ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΤΟΝ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΣΟΥΪΛΕΜΕΖΗ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ

ΛΑΡΙΣΑ - 2023

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΤΟΝ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ»

Ονοματεπώνυμο φοιτήτριας: **Σουϊλεμέζη Σταυρούλα**

Πατρώνυμο: **Ευθύμιος**

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: **Ψαρρά Άννα-Μαρία**

Εργαστήριο: **Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα**

«Investigation of the effect of extracts of plant origin on energy metabolism of neural cells»

Name of student: **Souilemezi Stavroula**

Father's name: **Efthimios**

Supervisor Professor: **Psarra Anna-Maria**

Laboratory: **Structural and Functional Biochemistry, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, School of Health Sciences, Larissa, Greece**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΨΑΡΡΑ ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας - Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 5
ABSTRACT 6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 7
1.1 Η Μαστίχα Χίου 7
1.1.1 Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του Μαστιχόδεντρου Χίου 7
1.1.2 Η χρήση της Μαστίχας Χίου στην παραδοσιακή Ιατρική 7
1.1.3 Η χημική σύσταση της ρητίνης της Μαστίχας Χίου 8
1.2 Οι μεταβολικές και θεραπευτικές δράσεις της Μαστίχας Χίου 8
1.2.1 Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες 8
1.2.2 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες 9
1.2.3 Αντικαρκινικές και αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες 9
1.2.4 Αντι-υπερλιπιδαιμικές ιδιότητες 9
1.3 Μιτοχόνδριακή δομή και λειτουργίες 10
1.4 Γλυκοκορτικοειδή 10
1.4.1 Γενικές πληροφορίες για τα γλυκοκορτικοειδή 10
1.4.2 Σύνθεση και έκκριση γλυκοκορτικοειδών 11
1.4.3 Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR) 12
1.4.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών 13
1.4.5 Βιολογικές δράσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών 15
1.5 Υποδοχέας του πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων (PPAR) 16
1.5.1 Δομή του υποδοχέα PPAR 16
1.5.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται ο PPAR 17
1.5.3 Βιολογικές επιδράσεις του PPARα 17
1.6 Οιστρογόνα 18
1.6.1 Γενικές πληροφορίες για τα οιστρογόνα 18
1.6.2 Σύνθεση και έκκριση οιστρογόνων 18
1.6.3 Υποδοχέας οιστρογόνων 19
1.6.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια του υποδοχέα οιστρογόνων 20
1.6.5 Ρόλος των οιστρογόνων και των υποδοχέων τους στα μιτοχόνδρια 21
1.6.6 Νευροπροστασία και οιστρογόνα 22
1.7 Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας 22
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 23
2.1 Οργανολογία 23

2.2 Υλικά 24
2.2.1 Χημικά/Αντιδραστήρια 24
2.2.2 Αναλώσιμα υλικά 25
2.2.3 Παρασκευή Διαλυμάτων 25
2.2.4 Αντισώματα 26
2.2.5 Κυτταρικές σειρές 27
2.2.6 Θρεπτικά μέσα κυτταροκαλλιεργειών 27
2.3 Μέθοδοι-Τεχνικές 28
2.3.1 Κλασμάτωση της ρητίνης προερχόμενη από Μαστιχόδεντρο της Νότιας Χίου 28
2.3.2 Βιοχημικές τεχνικές εντός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών 28
2.3.3 Βιοχημικές τεχνικές εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών 32
2.3.4 Επεξεργασία αποτελεσμάτων-Στατιστική Ανάλυση 34
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 35
3.1 Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας από τη ρητίνη του Pistacia lentiscus L. var. chia στη βιωσιμότητα των κυττάρων SH-SY5Y που έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του κυτταροτοξικού παράγοντα H_2O_2 700μM για 6 ώρες 35
3.2 Διερεύνηση της επίδρασης κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας από τη ρητίνη του Pistacia lentiscus L. var. chia στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) και του υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPARα) σε κύτταρα SH-SY5Y που έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του H_2O_2 700μM για 6 ώρες 36
3.3 Διερεύνηση της επίδρασης κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας από τη ρητίνη του Pistacia lentiscus L. var. chia στα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ σε κύτταρα SH-SY5Y που έχουν συνεπωαστεί απουσία και παρουσία H_2O_2 700μM για 6 ώρες και E2 10^{-9}M για 24 ώρες 40
3.4 Διερεύνηση της επίδρασης διαφορετικής πολικότητας κλασμάτων από τη ρητίνη του Pistacia Lentiscus L. var. chia στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) σε κύτταρα SH-SY5Y που έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία H_2O_2 700μM για 6 ώρες 45
3.5 Διερεύνηση της επίδρασης των διαφορετικής πολικότητας κλασμάτων από τη ρητίνη του Pistacia lentiscus L. var. chia στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης των κυττάρων SH-SY5Y που έχουν έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του κυτταροτοξικού παράγοντα H_2O_2 700μM για 6 ώρες. 48
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ 51
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 55
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ 60

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Μαστίχα Χίου παράγεται από τη ρητίνη του φυτού Pistacia lentiscus L. var. Chia και μελέτες για τη χημική της σύσταση έχουν δείξει πως αποτελείται κυρίως από τριτερπένια, τα οποία δομικά μοιάζουν αρκετά με τα γλυκοκορτικοειδή. Τα γλυκοκορτικοειδή ανήκουν στην κατηγορία των στεροειδών ορμονών και παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές και αντιαποπτωτικές δράσεις. Ο υποδοχέας πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPARα) εμπλέκεται στη β-οξείδωση των λιπιδίων και αποτελεί φαρμακευτικό στόχο για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών διαταραχών. Ακόμη, τα οιστρόγονα, είναι στεροειδείς ορμόνες οι οποίες φαίνεται να παρουσιάζουν νευροπροστατευτικές ιδιότητες και επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Κύριος στόχος της πτυχιακής εργασίας αποτελούσε η ανάδειξη της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης διαφορετικής πολικότητας κλασμάτων ρητίνης της Μαστίχας Χίου (Α: μη πολικό, Β: ημιπολικό, C: πολικό) έναντι του οξειδωτικού στρες που προκλήθηκε παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα υπεροξείδιου του υδρογόνου (H_2O_2) στην καλλιέργεια των κυττάρων SH-SY5Y. Επιπλέον, διερευνήθηκε ο πιθανός ενισχυτικός ρόλος παρουσία οιστραδιολής (Ε2) στην αντίσταση του οξειδωτικού στρες των κυττάρων SH-SY5Y που επωάστηκαν με κλάσματα ρητίνης αλλά και με υπεροξειδίο του υδρογόνου. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι βιοχημικοί μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτελούνται αυτές οι δράσεις με έμφαση στη διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής υποδοχέων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον ενεργειακό μεταβολισμό όπως του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), των υποδοχέων οιστρογόνων (ERα, ERβ) και του υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPARα). Εφαρμόστηκαν μια σειρά από πειραματικές διαδικασίες όπως ανοσοαποτύπωση κατά Western, μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας μέσω του MTT καθώς και μελέτη των μεταβολών του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω της μεθόδου JC-1. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το κλάσμα Α προκαλεί αντίσταση στη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας παρουσία του H_2O_2. Ακόμη, τα κλάσματα Α και Β απουσία H_2O_2 οδήγησαν σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR ενώ παρουσία του H_2O_2 προκαλούν αντίσταση στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα. Με την προσθήκη Ε2, φαίνεται να ενισχύεται η δράση των κλασμάτων Α και C καθώς μετριάζει τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ και του ERα που προκλήθηκε παρουσία H_2O_2. Επιπρόσθετα, τα κλάσματα ρητίνης παρουσία του H_2O_2, προκαλούν αντίσταση στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα GR και αποτρέπουν την εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Συγκρίνοντας τα κλάσματα παρατηρούμε πως το κλάσμα Α συγκέντρωσης 20μg/ml είναι το πιο νευροπροστατευτικό.

Λέξεις κλειδιά: Μαστίχα Χίου, Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR), Υποδοχέας πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPARα), Υποδοχείς οιστρογόνων (ERα, ERβ), Μιτοχόνδρια, Οξειδωτική φωσφορυλίωση, Οξειδωτικό στρες, Νευροπροστασία

ABSTRACT

Chios Mastic is produced from the resin of the plant Pistacia lentiscus L. var. Chia and consists mainly of triterpenes. Glucocorticoids belong to the class of steroid hormones and exhibit antioxidant and anti-apoptotic activities. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα) is involved in the beta-oxidation of lipids and is a drug target for the treatment of neurodegenerative disorders. Furthermore, estrogens, are steroid hormones which appear to exhibit neuroprotective properties and induce transcription of genes involved in oxidative phosphorylation. The main aim of this thesis was to investigate the possible neuroprotective effect of different polarity of Chios mastic resin fractions (A: non-polar, B: semi-polar, C: polar) against oxidative stress induced in the presence of the oxidant hydrogen peroxide (H_2O_2) in the culture of SH-SY5Y cells. In addition, the possible additive effect of the presence of estradiol (E2) on oxidative stress resistance of SH-SY5Y cells incubated with both resin and hydrogen peroxide fractions was investigated. Specifically, the biochemical mechanisms through which these actions are carried out were studied with emphasis on investigation of possible involvement of receptors that play an important role in energy metabolism such as glucocorticoid receptor (GR), estrogen receptors (ERα, ERβ) and peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα). A number of experimental procedures were applied such as Western immunoprecipitation, measurement of cell viability by MTT and study of changes in mitochondrial membrane potential by JC-1 method. The results showed that fraction A causes resistance to the decrease in cell viability induced upon H_2O_2 treatment. Furthermore, A and B fraction in the absence of H_2O_2 led to an increase in the protein levels of GR while in the presence of H_2O_2 they cause resistance to decrease the protein levels of PPARα. The addition of E2 seems to enhance the activity of fractions A and C as it moderate the decrease in protein levels of ERβ and ERα induced in the presence of H2O2. In addition, resin fractions in the presence of H_2O_2, cause resistance to the reduction of GR receptor protein levels and prevent mitochondrial membrane depolarization. Comparing the fractions, we observe that A fraction at concentration of 20 μg/ml is the most neuroprotective.

Key words: Chios mastic, Glucocorticoid receptor (GR), Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα), Estrogen receptors (ERα, ERβ), Mitochondria, Oxidative phosphorylation, Oxidative stress, Neuroprotection

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η Μαστίχα Χίου

1.1.1 Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του Μαστιχόδεντρου Χίου

Η Μαστίχα Χίου αποτελεί μια φυσική και αρωματική ρητίνη που λαμβάνεται από τον κορμό και τα κλαδιά του φυτού Pistacia lentiscus var. Chia γνωστό και ως Μαστιχόδεντρο ή σχίνος. Το Μαστιχόδεντρο φτάνει σε ύψος τα 2-3 μέτρα και αναπτύσσεται αργά καθώς είναι έτοιμο για καλλιέργεια μετά από 40-50 χρόνια (Ganos et al. 2022). Η παραγωγή της μαστίχας ξεκινά μετά την ολοκλήρωση του 5^{ου} ή του 6^{ου} χρόνου καλλιέργειας του φυτού. Παρά το γεγονός ότι το P. lentiscus κατανέμεται σε όλη τη Μεσόγειο, η ποικιλία Chia καλλιεργείται αποκλειστικά στη Χίο, όπου πραγματοποιείται μεγάλης κλίμακας παραγωγή μαστίχας. Ειδικότερα, η Μαστίχα Χίου καλλιεργείται μόνο στο νότιο τμήμα του νησιού εξαιτίας των κλιματικών και εδαφικών συνθηκών που επικρατούν εκεί (Andreadou et al. 2016). Στη Χίο επικρατεί μεσογειακό κλίμα που χαρακτηρίζεται από μακρά, ζεστά και ξηρά καλοκαίρια καθώς και ψυχρούς χειμερινούς μήνες (Stefi et al. 2022). Ακόμη στο νότιο τμήμα του νησιού, το οποίο είναι λοφώδες, τα ξηρά και ζεστά καλοκαίρια των Μαστιχοχωρίων επιτρέπουν στη μαστίχα να στεγνώσει (Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου- gummastic.gr).

Εικόνα 1: Το Μαστιχόδεντρο Χίου, το οποίο καλλιεργείται στο νότιο τμήμα του νησιού και από το οποίο παράγεται η ρητίνη (Ierapetritis 2010).

1.1.2 Η χρήση της Μαστίχας Χίου στην παραδοσιακή Ιατρική

Η συγκομιδή της Μαστίχας Χίου πραγματοποιείται πάνω από 2500 χρόνια και είναι ήδη γνωστή από την αρχαιότητα εξαιτίας των θεραπευτικών της ιδιοτήτων. Ειδικότερα, υπάρχουν αναφορές για τη χρήση της Μαστίχας Χίου σε κείμενα σημαντικών προσωπικοτήτων όπως του Διοσκουρίδη, του Γαληνού και του Παράκελσου που τονίζουν πως θεραπεύει γαστρεντερικές και φλεγμονώδεις διαταραχές, όπως πεπτικά έλκη (Pachi et al. 2020). Ειδικότερα, ο Διοσκουρίδης, αναφέρει ότι η Μαστίχα Χίου ενδείκνυται για το βήχα, το στομάχι, τον αρωματισμό της αναπνοής και για μάσκες ομορφιάς. Ο Γαληνός, συνιστά τη Μαστίχα Χίου για την αντιμετώπιση φλεγμονών του στομάχου, του εντέρου και του ήπατος. Ο Παράκελσος, αναφέρει στο έργο του τις επουλωτικές ιδιότητες της ρητίνης της Μαστίχας Χίου. Να τονιστεί πως το 2015, η Μαστίχα Χίου συμπεριλήφθηκε στην κατηγορία των παραδοσιακών φυτικών φαρμάκων με βάση τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων

(EMA), ο οποίος εγκρίνει τη χρήση της για την αντιμετώπιση ήπιων δυσπεπτικών και γαστρεντερικών διαταραχών και φλεγμονών του δέρματος. (Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου- gummastic.gr).

1.1.3 Η χημική σύσταση της ρητίνης της Μαστίχας Χίου

Όσο αναφορά τη χημική της σύσταση, τα τριτερπένια αποτελούν τη σημαντικότερη χημική ομάδα της ρητίνης, καθώς αντιπροσωπεύουν το 65-70% του συνολικού βάρους της. Να σημειωθεί πως η ακατέργαστη ρητίνη περιέχει σε υψηλό ποσοστό (30%) ένα αδιάλυτο και κολλώδες πολυμερές (1,4-poly-β-myrcene), το οποίο συγκρατεί τις βιοδραστικές ενώσεις της ρητίνης όλες μαζί (Pachi et al. 2020, Paraschos et al. 2007). Όμως έχει αναφερθεί πως το πολυμερές 1,4-poly-β-myrcene μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα των υπόλοιπων δραστικών ενώσεων που περιέχονται στη ρητίνη, επομένως αφαιρείται καθώς δυσχεραίνει το χειρισμό και την επεξεργασία των δειγμάτων (Pachi et al. 2020).

Η ανάλυση του μη πολικού κλάσματος έδειξε ότι το ίδιο αποτελείται από 235,5 mg του πολυμερούς 1,4-poly-β-myrcene, 418,2 mg keto-oleanolic aldehyde και 152,3 mg της oleanolic aldehyde. Έπειτα, η ανάλυση του ημιπολικού κλάσματος έδειξε ότι σε αυτό περιέχονται 261,5 mg oleanolic aldehyde, 218,5 mg lupeol και 341,3 mg μείγματος τριτερπενοειδών οξέων. Στο πολικό κλάσμα κυριαρχούν φαινολικές ενώσεις ενώ παρατηρήθηκε έλλειψη τριτερπενοειδών (Kalousi et al. 2023).

Η ανάλυση του ουδέτερου κλάσματος με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS), έδειξε ότι αποτελείται από επτά τετρακυκλικά και πεντακυκλικά τριτερπενοειδή (tirucallol, dipterocarpol, lupeol, β-amyrin, β-amyrone, oleanonic aldehyde και germanicol) (Marner et al. 1991). Το όξινο κλάσμα υποβλήθηκε σε διάφορους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με αποτέλεσμα την απομόνωση των κυριότερων τριτερπενικών οξέων όπως oleanonic acid, oleanolic acid, moronic acid, 24Z-masticadienonic acid (MNA), 24Z-isomasticadienonic acid (IMNA), 24Z-masticadienolic acid, 24Z-isomasticadienolic acid, 3-O-Acetyl-3-epi-(iso)masticadienolic acid, 3,4-Seco-28-norolean-12-en-3-oic acid, 18-α-H-Oleanonic acid, 3-Epi-(iso)masticadienolic acid, Masticadienolic acid (Paraschos et al. 2007, Assimopoulou et al. 2005). Επιπλέον, η ρητίνη του Μαστιχόδεντρου Χίου περιέχει ίχνη διαφόρων φαινολικών ενώσεων όπως tyrosol, vanillic acid, gallic acid, trans-cinnamic acid, o-coumaric acid, p-hydroxy-benzoic acid, p-hydroxy-phenylacetic acid, Syringic acid, Ferulic acid, Oleanolic acid, caffeic acid (Kaliora et al. 2004).

1.2 Οι μεταβολικές και θεραπευτικές δράσεις της Μαστίχας Χίου

1.2.1 Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες

Κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει την αντιφλεγμονώδη δράση του μαστίχας Χίου σε ασθενείς με νόσο του Crohn. Η νόσος του Crohn είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος που μπορεί να προσβάλει οποιοδήποτε επίπεδο του γαστρεντερικού σωλήνα κατά την οποία φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα (TNF-α), έχουν καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή και ενίσχυση του φλεγμονώδους καταρράκτη. Έχει αναφερθεί αυξημένη συγκέντρωση του παράγοντα νέκρωσης όγκων άλφα TNF-α, της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης CRP και της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) σε ασθενείς με νόσο του Crohn (Kaliora et al. 2007). Ειδικότερα, σε μια μικρή κλινική μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 10 ασθενείς με νόσο του Crohn και στους οποίους χορηγήθηκαν δισκία μαστίχας Χίου για 4 εβδομάδες (2,2 g/ημέρα), παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων της

ιντερλευκίνης-6, της CRP και του TNF-α, ενώ δεν αναφέρθηκαν σημαντικές παρενέργειες. (Kaliora et al. 2007).

1.2.2 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Έρευνες έχουν εστιάσει στη χρησιμότητα των φυτικών ενώσεων, οι οποίες παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων όπως αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση της αθηροσκλήρωσης. Διερευνώντας in vitro, τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου, αποδείχθηκε πως η μαστίχα εμποδίζει την οξείδωση της λιποπρωτεϊνης χαμηλής πυκνότητας (LDL). Να τονιστεί πως η οξειδωμένη LDL, εμφανίζει προφλεγμονώδεις ιδιότητες, συμβάλλοντας δραστικά στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Έτσι, γίνεται αντιληπτό πως η μαστίχα και συγκεκριμένα συστατικά της όπως τα τριτερπένια (amyrin, oleanolic acid, lupeol) εμφανίζουν μια προστατευτική δράση ενάντια στην οξείδωση της LDL (Andrikopoulos et al. 2003). Μελέτη σε περιφερειακά κύτταρα του αίματος (PBMC), συνπαρουσία oxLDL και πολικού κλάσματος Μαστίχας Χίου για 48 και 72 ώρες, απέδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του αντιοξειδωτικού γλουταθείονης (GSH). Παρόμοια αντιοξειδωτική δράση παρατηρήθηκε και σε κύτταρα PBMC που συνεπωάστηκαν με το πολυφαινολικό κλάσμα της ρητίνης και oxLDL καθώς παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της γλουταθειόνης κατά 5% ενώ η συνεπώαση των κυττάρων με τριτερπενικό κλάσμα ρητίνης και oxLDL οδήγησε σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της GSH κατά 23,6% (Dedoussis et al. 2004).

1.2.3 Αντικαρκινικές και αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες

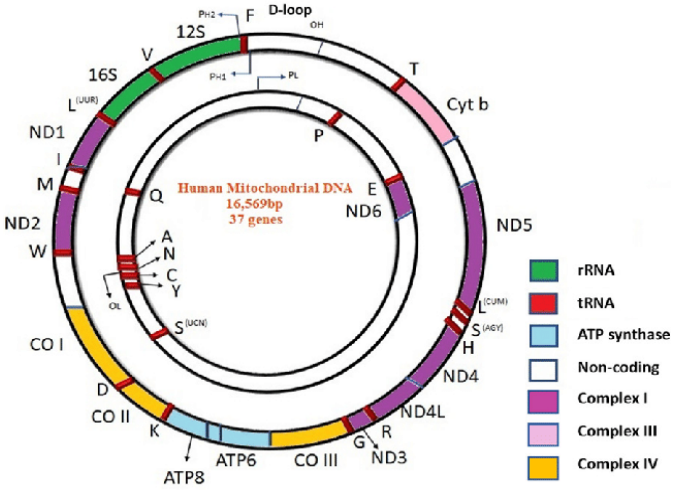
Η πρόσληψη ενώσεων φυτικής προέλευσης έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου και σημαντική αύξηση του ρυθμού επιβίωσης των καρκινοπαθών. Αρκετές πειραματικές μελέτες τόσο in vitro όσο και σε ζώα αποδεικνύουν τις αντικαρκινικές και αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις της Μαστίχας Χίου. Πειραματική μελέτη καταγράφει πως η μαστίχα Χίου in vitro αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει τον κυτταρικό θάνατο σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα HCT116. Ειδικότερα, αποδείχθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής πως η μαστίχα προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 σε κύτταρα HCT116 τα οποία επωάστηκαν για 72 ώρες παρουσία εκχυλισμάτων ρητίνης Μαστίχας Χίου. Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε πως η επαγωγή της απόπτωσης σε κύτταρα HCT116, που έχουν επωαστεί παρουσία εκχυλισμάτων μαστίχας, συσχετίζεται από την ενεργοποίηση της κασπασών. Ειδικότερα, σύμφωνα με πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, βρέθηκαν μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα προκασπάσης 3 (Balan et al. 2007).

1.2.4 Αντι-υπερλιπιδαιμικές ιδιότητες

Αξιοσημείωτες είναι και οι υπερλιπιδαιμικές δράσεις της Μαστίχας Χίου που έχουν διατυπωθεί σε διάφορες πειραματικές μελέτες. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι επιδράσεις των διαφόρων συστατικών ελαίου της μαστίχας Χίου στην περιεκτικότητα των λιπιδίων του πλάσματος σε υπερλιπιδαιμικούς αρουραίους. Βρέθηκε πως η αντι-λιπιδαιμική δράση της μαστίχας Χίου είναι δοσοεξαρτώμενη και οφείλεται στο μονοτερπένιο camphene. Συγκεκριμένα, στους υπεριλιπιδαιμικούς αρουραίους στους οποίους χορήγησαν camphene, παρατηρήθηκε μείωση της ολικής χοληστερόλης κατά 19,4%, της LDL-χοληστερόλης κατά 18,1% και των τριγλυκεριδίων κατά 22,9% (Vallianou et al. 2011).

1.3 Μιτοχόνδριακή δομή και λειτουργίες

Γενικά, τα μιτοχόνδρια αποτελούν κυτταρικά οργανίδια, στα οποία περιέχονται πολλά πανομοιότυπα αντίγραφα του γενετικού τους υλικού. Ειδικότερα, το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι ένα κυκλικό, δίκλωνο DNA χωρίς ιντρόνια, μήκους περίπου 16,6 kb. Αποτελείται από δύο αλυσίδες μια βαριά (H) και μια ελαφριά αλυσίδα (L). Η αλυσίδα L μεταγράφεται από έναν υποκινητή (PL) και η αλυσίδα Η από δύο γειτονικούς υποκινητές (PH1, PH2). Όλοι οι υποκινητές εντοπίζονται στο βρόχο D. Η μεταγραφή από τους υποκινητές PH2 και PL παράγει μεγάλα πολυκιστρονικά προϊόντα, τα οποία υποβάλλονται σε επεξεργασία παράγοντας ώριμα mRNA και tRNA. Αντίθετα η μεταγραφή από το PHI παράγει ένα σύντομο πρόδρομο μόριο που περιέχει δύο rRNAs. Το mtDNA έχει μόνο 37 γονίδια: 11 mRNAs, που μεταφράζονται σε 13 πρωτεΐνες, 2 ριβοσωμικά RNAs (rRNAs, 12S και 16S) και 22 tRNAs (Psarra et al. 2008).



Εικόνα 2: Η δομή του μιτοχονδριακού DNA (Rambani et al. 2022).

Τα μιτοχόνδρια θεωρούνται σημαντικά οργανίδια λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν ενέργεια με τη μορφή ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Ακόμη τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν στη σηματοδότηση του ασβεστίου, στη σύνθεση της αίμης, στο κυτταρικό θάνατο, στη θερμογένεση και στη βιοσύνθεση στεροειδών ορμονών (Kokkinopoulou et al. 2021).

1.4 Γλυκοκορτικοειδή

1.4.1 Γενικές πληροφορίες για τα γλυκοκορτικοειδή

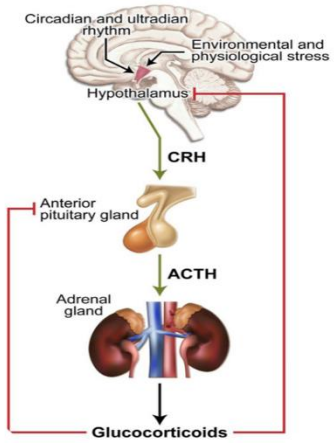
Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) είναι στεροειδείς ορμόνες με χαρακτηριστικό παράδειγμα την κορτιζόλη και εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες όπως στο μεταβολισμό, στην ομοιόσταση του νερού και ηλεκτρολυτών, στην ανοσολογική απόκριση, στην ανάπτυξη, στην καρδιαγγειακή λειτουργία, στις γνωστικές λειτουργίες και στην αναπαραγωγή (Timmermans et al. 2019). Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν καταβολική δράση καθώς συμβάλλουν στη διάσπαση των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση αμινοξέων, όπου τα τελευταία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή γλυκόζης. Ακόμη φαίνεται να συμμετέχουν στη διάσπαση του γλυκογόνου και την απελευθέρωση λιπαρών οξέων (Cole et al. 2019).

Αξίζει να σημειωθεί, πως έχουν ανακαλυφθεί φυτικές ενώσεις που παρουσιάζουν παρόμοια δράση με αυτή των γλυκοκορτικοειδών. Συγκεκριμένα, τα τριτερπένια, που είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και προκύπτουν από το μονοπάτι του

μεβαλονικού οξέος, παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με τα γλυκοκορτικοειδή καθώς και αντιφλεγμωνώδεις και αντιαποπτωτικές ιδιότητες χωρίς να προκαλούν παρενέργειες. (Kalousi et al. 2022, Georgantopoulos et al. 2023).

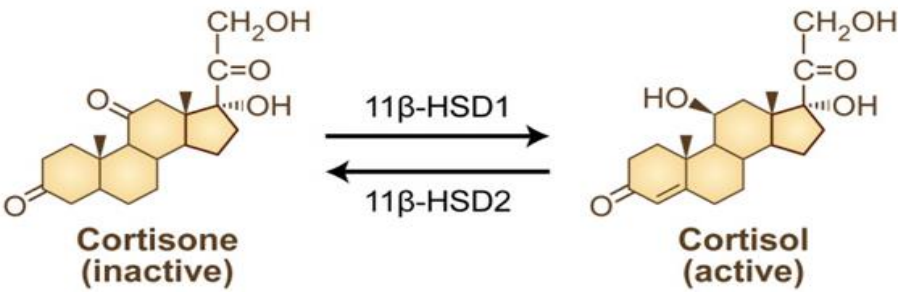
1.4.2 Σύνθεση και έκκριση γλυκοκορτικοειδών

Η βιοσύνθεση και η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών ρυθμίζεται μέσω του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA axis). Αρχικά, ο υποθάλαμος εκκρίνει την ορμόνη απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης (CRH) ως απόκριση στο στρες. Έπειτα η CRH, μεταφέρεται και διεγείρει την υπόφυση με αποτέλεσμα την έκκριση της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH). Η ACTH απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος και μεταφέρεται στη στηλιδωτή ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων με αποτέλεσμα τη σύνθεση και την έκκριση κορτιζόλης. Η διατήρηση της ομοιόστασης των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών πραγματοποιείται μέσω της αρνητικής ανατροφοδότησης (Kadmiel et al. 2013).



Εικόνα 3: Ρύθμιση της έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών μέσω του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (Kadmiel et al. 2013).

Η ενεργότητα των γλυκοκορτικοειδών ρυθμίζεται από το ένζυμο που 11-β αφυδρογονάση των υδροξυστεροειδών (11-β HSD). Η ισομορφή 1 του ενζύμου (11-β HSD1) μετατρέπει την ανενεργή κορτιζόνη σε ενεργή κορτιζόλη ενώ η ισομορφή 2 του ενζύμου (11-β HSD2) καταλύει την αντίστροφη αντίδραση δηλαδή τη μετατροπή της κορτιζόλης σε κορτιζόνη (Kadmiel et al. 2013).

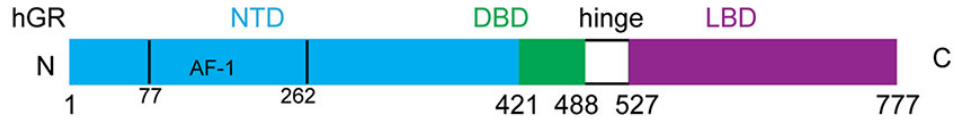


Εικόνα 4: Ρύθμιση της βιοδιαθεσιμότητας της κορτιζόλης μέσω των ενζύμων 11-β HSD-1 και 11-β HSD-2 (Kadmiel et al. 2013).

1.4.3 Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR)

1.4.3.1 Δομή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR) ανήκει στην κατηγορία των πυρηνικών υποδοχέων. Πρόκειται για έναν μεταγραφικό παράγοντα που ενεργοποιείται από στεροειδείς ορμόνες και ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό, την ανάπτυξη, το στρες και τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Ο GR κωδικοποιείται από το γονίδιο NR subgroup 3 group C member 1 (NR3C1) που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 (5q31). Αποτελείται από 777 αμινοξέα και οργανώνεται σε 3 επικράτειες: την αμινοτελική επικράτεια (NTD), την επικράτεια σύνδεσης στο DNA (DBD) και την επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη (LBD) που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο. Μεταξύ των επικρατειών DBD και LBD, υπάρχει μια μικρή περιοχή εύκαμπτης σύνδεσης. Η NTD περιέχει μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (AF-1) που απαιτείται για πλήρη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα (Frank et al. 2021).

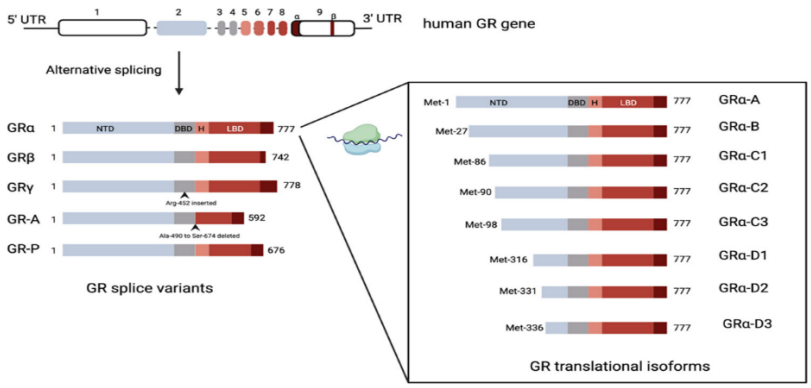


Εικόνα 5: Δομικές και λειτουργικές επικράτειες του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) (Frank et al. 2021).

1.4.3.2 Ισομορφές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Αρχικά, αξίζει να αναφερθεί πως το εναλλακτικό μάτισμα του πρωτογενούς mRNA του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών οδηγεί στην παραγωγή 5 εναλλακτικών μεταγράφων και συγκεκριμένα των GRα, GRβ, GRγ, GR-A και GR-P. Οι υποδοχείς GRα και GRβ εμφανίζουν σχεδόν πανομοιότυπη αλληλουχία αλλά διαφέρουν στο εξώνιο 9 που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο. Στον GRβ, απουσιάζει η αλληλουχία που κωδικοποιοεί την 11η και 12η έλικα της επικράτειας LBD, καθιστώντας τον ανίκανο να δεσμεύσει γλυκοκορτικοειδή (Bhaumik et al. 2023). Ο GRβ φαίνεται να αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του GRα, καθώς ανταγωνίζεται τον GRα για τη σύνδεση στις αλληλουχίες απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs) αλλά και δημιουργεί ανενεργά ετεροδιμερή σύμπλοκα μαζί του (Ramos-Ramírez et al. 2021).

Λόγω της εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης, προκύπτουν συνολικά 8 ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών από κάθε μετάγραφο. Συγκεκριμένα, στο εξώνιο 2, υπάρχουν οκτώ συντηρημένα κωδικόνια έναρξης AUG που παράγουν διάφορες ισομορφές GR συμπεριλαμβανομένων των GRα-A, -B, -C1, -C2, -C3, -D1, -D2 και -D3. Επιπλέον, κάθε ισομορφή μπορεί να υπόκειται σε διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με αποτέλεσμα τη μεταβολή της λειτουργίας του υποδοχέα (Bhaumik et al. 2023).



Εικόνα 6: Τα μετάγραφα που προκύπτουν από την εναλλακτική ωρίμανση του mRNA του ανθρώπινου πρωτεγενούς μεταγράφου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών καθώς και οι διαφορετικές ισομορφές του υποδοχέα GRα που προκύπτουν εξαιτίας της εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης (Bhaumik et al. 2023).

1.4.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

1.4.4.1 Γενωμικό μονοπάτι

Αρχικά, σε κατάσταση ηρεμίας, ο GR βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή μορφή καθώς συνδέεται με ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών συνοδών που αποτελείται από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ HSP90, HSP70 και HSP56, καθώς και τις ανοσοφιλίνες KBP51, FKBP52, Cyp44 και PP5. Μετά τη δέσμευση του κατάλληλου προσδέτη, ο υποδοχέας GR υφίσταται αλλαγή στερεοδιαμόρφωσης, η οποία περιλαμβάνει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση και ακετυλίωση. Αυτή η αναδιάταξη εκθέτει τα δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού του και έτσι ο GR μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου μπορεί να ρυθμίσει τη μεταγραφή διάφορων γονιδίων στόχων του (Liu et al. 2019). Συγκεκριμένα, στο εσωτερικό του πυρήνα, ο GR ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του με τρεις κύριους τρόπους:

(i) Μέσω άμεσης σύνδεσης με τις αλληλουχίες απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs)
(ii) Μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες
(iii) Μέσω άμεσης σύνδεσης με τα GREs όσο και με αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες.

Η αλληλουχία GRE στην οποία ο GR δεσμεύεται ως ομοδιμερές, είναι παλίνδρομη και αποτελείται από δύο τμήματα 6 ζευγών βάσεων που χωρίζονται από τρία ζεύγη βάσεων (5’-AGAACAnnnTGTTCT-3’) (Meijsing et al. 2009). Η σύνδεση του συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα σε αρνητικά στοιχεία GREs (nGREs) μπορεί να καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Ειδικότερα, η αλληλουχία nGRE είναι η 5’-CTCC(n)0-2GGAGA-3’ και σε αυτή συνδέεται ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών ως μονομερές (Hudson et al. 2013).

1.4.4.2 Μη γενωμικό μονοπάτι

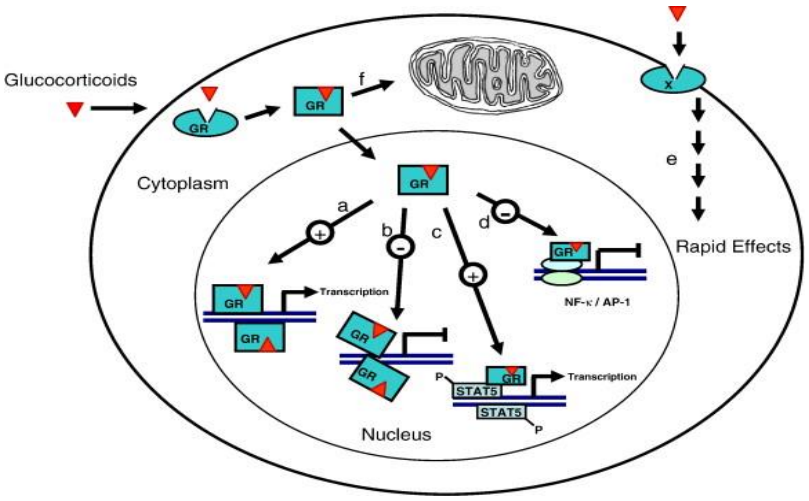
Εκτός από το γενωμικό σηματοδοτικό μονοπάτι δράσης των γλυκοκορτικοειδών, που συνήθως διαρκεί ώρες, τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν επίσης να ασκήσουν τις δράσεις τους εντός λεπτών μέσω μη γονιδιωματικών σηματοδοτικών μηχανισμών. Συγκεκριμένα, στο μη γενωμικό μονοπάτι δεν πραγματοποιείται μεταγραφή και μετάφραση γονιδίων στόχων, αλλά επιτελούνται βιολογικές δράσεις κυρίως μέσω του μεμβρανικού υποδοχέα GR (mGR) που είναι συζευγμένος με πρωτεΐνη G είτε μέσω του GR που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (cGR). Το σύμπλοκο GR-προσδέτης

φαίνεται να ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K-Akt, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να ενεργοποιήσει την ενδοθηλιακή συνθάση μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) (Panettieri et al. 2019).

1.4.4.3 Μιτοχονδριακό μονοπάτι

Οι επιδράσεις των GCs στα μιτοχόνδρια εξαρτώνται από τη δόση και από το χρόνο έκθεσης. Συγκεκριμένα χαμηλή δόση ή μικρό χρόνο έκθεσης των κυττάρων σε GCs οδηγεί σε αύξηση της βιογένεσης των μιτοχονδρίων, επαγωγή της έκφρασης των ενζύμων που συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα και αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Du et al. 2009).

Αποτελέσματα πειραματικής μελέτης απέδειξαν ομολογία μεταξύ των αλληλουχίων μιτοχονδρίων και των στοιχείων απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (GREs) (Sekeris 1990). Ακόμη, εντοπίστηκε ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια διάφορων κυτταρικών τύπων όπως HeLa, HepG2 και SaOS-2 (Psarra et al. 2006). Για τη διερεύνηση της σύνδεσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε μιτοχονδριακές αλληλουχίες που είναι ομόλογες με τις GREs, μελετήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα γονιδίων που κωδικοποιούνται από το μιτοχόνδριο μετά από προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε κύτταρα HepG2. Παρατηρήθηκε ότι στα κύτταρα HepG2, η παρουσία δεξαμεθαζόνης οδήγησε σε αύξηση της μεταγραφής αρκετών γονιδίων, όπως των μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων TFAM, TFB1M, TFB2M, των 12 S και 16 S RNA και διάφορων μιτοχονδριακών γονιδίων OXPHOS, όπως των υπομονάδων I-IV της NADH-CoQ-αναγωγάσης (ND I-IV), του κυτόχρωμα b (Cyt b), της ATP-συνθάσης 6 και 8 (ATP 6 και ATP 8) και της υπομονάδας 1 της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COX I). Έρευνες αποδεικνύουν ότι τα γλυκοκορτικοειδή οδηγούν στην αύξηση των μεταγράφων COXI και COXIII στους σκελετικούς μύες αρουραίου, του COXII στα κύτταρα GH4C1 της υπόφυσης αρουραίου και του COXIII στην εγκεφαλική περιοχή του ιππόκαμπου αρουραίου. Επομένως, τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να επάγουν άμεσα τη μιτοχονδριακή μεταγραφή μέσω του GR, επηρεάζοντας τη βιοσύνθεση των ενζύμων OXPHOS (Psarra et al. 2011, Psarra et al. 2008).



Εικόνα 7: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται τα γλυκοκορτικοειδή (Psarra et al. 2008).

1.4.5 Βιολογικές δράσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

1.4.5.1 Εμπλοκή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στο μεταβολισμό της γλυκόζης και στο μεταβολισμό των λιπιδίων

Τα γλυκοκορτικοειδή, αναστέλλουν την πρόσληψη και την οξείδωση της γλυκόζης στους σκελετικούς μύες και στο λευκό λιπώδη ιστό. Ειδικότερα, πειραματική μελέτη απέδειξε ότι η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών οδήγησε σε μείωση της πρόσληψης της γλυκόζης και αναστολή της μετατόπισης του υποδοχέα GLUT4 στην πλασματική μεμβράνη σε μυϊκά κύτταρα ποντικού, τα οποία έχουν διεγερθεί από ινσουλίνη (Weinstein et al. 1998, Alam et al. 2016). Αξίζει να αναφερθεί, πως πειραματικές μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τα γλυκοκορτικοειδή μέσω του γενωμικού μονοπατιού, οδηγούν σε αύξηση της μεταγραφής και της έκφρασης ενζύμων που συμμετέχουν στη λιπόλυση όπως της τριγλυκεριδικής λιπάσης του λιπώδους ιστού ATGL και της ορμονοευαίσθητης λιπάσης HSL (Peckett et al. 2011).

1.4.5.2 Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών και οξειδωτικό στρες

Δεδομένα της παγκόσμιας βιβλιογραφίας υποστηρίζουν πως η επώαση των κυττάρων με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη και αποδεκτή διαδικασία για την πρόκληση οξειδωτικού στρες σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Κατά το οξειδωτικό στρες υπερπαράγονται ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS), οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε απορρύθμιση της λειτουργίας του μιτοχονδρίου. Συγκεκριμένα, το οξειδωτικό στρες, διαταράσσει την ισορροπία μεταξύ αντιοξειδωτικών ενζύμων και ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) προκαλώντας βλάβες στο μιτοχονδριακό DNA, αποικοδόμηση πρωτεϊνών και λιπιδίων του μιτοχονδρίου και διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως τη νόσο Alzheimer και τη νόσο του Parkinson. Οι υψηλές ROS μπορούν να μειώσουν τη δραστικότητα διάφορων ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας όπως της αφυδρογονάσης NADH, της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και τη συνθάσης του ATP με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων ATP που παράγονται από τα μιτοχόνδρια και την επαγωγή της απόπτωσης (Guo et al. 2013). Κατά τη διάρκεια πειραματικής μελέτης, εξετάστηκε η επίδραση του H_2O_2 1mM στη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών έπειτα από επώαση των κυττάρων Hela με δεξαμεθαζόνη 100 nM. Ειδικότερα, η συνεπώαση των κυττάρων Hela με δεξαμεθαζόνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου, μείωσε τη μεταγραφική δραστικότητα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών καθιστώντας τον ανενεργό. Στην ίδια έρευνα, μετρήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western και παρατηρήθηκε πως η επώαση των κυττάρων παρουσία H_2O_2 δεν προκάλεσε μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα GR, υποδεικνύοντας ότι η μείωση της μεταγραφικής δραστικότητας του GR οφείλεται σε πιθανή μεταβολή της στερεοδιαμόρφωσής του και την οξείδωση της επικράτειας DBD (Makino et al. 1996).

1.4.5.3 Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών και νευροπροστασία

Πολλές μελέτες αποδεικνύουν τις νευροπροστατευτικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών. Ειδικότερα, σε μελέτη στην οποία διερευνήθηκε η προστατευτική δράση της κορτικοστερόνης (CORT), έναντι του οξειδωτικού στρες και της απόπτωσης που προκαλείται παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου για 24 ώρες σε νευρικά κύτταρα SH-SY5Y, βρέθηκε πως η μειωμένη βιωσιμότητα των κυττάρων που προκλήθηκε λόγω H_2O_2 συγκέντρωσης 250μM, αναστράφηκε με την προσθήκη CORT συγκέντρωσης 0,03 μM για 72 ώρες. Η αυξημένη έκφραση αποπτωτικών δεικτών, όπως οι PUMA και Bim που προκλήθηκε λόγω της παρουσίας οξειδωτικού

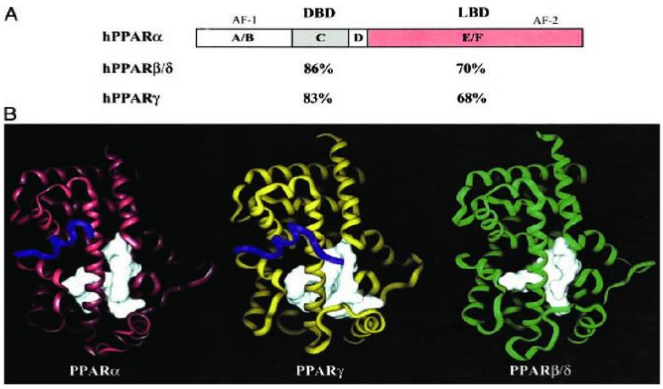
παράγοντα, μειώθηκε παρουσία CORT. Επιπλέον, η CORT μείωσε τις οξειδωτικές βλάβες που προκαλούνται από το H_2O_2 μέσω της ρύθμισης των αντιοξειδωτικών ενζύμων (GSH, MnSOD, HO-1) (Lee et al. 2022). Τα ευρήματα της συγκεκριμένης έρευνας υποδηλώνουν ότι η CORT ενισχύει την ενδοκυτταρική άμυνα έναντι του οξειδωτικού κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από το H_2O_2 προάγοντας έτσι την επιβίωση των νευρικών κυττάρων (Lee et al. 2022).

1.5 Υποδοχέας του πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων (PPAR)

1.5.1 Δομή του υποδοχέα PPAR

Οι υποδοχείς ενεργοποίησης του πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων (PPAR) είναι μεταγραφικοί παράγοντες και ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Οι PPARs ενεργοποιούνται από λιπαρά οξέα και περιλαμβάνουν τους ακόλουθους τρεις υποτύπους: PPARα, PPARγ, και PPARδ (Chinetti et al. 2000).

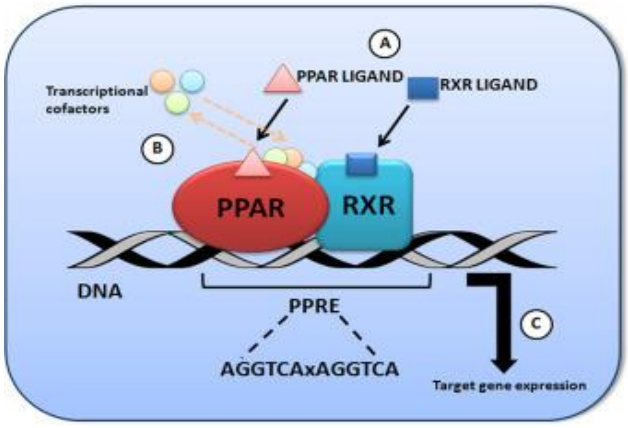
Σχετικά με τη δομή τους, αποτελούνται από τις πρωτεϊνικές επικράτειες A/B, C και E/F. Συγκεκριμένα, στην A/B συχνά λαμβάνουν χώρα μεταφραστικές τροποποιήσεις καθώς περιέχει μια ανεξάρτητη από τον προσδέτη περιοχή ενεργοποίησης 1 (AF-1). Μέσω της περιοχής C επιτυγχάνεται πρόσδεση στο DNA ενώ στη περιοχή E/F πραγματοποιείται σύνδεση του προσδέτη. Στην επικράτεια D φαίνεται να προσδένονται διάφοροι συμπαράγοντες. Η στρατολόγηση των συμπαράγοντων PPAR που συμμετέχουν στη διαδικασία μεταγραφής διαμεσολαβείται από την εξαρτώμενη από το προσδέτη περιοχή ενεργοποίησης-2 (AF-2), που βρίσκεται στην περιοχή E/F (Christofides et al. 2021).



Εικόνα 8: Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επικρατειών και των πρωτεϊνικών δομών των ισομορφών του υποδοχέα PPAR (Hihi et al. 2002).

1.5.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται ο PPAR

Σε αντίθεση με τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών, οι οποίοι δρουν ως ομοδιμερή, ο PPAR ετεροδιμερίζεται με τον υποδοχέα ρετινοειδών Χ (RXR), ο οποίος ανήκει στην ίδια υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Αυτό το ετεροδιμερές PPAR/RXR μπορεί να σχηματιστεί ακόμη και απουσία προσδέτη. Όταν πραγματοποιηθεί σύνδεση του προσδέτη, ο ίδιος μετακινείται στο πυρήνα και ρυθμίζει τη μεταγραφή διάφορων γονιδίων στόχων μέσω της σύνδεσης του σε στοιχεία απόκρισης (PPRE) (Rigano et al. 2017).



Εικόνα 9: Ρύθμιση της σηματοδότησης μέσω του PPARα (Rigano et al. 2017).

1.5.3 Βιολογικές επιδράσεις του PPARα

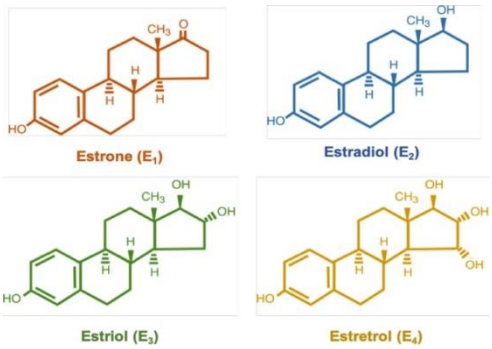
Όσο αναφορά τη λειτουργεία τους, έχει βρεθεί ότι ο PPARα διεγείρει τη γλυκονεογένεση και συμμετέχει στη σύνθεση της αίμης (Kersten et al. 1999). Η μεταγραφή του PPARα μπορεί να ρυθμιστεί και από τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και έχει δειχθεί πως υπάρχει φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των 2 υποδοχέων με αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής προφλεγμονωδών γονιδίων (Bougarne et al. 2009). Επιπλέον, επάγει τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα τριγλυκεριδίων στην κυκλοφορία του αίματος (Michalik et al. 2006).

Πολυάριθμες μελέτες καταδεικνύουν πως σε περιπτώσεις οξειδωτικού στρες, ο υποδοχέας PPARα συμβάλλει στη μεταγραφική ρύθμιση διάφορων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Συγκεκριμένα, μελέτη που έγινε ποντίκια που έπασχαν από ισχαιμία του μυοκαρδίου, η χορήγηση του clofibrate, ενός αγωνιστή του υποδοχέα PPARα, οδήγησε στη μείωση της παραγωγής των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) μέσω αύξησης της έκφρασης μιτοχονδριακών αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως των ισομορφών 1 και 2 της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD1, SOD2) και καταλάσης (CAT) στο καρδιακό ιστό (Ibarra-Lara et al. 2012). Επιπρόσθετα, αγωνιστές του PPARα, παρουσιάζουν νευροπροστατευτικές ιδιότητες και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία διάφορων ασθενειών όπως του Altzheimer. Ειδικότερα, χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου Alzheimer αποτελεί η εξωκυτταρική συσσώρευση και εναπόθεση νευροτοξικών πεπτιδίων αμυλοειδούς-β (Αβ). Η α-σεκρετάση (ADAM10) διασπά την αλληλουχία Αβ με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής της Αβ. Έχει βρεθεί πως ο υποκινητής του γονιδίου Adam10 περιέχει στοιχεία απόκρισης του PPARα. Πειραματική μελέτη απέδειξε ότι η χορήγηση του φαρμάκου Gemfibrozil, ενός αγωνιστή του PPARα, αύξησε επίσης την έκφραση του ADAM10 σε νευρώνες του ιππόκαμπου που απομονώθηκαν από ποντίκια, αποτελώντας μια χρήσιμη φαρμακευτική ουσία για τη θεραπεία του Altzheimer (Corbett et al. 2015).

1.6 Οιστρογόνα

1.6.1 Γενικές πληροφορίες για τα οιστρογόνα

Τα οιστρογόνα, αποτελούν στεροειδείς ορμόνες και περιλαμβάνουν την οιστρόνη (E1), την οιστραδιόλης (E2), την οιστριόλη (E3) και της οιστετρόλης (E4). Όσο αναφορά την χημική δομή τους, αποτελούνται από 17 δεσμούς άνθρακα-άνθρακα διατεταγμένους σε τέσσερις συγχωνευμένους δακτυλίους.

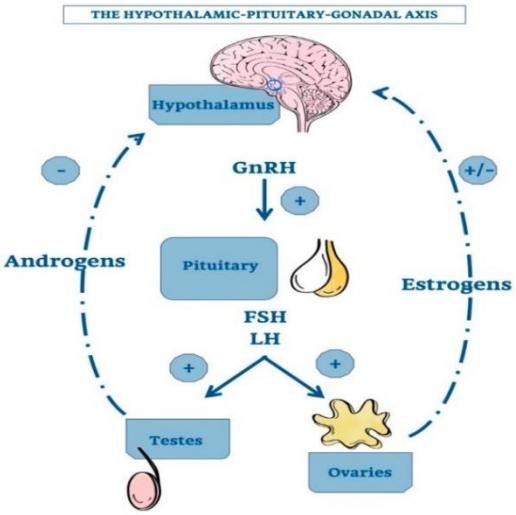


Εικόνα 10: Οι χημικές δομές των οιστρογόνων (Fuentes et al. 2019).

Τα οιστρογόνα ρυθμίζουν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια και εμπλέκονται στο νευροενδοκρινικό, το αγγειακό, το σκελετικό, το αναπαραγωγικό και το ανοσοποιητικό σύστημα τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες (Hamilton et al. 2017). Πρόδρομο μόριο όλων των οιστρογόνων αποτελεί η χοληστερόλη και το βιοσυνθετικό τους μονοπάτι περιλαμβάνει μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων. Να σημειωθεί πως τα οιστρογόνα παράγονται κυρίως στις ωοθήκες, το ωχρό σωμάτιο και τον πλακούντα και σε μικρότερο ποσοστό μπορούν να παραχθούν από το ήπαρ, τη καρδιά, το δέρμα και τον εγκέφαλο (Cui et al. 2013).

1.6.2 Σύνθεση και έκκριση οιστρογόνων

Αρχικά, η ορμόνη απελευθέρωσης γοναδοτροπινών (GnRH) διεγείρει την υπόφυση με αποτέλεσμα την παραγωγή της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) και ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH). Έπειτα, οι ορμόνες LH και FSH δρουν στους όρχεις και στις ωοθήκες οδηγώντας στην επαγωγή της έκκρισης ανδρογόνων και οιστρογόνων αντίστοιχα. Να σημειωθεί πως για τη διατήρηση της ομοιόστασης, η αυξημένη συγκέντρωση ανδρογόνων και οιστρογόνων μπορεί να αναστείλει την παραγωγή της GnRH από τον υποθάλαμο μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης. Στα θηλυκά άτομα, τα αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων μπορεί να οδηγήσουν και σε επαγωγή της έκκρισης GnRH μέσω θετικής ανατροφοδότησης (Rezzani et al. 2020).



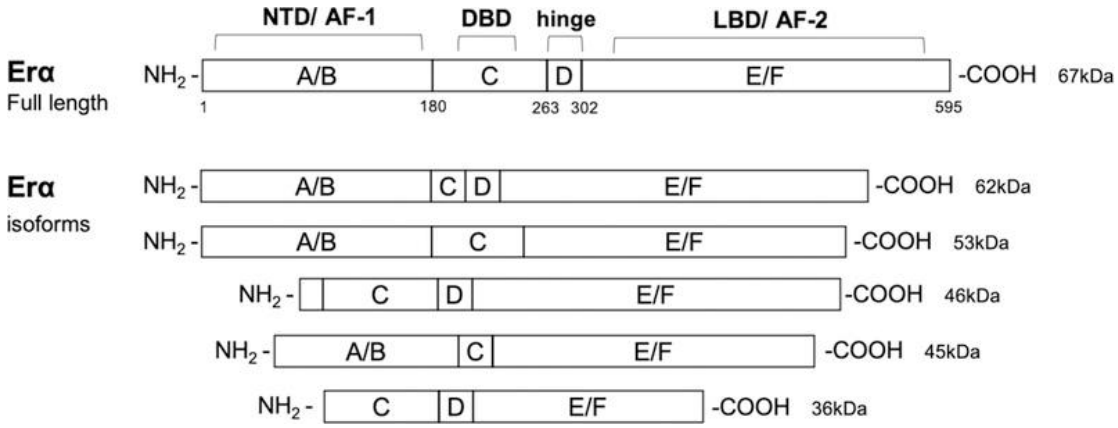
Εικόνα 11: Ρύθμιση της έκκρισης των οιστρογόνων και των ανδρογόνων μέσω του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (Rezzani et al. 2020).

1.6.3 Υποδοχέας οιστρογόνων

1.6.3.1 Δομή και ισομορφές των υποδοχέων οιστρογόνων

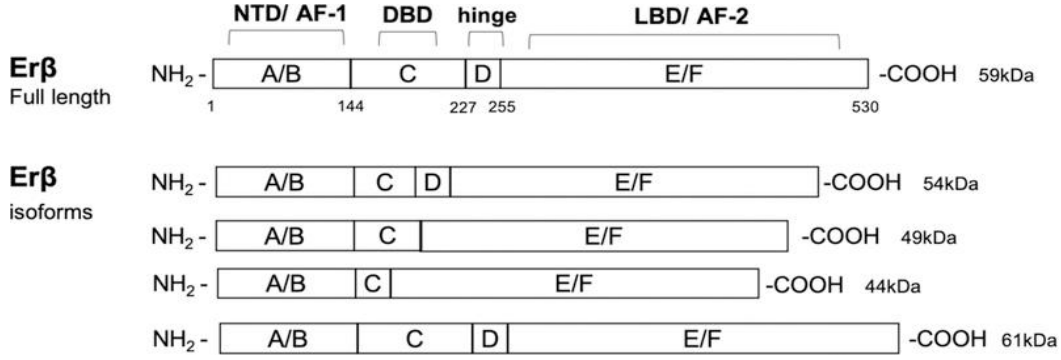
Οι υποδοχείς οιστρογόνων ERα και ERβ, ανήκουν στην κατηγορία των πυρηνικών υποδοχέων και περιέχουν διάφορες λειτουργικές πρωτεϊνικές επικράτειες. Ειδικότερα, απαρτίζονται από τέσσερις περιοχές τις A/B, C, D και E/F. Η A/B βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο (NTD) και συμμετέχει στη ρύθμιση της μεταγραφής. Η περιοχή C αντιστοιχεί στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD), η οποία συμβάλλει στο διμερισμό του υποδοχέα οιστρογόνων και στη δέσμευση του σε συγκεκριμένες αλληλουχίες γνωστές και ως στοιχεία απόκρισης οιστρογόνων (EREs). Η περιοχή D είναι μια περιοχή εύκαμπτου συνδέτη που συνδέει τις περιοχές C και E και μέσω αυτής, ο υποδοχέας μπορεί να συνδέεται σε πρωτεΐνες συνοδούς. Στο καρβοξυτελικό άκρο υπάρχει η περιοχή E/F, στην οποία προσδένονται τα οιστρογόνα αλλά και συνενεργοποιητές των υποδοχέων. Τέλος, δύο περιοχές ρύθμισης της μεταγραφής των γονιδίων στόχων αποτελούν οι AF1 και AF2 που βρίσκονται εντός του NTD και του LBD, αντίστοιχα.

Ο ERα κωδικοποιείται από το γονίδιο ESR1 στον άνθρωπο, το οποίο βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 6q25.1. Εξαιτίας του εναλλακτικού ματίσματος αλλά και της παρουσίας εναλλακτικών κωδικονίων έναρξης της μετάφρασης, προκύπτουν διαφορετικές ισομορφές του ERα με διαφορετικό μοριακό βάρος. Κάποιες από τις ισομορφές του ERα δεν διαθέτουν την επικράτεια NTD, που όπως προαναφέρθηκε περιέχει την περιοχή AF-1, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να ρυθμίσουν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Έχει παρατηρηθεί πως οι συγκεκριμένες ισομορφές σχηματίζουν ετεροδιμερή με άλλες ισομορφές του ERα αναστέλλοντας την ικανότητά του τελευταίου να ελέγχει τη μεταγραφή (Fuentes et al. 2019).



Εικόνα 12: Οι δομικές και λειτουργικές περιοχές των διαφορετικών ισομορφών του ERα (Fuentes et al. 2019).

Ο ERβ κωδικοποιείται από το γονίδιο ESR2 που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14 (14q23-24) και οι ισομορφές που προκύπτουν διαφέρουν στην LBD που περιέχει την περιοχή ρύθμισης της μεταγραφής AF-2. Επομένως, οι ισομορφές του ERβ που δεν έχουν μεταγραφική δραστηριότητα δημιουργούν ετεροδιμερή σύμπλοκα με τον ERα με αποτέλεσμα την καταστολή της δράσης του τελευταίου (Fuentes et al. 2019).



Εικόνα 13: Οι δομικές και λειτουργικές περιοχές των διαφορετικών ισομορφών του ERβ (Fuentes et al. 2019).

1.6.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια του υποδοχέα οιστρογόνων

1.6.4.1 Άμεση γενωμική σηματοδότηση

Κατά την άμεση γενωμική σηματοδότηση, αρχικά οι πυρηνικοί υποδοχείς οιστρογόνων ERα και ERβ βρίσκονται σε ανενεργή μορφή στο κυτταρόπλασμα συνδεμένοι με πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Le Dily et al. 2018). Μόλις πραγματοποιηθεί σύνδεση του κατάλληλου προσδέτη στον υποδοχέα, πραγματοποιείται αλλαγή της διαμόρφωσης και διμερισμός του υποδοχέα. Το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα μεταφέρεται στον πυρήνα και συνδέεται σε στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (EREs).

1.6.4.2 Έμμεση γενωμική σηματοδότηση

Κατά την έμμεση γενωμική σηματοδότηση, ο υποδοχέας οιστρογόνων ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων του χωρίς ο ίδιος να δεσμεύεται στο DNA. Συγκεκριμένα, πολλοί υποκινητές γονιδίων στόχων δεν περιέχουν στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (EREs) (O'Lone et al. 2004). Όσο αναφορά το μηχανισμό δράσης, το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα συνδέεται με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι διαθέτουν επικράτεια DBD με αποτέλεσμα την πρόσδεση τους σε υποκινητές

γονιδίων στόχων (Göttlicher et al. 1998). Έχει βρεθεί πως μέσω αυτού του μηχανισμού ρυθμίζεται η μεταγραφή γονιδίων όπως του υποδοχέα λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL), της ενδοθηλιακής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS), της κυκλίνης D1 και του υποδοχέα ρετινοϊκού οξέος-1α (Marino et al. 2006).

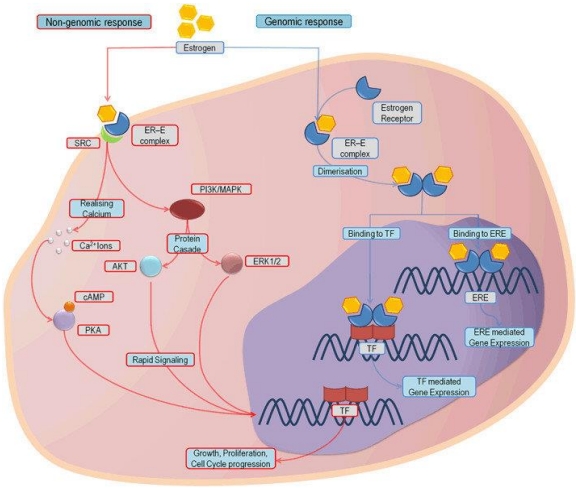
1.6.4.3 Μη γενωμική σηματοδότηση

Σε αντίθεση με τη γενωμική σηματοδότηση, η οποία διαρκεί ώρες, κατά τη μη γενωμική σηματοδότηση, δεν πραγματοποιείται μετακίνηση του συμπλόκου υποδοχέα-ορμόνης στο εσωτερικό του πυρήνα και μεταγραφή γονιδίων στόχων. Οι μη γονιδιακές δράσεις των οιστρογόνων συχνά περιλαμβάνουν ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που παράγουν κυκλικό AMP (cAMP) και ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν πρωτεϊνικές κινάσες με αποτέλεσμα την έμμεση ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Να τονιστεί πως τα σηματοδοτικά μονοπάτια των μη γενωμικών δράσεων μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 4 κατηγορίες:

- Το μονοπάτι της φωσφολιπάσης C (PLC)/πρωτεϊνικής κινάσης C (PKCs)
- Ο καταρράκτης Ras/Raf/MAPK
- Ο καταρράκτης της κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3 (PI3K)/κινάσης Akt
- Το σηματοδοτικό μονοπάτι cAMP/πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA)

1.6.4.4 Σηματοδότηση ανεξάρτητη από προσδέτη

Οι ανεξάρτητες από τον προσδέτη αποκρίσεις, συνήθως παρατηρούνται μετά την ενεργοποίηση άλλων μονοπατιών και για την πραγματοποίηση τους δεν απαιτούν τη σύνδεση των ορμονών στον υποδοχέα. Υπάρχουν διάφορα σήματα που μπορούν να επάγουν τη δραστηριότητα των υποδοχέων χωρίς την πρόσδεση των ορμονών. Μεταξύ των σημάτων περιλαμβάνονται πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες (PGF), κυτταροκίνες και νευροδιαβιβαστές οδηγώντας έτσι στην ενεργοποίηση καταρρακτών φωσφορυλιώσεων (Biason-Lauber et al. 2022).



Εικόνα 14: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται ο υποδοχέας οιστρογόνων (Słowikowski et al. 2017).

1.6.5 Ρόλος των οιστρογόνων και των υποδοχέων τους στα μιτοχόνδρια

Αρχικά, ο υποδοχέας ER έχει ανιχνευθεί σε πολλούς κυτταρικούς τύπους ανάμεσα στους οποίους βρίσκονται MCF-7, HepG2, SaOS-2 και SH-SY5Y. Παρόλο που σε ορισμένα μιτοχόνδρια κυττάρων έχει αποδειχθεί η παρουσία τόσο του ERα όσο και του ERβ, η κυρίαρχη ισομορφή που επικρατεί στα μιτοχόνδρια είναι ο ERβ. Έρευνα έχει δείξει πως στα κύτταρα HepG2 και SaOS-2, ο ERβ βρίσκεται αποκλειστικά στα

μιτοχόνδρια σε αντίθεση με τον ERα που εντοπίζεται μόνο στον πυρήνα (Psarra et al. 2008). Όπως έχει ήδη αναφερθεί έχουν βρεθεί στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (HREs) στο μιτοχονδριακό DNA για γονίδια που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Έρευνες έχουν δείξει πως η σύνδεση της 17β-οιστραδιόλης στον υποδοχέα ERβ αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης των μιτοχονδριακών mRNA για τις υπομονάδες I, II και III της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, βασικού συμπλόκου που συμμετέχει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (Psarra et al. 2008). Ακόμη, έχει αποδειχθεί πως η οιστραδιόλη, επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα NRF1, ο οποίος στη συνέχεια επάγει τη μεταγραφή του κύριου μεταγραφικού παράγοντα του μιτοχονδρίου TFAM (Klinge et al. 2020).

1.6.6 Νευροπροστασία και οιστρογόνα

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι απαραίτητη για τους νευρώνες, οι οποίοι έχουν υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις σε ATP. Ερευνητική μελέτη αξιολόγησε τις προστατευτικές επιδράσεις των οιστρογόνων έναντι της τοξικότητας που προκαλείται από το H_2O_2 σε ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος SK-N-SH. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν πως η οιστραδιόλη (E2) αύξησε την κυτταρική επιβίωση έναντι της τοξικότητας που προκαλεί το H_2O_2 και μείωσε αποτελεσματικά την υπεροξείδωση των λιπιδίων που προκλήθηκε παρουσία υπεροξειδίου. Επιπλέον, η E2 ασκεί τις προστατευτικές επιδράσεις διατηρώντας την ενδοκυτταρική ομοιόσταση ασβεστίου και το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Wang et al. 2006). Γενικότερα, τα οιστρογόνα επάγουν την έκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως του Bcl-2 και Bcl-xL. Πειραματική μελέτη απέδειξε πως η επώαση νευρικών κυττάρων με οιστραδιόλη συγκέντρωσης 10 nM για 12-72h οδήγησε σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του αντι-αποπτωτικού Bcl-w και σε μείωση της έκφρασης του προ-αποπτωτικού Bim συνεισφέροντας έτσι στην κυτταρική επιβίωση των νευρώνων (Yao et al. 2007).

1.7 Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας

Στόχος της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας αποτελεί η ανάδειξη της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης του μη πολικού κλάσματος Α, του ημιπολικού κλάσματος Β και του πολικού κλάσματος C της μαστίχας Χίου έναντι του οξειδωτικού στρες. Για την επίτευξη αυτού του στόχου προστέθηκε H_2O_2 700μM για 6 ώρες στην καλλιέργεια των κυττάρων SH-SY5Y. Επιπλέον, μελετήθηκε η πιθανή ενισχυτική επίδραση παρουσία της ορμόνης E2 σε τελική συγκέντρωση 10^{-9}M για 24 ώρες στην αντίσταση της κυτταροτοξικότητας που προκλήθηκε από το H_2O_2 σε κύτταρα που επωάστηκαν με κλάσματα ρητίνης και H_2O_2. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω των οποίων επιτελούνται αυτές οι δράσεις με έμφαση στη διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής υποδοχέων στεροειδών ορμονών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον ενεργειακό μεταβολισμό, όπως του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), των υποδοχέων οιστρογόνων (ERα, ERβ) και του υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPARα). Για την πραγματοποίηση του συγκεκριμένου στόχου, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραματικών δοκιμασίων όπου αρχικά μελετήθηκε η επίδραση των κλασμάτων ρητίνης στην κυτταρική βιωσιμότητα των SH-SY5Y, τα οποία επωάστηκαν παρουσία και απουσία H_2O_2 700μM για 6 ώρες, με τη δοκιμασία του MTT. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western προκειμένου να ανιχνευτούν πιθανές επιδράσεις διάφορων συγκεντρώσεων κλασμάτων ρητίνης στα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων GR και PPARα των κυττάρων SH-SY5Y, τα οποία καλλιεργήθηκαν

παρουσία και απουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου 700μM για 6 ώρες. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western για τη μελέτη της πιθανής επίδρασης των κλασμάτων στα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ σε κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία επωάστηκαν παρουσία και απουσία οιστραδιόλης 10^{-9}M για 24 ώρες και υπεροξειδίου του υδρογόνου 700μM για 6 ώρες, με στόχο την ανίχνευση πιθανής ενισχυτικής δράσης των υποδοχέων οιστρογόνων και των κλασμάτων στο ενεργειακό μεταβολισμό των νευρικών κυττάρων. Τέλος, μελετήθηκαν οι επιδράσεις των κλασμάτων στη μεταβολή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης σε κύτταρα SH-SY5Y που επωάστηκαν παρουσία και απουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου 700μM για 6 ώρες, μέσω της δοκιμασίας JC-1 με στόχο τη μελέτη της πιθανής αντίστασης των κλασμάτων στους αποπτωτικούς μηχανισμούς που επάγονται από τον οξειδωτικό παράγοντα H_2O_2.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Οργανολογία

Οι συσκευές και τα εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Συσκευές και εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας.

Εργαστηριακά όργανα	Εταιρεία
Multimode Plate Reader	Enspire multimode plate reader
Αναδευτήρας (Vortex)	Bio Vortex V1
Ανάστροφο Μικροσκόπιο	A. Kruss Optronic Germany
Αυτόματος πιπεταδόρος	HTC Lab solution
Επιτραπέζια μικρή φυγόκεντρος (Quick spin)	Nippon Genetics Europe GmbH
Επωαστήρας κυτταροκαλλιεργειών	Thermo Electron Corporation
Ζυγός	Kern EW
Ζυγός	Kern 440-47N
Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής/Απαγωγός	Tel Star AV-30/70
Θερμαινόμενη πλάκα (Heat Block)	Kisker
Μαγνητικός Αναδευτήρας (Stirrer)	Nuova thermolyne
Οριζόντιος Αναδευτήρας	Heidolph Rotamax
Πεχάμετρο	Metrohm 827 pH lab
Πλάκα Neubauer	HBG Germany
Πλαστική ράβδος (scraper)	Thermo Fisher Scientific
Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών	W.B Kodak
Συνεστιακό Μικροσκόπιο	Zeiss LSM 800, Zeiss, Jena, Germany
Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς	Biorad mini-trans Blot
Συσκευή ηλεκτροφόρησης	Biorad mini-PROTEAN tetra cell
Συσκευή υπερήχων (Sonicator)	Heischer Ultrasound Technology, model UP400S
Τροφοδοτικό	Wealtec Elite 200
Υδατόλουτρο κυτταροκαλλιεργειών	P. Selecta
Φασματοφωτόμετρο	Spectronic 20 GENESYSTEM

Φυγόκεντρος κυτταροκαλλιεργειών	Jouan BR4
Ψυχόμενη φυγόκεντρος	Eppendorf 5810R

2.2 Υλικά

2.2.1 Χημικά/Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας.

Αντιδραστήρια	Εταιρεία
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma
5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1)	Thermo Fisher Scientific
Acrylamide/Bis 40% (Acr)	Bio-Rad
Ammonium persulfate (APS)	Serva
Bradford (5X)	Bio-Rad
Bradford Protein Assay	Biorad
Brophonelol blue	Fluka
Developer	Fuji
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Enhanced ChemiLuminescence (ECL)	Santa Cruz
Estradiol (E2)	Sigma
Ethanol 100%	Sigma
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	Scharlau
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
Fixer	Fuji
Glycerol	KaloChem
Glycine	Serva
Hoechst-33342	Sigma
Hydrochloric acid (HCl)	Scharlau
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma
L-Glutamine 200mM (L-Gln) (100X)	Gibco
Methanol 100%	Sigma
Penicillin/Streptomycin (P/S) (5000U/mL)	Gibco
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	SERVA
Phosphate Buffered Saline (PBS) (10X)	Gibco
Protease inhibibitors	Roche
Protein ladder	Proteintech
Skimmed milk powder	Regilait
Sodium chloride (NaCl)	Scharlau
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	AppliChem
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Serva
Triton X-100	AppliChem
Trypsin-EDTA 5% (10X)	Gibco

Tween 20	Sigma
β-mercaptoethanol	Riedel de Haen

2.2.2 Αναλώσιμα υλικά

Τα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας.

Αναλώσιμα Υλικά	Εταιρεία
Γυάλινες πιπέτες (Pasteur)	Kimble
Βαθμονομημένα Σωληνάρια (Falcon) (15mL, 50mL)	Sarstedt
Διηθητικά χαρτιά (Whatman)	Sigma
Σωληνάρια για μεταφορά των κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) (cryovials) (1,5mL και 2mL)	Sarstedt
Φιλμ ανίχνευσης σήματος	FUJI MEDICAL
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0,45μM, 0,22μM)	Amersham™ Protran™
Πλαστικά Σιφώνια (2mL, 5mL, 10mL, 25mL)	Sarstedt
Πλαστικά σωληνάρια (eppendorf) (1.5 mL, 2.0 mL)	Sarstedt
Τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων (6, 24, 96 θέσεων)	Sarstedt
Φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων (T25, T75)	Sarstedt
Πιάτα καλλιέργειας κυττάρων (60x15mm)	Corning
Ρύγχοι πιπεττών (tips) (0.2-10 μL, 20-200 μL, 100-1000 μL)	Sarstedt

2.2.3 Παρασκευή Διαλυμάτων

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας.

Διαλύματα	
Lysis Buffer Περιέχονται 20 mM Tris pH 7.5, 0.5% (v/v) Triton X-100, 250 mM NaCl και 3 mM EDTA. Πριν τη χρήση του προστίθενται 1mM DTT, 0.1 mM PMSF και διάλυμα Protease Inhibibitors στην απαιτούμενη συγκέντρωση. Αποθήκευση στους 4°C.	**Διάλυμα Bradford 1X** Αραίωση του διαλύματος Bradford 5X σε dH_2O με αποτέλεσμα την παραγωγή νέου διαλύματος Bradford με τελική συγκέντρωση 1X
Sample Buffer 4X Περιέχονται 1 M Tris-HCl pH 6,8, 10% (v/v) Glycerol, 10% (v/v) SDS, 1% (v/v) Brophonelol blue σε dH_2O. Ανάδευση και θέρμανση του τελικού διαλύματος. Το τελικό διάλυμα μοιράζεται σε aliquots των	**Διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution)** Για την παρασκευή 1000mL διαλύματος προστίθενται 725mL dH_2O, 250mL Διαλύματος Α και 25mL Διαλύματος Β.

960μL στα οποία προστίθεται 5% (v/v) β-mercaptoethanol. Αποθήκευση στους -20°C.	Αποθήκευση του τελικού διαλύματος σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου.
Διάλυμα σταθεροποίησης σήματος (Fixer solution) Για την παρασκευή 1000mL διαλύματος προστίθενται 750mL dH_2O, 225mL Διαλύματος Α και 25mL Διαλύματος Β.Αποθήκευση του τελικού διαλύματος σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου.	**Ρυθμιστικό διάλυμα Tris Hydrochloride (Tris-HCl) pH 6,8 1,5M** Διάλυση κατάλληλης ποσότητας Tris base σε dH_2O. Ρύθμιση του pH (6,8) με την προσθήκη πυκνού HCl 12N. Αποθήκευση του τελικού διαλύματος στους 4°C.
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris Hydrochloride (Tris-HCl) pH 8,8 1,5M Διάλυση κατάλληλης ποσότητας Tris base σε dH_2O. Ρύθμιση του pH (8,8) με την προσθήκη πυκνού HCl 12N. Αποθήκευση του τελικού διαλύματος στους 4°C.	**Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer buffer) 1X** Περιέχει 20% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Running Buffer 10X και 0,05% (v/v) SDS σε dH2O. Αποθήκευση του τελικού διαλύματος στους 4°C.
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-buffered saline (TBS) 10X Διάλυση κατάλληλης ποσότητας Tris base σε dH_2O. Ρύθμιση του pH (7,4-7,6) με την προσθήκη πυκνού HCl 12N. Αποθήκευση του τελικού διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.	**Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) 10X** Περιέχει 14,4% (w/v) Glycine και 3% (w/v) Tris base σε dH_2O. Αποθήκευση του τελικού διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-buffered saline with Tween 20 (TBST) 1X Περιέχει 10 % (v/v) TBS 10X και 0.06% (v/v) Tween 20 σε dH_2O. Αποθήκευση του τελικού διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.	**Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) 1X** Περιέχει 10% (v/v) Running Buffer 10X και 0,1% (v/v) SDS σε dH_2O. Αποθήκευση του τελικού διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2.4 Αντισώματα

Τα πρωτογενή και τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανασοαποτύπωση κατά Western παρουσιάζονται στους Πίνακες 5 και 6 αντίστοιχα.

Πίνακας 5: Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας.

Αντίσωμα ένταντι	Συγκέντρωση (v/v)	Πηγή παραγωγής	Μοριακό Βάρος (kDa)	Εταιρεία
Glucocorticoid receptor (GR) (G-5)	1:1000	Mouse	95	Santa Cruz
Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha (PPARα) (H-2)	1:1000	Mouse	55	Santa Cruz
Estrogen receptor alpha (ERα) (F10)	1:1000	Rabbit	66	ProteinTech
Estrogen receptor alpha (ERβ) (B-3)	1:1000	Rabbit	56	ELK
β-actin	1:2000	Mouse	42	ProteinTech

Πίνακας 6: Δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας.

Αντίσωμα έναντι	Συγκέντρωση (v/v)	Εταιρεία
Mouse IgG-HRP	1:50.000	Pierce Antibodies
Rabbit IgG-HRP	1:50.000	Pierce Antibodies

2.2.5 Κυτταρικές σειρές

- **SH-SY5Y**

Τα κύτταρα SH-SY5Y προήλθαν από την κυτταρική σειρά SK-N-SH, η οποία υποκλωνοποιήθηκε τρεις φορές σε SH-SY, SH-SY5 και τελικά στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y. Η κυτταρική σειρά SK-N-SH απομονώθηκε το 1970 από βιοψία μυελού των οστών, η οποία λήφθηκε από ανήλικο κορίτσι 4 ετών που έπασχε από νευροβλάστωμα (Şahin et al. 2021), έναν σπάνιο καρκίνο που αναπτύσσεται σε νευρώνες του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y είναι ένα μείγμα προσκολλημένων επιθηλιακών κυττάρων τύπου S και νευροβλαστών τύπου N. Τα κύτταρα SH-SY5Y χρησιμοποιούνται συνήθως για τη μελέτη του νευροεκφυλισμού καθώς μπορούν να μετατραπούν σε διάφορους τύπους νευρώνων με την εξωγενή προσθήκη συγκεκριμένων ενώσεων (Xicoy et al. 2017). Ακόμη η κυτταρική σειρά SH-SY5Y αποτελεί μοντέλο για τη μελέτη του οξειδωτικού στρες (Martínez et al. 2020) και διάφορων νευροεκφυλιστικών διαταραχών.

2.2.6 Θρεπτικά μέσα κυτταροκαλλιεργειών

Τα θρεπτικά μέσα για την καλλιέργεια των ευκαρυωτικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της πτυχιακής εργασίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας.

Θρεπτικά μέσα	Σύσταση
Πλήρες θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium **Low Glucose with phenol red** (**DMEM) 1X**	• Περιέχονται 1gr/L D-Glucose, L-glutamate και phenol red. • Για την παραγωγή πλήρους θρεπτικού υλικού προστίθενται 10% v/v FBS, 1% v/v L-Gln και 1% v/v P/S • Αποθήκευση στους 4°C.
Πλήρες θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium **Low Glucose without phenol red** (**DMEM) 1X**	• Περιέχονται 1gr/L D-Glucose και L-glutamate. • Για την παραγωγή πλήρους θρεπτικού υλικού προστίθενται 10% v/v FBS cis, 1% v/v L-Gln και 1% v/v P/S. • Αποθήκευση στους 4°C.

2.3 Μέθοδοι-Τεχνικές

2.3.1 Κλασμάτωση της ρητίνης προερχόμενη από Μαστιχόδεντρο της Νότιας Χίου

Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των κλασμάτων προέρχεται από το φυτό Pistacia lentiscus L. var. Chia το οποίο καλλιεργήθηκε στη Νότια Χίο. Αξίζει να σημειωθεί πως η ρητίνη ήταν ευγενική χορηγία της Ένωσης Μαστιχοπαραγωγών Χίου. Να αναφερθεί πως η κλασμάτωση της ρητίνης πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Φωτεινής Καλούση. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση 10gr ρητίνης σε ακετόνη με αναλογία ακετόνης/ρητίνη 10:1 όγκου (ml) / βάρος (gr) και ακολούθησε ανάδευση για 2 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα του τελικού διαλύματος και μετέπειτα εξάτμιση του διαλύτη με αποτέλεσμα την παραγωγή 9.5gr ακετονικού εκχυλίσματος (95% απόδοση). Όσο αναφορά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου εκχυλίσματος, παρουσιάζει κίτρινο χρώμα και κρεμώδη υφή. Ακολούθησε ξανά διαλυτοποίηση του εκχυλίσματος σε μικρή ποσότητα ακετόνης και στη συνέχεια προστέθηκε σε silica gel με αναλογία βάρους 1:3 (gr) με αποτέλεσμα την πλήρη εξάτμιση του διαλύματος. Η σκόνη που προέκυψε από την εξάτμιση του τελικού διαλύματος διαχωρίστηκε σε μία στιβάδα Celite με αναλογία βάρους 1:3 (gr), που ήταν βρεγμένη με πετρελαϊκό αιθέρα (Pe). Έπειτα, ακολούθησε διαδοχική προσθήκη διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας. Ειδικότερα, προστέθηκαν οι διαλύτες πετρελαϊκός αιθέρας (Pe), οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) και τετραϋδροφουράνιο (THF), σε αναλογία 1:30 βάρος (gr) /όγκο (mL). Τελικά, προέκυψαν 3 διηθήματα, τα οποία στη συνέχεια εξατμίστηκαν παράγοντας 1.91gr μη πολικού κλάσματος (20.08% του διηθήματος Pe), 5.81gr ημι-πολικού κλάσματος (61.2% του διηθήματος EtOAc) και 0.56gr πολικού κλάσματος (5.9% του διηθήματος THF). Τα παραπάνω κλάσματα ρητίνης, τα οποία παρουσιάζουν διαφορετική πολικότητα αποθηκεύτηκαν στους 4^{o}C. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διαλυτοποίηση των κλασμάτων ρητίνης σε 100% DMSO με σκοπό την παραγωγή διαλυμάτων με τελική συγκέντρωση 100mg/mL. Τα τελικά διαλύματα αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης στους -80^{o}C (Kalousi et al. 2023).

2.3.2 Βιοχημικές τεχνικές εντός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών

2.3.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο DMEM, στο οποίο περιέχονται 1gr/L D-Glucose, 10% v/v FBS, 1% v/v L-Gln, 1% v/v P/S και phenol red. Να αναφερθεί πως η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε εντός επωαστικού κλιβάνου σε συνθήκες 37 ^{o}C και 5% CO_2.

2.3.2.3 Θρυψινοποίηση

Αρχικά, η θρυψίνη αποτελεί ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, το οποίο χρησιμοποιείται προκειμένου να αποφεύγεται η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια της φλάσκας καλλιέργειας και να εμποδίζεται η εμφάνιση κυτταρικών συσσωματωμάτων. Ειδικότερα σε περιπτώσεις κορεσμού της επιφάνειας της φλάσκας κατά 80%-90%, η προσθήκη της θρυψίνης είναι αναγκαία. Κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης, αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό της φλάσκας καλλιέργειας των κυττάρων. Έπειτα, πραγματοποιείται προσθήκη θρυψίνης και μεταφορά της φλάσκας σε επωαστικό κλίβανο σε συνθήκες 37 ^{o}C και 5% CO_2 για 1-2min. Ακολουθεί παρατήρηση της φλάσκας στο μικροσκόπιο, διαπιστώνοντας ότι τα κύτταρα έχουν χάσει τη

μορφολογία τους και επιπλέουν. Για την απενεργοποίηση της θρυψίνης, προστίθενται στη φλάσκα θρεπτικό υλικό σε ποσότητα 4X του όγκου της θρυψίνης, που προστέθηκε στην αρχή της θρυψινοποίησης. Αναδεύεται το περιεχόμενο της φλάσκας και μεταφέρεται σε falcon. Από το falcon, μεταφέρεται ποσότητα σε φλάσκα ανάπτυξης, η οποία συμπληρώνεται με θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας DMEM.

2.3.2.4 Επίστρωση κυττάρων

Μετά το πέρας της διαδικασίας της θρυψινοποίησης, ακολουθεί η μέτρηση των κυττάρων και η μεταφορά τους σε πιάτα καλλιέργειας (well-plates). Αρχικά μεταφέρονται 10μl κάτω από την καλυπτρίδα σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer και ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων με τη βοήθεια του ανάστροφου μικροσκοπίου. Πραγματοποιείται μεταφορά του επιθυμητού όγκου κυττάρων από το falcon που περιέχει τα κύτταρα, τα οποία έχουν επαναδιαλιαλυτοποιηθεί μετά την προσθήκη της θρυψίνης, σε νέο falcon. Στο νέο falcon, μετά την προσθήκη των κυττάρων, προστίθενται και θρεπτικό μέσο DMEM, στο οποίο περιέχονται 1gr/L D-Glucose, 10% v/v FBS, 1% v/v L-Gln, 1% v/v P/S και phenol red. Εφόσον ολοκληρωθεί η μεταφορά του επιθυμητού αριθμού κυττάρων στα wells, ακολουθεί μια ήπια ανάδευση των well-plates και παρατηρούνται στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Τέλος, τα well-plates εισάγονται στον επωαστικό κλίβανο σε συνθήκες 37^{o}C και 5% CO_2.

2.3.2.5 Προσθήκη ουσιών στα κύτταρα

Για τη διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων ρητίνης στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) και του υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPARα) παρουσία και απουσία H_2O_2, αρχικά πραγματοποιήθηκε επίστρωση κυττάρων SH-SY5Y (250.000 κυττάρων/well) σε πιάτα καλλιέργειας 6 θέσεων (6-well plates) σε θρεπτικό υλικό DMEM low glucose with phenol red εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, 1% v/v P/S και 1% v/v L-Gln. Μετά την επώαση των κυττάρων για 48 ώρες σε επωαστικό κλίβανο (37^{o}C και 5% CO_2) ακολουθεί η προσθήκη κλασμάτων μαστίχας διαφορετικής πολικότητας σε θρεπτικό μέσο DMEM low glucose. Ειδικότερα, το κλάσμα Α (μη πολικό), το κλάσμα Β (ημιπολικό) και το κλάσμα C (πολικό) προστέθηκαν στα well-plates σε τελική συγκέντρωση 20μg/ml. Εφόσον προστεθούν οι κατάλληλες ποσότητες των κλασμάτων μαστίχας, ακολουθεί επώαση των κυττάρων σε συνθήκες 37oC και 5% CO_2 για 24 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσθήκη H_2O_2 σε τελική συγκέντρωση 700μM διαλυμένο σε dH_2O, έξι ώρες πριν τη λήξη του εικοσιτετράωρου με σκοπό την επαγωγή της απόπτωσης στα κύτταρα SH-SY5Y. Αξίζει να αναφερθεί πως τα κλάσματα μαστίχας είναι διαλυμένα σε DMSO επομένως είναι αναγκαία η ύπαρξη μίας συνθήκης μάρτυρα (control) στην οποία στα κύτταρα έχει προστεθεί κατάλληλη ποσότητα DMSO σε συγκέντρωση 1/1000 (v/v) και θρεπτικό μέσο DMEM low glucose απουσία ποσότητας κλασμάτων.

Επαναλήφθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία για τη διερεύνηση της επίδρασης κλασμάτων ρητίνης στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) κατά την οποία όμως προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις κλασμάτων ρητίνης Μαστίχας Χίου. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε επίστρωση κυττάρων SH-SY5Y (250.000 κυττάρων/well) σε πιάτα καλλιέργειας 6 θέσεων (6-well plates) σε θρεπτικό υλικό DMEM low glucose και ακολούθησε επώαση για 48 ώρες στους 37^{o}C και 5% CO_2. Έπειτα, προστίθενται στα κύτταρα SH-SY5Y κλάσματα μαστίχας Α (μη πολικό) και το κλάσμα C (πολικό) σε τελικές συγκεντρώσεις 20μg/ml και 10μg/ml ενώ το κλάσμα Β (ημιπολικό) προστέθηκε σε τελικές συγκεντρώσεις 10μg/ml και 5μg/ml.

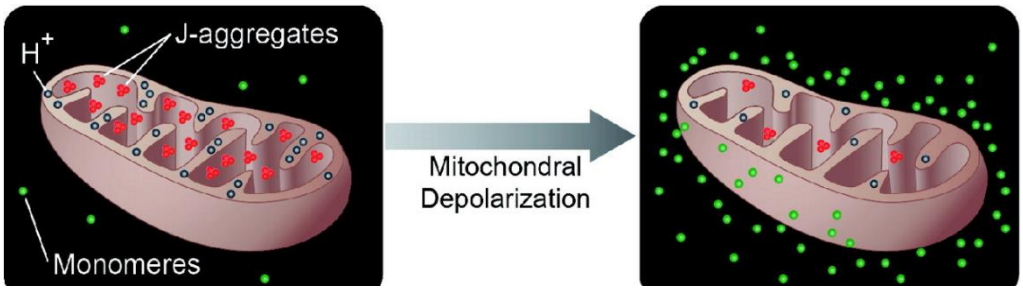
Έπειτα πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων σε συνθήκες 37°C και 5% CO_2 για 24 ώρες και προσθήκη H_2O_2 σε τελική συγκέντρωση 700μM διαλυμένο σε dH_2O, έξι ώρες πριν τη λήξη του εικοσιτετράωρου.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας στους υποδοχείς οιστρογόνων που βρίσκονται στα κύτταρα SH-SY5Y παρουσία και απουσία τόσο του H_2O_2 όσο και της οιστραδιόλης (E2). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε επίστρωση κυττάρων SH-SY5Y (250.000 κυττάρων/well) σε πιάτα καλλιέργειας 6 θέσεων (6-well-plates) σε θρεπτικό υλικό DMEM low glucose και ακολούθησε μεταφορά των well-plates σε επωαστήρα για 48 ώρες στους 37°C και 5% CO_2. Μετά την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού, προστίθενται στα κύτταρα SH-SY5Y κλάσματα μαστίχας A (μη πολικό) και το κλάσμα C (πολικό) σε τελικές συγκεντρώσεις 20μg/ml. Να τονιστεί πως προστέθηκε στα κύτταρα SH-SY5Y και οιστραδιόλη (E2) σε τελική συγκέντρωση 10^{-9}M διαλυμένη σε EtOH 100% για 24 ώρες. Έπειτα πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων σε συνθήκες 37°C και 5% CO_2 για 24 ώρες. Στις 18h πριν τη λήξη του εικοσιτετράωρου προστέθηκε H_2O_2 σε τελική συγκέντρωση 700μM διαλυμένο σε dH_2O.

2.3.2.6 Ανοσοκυτταροχημεία Φθορισμού

Δοκιμασία μέτρησης της μεταβολής του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης των κυττάρων SH-SY5Y

H JC-1 (5,5,6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimi-dazoylcarbocyanine iodide) είναι μια κατιονική χρωστική καρβοκυανίνης, μέσω της οποίας ανιχνεύονται αλλαγές δυναμικού της μεμβράνης των μιτοχονδρίων σε υγιή και αποπτωτικά κύτταρα διάφορων τύπων (πχ νευρώνες, μυοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα) (Sivandzade et al. 2019). Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, μειώνεται ο δείκτης $\Delta\Psi_M$ καθώς πραγματοποιείται άνοιγμα των πόρων της μιτοχονδριακής μεμβράνης, αυξάνοντας έτσι τη διαπερατότητα της και σημειώνεται απώλεια της ηλεκτροχημικής βαθμίδας πρωτονίων. Συγκεκριμένα σε υγιή κύτταρα, η χρωστική JC-1 εισέρχεται και συσσωρεύεται στα ενεργοποιημένα και αρνητικά φορτισμένα μιτοχόνδρια και σχηματίζει αυθόρμητα κόκκινα φθορίζοντα συσσωματώματα J. Αντίθετα, σε αποπτωτικά κύτταρα η χρωστική JC-1 εισέρχεται σε μικρότερο βαθμό στα μιτοχόνδρια. Έτσι, η JC-1 δεν φτάνει σε επαρκή συγκέντρωση για να προκαλέσει το σχηματισμό συσσωματωμάτων και υπάρχει σε μονομερή μορφή έχοντας πράσινο φθορισμό. Επομένως κατά την εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης παρατηρείται μείωση του λόγου έντασης του φθορισμού κόκκινο/πράσινο (Sivandzade et al. 2019).

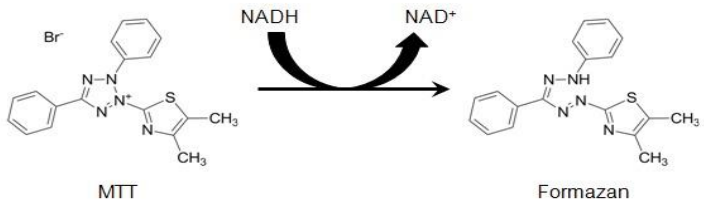


Εικόνα 15: Ο τρόπος δράσης της χρωστικής JC-1 (Sakamuru et al. 2012).

Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε επίστρωση κυττάρων SH-SY5Y (100.000 cells/dish) σε πιάτα καλλιέργειας κυττάρων (60x15mm) σε θρεπτικό υλικό DMEM low glucose with phenol red εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, 1% v/v P/S και 1% v/v L-Gln και ακολούθησε επώαση τους στους 37^{o}C και 5% CO_2 για 48 ώρες. Μετά το πέρας των 48 ωρών προστέθηκαν στα κύτταρα κλάσματα μαστίχας A και C σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml ενώ το κλάσμα B προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 5μg/ml και έπειτα πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων παρουσία των κλασμάτων για 24 ώρες. Ακολούθησε προσθήκη H_2O_2 700μM στα πιάτα καλλιέργειας κυττάρων SH-SY5Y, η οποία πραγματοποιήθηκε 6 ώρες πριν τη λήξη των 24 ωρών. Μετά τη λήξη του εικοσιτετράωρου, προστέθηκε ποσότητα διαλύματος που περιέχει τη φωτοευαίσθητη χρωστική JC-1 σε τελική συγκέντρωση 2μg/ml αλλά και τη χρωστική HOECHST-33342 σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml, η οποία χρωματίζει στους πυρήνες των κυττάρων. Και οι 2 χρωστικές είναι διαλυμένες σε PBS 1x. Εφόσον προστεθεί το mastermix στα πιάτα καλλιέργειας, ακολουθεί επώαση των κυττάρων στους 37^{o}C και 5% CO_2 για 30min. Μετά τα 30min, αφαιρείται από τα πιάτα το διάλυμα των χρωστικών και πραγματοποιούνται 2 πλύσεις των κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM low glucose without phenol red για να απομακρυνθεί η περίσσεια των χρωστικών. Έπειτα, ακολουθεί εκ νέου προσθήκη θρεπτικού υλικού DMEM low glucose without phenol red και παρατήρηση των κυττάρων στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Το πράσινο σήμα της χρωστικής JC-1 μετρήθηκε με διέγερση σε μήκος κύματος 488 nm και εκπομπή σε μήκος κύματος 494-535 nm. Ακόμη το κόκκινο σήμα της χρωστικής JC-1 μετρήθηκε με διέγερση σε μήκος κύματος 560 nm και εκπομπή σε μήκος κύματος 560-590 nm.

2.3.2.7 Χρωματομετρική μέθοδος MTT

Η ποσοτική χρωματομετρική μέθοδος MTT χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της κυτταρικής μεταβολικής δραστηριότητας και αποτελεί δείκτη της βιωσιμότητας και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων καθώς και της κυτταροτοξικότητας. Συγκεκριμένα, μόνο στα μεταβολικά ενεργά κύτταρα πραγματοποιείται αναγωγή του κίτρινου άλατος τετραζολίου MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) με αποτέλεσμα την παραγωγή μωβ κρυστάλλων φορμαζάνης από μιτοχονδριακές NAD(P)H εξαρτώμενες αφυδρογονάσες (Mosmann et al. 1983).



Εικόνα 16: Η αντίδραση αναγωγής του κίτρινου αντιδραστηρίου MTT σε μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης παρουσία μιτοχονδριακών αφυδρογονασών στα μεταβολικά ενεργά κύτταρα (Riss et al. 2004).

Ειδικότερα, σε 96-well plates πραγματοποιήθηκε επίστρωση κυττάρων SH-SY5Y (15.000 cells/well) παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM low glucose with phenol red εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, 1% v/v P/S και 1% v/v L-Gln. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων στους 37^{o}C και σε 5% CO_2. Μετά την πάροδο 48 ωρών, προστέθηκαν στα κύτταρα για 24 ώρες κλάσματα ρητίνης Μαστίχας Χίου A, B και C σε τελικές

συγκεντρώσεις 20μg/ml και 40μg/ml και τα πιάτα μεταφέρθηκαν στον επωαστήρα. Στις 6 ώρες πριν τη λήξη του εικοσιτετράωρου προστίθεται H_2O_2 700μM. Μετά το τέλος της επώασης των 24 ωρών, στα κύτταρα προστίθεται το αντιδραστήριο MTT σε τελική συγκέντρωση 0,5mg/ml για 3 ώρες σε συνθήκες 37^oC και 5% CO_2 με αποτέλεσμα την παραγωγή μωβ κρυστάλλων φορμαζάνης. Έπειτα, προστίθεται σε κάθε well 150μL οργανικού διαλύτη (ισοπροπανόλη) για τη διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης. Ακολουθεί επώαση του 96-well-plate, σε σκοτάδι υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30min. Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 570nm και του background στα 690nm σε φωτόμετρο Multimode Plate Reader.

2.3.3 Βιοχημικές τεχνικές εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών

2.3.3.1 Συλλογή κυττάρων (Harvest)

Εφόσον ολοκληρωθεί η επώαση των κυττάρων με τις προς μελέτη ουσίες, ακολουθεί η συλλογή των κυττάρων, μια διαδικασία που ονομάζεται Harvest. Αρχικά, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό DMEM low glucose with phenol red. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται πλύσεις με PBS 1X σε θερμοκρασία 4^oC. Έπειτα με τη βοήθεια μιας πλαστικής ράβδου γνωστή και ως scraper συλλέγουμε όλα τα κύτταρα που βρίσκονται σε κάθε πηγαδάκι (well). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2.000rpm για 5min στους 4 ^oC. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων αποθηκεύεται στους -80^oC ή μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας για τη διεξαγωγή πειραματικών δοκιμασιών.

2.3.3.2 Λύση κυττάρων

Αρχικά, τα ιζήματα των κυττάρων που βρίσκονται αποθηκευμένα στους -80^oC μεταφέρονται σε πάγο για 10min. Στη συνέχεια, στα κυτταρικά ιζήματα προστίθεται διάλυμα λύσης (Lysis Buffer), το οποίο πριν τη χρήση του συμπληρώνεται με 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF και με διάλυμα Protease Inhibibitors στην κατάλληλη συγκέντρωση. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των κυττάρων παρουσία του τελικού διαλύματος λύσης για 30min. Έπειτα, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με τη βοήθεια υπερήχων. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα εκτίθενται στους υπερήχους για 1sec και αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται εφαρμόζοντας 5 κύκλους έκθεσης που διαφέρουν μεταξύ τους 35sec.

2.3.3.3 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford και προετοιμασία δειγμάτων για Western Blot

Η χρωματογραφική μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών. Ειδικότερα, πραγματοποιείται αραίωση του διαλύματος Bradford 5X με σκοπό την παραγωγή διαλύματος με τελική συγκέντρωση 1X. Στη συνέχεια, προστίθεται 1ml από το αντιδραστήριο Bradford 1X σε 1μl από κάθε πρωτεϊνικό δείγμα. Ακολουθεί ανάδευση των τελικών δειγμάτων και επώαση τους σε σκοτεινό μέρος για 20-40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, μετριέται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 595nm. Η μέτρηση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης που βρίσκεται στο δείγμα υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση που προέκυψε από την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης BSA και ακολουθεί επεξεργασία των δεδομένων με τη βοήθεια του Microsoft Office Excel.

2.3.3.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Με την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πολυακρυλαμίδιο κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), είναι δυνατός ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών

με βάση τη μοριακή τους μάζα. Το σύμπλοκο του SDS με την αποδιαταγμένη πρωτεΐνη έχει ένα μεγάλο καθαρό αρνητικό φορτίο σχεδόν ανάλογο με τη μάζα της ίδιας της πρωτεΐνης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο με αποτέλεσμα την μετακίνηση των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών από την κάθοδο (-) προς την άνοδο (+). Αρχικά τα πρωτεϊνικά δείγματα τοποθετούνται σε πήκτωμα χαμηλής συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου (stacking gel) και στη συνέχεια με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου μεταφέρονται και διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος σε πήκτωμα υψηλής συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου (separating gel). Η σύσταση των πηκτωμάτων επιστοίβαξης (stacking gel) και διαχωρισμού (separating gel) παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Η σύσταση των πηκτωμάτων επιστοίβαξης (stacking gel) και διαχωρισμού (separating gel)

Stacking gel	Separating gel
ddH_2O	ddH_2O
0,125 M Tris-HCl pH 6,8	0,375 M Tris-HCl pH 8,8
SDS 0,1% (w/v)	SDS 0,1% (w/v)
Acr 4% (w/v)	Acr 10% ή 12% (w/v)
APS 1% (w/v)	APS 1% (w/v)
TEMED 0,04% (v/v)	TEMED 0,04% (v/v)

Τα πρωτεϊνικά δείγματα που έχουν προετοιμαστεί για ηλεκτροφόρηση, θερμαίνονται στους 95^oC για 5min με αποτέλεσμα την κατάργηση της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών και των ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή ένταση ηλεκτρικού ρεύματος στα 90 Volt παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος Running Buffer 1X.

2.3.3.5 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot)

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western αποτελεί μία αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρέως με σκοπό την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών-στόχων σε ένα δείγμα. Τα βήματα που απαιτούνται για την ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western είναι τα ακόλουθα:

- ***Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης***

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, ακολουθεί εξισορρόπηση του πηκτώματος για 10min σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer). Μετά το πέρας των 10min, στη μαύρη πλευρά της κασετίνας ηλεκτρομεταφοράς δημιουργείται μια μορφή τύπου "sandwich" όπου τοποθετείται το gel και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ανάμεσα σε 2 σφουγγαράκια και διηθητικά χαρτιά τύπου Whatman. Ακολούθως, ξεκινά η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών στα 0,35A για 70min στους 4^oC. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, πάνω στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες, μεταφέρεται σε διάλυμα TBST 1X.

- ***Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων (Blocking) στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης***

Ακολουθεί το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με σκοπό να παρεμποδιστεί μη ειδική πρόσδεση των πρωτογενών

αντισωμάτων. Για την επίτευξη του συγκεκριμένου σκοπού, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μεταφέρεται σε διάλυμα που περιέχει 10% w/v άπαχο αποξηραμένο γάλα (3%-5% non-fat dry milk, NFDM) διαλυμένο σε TBST 1X και ακολουθεί επώαση της μεμβράνης υπό ανάδευση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.

- ***Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεινών***

Έπειτα πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο είναι αραιωμένο στην επιθυμητή συγκέντρωση σε διάλυμα που περιέχει 2% w/v άπαχο αποξηραμένο γάλα σε TBST 1X, για 1 overnight (~16h) υπό ανάδευση στους 4^{o}C. Μετά την ολοκλήρωση του overnight, πραγματοποιούνται 5 πλύσεις (5min η καθεμία) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST 1X με σκοπό την απομάκρυνση περίσσειας πρωτογενούς αντισώματος που δεν έχει συνδεθεί σε ειδικές θέσεις της πρωτεΐνης-στόχου. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αραιώνεται (1:50.000) σε διάλυμα που περιέχει 2% w/v άπαχο αποξηραμένο γάλα σε TBST 1X. Η επώαση διαρκεί 1h και πραγματοποιείται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα αφαιρείται το δευτερογενές αντίσωμα και πραγματοποιούνται 3 πλύσεις (5min η καθεμία) με TBST 1X με σκοπό την απομάκρυνση περίσσειας του δευτερογενούς αντισώματος.

- ***Εμφάνιση σήματος***

Η εμφάνιση του σήματος βασίζεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας. Συγκεκριμένα, το δευτερογενές αντίσωμα είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδος (horseradish peroxidase, HRP). Προσθέτοντας το υπόστρωμα (ECL) του συγκεκριμένου ενζύμου, παρατηρείται εκπομπή φωτός ως αποτέλεσμα της αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος. Ειδικότερα, προστίθεται στη μεμβράνη το αντιδραστήριο ECL (ECL_A και ECL_B σε αναλογία 1:1) για 3min σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πάροδο των 3min, η μεμβράνη τοποθετείται σε κασετίνα έκθεσης και μεταφέρεται σε σκοτεινό θάλαμο (dark room), όπου στο εσωτερικό της κασετίνας τοποθετούνται φωτοευαίσθητα X-ray φιλμ με σκοπό την ανίχνευση σήματος. Στη συνέχεια, το φιλμ αρχικά τοποθετείται σε διάλυμα εμφάνισης σήματος (Developer), εμβαπτίζεται σε νερό και μεταφέρεται σε διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Fixer).

2.3.4 Επεξεργασία αποτελεσμάτων-Στατιστική Ανάλυση

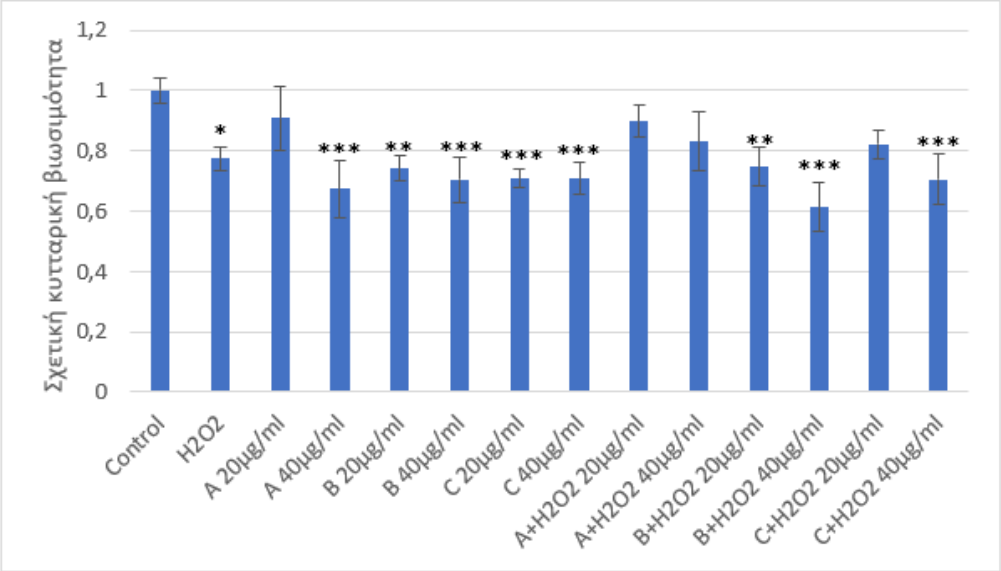
Όλα τα αποτελέσματα των πειραματικών δοκιμασιών απαιτούσαν υπολογιστική επεξεργασία. Η μέτρηση της συνολικής πρωτεΐνης σε ένα δείγμα μέσω της χρωματογραφικής μεθόδου Bradford, η προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση, οι κανονικοποιήσεις των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western, οι κανονικοποιήσεις των αποτελεσμάτων των πειραμάτων μέτρησης κυτταρικής βιωσιμότητας MTT και οι κανονικοποιήσεις του πειράματος μέτρησης των αλλαγών του μιτοχονδριακού δυναμικού JC-1 πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του Microsoft Office Excel. Οι ποσοτικοποιήσεις των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western Blot καθώς και των αποτελεσμάτων του πειράματος μέτρησης των αλλαγών του μιτοχονδριακού δυναμικού JC-1 πραγματοποιήθηκαν μέσω του προγράμματος ImageJ. Τα αποτελέσματα του πειράματος MTT και JC-1 αναλύθηκαν με One-Way- και Two-Way Analysis of Variance-Tukey B (ANOVA) αντίστοιχα μέσω του προγράμματος StatPlus ενώ για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Adobe Photoshop CS.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας από τη ρητίνη του Pistacia lentiscus L. var. chia στη βιωσιμότητα των κυττάρων SH-SY5Y που έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του κυτταροτοξικού παράγοντα H_2O_2 700μM για 6 ώρες

Αρχικός στόχος της συγκεκριμένης έρευνας, αποτελούσε η εκτίμηση της πιθανής νευροπροστατευτικής επίδρασης των διαφορετικής πολικότητας κλασμάτων ρητίνης του Pistacia lentiscus L. var. chia στη βιωσιμότητα των νευρικών κυττάρων SH-SY5Y, τα οποία επωάστηκαν παρουσία και απουσία οξειδωτικού παράγοντα H_2O_2 700μM για 6 ώρες, μέσω της δοκιμασίας MTT. Συγκεκριμένα, κύτταρα SH-SY5Y καλλιεργήθηκαν σε 96-well plates (15.000 cells/well) παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM για 48 ώρες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας (A: μη πολικό, B: ημιπολικό και C: πολικό) σε τελικές συγκεντρώσεις 20μg/ml και 40μg/ml και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες. Στις 6 ώρες πριν τη λήξη του εικοσιτετράωρου προστέθηκε στα κύτταρα H_2O_2 700μM με σκοπό την πρόκληση οξειδωτικού στρες. Στη λήξη του εικοσιτετράωρου, προστέθηκε στα κύτταρα το αντιδραστήριο MTT σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml και ακολούθησε διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης και μέτρηση της απορρόφησης στα 570nm και στα 690nm. Να σημειωθεί πως η συνθήκη αναφοράς (control) περιείχε 1/1000 v/v DMSO.

Όπως παρατηρούμε και από το Διάγραμμα 1, το υπεροξείδιο του υδρογόνου προκάλεσε 20% στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας λόγω του οξειδωτικού στρες που υφίστανται τα κύτταρα. Το μη πολικό κλάσμα A σε συγκέντρωση 20μg/ml προκάλεσε μικρή κυτταροτοξικότητα περίπου 10% ενώ σε συγκέντρωση 40μg/ml μείωσε την κυτταρική βιωσιμότητα κατά 30%. Το ημιπολικό κλάσμα B και το πολικό κλάσμα C σε συγκεντρώσεις 20μg/ml όσο και 40μg/ml μείωσαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά 30%, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες (control). Αξιοσημείωτη είναι η επίδραση των κλασμάτων ρητίνης παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ειδικότερα, παρατηρείται αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας στα κύτταρα που συνεπωάστηκαν με κλάσμα A και H_2O_2 σε σύγκριση με τα κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με H_2O_2. Το κλάσμα A σε συγκεντρώσεις 20μg/ml και 40μg/ml παρουσία H_2O_2 αύξησε την κυτταρική βιωσιμότητα κατά 20% και 7% αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα κύτταρα που επωάστηκαν με H_2O_2. Η συνεπώαση των κυττάρων με το ημιπολικό κλάσμα B σε συγκέντρωση 20μg/ml και με υπεροξείδιο του υδρογόνου δεν προκάλεσε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή ενώ η συνεπώαση των κυττάρων με κλάσμα B σε συγκέντρωση 40mg/ml μείωσε κατά 20% την κυτταρική βιωσιμότητα σε σύγκριση με τα κύτταρα που επωάστηκαν με H_2O_2. Τέλος, η συνπαρουσία του πολικού κλάσματος C σε συγκέντρωση 20μg/ml με το H_2O_2 δεν οδήγησε σε κάποια μεταβολή ενώ το κλάσμα C σε συγκέντρωση 40μg/ml παρουσία H_2O_2 οδήγησε σε μία μικρή μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 10% σε σύγκριση με τα κύτταρα που επωάστηκαν μόνο παρουσία H_2O_2. Συμπερασματικά είναι αντιληπτό πως το κλάσμα A είναι ικανό να αναστρέψει την απόπτωση που προκαλείται παρουσία υπεροξειδίου εξαιτίας της παρουσίας ένζυμων των μιτοχονδρίων, τα οποία βοηθούν τα κύτταρα να επιβιώσουν. Ακόμη το κλάσμα B σε συγκέντρωση 40μg/ml φαίνεται να είναι το πιο κυτταροτοξικό σε σχέση με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις κλασμάτων.



Διάγραμμα 1: Αξιολόγηση της επίδρασης του μη πολικού Α, του ημιπολικού Β και του πολικού C κλάσματος από τη ρητίνη του Pistacia lentiscus L. var. chia στη βιωσιμότητα των νευρικών κυττάρων SH-SY5Y που επωάστηκαν παρουσία και απουσία H_2O_2 με τελική συγκέντρωση 700μM για 6 ώρες. Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα παρουσιάζεται ως η βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσία των κλασμάτων ρητίνης ή/και του υπεροξειδίου συγκρινόμενη με τη κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων μαρτύρων (συνθήκη control), όπου στην τελευταία η κυτταρική βιωσιμότητα ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος ±SD (n=5). *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001

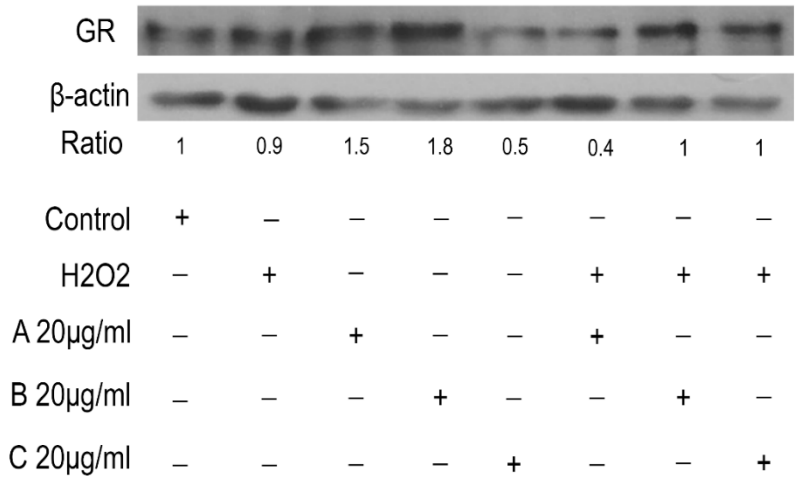
3.2 Διερεύνηση της επίδρασης κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας από τη ρητίνη του Pistacia lentiscus L. var. chia στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) και του υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPARα) σε κύτταρα SH-SY5Y που έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του H_2O_2 700μM για 6 ώρες

Επόμενος στόχος της συγκεκριμένης πειραματικής μελέτης ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης των κλασμάτων ρητίνης στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) και του υποδοχέα πολλαπλασιαστή υπεροξεισωμάτων α (PPARα) στα κύτταρα SH-SY5Y που έχουν επωαστεί με H_2O_2 700μM για 6 ώρες. Επομένως για την επίτευξη του στόχου αυτού, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western ανιχνεύοντας έτσι στις μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και του PPARα, οι οποίοι ρυθμίζουν σηματοδοτικά μονοπάτια παραγωγής ενέργειας με τη μορφή του ATP.

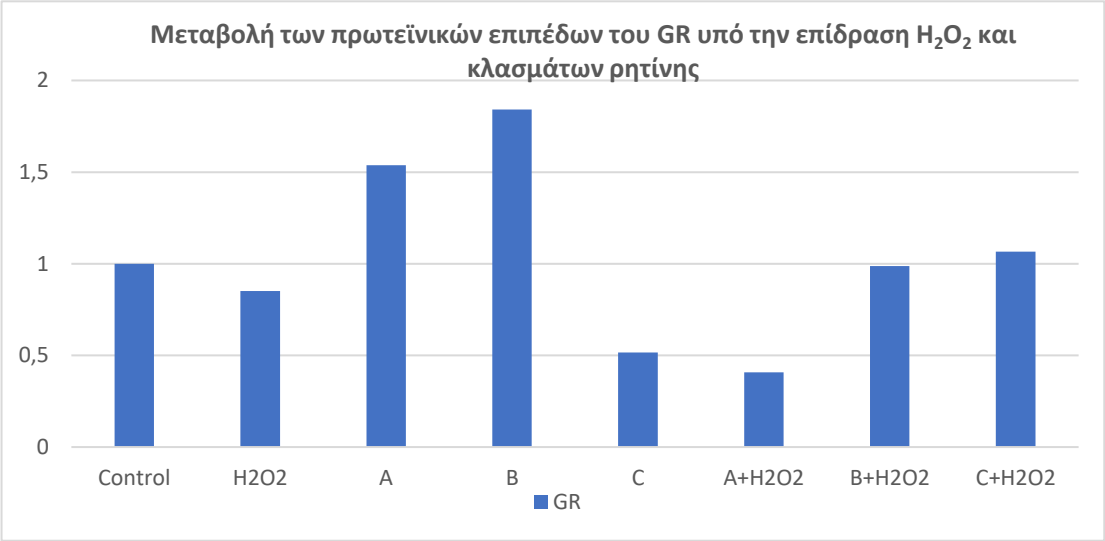
Ειδικότερα, κύτταρα SH-SY5Y καλλιεργήθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας κυττάρων (250.000 cells/well) για 48 ώρες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη κλασμάτων Α, Β και C σε συγκέντρωση 20μg/ml και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες. Έπειτα 6 ώρες πριν τη λήξη του εικοσιτετράωρου προστέθηκε στα κύτταρα H_2O_2 700μM. Η συνθήκη αναφοράς (control) περιείχε 1/1000 v/v DMSO.

Στην Εικόνα 17 και στο Διάγραμμα 2, παρουσιάζεται η επίδραση των κλασμάτων στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Παρατηρούμε ότι παρουσία του H_2O_2 προκαλείται μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) κατά 10%. Τα κλάσματα Α και Β φαίνεται να προκαλούν αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα GR κατά 50% και 80% αντίστοιχα, η οποία αναιρείται παρουσία τόσο των κλασμάτων Α και Β όσο και του υπεροξειδίου. Η επώαση των κυττάρων με το κλάσμα C απουσία H_2O_2, προκαλεί μείωση των

πρωτεϊνικών επιπέδων του GR κατά 50% σε σύγκριση με το control. Η συνεπώαση των κυττάρων με το κλάσμα A παρουσία H_2O_2 δεν φαίνεται να προκαλεί αντίσταση στην επαγόμενη από το H_2O_2 μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR καθώς παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνικών του επιπέδων κατά 60% σε σύγκριση με τη συνθήκη control. Τα κλάσματα B και C παρουσία του υπεροξειδίου παρουσιάζουν μικρή αντίσταση στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων GR από το H_2O_2 καθώς δεν μεταβάλλονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα GR σε σύγκριση με τη συνθήκη control.

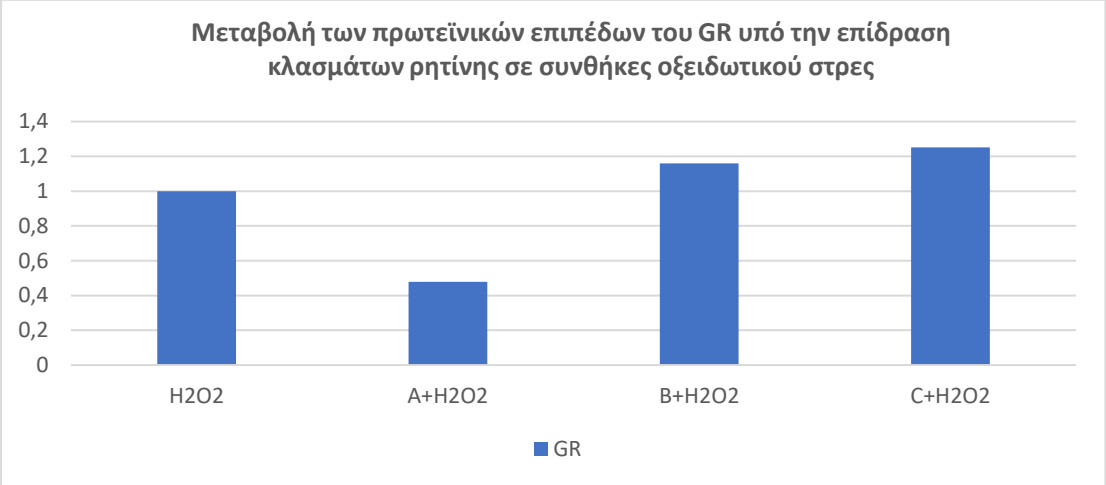


Εικόνα 17*:* Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας A, B και C συγκέντρωσης 20μg/ml στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) στα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του H_2O_2 700μM για 6 ώρες. Οι λόγοι προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω του προγράμματος Image J. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).



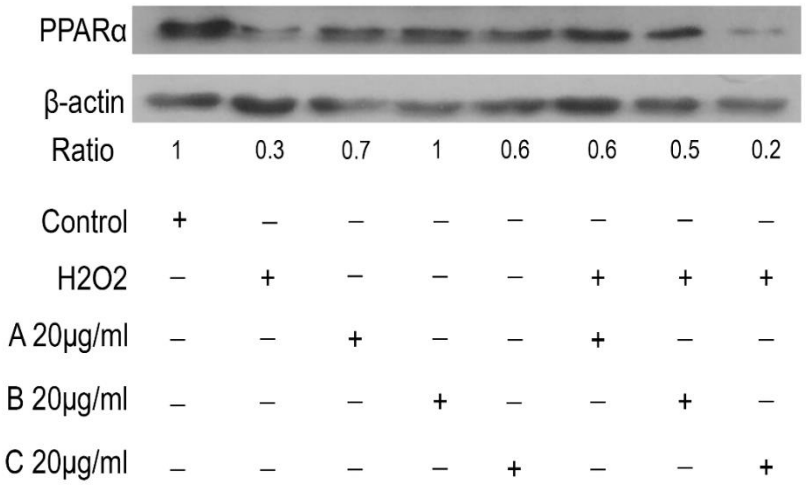
Διάγραμμα 2: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω του προγράμματος Microsoft Excel. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).

Με σκοπό τη διευκόλυνση της ανάγνωσης των αποτελεσμάτων, στο Διάγραμμα 3, πραγματοποιείται κανονικοποίηση των τιμών ως προς το H_2O_2. Παρατηρείται πως το κλάσμα Α παρουσία υπεροξειδίου δεν προκαλεί αντίσταση στην επαγόμενη κυτταροτοξικότητα καθώς δεν αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) σε σύγκριση με τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα στη συνθήκη H_2O_2. Αντίθετα, τα κλάσματα Β και C παρουσία H_2O_2 προκαλούν αντίσταση στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR που προκαλεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου καθώς παρουσιάζουν αυξημένα τα επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών κατά 15% και 25% αντίστοιχα σε σύγκριση με τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα στη συνθήκη μόνο παρουσίας H_2O_2 συμβάλλοντας έτσι στη μείωση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται εξαιτίας του H_2O_2 και στην επαγωγή της παραγωγής της ενέργειας.

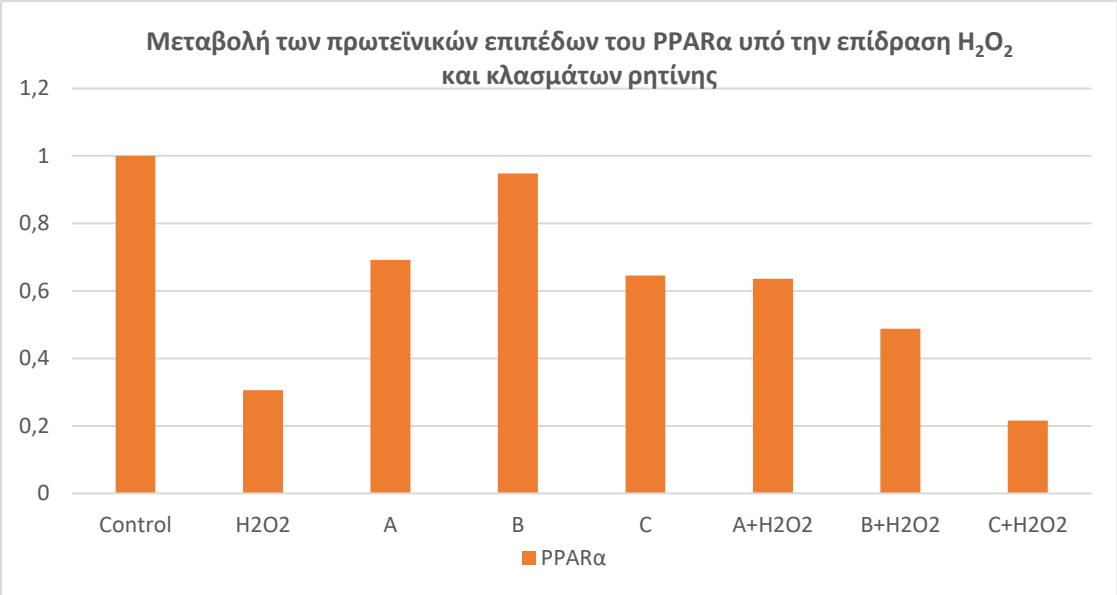


<u>Διάγραμμα 3:</u> Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας Α, Β και C συγκέντρωσης 20μg/ml στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) στα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του H_2O_2 700μM για 6 ώρες. Η κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών GR πραγματοποιήθηκε ως προς τη συνθήκη που περιέχει μόνο H_2O_2. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη H_2O_2.

Στην Εικόνα 18 και στο Διάγραμμα 4, παρουσιάζεται η επίδραση των κλασμάτων Α, Β και C στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPARα). Παρατηρούμε πως παρουσία H_2O_2 παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα PPARα κατά 70%. Παρουσία των κλασμάτων Α και C μειώνονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα PPARα κατά 30% και 40%, αντίστοιχα, ενώ το κλάσμα Β φαίνεται να μην προκαλεί κάποια μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα σε σύγκριση με τη συνθήκη control. Τέλος, η συνεπώαση των κυττάρων με τα κλάσματα Α και Β παρουσία υπεροξειδίου φαίνεται να μετριάζει την προκαλούμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα λόγω του H_2O_2 καθώς παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων κατά 40% και 50% αντίστοιχα σε σύγκριση με τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα στη συνθήκη H_2O_2 που παρατηρείται μείωση κατά 70%. Το κλάσμα C παρουσία υπεροξειδίου δεν φαίνεται να αντιστέκεται στην προκαλούμενη κυτταροτοξικότητα λόγω του H_2O_2 καθώς μειώνει περισσότερο τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα κατά 80% σε σύγκριση με τη συνθήκη που περιέχει μόνο H_2O_2 που παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα κατά 70%.

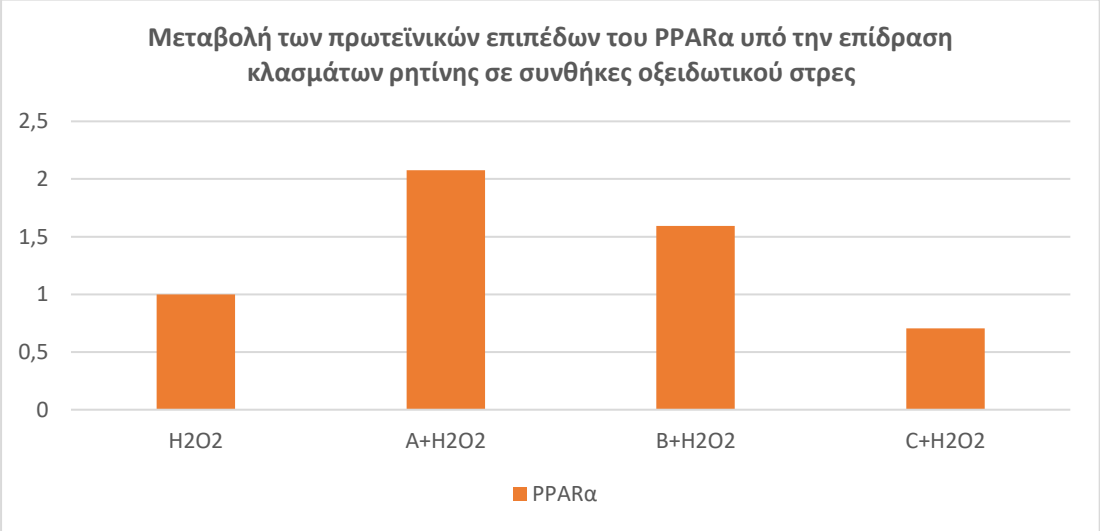


Εικόνα 18: Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας A, B και C συγκέντρωσης 20μg/ml στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPARα) στα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του H_2O_2 700μM για 6 ώρες. Οι λόγοι προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω του προγράμματος Image J. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).



Διάγραμμα 4: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών του υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPARα) ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω του προγράμματος Microsoft Excel. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).

Με σκοπό τη διευκόλυνση της ανάγνωσης των αποτελεσμάτων, στο Διάγραμμα 5, πραγματοποιείται κανονικοποίηση των τιμών ως προς το H_2O_2. Παρατηρείται ότι τα κλάσματα Α και Β παρουσία υπεροξειδίου προκαλούν αντίσταση στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα που προκλήθηκε εξαιτίας του οξειδωτικού στρες. Ειδικότερα, τα κλάσματα Α και Β παρουσιάζουν υψηλότερα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα PPARα κατά 2 φορές και 60% αντίστοιχα σε σύγκριση με τη συνθήκη H_2O_2. Αντίθετα, το κλάσμα C δεν προκαλεί αντίσταση στην κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από το H_20_2 καθώς εμφανίζει μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα κατά 30% σε σύγκριση με τη συνθήκη που περιέχει μόνο H_2O_2.



Διάγραμμα 5: Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας Α, Β και C συγκέντρωσης 20μg/ml στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υποροξεισωμάτων α (PPARα) στα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του H_2O_2 700μM για 6 ώρες. Η κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών του υποδοχέα PPARα πραγματοποιήθηκε ως προς τη συνθήκη που περιέχει μόνο H_2O_2. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη H_2O_2.

3.3 Διερεύνηση της επίδρασης κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας από τη ρητίνη του Pistacia lentiscus L. var. chia στα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ σε κύτταρα SH-SY5Y που έχουν συνεπωαστεί απουσία και παρουσία H_2O_2 700μM για 6 ώρες και E2 10^{-9}M για 24 ώρες

Επόμενος στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης των κλασμάτων ρητίνης στα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ στα κύτταρα SH-SY5Y που έχουν επωαστεί με παρουσία και απουσία τόσο H_2O_2 700μM για 6 ώρες όσο και οιστραδιόλης (E2) σε τελική συγκέντρωση 10^{-9}M για 24 ώρες. Η ανίχνευση των πρωτεϊνικών μεταβολών των υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ, οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον ενεργειακό μεταβολισμό, πραγματοποιήθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

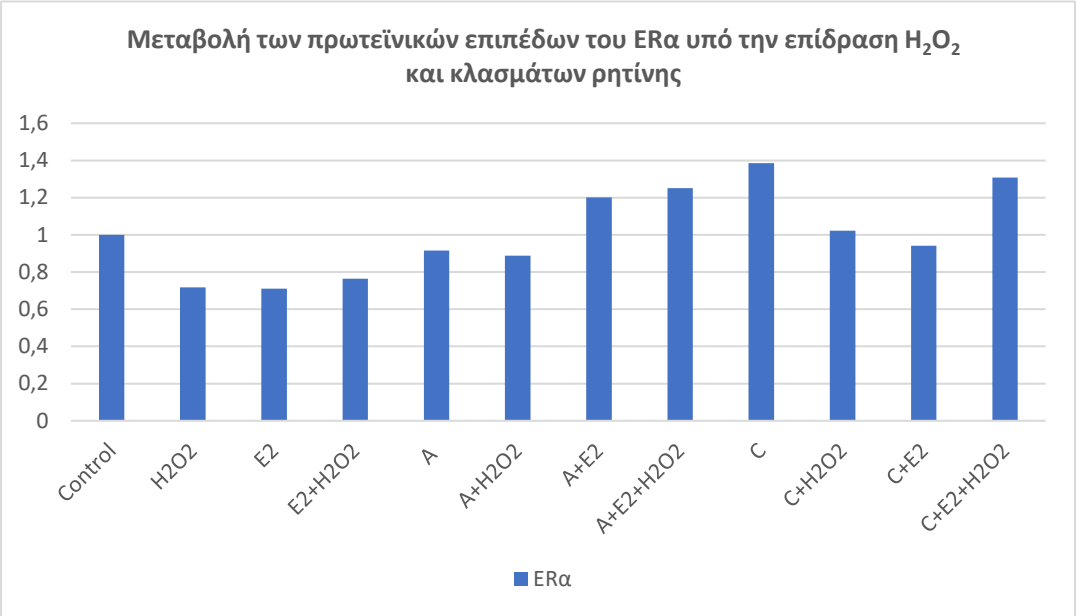
Ειδικότερα, κύτταρα SH-SY5Y καλλιεργήθηκαν σε 6-well plates (250.000 cells/well) για 48 ώρες. Έπειτα προστέθηκαν τα κλάσματα Α, C σε συγκέντρωση 20μg/ml και οιστραδιόλη (E2) σε τελική συγκέντρωση 10^{-9}M διαλυμένη σε EtOH 100% για 24 ώρες. Στις 6 ώρες πριν τη λήξη του εικοσιτετράωρου προστέθηκε H_2O_2 700μM. Η συνθήκη αναφοράς (control) περιείχε 1/1000 v/v DMSO. Να τονιστεί πως δεν μελετήθηκε η

επίδραση του κλάσματος Β καθώς σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενων πειραμάτων MTT φάνηκε να είναι το πιο κυτταροτοξικό συγκριτικά με τα άλλα 2 κλάσματα.

Στην Εικόνα 19 και στο Διάγραμμα 6, παρουσιάζεται η επίδραση των κλασμάτων στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα ERα. Παρατηρούμε ότι το H_2O_2 όπως και η Ε2 προκαλούν μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα ERα κατά 30%, συγκριτικά με τη συνθήκη control. Στη συνδυαστική συνθήκη που περιλαμβάνει την επώαση των κυττάρων με Ε2 και H_2O_2 παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα κατά 20% σε σύγκριση με τη συνθήκη control. Επομένως δεν παρατηρείται συνδυαστική δράση της Ε2 και του H_2O_2. Το κλάσμα Α δεν φαίνεται να έχει κάποια σημαντική επίδραση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα ERα. Ακόμη, το κλάσμα Α παρουσία H_2O_2 δεν μεταβάλλει σημαντικά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα σε σύγκριση με το control, γεγονός που δείχνει πως το κλάσμα Α αντιστέκεται στην κυτταροτοξική δράση του H_2O_2. Η αντίσταση του κλάσματος Α στο οξειδωτικό στρες που προκαλεί το H_2O_2 ενισχύεται παρουσία Ε2, καθώς φαίνεται αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα κατά 30% στη συνθήκη που περιλαμβάνει ταυτόχρονη συνεπώαση των κυττάρων με το κλάσμα Α, με H_2O_2 και Ε2 σε σύγκριση με τη συνθήκη control. Επιπλέον, το κλάσμα Α παρουσία Ε2 αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα κατά 20%. Όσο αναφορά το κλάσμα C, αυτό προκαλεί αύξηση κατά 40% στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα ενώ η δράση αυτή αναιρείται παρουσία Ε2 καθώς δεν μεταβάλλονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα στη συνθήκη control. Επιπρόσθετα, το κλάσμα C παρουσία του H_2O_2 φαίνεται να αντιστέκεται στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων που ERα που προκαλείται εξαιτίας του κυτταροτοξικού παράγοντα H_2O_2 καθώς δεν μεταβάλλει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του συγκεκριμένου υποδοχέα σε σύγκριση με το control. Η αντίσταση του κλάσματος C στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα που προκαλείται λόγω H_2O_2 ενισχύεται παρουσία Ε2 καθώς παρατηρούμε αύξηση των επιπέδων του ERα κατά 30% στη συνθήκη που περιλαμβάνει ταυτόχρονη συνεπώαση των κυττάρων με το κλάσμα C, με H_2O_2 και με Ε2 σε σύγκριση με τη συνθήκη control.

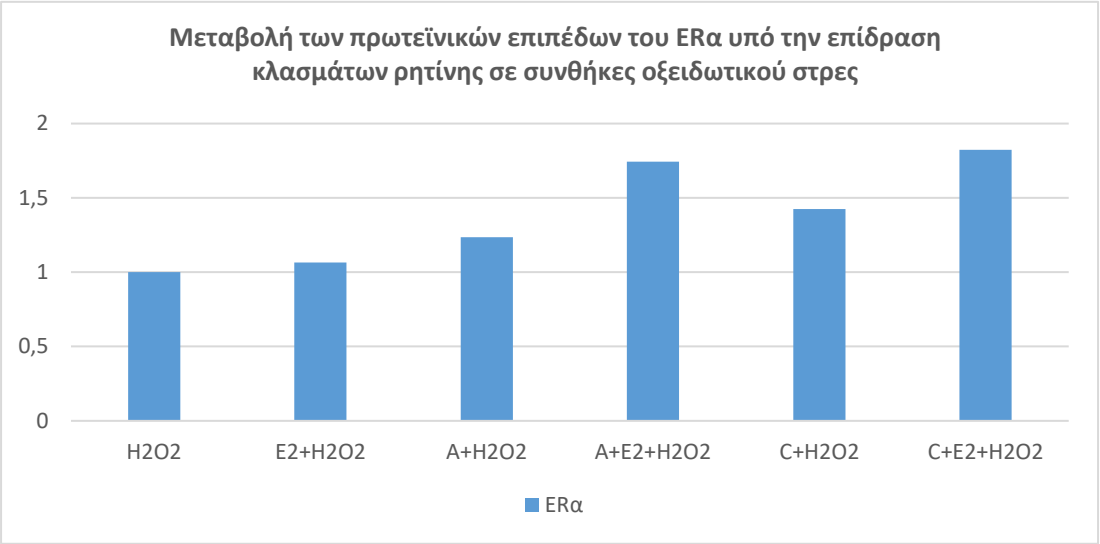
Εικόνα 19: Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας Α και C συγκέντρωσης 20μg/ml στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα οιστρογόνων ERα στα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του Ε2 10^{-9}M για 24 ώρες και H_2O_2 700μM για 6 ώρες. Οι λόγοι προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω του

προγράμματος Image J. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).



Διάγραμμα 6: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεινικών ζωνών του υποδοχέα οιστρογόνων ERα ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω του προγράμματος Microsoft Excel. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).

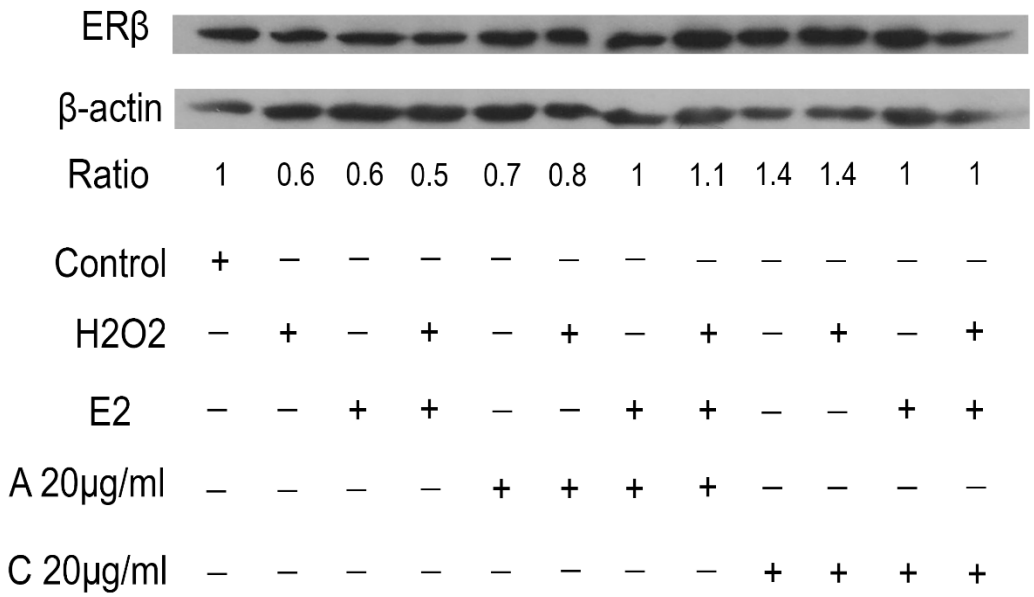
Με σκοπό τη διευκόλυνση της ανάγνωσης των αποτελεσμάτων, στο Διάγραμμα 7, πραγματοποιείται κανονικοποίηση των τιμών ως προς το H_2O_2. Ειδικότερα, παρατηρείται πως η Ε2 παρουσία H_2O_2 δεν μεταβάλλει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα ERα σε σύγκριση με τη συνθήκη που περιέχει μόνο H_2O_2. Ακόμη, παρατηρούμε πως το κλάσμα Α παρουσία H_2O_2 αυξάνει κατά 20% τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα ERα και η συγκεκριμένη δράση ενισχύεται παρουσία Ε2 καθώς ανιχνεύεται αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα ERα κατά 70% στη συνθήκη που περιλαμβάνει συνεπώαση των κυττάρων με το κλάσμα Α, H_2O_2 και Ε2 σε σύγκριση με τη συνθήκη που περιέχει μόνο H_2O_2. Όσο αναφορά την επίδραση του κλάσματος C παρουσία H_2O_2 φαίνεται πως προκαλεί αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα ERα κατά 40% και η συγκεκριμένη δράση ενισχύεται παρουσία Ε2 καθώς παρατηρείται αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα ERα κατά 80% στη συνθήκη που περιλαμβάνει συνεπώαση των κυττάρων με το κλάσμα C, H_2O_2 και Ε2 σε σύγκριση με τη συνθήκη H_2O_2.



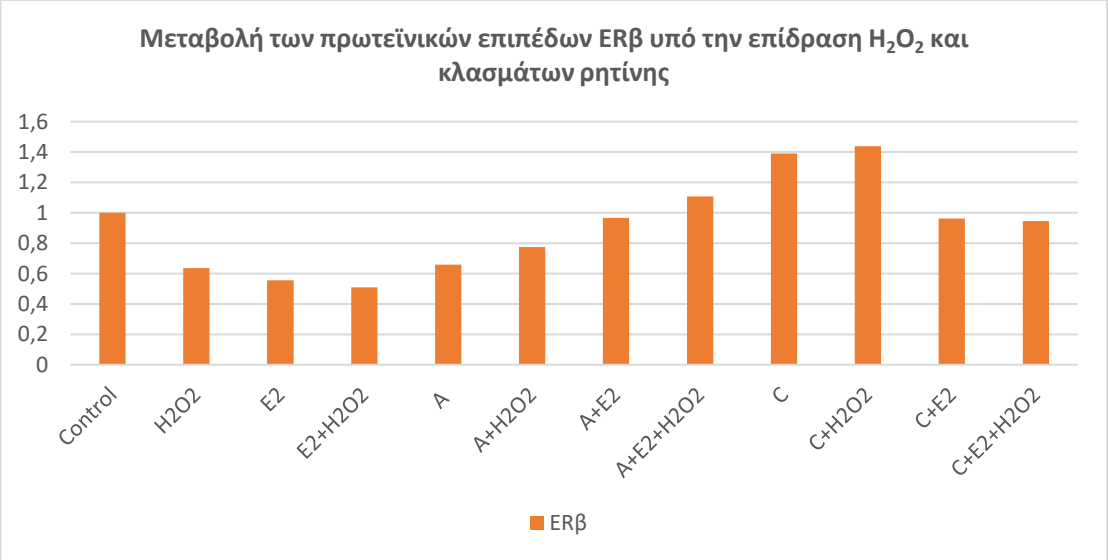
<u>Διάγραμμα 7:</u> Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας Α και C συγκέντρωσης 20μg/ml στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα οιστρογόνων ERα στα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του H_2O_2 700μM για 6 ώρες και Ε2 10^{-9}M για 24 ώρες. Η κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών του υποδοχέα ERα πραγματοποιήθηκε ως προς τη συνθήκη που περιέχει μόνο H_2O_2. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη H_2O_2.

Στην Εικόνα 20 και στο Διάγραμμα 8, παρουσιάζεται η επίδραση των κλασμάτων Α και C στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα ERβ. Ειδικότερα, παρατηρείται πως το η παρουσία H_2O_2 όπως και η Ε2 μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα ERβ κατά 40%, συγκριτικά με τη συνθήκη control. Στη συνδυαστική συνθήκη που περιλαμβάνει τη συνεπώαση των κυττάρων με H_2O_2 και Ε2 παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ κατά 50% σε σύγκριση με τη συνθήκη control. Το κλάσμα Α μείωσε τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ κατά 30% ενώ παρουσία της ορμόνης Ε2, αυτή η μείωση φαίνεται να αναιρείται καθώς στη συνθήκη που περιλαμβάνει συνεπώαση των κυττάρων με το κλάσμα Α και Ε2, δεν μεταβάλλονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ σε σύγκριση με το control. Ακόμη, το κλάσμα Α παρουσία H_2O_2 μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ σε σύγκριση με το control, αλλά σε μικρότερο βαθμό δηλαδή κατά 20% σε σύγκριση τα επίπεδα του ERβ στη συνθήκη H_2O_2, τα οποία μειώνονται κατά 40%. Επομένως η επώαση των κυττάρων παρουσία Α και H_2O_2 φαίνεται να είναι νευροπροστατευτική. Το κλάσμα Α παρουσία τόσο της Ε2 όσο και του H_2O_2 φαίνεται να μην μεταβάλει σημαντικά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ, γεγονός που δείχνει ότι μπορεί να αναστρέψει τη μείωση των επιπέδων ERβ που προκαλείται στη συνθήκη του H_2O_2. Το κλάσμα C τόσο απουσία όσο και παρουσία H_2O_2 προκαλεί αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ κατά 40% σε σύγκριση το control επομένως είναι φανερή η νευροπροστατευτική του δράση. Να τονιστεί όμως πως η συγκεκριμένη δράση του κλάσματος C αναιρείται παρουσία Ε2 όπως και στη συνθήκη που περιλαμβάνει συνεπώαση των κυττάρων με

το κλάσμα C, E2 και H_2O_2 δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα ERβ σε σύγκριση με τη συνθήκη control.

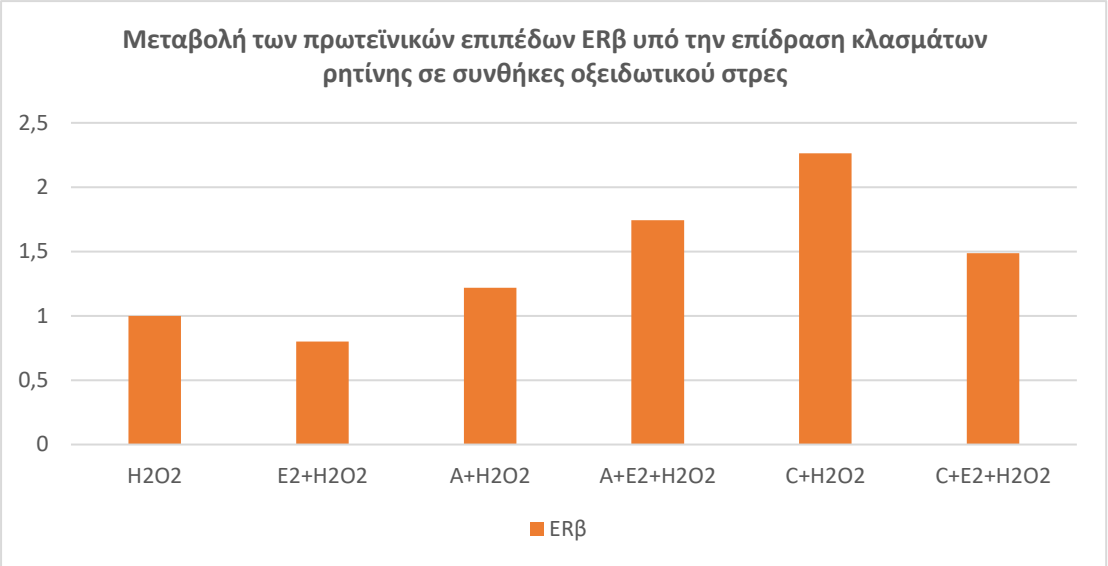


Εικόνα 20: Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας A και C συγκέντρωσης 20μg/ml στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα οιστρογόνων ERβ στα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του E2 10^{-9}M για 24 ώρες και H_2O_2 700μM για 6 ώρες. Οι λόγοι προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω του προγράμματος Image J. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).



Διάγραμμα 8: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών του υποδοχέα οιστρογόνων ERβ ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω του προγράμματος Microsoft Excel. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).

Με σκοπό τη διευκόλυνση της ανάγνωσης των αποτελεσμάτων, στο Διάγραμμα 9, πραγματοποιείται κανονικοποίηση των τιμών ως προς το H_2O_2. Ειδικότερα, φαίνεται πως η Ε2 παρουσία H_2O_2 μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα ERβ κατά 20% σε σύγκριση με τη συνθήκη που περιέχει μόνο H_2O_2. Ακόμη, παρατηρούμε πως το κλάσμα Α παρουσία H_2O_2 αυξάνει κατά 20% τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα ERβ και η συγκεκριμένη δράση ενισχύεται παρουσία Ε2 καθώς ανιχνεύεται αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα ERα κατά 70% στη συνθήκη που περιλαμβάνει συνεπώαση των κυττάρων με το κλάσμα Α, Ε2 και H_2O_2 σε σύγκριση με τη συνθήκη που περιέχει μόνο H_2O_2. Όσο αναφορά την επίδραση του κλάσματος C παρουσία H_2O_2 φαίνεται πως προκαλεί αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα ERβ κατά 2,2 φορές και η συγκεκριμένη δράση αναιρείται παρουσία Ε2 καθώς παρατηρείται αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα ERβ κατά 50% στη συνθήκη που περιλαμβάνει συνεπώαση των κυττάρων με κλάσμα C, Ε2 και H_2O_2 σε σύγκριση με τη συνθήκη H_2O_2.



Διάγραμμα 9: Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας Α και C συγκέντρωσης 20μg/ml στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα οιστρογόνων ERβ στα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του H_2O_2 700μM για 6 ώρες και Ε2 10^{-9}M για 24 ώρες. Η κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών του υποδοχέα ERβ πραγματοποιήθηκε προς τη συνθήκη που περιέχει μόνο H_2O_2. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη H_2O_2.

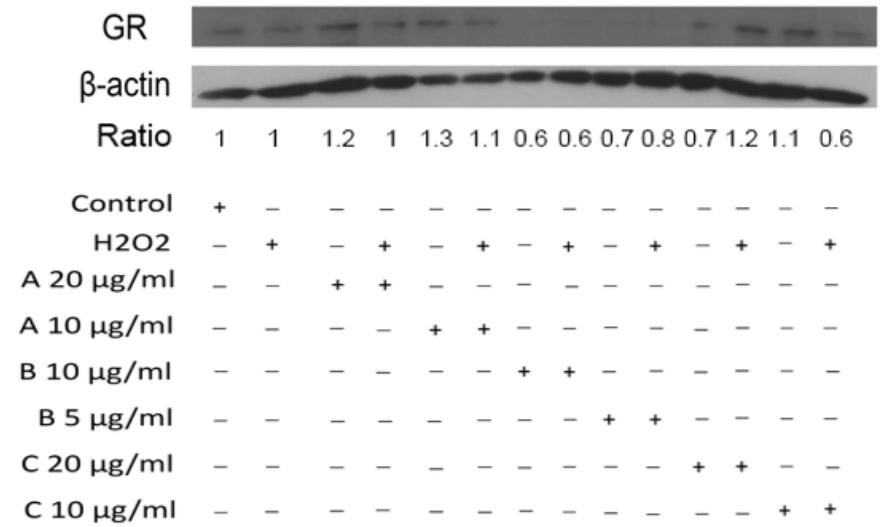
3.4 Διερεύνηση της επίδρασης διαφορετικής πολικότητας κλασμάτων από τη ρητίνη του Pistacia Lentiscus L. var. chia στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) σε κύτταρα SH-SY5Y που έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία H_2O_2 700μM για 6 ώρες

Για την αξιολόγηση της επίδρασης των κλασμάτων ρητίνης στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) στα κύτταρα SH-SY5Y, που έχουν επωαστεί με H_2O_2, διεξήχθη πειραματική διαδικασία ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων SH-SY5Y (250.000 κυττάρων/well) σε 6-well plates για 48 ώρες. Έπειτα, προστέθηκαν στα κύτταρα SH-SY5Y κλάσματα μαστίχας Α και C σε τελικές συγκεντρώσεις 20μg/ml και 10μg/ml ενώ το κλάσμα Β προστέθηκε σε τελικές συγκεντρώσεις 10μg/ml και 5μg/ml. Έπειτα πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων για 24 ώρες και ακολούθησε προσθήκη

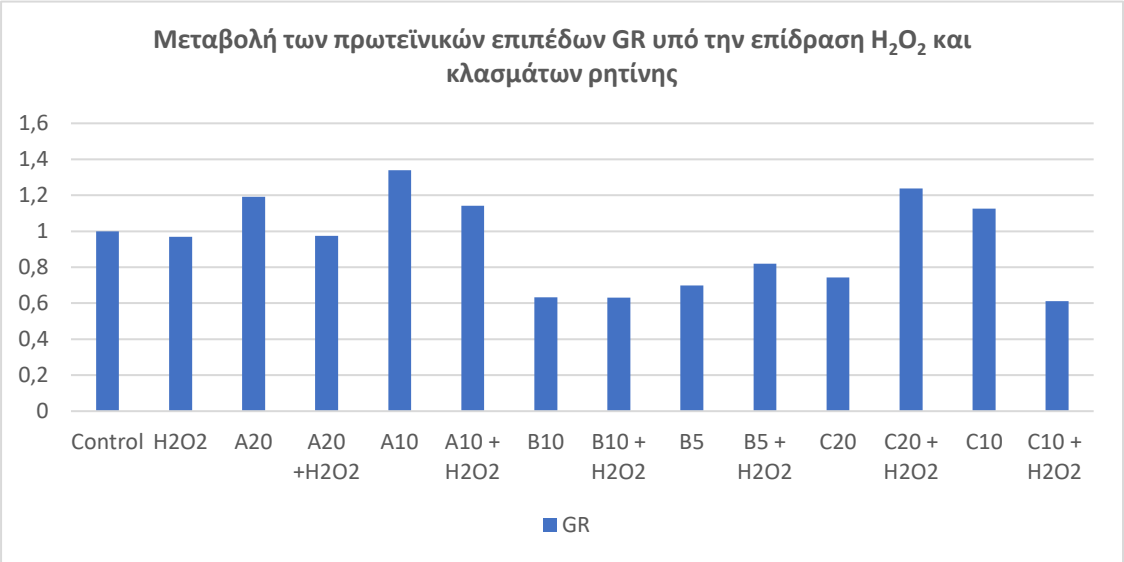
H_2O_2 σε τελική συγκέντρωση 700μM, έξι ώρες πριν τη λήξη του εικοσιτετράωρου. Να σημειωθεί πως η συνθήκη αναφοράς (control) περιείχε 1/1000 v/v DMSO.

Στην Εικόνα 21 και στο Διάγραμμα 10, παρουσιάζεται η επίδραση των κλασμάτων στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Το κλάσμα Α σε συγκέντρωση 20μg/ml προκαλεί αύξηση κατά 20% ενώ το κλάσμα Α σε συγκέντρωση 10μg/ml φαίνεται να προκαλεί αύξηση κατά 30% των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR σε σύγκριση με το control. Ακόμη, το κλάσμα Α σε συγκέντρωση 20μg/ml παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου φαίνεται να μην μεταβάλει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR σε αντίθεση με το κλάσμα Α σε συγκέντρωση 10μg/ml, το οποίο παρουσία H2O2 προκαλεί αύξηση κατά 10% στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα GR σε σύγκριση με τη συνθήκη control. Έτσι γίνεται αντιληπτό πως το κλάσμα Α συγκέντρωσης 10μg/ml μπορεί να ενισχύσει τον ενεργειακό μεταβολισμό και να επάγει μοριακά σηματοδοτικά μονοπάτια νευροπροστασίας των κυττάρων αποτρέποντας τις αποπτωτικές επιδράσεις του H_2O_2 στα κύτταρα SH-SY5Y. Το κλάσμα Β σε συγκέντρωση 10μg/ml τόσο παρουσία όσο και απουσία H_2O_2 φαίνεται να προκαλεί μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα GR κατά 40% σε σύγκριση με το αντίστοιχο control. Επιπλέον, το κλάσμα Β σε συγκέντρωση 5μg/ml φαίνεται να προκαλεί μείωση κατά 30% ενώ το ίδιο κλάσμα παρουσία H_2O_2 φαίνεται να προκαλεί μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα GR κατά 80%. Όσο αναφορά το κλάσμα C σε συγκέντρωση 20μg/ml αυτό προκαλεί μείωση του GR κατά 30% ενώ η παρουσία του ίδιου κλάσματος με το H_2O_2 οδηγεί σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR κατά 20% σε σύγκριση με το control. Το κλάσμα C σε συγκέντρωση 10μg/ml φαίνεται να προκαλεί αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR κατά 10% ενώ παρουσία κλάσματος με το H_2O_2 διακρίνονται μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR κατά 40% σε σύγκριση με το control. Βέβαια να τονιστεί πως λόγω πειραματικών σφαλμάτων δεν μπορούμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση των κλασμάτων στα επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) και για αυτό απαιτείται επανάληψη του συγκεκριμένου πειράματος.



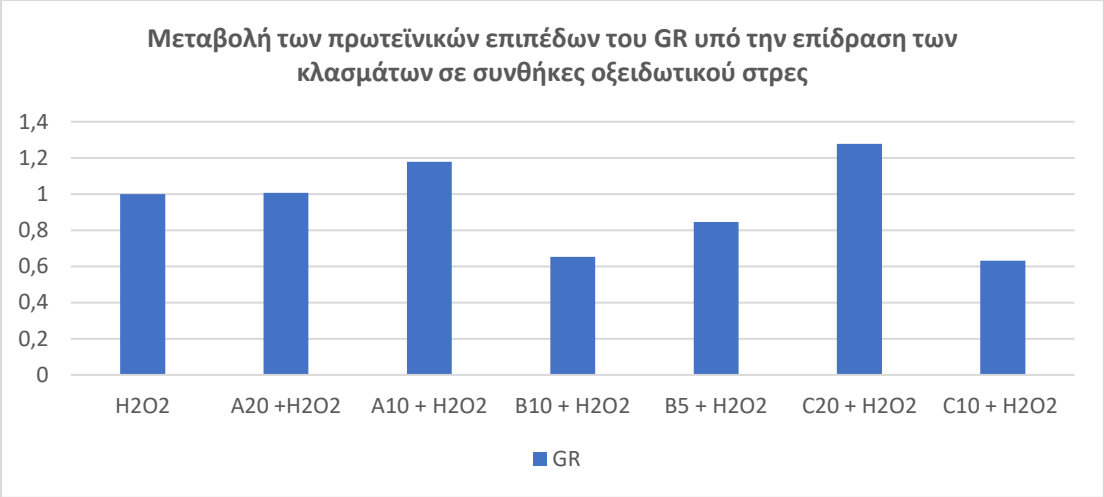
Εικόνα 21: Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας Α και C σε συγκεντρώσεις 20μg/ml και 10μg/ml και του κλάσματος Β σε συγκεντρώσεις 10μg/ml και 5μg/ml στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) στα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του H_2O_2 700μM για 6 ώρες. Οι λόγοι προκύπτουν με την κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω του προγράμματος Image J. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών

των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).



Διάγραμμα 10: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών του υποδοχέα GR ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω του προγράμματος Microsoft Excel. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).

Με σκοπό τη διευκόλυνση της ανάγνωσης των αποτελεσμάτων, στο Διάγραμμα 11, πραγματοποιείται κανονικοποίηση των τιμών ως προς το H_2O_2. Διακρίνεται ότι το κλάσμα Α παρουσία H_2O_2 συγκέντρωσης 20μg/ml δεν μεταβάλει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR σε σύγκριση με τη συνθήκη που περιέχει μόνο H_20_2. Το κλάσμα Α συγκέντρωσης 10μg/ml παρουσία H_2O_2 αυξάνει κατά 20% τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR σε σύγκριση με τη συνθήκη που περιέχει H_2O_2 προκαλώντας μικρή αντίσταση στην κυτταροτοξικότητα που προκαλεί το H_2O_2. Σχετικά με το κλάσμα Β, τόσο σε συγκέντρωση 10μg/ml όσο και σε συγκέντρωση 5μg/ml παρουσία H_2O_2 διακρίνονται μειωμένα επίπεδα του υποδοχέα GR κατά 30% και 20% αντίστοιχα. Το κλάσμα C σε συγκέντρωση 20μg/ml παρουσία H_2O_2 φαίνεται να ενισχύει τον ενεργειακό μεταβολισμό καθώς αυξάνει τα επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών κατά 30% σε σύγκριση με τη συνθήκη που περιέχει μόνο H_2O_2. Τέλος το κλάσμα C σε συγκέντρωση 10μg/ml δεν φαίνεται να έχει νευροπροστατευτική δράση καθώς μειώνει τα επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών κατά 40% σε σύγκριση με τη συνθήκη που περιέχει μόνο H_2O_2.



Διάγραμμα 11: Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας Α και C σε συγκεντρώσεις 20μg/ml και 10μg/ml και του κλάσματος Β σε συγκεντρώσεις 10μg/ml και 5μg/ml στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) στα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του H_2O_2 700μM για 6 ώρες. Η κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών του υποδοχέα GR πραγματοποιήθηκε ως προς τη συνθήκη που περιέχει μόνο H_2O_2. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη H_2O_2.

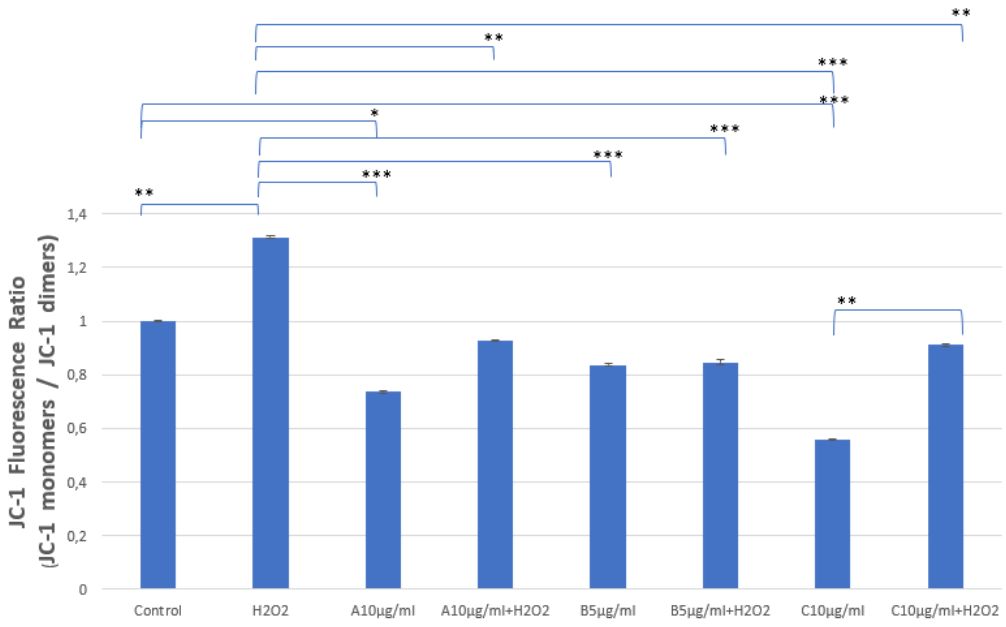
3.5 Διερεύνηση της επίδρασης των διαφορετικής πολικότητας κλασμάτων από τη ρητίνη του Pistacia lentiscus L. var. chia στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης των κυττάρων SH-SY5Y που έχουν έχουν επωαστεί παρουσία και απουσία του κυτταροτοξικού παράγοντα H_2O_2 700μM για 6 ώρες.

Τελευταίος στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελεί η μελέτη της επίδρασης των κλασμάτων ρητίνης στη μεταβολή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, το οποίο αποτελεί σημαντική παράμετρο της μιτοχονδριακής λειτουργίας αλλά και δείκτη της απόπτωσης των κυττάρων, μέσω της δοκιμασίας JC-1.

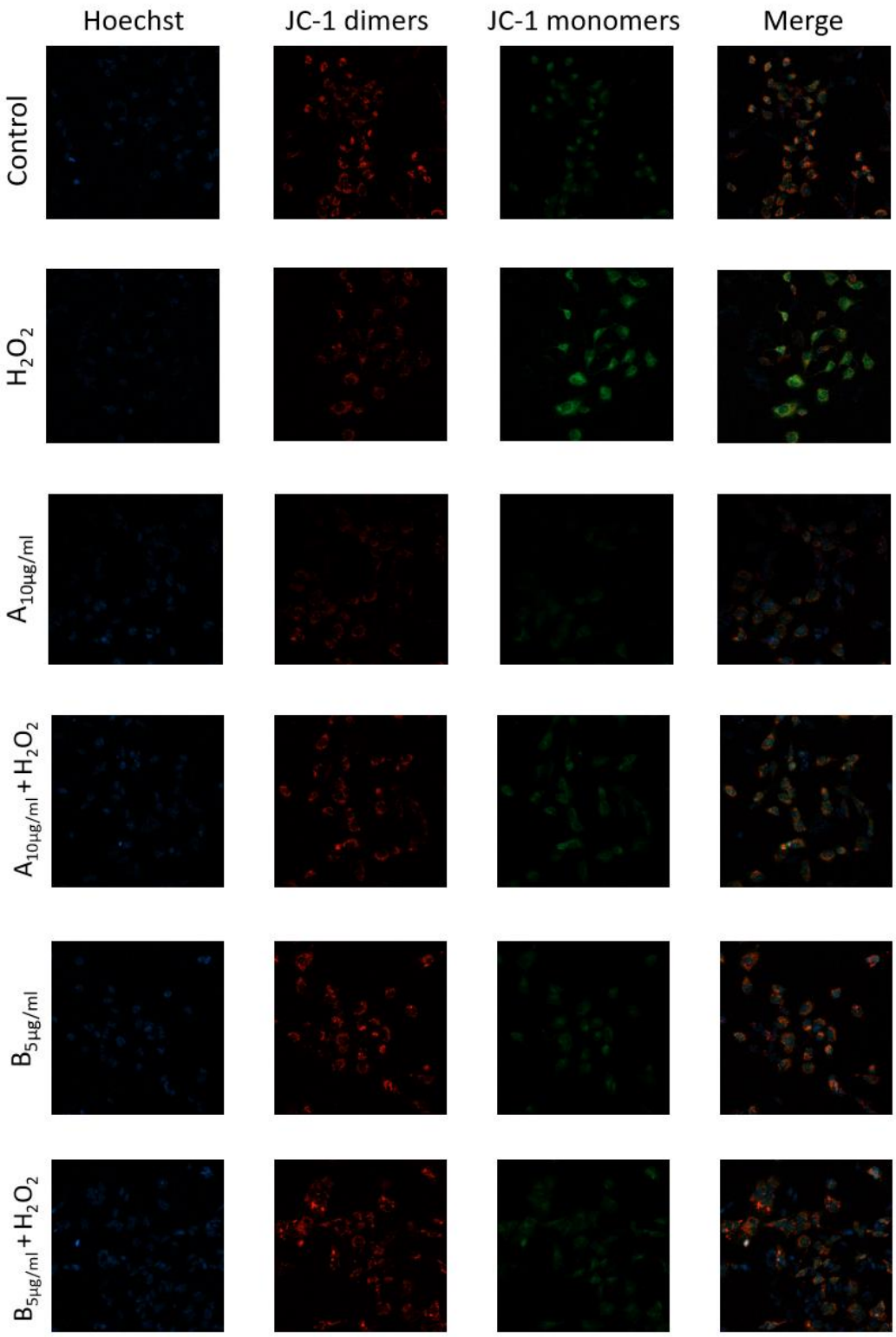
Ειδικότερα πραγματοποιήθηκε επίστρωση κυττάρων SH-SY5Y (100.000 cells/dish) σε πιάτα καλλιέργειας (60x15mm) και ακολούθησε επώαση τους για 48 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση των 48 ωρών προστέθηκαν στα κύτταρα κλάσματα μαστίχας Α και C σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml ενώ το κλάσμα Β προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 5μg/ml και έπειτα πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων παρουσία των κλασμάτων για 24 ώρες. Ακολούθησε προσθήκη H_2O_2 700μM στα πιάτα καλλιέργειας κυττάρων SH-SY5Y, η οποία πραγματοποιήθηκε 6 ώρες πριν τη λήξη των 24 ωρών. Μετά τη λήξη του εικοσιτετράωρου, προστέθηκε διάλυμα φωτοευαίσθητης χρωστικής JC-1 σε τελική συγκέντρωση 2μg/ml και της χρωστικής HOECHST-33342 1mg/ml για 30min. Μετά τα 30min, πραγματοποιούνται πλύσεις με θρεπτικό υλικό DMEM low glucose without phenol red για να απομακρυνθεί η περίσσεια χρωστικών και ακολουθεί μέτρηση του λόγου έντασης πράσινου/κόκκινου φθορισμού της χρωστικής JC-1.

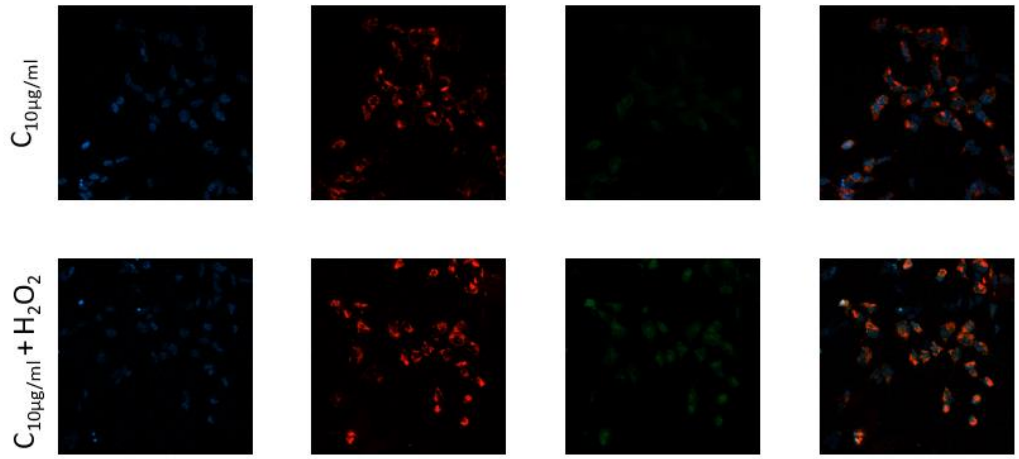
Όπως παρατηρούμε και από την Εικόνα 22 και από το Διάγραμμα 12, το υπεροξείδιο του υδρογόνου οδήγησε στην εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης κατά 30% σε σύγκριση με τη συνθήκη control. Να τονιστεί πως η εκπόλωση της εσωτερικής

μιτοχονδριακής μεμβράνης αποτελεί βασικό γεγονός που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της απόπτωσης με αποτέλεσμα τη διαταραχή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και συνεπώς της παραγωγής ενέργεια με τη μορφή του ATP. Το κλάσμα Α μειώνει το λόγο έντασης πράσινου/κόκκινο του φθορισμού της χρωστικής JC-1 κατά 30% ενώ η συνεπώαση των κυττάρων παρουσία κλάσματος Α και H_2O_2 φαίνεται να προκαλεί αντίσταση στην απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 καθώς στη συνδυαστική συνθήκη που περιλαμβάνει συνεπώαση κυττάρων με το κλάσμα Α και H_2O_2 παρατηρείται μείωση του λόγου μόνο κατά 10% σε σύγκριση με τη συνθήκη control. Όσο αναφορά το κλάσμα Β τόσο παρουσία όσο και απουσία H_2O_2 μειώνει το λόγο έντασης πράσινου/κόκκινο κατά 20%. Επιπλέον, το κλάσμα C μειώνει το λόγο κατά 40% σε σύγκριση με το αντίστοιχο control. Τέλος το κλάσμα C φαίνεται να είναι νευροπροστατευτικό καθώς παρουσία H_2O_2 αναστρέφει την εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης που προκαλείται παρουσία H_2O_2, καθώς μειώνει το λόγο έντασης πράσινου/κόκκινο του φθορισμού της χρωστικής JC-1 κατά 10% σε σύγκριση με τη συνθήκη control.



<u>Διάγραμμα 12:</u> Μελέτη της επίδρασης των κλασμάτων Α και C σε συγκεντρώσεις 10μg/ml και Β σε συγκέντρωση 5μg/ml στη μεταβολή του μιτοχονδριακού δυναμικού παρουσία και απουσία H_2O_2 700μM για 6 ώρες στα κύτταρα SH-SY5Y. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων όπου ο λόγος έντασης φθορισμού πράσινου/κόκκινου στη συνθήκη control ορίστηκε ως 1. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με two-way ANOVA-Tukey Β και ο σχετικός λόγος έντασης φθορισμού δηλώνεται ως μέσος όρος ± S.D. (n = 4). *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001


Hoechst
JC-1 dimers
JC-1 monomers
Merge
Control
H_2O_2
$A_{10\mu g/ml}$
$A_{10\mu g/ml} + H_2O_2$
$B_{5\mu g/ml}$
$B_{5\mu g/ml} + H_2O_2$



Εικόνα 22: Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας, A και C σε συγκεντρώσεις 10μg/ml και B σε συγκέντρωση 5μg/ml, στη μεταβολή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης παρουσία και απουσία H_2O_2 700μM για 6 ώρες στα κύτταρα SH-SY5Y. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της χρώσης JC-1 και Hoechst σε κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία επωάστηκαν παρουσία και απουσία H_2O_2 700μM.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Μαστίχα Χίου είναι μια φυσική ρητίνη που λαμβάνεται από τον κορμό και τα κλαδιά του φυτού Pistacia lentiscus var. Chia και χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων της (Andrikopoulos et al. 2003, Loizou et al. 2009). Αναλύσεις της σύστασης της ρητίνης της μαστίχας Χίου δείχνουν πως αποτελείται κυρίως από τριτερπένια, τα οποία φαίνεται να είναι υπεύθυνα για τις περισσότερες βιολογικές της δράσεις (Kalousi et al. 2023).

Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν στεροειδείς ορμόνες που παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις, νευροπροστατευτικές και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες (Hamilton et al. 2017). Παρουσία οξειδωτικού στρες, μειώνεται η μεταγραφική δραστικότητα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής γονιδίων στόχων του (Makino et al. 1996). Σχετικά με τον υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPARα), αποτελεί έναν μεταγραφικό παράγοντα και έχει ποικίλες βιολογικές δράσεις καθώς επάγει τη β-οξείδωση και διεγείρει τη γλυκονεογένεση (Kersten et al. 1999). Μελέτες αποδεικνύουν πως αγωνιστές του PPARα χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών κατά τις οποίες επικρατούν υψηλά επίπεδα ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) (Wójtowicz et al. 2020). Όσο αναφορά τα οιστρογόνα, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την οιστραδιόλη, αποτελούν στεροειδείς ορμόνες οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο καθώς ρυθμίζουν μια πληθώρα συστημάτων (Hamilton et al. 2017). Έχει βρεθεί πως η σύνδεση της οιστραδιόλης στον υποδοχέα ERβ αυξάνει τα επίπεδα των μιτοχονδριακών mRNA των υπομονάδων I, II και III της κυτοχρωμικής οξειδάσης, με αποτέλεσμα την επαγωγή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Psarra et al. 2008). Ακόμη, να τονιστεί πως κατά το οξειδωτικό στρες, παρατηρείται υπερβολική παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και μια ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και της

αντιοξειδωτικής άμυνας του κυττάρου με αποτέλεσμα την επαγωγή αποπτωτικών μηχανισμών και απορρύθμιση της δράσης των μιτοχονδρίων.

Αρχικός στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελεί η ανάδειξη της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης του μη πολικού κλάσματος Α, του ημιπολικού κλάσματος Β και του πολικού κλάσματος C έναντι του οξειδωτικού στρες που προκλήθηκε με την προσθήκη H_2O_2 συγκέντρωσης 700μM για 6 ώρες στην καλλιέργεια των κυττάρων SH-SY5Y. Ακόμη, δεύτερος στόχος ήταν η διερεύνηση της πιθανής ενισχυτικής επίδρασης παρουσία οιστραδιολής (E2) 10^{-9}M στην αντίσταση του οξειδωτικού στρες των κυττάρων SH-SY5Y που επωάστηκαν με κλάσματα ρητίνης αλλά και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η σηματοδότηση μέσω των οποίων επιτελούνται αυτές οι δράσεις με έμφαση στη διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής υποδοχέων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον ενεργειακό μεταβολισμό, όπως του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), των υποδοχέων οιστρογόνων (ERα, ERβ) και του υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPARα).

Για την εκπλήρωση του πρώτου στόχου πραγματοποιήθηκαν διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση των κλασμάτων ρητίνης στην κυτταρική βιωσιμότητα των SH-SY5Y, τα οποία συνεπωάστηκαν παρουσία και απουσία H_2O_2 700μM για 6 ώρες. Τα αποτελέσματα του MTT έδειξαν ότι μόνο το μη πολικό κλάσμα Α σε συγκεντρώσεις 20μg/ml και 40μg/ml παρουσιάζει νευροπροστατευτική δράση λόγω των αφυδρογονασών, οι οποίες βοηθούν στην αντίσταση του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από τον παράγοντα οξειδωτικού στρες H_2O_2. Οι αντιαποπτωτικές ιδιότητες του μη πολικού κλάσματος Α μπορεί να αποδίδονται στη χημική σύσταση του καθώς παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση τριτερπενίων. Σύμφωνα με έρευνες φαίνεται πως τα τριτερπένια παρουσιάζουν αντιαποπτωτικές και αντιοξειδωτικές δράσεις (Kalousi et al. 2023).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των κλασμάτων ρητίνης στα πρωτεϊνικά επίπεδα υποδοχέων και συγκεκριμένα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) και του υποδοχέα πολλαπλασιαστή υπεροξεισωμάτων α (PPARα) σε κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία και απουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου συγκέντρωσης 700μM για 6 ώρες. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western έδειξαν ότι τα κλάσματα Α και Β απουσία H_2O_2 φαίνεται να προκαλούν αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα GR, η οποία αναιρείται παρουσία τόσο των κλασμάτων Α και Β όσο και του υπεροξειδίου σε σύγκριση με τη συνθήκη control. Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί πως τα κλάσματα Α και Β παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε τριτερπένια, τα οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχουν παρόμοια δράση με τα γλυκοκορτικοειδή (Kalousi et al. 2022). Ακόμη, έχει φανεί πως η επαγωγή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφής γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας όπως του COXIII στην εγκεφαλική περιοχή του ιππόκαμπου αρουραίου (Psarra et al. 2008). Βέβαια παρατηρούμε το πολικό κλάσμα C απουσία H_2O_2 μειώνει αρκετά τα επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών GR γεγονός που ίσως οφείλεται πως στο συγκεκριμένο κλάσμα απουσιάζουν τα τριτερπένια αλλά κυριαρχούν μόνο φαινολικές ενώσεις (Kalousi et al. 2023). Επιπλέον, καλό θα ήταν να τονιστεί πως τα κλάσματα Β και C παρουσία H_2O_2 προκαλούν ελάχιστη αντίσταση στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR που προκαλεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Όσο αναφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα, διακρίνεται πως η συνεπώαση των κυττάρων με τα

κλάσματα Α και Β προκαλεί αντίσταση στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα που προκαλείται εξαιτίας του οξειδωτικού παράγοντα H_2O_2. Έχει αναφερθεί πως η ενεργοποίηση του PPARα οδηγεί σε αύξηση του αμυντικού μηχανισμού του κυττάρου και παρουσιάζει ιδιαίτερες νευροπροστατευτικές δράσεις, καθώς φαίνεται να αποτελεί φαρμακευτικό στόχο για τη θεραπεία του Altzheimer (Corbett et al. 2015).

Επόμενος στόχος της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης των κλασμάτων στα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ σε κύτταρα SH-SY5Y που έχουν συνεπωαστεί απουσία και παρουσία H_2O_2 700μM για 6 ώρες και Ε2 10^{-9}M για 24 ώρες. Μελετώντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων ERα και ERβ διαπιστώθηκε πως η νευροπροστευτική δράση των κλασμάτων Α και C έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλεί το υπεροξείδιο ενισχύεται παρουσία της ορμόνης Ε2. Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε νευρικά κύτταρα, η προσθήκη Ε2 οδήγησε σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του αντι-αποπτωτικού Bcl-2 και σε μείωση της έκφρασης του προ-αποπτωτικού Bim αναστέλλοντας την απόπτωση των κυττάρων (Yao et al. 2007). Ακόμη σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα SH-SY5Y τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία υπεροξειδίου διαπιστώθηκε πως η προσθήκη Ε2 αύξησε τη βιωσιμότητα των κυττάρων έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλεί το υπεροξείδιο συμβάλλοντας στη διατήρηση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, γεγονότα που υποδεικνύουν την αντιαποπτωτική της δράση (Wang et al. 2006).

Έπειτα, διερευνήθηκε η επίδραση των κλασμάτων ρητίνης στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) σε κύτταρα SH-SY5Y που επωάστηκαν τόσο παρουσία όσο και απουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου συγκέντρωσης 700μM για 6 ώρες. Διαπιστώθηκε πως μόνο τα κλάσματα Α συγκέντρωσης 10μg/ml και C 20μg/ml παρουσία του H_2O_2, είναι ικανά να αποτρέψουν την προκαλούμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα GR, από τον παράγοντα οξειδωτικού στρες H_2O_2. Ειδικότερα, μελέτη σε νευρικά κύτταρα απέδειξε ότι η προσθήκη κορτικοστερόνης (CORT) μείωσε τις οξειδωτικές βλάβες που προκαλούνται από το H_2O_2 μέσω της ρύθμισης των αντιοξειδωτικών ενζύμων (GSH, MnSOD, HO-1) (Lee et al. 2022). Άρα πιθανόν η δράση των κλασμάτων Α συγκέντρωσης 10μg/ml και C 20μg/ml να επάγει την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, κάτι το οποίο θα μπορούσε μελλοντικά να ερευνηθεί μετρώντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα αλλά και τη δραστικότητα των συγκεκριμένων ενζύμων.

Τελευταίος στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης των κλασμάτων ρητίνης στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω της δοκιμασίας JC-1. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως όλα τα κλάσματα Α,Β και C παρουσία του H_2O_2 προκάλεσαν αντίσταση στην απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 καθώς μείωσαν το λόγο έντασης πράσινου/κόκκινο του φθορισμού της χρωστικής JC-1 και συνεπώς ανέστειλαν την εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης σε αντίθεση με τη συνθήκη του H_2O_2. Μάλιστα τα αποτελέσματα συνάδουν και με τη βιβλιογραφία καθώς η προσθήκη κορτικοστερόνης σε νευρώνες φλοιού έδειξε πως αυξάνει το δυναμικό της μεμβράνης των μιτοχονδρίων αποδεικνύοντας έτσι τη νευροπροστατευτική δράση των γλυκοκορτικοειδών (Du et al. 2009).

Ανακεφαλαιώνοντας λοιπόν, διαπιστώνουμε πως το μη πολικό κλάσμα Α παρουσιάζει νευροπροστατευτική και αντιαποπτωτική δράση καθώς προκαλεί αντίσταση στη

μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας που προκαλείται εξαιτίας του H_2O_2. Ακόμη, το μη πολικό κλάσμα Α και το ημιπολικό κλάσμα Β απουσία H_2O_2 οδήγησαν σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, ο οποίος ρυθμίζει τα μεταγραφικά επίπεδα ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας με αποτέλεσμα την πιθανή του επίδραση στην αύξηση της παραγωγής του ATP. Επιπλέον, το μη πολικό κλάσμα Α και ημιπολικό κλάσμα Β προκαλούν αντίσταση στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα, με αποτέλεσμα την πιθανή επαγωγή της β-οξείδωσης αυξάνοντας έτσι τα υποστρώματα των ενζύμων που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs με πιθανή επαγωγή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Το μη πολικό κλάσμα Α και το πολικό κλάσμα C παρουσία H_2O_2 700μM για 6 ώρες αλλά και E2 10^{-9}M για 24 ώρες φαίνεται να μετριάζουν τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ και του ERα ρυθμίζοντας έτσι την επαγωγή της μιτοχονδριακής λειτουργίας αναστέλλοντας πιθανές αποπτωτικές δράσεις. Επιπρόσθετα, τα κλάσματα Α, Β και C παρουσία του H_2O_2 700μM για 6 ώρες, είναι ικανά να αποτρέψουν την προκαλούμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα GR και πιθανώς να επάγουν τη μεταγραφή αντιοξειδωτικών ενζύμων με αποτέλεσμα τη μείωση των ενεργών μορφών οξυγόνου στο κύτταρο. Επιπλέον όλα τα κλάσματα φαίνεται να αποτρέπουν την εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, συγκριτικά με τη συνθήκη του H_2O_2 ασκώντας έτσι αντιαποπτωτικές ιδιότητες. Τέλος συγκρίνοντας τα κλάσματα παρατηρούμε πως το κλάσμα Α συγκέντρωσης 20μg/ml είναι το πιο νευροπροστατευτικό.

Γενικά, διαπιστώνεται πως τα κλάσματα ρητίνης, τόσο παρουσία όσο και απουσία H_2O_2 αλλά και της ορμόνης Ε2, έχουν νευροπροστατευτική δράση αλλά απαιτούνται περισσότερες βιολογικές και πειραματικές επαναλήψεις για την επιβεβαίωση των συγκεκριμένων ιδιοτήτων. Ακόμη, προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση των διαφορετικής πολικότητας κλασμάτων στον ενεργειακό μεταβολισμό των νευρικών κυττάρων παρουσία και απουσία H_20_2 και Ε2, θα μπορούσαν να μετρηθούν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ATP και τα πρωτεϊνικά επίπεδα ενζύμων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση καθιστώντας έτσι εφικτή την κατανόηση και συσχέτιση της σηματοδότησης που εμπλέκονται οι υποδοχείς GR, ERα, ERβ και PPARa με τη δράση τους στο μιτοχόνδριο. Τέλος, θα μπορούσαν να μετρηθούν οι μεταβολές των επιπέδων πρωτεϊνικών επιπέδων μορίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι της απόπτωσης προκειμένου να συσχετιστούν οι αντιαποπτωτικές ιδιότητες της ρητίνης της Μαστίχας Χίου με τη δράση των υπό μελέτη υποδοχέων που διερευνήθηκαν στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A. C. Kaliora, A. Mylona, A. Chiou, D. G. Petsios & N. K. Andrikopoulos (2004) Detection and Identification of Simple Phenolics in Pistacia lentiscus Resin, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 27:2, 289-300, DOI: 10.1081/JLC-120027100
- Alam F, Islam MA, Khalil MI, Gan SH. Metabolic Control of Type 2 Diabetes by Targeting the GLUT4 Glucose Transporter: Intervention Approaches. Curr Pharm Des. 2016;22(20):3034-49. doi: 10.2174/1381612822666160307145801. PMID: 26951104.
- Andreadou I, Mitakou S, Paraschos S, Efentakis P, Magiatis P, Kaklamanis L, Halabalaki M, Skaltsounis L, Iliodromitis EK. "Pistacia lentiscus L." reduces the infarct size in normal fed anesthetized rabbits and possess antiatheromatic and hypolipidemic activity in cholesterol fed rabbits. Phytomedicine. 2016 Oct 15;23(11):1220-6. doi: 10.1016/j.phymed.2016.06.002. Epub 2016 Jun 4. PMID: 27316396.
- Andrikopoulos NK, Kaliora AC, Assimopoulou AN, Papapeorgiou VP. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. Phytother Res. 2003 May;17(5):501-7. doi: 10.1002/ptr.1185. PMID: 12748987.
- Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of Pistacia species. Part I. Pistacia lentiscus var. Chia. Biomed Chromatogr. 2005 May;19(4):285-311. doi: 10.1002/bmc.454. PMID: 15651084.
- Balan KV, Prince J, Han Z, Dimas K, Cladaras M, Wyche JH, Sitaras NM, Pantazis P. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from Pistacia lentiscus L. var. chia. Phytomedicine. 2007 Apr;14(4):263-72. doi: 10.1016/j.phymed.2006.03.009. Epub 2006 May 18. PMID: 16713222.
- Bhaumik S, Lockett J, Cuffe J, Clifton VL. Glucocorticoids and Their Receptor Isoforms: Roles in Female Reproduction, Pregnancy, and Foetal Development. Biology. 2023; 12(8):1104.
- Biason-Lauber A, Lang-Muritano M. Estrogens: Two nuclear receptors, multiple possibilities. Mol Cell Endocrinol. 2022 Aug 20;554:111710. doi: 10.1016/j.mce.2022.111710. Epub 2022 Jul 2. PMID: 35787463.
- Bougarne N, Paumelle R, Caron S, Hennuyer N, Mansouri R, Gervois P, Staels B, Haegeman G, De Bosscher K. PPARalpha blocks glucocorticoid receptor alpha-mediated transactivation but cooperates with the activated glucocorticoid receptor alpha for transrepression on NF-kappaB. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 May 5;106(18):7397-402. doi: 10.1073/pnas.0806742106. Epub 2009 Apr 17. PMID: 19376972; PMCID: PMC2678648.
- Chinetti, G., Fruchart, JC. & Staels, B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. Inflamm. res. 49, 497–505 (2000).
- Christofides A, Konstantinidou E, Jani C, Boussiotis VA. The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. Metabolism. 2021 Jan;114:154338. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154338. Epub 2020 Aug 11. PMID: 32791172; PMCID: PMC7736084.
- Cole TJ, Short KL, Hooper SB. The science of steroids. Semin Fetal Neonatal Med. 2019 Jun;24(3):170-175. doi: 10.1016/j.siny.2019.05.005. Epub 2019 May 23. PMID: 31147162.
- Corbett GT, Gonzalez FJ, Pahan K. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor α stimulates ADAM10-mediated proteolysis of APP. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jul 7;112(27):8445-50. doi: 10.1073/pnas.1504890112. Epub 2015 Jun 15. PMID: 26080426; PMCID: PMC4500265.
- Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. Trends Mol Med. 2013 Mar;19(3):197-209. doi: 10.1016/j.molmed.2012.12.007. Epub 2013 Jan 22. PMID: 23348042; PMCID: PMC3595330.
- Dedoussis GV, Kaliora AC, Psarras S, Chiou A, Mylona A, Papadopoulos NG, Andrikopoulos NK. Antiatherogenic effect of Pistacia lentiscus via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. Atherosclerosis. 2004 Jun;174(2):293-303. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.02.011. PMID: 15136059.
- Du J, Wang Y, Hunter R, Wei Y, Blumenthal R, Falke C, Khairova R, Zhou R, Yuan P, Machado-Vieira R, McEwen BS, Manji HK. Dynamic regulation of mitochondrial function by

glucocorticoids. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Mar 3;106(9):3543-8. doi: 10.1073/pnas.0812671106. Epub 2009 Feb 6. PMID: 19202080; PMCID: PMC2637276.

- Frank F, Ortlund EA, Liu X. Structural insights into glucocorticoid receptor function. Biochem Soc Trans. 2021 Nov 1;49(5):2333-2343. doi: 10.1042/BST20210419. PMID: 34709368; PMCID: PMC9274455.
- Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. Adv Protein Chem Struct Biol. 2019;116:135-170. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.01.001. Epub 2019 Feb 4. PMID: 31036290; PMCID: PMC6533072.
- Ganos, C.G., Gortzi, O., Chinou, E.B., Calapai, G., Chinou, I.B. (2022). Antimicrobial Properties of Selected Native Greek Aromatic Plants: An Ethnopharmacological Overview. In: Rai, M., Kosalec, I. (eds) Promising Antimicrobials from Natural Products. Springer, Cham.
- Georgantopoulos A, Vougioukas A, Kalousi FD, Tsialtas I, Psarra AG. Comparative Studies on the Anti-Inflammatory and Apoptotic Activities of Four Greek Essential Oils: Involvement in the Regulation of NF-κB and Steroid Receptor Signaling. Life (Basel). 2023 Jul 10;13(7):1534. doi: 10.3390/life13071534. PMID: 37511910; PMCID: PMC10381560.
- Göttlicher M, Heck S, Herrlich P. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. J Mol Med (Berl). 1998 Jun;76(7):480-9. doi: 10.1007/s001090050242. PMID: 9660166.

- Guo C, Sun L, Chen X, Zhang D. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. Neural Regen Res. 2013 Jul 25;8(21):2003-14. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.009. PMID: 25206509; PMCID: PMC4145906.

- Hamilton KJ, Hewitt SC, Arao Y, Korach KS. Estrogen Hormone Biology. Curr Top Dev Biol. 2017;125:109-146. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.12.005. Epub 2017 Feb 3. PMID: 28527569; PMCID: PMC6206851.
- Hihi AK, Michalik L, Wahli W. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. Cell Mol Life Sci. 2002 May;59(5):790-8. doi: 10.1007/s00018-002-8467-x. PMID: 12088279.
- Hudson WH, Youn C, Ortlund EA. The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. Nat Struct Mol Biol. 2013 Jan;20(1):53-8. doi: 10.1038/nsmb.2456. Epub 2012 Dec 9. PMID: 23222642; PMCID: PMC3539207.

- Ibarra-Lara L, Hong E, Soria-Castro E, Torres-Narváez JC, Pérez-Severiano F, Del Valle-Mondragón L, Cervantes-Pérez LG, Ramírez-Ortega M, Pastelín-Hernández GS, Sánchez-Mendoza A. Clofibrate PPARα activation reduces oxidative stress and improves ultrastructure and ventricular hemodynamics in no-flow myocardial ischemia. J Cardiovasc Pharmacol. 2012 Oct;60(4):323-34. doi: 10.1097/FJC.0b013e31826216ed. PMID: 22691880.
- Ierapetritis, Dimitris. (2010). The Geography of the Chios Mastic Trade from the 17th through to the 19th Century. Ethnobotany Research and Applications. 8. 153-167. 10.17348/era.8.0.153-167

- Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. Trends Pharmacol Sci. 2013 Sep;34(9):518-30. doi: 10.1016/j.tips.2013.07.003. Epub 2013 Aug 14. PMID: 23953592; PMCID: PMC3951203.
- Kaliora AC, Stathopoulou MG, Triantafillidis JK, Dedoussis GV, Andrikopoulos NK. Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn's disease treated with mastic. World J Gastroenterol. 2007 Dec 7;13(45):6031-6. doi: 10.3748/wjg.v13.45.6031. PMID: 18023095; PMCID: PMC4250886.
- Kaliora AC, Stathopoulou MG, Triantafillidis JK, Dedoussis GV, Andrikopoulos NK. Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. World J Gastroenterol. 2007 Feb 7;13(5):748-53. doi: 10.3748/wjg.v13.i5.748. PMID: 17278198; PMCID: PMC4066008.
- Kalousi FD, Pollastro F, Christodoulou EC, Karra AG, Tsialtas I, Georgantopoulos A, Salamone S, Psarra AG. Apoptotic, Anti-Inflammatory Activities and Interference with the Glucocorticoid Receptor Signaling of Fractions from Pistacia lentiscus L. var. chia Leaves. Plants (Basel). 2022 Mar 30;11(7):934. doi: 10.3390/plants11070934. PMID: 35406916; PMCID: PMC9002849.

- Kalousi FD, Pollastro F, Karra AG, Tsialtas I, Georgantopoulos A, Salamone S, Psarra A-MG. Regulation of Energy Metabolism and Anti-Inflammatory Activities of Mastiha Fractions from Pistacia lentiscus L. var. chia. Foods. 2023; 12(7):1390.

- Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. J Clin Invest. 1999 Jun;103(11):1489-98. doi: 10.1172/JCI6223. PMID: 10359558; PMCID: PMC408372.
- Klinge CM. Estrogenic control of mitochondrial function. Redox Biol. 2020 Apr;31:101435. doi: 10.1016/j.redox.2020.101435. Epub 2020 Jan 23. PMID: 32001259; PMCID: PMC7212490.
- Kokkinopoulou I, Moutsatsou P. Mitochondrial Glucocorticoid Receptors and Their Actions. Int J Mol Sci. 2021 Jun 3;22(11):6054. doi: 10.3390/ijms22116054. PMID: 34205227; PMCID: PMC8200016.
- Le Dily F, Beato M. Signaling by Steroid Hormones in the 3D Nuclear Space. Int J Mol Sci. 2018 Jan 23;19(2):306. doi: 10.3390/ijms19020306. PMID: 29360755; PMCID: PMC5855546.
- Lee C, Jang JH, Park GH. Protective Role of Corticosterone against Hydrogen Peroxide-Induced Neuronal Cell Death in SH-SY5Y Cells. Biomol Ther (Seoul). 2022 Nov 1;30(6):570-575. doi: 10.4062/biomolther.2022.126. Epub 2022 Oct 20. PMID: 36261216; PMCID: PMC9622306.
- Liu B, Zhang T-N, Knight JK, Goodwin JE. The Glucocorticoid Receptor in Cardiovascular Health and Disease. Cells. 2019; 8(10):1227.
- Loizou S, Paraschos S, Mitakou S, Chrousos GP, Lekakis I, Moutsatsou P. Chios mastic gum extract and isolated phytosterol tirucallol exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. Exp Biol Med (Maywood). 2009 May;234(5):553-61. doi: 10.3181/0811-RM-338. Epub 2009 Feb 20. PMID: 19234052.
- Makino Y, Okamoto K, Yoshikawa N, Aoshima M, Hirota K, Yodoi J, Umesono K, Makino I, Tanaka H. Thioredoxin: a redox-regulating cellular cofactor for glucocorticoid hormone action. Cross talk between endocrine control of stress response and cellular antioxidant defense system. J Clin Invest. 1996 Dec 1;98(11):2469-77. doi: 10.1172/JCI119065. PMID: 8958209; PMCID: PMC507704.
- Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. Curr Genomics. 2006;7(8):497-508. doi: 10.2174/138920206779315737. PMID: 18369406; PMCID: PMC2269003.
- Marner, F.J., Freyer, A., Lex, J., 1991. Triterpenoids from gum Mastic, the resin of Pistacia lentiscus. Phytochemistry 30, 3709–3712. https://doi.org/10.1016/0031-9422(91) 80095-I.
- Meijsing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L, Yamamoto KR. DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. Science. 2009 Apr 17;324(5925):407-10. doi: 10.1126/science.1164265. PMID: 19372434; PMCID: PMC2777810.
- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. Pharmacol Rev. 2006 Dec;58(4):726-41. doi: 10.1124/pr.58.4.5. PMID: 17132851.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. PMID: 6606682.
- O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. Mol Endocrinol. 2004 Aug;18(8):1859-75. doi: 10.1210/me.2003-0044. Epub 2004 Mar 18. PMID: 15031323.
- Pachi VK, Mikropoulou EV, Gkiouvetidis P, Siafakas K, Argyropoulou A, Angelis A, Mitakou S, Halabalaki M. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Chios mastic gum (Pistacia lentiscus var. Chia, Anacardiaceae): A review. J Ethnopharmacol. 2020 May 23;254:112485. doi: 10.1016/j.jep.2019.112485. Epub 2020 Feb 22. Erratum in: J Ethnopharmacol. 2021 Jun 12;273:113961. PMID: 32092498.
- Panettieri RA, Schaafsma D, Amrani Y, Koziol-White C, Ostrom R, Tliba O. Non-genomic Effects of Glucocorticoids: An Updated View. Trends Pharmacol Sci. 2019 Jan;40(1):38-49. doi: 10.1016/j.tips.2018.11.002. Epub 2018 Nov 26. PMID: 30497693; PMCID: PMC7106476.
- Paraschos S, Magiatis P, Mitakou S, Petraki K, Kalliaropoulos A, Maragkoudakis P, Mentis A, Sgouras D, Skaltsounis AL. In vitro and in vivo activities of Chios mastic gum extracts and

constituents against Helicobacter pylori. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Feb;51(2):551-9. doi: 10.1128/AAC.00642-06. Epub 2006 Nov 20. PMID: 17116667; PMCID: PMC1797732.

- Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. Metabolism. 2011 Nov;60(11):1500-10. doi: 10.1016/j.metabol.2011.06.012. Epub 2011 Aug 23. PMID: 21864867.

- Psarra AM, Sekeris CE. Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. Biochim Biophys Acta. 2011 Oct;1813(10):1814-21. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.05.014. Epub 2011 Jun 2. PMID: 21664385.

- Psarra AM, Sekeris CE. Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. Biochim Biophys Acta. 2008 Jan;1783(1):1-11. doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.10.021. Epub 2007 Nov 13. PMID: 18062929.
- Psarra AM, Sekeris CE. Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. IUBMB Life. 2008 Apr;60(4):210-23. doi: 10.1002/iub.37. PMID: 18344181.

- Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE. The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. Mol Cell Endocrinol. 2006 Feb 26;246(1-2):21-33. doi: 10.1016/j.mce.2005.11.025. Epub 2006 Jan 4. PMID: 16388892.
- Rambani V, Hromnikova D, Gasperikova D, Skopkova M. Mitochondria and mitochondrial disorders: an overview update. Endocr Regul. 2022 Jul 13;56(3):232-248. doi: 10.2478/enr-2022-0025. PMID: 35843711.
- Ramos-Ramírez P, Tliba O. Glucocorticoid Receptor β (GRβ): Beyond Its Dominant-Negative Function. Int J Mol Sci. 2021 Mar 31;22(7):3649. doi: 10.3390/ijms22073649. PMID: 33807481; PMCID: PMC8036319.
- Rezzani R, Franco C, Hardeland R, Rodella LF. Thymus-Pineal Gland Axis: Revisiting Its Role in Human Life and Ageing. Int J Mol Sci. 2020 Nov 20;21(22):8806. doi: 10.3390/ijms21228806. PMID: 33233845; PMCID: PMC7699871.

- Rigano D, Sirignano C, Taglialatela-Scafati O. The potential of natural products for targeting PPARα. Acta Pharm Sin B. 2017 Jul;7(4):427-438. doi: 10.1016/j.apsb.2017.05.005. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28752027; PMCID: PMC5518659.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin C, Baell J, Chung TDY, Coussens NP, Dahlin JL, Devanarayan V, Foley TL, Glicksman M, Gorshkov K, Haas JV, Hall MD, Hoare S, Inglese J, Iversen PW, Kales SC, Lal-Nag M, Li Z, McGee J, McManus O, Riss T, Saradjian P, Sittampalam GS, Tarselli M, Trask OJ Jr, Wang Y, Weidner JR, Wildey MJ, Wilson K, Xia M, Xu X, editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004–. PMID: 23805433.
- Şahin M, Öncü G, Yılmaz MA, Özkan D, Saybaşılı H. Transformation of SH-SY5Y cell line into neuron-like cells: Investigation of electrophysiological and biomechanical changes. Neurosci Lett. 2021 Feb 6;745:135628. doi: 10.1016/j.neulet.2021.135628. Epub 2021 Jan 10. PMID: 33440235.
- Sakamuru S, Li X, Attene-Ramos MS, Huang R, Lu J, Shou L, Shen M, Tice RR, Austin CP, Xia M. Application of a homogenous membrane potential assay to assess mitochondrial function. Physiol Genomics. 2012 May 1;44(9):495-503. doi: 10.1152/physiolgenomics.00161.2011. Epub 2012 Mar 20. PMID: 22433785; PMCID: PMC3426425

- Sekeris CE. The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones. In Vivo. 1990 Sep-Oct;4(5):317-20. PMID: 2133104.

- Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. Bio Protoc. 2019 Jan 5;9(1):e3128. doi: 10.21769/BioProtoc.3128. PMID: 30687773; PMCID: PMC6343665.
- Słowikowski BK, Lianeri M, Jagodziński PP. Exploring estrogenic activity in lung cancer. Mol Biol Rep. 2017 Feb;44(1):35-50. doi: 10.1007/s11033-016-4086-8. Epub 2016 Oct 25. PMID: 27783191; PMCID: PMC5310573.

- Stefi AL, Papaioannou V, Nikou T, Halabalaki M, Vassilacopoulou D, Christodoulakis NS. Heat and Cold-Stressed Individuals of Pistacia lentiscus (Mastic Tree) Do Modify Their Secreting Profile. Plants (Basel). 2022 Nov 29;11(23):3290. doi: 10.3390/plants11233290. PMID: 36501332; PMCID: PMC9736404.
- Timmermans S, Souffriau J, Libert C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. Front Immunol. 2019 Jul 4;10:1545. doi: 10.3389/fimmu.2019.01545. PMID: 31333672; PMCID: PMC6621919.
- Vallianou I, Peroulis N, Pantazis P, Hadzopoulou-Cladaras M. Camphene, a plant-derived monoterpene, reduces plasma cholesterol and triglycerides in hyperlipidemic rats independently of HMG-CoA reductase activity. PLoS One. 2011;6(11):e20516. doi: 10.1371/journal.pone.0020516. Epub 2011 Nov 3. PMID: 22073134; PMCID: PMC3207810.
- Wang X, Dykens JA, Perez E, Liu R, Yang S, Covey DF, Simpkins JW. Neuroprotective effects of 17beta-estradiol and nonfeminizing estrogens against H2O2 toxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells. Mol Pharmacol. 2006 Jul;70(1):395-404. doi: 10.1124/mol.106.022384. Epub 2006 Apr 13. PMID: 16614138.
- Weinstein SP, Wilson CM, Pritsker A, Cushman SW. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. Metabolism. 1998 Jan;47(1):3-6. doi: 10.1016/s0026-0495(98)90184-6. PMID: 9440469.
- Wójtowicz S, Strosznajder AK, Jeżyna M, Strosznajder JB. The Novel Role of PPAR Alpha in the Brain: Promising Target in Therapy of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. Neurochem Res. 2020 May;45(5):972-988. doi: 10.1007/s11064-020-02993-5. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32170673; PMCID: PMC7162839.
- Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. Mol Neurodegener. 2017 Jan 24;12(1):10. doi: 10.1186/s13024-017-0149-0. PMID: 28118852; PMCID: PMC5259880.
- Yao M, Nguyen TV, Pike CJ. Estrogen regulates Bcl-w and Bim expression: role in protection against beta-amyloid peptide-induced neuronal death. J Neurosci. 2007 Feb 7;27(6):1422-33. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2382-06.2007. PMID: 17287517; PMCID: PMC6673600.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη καθηγήτρια της παρούσας πτυχιακής εργασίας δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία, αναπληρώτρια καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στην ερευνητική της ομάδα. Την ευχαριστώ από καρδιάς για τη συνεχή υποστήριξη και καθοδήγηση της σε όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας καθώς και για τις συμβουλές και τις πολύτιμες γνώσεις που μου πρόσφερε. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της συμβουλευτική επιτροπής, τον δρ. Λεωνίδα Δημήτριο και την δρ. Σκαμνάκη Βασιλική για τη συνεργασία μας και για τις σημαντικές γνώσεις που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια των προπτυχιακών μου σπουδών.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο, για την άψογη συνεργασία, την υπομονή, την καθημερινή στήριξη και βοήθεια που μου προσέφερε καθόλη τη διάρκεια της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Η συνεχής καθοδήγηση και οι συμβουλές του αποτελούν σημαντικό και αναπόσπαστο κομμάτι των αρχικών μου βημάτων στο χώρο του εργαστηρίου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας της κ.Ψαρρά καθώς και του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη βοήθεια τους και το όμορφο περιβάλλον που επικράτησε όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου για την υπομονή τους και για την αδιάκοπη υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας.

Κλείνοντας, δεν θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες την οικογένεια μου, τους γονείς μου και τα αδέρφια μου, που πάντα είναι δίπλα μου, προσφέροντας συνεχή στήριξη καθώς και πολύτιμη βοήθεια στην εκπλήρωση των στόχων μου.