



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ



ΚΑΛΟΥΣΗ ΦΩΤΕΙΝΗ
ΛΑΡΙΣΑ, 2018

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΕΝ
ΔΥΝΑΜΕΙ ΡΥΘΜΙΣΤΩΝ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ
ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ**

**INVESTIGATION OF THE MECHANISMS OF
ACTION OF PUTATIVE GLUCOCORTICOID
RECEPTOR MODULATORS**

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΡΥΘΜΙΣΤΩΝ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

ΚΑΛΟΥΣΗ ΦΩΤΕΙΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΔΡ. ΆΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ ΨΑΡΡΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας
Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών
Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη σύγχρονη εποχή, όλο και περισσότερα αποτελέσματα ερευνών αποκαλύπτουν συνεχώς τις ευεργετικές δράσεις της Μαστίχας Χίου, τόσο από *in vitro* και *in vivo* μελέτες όσο και από κλινικές δοκιμές. Τα ευεργετικά οφέλη της Μαστίχας Χίου αποδίδονται στη μεγάλη ποικιλία των συστατικών που περιέχονται στο εκχύλισμά της, το οποίο στο μεγαλύτερο μέρος του αποτελείται από τριτερπένια. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια τα τριτερπένια έχουν μελετηθεί αρκετά ως εν δυνάμει τροποποιητές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, λόγω των πολλών δομικών ομοιοτήτων που εμφανίζουν με τα γλυκοκορτικοειδή. Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν στεροειδείς ορμόνες, οι οποίες συνδέονται με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα στην ανενεργή του μορφή, τον ενεργοποιούν και επάγουν την πυρηνική του μετατόπιση, όπου έπειτα συνδέεται σε ειδικές περιοχές του DNA και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων στόχων του. Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η διερεύνηση των αντιφλεγμονωδών, υπογλυκαιμικών και αποπρωτικών δράσεων του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου καθώς και ο χαρακτηρισμός των μηχανισμών επίτευξης αυτών, κυρίως μέσω της εμπλοκής τους στη ρύθμιση της σηματοδότησης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Αρχικά, μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου, σε κύτταρα HeLa από όπου φάνηκε ότι το εκχύλισμα σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 20μg/ml προκαλεί λιγότερο από 10% κυτταροτοξικότητα, ενώ σε συγκεντρώσεις από 50μg/ml έως 200μg/ml προκαλεί από 40-90% κυτταροτοξικότητα. Στη συνέχεια, αποδείξαμε ότι το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου εμφανίζει αντιφλεγμονώδη δράση, σε κύτταρα Hek293, μέσω καταστολής της μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κβ. Η δράση αυτή πιθανόν να επιτελείται μέσω ρύθμισης της σηματοδότησης του GR από στεροειδικής φύσεως συστατικά του εκχυλίσματος μαστίχας. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα σε μικρές συγκεντρώσεις δεν προκαλεί επαγωγή, αντίθετα προκαλεί μικρή μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του GR, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τις μη παρατηρούμενες μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK, ενός γλυκονογενετικού ενζύμου και γονιδίου στόχου του GR, μιας και στον υποκινητή του εντοπίζονται στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι το εκχύλισμα προκαλεί μικρή αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, ενώ παρουσία δεξαμεθαζόνης η αύξηση αυτή αναστέλλεται και τα επίπεδα του GR μειώνονται. Τέλος, η μελέτη της αποπρωτικής δράσης του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου, έδειξε ότι το εκχύλισμα επάγει την απόπτωση σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 20μg/ml μέσω μείωσης της προαποπρωτικής προκασπάσης 3, και αύξηση της εκτελεστικής κασπάσης 3 σε συγκεντρώσεις από 100μg/ml και πάνω. Επομένως, το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου θα μπορούσε μελλοντικά να αξιοποιηθεί ως ένα εν δυνάμει υποκατάστατο στεροειδών ορμονών για την καταπολέμηση φλεγμονωδών νοσημάτων και καρκίνου, με τις λιγότερες πιθανές παρενέργειες λόγω των εκλεκτικών δράσεών του στη ρύθμιση της δράσης του GR.

Λέξεις-κλειδιά

Μαστίχα Χίου, βιολογικές δράσεις, γλυκοκορτικοειδή, υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών

ABSTRACT

Today, more and more research results constantly reveal the beneficial effects of Chios Mastiha, both from in vitro and in vivo studies as well as clinical trials. The benefits of Chios Mastiha are attributed to the wide variety of ingredients contained in its extract, which for the most part consists of triterpenes. However, in recent years, triterpenes have been studied extensively as putative glucocorticoid receptor regulators due to many structural similarities they share with glucocorticoids. Glucocorticoids are steroid hormones that bind to the glucocorticoid receptor (GR) found in the cytoplasm in its inactive form, activate it and induce its nuclear translocation, where regulates the expression of the target genes, binding in DNA specific sequences. The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory, hypoglycemic and apoptotic actions of Chios Mastiha extract and whether or not it exerts its effects by regulating glucocorticoid receptor signaling. Initially, cytotoxicity of Chios Mastiha extract was studied, showing that the extract at concentrations less than 20µg/ml induces less than 10% cytotoxicity, while concentrations more than 50µg/ml causes 40-90% cytotoxicity. Then, we demonstrated that Chios Mastiha extract exhibits anti-inflammatory activity by reducing NF-κβ transcriptional activity and possibly exerts this activity by regulating GR signaling. After that, it was observed that the extract at low concentrations causes little decrease in GR transcriptional activity, which was also confirmed by the absence of increase in protein levels of PEPCK, a gluconeogenesis enzyme and a direct target gene of GR signaling. It was also found that the extract causes little increase in GR protein levels, but this increase is inhibited in the presence of dexamethasone, reducing GR levels. Finally, studying the apoptotic effect of Chios Mastiha extract, it was shown that it induces apoptosis by reducing pro-caspase 3 and increasing effector caspase 3 protein levels at high concentrations, with procaspase 3 decreasing, however, being less to no more at lower concentrations. To sum up, Chios Mastiha extract could be used as a possible drug and a putative regulator of the glucocorticoid receptor to treat inflammatory diseases and cancer with the least possible side effects.

Keywords:

Chios Mastiha, biological activities, glucocorticoids, glucocorticoid receptors

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ.....	9
1.1.1. ΦΥΣΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ.....	9
1.1.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΣΗ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ.....	9
1.1.3. ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ	10
1.2. Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ (GR).....	11
1.2.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	11
1.2.2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ	11
1.2.3. ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ.....	12
1.2.4. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ	13
1.3. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ GR ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ	15
1.3.1. ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR.....	15
1.3.2. ΠΡΟ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR	16
1.3.3. ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR.....	17
1.4. Η ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ ΚΑΙ ΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	18
1.4.1. ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΔΡΑΣΕΙΣ	19
1.4.2. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	20
1.4.4. ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	20
1.4.5. ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ	21
1.5. ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΚΑΙ ΜΕΣΟΛΑΒΗΣΗ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΟΥ GR.....	21
1.6. ΣΚΟΠΟΣ	22
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
2.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	22
2.2. ΥΛΙΚΑ	23

2.2.1. ΧΗΜΙΚΑ.....	23
2.2.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ.....	24
2.2.3. ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ.....	24
2.2.4. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	25
2.2.5. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	27
2.2.6. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ.....	27
2.2.7. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	27
2.2.8. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	27
2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.3.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	27
2.3.2. ΔΟΚΙΜΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΟΥΛΦΟΡΟΔΑΜΙΝΗΣ.....	28
2.3.3. ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	28
2.3.4. ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD.....	28
2.3.5. SDS-PAGE.....	28
2.3.6. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΗΣ WESTERN.....	29
2.3.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ.....	29
2.3.8. ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΛΟΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	30
2.3.9. ΔΟΚΙΜΗ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ.....	30
2.3.10. ΔΟΚΙΜΗ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ.....	30
2.3.11. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	31
3.1. ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ.....	31
3.2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ.....	32
3.2.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ NF-κβ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK2932	
3.2.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ NF-κβ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ COS7	33

3.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ GR	34
3.3.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ GR.....	34
3.3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ GR.....	35
3.3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ ΡΕΡΣΚ.....	37
3.4. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ.....	38
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	39
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	44

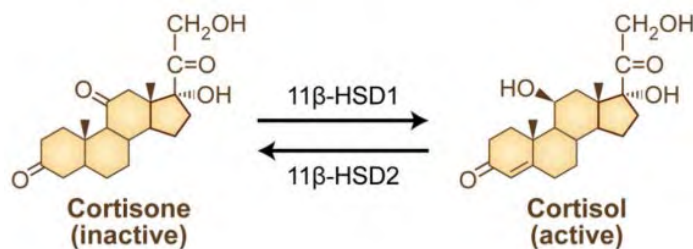
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ

1.1.1. ΦΥΣΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ

Τα γλυκοκορτικοειδή, είναι από τα πλέον διαδεδομένα φάρμακα στον κόσμο σήμερα, λόγω των ισχυρών αντιφλεγμονωδών και ανοσοκατασταλτικών τους δράσεων τις οποίες ασκούν μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή, όπως η κορτιζόλη στον άνθρωπο και η κορτικοστερόνη στα τρωκτικά, είναι ορμόνες ζωτικής σημασίας που προέρχονται από τη χοληστερόλη. Είναι λιπόφιλα μόρια, οπότε μπορούν να διαπεράσουν τις λιπιδιακές μεμβράνες με απλή διάχυση. Η διαθεσιμότητά τους στους ιστούς ρυθμίζεται μέσω συνδεδόμενων με κορτικοστεροειδή σφαιρινών (corticosteroid binding globulin) του ορού και από την τοπικά εκφραζόμενη 11β-αφυδρογονάση των υδροξυστεροειδών (11β-hydroxysteroid dehydrogenase). Πιο συγκεκριμένα, η κορτιζόλη, στην πλειονότητά της, παραμένει συνδεδεμένη με τις συνδεδόμενες σε κορτικοστεροειδή σφαιρίνες του ορού. Η βιολογικά ενεργή μορφή της κορτιζόλης είναι η ελεύθερη κορτιζόλη, η οποία μπορεί να μετατραπεί στην ανενεργή της μορφή, την κορτιζόνη, μέσω της 11β-αφυδρογονάσης των υδροξυστεροειδών τύπου 2. Αντίθετα, η 11β-αφυδρογονάση των υδροξυστεροειδών τύπου 1 μετατρέπει την κορτιζόνη σε κορτιζόλη (εικόνα 1). (Kadmiel M. *et al.*, 2013)

Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή είναι φάρμακα που μοιάζουν με τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή. Η πρεδνιζόνη/πρεδνιζολόνη, η δεξαμεθαζόνη και η βουδεζονίδη είναι μερικά από τα πιο συχνά συνταγογραφούμενα γλυκοκορτικοειδή. Σε αντίθεση με τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή, η δεξαμεθαζόνη δεν μπορεί να απενεργοποιηθεί από την 11β-HSD2, αυξάνοντας τη διαθεσιμότητά της. Επιπλέον, τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή δεν συνδέονται στη συνδεδόμενη με κορτικοστεροειδή σφαιρίνη (corticosteroid binding globulin), με αποτέλεσμα να μη ρυθμίζονται τα διαθέσιμα επίπεδά τους. (Kadmiel M. *et al.*, 2013)

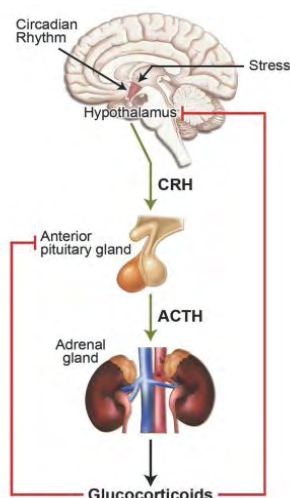


Εικόνα 1

Η μετατροπή της κορτιζόλης από την ενεργή στην ανενεργή μορφή μέσω των ενζύμων 11β-αφυδρογονάση των υδροξυστεροειδών τύπου 1 και 2. (Kadmiel M. *et al.*, 2013)

1.1.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΣΗ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Τα γλυκοκορτικοειδή συντίθενται και απελευθερώνονται από τον φλοιό των επινεφριδίων με κιρκαδικό ρυθμό ως απόκριση στο στρες. Η έκκριση αυτών των ορμονών ελέγχεται από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA). Εσωτερικά και εξωτερικά σήματα ενεργοποιούν τον υποθάλαμο για απελευθέρωση της ορμόνης απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης (CRH), η οποία δρα στην πρόσθια υπόφυση για να διεγείρει τη σύνθεση και την έκκριση της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH). Στη συνέχεια, η ACTH δρα στον φλοιό των επινεφριδίων για να διεγείρει την παραγωγή και την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών. Δρώντας σχεδόν σε όλους τους ιστούς και τα όργανα του σώματος, τα γλυκοκορτικοειδή διατηρούν την ομοιόσταση τόσο ως απόκριση στις φυσιολογικές ημερήσιες αλλαγές του μεταβολισμού όσο και ως απόκριση στο στρες. Τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν μια πληθώρα φυσιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένου του ενδιάμεσου μεταβολισμού, της λειτουργίας του ανοσοποιητικού, της ανάπτυξης του σκελετού, της καρδιαγγειακής λειτουργίας, της αναπαραγωγής και της γνωστικής λειτουργίας. Τα γλυκοκορτικοειδή στοχεύουν επίσης τον υποθάλαμο και την πρόσθια υπόφυση για να εμποδίσουν την παραγωγή και απελευθέρωση της CRH και της ACTH για να περιορίσουν τόσο το μέγεθος όσο και τη διάρκεια της αύξησης των γλυκοκορτικοειδών, δημιουργώντας ένα βρόγχο αρνητικής ανάδρασης (εικόνα 2). (Oakley R. H. *et al.*, 2013)



Εικόνα 2

*Ρύθμιση της έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων. Ερεθίσματα που οδηγούνται στον υποθάλαμο προκαλούν την έκκριση της ορμόνης απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (CRH), η οποία δρα στην πρόσθια υπόφυση για να διεγείρει τη σύνθεση και την έκκριση της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH). Η ACTH στη συνέχεια δρα στο φλοιό των επινεφριδίων και διεγείρει την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών. (Oakley R. H. *et al.*, 2013)*

1.1.3. ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Δυστυχώς, τα θεραπευτικά οφέλη των γλυκοκορτικοειδών περιορίζονται από σοβαρές παρενέργειες που αναπτύσσονται σε ασθενείς που υποβάλλονται σε χρόνια θεραπεία με τα συγκεκριμένα στεροειδή. Τα ανεπιθύμητα συμπτώματα περιλαμβάνουν την πρόκληση οστεοπόρωσης, την ατροφία του δέρματος, την μυϊκή αδυναμία, την ανάπτυξη διαβήτη, την κοιλιακή παχυσαρκία, το γλαύκωμα, την επιβράδυνση της ανάπτυξης στα παιδιά και την υπέρταση. Επιπλέον, οι ασθενείς με μακροχρόνια θεραπεία γλυκοκορτικοειδών συχνά αναπτύσσουν ιστοειδική αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή. Γι' αυτό το λόγο, κρίνεται αναγκαία η κατανόηση των

παραγόντων που ελέγχουν την κυτταρική απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή, σε μοριακό επίπεδο, καθώς η πρόοδος σε αυτόν τον τομέα θα διευκολύνει την ανάπτυξη νέων γλυκοκορτικοειδών με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες. (Oakley R. H. *et al.*, 2013)

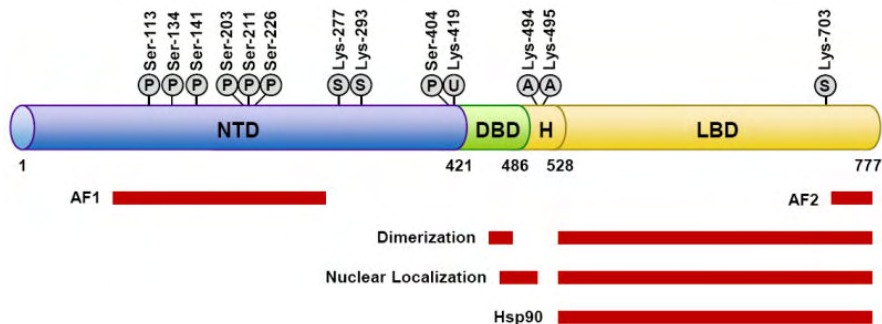
1.2. Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ (GR)

1.2.1. ΓΕΝΙΚΑ

Τόσο τα φυσικά όσο και τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή ασκούν τις δράσεις τους μέσω της σύνδεσής τους με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών ανήκει στους υποδοχείς στεροειδών ορμονών, οι οποίοι αποτελούν πυρηνικούς υποδοχείς και περιλαμβάνουν τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptors, GR), τους υποδοχείς οιστρογόνων (estrogen receptors, ER), τους υποδοχείς ανδρογόνων (androgen receptors, AR), τους υποδοχείς προγεσταγόνων (progesterone receptors, PR) και τους υποδοχείς μεταλλοκορτικοειδών (mineralocorticoid receptors, MR). (Louie M C *et al.*, 2017)

1.2.2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Ο GR αποτελείται από τρεις κύριους τομείς: μια N-τελική περιοχή trans-ενεργοποίησης της μεταγραφής (NTD), μια κεντρική περιοχή δέσμευσης στο DNA (DBD) και μια C-τελική περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (LBD). Οι DBD και το LBD διαχωρίζονται από μια εύκαμπτη περιοχή της πρωτεΐνης που ονομάζεται περιοχή άρθρωσης. Η DBD είναι η πιο συντηρημένη περιοχή στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και περιέχει δύο μοτίβα δακτύλου ψευδαργύρου που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν τις αλληλουχίες στόχους στο DNA που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (GREs). Η NTD περιέχει μια ισχυρή λειτουργία μεταγραφικής ενεργοποίησης (AF1) που αλληλεπιδρά με τους συν-ρυθμιστές και το βασικό μηχανισμό της μεταγραφής και είναι η πρωταρχική θέση για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Η LBD, που αποτελείται από 12 α-έλικες και 4 β-πτυχωτά φύλλα, σχηματίζει έναν υδρόφοβο θύλακα για τη δέσμευση των γλυκοκορτικοειδών και περιέχει επίσης μια λειτουργία ενεργοποίησης (AF2) που αλληλεπιδρά με συν-ρυθμιστές με προσδετο-εξαρτώμενο τρόπο. Δύο πυρηνικά σήματα εντοπισμού, NL1 και NL2, εντοπίζονται στη σύνδεση της DBD / περιοχής άρθρωσης και εντός της LBD, αντίστοιχα. Τέλος, εντός της περιοχής σύνδεσης στο DNA εντοπίζεται η περιοχή διμερισμού, ενώ στην περιοχή σύνδεσης με τον προσδέτη, η περιοχή σύνδεσης με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ Hsp70/90 (εικόνα 3). (Oakley R. H. *et al.*, 2013)



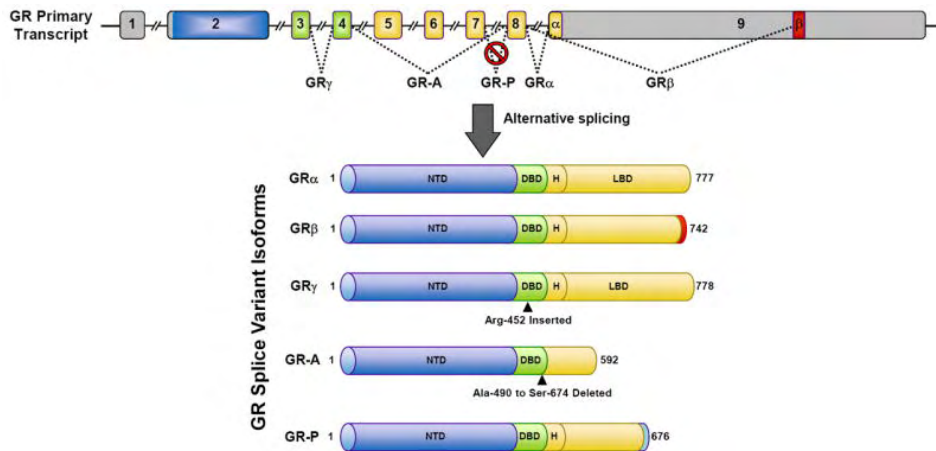
Εικόνα 3

Δομή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

*Απεικονίζονται οι δομικές επικράτειες του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Στο αμινοτελικό άκρο βρίσκεται η περιοχή *trans*-ενεργοποίησης της μεταγραφής (AF-1), ακολουθεί η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD), έπειτα η περιοχή άρθρωσης (H) και τέλος η περιοχή σύνδεσης στον προσδέτη (LBD). (Oakley R. H. et al., 2013)*

1.2.3. ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Το ανθρώπινο γονίδιο του GR (NR3C1) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 (5q31.3) και αποτελείται από 9 εξόνια. Η GR NTD κωδικοποιείται κατά κύριο λόγο από το εξόνιο 2, η DBD κωδικοποιείται από τα εξόνια 3 και 4 και η περιοχή άρθρωσης και η LBD κωδικοποιούνται από τα εξόνια 5-9. Εναλλακτικό μάτισμα στο εξόνιο 9, κοντά στο τέλος του κυρίως μεταγραφήματος, δημιουργεί δύο ισομορφές του υποδοχέα, που ονομάζονται GRα και GRβ. Η GRα προέρχεται από το άκρο του εξωνίου 8 που συνδέεται με την αρχή του εξονίου 9, ενώ η GRβ προκύπτει από το άκρο του εξονίου 8 που συνδέεται με τις καθοδικές αλληλουχίες του εξονίου 9. Η GRα, αποτελεί την κλασική και πιο άφθονη ισομορφή και είναι υπεύθυνη για το κλασικό μονοπάτι σηματοδότησης του GR. Αντίθετα, η GRβ δε δεσμεύει τους αγωνιστές γλυκοκορτικοειδών, αλλά παραμένει ιδιосуστατικά ανενεργή στον πυρήνα των κυττάρων. Ωστόσο, όταν συν-εκφραστεί με τη GRα, η GRβ λειτουργεί ως κυρίαρχος αρνητικός αναστολέας και ανταγωνίζεται τη δραστηριότητα της GRα σε πολλά γονίδια στόχους που ανταποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή. Εκτός από τη GRβ, το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου του GR δημιουργεί κι άλλες ισομορφές του υποδοχέα, τη GRγ, που έχει συσχετιστεί με αντοχή στα γλυκοκορτικοειδή και τις GR-Α, GR-Ρ, για τις οποίες λίγα είναι γνωστά σήμερα (εικόνα 4). (Oakley R. H. et al., 2013)



Εικόνα 4

Οι ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

Το πρωταρχικό μετάγραφο του GR αποτελείται από 9 εξόνια. Το εξόνιο 2 κωδικοποιεί την NTD, τα εξόνια 3-4 την DBD και τα εξόνια 5-9 την περιοχή άρθρωσης (H) και την LBD. Η ισομορφή GR α , που είναι και η πιο άφθονη, προέρχεται από μάτισμα μεταξύ του εξονίου 8 και της αρχής του εξονίου 9, ενώ οι υπόλοιπες ισομορφές προέρχονται από εναλλακτικά γεγονότα μάτισματος, όπως απεικονίζονται παραπάνω. (Robert H. *et al.*, 2013)

1.2.4. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

ΚΛΑΣΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ

Απουσία ορμόνης, ο GR βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ως μέρος ενός μεγάλου πολυ-πρωτεϊνικού συμπλέγματος που περιλαμβάνει πρωτεΐνες θερμικού σοκ (hsp90, hsp70 και p23) και ανοσοφιλίνες της οικογένειας FK506 (FKBP51 και FKBP52). Αυτές οι πρωτεΐνες διατηρούν τον υποδοχέα σε μια διαμόρφωση που είναι μεταγραφικά αδρανής αλλά ευνοεί τη δέσμευση με τον προσδέτη με υψηλή συγγένεια. Μετά τη δέσμευση των γλυκοκορτικοειδών, ο GR υφίσταται μεταβολή διαμόρφωσης με αποτέλεσμα τη διάσπαση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών. Αυτή η δομική αναδιάταξη εκθέτει τα δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού και ο GR μετατοπίζεται γρήγορα στον πυρήνα μέσω των πυρηνικών πόρων. (Psarra and Sekeris (2008), Nicolaidis NC. *et al.*, 2010)

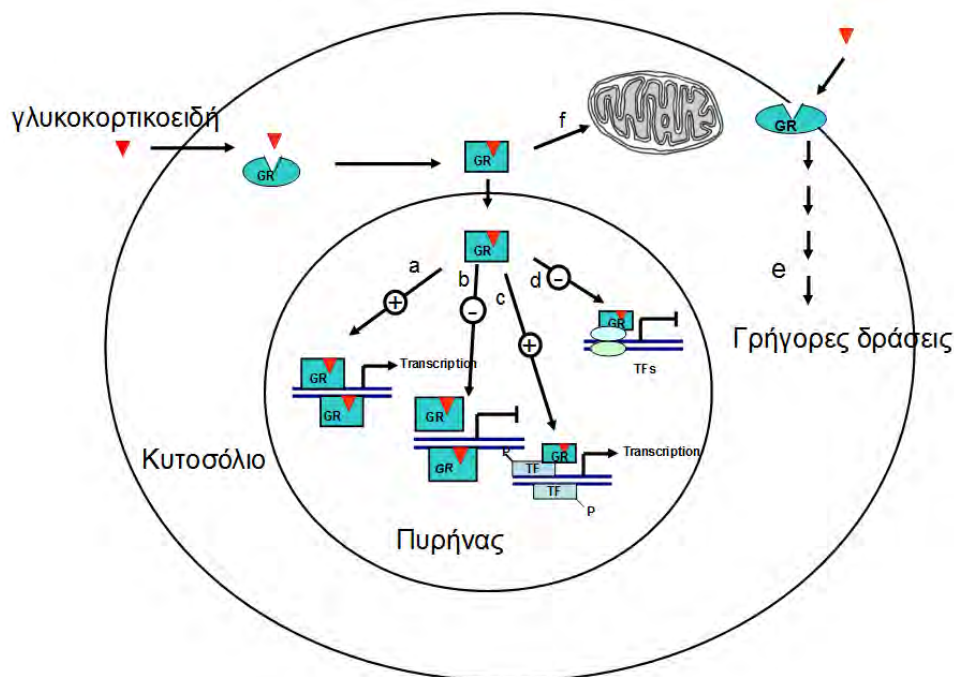
Μόλις εισέλθει στον πυρήνα, ο GR δεσμεύεται άμεσα στα GREs και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων στόχων. Τα GREs έχειδειχθεί ότι μεσολαβούν στην εξαρτώμενη από γλυκοκορτικοειδή διέγερση πολλών γονιδίων και συνεπώς συχνά αναφέρονται ως ενεργοποιητικά ή θετικά GRE. Ωστόσο, γονιδιακές αναλύσεις έχουν αποκαλύψει και την ύπαρξη αρνητικών GRE (nGRE) που μεσολαβούν στην εξαρτώμενη από γλυκοκορτικοειδή καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων. (Psarra & Sekeris 2008, Oakley RH. *et al.*, 2013)

Ο GR μπορεί επίσης να ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων με φυσική αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες μεταγραφής. Η σύνδεση του GR με συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας STAT, είτε εκτός είτε σε συνδυασμό με σύνδεση με GRE, έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει τη μεταγραφή των ανταποκρινόμενων γονιδίων. Αντιθέτως, η αλληλεπίδραση του GR με τους προ-φλεγμονώδεις παράγοντες μεταγραφής, AP1 και NF-κB, ανταγωνίζεται τη δραστηριότητά τους και θεωρείται ότι είναι ένας πρωταρχικός μηχανισμός με τον οποίο τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν τη φλεγμονή. (Psarra & Sekeris, 2008)

Επίσης, πρόσφατα έχει ανακαλυφθεί και ο εντοπισμός του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών καθώς και άλλων υποδοχέων στεροειδών ορμονών στα μιτοχόνδρια, όπου παίζει καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό, στην αύξηση, στην ανάπτυξη, στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι ο GR συνδέεται σε αλληλουχίες του μιτοχονδριακού DNA και ενεργοποιεί τη μεταγραφή μιτοχονδριακών γονιδίων, όπως γονίδια της αναπνευστικής αλυσίδας (OXPHOS), οδηγώντας στην ενεργοποίηση της βιοσύνθεσης των ενζύμων της OXPHOS. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή μιτοχονδριακού ATP. (Psarra 2005, Psarra & Sekeris, 2008, 2009, 2011)

ΜΗ ΚΛΑΣΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ

Ενώ τα κύρια αποτελέσματα των γλυκοκορτικοειδών διαμεσολαβούνται από μεταγραφικές αποκρίσεις που συμβαίνουν σε λεπτά έως ώρες, ένα αυξανόμενο σώμα στοιχείων υποδηλώνει ότι ο GR μπορεί επίσης να δράσει μέσω μη γονιδιωματικών μηχανισμών για να προκαλέσει ταχείες κυτταρικές αποκρίσεις που συμβαίνουν μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα έως λεπτά και δεν απαιτούν αλλαγές στην έκφραση γονιδίων. Σε αυτά τα γεγονότα φαίνεται ότι εμπλέκονται πολλοί μηχανισμοί σηματοδότησης που τελικά επηρεάζουν τη δραστηριότητα διαφόρων κινασών, όπως PI3K, AKT και MAPK. Ο GR έχει επίσης αναφερθεί ότι εντοπίζεται στη πλασματική μεμβράνη σε κυστίδια μέσω αλληλεπίδρασης με την καβεολίνη 1. Η ενεργοποίηση αυτού του GR που συνδέεται με τη μεμβράνη ρυθμίζει τη διακυτταρική επικοινωνία και τον πολλαπλασιασμό των νευρικών προγονικών κυττάρων μέσω ενός μηχανισμού που απαιτεί τη δραστηριότητα της c-Src και την ταχεία εξαρτώμενη από MAPK φωσφορυλίωση της συνδεξίνης-43. Η ύπαρξη μη γονιδιακής σηματοδότησης προσθέτει μεγαλύτερη πολυπλοκότητα και ποικιλομορφία στα γλυκοκορτικοειδή και τις βιολογικές τους δράσεις και αυξάνει την πιθανότητα ότι οι επιλεκτικοί ρυθμιστές των γονιδιακών ή μη γονιδιακών οδών που εξαρτώνται από τον GR μπορεί να είναι θεραπευτικά πλεονεκτικές (εικόνα 5). (Psarra & Sekeris, 2008), Oakley R. H. *et al.*, 2013)



Εικόνα 5

Μονοπάτια σηματοδότησης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

Ο GR αφού ενεργοποιηθεί από τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση μέσω απευθείας σύνδεσης στο DNA, ενεργοποιώντας (a) ή καταστέλλοντας (b) τη μεταγραφή, μέσω σύνδεσης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται στη συνέχεια στο DNA (c,d). Επίσης, ο GR εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, όπου επίσης δρα ως μεταγραφικός παράγοντας της OXPHOS (f), ενώ μπορεί επίσης να σηματοδοτεί με μη – γενωμικό τρόπο μέσω αλλαγών της δραστηριότητας διαφόρων κινασών (e). (Psarra & Sekeris, 2008)

1.3. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ GR ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

1.3.1. ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR

Έχει αποδειχθεί ότι τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν πολλά από τα αρχικά συμβάντα σε μια φλεγμονώδη απόκριση, δρώντας ως ανοσοκατασταλτικά. Ειδικότερα, προάγουν τη λύση της φλεγμονής παρόλο που οι μηχανισμοί με τους οποίους το κάνουν έχουν μελετηθεί λιγότερο από εκείνους που συνδέονται με την καταστολή της αρχικής απόκρισης. Τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την αγγειοδιαστολή και την αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα που εμφανίζεται μετά τη φλεγμονώδη προσβολή και μειώνουν τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων στις φλεγμαίνουσες περιοχές, επιδράσεις που απαιτούν νέα πρωτεϊνική σύνθεση. Επίσης, μεταβάλλουν τη διανομή και μετακίνηση των λευκοκυττάρων, το θάνατο και την επιβίωση, και, κυρίως, τροποποιούν προγράμματα κυτταρικής διαφοροποίησης, διαμορφώνοντας έτσι την επακόλουθη απόκριση. Οι περισσότερες από τις αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών μπορούν

να αποδοθούν είτε άμεσα είτε έμμεσα στις μεταγραφικές επιδράσεις αγωνιστών του GR που μεταβάλλουν τη μεταγραφή πολυάριθμων γονιδίων σε λευκοκύτταρα, τόσο αυξάνοντας όσο και μειώνοντας την έκφρασή τους. Συγκεκριμένα, τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν τη μεταγραφή πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες και χημειοκίνες, μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και βασικά ένζυμα εμπλεκόμενα στην έναρξη και / ή τη διατήρηση της φλεγμονώδους απόκρισης του ξενιστή. Τα αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα των γλυκοκορτικοειδών έχουν αποδοθεί εν μέρει στην ικανότητα του GR να καταστέλλει τη δραστικότητα των NF-κΒ και AP-1, καθώς και άλλων βασικών μεταγραφικών παραγόντων της ανοσολογικής απόκρισης. Αυτό έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει μέσω trans-ενεργοποίησης από τον GR του αναστολέα του NF-κΒ, IκΒ, ο οποίος βρίσκεται σε σύμπλοκο με τον NF-κΒ στο κυτταρόπλασμα, αλλά φαίνεται να περιορίζεται σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους και όχι να αποτελεί έναν καθολικό μηχανισμό. (Coutinho A. E. *et al.*, 2011)

1.3.2. ΠΡΟ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR

Πολλές έρευνες έχουν αποδείξει ότι τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν ισχυρούς επαγωγείς της απόπτωσης σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Την πιο χαρακτηριστική αποπτωτική τους δράση την ασκούν, μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, στο σκελετικό σύστημα, με αποτέλεσμα η χρόνια χορήγησή τους να οδηγεί σε οστεοπόρωση. Πιο συγκεκριμένα, ασκούν αντι-πολλαπλασιαστικά και προ-αποπτωτικά αποτελέσματα στους οστεοβλάστες, τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό των οστών, μέσω αύξησης προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως της Bim και καταστολής αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως τις Bcl-2, Bcl-XL και Mcl-2. Επιπροσθέτως, τα γλυκοκορτικοειδή έχει αναφερθεί ότι αυξάνουν την επιβίωση των οστεοκλαστών, που είναι υπεύθυνοι για την απορρόφηση του οστού, ενώ προκαλούν και αποπτωτικές επιδράσεις στα κύτταρα του χόνδρου. Είναι ευρέως γνωστό ότι η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή αναστέλλει, επίσης τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων, την υπερτροφία και την παραγωγή της μήτρας του χόνδρου, συμβάλλοντας στη μειωμένη διαμήκη ανάπτυξη των οστών. Όσο αφορά το μυϊκό σύστημα, περίσσεια γλυκοκορτικοειδών μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μυοπάθειας, μέσω αυξημένου καταβολισμού πρωτεϊνών και απόπτωσης, η οποία έχει συνδεθεί με την ενεργοποίηση του μονοπατιού FADD-Fas ligand, ενεργοποίηση της κασπάσης 8 και αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των προ-αποπτωτικών μορίων Bax, Bad και Bid. Τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν επίσης απόπτωση σε άλλους τύπους μυών, όπως των λείων μυών του αναπνευστικού συστήματος, όπου έχει αποδειχθεί ότι προκαλείται μέσω αύξησης της έκφρασης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax και μείωσης της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Ωστόσο, υπάρχουν και πολλές θετικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών στη θεραπεία των ασθενειών των αεραγωγών, όπως της καταστολής της φλεγμονής σε περιπτώσεις άσθματος. Γι' αυτό το λόγο, απαιτείται περεταίρω αποσαφήνιση του τρόπου που η απόπτωση επηρεάζει τα κύτταρα των λείων μυών των αεραγωγών καθώς και το ρόλο της στην πρόοδο της ασθματικής νόσου. Οι αποπτωτικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος

έχουν μελετηθεί καλά τα τελευταία χρόνια και τα γλυκοκορτικοειδή είναι γνωστό ότι εμφανίζουν πολλά πλειοτροπικά αποτελέσματα. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι σημαντικά για την επιλογή των T κυττάρων, την ομοίωση του ανοσοποιητικού συστήματος, και την επίλυση της ανοσοαπόκρισης μετά την κάθαρση της λοίμωξης. Οι αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών και η απόπτωση που προκαλείται από GC οδήγησαν στη χρήση της στεροειδικής θεραπείας ως ανεκτίμητο μέρος της θεραπείας σε πολλές κλινικές περιπτώσεις, όπως στη θεραπεία κακοηθειών του ανοσοποιητικού συστήματος. Υψηλές δόσεις γλυκοκορτικοειδών είναι γνωστό ότι προκαλούν απόπτωση στα θυμοκύτταρα, τα T κύτταρα, τα B κύτταρα, τα μακροφάγα, τα ώριμα αλλά όχι τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, τα ηωσινόφιλα και τα φυσικά φονικά κύτταρα. Ωστόσο, τα γλυκοκορτικοειδή έχουν την αντίθετη επίδραση στα ουδετερόφιλα και στην πραγματικότητα προστατεύουν αυτά τα κύτταρα από την απόπτωση. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι επίσης σημαντικά στο ενδοκρινικό σύστημα, όπου υψηλές δόσεις συχνά έχουν ως αποτέλεσμα μεταβολές στο μεταβολισμό της γλυκόζης που μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη διαβήτη τύπου II. Τέλος, το πάγκρεας, το οποίο παράγει ινσουλίνη, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στις αποπτωτικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών. Οι μηχανισμοί δράσης περιλαμβάνουν την καταστολή της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και την ενεργοποίηση της καλσινευρίνης, οδηγώντας σε απο-φωσφορλίωση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης BAD. Αυτές οι αποπτωτικές επιδράσεις μπορεί να συμβάλλουν στην εξασθένηση της λειτουργίας των β-κυττάρων του παγκρέατος, που οδηγεί στην ανάπτυξη του σακχαρώδους διαβήτη. (Gruber-Yates A. L. *et al.*, 2013)

1.3.3. ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR

Ενώ τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να επάγουν απόπτωση σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών τύπων σε όλο το σώμα, πολλοί τύποι κυττάρων εμφανίζουν αντι-αποπτωτική απόκριση στη σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών. Έχει ήδη αναφερθεί ότι τα ουδετερόφιλα παρουσιάζουν ένα αντι-αποπτωτικό αποτέλεσμα σε απόκριση των γλυκοκορτικοειδών. Ομοίως, τα ωοθυλακικά κύτταρα των ωοθηκών έχουν αντι-αποπτωτική απόκριση στη σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών. Επίσης, τα ηπατοκύτταρα και τα λιποκύτταρα έχει τεκμηριωθεί ότι εμφανίζουν αντι-αποπτωτική απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή. Τα πρωτογενή ηπατικά κύτταρα υφίστανται αυθόρμητη απόπτωση σε καλλιέργεια και η δεξαμεθαζόνη έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει αυτή τη διαδικασία τόσο σε ανθρώπινα όσο και σε ηπατοκύτταρα αρουραίου κατά τρόπο δόσο-εξαρτώμενο. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνονται μετά από επώαση με δεξαμεθαζόνη, ενώ η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax μειώνεται. Επιπλέον, η δεξαμεθαζόνη έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την επαγόμενη από TNF- α απόπτωση σε ανθρώπινα λιποκύτταρα και προ-λιποκύτταρα. Αυτό ίσως να εξηγεί γιατί αυξάνεται ο λιπώδης ιστός στην παχυσαρκία, παρά τους αυξημένους φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως ο TNF- α που θα έπρεπε να προκαλεί απόπτωση των λιποκυττάρων. Δύο πρόσθετα όργανα όπου τα γλυκοκορτικοειδή είναι κυτταροπροστατευτικά είναι η καρδιά και ο νεφρός. Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να προστατεύσουν από καρδιακή βλάβη, καθώς επίσης και να αναστείλουν απευθείας την απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων. Όσο αφορά

τους νεφρούς, έχει δειχθεί ότι η δεξαμεθαζόνη προστατεύει τα νεφρικά μεσαγγειακά κύτταρα αρουραίων από την απόπτωση που επάγεται από το στρες, μέσω ρύθμισης των επιπέδων φωσφορικής σφιγγοσίνης-1 (SP1), η οποία μπορεί να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και να εξουδετερώσει τους αποπτωτικούς μηχανισμούς. Τέλος, αρκετοί τύποι κυττάρων που περιλαμβάνουν πολλά κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης δεν υποβάλλονται σε απόπτωση ως απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή, υποδεικνύοντας ότι τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να έχουν προστατευτική επίδραση με ιστοειδικό τρόπο. (Gruber-Yates A. L. *et al.*, 2013)

1.4. Η ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ ΚΑΙ ΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Η Μαστίχα Χίου είναι η ρητινώδης έκκριση του μαστιχόδεντρου, το οποίο ανήκει στην οικογένεια Anacardiaceae το γένος *Pistacia lentiscus* L. και φύεται κατά κύριο λόγο στις ακτές της Ανατολικής λεκάνης της Μεσογείου. Από τη συγκεκριμένη οικογένεια, μόνο η ποικιλία *Pistacia Lentiscus var Chia*, που καλλιεργείται συστηματικά στο νότιο τμήμα της νήσου Χίου, παράγει την εκλεκτή και μοναδική για τις θεραπευτικές δράσεις της Μαστίχα. Η φυσική και αρωματική ρητίνη εκκρίνεται σε σχήμα δακρύων από τον κορμό και τα μεγάλα κλαδιά, μέσω επιφανειακών τομών που προκαλούνται με αιχμηρά εργαλεία. Παραμένει κάτω από το θάμνο μέχρι να στερεοποιηθεί, κι έπειτα συλλέγεται, διαχωρίζεται σε κατηγορίες και καθαρίζεται από τους μαστιχοπαραγωγούς, προτού παραδοθεί στο συνεταιρισμό κάθε χωριού για προωθηθεί στη συνέχεια στην Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου. (Chios Mastiha published scientific booklet)

Η ακριβής σύνθεση της Μαστίχας Χίου δεν είναι ακόμη γνωστή. Μια εξαιρετική ποικιλία από αρωματικά και θεραπευτικά συστατικά απαντώνται στη μοναδική αυτή ρητίνη. Πιο συγκεκριμένα περιέχονται: φυσικό πολυμερές, πτηνικά και αρωματικά συστατικά που συνθέτουν το αιθέριο έλαιο, το μαστιχέλαιο, τερπενικά οξέα, φυτοστερόλες, πολυφαινολικά μόρια κι ένας μεγάλος αριθμός από άλλα δραστικά συστατικά, μερικά από τα οποία απαντώνται στη φύση για πρώτη φορά. Ο συνδυασμός αυτός των ογδόντα και πλέον συστατικών δικαιολογεί τις πολλαπλές χρήσεις της Μαστίχας Χίου, τόσο στον τομέα των τροφίμων όσο και στον τομέα της υγείας και προσωπικής περιποίησης, σε παγκόσμια κλίμακα. (Chios Mastiha published scientific booklet)

Στη σύγχρονη εποχή, αποτελέσματα ερευνών έχουν αποκαλύψει τις ευεργετικές δράσεις της Μαστίχας Χίου που είχαν αναφερθεί ακόμα από την αρχαιότητα. Αποδεικνύεται πλέον επιστημονικά ότι η Μαστίχα Χίου παρουσιάζει ευεργετική δράση κατά των παθήσεων του πεπτικού συστήματος, συμβάλλει στη στοματική υγιεινή, παρουσιάζει σημαντική αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική δράση, αποτελεί φυσικό αντιοξειδωτικό, ενώ παράλληλα συμβάλλει στην επούλωση τραυμάτων και την ανάπλαση της επιδερμίδας. (Chios Mastiha published scientific booklet)



Εικόνα 6

(A) Το μαστιχόδεντρο *Pistacia Lentiscus var Chia* και (B) η Μαστίχα Χίου.

Η Μαστίχα Χίου αποτελεί τη ρητίνη που εκκρίνεται σε σχήμα δακρύων από τον κορμό και τα μεγάλα κλαδιά του μαστιχόδεντρου *Pistacia Lentiscus var Chia*, μέσω επιφανειακών τομών, παραμένει κάτω από το θάμνο μέχρι να στερεοποιηθεί, κι έπειτα συλλέγεται, διαχωρίζεται σε κατηγορίες και καθαρίζεται από τους μαστιχοπαραγωγούς. (*Chios Mastiha published scientific booklet*)

1.4.1. ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Όλο και περισσότερα πειραματικά δεδομένα αποκαλύπτουν τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της Μαστίχας Χίου από *in vitro*, *in vivo* αλλά και κλινικές μελέτες. Πιο συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι το εκχυλίσμα της Μαστίχας Χίου ανέστειλε την παραγωγή προ-φλεγμονωδών μορίων, όπως μονοξειδίου του αζώτου (NO) και προσταγλαδίνη (PGE2) σε μακροφαγικά κύτταρα RAW 264.7 ενεργοποιημένα από λιποπολυσακχαρίδιο (LPS). Επίσης, έχει δειχθεί η μείωση τόσο των μεταγραφικών όσο και των πρωτεϊνικών επιπέδων της συνθάσης του NO (iNOS), καθώς και της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX-2), ενός ενζύμου υπεύθυνου για το σχηματισμό προσταγλαδινών και την επακόλουθη επαγωγή φλεγμονής. Πειράματα που έγιναν σε καρκινικά κύτταρα προστάτη PC-3 έδειξαν καταστολή της σηματοδότησης του NF-kB (nuclear factor kB), και πιο συγκεκριμένα, μείωση της έκφρασης της κυκλίνης D1, που αποτελεί γονίδιο στόχο του, καθώς και αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του IκBa, που συνδέεται με τον NF-kB και τον αναστέλλει. Επιπλέον, χορήγηση του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου σε ποντίκια με αλλεργικό άσθμα, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ηωσινοφιλίας, μειώνοντας την υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών και καταστέλλοντας την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών στο υγρό των βρογχοκυψελίδων. Τέλος, χορήγηση του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου σε ασθενείς με τη νόσο του Crohn, οδήγησε σε μείωση του TNF-α (tumor necrosis factor α) και σημαντική αύξηση του MIF (migrating inhibitory factor)

από δείγμα περιφερικού αίματος, υποδηλώνοντας ότι αναστέλλεται η μετανάστευση και χημειοταξία των μακροφάγων. Επομένως, τα πειραματικά αυτά δεδομένα αποκαλύπτουν τις σημαντικές αντιφλεγμονώδεις δράσεις της Μαστίχας Χίου, τόσο από *in vitro* όσο και από κλινικές δοκιμές. (Dimas *et al.* 2012)

1.4.2. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Εκτός από τις αναμφισβήτητες αντιφλεγμονώδεις δράσεις της Μαστίχας Χίου, μελέτες έφεραν στο φως και αντιοξειδωτικές και καρδιοπροστατευτικές δράσεις της. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε λεία μυϊκά κύτταρα που επωάστηκαν με εκχύλισμα Μαστίχας Χίου έδειξαν μείωση της παραγωγής σουπεροξειδίου μέσω αναστολής της δραστηριότητας της οξειδάσης του NADPH (Triantafyllou A. *et al.*, 2011). Επιπροσθέτως, πολλές κλινικές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η Μαστίχα Χίου αναστέλλει την οξειδωση της LDL (low density lipoprotein), η οποία οδηγεί στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας και επακόλουθης αρτηριοσκλήρυνσης. Επίσης, έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HAECs (human aortic endothelial cells) έδειξε ότι το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου ανέστειλε σημαντικά την έκφραση μορίων προσκόλλησης, όπως VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) και ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) που παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία αθηροσκλήρυνσης, αποκαλύπτοντας τις καρδιοπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές δράσεις της Μαστίχας Χίου. (Dimas *et al.* 2012)

1.4.4. ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Πολλά πειραματικά δεδομένα αποκαλύπτουν, επίσης, τις αντι-πολλαπλασιαστικές και αποπτωτικές δράσεις της Μαστίχας Χίου. Ειδικότερα, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην ανθρώπινη καρκινική σειρά παχέος εντέρου HCT116 έδειξαν ότι εκχύλισμα εξανίου Μαστίχας Χίου επάγει την απόπτωση μέσω ενεργοποίησης των κασπασών 3, 8 και 9 σε αποκολλημένα από το υπόστρωμα κύτταρα, μια διαδικασία που στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως “anoikis” (Balan KV *et al.* 2005, 2007). Επιπλέον, το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου ανέστειλε την ανάπτυξη ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων προστάτη PC-3, μπλοκάροντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, σταματώντας τα κύτταρα στη φάση G1 και μειώνοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης D1 και της p-AKT κινάσης (Dimas *et al.* 2012). Επίσης, έρευνες που διεξήχθησαν σε καρκινικές σειρές παχέος εντέρου έδειξαν ότι τόσο το αιθέριο έλαιο Μαστίχας Χίου όσο και απομονωμένων συστατικών του, καθώς και συνδυασμός αυτών, ανέστειλε την κυτταρική ανάπτυξη *in vitro*, ενώ η καθημερινή χορήγηση από το στόμα του αιθέριου ελαίου της Μαστίχας Χίου σε μοντέλα ποντικών ανέστειλε και την ανάπτυξη όγκων παχέος εντέρου (Spyridoroulou K. *et al.*, 2017). Επιπλέον, το εκχύλισμα Μαστίχας Χίου φάνηκε ότι προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης και απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα στόματος YD-10B, μέσω μείωσης της προ-κασπάσης 3 και κατακερματισμού του DNA (ShengJin Li *et al.*, 2011). Επίσης, άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο Μαστίχας Χίου άσκησε αντι-πολλαπλασιαστικές και αποπτωτικές δράσεις στα

ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα K562, και ανέστειλε την απελευθέρωση του αυξητικού αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα VEGF (vascular endothelial growth factor) σε κύτταρα K562 καθώς και σε κύτταρα μυελώματος ποντικού B16, μέσω μείωσης της κινάσης Erk1/2 (Heleni Loutrari *et al.*, 2006). Τέλος, πειράματα που διεξήχθησαν σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα Lewis (Lewis lung carcinoma) καθώς και σε ποντικούς μεταμοσχευμένους με τα συγκεκριμένα κύτταρα, έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο Μαστίχας Χίου εξασθενεί την ανάπτυξη όγκου και ασκεί επαγωγή της απόπτωση στα κύτταρα του όγκου, αναστέλλει τη φλεγμονώδη απόκριση που συνδέεται με τον όγκο καθώς και την αγγειογένεση, μέσω αναστολής της σηματοδότησης των Ras/RhoA καθώς και του NF-κB (Magkouta S *et al.*, 2009).

1.4.5. ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Εκτός από τις αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, καρδιοπροστατευτικές και αντικαρκινικές δράσεις της Μαστίχας Χίου, αρκετές μελέτες έχουν φέρει στο φως και τις ευεργετικές δράσεις της στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων. Πράγματι, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε διαβητικά ποντίκια έδειξαν μείωση των επιπέδων τριγλυκεριδίων, LDL, HDL και γλυκόζης του ορού, ενώ μειώθηκε κατά πολύ και η ηπατική στεάτωση (Georgiadis *et al.*, 2013). Επίσης, κλινικές μελέτες που διεξήχθησαν σε ασθενείς, οι οποίοι λάμβαναν καθημερινά Μαστίχα Χίου, έδειξαν μείωση των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης του ορού, της LDL, της απολιποπρωτεΐνης A-1 και B στην ομάδα υψηλής δόσης, ενώ μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στην ομάδα χαμηλής δόσης στα αρσενικά άτομα (Triantafyllou *et al.*, 2007). Έχει προταθεί ότι αυτή η αντιδιαβητική και υπολιπιδαιμική δράση μεσολαβείται μέσω τροποποίησης της σηματοδότησης των υποδοχέων PPARα και PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor alpha και gamma). Οι υποδοχείς PPAR αποτελούν πυρηνικούς υποδοχείς που μοιάζουν δομικά με τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών και ρυθμίζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων, την κυτταρική διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό καθώς και την ανοσολογική απόκριση, ενώ λιπαρά οξέα και παράγωγα αυτών αποτελούν ενδογενείς προσδέτες τους. Η παρουσία του ολεανονικού οξέος στο εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου, καθώς και άλλων συστατικών, ενισχύει αυτή την υπόθεση, εφόσον έχει αποδειχθεί ότι δρα ως αγωνιστής του PPARγ και τον ενεργοποιεί (Georgiadis *et al.*, 2014). Ωστόσο, πολλές ακόμη μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν ώστε να αποσαφηνιστούν πλήρως οι μηχανισμοί με τους οποίους ασκούνται τόσο οι αντιδιαβητικές όσο και οι υπόλοιπες δράσεις της η Μαστίχα Χίου.

1.5. ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΚΑΙ ΜΕΣΟΛΑΒΗΣΗ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΟΥ GR

Η σύνθεση του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου έχει αναλυθεί αρκετά και οι βιολογικές δράσεις της μπορούν να αποδοθούν σε μια ποικιλία δραστικών συστατικών που έχουν εντοπιστεί στο εκχύλισμά της, όπως είναι μονοτερπένια, τριτερπένια, φυτοστερόλες, πολυφαινολικά μόρια, φυσικά πολυμερή και πολλά ακόμη. Πιο συγκεκριμένα, στο όξινο κλάσμα της Μαστίχας Χίου συμπεριλαμβάνονται

όλα τα κύρια τριτερπενικά οξέα, όπως το μαστιχαδιενονικό οξύ (12%), το ισομαστιχαδιενονικό οξύ (12%), το ολεανονικό οξύ (6%), το μορονικό οξύ (6%), το μαστιχαδιενολικό οξύ, το ισομαστιχαδιενολικό οξύ και το ολεανολικό οξύ. Στο ουδέτερο κλάσμα της Μαστίχας Χίου έχουν εντοπιστεί ουδέτερα τριτερπενικά συστατικά όπως, η ολεανολική αλδεΐδη, η 28-νορολεαν-17-εν-3-όνη, η πιρουκαλόλη, η β-αμυρίνη, η ισομαστιχαδιενολική αλδεΐδη και η δαμαραδιενόνη. Άλλα συστατικά που έχουν εντοπιστεί στο εκχύλισμα σε μικρότερες συγκεντρώσεις είναι η βερμπενόνη, το α-τερπινολένιο, η λιναλοόλη, το καμφένιο, καθώς και ίχνη γαλλικού οξέος. Επίσης, από το αιθέριο έλαιο Μαστίχας Χίου έχουν απομονωθεί δύο αρωματικά μονοτερπένια, το α-πινένιο (67%) και το μυρσένιο (18%), τα οποία καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος. Τα παραπάνω συστατικά φαίνεται ότι είναι υπεύθυνα για τις αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, υπογλυκαιμικές, και υπολιπιδαιμικές δράσεις της Μαστίχας Χίου, ενώ είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη συνέργειας μεταξύ των συστατικών της, καθιστώντας το συνδυασμό δύο ή περισσότερων αυτών πιο αποτελεσματικό από το καθένα μεμονωμένα. (Loizou *et al.*, 2009, Georgiadis *et al.*, 2014, Spyridopoulou *et al.*, 2017)

Τα τριτερπένια, τα οποία σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μελετών ανάλυσης αποτελούν τα πιο άφθονα συστατικά του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου, έχουν δομή όμοια με τα γλυκοκορτικοειδή, τα οποία ασκούν τις δράσεις τους μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι τα τριτερπένια δρουν ως αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, επάγοντας την ενεργοποίησή του, την μετακίνησή του στον πυρήνα του κυττάρου, όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιώντας ή αναστέλλοντας την έκφραση των γονιδίων στόχων του. (Georgatza *et al.*, 2016)

1.6. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός των βιολογικών δράσεων της Μαστίχας Χίου και πιο συγκεκριμένα, των αντιφλεγμονωδών, υπογλυκαιμικών και αντικαρκινικών δράσεων του εκχυλίσματος της ρητίνης της, καθώς και η αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων ασκούνται. Επίσης, στόχος της συγκεκριμένης μελέτης είναι η περεταίρω διερεύνηση και ο χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασής του εκχυλίσματος με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, ώστε να μπορέσει μελλοντικά να χρησιμοποιηθεί ως εν δυνάμει εκλεκτικός αγωνιστής του, αλλά με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες, για την καταπολέμηση σοβαρών ασθενειών, όπως ο καρκίνος, οι φλεγμονώδεις νόσοι, ο διαβήτης, οι καρδιακές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

- Φωτόμετρο Spectronic® 20 GENESYS™

- Φωτόμετρο για 96-well plate (Bioline, Ιατρική σχολή, ΠΘ, εργαστήριο φαρμακολογίας)
- Συσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminar Flow Hood) Tel Star AV-30/70
- Επωαστήρας: New Brunswick (an Eppendorf Company) Galaxy 170S
- Επωαστήρας: SHEL LAB
- Υδατόλουτρο: P SELECTA
- Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): A. Kruss Optronic Germany
- Φυγόκεντρος στις κυτταροκαλλιέργειες: Entrofriger- BLII/ PS Selecta®
- Λουμινόμετρο: Berthold Technologies, LuBat 39508
- Φυγόκεντρος: eppendorf 5417R
- Φυγόκεντρος Eppendorf 5810R
- Αναδευτήρας: Heidolph Rotamax
- Ζυγοί: KERN EW + KERN 440-47 N
- Heat blocker: KISKER
- Quick spin: Nippon Genetics Europe GmbH
- Vortex: Bio Vortex V1
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης: Biorad mini-PROTEAN® tetra cell
- Συσκευή μεταφοράς (transfer): Biorad mini-trans Blot
- Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S
- Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών από W.B Kodak

2.2. ΥΛΙΚΑ

2.2.1. ΧΗΜΙΚΑ

- Acrylamide/Bis acrylamide 40% (Bio-Rad)
- Acetic acid
- Ammonium persulfate, APS (Sigma)
- ATP (Sigma)
- Bradford protein assay (Bio-Rad)
- Bromophenol blue (fluka)
- Co-enzyme-A (Applichem Panreac)
- Dexamethazone (Riedel-de Haën)
- DMSO (Sigma)
- DTT (SERVA)
- Developer (Carestream)
- ECL A + ECL B (Santa Cruz)
- FBS (Gibco®)
- FBS cis (biosera)
- Fixer (Carestream)
- Glycine (SERVA)
- HCl (Merck)
- KCl (Merk)

- KH_2PO_4 (Merck)
- L-Glutamine (Gibco)
- Lipofectamine (Invitrogen)
- Luciferine (Sigma)
- MgCl_2 (SERVA)
- MgSO_4 (SERVA)
- Na_2HPO_4 (Merk)
- NaH_2PO_4 (Applichem)
- NaCl (Panreac)
- Na_2CO_3 (Merk)
- NaOH (Merck)
- O-nitrophenyl- β -D-galactoside, ONPG (Sigma)
- RBS 1x (Gibco)
- Phenyl Methyl Sulfonyl Floride, PMSF (SERVA)
- Protease inhibitors (Sigma)
- Sodium Dodecyl Sulfate, SDS (SIGMA)
- Skimmed milk powder (Regilait)
- TEMED (Applichem)
- Trichloroacetic acid, TCA (AppliChem)
- Tris-base (Merk, SERVA)
- Trypsin-EDTA 5% 10x (Gibco, Sigma)
- Tween 20 (Euroclone, Sigma)
- Αιθανόλη 100% (SIGMA)
- Βιοαιθανόλη (Kalochem)
- β -μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haën)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών Pageruler (ThermoScientific Fermentas)
- Μεθανόλη (Sigma)
- Πενικιλίνη – Στρεπτομυκίνη (Gibco)
- Σουλφοροδαμίνη, SRB (Sigma)

2.2.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

- Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® 4,5 g/mol Glucose (Life Technologies - Invitrogen) [+]
L-glutamate, [+]
pyruvate
- Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® 4,5 g/mol Glucose (Life Technologies - Invitrogen) [-]
L-glutamate, [-]
phenol red
- Opti-MEM: Life Technologies – Invitrogen

2.2.3. ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ

Το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου παραλήφθηκε από την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου σε μορφή σκόνης, προερχόμενο από τη ρητίνη του μαστιχόδεντρου. Διαλυτοποιήθηκε στον οργανικό διαλύτη DMSO και αποθηκεύτηκε στους 4°C.

2.2.4. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- **Dexamethazone (DEX):**

Διαλύεται σε 100% αιθανόλη και παραμένει αποθηκευμένη στους -20°C.

- **DTT 1M:**

Για 10ml διαλύονται 1,54 gr DTT 1M σε ddH₂O. Ακολουθεί ανάδευση, aliquots και φύλαξη στους -20°C.

- **PMSF 200mM:**

Για την παρασκευή 2ml PMSF 200mM διαλύονται 0.07gr PMSF σε 2ml ισοπροπανόλης και αποθηκεύονται στους -20°C. Με αραιώση 10% σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20mM.

- **Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων (Lysis Buffer):**

Αποτελείται από 20mM Tris pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 250mM NaCl και 3mM EDTA και αποθηκεύεται στους 4°C. Σε 1ml από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται επιπλέον 0.5μl PMSF 20mM (-20°C), 2μl DTT 1M (-20°C) και 10μl μείγματος αναστολέων πρωτεασών.

- **Sample Buffer 4x (διάλυμα επιστοίβαξης δείγματος):**

Αποτελείται από 1M Tris pH 6.8, 10% γλυκερόλη, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% κυανού της βρωμοφαινόλης και αποθηκεύεται στους -20°C.

- **TCA 50%:**

Για την παρασκευή TCA 50% ζυγίζουμε 12,5gr TCA και προσθέτουμε μέχρι τα 25ml ddH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- **Tris 20mM pH 7.5:**

Για τη δημιουργία του αναμειγνύονται 20μl stock διαλύματος Tris 1 M pH 7.5 (4 °C) με 980μl ddH₂O και το διάλυμα διατηρείται σε R.T.

- **Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:**

Για την παρασκευή 0.2 lt διαλύματος ζυγίζονται 36,342 gr Tris τα οποία διαλύονται σε dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με προσθήκη HCl 12N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

- **Ammonium persulfate (APS) 10 %:**

Παρασκευάζεται διαλύοντας 100mg APS σε 1ml ddH₂O και αποθηκεύεται στους -20°C.

- **O-nitrophenyl-β-D-galactoside, (ONPG):**

Διαλύεται κατάλληλη ποσότητα σκόνης σε διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0,1M pH 7,5, ώστε η τελική συγκέντρωση να αντιστοιχεί σε 4mg/ml. Ακολουθεί ανάδευση στη ρόδα στους 4°C και αποθήκευση στους -20°C.

- **Αντιδραστήριο λουσιφεράσης:**

Σε ddH₂O διαλύονται τα εξής: Tris 1M (τελική συγκέντρωση 20mM), MgSO₄ (2,67mM), EDTA (0,1M), DTT (33,3mM), Co-enzyme-A (270μM), luciferine (470μM) και ATP (530μM). Φυλάσσεται στους -20°C σε σκουρόχρωμο δοχείο.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10x:**

Ζυγίζονται 30.3gr Tris base και 144.00 gr γλυκίνης, τα οποία διαλύονται σε όγκο 1lt ddH₂O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος και αποθηκεύεται σε R.T.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1x:**

Αραιώνονται 100ml R.B. 10x σε 900ml dH₂O (αναλογία 1:9). Στο διάλυμα προστίθεται και SDS σε αναλογία 0.1%, δηλαδή 10ml. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10x:**

Αποτελείται από 10% Running Buffer 10x, 20% MeOH και 0.05% SDS. Ο όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη dH₂O και το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10x:**

Ζυγίζονται 2gr KCl, 2,4gr KH₂PO₄, 17,8gr Na₂HPO₄·2H₂O και 80gr NaCl, τα οποία διαλύονται σε όγκο 1lt. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε R.T.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1x:**

Αποτελείται από 10% stock buffer PBS 10x και 1% Tween-20, ο όγκος συμπληρώνεται με dH₂O και αποθηκεύεται σε R.T.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (TBS) 10x:**

Για τη δημιουργία 1lt TBS 10X ζυγίζονται 24gr Tris-base (MB 121,1) και 88gr NaCl (MB 58,4). Ακολούθως ρυθμίζεται το pH στα 7,4-7,6 με προσθήκη πυκνού HCl 12 M.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1x:**

Αποτελείται από 10% stock buffer TBS 10x και 1% Tween-20. Ο όγκος συμπληρώνεται με dH₂O και αποθηκεύεται σε R.T.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (Sodium phosphate) 0,1M pH 7,5:**

Για τη δημιουργία 100ml αναμειγνύονται 41ml Na₂HPO₄ και 9ml NaH₂PO₄ σε 50ml ddH₂O.

- **Διαλύματα για εμφάνιση σήματος:**

Παρασκευάζονται με ανάμειξη 1:3,5 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (fixer ή developer) σε dH₂O και διατηρούνται σε RT στο σκοτάδι.

- **Διάλυμα Na₂HPO₄ 0,2M:**

Για την δημιουργία 100ml διαλύονται 3,55gr Na₂HPO₄ σε ddH₂O.

- **Διάλυμα NaH₂PO₄ 0,2M:**

Για την δημιουργία 100ml διαλύονται 2,02gr NaH₂PO₄ σε ddH₂O.

- **Διάλυμα σουλφοροδαμίνης 0,4% w/v:**

Για τη δημιουργία σουλφοροδαμίνης 0,4% w/v ζυγίζουμε 0,4gr σουλφοροδαμίνη και τη διαλύουμε σε 100ml 1% οξικού οξέος.

2.2.5. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Για τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων χρησιμοποιήθηκαν τα βακτήρια Escherichia Coli στελέχους DH5a.

2.2.6. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

Για την παροδική διαμόλυνση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pMMTV-NFκB-RE-luciferase, pMMTV-GRE-luciferase και pSV40-β-gal.

2.2.7. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Για την επίτευξη της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές HeLa (human cervix adenocarcinoma), Hek293 (human embryonic kidney) και HepG2 (human hepatocellular carcinoma) που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, καθώς και η κυτταρική σειρά COS7 που διαθέτει χαμηλά ενδογενή επίπεδα GR. Τα κύτταρα HeLa είναι δύσκολα διαμολύνσιμα γι' αυτό και απαιτούν μεγαλύτερη ποσότητα λιπιδίων για τη μεταφορά του πλασμιδιακού DNA, ενώ αντίθετα τα Hek293 και COS7 διαμολύνονται εύκολα και δεν απαιτούν μεγάλες ποσότητες.

2.2.8. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαλυμένα σε PBSTx1, milk 2% και διατηρούνταν στους -20°C.

Πρωτογενή

- Anti-β-actin (Sigma), 1:5000
- Anti-GR H-300 (Santa cruz), 1:1000
- Anti-procaspase 3 (Abcam), 1:4000
- Anti-PEPCK (Santa cruz), 1:2500

Δευτερογενή

- Mouse-HRP (Pierce), 1:50.000
- Rabbit-HRP (Pierce), 1:50.000

2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂ σε θρεπτικό μέσο DMEM με phenol red με 4,5mg/ml γλυκόζη εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 1% L-γλουταμίνη σε T25 και T75 φλάσκες στον επωαστήρα. Το πάγωμα των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε FBS και DMSO σε αναλογία 9:1 σε cryovials και αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Για το στρώσιμο των κυττάρων προηγήθηκε μέτρηση σε πλακίδιο Neubauer και χρησιμοποιήθηκε DMEM χωρίς phenol red εμπλουτισμένο με 10% FBS cis από το οποίο απουσίαζαν τα στεροειδή καθώς και 1% L-γλουταμίνη.

2.3.2. ΔΟΚΙΜΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΟΥΛΦΟΡΟΔΑΜΙΝΗΣ

Αρχικά πραγματοποιήθηκε κατακρήμνιση των πρωτεϊνών των κυττάρων με 50% TCA και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 4°C. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν 4 πλύσεις με ddH₂O, και έγινε προσθήκη της σουρφολοδαμίνης 0,4%w/v διαλυμένης σε 1% οξικό οξύ σε συγκέντρωση 0,4% w/v. Ακολούθησε επώαση του plate για 30 λεπτά στο σκοτάδι κι έπειτα έγιναν 4 πλύσεις με 1% οξικό οξύ. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη Tris-base 10mM και επώαση για 10 λεπτά στους 37°C. Τέλος, μετά από ανάδευση του plate στο shaker πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 540 nm, στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής Σχολής Λάρισας.

2.3.3. ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Αρχικά, έγινε λύση του κυτταρικού ιζήματος με προσθήκη lysis buffer και έπειτα τα κύτταρα επώαστηκαν για 20-25 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια, ακολούθησε η διαδικασία της λύσης με χρήση υπερήχων (sonication), επαναλαμβάνοντας 5 κύκλους έκθεσης ενός δευτερολέπτου με 35 δευτερόλεπτα μεσοδιάστημα σε 40% ένταση.

2.3.4. ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD

Η μέθοδος Bradford έχει βασική αρχή την αλλαγή της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία υπό όξινες συνθήκες, μπορεί από την καφέ-κόκκινη να μετατραπεί στη μπλε μορφή της, προσδεδεμένη με της πρωτεΐνες που εμπριέχονται στο υπό εξέταση διάλυμα. Το διάλυμα Bradford αραιώθηκε από το 5X (stock) στο 1X και χρησιμοποιήθηκε σε τελική αραιώση 1:1000, δηλαδή 1 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε 1 ml αντιδραστήριου 1X. Τα δείγματα παρέμειναν για 20 λεπτά στο σκοτάδι και φωτομετρήθηκαν στα 595nm. Η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος υπολογίστηκε από τον τύπο $y=0,0345x+0,01$, που προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA, που έγινε στο εργαστήριο.

2.3.5. SDS-PAGE

Τα δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν αποτελούνταν από πρωτεϊνικό εκχύλισμα, το οποίο υπολογίστηκε με τη μέθοδο της Bradford, Tris 20 mM και sample buffer 4X. Πριν την ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε θέρμανση των δειγμάτων για 3-5 λεπτά

στους 95°C και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 0,02 A. Για τον εντοπισμό μεγαλομοριακών μορίων χρησιμοποιήθηκε πηκτική ακρυλαμιδίου 10%, ενώ για τα μικρομοριακά 12%. Η σύσταση του gel προσκόλλησης (stalking) και διαχωρισμού (separating) ήταν η εξής:

Separating gel			Stalking gel	
	10%	12%		4%
ddH ₂ O	2,425 ml	2,175 ml	ddH ₂ O	2,025 ml
Tris HCl pH= 8,8 1,5M	1,25 ml	1,25 ml	Tris HCl pH= 6,8	0,21 ml
SDS 10%	50 μlt	50 μlt	SDS 10%	25 μlt
Bis Acr.40%	1,25 ml	1,5 ml	Bis Acr.40%	0,25 ml
Temed	2,5 μlt	2,5 μlt	Temed	2,5 μlt
APS 10%	25 μlt	25 μlt	APS 10%	12,5 μlt

2.3.6. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΗΣ WESTERN

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε μεταφορά των δειγμάτων σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης 0,2 μM ή 0,45μM διαμέτρου πόρων, υπό την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής τάσης 0,35 A για 70 λεπτά σε πάγο, σε διάλυμα transfer buffer. Μετά το πέρας της μεταφοράς ακολούθησε επώαση της μεμβράνης με διάλυμα blocking 10% w/v αποβουτυρωμένου γάλακτος σκόνης σε PBST 1X, για 1 ώρα υπό ανάδευση σε RT. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα στους 4°C overnight κι έπειτα ακολούθησαν 5 πλύσεις των 5 λεπτών υπό ανάδευση με PBST1X. Κατόπιν έγινε επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα σε RT, ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με PBST 1X και ακολούθησε η προσθήκη του υποστρώματος ECL A+B σε ίση αναλογία. Τέλος, η μεμβράνη εκτέθηκε σε φιλμ σε ειδική κασετίνα στο σκοτάδι και ακολούθησε μονιμοποίηση του φιλμ στα διαλύματα developer και fixer για 1 λεπτό στο καθένα.

2.3.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ

Για την επίτευξη ημιστείρων συνθηκών, η συγκεκριμένη διαδικασία έγινε στον πάγκο του εργαστηρίου παρουσία αναμένου λύχνου. Αρχικά, δεκτικά κύτταρα E.coli DH5a μετασχηματίστηκαν με τη μέθοδο του θερμικού σοκ. Τα συγκεκριμένα κύτταρα βρίσκονταν αποθηκευμένα σε 30-40% γλυκερόλη στους -80°C. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 1μlt του επιθυμητού πλασμιδίου σε 80 μlt κυττάρων E.coli. Ακολούθησε επώαση στους 4°C για 30 λεπτά και στη συνέχεια στους 42°C για 1 λεπτό. Έπειτα,

πραγματοποιήθηκε επώαση για 2 λεπτά στους 4°C και προσθήκη 1ml αποστειρωμένου LB Broth. Ακολούθησε επώαση της 37°C για 1 ώρα και κατόπιν έγινε επίστρωση 1/500 του αρχικού όγκου σε τρυβλίο, το οποίο περιείχε αντιβιοτικό, αμπικιλίνη ή καναμυκίνη, σε συγκέντρωση 100mg/ml ή 50mg/ml, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, έγινε διασπορά των κυττάρων στο τρυβλίο, κι έπειτα επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες. Μετά το πέρας των 16 ωρών έγινε απομόνωση και καθαρισμός των πλασμιδίων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της QIAGEN, κάνοντας χρήση του plasmid mini kit. Ο έλεγχος της καθαρότητας καθώς και η ποσοτικοποίηση του pDNA έγινε με φωτομέτρηση (UV/Vis) σε αραιώση 1/200. Τέλος, τα πλασμίδια αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

2.3.8. ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η παροδική διαμόλυνση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό OPTIMEM και η συγκέντρωση των πλασμιδιακών φορέων ήταν 0,15μg/well. Η μεταφορά των πλασμιδιακών φορέων στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση λιποσωμάτων, και πιο συγκεκριμένα λιποφεκταμίνης, σε αναλογία 0,35/1 έως 1/1 μlt λιποφεκταμίνης / μg DNA, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Τα κύτταρα επωάστηκαν 4 ώρες με το mix της διαμόλυνσης και μετά το πέρας των 4 ωρών ακολούθησε αφαίρεση του OPTIMEM και προσθήκη DMEM χωρίς phenol red απουσία στεροειδών.

2.3.9. ΔΟΚΙΜΗ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ

Αρχικά, αφαιρέθηκε το θρεπτικό των κυττάρων και έγινε προσθήκη 70μl lysis buffer, το οποίο παρέμεινε στα κύτταρα για 30 λεπτά υπό ανάδευση στους 4°C. Ακολούθησε συλλογή του κυτταρολύματος μετά από ελαφρά απόξυση και φυγοκέντριση στα 13.000rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντριση έγινε συλλογή του υπερκείμενου και διατήρηση στους -80°C για αποθήκευση. Για τη μέτρηση της λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκαν 10μl κυτταρικού εκχυλίσματος και 100μl από το mix του αντιδραστηρίου της λουσιφεράσης και η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στο λουμινόμετρο σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού.

2.3.10. ΔΟΚΙΜΗ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ

Για μέτρηση της β-γαλακτοσιδάσης χρησιμοποιήθηκαν 20μl κυτταρικού εκχυλίσματος, 200μl από το mix της β-gal και 66μl ONPG, που αποτελεί το υπόστρωμα του ενζύμου. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 37°C μέχρι να αποκτήσουν ένα υποκίτρινο χρώμα, έπειτα έγινε stop της αντίδρασης με 500μl Na₂CO₃ και vortex και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 420nm. Η σύσταση του mix της β-γαλακτοσιδάσης ήταν η εξής:

mix1		mix β-γαλακτοσιδάσης	
ddH ₂ O	58,5 μl	Sodium phosphate	201 μl/δείγμα
β-μερκαπτοαιθανόλη	31,5 μl	mix 1	3 μl/δείγμα

Mg ₂ SO ₄	10 μlt		
---------------------------------	--------	--	--

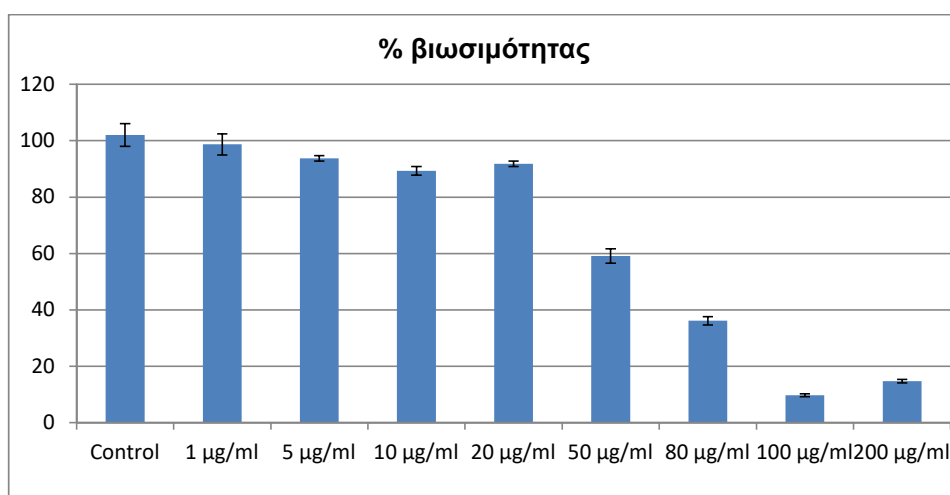
2.3.11. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Για την ποσοτικοποίηση των ζωνών από τα φιλμ της ανοσοαποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ, αφού πρώτα προηγήθηκε σάρωση των φιλμ σε κλίμακα του γκρι (grayscale) στα 300dpi και αποθήκευση σε αρχείο TIFF. Έπειτα η δημιουργία των τελικών εικόνων έγινε με το πρόγραμμα Photoshop CS4. Τα αποτελέσματα της μεθόδου της λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm STDEV (n=3-6), ενώ η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με ανεξάρτητο TTEST, θεωρώντας ως στατιστικά σημαντικές τις τιμές p-value <0,05.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου, σε κύτταρα HeLa, με σκοπό τον εντοπισμό του εύρους των ασφαλών μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού εφαρμόστηκε η δοκιμή της σουλφοροδαμίνης και η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε 96-well plate reader, στο εργαστήριο φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής Σχολής Θεσσαλίας. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται το ποσοστό της βιωσιμότητας των κυττάρων παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων (1μg/ml-200μg/ml) του εκχυλίσματος και η κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων.



Σχήμα 1

Έλεγχος κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου σε κύτταρα HeLa με τη δοκιμή της σουλφοροδαμίνης.

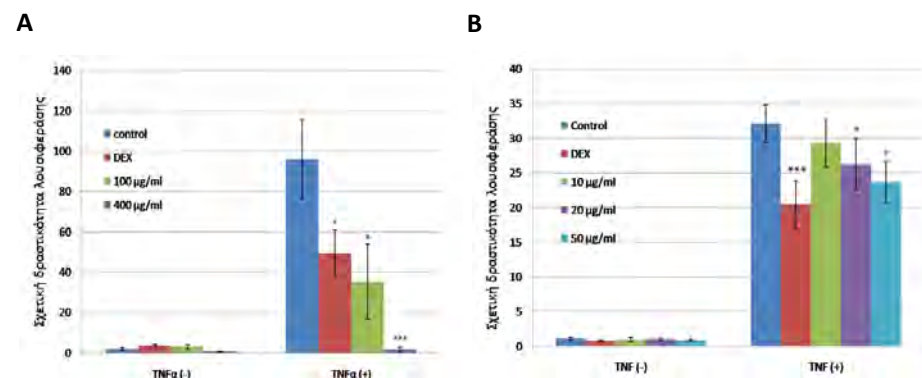
Κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν σε 96-well plate (8.000 cells/well), κι έπειτα τα κύτταρα επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος Μαστίχας Χίου για 48 ώρες, ενώ τα κύτταρα control επώαστηκαν με την αντίστοιχη ποσότητα DMSO. Ακολούθησε μέτρηση της κυτταροτοξικότητας και έκφραση των αποτελεσμάτων ως επί τοις εκατό βιωσιμότητα, όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα.

Παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου προκάλεσε μια δοσοεξαρτώμενη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων HeLa, σε ποσοστό έως και 90% στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 200 µg/ml. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 20 µg/ml προκλήθηκε λιγότερο από 10% κυτταροτοξικότητα.

3.2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ

3.2.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ NF-κβ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK293

Στη συνέχεια, ακολούθησε μέτρηση της επίδρασης του εκχυλίσματος της μαστίχας Χίου στη μεταγραφική ενεργότητα του παράγοντα φλεγμονής NF-κβ, με σκοπό τη διερεύνηση της αντιφλεγμονώδους δράσης του εκχυλίσματος. Για το σκοπό αυτό, κατά την παροδική διαμόλυνση κυττάρων Hek293, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pMMTV-NFκβ-RE-luc, οποίος περιέχει τα στοιχεία απόκρισης του NF-κβ (NF-κβ response elements, NF-κβ-REs), στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της λουσιφεράσης, ώστε η σύνδεση του NF-κβ σ' αυτά να ελέγχει την έκφρασή της. Τα κύτταρα επώαστηκαν απουσία και παρουσία TNFα, ενός ενεργοποιητή του NFκβ που επάγει φλεγμονή.



Σχήμα 2

Μέτρηση της επίδρασης του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου στη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κβ με τη μέθοδο της λουσιφεράσης, σε κύτταρα Hek293.

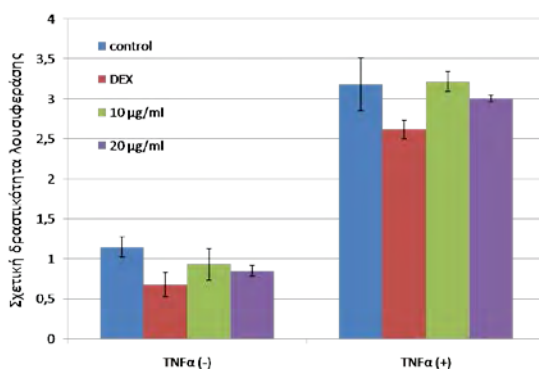
Κύτταρα Hek293 αναπτύχθηκαν σε 24-well plate (60.000 cells/well), και πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση αυτών με τους πλασμιδιακούς φορείς

pMMTV-NFκB-RE-luciferase και pSV40-β-gal, κατόπιν 24^h επώασης τους σε καλλιεργητικό μέσο απουσία ορμονών. Την τέταρτη μέρα έγινε προσθήκη του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου, απουσία και παρουσία TNFα σε τελική συγκέντρωση 10 ng/ml. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη (DEX) σε τελική συγκέντρωση 10⁻⁶M. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 6 ώρες και ακολούθησε η συλλογή και η μέτρησή της δραστηριότητας λουσιφεράσης κανονικοποιημένη ως προς την δραστηριότητα β-γαλακτοσιδάσης, εκφρασμένη ως σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης. Στο σχήμα απεικονίζεται η επίδραση του εκχυλίσματος σε μεγάλες συγκεντρώσεις, 100 και 400 μg/ml (A), καθώς και σε μικρότερες συγκεντρώσεις, 10-50 μg/ml (B). καθώς και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκρινόμενες με τις αντίστοιχες συνθήκες αναφοράς *P<0,05, ***P<0,001 n=3 (A), n=3-6 (B).

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, ο TNFα προκάλεσε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κβ, σε GR θετικά κύτταρα Hek293, γεγονός αναμενόμενο καθώς αποτελεί ενεργοποιητή του. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου προκάλεσε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κβ, στις μεγάλες συγκεντρώσεις των 100 και 400 μg/ml, σε ποσοστό 60% και 90%, αντίστοιχα. Αντίστοιχες συγκεντρώσεις (100-200 μg/ml), σύμφωνα με τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας, προκαλούν μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά 90-95% περίπου. Σε συγκεντρώσεις από 10-50 μg/ml, οι οποίες παρουσιάζουν κυτταροτοξικότητα από (10-40%) το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου προκάλεσε 10-30% μείωση της επαγόμενης από TNFα μεταγραφικής ενεργότητας του παράγοντα φλεγμονής NF-κβ, υποδεικνύοντας την αντιφλεγμονώδη δράση του.

3.2.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ NF-κβ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ COS7

Η μελέτη της διερεύνησης της πιθανής αντιφλεγμονώδους δράσης του εκχυλίσματος μαστίχας επαναλήφθηκε σε κύτταρα COS7, τα οποία εκφράζουν χαμηλά επίπεδα ενδογενούς GR, με σκοπό να διερευνηθεί κατά πόσο η αντιφλεγμονώδης δράση του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου επιτελείται μέσω της σηματοδότησης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.



Σχήμα 3

Διερεύνηση της επίδρασης του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου στη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κβ, σε κύτταρα COS7.

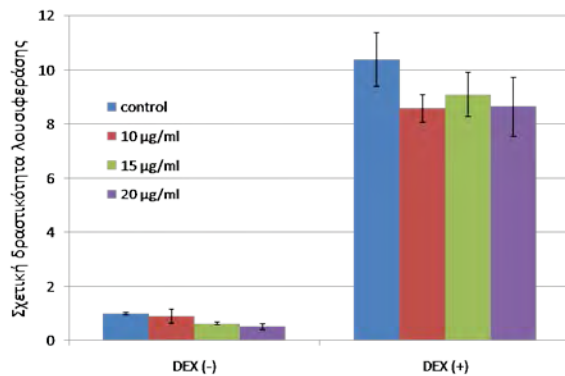
Κύτταρα COS7 αναπτύχθηκαν σε 24-well plate (35.000 cells/well) και πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση αυτών με τους πλασμιδιακούς φορείς pMMTV-NFκB-RE-luciferase και pSV40-β-gal, κατόπιν 24^{ης} επώασης τους σε καλλιεργητικό μέσο απουσία ορμονών. Την τέταρτη μέρα έγινε προσθήκη του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου, απουσία και παρουσία TNFα σε τελική συγκέντρωση 10ng/ml. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη (DEX) σε τελική συγκέντρωση 10⁻⁶M. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 6 ώρες και ακολούθησε η συλλογή και η μέτρησή της δραστηριότητας λουσιφεράσης κανονικοποιημένη ως προς την δραστηριότητα β-γαλακτοσιδάσης, εκφρασμένη ως σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης.

Παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου, σε συγκεντρώσεις 10 και 20 μg/ml δεν προκάλεσε μείωση της επαγόμενης από TNFα μεταγραφικής ενεργότητας του παράγοντα φλεγμονής NF-κβ στα κύτταρα COS7, τα οποία εκφράζουν τον GR σε χαμηλά επίπεδα, υποδηλώνοντας ότι η παρατηρούμενη αντιφλεγμονώδης δράση τους σε κύτταρα Hek293 επιτελείται, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω της ρύθμισης της ανοσοκατασταλτικής δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και με βάση τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με το ανεξάρτητο TTEST, όπου σε όλες τις συγκεντρώσεις το p-value προέκυψε μεγαλύτερο του 0,05, συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς.

3.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ GR

3.3.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ GR

Στη συνέχεια, ακολούθησε προσδιορισμός της επίδρασης του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου στη μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa, με πλασμιδιακό φορέα pMMTV-GRE-luc, ο οποίος περιέχει στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoid response elements, GREs), στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της λουσιφεράσης, ώστε η σύνδεση του GR σ' αυτά να ελέγχει την έκφρασή της καθώς και με πλασμιδιακό φορέα pSV40-β-gal για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης και την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Τα κύτταρα επώαστηκαν απουσία και παρουσία δεξαμεθαζόνης (DEX), που αποτελεί συνθετικό αγωνιστή του GR, προκαλώντας την πυρηνική του μετατόπιση και την έναρξη της μεταγραφής, καθώς και με εκχύλισμα Μαστίχας σε εύρος συγκεντρώσεων 10-20μg/ml.



Σχήμα 4

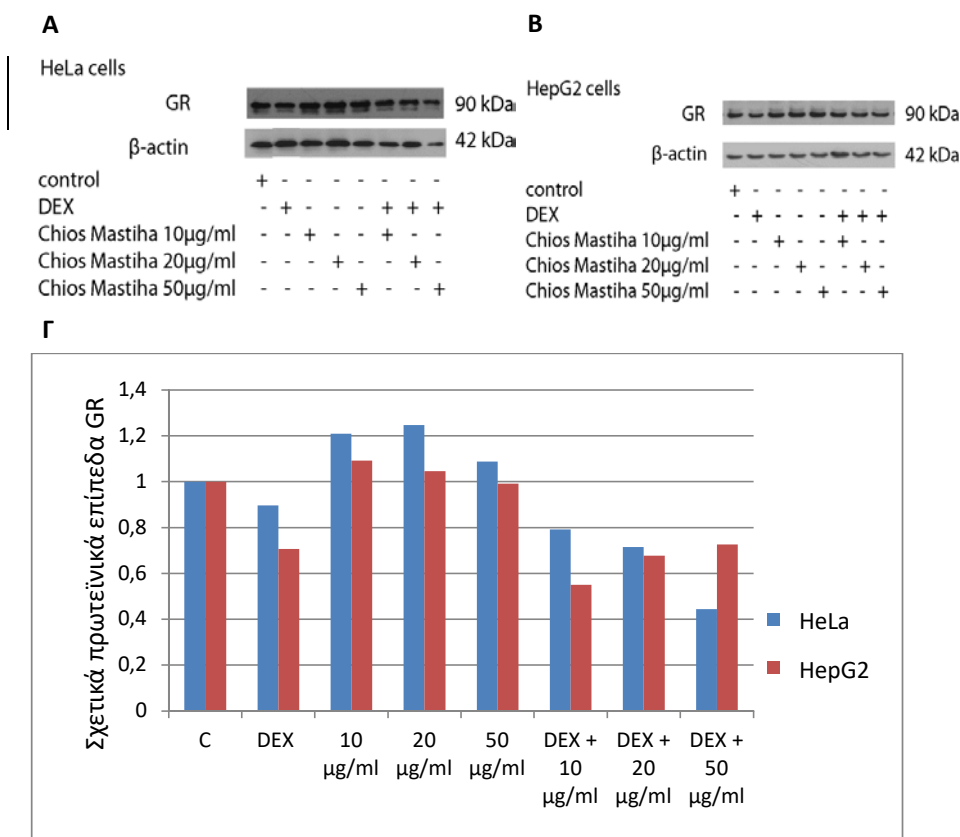
Μέτρηση της επίδρασης του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου στη μεταγραφική ενεργότητα του GR με τη μέθοδο της λουσιφεράσης σε κύτταρα HeLa.

Κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν σε 24-well plate (60.000 cells/well), και πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση αυτών με τους πλασμιδιακούς φορείς pMMTV-GRE-luciferase και pSV40-β-gal, κατόπιν 24^h επώασης τους σε καλλιεργητικό μέσο απουσία ορμονών. Την τέταρτη μέρα έγινε προσθήκη του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου, απουσία και παρουσία TNFα σε τελική συγκέντρωση 10ng/ml. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη (DEX) σε τελική συγκέντρωση 10⁻⁷M. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 6 ώρες και ακολούθησε η συλλογή και η μέτρησή της ενζυμικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης, κανονικοποιημένη ως προς την δραστηριότητα β-γαλακτοσιδάσης, εκφρασμένη ως σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα η δεξαμεθαζόνη προκάλεσε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του GR, όπως και αναμένονταν καθότι η DEX αποτελεί αγωνιστή του GR. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην μεταγραφική ενεργότητα του GR, τόσο σε κύτταρα που επώαστηκαν με DEX, η οποία επάγει τη μεταγραφική ενεργότητα του GR, όσο και σε ανερέθιστα κύτταρα.

3.3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ GR

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα GR. Για το σκοπό, εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, τόσο σε κύτταρα HeLa, όσο και σε κύτταρα HepG2 και πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης του GR, παρουσία των εκχυλισμάτων με ή χωρίς DEX, σε σχέση με τα κύτταρα control. Παράλληλα αξιολογήθηκαν τα επίπεδα β-ακτίνης, για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.



Σχήμα 5

Προσδιορισμός της επίδρασης του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR με ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

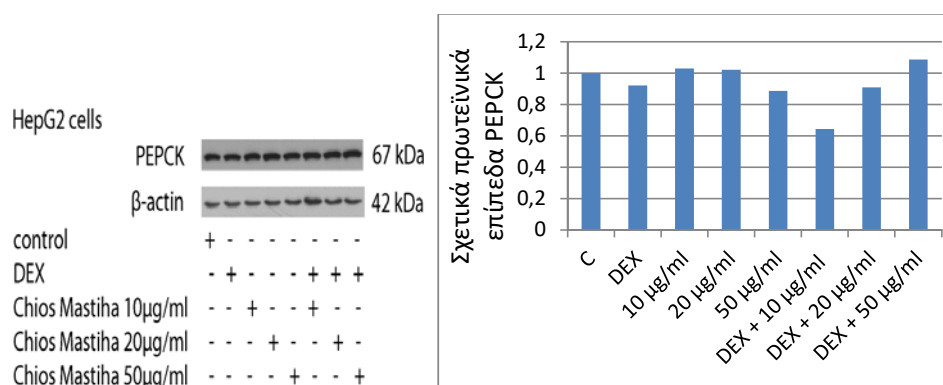
Κύτταρα HeLa και HepG2 αναπτύχθηκαν σε 6-well plate (120.000 HeLa cells/well, 300.000 HepG2 cells/well) για 48 ώρες σε καλλιεργητικό μέσο απουσία ορμονών. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη του εκχυλίσματος μαστίχας, απουσία και παρουσία DEX, σε συγκεντρώσεις όπως υποδεικνύεται στο σχήμα και τα κύτταρα επώαστηκαν για άλλες 48 ώρες.

Στο σχήμα απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες του GR και της β-ακτίνης σε κύτταρα HeLa (A) και HepG2 (B). Ακολουθεί το διάγραμμα με τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, μετά από κανονικοποίηση με τη β-ακτίνη (Γ).

Παρατηρήθηκε, ότι τόσο σε κύτταρα HeLa όσο και σε κύτταρα HepG2, το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου τείνει να προκαλέσει μικρή αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR. Η δράση αυτή είναι πιο εμφανής στα κύτταρα HeLa και αναιρείται παρουσία δεξαμεθαζόνης, η οποία προκαλεί μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, τόσο σε κύτταρα HeLa, όσο και σε κύτταρα HepG2.

3.3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ ΡΕΡΣΚ

Επίσης, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπιρροσταφυλικού (PEPCK), ενός γλυκονεογενετικού ενζύμου και γονιδίου στόχου του GR, προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσο επηρεάζει και τις γλυκονεογενετικές δράσεις του GR. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε κύτταρα HepG2, τα οποία επωάστηκαν με το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου, απουσία και απουσία DEX.



Σχήμα 6

Προσδιορισμός της επίδρασης του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της ΡΕΡΣΚ με ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

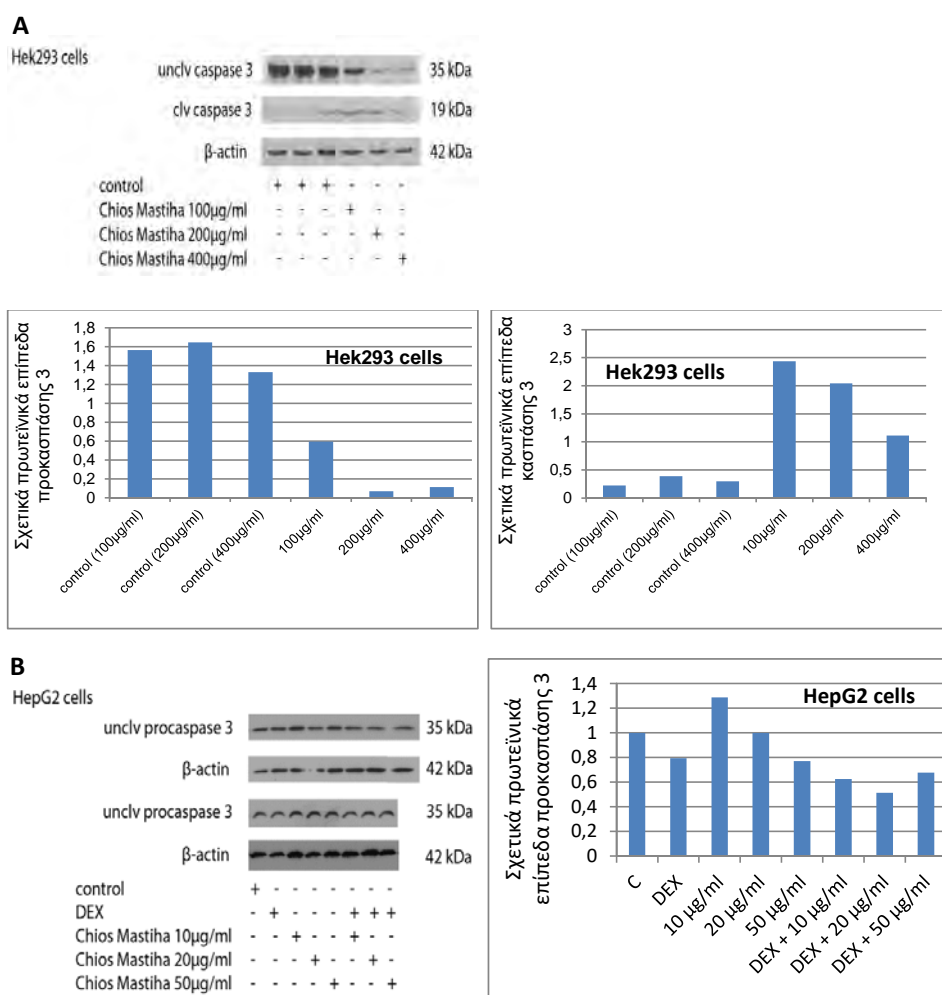
Κύτταρα HepG2 (300.000 cells/well) αναπτύχθηκαν σε 6-well plate για 48 ώρες. Έπειτα, έγινε προσθήκη του εκχυλίσματος απουσία και παρουσία DEX και τα κύτταρα επωάστηκαν για επιπλέον 48 ώρες. Με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έγινε εντοπισμός της ΡΕΡΣΚ καθώς και της β-ακτίνης. Τέλος, έγινε ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών με το πρόγραμμα ImageJ και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Αριστερά απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες της ΡΕΡΣΚ και της β-ακτίνης, και δεξιά το διάγραμμα με τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της ΡΕΡΣΚ, μετά την κανονικοποίηση με τη β-ακτίνη.

Παρατηρήθηκε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ΡΕΡΣΚ, παρουσία του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου παραμένουν στα ίδια επίπεδα με τα κύτταρα αναφοράς σε συγκεντρώσεις 10 και 20 μg/ml. Μικρή μείωση παρατηρείται σε συγκέντρωση 50 μg/ml, υποδηλώνοντας ότι το εκχύλισμα πιθανόν να καταστέλλει τη σύνθεση του γλυκονεογενετικού ενζύμου ΡΕΡΣΚ, πιθανόν μέσω περιορισμένης αρνητικής ρύθμισης της μεταγραφικής ενεργότητας του GR. Η συγχορήγηση δεξαμεθαζόνης και εκχυλίσματος προκαλεί περαιτέρω μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της ΡΕΡΣΚ, αναιρώντας περαιτέρω τις γλυκονεογενετικές δράσεις της DEX.

3.4. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ

Τέλος, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της αποπτωτικής δράσης του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western, των επιπέδων της προαποπτωτικής πρωτεΐνης προκασπάσης 3 (uncleaved, μη πρωτεολυμένη) καθώς και της εκτελεστικής κασπάσης 3 (cleaved, πρωτεολυμένη), η οποία αποτελεί το τελικό ενεργοποιητή της έναρξης του αποπτωτικού μονοπατιού. Η μελέτη έγινε σε κύτταρα Hek293 και HepG2.



Σχήμα 7

Διερεύνηση της αποπτωτικής δράσης του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου σε κύτταρα Hek293 και HepG2 με ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Κύτταρα Hek293 και HepG2 αναπτύχθηκαν σε 6-well plate (120.000 Hek293 cells/well και 300.000 HepG2 cells/well) και τα κύτταρα αφήθηκαν να αναπτυχθούν για 48 ώρες σε καλλιεργητικό μέσο απουσία ορμονών. Έπειτα, έγινε προσθήκη του εκχυλίσματος απουσία και παρουσία DEX και τα κύτταρα επώαστηκαν για άλλες 48

ώρες. Με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έγινε εντοπισμός της προκασπάσης 3, της κασπάσης 3 καθώς και της β-ακτίνης.

Στο σχήμα απεικονίζονται οι ζώνες της προκασπάσης 3 και της κασπάσης 3 στα κύτταρα Hek293, καθώς και τα σχετικά επίπεδα έκφρασης, όπως προέκυψαν από την κανονικοποίηση με τη β-ακτίνη (A), καθώς και της προκασπάσης 3 στα κύτταρα HepG2 (B).

Παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου προκάλεσε επαγωγή της απόπτωσης, μέσω μείωσης των επιπέδων της προκασπάσης 3 και αύξηση της ενεργής κασπάσης 3, σε συγκεντρώσεις από 100-400μg/ml, σε κύτταρα Hek293. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με παρατηρήσεις μας κατά την διερεύνηση της κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος, δεδομένου ότι οι συγκεντρώσεις αυτές αποδείχθηκαν κυτταροτοξικές και μάλιστα το ποσοστό μείωσης της βιωσιμότητας που προέκυψε από την ανάλυση της SRB συμπίπτει με το ποσοστό μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης 3 από την ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western (περίπου 60-90%). Γι' αυτό το λόγο, ελέγχθηκαν στη συνέχεια μικρότερες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (10-50μg/ml) σε κύτταρα HepG2. Από αυτά, παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου σε συγκεντρώσεις 10-50μg/ml προκάλεσε μικρότερη μείωση της προκασπάσης 3, από 0-20%, ενώ παρουσία DEX η δράση αυτή είναι αθροιστική και φτάνει το 40-50%.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη σύγχρονη εποχή, όλο και περισσότερα αποτελέσματα ερευνών αποκαλύπτουν συνεχώς τις ευεργετικές δράσεις της Μαστίχας Χίου που είχαν αναφερθεί ακόμα από την αρχαιότητα. Αποδεικνύεται πλέον επιστημονικά ότι η Μαστίχα Χίου παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, υπογλυκαιμικές δράσεις, τόσο από *in vitro* και *in vivo* μελέτες όσο και από κλινικές δοκιμές. (Dimas *et al.* 2012, Balan KV *et al.* 2005, 2007, Georgiadis *et al.*, 2013)

Τα ευεργετικά οφέλη της Μαστίχας Χίου που έχουν έρθει στο φως από επιστημονικές μελέτες αποδίδονται στη μεγάλη ποικιλία των συστατικών που περιέχονται στο εκχύλισμά της. Η σύνθεση του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου έχει αναλυθεί αρκετά και έχει αποδειχθεί ότι αποτελείται στο μεγαλύτερο ποσοστό της από τριτερπένια, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις έχουν εντοπιστεί και φυτοστερόλες, πολυφαινολικά μόρια, φυσικά πολυμερή και πολλά ακόμη. (Loizou *et al.*, 2009, Georgiadis *et al.*, 2014, Spyridoroulou *et al.*, 2017)

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια τα τριτερπένια έχουν μελετηθεί αρκετά ως εν δυνάμει τροποποιητές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, λόγω των πολλών δομικών ομοιοτήτων που εμφανίζουν με τα γλυκοκορτικοειδή (Georgatza *et al.*, 2016). Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν στεροειδείς ορμόνες λιποειδικής φύσεως που διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και συνδέονται με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, τον οποίο ενεργοποιούν και μέσω του οποίου ασκούν τις δράσεις τους. Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή χορηγούνται ως γνωστό για την

καταπολέμηση χρόνιων φλεγμονωδών νόσων καθώς και αιματολογικών καρκίνων, αλλά η μακροχρόνια χρήση τους οδηγεί σε σοβαρές παρενέργειες, όπως οστεοπόρωση, μυϊκή αδυναμία και διαβήτη τύπου II (Kadmiel M. *et al.*, 2013, Oakley R. H. *et al.*, 2013, Psarra 2005, Psarra and Sekeris, 2008, 2009, 2011). Για το λόγο αυτό κρίνεται αναγκαία η εύρεση νέων αντικαταστατών τους που θα ενεργοποιούν τις ευεργετικές δράσεις της σηματοδότησης των γλυκοκορτικοειδών και θα παρεμποδίζουν την εκδήλωση των παρενεργειών τους (Georgatza *et al.*, 2016).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των βιολογικών ευεργετικών δράσεων του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου και πιο συγκεκριμένα, η διερεύνηση της αντιφλεγμονώδους, υπογλυκαιμικής και αποπρωτικής τους δράσης, καθώς και των μηχανισμών μέσω των οποίων επιτελούνται. Απώτερος, στόχος ήταν η διερεύνηση του κατά πόσο το εκχύλισμα της Μαστίχας ασκεί αντιφλεγμονώδεις και υπογλυκαιμικές δράσεις, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω ρύθμισης της δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και συγκεκριμένα μέσω εκλεκτικής ενεργοποίησης των ευεργετικών αντιφλεγμονωδών δράσεων του υποδοχέα και καταστολής των υπεργλυκαιμικών του δράσεων

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου σε κύτταρα HeLa, από όπου φάνηκε ότι το εκχύλισμα σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 20μg/ml προκαλεί λιγότερο από 10% κυτταροτοξικότητα, ενώ συγκεντρώσεις από 50μg/ml έως 200 μg/ml προκαλούν από 40-90% κυτταροτοξικότητα. Στη συνέχεια, εφαρμόζοντας τη μέθοδο της λουσιφεράσης, αποδείχθηκε ότι το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου εμφανίζει αντιφλεγμονώδη δράση, μέσω καταστολής της από TNFα-επαγόμενης μεταγραφικής δραστηριότητας του παράγοντα φλεγμονής NF-κβ, σε κύτταρα Hek293 τα οποία εκφράζουν σημαντικά επίπεδα GR. Το εκχύλισμα σε συγκεντρώσεις 100-400μg/ml προκάλεσε 40-90% μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κβ, ενώ σε μικρότερες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις 10-50μg/ml η μείωση που παρατηρήθηκε ήταν 10-30%. Να σημειωθεί ότι ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών ασκεί τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις του μέσω σύνδεσης με τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κβ και καταστέλλοντας, έπειτα, την έκφραση γονιδίων φλεγμονής, όπως χημειοκίνες και κυτταροκίνες (Psarra & Sekeris, 2008). Ωστόσο, πραγματοποιώντας το ίδιο πείραμα με τη μέθοδο της λουσιφεράσης σε κύτταρα COS7, τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα GR, δεν παρατηρήθηκε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κβ, υποδηλώνοντας ότι η άσκηση της αντιφλεγμονώδους δράσης του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου επιτελείται, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω της GR σηματοδότησης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου στη μεταγραφική ενεργότητα του ίδιου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, από όπου φάνηκε ότι το εκχύλισμα δεν προκαλεί στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην μεταγραφική ενεργότητα του GR, σε συγκεντρώσεις από 10-20μg/ml. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από τη μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase), ενός γλυκονογενετικού ενζύμου και

γονίδιο που αποτελεί άμεσο στόχο της σηματοδότησης του GR, σε κύτταρα HepG2, τα οποία χαρακτηρίζονται ως υψηλά μεταβολικά, ιδιαίτερα όσο αφορά τη σύνθεση γλυκόζης (Phuc Le *et al*, 2005). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK παρουσία του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου, παρουσίασαν μια δοσοεξαρτώμενη μικρή μείωση, υποδηλώνοντας την καταστολή των γλυκονογενετικών δράσεων του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Επίσης, μελετήθηκαν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR παρουσία του εκχυλίσματος, από όπου προέκυψε ότι το εκχύλισμα προκαλεί μικρή αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων τόσο σε κύτταρα HeLa όσο και σε κύτταρα HepG2, ενώ παρουσία DEX η αύξηση αυτή αναστέλλεται και τα επίπεδα του GR μειώνονται. Από αυτό, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου, ενώ αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, δεν επάγει τη μεταγραφική του ενεργότητα πιθανώς ενισχύοντας το μονοπάτι της έμμεσης ρύθμισης της μεταγραφής, στο οποίο ο GR συνδέεται σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο NF-κβ, και είτε καταστέλλει είτε ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων που ελέγχουν.

Τέλος, μέσα από τη μελέτη της αποπτωτικής δράσης του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου, αποδείχθηκε ότι το εκχύλισμα επάγει την απόπτωση όπως υποδεικνύεται από τη μείωση της προαποπτωτικής προκασπάσης 3 και αύξηση της εκτελεστικής κασπάσης 3 σε κύτταρα Hek293, σε συγκεντρώσεις 100-400μg/ml. Ωστόσο, η μείωση της προκασπάσης 3 είναι μικρότερη σε μικρότερες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (10-50μg/ml) σε κύτταρα HepG2.

Από τα αποτελέσματά μας, στο σύνολό τους έχει καταστεί σαφές ότι το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου εμφανίζει αντιφλεγμονώδη, υπογλυκαιμική και αποπτωτική δράση, ρυθμίζοντας μεταξύ άλλων και τη σηματοδότηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, και πιο συγκεκριμένα, ενισχύοντας τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις του και καταστέλλοντας την επαγωγή των υπεργλυκαιμικών του δράσεων. Για το λόγο αυτό, το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου θα μπορούσε μελλοντικά να αξιοποιηθεί ως ένα εν δυνάμει φάρμακο και ως πιθανός τροποποιητής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών για την καταπολέμηση φλεγμονωδών νοσημάτων και καρκίνου, με όσο το δυνατόν λιγότερες πιθανές παρενέργειες, μέσω εκλεκτικής ενεργοποίησης της σηματοδότησής του.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Balan KV, Demetzos C, Prince J, Dimas K, Cladaras M, Zhiyong Han, Wyche JH, Pantazis P, (2005), "Induction of Apoptosis in Human Colon Cancer HCT116 Cells Treated with an Extract of the Plant Product, Chios Mastic Gum", *In vivo* 19: 93-102
2. Balan KV, Prince J, Han J, Dimas K, Cladaras M, Wyche JH, Sitaras NM, Pantazis P, (2007), "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", *ELSEVIER Phytomedicine* 14, 263 – 272
3. Dimas K, Pantazis P, Ramanujam R, (2012), "Chios Mastic Gum: A Plant-produced Resin Exhibiting Numerous Diverse Pharmaceutical and Biomedical Properties", *In vivo* 26: 777-786
4. Georgatza D, Gorgogietas VA, Kylandri P, Charalambous MC, Papadopoulou KK, Hayes JM, Psarra AM, (2016), "The triterpene echinocystic acid and its 3-O-glucoside derivative are revealed as potent and selective glucocorticoid receptor agonists", *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology, Vol 79, 277-287*
5. Georgiadis I, Karatzas T, Korou LM, Katsilambros N, Perrea D, (2014), "Beneficial Health Effects of Chios Gum Mastic and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Indications of Common Mechanisms", *Journal Of Medicinal Food, J Med Food, 1–10*
6. Georgiadis I, Karatzas T, Korou LM, Agrogiannis G, Vlachos IS, Pantopoulou A, Tzanetakou IP, Katsilambros N, Perrea DN, (2013), "Evaluation of Chios Mastic Gum on Lipid and Glucose Metabolism in Diabetic Mice", *Journal Of Medicinal Food J Med Food, 1–7*
7. Gruver-Yates A and Cidlowski J, (2013), "Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword", *Cells, 2, 202-223*
8. Kadmiel M and Cidlowski J, (2013), "Glucocorticoid receptor signaling in health and disease", *Trends Pharmacol Sci., 34(9): 518–530*
9. Loizou S, Paraschos S, Mitakou S, Chrousos GP, Lekakis I, Moutsatsou P, (2009) "Chios Mastic Gum Extract and Isolated Phytosterol Tirucallol Exhibit Anti-Inflammatory Activity in Human Aortic Endothelial Cells", *Experimental Biology and Medicine* 234: 553
10. Louie M and Sevigny M, (2017), "Steroid hormone receptors as prognostic markers in breast cancer", *American Journal Of Cancer Research, 7(8): 1617-1636*
11. Loutrari H, Magkouta S, Pyriochou A, Koika V, Kolisis FN, Papapetropoulos A, Roussos C, (2006), "Mastic Oil from Pistacia lentiscus var. chia Inhibits Growth and Survival of Human K562 Leukemia Cells and Attenuates Angiogenesis", *Nutrition and Cancer, 55:1, 86-93*
12. Magkouta S, Stathopoulos GT, Psallidas I, Papapetropoulos A, Kolisis FN, Roussos C, Loutrari H, (2009), "Protective Effects of Mastic Oil From Pistacia

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Αλλαγή κωδικού πεδίου

- Lentiscus Variation Chia Against Experimental Growth of Lewis Lung Carcinoma”, *Nutrition and Cancer*, 61:5, 640-648
13. Nicolaides N, Galata Z, Tomoshige Kino, Chrousos G, and Charmandari E, (2010), “The Human Glucocorticoid Receptor: Molecular Basis of Biologic Function”, *NIH Steroids*, Vol. 75, No. 1Oakley R and Cidlowski J, (2013), “The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease”, *NIH J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 132, No. 5, pp. 1033-1044
 14. Phillip Phuc Le, Joshua R. Friedman, Jonathan Schug, John E. Brestelli, J. Brandon Parker, Irina M. Bochkis, Klaus H. Kaestner, (2005), “Glucocorticoid Receptor-Dependent Gene Regulatory Networks”, *PLoS Genet* 1(2): e16
 15. Psarra AM, Solakidi S, Trougakos IP, Margaritis LH, Spyrou G, Sekeris CE, (2005), “Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli”, *Int J Biochem Cell Biol.* 37:2544-58
 16. Psarra AM, Sekeris C, (2008) “Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment”, *Biochimica et Biophysica Acta*, ELSEVIER, 1783, 1 – 11
 17. Psarra AM, Sekeris C, (2009), “Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions”, *Biochimica et Biophysica Acta*, ELSEVIER, 1787:431-6
 18. Psarra AM, Sekeris C, (2011), “Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: Role of the mitochondrial glucocorticoid receptor”, *Biochimica et Biophysica Acta*, ELSEVIER, 1813, 1814– 1821
 19. Spyridopoulou K, Tiptiri-Kourpeti A, Lampri E, Fitsiou E, Vasileiadis S, Vamvakias M, Bardouki H, Goussia A, Malamou-Mitsi V, Panayiotidis MI, Galanis A, Pappa A, Chlichlia K, (2017), “Dietary mastic oil extracted from Pistacia lentiscus var. chia suppresses tumor growth in experimental colon cancer models”, *Scientific RepoRts*, 7: 3782
 20. Triantafyllou A, Chaviaras N, Sergentanis TN, Protopapa E, Tsaknis J, (2007), “Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population”, *ELSEVIER Journal of Ethnopharmacology* 111, 43–49Triantafyllou A, Bikineyeva A, Dikalova A, Nazarewicz R, Lerakis S and Dikalov S, (2011), “Anti-inflammatory activity of Chios mastic gum is associated with inhibition of TNF-alpha induced oxidative stress”, *Nutrition Journal*, 10:64
 21. “Overview of the major scientific publications on the beneficial activity of Chios Mastiha”, (2015), Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, *Chios Mastiha published scientific booklet*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές και ειλικρινείς ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας Δρ. Άννα Μαρία Ψαρρά, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στην ερευνητική της ομάδα, για την πολύτιμη βοήθεια της, τις γνώσεις που μου προσέφερε, για την υπομονή της καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας και για την έμπρακτη υποστήριξη της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, από την οποία προμηθευτήκαμε το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου, για την άψογη συνεργασία μας, τη διαρκή επικοινωνία και την υλική υποστήριξη της έρευνας μας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, την Δρ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών και τη Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη, Λέκτορα Βιοχημείας-Μεταβολισμού.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτωρ Αικατερίνη Καρρά για την υπομονή της, τη βοήθεια και τις γνώσεις που μου προσέφερε καθόλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στην ερευνητική μελέτη, τους υποψήφιους διδάκτορες της ερευνητικής μας ομάδας Βύρωνα Γοργογιέτα και Ιωάννη Τσιάλτα, για την στήριξη που μου προσέφεραν καθόλη τη διάρκεια της έρευνας, καθώς επίσης και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την άψογη συνεργασία μας.

Και τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου και τους φίλους μου, που με την συνεχή ηθική στήριξη τους με βοήθησαν να ολοκληρώσω ένα ακόμη σημαντικό κομμάτι της ζωής μου.