

# **ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος  
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΧΥΤΑΣ**

*“ Αξιολόγηση της διατροφικής αξίας φυτικής προέλευσης τριτερπενοειδών ως  
ρυθμιστές στεροειδικών ορμονικών δράσεων σε καρκινικά κύτταρα HeLa ”*

**2015**

*“Αξιολόγηση της διατροφικής αξίας φυτικής προέλευσης τριτερπενοειδών ως ρυθμιστές στεροειδικών ορμονικών δράσεων σε καρκινικά κύτταρα HeLa ”*

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Ψαρρά Άννα-Μαρία:** Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας,

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

**Λεωνίδας Δημήτριος:** Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας,

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

**Σκαμνάκη Βασιλική:** Λέκτορας Βιοχημείας - Μεταβολισμού,

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
Περιεχόμενα .....	3
1. Περίληψη.....	5
2. Εισαγωγή.....	6
2.1 Ορμόνες .....	6
2.2 Κατάταξη των ορμονών.....	6
2.3 Στεροειδείς ορμόνες.....	7
3. Πυρηνικοί υποδοχείς.....	8
3.1 Δομή των πυρηνικών υποδοχέων.....	8
4. Γλυκοκορτικοειδή .....	12
4.1 Γενικά.....	12
4.2 Μηχανισμός έκκρισης κορτιζόλης.....	13
4.3 Δράσεις των γλυκοκορτικοειδών.....	14
4.4 Παθολογικές καταστάσεις ενδογενούς έκκρισης κορτιζόλης.....	16
4.5 Συχνά συμπτώματα και εργαστηριακές διαταραχές στον υπερκορτιζολισμό.....	16
4.6 Φαρμακολογικές δράσεις γλυκοκορτικοειδών .....	18
4.7 Παρενέργειες από τη χρήση των γλυκοκορτικοειδών .....	19
4.7.1 Υπέρταση.....	20
4.7.2 Υπεργλυκαιμία.....	20
4.7.3 Οστεοπόρωση.....	20
4.7.4 Διαταραχές της σωματικής ανάπτυξης.....	21
4.8 Σύνδρομο εξ αποστερήσεως κορτικοειδών.....	21
4.9 Μηχανισμός δράσης των στεροειδών ορμονών.....	21
4.10 Επαγωγή μεταγραφής αντιφλεγμονωδών γονιδίων από τα γλυκοκορτικοειδή.....	22
4.11 Αναστολή της μεταγραφής φλεγμονωδών γονιδίων.....	23
5. Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR).....	24
5.1 Εκλεκτικός αγωνιστής υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRA).....	25
6. Μιτοχόνδρια και μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).....	27
7. Ο μηχανισμός της απόπτωσης.....	29
7.1 Γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση.....	30
7.1.1 Fas-Fas ligand .....	30
7.1.2 Οικογένεια των γονιδίων ICE.....	31
7.1.3 Οικογένεια Bcl-2 .....	31
7.1.4 Γονίδια c-myc και p53.....	32
7.2 Επαγωγή της απόπτωσης.....	33
7.3 Κασπάσες και απόπτωση.....	33
7.4 Μιτοχόνδρια και απόπτωση.....	35
7.5 Ο ρόλος της απόπτωσης στον ανθρώπινο οργανισμό.....	36
8. Τερπένια.....	38
8.1 Τριτερπένια.....	39
8.1.1 Ουρσολικό οξύ και Ολεανολικό οξύ.....	39
8.1.2 Μασλινικό οξύ.....	41
8.1.3 Celastrol.....	41
8.1.4 Celastrol μεθυλεστέρας.....	42
8.1.5 Avicins.....	42
8.1.6 Λουπεόλη, βετουλίνη και βετουλινικό οξύ.....	42

8.1.7 Bardoxolone μεθύλιο.....	43
9. Πειραματικό μέρος.....	44
10. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	45
11. Βιβλιογραφία.....	54

## 1. Περίληψη

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) είναι τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Τα θεραπευτικά τους αποτελέσματα είναι εξαιρετικά, ωστόσο, συχνά συνοδεύονται από σοβαρές και μερικές φορές μη αναστρέψιμες παρενέργειες. Για το λόγο αυτό, ένας στόχος της έρευνας στον τομέα των GCs είναι η ανάπτυξη νέων φαρμάκων, τα οποία δείχνουν μειωμένο προφίλ παρενέργειας, διατηρώντας παράλληλα τις αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες των κλασικών GCs.

Στην παρούσα εργασία θα μελετήσουμε την συμπεριφορά ορισμένων τριτερπενικών ενώσεων σε σχέση με τα γλυκοκορτικοειδή και αν αυτές οι ενώσεις έχουν την δυνατότητα να αντικαταστήσουν τα GCs. Για τον σκοπό αυτό μελετούμε την δυνατότητα σύνδεσης των τριτερπενικών ενώσεων με τους υποδοχείς των GCs και κατά συνέπεια την ενεργοποίηση και μετακίνησή τους στον πυρήνα καθώς και την επίδρασή τους στη μιτοχονδριακή λειτουργία και την επαγωγή απόπτωσης.

### Abstract

Glucocorticoids (GCs) are the most commonly used anti-inflammatory and immunosuppressive drugs. Their therapeutic effects are excellent, however, there are often accompanied by severe and sometimes irreversible side effects. One goal of research in the GC field is the development of new drugs, which show a reduced side-effect profile while maintaining the anti-inflammatory and immunosuppressive properties of classical GCs.

In this study we are examining the behavior of some triterpene compounds relative to glucocorticoids to check if these compounds have the potential to replace the GCs. We have studied the connection capability of triterpene compounds on the receptors of GCs and their activation and translocation to the nucleus as well as their effects on mitochondrial function and induction of apoptosis.

## 2. Εισαγωγή

### 2.1 Ορμόνες

Οι ορμόνες είναι χημικές ουσίες που παράγονται στον οργανισμό, κυκλοφορούν στο αίμα και έχουν ειδική ρυθμιστική δράση στη δραστηριότητα συγκεκριμένων κυττάρων ή οργάνων του σώματος. Είναι χημικά μόρια που δρουν ως μηνύματα για το συντονισμό της βιοχημικής δραστηριότητας των κυττάρων και των πολυκυτταρικών οργανισμών.

Οι ορμόνες:

- Παράγονται από ειδικούς ιστούς ή αδένες
- Εκκρίνονται στο αίμα, το οποίο και τις μεταφέρει στα σημεία όπου επενεργούν
- Προκαλούν ορισμένες βιοχημικές τροποποιήσεις στη δραστηριότητα των οργάνων ή των κυττάρων όπου δρουν (όργανα - στόχοι ή κύτταρα - στόχοι)

### 2.2 Κατάταξη των ορμονών.

Οι ορμόνες κατατάσσονται σε κατηγορίες με βάση τον τόπο παραγωγής, τον τρόπο δράσης και τη φυσιολογική τους λειτουργία. Ως χημικά μόρια μπορούν επίσης να καταταγούν με βάση τη χημική τους φύση, οπότε υποδιαιρούνται στις εξής κατηγορίες:

- **Στεροειδείς ορμόνες.** Οι ορμόνες αυτής της κατηγορίας συνθέτονται με μητρική ουσία τη χοληστερόλη, δεν εναποθηκεύονται, αλλά απελευθερώνονται μόλις συντεθούν. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ορμόνες του φλοιού των επινεφριδίων (σπουδαιότερες είναι η αλδοστερόνη και η κορτιζόλη), καθώς και οι ορμόνες των γεννητικών αδένων. Οι τελευταίες διαφοροποιούνται ανάλογα με το φύλο και είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία των γαμετικών κυττάρων αλλά και για την εμφάνιση των δευτερογενών χαρακτηριστικών που παρατηρούνται ανάμεσα στους άνδρες και τις γυναίκες. Οι κυριότερες ορμόνες των γεννητικών αδένων είναι η τεστοστερόνη (παράγεται στους όρχεις), η οιστραδιόλη (παράγεται στα ωοθυλάκια) και η προγεστερόνη (παράγεται από το ωχρο σωματίο).
- **Πεπτιδορμόνες και πρωτεορμόνες.** Είναι ουσίες πρωτεϊνικής φύσεως, οι οποίες συνθέτονται στη μορφή πρόδρομων ουσιών (προορμόνες) και οι οποίες εναποθηκεύονται και αποδίδονται στην κυκλοφορία του αίματος μετά την διέγερση του ενδοκρινούς αδένος. Π.χ. γλυκαγόνη, ινσουλίνη κ.α.
- **Ορμόνες που προέρχονται από αμινοξέα,** όπως η επινεφρίνη, η αδρεναλίνη και η θυροξίνη. (*ebooks.edu.gr*)

Οι δράσεις της ορμόνης και τα μέρη του σώματος που αφορά διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο της ορμόνης. Οι περισσότερες ορμόνες παράγονται από ειδικούς αδένες οι οποίοι ονομάζονται ενδοκρινείς αδένες. Όσο υψηλότερες είναι οι ποσότητες μιας ορμόνης στο αίμα τόσο περισσότερες δραστηριότητες γίνονται οι λειτουργίες που ελέγχει η ορμόνη αυτή.

Οι ορμόνες συμμετέχουν στη διαδικασία μεταβίβασης σήματος από το ένα κύτταρο στο άλλο. Αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα-στόχους τους μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων υποδοχέων-ορμονών. Ο υποδοχέας μπορεί να βρίσκεται στη μεμβράνη του πλάσματος ή μέσα στο κύτταρο (κυτταροπλασματικό ή πυρηνικό). Η αλληλεπίδραση ορμόνης-υποδοχέα μπορεί να δημιουργεί δεύτερους αγγελιαφόρους ή να ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση. Η επίδραση της ορμόνης στο κύτταρο μπορεί να είναι το αποτέλεσμα τροποποιημένων μεταβολικών οδών (δηλαδή μεταβολές

σχετικές με τη δραστηριότητα ή τις συγκεντρώσεις ενζύμων) ή μεταβολών στην κυτταρική δομή και ανάπτυξη.

Οι ορμόνες μαζί με το νευρικό σύστημα ρυθμίζουν τη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Η παρουσία ή η απουσία τους επηρεάζει το μεταβολισμό, την εμφάνιση του ανθρώπου και τη συμπεριφορά. Το νευρικό σύστημα είναι υπεύθυνο για τη γρήγορη ρύθμιση, ενώ οι ενδοκρινείς αδένες για τη ρύθμιση αλλαγών που απαιτούν περισσότερο χρόνο.

Η ορμονική έκκριση ρυθμίζεται τόσο από αρνητικούς όσο και από θετικούς μηχανισμούς ανατροφοδότησης.

### 2.3 Στεροειδείς ορμόνες

Η κατηγορία των στεροειδών ορμονών περιλαμβάνει πολλά μέλη. Οι στεροειδείς ορμόνες εκκρίνονται κυρίως από το φλοιό των επινεφριδίων, τις γονάδες και τον πλακούντα. Οι γονάδες (ωοθήκες και όρχεις) και ο πλακούντας παράγουν τις γεννητικές ορμόνες, ενώ ο φλοιός των επινεφριδίων παράγει τρεις τύπους στεροειδών ορμονών:

1. **Τα γλυκοκορτικοειδή**, τα οποία δρουν κυρίως στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα διεγείρουν τη γλυκονεογένεση από αμινοξέα, ενώ επάγουν τον καταβολισμό των πρωτεϊνών. Ο σημαντικότερος εκπρόσωπός τους είναι η κορτιζόλη και η κορτικοστερόνη.
2. **Τα αλατοκορτικοειδή**, με σημαντικότερο εκπρόσωπο την αλδοστερόνη, που ρυθμίζει το ισοζύγιο των ιόντων νατρίου-καλίου στο αίμα, ρυθμίζοντας τον εξωκυτταρικό του όγκο και την πίεση του αίματος, και
3. **Τα ανδρογόνα, οιστρογόνα και γεσταγόνα**, τα οποία επιδεικνύουν πλήθος λειτουργιών, όμως κατά κύριο λόγο ελέγχουν την ανάπτυξη του γεννητικού συστήματος, αλλά και των δευτερευόντων χαρακτήρων του φύλου. Επιπλέον, ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος τους στη ρύθμιση λειτουργιών του νευρικού συστήματος και στον έλεγχο της συμπεριφοράς και των συναισθημάτων.

Ο φλοιός των επινεφριδίων είναι ένα απαραίτητο για τη ζωή όργανο, αποτελούμενο από δύο διαφορετικούς ιστούς, το *φλοιό (cortex)* και το *μυελό (medulla)*. Τα κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων είναι μετατραπέντα νευρικά κύτταρα και βρίσκονται υπό τον έλεγχο του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Παράγουν κατεχολαμίνες, με κυριότερους εκπροσώπους την αδρεναλίνη, τη νοραδρεναλίνη και τη ντοπαμίνη. Ο φλοιός των επινεφριδίων σχηματίζει τρεις τύπους στεροειδών ορμονών: τα γλυκοκορτικοειδή, τα αλατοκορτικοειδή και στεροειδή ανάλογα των γεννητικών ορμονών. Από ιστολογικής απόψεως, ο φλοιός των επινεφριδίων διαιρείται σε τρεις στοιβάδες, την εξωτερική σπειροειδή ζώνη (*zona glomerulosa*), την ενδιάμεση στηλιδωτή ζώνη (*zona fasciculata*) και την εσωτερική δικτυωτή ζώνη (*zona reticularis*). Η σπειροειδής ζώνη σχηματίζει την αλδοστερόνη, ενώ οι δύο άλλες τα γλυκοκορτικοειδή και τα στεροειδικά ανάλογα των γεννητικών ορμονών. Το περιεχόμενο σε ορμόνες του φλοιού είναι μικρό, όμως ο ρυθμός συνθέσεώς τους είναι σημαντικός. Οι στεροειδείς ορμόνες διαμεσελοβούν τις δράσεις τους μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων που ανήκουν στην κατηγορία των πυρηνικών υποδοχέων.

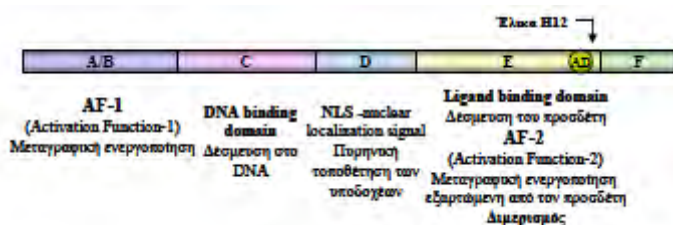
### 3. Πυρηνικοί Υποδοχείς

Οι περισσότερες φυσιολογικές λειτουργίες των θηλαστικών βρίσκονται υπό τον έλεγχο των ορμονών. Οι ορμόνες είναι χημικά πρωτογενή μηνύματα που μεταβιβάζουν το σήμα τους στα κύτταρα μέσω ειδικών μεμβρανών και πυρηνικών υποδοχέων. Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι εξελικτικά νεώτεροι από τους μεμβρανικούς, γιατί περιορίζονται στα μετάζωα. Οι μεμβρανικοί υποδοχείς δρουν μέσω πολύπλοκων μηχανισμών μεταγωγής σήματος που συμπεριλαμβάνουν G-πρωτεΐνες, μόρια που αποτελούν δευτέρους μηνύτορες ή/και αρκετές κινάσες (Calberg, 2004). Αντίθετα οι πυρηνικοί υποδοχείς ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων λειτουργώντας ως μεταγραφικοί παράγοντες, που ενεργοποιούνται στις περισσότερες περιπτώσεις από προσδέτες και συνιστούν μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων, την επονομαζόμενη υπεροικογένεια των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων (NHR – Nuclear Hormone Receptors), στην οποία συμπεριλαμβάνονται υποδοχείς όπως οι κλασσικοί ενδοκρινείς. Όπως και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες έχουν ενεργό ρόλο στην αναδιάταξη της χρωματίνης και λειτουργούν είτε μόνοι τους, είτε σε συνεργασία με συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς για την ενεργοποίηση ή την καταστολή της έκφρασης γονιδίων, αντίστοιχα. Αρκετές ορμόνες, βιοενεργά λιπίδια και άλλα μικρά φυσικά ή συνθετικά οργανικά μόρια μπορούν να αποτελέσουν προσδέτες αυτών των υποδοχέων (Glass and Rosenfeld, 2000).

Υπάρχουν δύο κατηγορίες πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων σε σχέση με τη θέση που βρίσκονται μέσα στο κύτταρο. Υπάρχουν οι πυρηνικοί υποδοχείς των οποίων η μετατόπιση στον πυρήνα προϋποθέτει την παρουσία προσδετών και αυτοί οι οποίοι είναι μόνιμα τοποθετημένοι στον πυρήνα, ανεξάρτητα από την παρουσία προσδετών.

#### 3.1 Δομή των πυρηνικών υποδοχέων

Οι πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς απαρτίζονται από κοινές λειτουργικές περιοχές, που τους έχουν δοθεί οι ονομασίες από Α έως F (Εικόνα 1). Η περιοχή A/B καταλαμβάνει το αμινοτελικό τους άκρο και είναι η λιγότερη συντηρημένη περιοχή ανάμεσα στα μέλη της υπεροικογένειας, με ποικίλο μέγεθος και με μια αυτόνομη περιοχή ενεργοποίησης, την AF-1 (Activation Function-1). Η περιοχή A/B αποτελεί συχνά αντικείμενο εναλλακτικής «συρραφής» (splicing) και εναλλακτικής χρησιμοποίησης των προαγωγέων. Ακόμα πολλές φορές διαφοροποιείται με μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορύλιωση, η οποία φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο για τη μεταγραφική δραστηριότητα της AF-1 περιοχής (Shao and Lazar, 1999).



**Εικόνα 1.** Σχηματική απεικόνιση της δομικής και λειτουργικής οργάνωσης των πυρηνικών υποδοχέων. Οι πυρηνικοί υποδοχείς συνθέτονται από τις συγκεκριμένες περιοχές, εξαίρεση αποτελεί η F περιοχή η οποία απουσιάζει από κάποια μέλη της υπεροικογένειας. AD-autonomous domain είναι η αυτόνομη περιοχή ενεργοποίησης, στην οποία εντοπίζεται η συμμετοχή της H12 στη μεταγραφική ενεργοποίηση της AF-2.



Η δέσμευση των πυρηνικών υποδοχέων στο DNA πραγματοποιείται από τις δύο εξελικτικά συντηρημένες περιοχές τους, που λειτουργούν ανεξάρτητα για να ρυθμίσουν τις αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεΐνης και τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Οι αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεΐνης ρυθμίζονται από την C ή DBD (DNA-binding domain) περιοχή. Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, απαραίτητες για το σχηματισμό ομοδιμερών ή /και ετεροδιμερών, ρυθμίζονται από μια εκτεταμένη καρβοξυτελική επιφάνεια διμερισμού που περιέχεται στην E ή LBD (Ligand-Binding Domain) περιοχή.

Η συντηρημένη DBD περιοχή, είναι η περιοχή, όπως προαναφέρθηκε, με την οποία προσδένονται οι υποδοχείς στο DNA. Κατευθύνει τους υποδοχείς προς το αποκρινόμενο στοιχείο τους. Το αποκρινόμενο στοιχείο των ορμονών (HRE- Hormone Response Element) είναι μια ειδική ακολουθία DNA στον προαγωγέα των γονιδίων που αναγνωρίζουν οι πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς. Υπάρχουν τρεις τύποι σύνδεσης της DBD περιοχής των υποδοχέων στα αποκρινόμενα στοιχεία των γονιδίων στόχων τους, αναλόγως με το αν οι αλληλεπιδράσεις τους γίνονται ως μονομερή, ομοδιμερή ή ετεροδιμερή. Αποκρινόμενα στοιχεία που αναγνωρίζονται από υποδοχείς που δεσμεύονται ως ομοδιμερή ή ετεροδιμερή τυπικά αποτελούνται από δυο ακολουθίες αναγνώρισης που επιτρέπουν τις βέλτιστες αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης- πρωτεΐνης.

Βασιζόμενοι στους τρεις διαφορετικούς τύπους σύνδεσης στο DNA προκύπτουν και τρία χαρακτηριστικά των αποκρινόμενων στοιχείων που καθορίζουν την εξειδικευμένη αναγνώριση από συγκεκριμένη ομάδα των πυρηνικών υποδοχέων:

1. η ακριβής ακολουθία του μοτίβου αναγνώρισης,
2. ο προσανατολισμός της μιας ακολουθίας του μοτίβου σε σχέση με την άλλη (π.χ. απευθείας επανάληψη, παλίνδρομη επανάληψη ή ανεστραμμένη επανάληψη) και
3. ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που διαχωρίζει τα δυο μοτίβα (*Glass, 1994*).

Έτσι οι υποδοχείς VDR (Vitamin D Receptor), RAR (Retinoid Acid Receptor) και TR (Thyroid hormone Receptor) δεσμεύονται ως ομοδιμερή σε αποκρινόμενα στοιχεία με παλίνδρομη ακολουθία, ενώ ως ετεροδιμερή με τους RXR (Retinoid X Receptor) σε αποκρινόμενα στοιχεία απευθείας επανάληψης. Οι RXR καταλαμβάνουν πάντα το 5' άκρο της ακολουθίας στα συγκεκριμένα ετεροδιμερή. Τα απευθείας επανάληψης αποκρινόμενα στοιχεία αντιπροσωπεύουν τα μεγαλύτερης συγγένειας σημεία δέσμευσης των ετεροδιμερών των RXR, γιατί η DBD περιοχή των υποδοχέων VDR, RAR και TR προτιμά να περιστρέφεται 180° διατηρώντας σταθερή την καρβοξυτελική περιοχή διμερισμού (*Kurokawa et al, 1993*).

Ο RXR μπορεί να προσδένεται σε αποκρινόμενα στοιχεία του και ως ομοδιμερές. Μελέτες όμως έδειξαν ότι μπορεί να σχηματίζει και σταθερά τετραμερή. Αυτό παρατηρήθηκε σε γονίδια στόχους του RXR, όπως το γονίδιο της CRBP II (Cellular Retinol-Binding Protein II), το οποίο περιέχει αρκετά μισά μοτίβα αναγνώρισης που συνεργάζονται στη στρατολόγηση μονομερών του RXRα, ώστε να σχηματίσουν ένα λειτουργικό τετραμερές. Η δυνατότητα του σχηματισμού τετραμερών φαίνεται ότι εξαρτάται από την ισομορφία του υποδοχέα, καθώς ο RXRβ δε μπορεί να σχηματίσει τα συγκεκριμένα σύμπλοκα. Η δέσμευση του προσδέτη έχει σαν αποτέλεσμα το διαχωρισμό του τετραμερούς σε διμερή ή μονομερή, τα οποία θα είναι διαθέσιμα για το σχηματισμό ομοδιμερών ή ετεροδιμερών, υπονοώντας ότι τα τετραμερή αντιπροσωπεύουν απλώς μια αποθηκευτική εκδοχή του RXR (*Kersten et al., 1997; Dongand Noy, 1998; Chen et al., 1998*).

Η DBD περιοχή συνίσταται από δυο δακτύλους ψευδαργύρου, του τύπου των τεσσάρων κυστεϊνών. Μελέτες της δομής και της λειτουργίας της DBD περιοχής αρκετών μελών της υπεροικογένειας οδήγησαν στην αναγνώριση κάποιων

ακολουθιών που ονομάστηκαν P-, D-, T- και A- boxes. Το P box αντιστοιχεί στις ακολουθίες της καρβοξυτελικής άρθρωσης του πρώτου δακτύλου ψευδαργύρου και καθορίζει τις ειδικές συνδέσεις των πυρηνικών υποδοχέων με το DNA (Mader et al., 1989; Umehono and Evans, 1989; Luisi et al., 1991). Το D box συνίσταται από τα αμινοξέα της πρώτης άρθρωσης του δευτέρου δακτύλου ψευδαργύρου και αποτελεί μια επιφάνεια διμερισμού που εμπλέκεται στην αναγνώριση του ενός μοτίβου αναγνώρισης (Hirst et al., 1992). Τα T box και A box εντοπίζονται αμέσως παρακάτω από το δεύτερο δάκτυλο ψευδαργύρου και έχουν αναγνωριστεί στους υποδοχείς RXR και NGFI-B (Nerve Growth Factor Induced clone-B), αντίστοιχα. Το T box συνεισφέρει στον ομοδιμερισμό του RXR, και το A box είναι απαραίτητο για τη δέσμευση του NGFI-B ως μονομερές στο αποκρινόμενο στοιχείο του (Wilson et al., 1992).

Η D περιοχή, είναι λιγότερο εξελικτικά συντηρημένη από τις γειτονικές περιοχές DBD και LBD και λειτουργεί ως συνδετικός κρίκος τους. Περιέχει ένα σήμα για την πυρηνική τοποθέτηση των υποδοχέων (NLS-nuclear localization signal) ή τουλάχιστον κάποια στοιχεία του λειτουργικού NLS.

Η LBD περιοχή αποτελεί το βασικό γνώρισμα των πυρηνικών υποδοχέων. Είναι υπεύθυνη για πολλές και διαφορετικές λειτουργίες, οι περισσότερες από τις οποίες πραγματοποιούνται εξαρτώμενες από την παρουσία προσδέτη. Έτσι στην LBD περιοχή αποδίδεται η μεταγραφική δραστηριότητα των υποδοχέων που εξαρτάται από τους προσδέτες (AF-2, Activation Function-2) και εντοπίζεται μια πολύ βασική επιφάνεια διμερισμού. Λεπτομερή μοριακά δεδομένα της σχέσης δομής-λειτουργίας και της μετάδοσης μηνύματος από τους πυρηνικούς υποδοχείς αποκτήθηκαν μετά από την κρυσταλλογραφία της LBD περιοχής μόνη της ή παρουσία αγωνιστών, ανταγωνιστών και συνενεργοποιητών. Οι υποδοχείς στους οποίους δεν υπάρχουν συνδεδεμένοι προσδέτες συνήθως αναφέρονται ως απο- μορφές των υποδοχέων, ενώ όταν έχουν συνδεθεί προσδέτες ονομάζονται ολο- μορφές. Η γενική διαμόρφωση της LBD περιοχής των πυρηνικών υποδοχέων αποτελείται από ένα τρισδιάστατο «σάντουιτς» 12 α-ελίκων (H1-H12). Η αρίθμηση των ελίκων ξεκινά από το αμινοτελικό άκρο. Οι έλικες H3, H5, H10 και H11 δημιουργούν μια κοιλότητα από υδρόφοβα αμινοξέα, στην οποία θα φιλοξενηθεί ο υδρόφοβος προσδέτης. Όταν ο προσδέτης πάρει την τελική του θέση στην κοιλότητα, η H12 σφραγίζει την «τσέπη» της LBD περιοχής και επιπλέον σταθεροποιεί τη σύνδεση του προσδέτη συνεισφέροντας στο υδρόφοβο περιβάλλον ή / και ερχόμενη σε επαφή και με τον ίδιο τον προσδέτη. Η έλικα H12 ονομάζεται και περιοχή ενεργοποίησης (AD- Activating Domain) της AF-2 λειτουργίας. Όταν η H12 πλησιάζει στην υπόλοιπη LBD, δημιουργεί μια υδρόφοβη σχισμή μαζί με άλλα αμινοξέα που βρίσκονται εκτεθειμένα στην επιφάνεια της LBD και σχηματίζουν το NR box (Nuclear Receptor box) των συνενεργοποιητών. Μελέτες κρυσταλλογραφίας έδειξαν συγκεκριμένα τις αλληλεπιδράσεις του μοτίβου LXXLL του NR box, αποδίδοντάς του ένα πολύ βασικό ρόλο στη συγκρότηση των συμπλόκων των συνενεργοποιητών των πυρηνικών υποδοχέων (Nolte et al., 1998).

Μερικοί πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να λειτουργήσουν και ως καταστολείς της μεταγραφής γονιδίων, όταν είναι συνδεδεμένοι στο DNA. Αυτό το φαινόμενο συμβαίνει κατά την απουσία αγωνιστών των υποδοχέων. Μπορεί να επάγεται από την παρουσία ανταγωνιστών και σχετίζεται με τη στρατολόγηση των πρωτεϊνών συνκαταστολέων. Οι συνκαταστολείς συνδέονται πάντα στην επιφάνεια της LBD περιοχής των υποδοχέων, όταν δεν υπάρχει συνδεδεμένος προσδέτης, με παρόμοιο τρόπο με αυτό των συνενεργοποιητών, αναγνωρίζοντας ένα μοτίβο το CoNR box (Co-Repressor Nuclear Receptor box) (Hu and Lazar, 1999; Nagy et al., 1999). Με τη δέσμευση του προσδέτη αλλάζει η στερεοδιαμόρφωση της LBD περιοχής,

Η κατασταλτική μεταγραφική δραστηριότητα των πυρηνικών υποδοχέων μπορεί ακόμη να οφείλεται στον ανταγωνισμό μεταξύ πυρηνικών υποδοχέων τόσο για τη δέσμευση σε αποκρινόμενα στοιχεία στο DNA (Towers et al., 1998; Towers et al., 1999), όσο και για πρωτεΐνες είτε των υποδοχέων που χρησιμοποιούν για να σχηματίσουν ετεροδιμερή όπως τον RXR, είτε των κοινών συνενεργοποιητών όπως οSRC-1 (Steroid Receptor CoActivator-1). Μερικοί υποδοχείς διαθέτουν στο καρβοξυτελικό άκρο της LBD περιοχής τους μια επιπλέον περιοχή, την F, η οποία διαφοροποιείται ανάμεσα στους υποδοχείς και δεν παρουσιάζει ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά, ούτε κάποια γνωστή λειτουργία. Μερικοί υποθέτουν ότι μπορεί να συμμετέχει στη στρατολόγηση των συνενεργοποιητών στην LBD περιοχή. Η F περιοχή απουσιάζει από αρκετούς υποδοχείς, όπως από τους PR (Progesterone Receptor), PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), RAR και RXR (Robyr et al., 2000).

11

## 4. ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ

### 4.1. Γενικά

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι μία κατηγορία στεροειδών ορμονών που εκκρίνονται από τον φλοιό των επινεφριδίων και χαρακτηρίζονται από τη δράση τους να προωθούν τη βιοσύνθεση γλυκόζης από γλυκογενετικά αμινοξέα (γλυκονεογένεση) και την εναπόθεση γλυκογόνου στο συκώτι, σε συνδυασμό με ελαττωμένη χρησιμοποίηση της γλυκόζης από τους περιφερειακούς ιστούς, αυξάνοντας έτσι τη γλυκόζη στο αίμα. Γενικά η δράση των γλυκοκορτικοειδών είναι αντίθετη με εκείνη της ινσουλίνης.

Η έκκρισή τους ρυθμίζεται από την ορμόνη κορτικοτροπίνη (ACTH) της υπόφυσης. Υπερβολική έκκριση γλυκοκορτικοειδών είναι η αιτία της νόσου Cushing, που χαρακτηρίζεται από αδυναμία, κατάπτωση, ελάττωση της μάζας των μυών και ανακατανομή του λίπους στο σώμα.

Τα γλυκοκορτικοειδή, από τα οποία σπουδαιότερα είναι η κορτιζόνη, η υδροκορτιζόνη και η κορτικοστερόνη, ασκούν επίσης αντιφλεγμονώδη και αντιαλλεργική δράση. Συντελούν στον σχηματισμό αντισωμάτων προκαλώντας τις απαραίτητες για τον σκοπό αυτόν γ-γλοβουλίνες και γενικά η έκκρισή τους αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς του οργανισμού, κυρίως σε κατάσταση στρες.

Σήμερα, είναι γνωστό ότι, τα γλυκοκορτικοειδή μεσολαβούν σε πληθώρα αποκρίσεων συμπεριλαμβανομένου του ρόλου τους στην ανάπτυξη, στην διατήρηση της πίεσης του αίματος, στη ρύθμιση του στρες και στις ανοσοαπαντήσεις. Τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν τις δράσεις τους μέσω της δέσμευσής τους στον GR, έναν μεταγραφικό παράγοντα ικανό να ρυθμίζει διάφορα γονίδια.

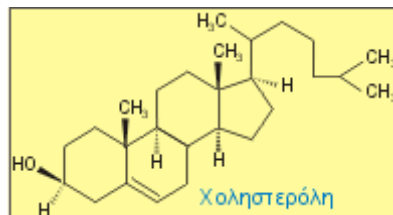
Τα γλυκοκορτικοειδή είναι πολύ ωφέλιμες ουσίες λόγω της φαρμακολογικής τους δράσης, αφού είναι ισχυροί αναστολείς των φλεγμονωδών αποκρίσεων και γι' αυτό το λόγο είναι ιδιαίτερος χρήσιμα στην αντιμετώπιση πολλών ασθενειών. Παρ' όλη τη χρησιμότητά τους όμως, επιφέρουν πλήθος παρενεργειών ιδιαίτερος στη σύσταση του σώματος. Παρόμοια με τις ανεπιθύμητες ενέργειες της χορήγησης γλυκοκορτικοειδών, είναι και τα κλινικά σημεία του συνδρόμου Cushing, δηλαδή της ενδογενούς υπερέκκρισης κορτιζόλης. Για το λόγο αυτό, το σύνολο των εκδηλώσεων των παρενεργειών της χορήγησης μεγάλων δόσεων γλυκοκορτικοειδών ονομάζεται ιατρογενές ή εξωγενές σύνδρομο Cushing.

Οι κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι οι διαταραχές του μεταβολισμού της γλυκόζης, δηλαδή υπεργλυκαιμία, ινσουλινοαντοχή και υπερινσουλιναίμία, η αυξημένη συσσώρευση λίπους σε συγκεκριμένες περιοχές του σώματος, δημιουργώντας κεντρική παχυσαρκία, καθώς επίσης και κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στην όψη των ατόμων αυτών. Ο αυξημένος καταβολισμός των πρωτεϊνών είναι μία ακόμη παρενέργεια των γλυκοκορτικοειδών, ιδιαίτερος στους σκελετικούς μυς των άνω και κάτω άκρων, προκαλώντας ακόμη και μυοπάθεια λόγω της χορήγησης γλυκοκορτικοειδών. Επίσης, η μείωση της οστικής μάζας και πυκνότητας είναι μία σοβαρή παρενέργεια που προκύπτει από την επίδραση των γλυκοκορτικοειδών σε ποικίλους μηχανισμούς οστεοποίησης ή οστικής απορρόφησης. Ακόμη, τα γλυκοκορτικοειδή έχουν σημαντικές επιδράσεις σε διάφορους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος δρώντας κυρίως ανασταλτικά και κάνοντας τον οργανισμό πιο ευάλωτο σε λοιμώξεις, σε μηχανισμούς που συμμετέχει η αυξητική ορμόνη καθυστερώντας συχνά την ανάπτυξη και τέλος στην έκκριση κορτικοτροπίνης προκαλώντας ατροφία των επινεφριδίων.

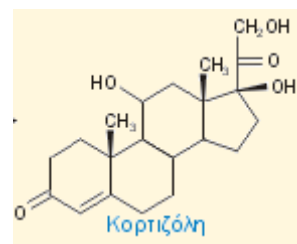
## 4.2. Μηχανισμός έκκρισης κορτιζόλης

Ο όρος «κορτικοειδή» αναφέρεται στις στεροειδείς ορμόνες που εκκρίνονται στο φλοιό (cortex) των επινεφριδίων αδένων.

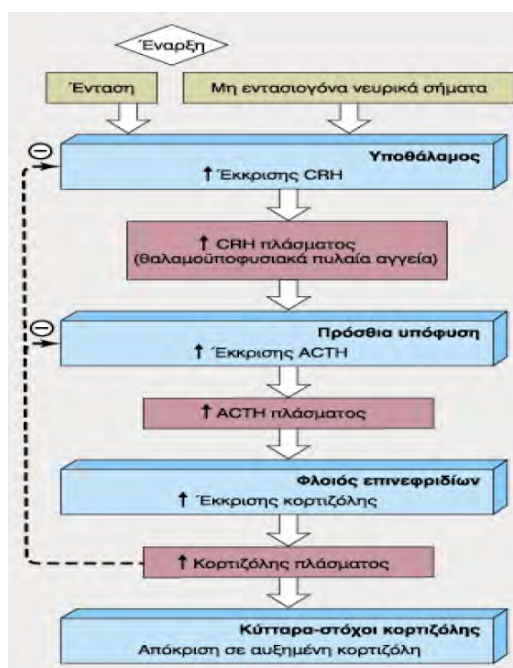
Το πρόδρομο μόριο παραγωγής όλων των στεροειδών ορμονών άρα και των γλυκοκορτικοειδών είναι η χοληστερόλη (Δημόπουλος Κ.Α., Αντωνοπούλου Σ., 2000), οποία μετά από διάφορες μεταβολικές διεργασίες μετατρέπεται σε φλοιοεπινεφριδιακές ορμόνες, από τις οποίες πιο σπουδαία θεωρείται η κορτιζόλη γιατί έχει πολύ σημαντική επίδραση στον ανθρώπινο μεταβολισμό, στην απόκριση του σώματος σε εντασιογόνες καταστάσεις, στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και σε άλλες σημαντικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού.



Τα γλυκοκορτικοειδή, με κύριο εκπρόσωπο την κορτιζόλη, εκκρίνονται στον ανθρώπινο οργανισμό σε τακτικούς ρυθμούς κατά τη διάρκεια του εικοσιτετραώρου (με μέγιστες συγκεντρώσεις το πρωί, πριν την αφύπνιση) και σε στρεσογόνες καταστάσεις (σωματικό ή ψυχολογικό stress).



Η έκκριση της κορτιζόλης ρυθμίζεται κυρίως από το σύστημα «Υποθάλαμος – Πρόσθια Υπόφυση – Επινεφρίδια» (Y – Y – E), η οποία ασκεί αρνητική ανατροφοδοτική ρύθμιση στην έκκριση της κορτικοεκλυτίνης (CRH) και της κορτικοτροπίνης ή φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH). (Vander A., et al 2001)



Πηγή: Vander A., Sherman J., Luciano D., (2001) *Φυσιολογία του ανθρώπου – 8η έκδοση*. Μτφ. Ν. Γελαδάς, Μ. Τσακόπουλος. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης

Εσωτερικά και εξωτερικά σήματα ενεργοποιούν τον υποθάλαμο να απελευθερώσει την ορμόνη κορτικοτροπίνης, η οποία ενεργεί επί της πρόσθιας υπόφυσης και διεγείρει την σύνθεση και έκκριση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH). Η ACTH δρα τότε στον φλοιό των επινεφριδίων και διεγείρει την παραγωγή και έκκριση γλυκοκορτικοειδών.

Η κορτιζόλη κυκλοφορεί συνδεδεμένη στη σφαιρίνη σύνδεσης των κορτικοειδών ή τρανσκορτίνη (corticosteroid – binding globulin, CBG) σε ποσοστό 75%, με την

αλβουμίνη σε ποσοστό 15%, και σε ελεύθερη μορφή σε ποσοστό 10%. Η συνδεδεμένη κορτιζόλη είναι βιολογικά ανενεργός κι εξυπηρετεί τη μεταφορά της ορμόνης στα όργανα-στόχους καθώς επίσης αποτρέπει τις μεγάλες διακυμάνσεις επιπέδων κορτιζόλης στο πλάσμα. Αντίθετα, η ελεύθερη κορτιζόλη είναι βιολογικά ενεργή και η φυσιολογική τιμή της στο πλάσμα είναι περίπου 0,5 μg/dL. (McPhee S., Μουτσόπουλος X., 2000).

#### **4.3. Δράσεις των γλυκοκορτικοειδών**

- 1. Συντήρηση της μεταβολικής ομοιόστασης**
    - A. Ρύθμιση της συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα / οδωτικές επιδράσεις στη νεογλυκογένεση / αύξηση της σύνθεσης γλυκογόνου.
    - B. Αύξηση των συγκεντρώσεων της ινσουλίνης / οδωτικές επιδράσεις στις λιπολυτικές ορμόνες.
    - Γ. Αύξηση του μεταβολισμού / ελάττωση του καταβολισμού (πλην λίπους) / αναστολή του άξονα της αυξητικής ορμόνης.
    - Δ. Αναστολή του αναπαραγωγικού άξονα
    - E. Αλατοκορτικοειδής δράση της κορτιζόλης.
  - 2. Επίδραση στους συνδετικούς ιστούς.**
    - A. Προκαλεί απώλεια κολλαγόνου και συνδετικού ιστού.
  - 3. Επίδραση στην ομοιόσταση του ασβεστίου**
    - A. Διέγερση των οστεοκλαστών / αναστολή των οστεοβλαστών
    - B. Μείωση της εντερικής απορρόφησης του ασβεστίου / διέγερση της απελευθέρωσης παραθορμόνης / αύξηση της απέκκρισης αβεστίου στα ούρα / μείωση της επαναρρόφησης του φωσφόρου.
  - 4. Συντήρηση της καρδιαγγειακής λειτουργίας**
    - A. Αύξηση της καρδιακής παροχής
    - B. Αύξηση του καρδιακού τόνου
    - Γ. Οδωτικές επιδράσεις στις αγγειοσυσταλτικές ορμόνες / αύξηση της κατακράτησης νατρίου
  - 5. Επίδραση στη συμπεριφορά και στη γνωσιακή λειτουργία**
  - 6. Επίδραση στο σύστημα ανοσίας**
    - A. Αύξηση της ενδαγγειακής συγκέντρωσης λευκών αιμοσφαιρίων
    - B. Ελάττωση της μετανάστευσης φλεγμονωδών κυττάρων σε περιοχές βλάβης.
    - Γ. Καταστολή του συστήματος της ανοσίας (θυμόλυση, καταστολή κυτταροκινών, προστανοειδών, κινινών, της σεροτονίνης, της ισταμίνης, της κολλαγονάσης και του παράγοντα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου)
- (Vander A., Sherman J., Luciano D., 2001) *Φυσιολογία του ανθρώπου – 8η έκδοση. Μτφ. Ν. Γελαδάς, Μ. Τσακόπουλος. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης* )

Όσον αφορά στο μεταβολισμό, η κορτιζόλη δρα καθοριστικά και επιτρεπτικά στην έναρξη των προσαρμογών του οργανισμού που απαιτεί η νηστεία. Είναι γνωστό πως σε φάση νηστείας (ή μεταπορροφητική ή προγευματική φάση) διεγείρονται διάφοροι μηχανισμοί στον ανθρώπινο οργανισμό, μεταξύ αυτών η γλυκονεογένεση και η λιπόλυση. Η γλυκονεογένεση και η λιπόλυση είναι αποτέλεσμα διαφόρων μηχανισμών, είτε ρυθμιζόμενων ορμονικά είτε αντανακλαστικά, και αποτελούν την «αντίδραση» του οργανισμού στη νηστεία. Αν και υπάρχουν όμως αυτοί οι μηχανισμοί, ο οργανισμός δε θα μπορούσε να αντεπεξέλθει σε περίπτωση ανεπάρκειας κορτιζόλης, γιατί έστω και κάποιες ελάχιστες ποσότητες της ορμόνης αυτής είναι απαραίτητες για τη διέγερση της γλυκονεογένεσης και της λιπόλυσης. Αυτό δε σημαίνει ότι στη φάση νηστείας η κορτιζόλη αυξάνεται, αλλά ότι απλά είναι απαραίτητη κάποια στοιχειώδης ποσότητα αυτής, ώστε να διατηρούνται σταθερές οι

συγκεντρώσεις των ενζύμων του ήπατος για τη γλυκονεογένεση και κάποιων των ενζύμων του λιπώδους ιστού για τη λιπόλυση.

Μία ακόμη δράση της κορτιζόλης είναι η αναστολή πρόληψης γλυκόζης από τα κύτταρα του μυϊκού και του λιπώδους ιστού, δηλαδή ανταγωνιστική της ινσουλίνης. Αυτή την ανταγωνιστική δράση όμως, δεν τη διατηρεί στα εγκεφαλικά και καρδιακά κύτταρα γιατί αν αυτό συνέβαινε, τα δύο όργανα δε θα ήταν ικανά να αντεπεξέλθουν σε περίπτωση στρεσογόνου κατάστασης αφού δε θα είχαν τη γλυκόζη ως καύσιμο.

Το συμπέρασμα που βγαίνει από τα παραπάνω είναι ότι η κορτιζόλη είναι μία ορμόνη που έχει αντίθετη δράση από αυτή της ινσουλίνης, χωρίς όμως να σχετίζεται και να επηρεάζεται η έκκρισή της από τον κύκλο «φάση νηστείας – απορρόφησης», αλλά να είναι αναγκαία για τη ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων και των λιπιδίων κατά τη μεταπορροφητική φάση. Το κύριο χαρακτηριστικό της είναι η καταβολική δράση που έχει για τους περισσότερους ιστούς, με κύρια εξαίρεση το ήπαρ στο οποίο έχει αναβολική δράση (γλυκονεογένεση). Για τους παραπάνω λόγους, σε φάση νηστείας τα άτομα με ανεπάρκεια κορτιζόλης διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο ανάπτυξης σοβαρής υπογλυκαιμίας, καθώς επίσης και τα άτομα με υπέρμετρη έκκριση της ορμόνης αυτής παρουσιάζουν υπεργλυκαιμία και συμπτώματα παρόμοια με αυτά της ανεπάρκειας ινσουλίνης.

Αναφορικά με την ανάπτυξη του οργανισμού, η κορτιζόλη έχει επίσης πολύ σημαντικό ρόλο. Σε περιπτώσεις που η κορτιζόλη είναι αυξημένη για κάποιο λόγο, η σύνθεση DNA αναστέλλεται και προάγεται ο καταβολισμός των πρωτεϊνών. Επίσης αναστέλλεται η ανάπτυξη των οστών και συχνά προκαλούνται κατάγματα γιατί τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης καταστέλλουν τη λειτουργία των οστεοβλαστών και διεγείρουν τη λειτουργία των οστεοκλαστών. Ακόμη, η κορτιζόλη αναστέλλει την έκκριση αυξητικής ορμόνης, μιας ορμόνης που όσον αφορά στο μεταβολισμό υδατανθράκων και λιπών έχουν όμοια δράση. Λόγω αυτών των λειτουργιών, η κορτιζόλη συχνά ευθύνεται για την καθυστερημένη ανάπτυξη των παιδιών που για διάφορους λόγους έχουν αυξημένη συγκέντρωση της ορμόνης αυτής.

Η κορτιζόλη επίσης έχει πολύ σημαντικές επιδράσεις στην απόκριση του οργανισμού στις εντασιογόνες καταστάσεις. Εντασιογόνες καταστάσεις για έναν οργανισμό θεωρούνται ο φυσικός τραυματισμός, η λοίμωξη, η καταπληξία, οι συναισθηματικές εντάσεις και γενικά όποια κατάσταση πρέπει να αντιμετωπιστεί από τον οργανισμό ώστε να διατηρηθεί η ομοιότητα και η ακεραιότητά του. Σε όλες αυτές τις καταστάσεις παρατηρείται αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης στον οργανισμό, καθώς επίσης λαμβάνουν χώρα κι άλλες αποκρίσεις του οργανισμού, όπως η διέγερση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος (*Paquot N. et al, 1995*), η έκκριση επινεφρίνης και η έκκριση αντιδιουρητικής ορμόνης (ADH).

Οι επιδράσεις της κορτιζόλης στις εντασιογόνες καταστάσεις ταυτίζονται κατά ένα μέρος με τις επιδράσεις της ορμόνης στο μεταβολισμό. Με τη λιπόλυση, τη γλυκονεογένεση και τον καταβολισμό των πρωτεϊνών αυξάνονται τα επίπεδα γλυκερόλης, ελεύθερων λιπαρών οξέων, γλυκόζης και αμινοξέων στο πλάσμα. Τα παραπάνω μπορούν να αποτελέσουν πολύ σημαντική απάντηση σε μία εντασιογόνο κατάσταση, όπως σε περίπτωση που απαιτούνται περισσότερα «καύσιμα» για τον οργανισμό ή απαιτούνται αμινοξέα για ιστική επιδιόρθωση λόγω κάποιου πιθανού τραυματισμού ή ακόμη και στην περίπτωση ασιτίας ή νηστείας.

Η κορτιζόλη επίσης ενισχύει την αγγειακή αντιδραστικότητα, δηλαδή μπορεί να διατηρήσει τους λείους μυς των αγγείων σε σύσπαση μετά την αγγειοσυσταλτική δράση της νορεπινεφρίνης. Αυτό είναι πολύ σημαντικό γιατί στις εντασιογόνες καταστάσεις απελευθερώνονται άγνωστες αγγειοδιασταλτικές ουσίες που σε περίπτωση ανεπάρκειας κορτιζόλης, μπορούν να προκαλέσουν υπόταση ή ακόμα να προκληθεί κυκλοφορική ανεπάρκεια. Με άλλα λόγια, η κορτιζόλη δύναται να

προφυλάξει τον οργανισμό από μία τόσο δυσάρεστη κι επικίνδυνη κατάσταση, αποτρέποντας τη μείωση των συνολικών περιφερικών αντιστάσεων των αγγείων.

Η πιο γνωστή δράση της κορτιζόλης είναι η αντιφλεγμονώδης δράση δηλαδή ελάττωση της φλεγμονώδους απάντησης (*Chrousos GP, 1995*). Ακόμη, η κορτιζόλη προκαλεί μείωση του αριθμού των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων (*Janeway C.A et al 1999*), μείωση της παραγωγής αντισωμάτων, μείωση της δραστηριότητας των Τ-βοηθητικών (CD4+) και Τ-κυτταροτοξικών (CD8+) κυττάρων και ακόμη ελαττώνει τον πυρετό που προκαλείται στη λοίμωξη. Οι παραπάνω δράσεις είναι πολύ σημαντικές και συχνά επιθυμητές. Η ενδογενής έκκριση κορτιζόλης κατά τη διάρκεια εντασιογόνων καταστάσεων, υπό φυσιολογικές συνθήκες, επιφέρει σε κάποιο βαθμό τις παραπάνω δράσεις, προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό από πιθανή βλάβη εξ' αιτίας της φλεγμονής.

#### **4.4. Παθολογικές Καταστάσεις Ενδοκρινούς Έκκρισης Κορτιζόλης**

Πολλές σοβαρές ασθένειες σχετίζονται με τη λειτουργία των επινεφριδίων. Οι διαταραχές στην έκκριση των ορμονών μπορεί να οφείλονται σε υπερλειτουργία ή υπολειτουργία των επινεφριδίων, δηλαδή μπορεί να παρουσιάζεται υπερέκκριση ή ανεπάρκεια των ορμονών αντίστοιχα. (*Andreoli T.E., et al, 2000*)

##### **Σύνδρομο υπερλειτουργίας του φλοιού των επινεφριδίων**

Καταστάσεις περίσσειας γλυκοκορτικοειδών:

##### **A. Φυσιολογικές καταστάσεις**

1. Υπερένταση (stress)
2. Εντατική άσκηση
3. Τελευταίο τρίμηνο κύησης

##### **B. Παθολογικές καταστάσεις**

1. Ψυχιατρικές καταστάσεις (διαταραχές ψευδο-Cushing)
  - α. Κατάθλιψη
  - β. Αλκοολισμός
  - γ. Ψυχογενής ανορεξία
  - δ. Φοβικές διαταραχές
  - ε. Στέρηση οινόπνευματος / ναρκωτικών
2. Καταστάσεις εξαρτημένες από την ACTH
  - α. Αδένωμα της υπόφυσης (νόσος του Cushing)
  - β. Σύνδρομο έκτοπης ACTH
    - β.1. Βρογχικό καρκινοειδές
    - β.2. Καρκινοειδές του θύμου
    - β.3. Νησιδίωμα
    - β.4. Μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα.
  - γ. Έκτοπη έκκριση CRH
3. Καταστάσεις ανεξάρτητες από την ACTH
  - α. Αδένωμα των επινεφριδίων
  - β. Καρκίνωμα των επινεφριδίων
  - γ. Μικροοζώδης επινεφριδοπάθεια

##### **Γ. Εξωγενείς πηγές**

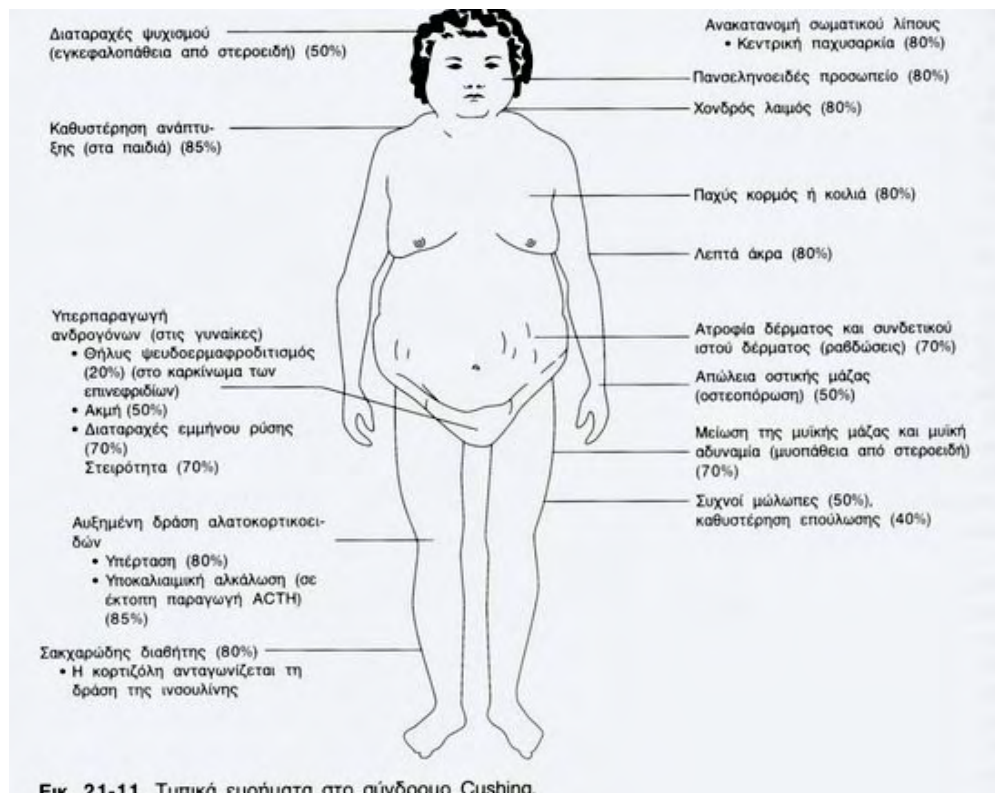
1. Λήψη γλυκοκορτικοειδών
2. Λήψη ACTH

#### **4.5. Συχνά συμπτώματα και εργαστηριακές διαταραχές στον υπερκορτιζολισμό**

1. Κατανομή του λίπους (αυχονοραχιαίο και υπερκλείδιο λιπώδες σώμα, εξάλειψη των κροταφικών βόθρων, κεντρική παχυσαρκία, αύξηση του βάρους). Συχνότητα 95%.



2. Αναστολή της σωματικής αύξησης (σε παιδιά). Συχνότητα 95%.
3. Αναστολή της ενήβωσης (σε παιδιά). Συχνότητα 90%.
4. Ανωμαλίες του καταμήνιου κύκλου (σε γυναίκες). Συχνότητα 80%.
5. Κεντρικός υποθυρεοειδισμός. Συχνότητα 80%.
6. Λέπτυνση του δέρματος/υπεραιμία. Συχνότητα 80%.
7. Πανσεληνοειδές πρόσωπο. Συχνότητα 75%.
8. Αύξηση της όρεξης. Συχνότητα 75%.
9. Διαταραχές ύπνου. Συχνότητα 75%.
10. Υπέρταση. Συχνότητα 75%.
11. Υπερχοληστερολαιμία / υπερτριγλυκεριδαιμία. Συχνότητα 70%.
12. Διαταραχές των νοητικών λειτουργιών (ελλιπής συγκέντρωση, ελάττωση της μνήμης, ευφορία). Συχνότητα 70%.
13. Σακχαρώδης διαβήτης/δυσανεξία της γλυκόζης. Συχνότητα 65%.
14. Ραβδώσεις του δέρματος. Συχνότητα 65%.
15. Υπερτρίχωση. Συχνότητα 65%.
16. Αδυναμία των κεντρικών μυών. Συχνότητα 60%.
17. Ψυχικές διαταραχές (συναισθηματική αστάθεια, κατάθλιψη, μανία, ψύχωση). Συχνότητα 50%.
18. Λευκοκυττάρωση. Συχνότητα 50%.
19. Ελάττωση της libido/ανικανότητα. Συχνότητα 50%.
20. Ακμή. Συχνότητα 45%.
21. Οστεοπόρωση/παθολογικά κατάγματα. Συχνότητα 40%.
22. Αρρενοποίηση (σε γυναίκες). Συχνότητα 40%.
23. Εύκολη ανάπτυξη εκχυμώσεων. Συχνότητα 40%.
24. Ελλιπής επούλωση τραυμάτων. Συχνότητα 40%.



Πηγή: McPhee S., Μουτσόπουλος X., (2000) Παθολογική Φυσιολογία. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας

#### 4.6. Φαρμακολογικές Δράσεις Γλυκοκορτικοειδών

Τα γλυκοκορτικοειδή, είναι γνωστό ότι προάγουν τον ενδιάμεσο μεταβολισμό, αυξάνουν την αντοχή στο stress κι επηρεάζουν άλλα στοιχεία του ενδοκρινικού συστήματος. Επίσης, μεταβάλλουν τα επίπεδα των έμμορφων στοιχείων του αίματος, διεγείρουν την έκκριση γαστρικού οξέος, επιδρούν στο ΚΝΣ και ευθύνονται για απώλεια οστικής μάζας. Ακόμη, τα γλυκοκορτικοειδή έχουν ισχυρή αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική δράση και αυτό είναι το κύριο χαρακτηριστικό τους που τα κάνει πολύ χρήσιμα στη θεραπευτική πολλών νοσημάτων, γι' αυτό το λόγο η δράση τους αυτή χαρακτηρίζεται ως φαρμακολογική.

Η φλεγμονώδης απάντηση του οργανισμού στο τραύμα ή τη λοίμωξη μπορεί να διαταραχθεί από την υψηλή συγκέντρωση γλυκοκορτικοειδών στο πλάσμα, αφού τα τελευταία έχουν σημαντική επίδραση σε ένζυμα και άλλες δομές του ανοσοποιητικού συστήματος. Κατ' αρχήν αναστέλλεται η δράση της φωσφολιπάσης  $A_2$  κι έτσι δεν μπορεί να παραχθεί αραχιδονικό οξύ από τα φωσφολιπίδια των ιστών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην παράγονται θρομβοξάνες, προσταγλαδίνες, προστακυκλίνη και λευκοτριένια, που αποτελούν ισχυρούς παράγοντες της φλεγμονής (εικοσανοειδή). Επίσης, τα γλυκοκορτικοειδή σταθεροποιούν τις μεμβράνες των λυσοσωμάτων με αποτέλεσμα να αναστέλλουν την απελευθέρωση ιντερλευκίνης-1 (IL-1, ενδογενές πυρετογόνο) από τα κοκκιοκύτταρα. Επίσης καταστέλλεται η παραγωγή αντισωμάτων, αποτρέπεται η μετανάστευση των ουδετερόφιλων στα σημεία της φλεγμονής και μειώνεται το τοπικό οίδημα, όμως με την καταστολή αυτή του ανοσοποιητικού συστήματος, ο οργανισμός είναι πιο επιρρεπής στις λοιμώξεις. Τέλος, τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν τις εκδηλώσεις που προκύπτουν από την έκλυση ισταμίνης. Αυτές οι αντιφλεγμονώδεις και αντιαλλεργικές δράσεις συγκαταλέγονται στις φαρμακολογικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών. (Mycek M.J., 2003)

Οι φαρμακολογικές δράσεις της κορτιζόλης, παλαιότερα είχε θεωρηθεί ότι μπορούσαν να επιτευχθούν μόνο με υψηλές δόσεις, όμως σήμερα είναι γνωστό ότι επιτυγχάνονται σε μικρότερο βαθμό από την ενδογενή έκκριση της ορμόνης καθώς επίσης και με την εξωγενή χορήγηση γλυκοκορτικοειδών.

Τα γλυκοκορτικοειδή που χρησιμοποιούνται στη θεραπευτική είναι τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή κορτιζόλη ή υδροκορτιζόνη και το συνθετικό της παράγωγο κορτιζόνη, καθώς και τα συνθετικά πρεδνιζόνη, πρεδνιζολόνη, μεθυλοπρεδνιζολόνη, τριαμσινολόνη, παραμεθαζόνη, βηταμεθαζόνη και δεξαμεθαζόνη. (Elders M.J. et al, Am J Dis Child. 1975; 129: 1329 )

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6.2:** ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ

Παράγωγο	Αντιφλεγμονώδης Δράση*	Αλατοκορτικοειδής Δράση**	Δοσολογική Αντιστοιχία***
Κορτιζόλη (υδροκορτιζόνη)	1	++	20
Κορτιζόνη οξείκη <sup>α</sup>	0.8	++	25
Πρεδνιζολόνη	4	+	5
Πρεδνιζόνη	3.5	+	5
Μεθυλοπρεδνιζολόνη	5	0	4
Τριαμσινολόνη	5	0	4
Παραμεθαζόνη	10	0	2
Βηταμεθαζόνη	25	0	0.75
Δεξαμεθαζόνη	30	0	0.75
Φθοριοϋδροκορτιζόνη	15	+++++	----

\* Σε σύγκριση με την κορτιζόλη.

\*\* Σε σύγκριση με τη φθοριοϋδροκορτιζόνη.

\*\*\* Σε mg.

<sup>α</sup> Η οξείκη κορτιζόνη δρα μεταβολιζόμενη σε υδροκορτιζόνη.

Πηγή: Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων, (2003) *Εθνικό Συνταγολόγιο 2003*

#### 4.7. Παρενέργειες από τη Χρήση των Γλυκοκορτικοειδών

Η κορτιζόλη, ως γνωστό, είναι ορμόνη απόλυτα αναγκαία για την επιβίωση του ατόμου. (*Δελτίο Α' Παιδιατρικής κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών*). Αποτελεί, όμως, και ένα εξαιρετικό φάρμακο που δεν εκριζώνει μεν την ασθένεια για την οποία χρησιμοποιείται, δεν τη θεραπεύει, αλλά δρα «πυροσβεστικά». Η δράση αυτή παρεμποδίζει περαιτέρω ιστική καταστροφή και συμβάλλει στη διατήρηση της βιολογικής ακεραιότητας των ιστών. Η δράση αυτή αξιοποιείται ήδη από τον ίδιο τον οργανισμό σε περίπτωση φλεγμονής, όταν ενεργοποιεί, προφανώς μέσω των διαφόρων κυτοκινών, τον άξονα υποθάλαμος – υπόφυση – επινεφρίδια, με συνέπεια την αύξηση της κορτιζόλης. Γενικώς τα κορτικοειδή χρησιμοποιούνται, είτε ως θεραπεία υποκατάστασης όταν υπάρχει εγγενής αδυναμία του οργανισμού να συνθέσει κορτιζόλη, είτε ως φάρμακο για την αντιμετώπιση νοσημάτων. Οι παρενέργειες των κορτικοειδών σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δύσκολο να διαχωριστούν από τις επιδράσεις της πρωτοπαθούς νόσου για την οποία χορηγούνται. Κλασικό σχετικό παράδειγμα αποτελεί η αναστολή της ανάπτυξης που παρατηρείται στο παιδί με χρόνια αυτοάνοσο πρόβλημα.

Τόσο τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή όσο και τα συνθετικά τους παράγωγα, σε ισοδύναμες δόσεις, έχουν ισόβαθμες ανεπιθύμητες ενέργειες. Έτσι, η μακροχρόνια κυρίως χορήγηση μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές παρενέργειες. Μία από τις πιο σημαντικές είναι το ιατρογενές σύνδρομο Cushing που συνοδεύεται από ανακατανομή του λίπους του σώματος, διόγκωση του προσώπου (πανσεληνοειδές προσωπείο), αυξημένη τριχοφυΐα, ακμή και συχνά οστεοπόρωση λόγω καταστολής των οστεοβλαστών και διέγερσης των οστεοκλαστών καθώς επίσης και λόγω του αρνητικού ισοζυγίου ασβεστίου που επιφέρουν τα γλυκοκορτικοειδή. Ακόμη, με τη χορήγηση γλυκοκορτικοειδών υπάρχει ελαττωμένη επούλωση των τραυμάτων, αυξημένος κίνδυνος λοιμώξεων και εξάπλωση μικροβιακών φλεγμονών. Η κατακράτηση ύδατος και νατρίου, η υπέρταση και η υποκαλιαιμία είναι επίσης πολύ συχνές παρενέργειες, καθώς και η απορύθμιση του σακχαρώδους διαβήτη. Επιπλέον, το πεπτικό έλκος, ο καταρράκτης, η αύξηση ενδοφθάλμιας πίεσης και το γλαύκωμα, οι ψυχωσικές διαταραχές (ψύχωση, ευφορία) και η αναστολή σωματικής ανάπτυξης στα παιδιά είναι σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Η αύξηση της όρεξης στις περισσότερες περιπτώσεις θεωρείται παρενέργεια, όμως στην περίπτωση των νεοπλασιών, είναι ένας από τους λόγους που συμπεριλαμβάνεται στο θεραπευτικό σχήμα, δηλαδή στην αντιμετώπιση της καρκινικής καχεξίας. Τέλος, η αναστολή της φλοιοεπινεφριδιακής λειτουργίας και του άξονα Y–Y–E είναι πολύ σημαντική παρενέργεια αφού η αιφνίδια διακοπή του φαρμάκου μπορεί να προκαλέσει σύνδρομο οξείας επινεφριδιακής ανεπάρκειας, το οποίο μπορεί να είναι θανατηφόρο. Οι αντενδείξεις των γλυκοκορτικοειδών περιλαμβάνουν σημαντικό αριθμό νοσημάτων και παθολογικών καταστάσεων. Θα πρέπει όμως πάντα να σταθμίζεται ο δυνητικός κίνδυνος σε σχέση με το προσδοκώμενο ευεργετικό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Οι σημαντικότερες από αυτές είναι το γαστροδωδεκαδακτυλικό έλκος, ο απλός οφθαλμικός έρπητας, το γλαύκωμα, η εκσεσημασμένη οστεοπόρωση, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι ψυχώσεις, η καρδιοπάθεια ή η υπέρταση με συμφορητική ανεπάρκεια, η συστηματική μυκητίαση, φυματίωση και η βαριά νεφροπάθεια. Ακόμη, δε θα πρέπει να χορηγούνται αμέσως πριν και μετά προφυλακτικό εμβολιασμό και κατά την περίοδο του θηλασμού γιατί υπάρχει κίνδυνος αναστολής στη σωματική ανάπτυξη του βρέφους.

Οι παρενέργειες που γενικώς παρατηρούνται κατά τη φαρμακολογική χρήση των κορτικοειδών συνοψίζονται στον πίνακα 1 και ορισμένες από αυτές αναλύονται παρακάτω:

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1**  
**ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ**

Υπέρταση  
Υπεργλυκαιμία - Διαταραχή ανοχής γλυκόζης  
Οστεοπόρωση  
Αναστολή σωματικής ανάπτυξης  
Κεντρική παχυσαρκία  
Υπερλιπιδαιμία  
Υπερτρίχωση  
Ραβδώσεις  
Επιρρέπεια στις λοιμώξεις  
Καταρράκτης  
Νεφρολιθίαση  
Μυοπάθεια  
Εγκεφαλικές επιδράσεις  
Σύνδρομο αποστείρωσης

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2**  
**ΥΠΕΡΤΑΣΗ ΑΠΟ ΥΠΕΡΚΟΡΤΙΖΟΛΑΙΜΙΑ**

Μηχανισμοί

- Κατακράτηση Na
- ↑ καρδιακής προσρορίας
- Αυξημένη ανταπόκριση αγγείων σε αγγειοσυσπαστικές ουσίες και κυρίως κατεχολαμίνες
- ↓ δραστηριότητα ρενίνης-αγγiotενοσίνης II
- Κατεχολαμίνες και AVP δεν μεταβάλλονται
- ↑ ANP
- Η συμβολή της συνυπάρχουσας υπερινσοουλιναιμίας δεν είναι πλήρως τεκμηριωμένη

Να σημειωθεί ότι η αυξημένη θνησιμότητα στο σ. Cushing αποδίδεται κυρίως σε καρδιαγγειακά αίτια.

#### 4.7.1. Υπέρταση

Η υπέρταση από υπερκορτιζολαιμία (ιατρογενής ή ενδογενής -σύνδρομο Cushing-) οφείλεται κυρίως στην κατακράτηση νατρίου, αλλά και σε άλλους μηχανισμούς (πίνακας 2), όπως ο αυξημένος όγκος παλμού και η αυξημένη ανταπόκριση των αγγείων σε αγγειοσυσπαστικές ουσίες (κυρίως τις κατεχολαμίνες). Οι κατεχολαμίνες, όπως και η αντιδιουρητική ορμόνη (AVP), δεν μεταβάλλονται, ενώ αυξάνεται το νατριουρητικό πεπτίδιο (ANP). Συνυπάρχει υπερινσοουλιναιμία, η συμβολή της οποίας στην αύξηση της αρτηριακής πίεσεως δεν είναι τεκμηριωμένη. Πρέπει να τονιστεί ότι η αυξημένη θνησιμότητα στο σύνδρομο Cushing αποδίδεται σε καρδιαγγειακά αίτια.

#### 4.7.2. Υπεργλυκαιμία

Συνήθως παρατηρείται διαταραχή στην ανοχή γλυκόζης και σπανίως υπεργλυκαιμία νηστείας ή κλινικά έκδηλος σακχαρώδης διαβήτης. Εντονότερη είναι η επίδραση σε άτομα με επιρρέπεια στο ΣΔ. Τα κορτικοειδή προκαλούν αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, επιδρώντας τόσο στο ήπαρ όσο και στο μυϊκό ιστό. Η ινσουλινική αντίσταση οδηγεί σε αντιρροπιστική υπερέκκριση ινσουλίνης από το β-κύτταρο, που τελικά, ιδιαίτερα σε άτομα με μειονεκτική λειτουργία του β-κυττάρου, μπορεί να καταλήξει σε ανεπάρκεια, υποϊνσουλινισμό και κλινική εκδήλωση σακχαρώδη διαβήτη. Προφανώς, σημαντική επιδείνωση αναμένεται και από την υπερφαγία που συνήθως συνοδεύει τη χορήγηση κορτικοειδών.

#### 4.7.3. Οστεοπόρωση

Η οστεοπόρωση αποτελεί σοβαρή παρενέργεια της θεραπείας με κορτικοειδή σε όλες τις ηλικίες. Η ανάπλαση του οστικού ιστού (remodeling) αποτελεί μια εξαιρετικά περίπλοκη διαδικασία, που περιλαμβάνει αναδόμηση και αποδόμηση, δύο διαδικασίες άρρηκτα συνδεδεμένες μεταξύ τους μ' έναν καταρράκτη μορίων, που ευθύνονται για τις σημαντικές αλληλεπιδράσεις δόμησης - αποδόμησης. Η επίδραση των κορτικοειδών στη διαδικασία ανάπλασης του οστίτη ιστού και η πρόκληση της οστεοπόρωσης ασκείται σε διάφορα επίπεδα που αναφέρονται παρακάτω:

1. Μείωση της σύνθεσης του οστίτη ιστού.
2. Αύξηση της αποδόμησης (resorption).
3. Μείωση του επιπέδου των ορμονών του φύλου.
4. Μείωση της απορρόφησης του ασβεστίου από το έντερο.
5. Μείωση της επαναρρόφησης του ασβεστίου από το νεφρικό σωληνάριο.

Οι δύο παραπάνω επιδράσεις στο μεταβολισμό του ασβεστίου έχουν ως αποτέλεσμα την ελάττωση του ασβεστίου στο πλάσμα και την αντιρροπιστική αύξηση της παραθορμόνης (PTH).

#### **4.7.4. Διαταραχή της σωματικής ανάπτυξης**

Είναι γνωστή η κατασταλτική δράση των κορτικοειδών στην ανάπτυξη, που, όπως και στην περίπτωση της οστεοπόρωσης, ασκείται σε πολλαπλά επίπεδα που συνοψίζονται παρακάτω:

- Επίδραση στον υποθάλαμο με αύξηση της σωματοστατίνης, που ως γνωστό αναστέλλει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης.
- Καταστολή των εκκριτικών αιχμών της GH κατά τον ύπνο.
- Αναστολή της σύνθεσης του αυξητικού παράγοντα IGF1 στο ήπαρ και τους ιστούς, καθώς και της δράσης του στο κυτταρικό επίπεδο.
- Αναστολή στη σύνθεση του κολλαγόνου.
- Άμεση επίδραση στον αυξητικό χόνδρο, όπου αναστέλλει τόσο τη σύνθεση του IGF1, όσο και την έκφραση και δεσμευτική ικανότητα του υποδοχέα της GH.
- Κατασταλτική δράση στην έκκριση ανδρογόνων από το επινεφρίδιο.

#### **4.8. Σύνδρομο εξ αποστερήσεως κορτικοειδών**

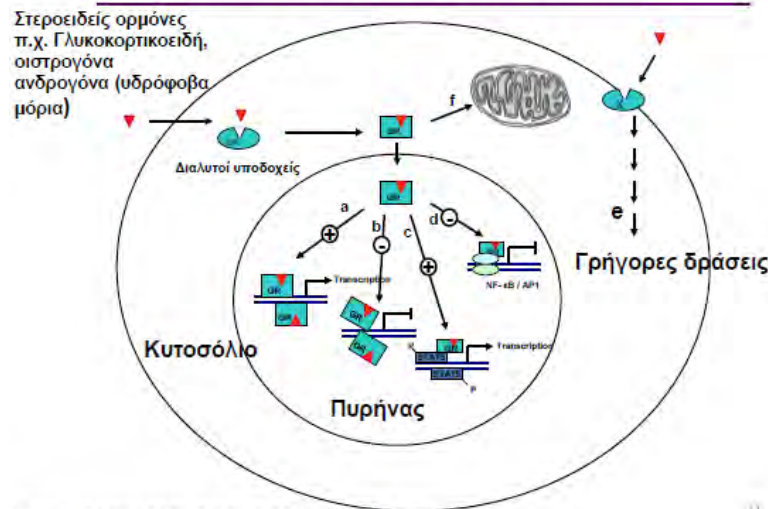
Μετά τη διακοπή των κορτικοειδών, που χρησιμοποιήθηκαν για μακρό χρονικό διάστημα ή στην περίπτωση συνδρόμου Cushing μετά την επιτυχή θεραπευτική παρέμβαση, εκτός από τον αναμενόμενο κίνδυνο της επινεφριδιακής ανεπάρκειας, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί ένα σύμπλεγμα συμπτωμάτων που αναφέρονται παρακάτω: Ανορεξία, ναυτία, εμετός, απώλεια βάρους, υπνηλία, μυαλγίες, αρθραλγίες, πυρετός, κεφαλαλγία και διαταραχές από την ψυχική σφαίρα. Μολονότι η συμπτωματολογία αυτή μπορεί να οφείλεται σε υποτροπή της πρωτοπαθούς νόσου, η περίπτωση του συνδρόμου αποστερήσεως κορτικοειδών, ανάλογο μ' εκείνο που παρατηρείται με την απεξάρτηση από τα ναρκωτικά, πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπ' όψιν κατά την αντιμετώπιση του ασθενούς.

#### **4.9. Μηχανισμός δράσης των στεροειδών ορμονών (γλυκοκορτικοειδών)**

Οι στεροειδείς ορμόνες (όπως γλυκοκορτικοειδή, οιστρογόνα, ανδρογόνα) είναι υδρόφοβα μόρια και έτσι διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, συναντούν τον διαλυτό υποδοχέα που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, δένεται με αυτόν, αλλάζει τη δομή του και ενεργοποιημένος πλέον εισέρχεται στο εσωτερικό του πυρήνα και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας δηλαδή επάγει τη μεταγραφική δραστηριότητα και κάποια γονίδια θα αρχίσουν να εκφράζονται, να ενεργοποιείται ή να αναστέλλεται η έκφρασή τους . (A.-M.G. Psarra, C.E. Sekeris 2008)



### Μηχανισμοί δράσης στεροειδών ορμονών



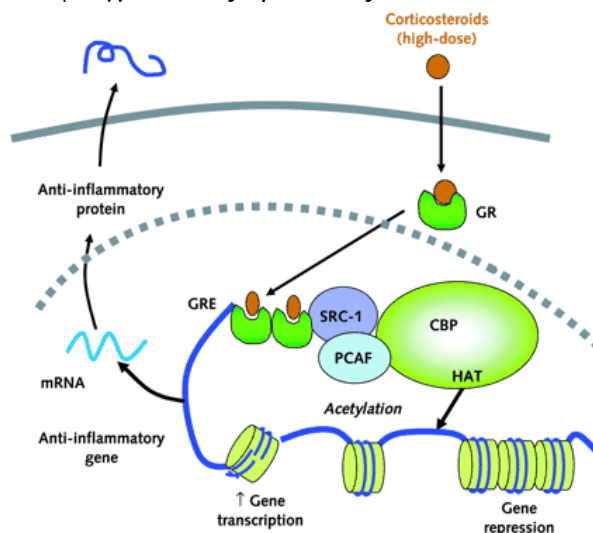
Psarra AM & Sekeris CE Biochim Biophys Acta 2008 1783:1-11

**Εικόνα 3: Μηχανισμοί δράσης των στεροειδών ορμονών:**

Οι στεροειδείς ορμόνες, μέσω της σύνδεσης προς συγγενείς υποδοχείς και την αλληλεπίδραση με το αποκρινόμενο στοιχείο των ορμονών (HREs Hormone Responsive Elements), μπορούν: (a) να ενεργοποιήσουν ή (b) να αναστείλουν τη μεταγραφή γονιδίων. Από την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης του συμπλόκου ορμόνης-υποδοχέα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες της ορμόνης μπορούν (c) να ενεργοποιήσουν, ή (d) να αποκλείσουν την μεταγραφή του γονιδίου. Η ορμόνη μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ταχείες, μη γονιδιακές επιδράσεις (e) με τις κλασικές μορφές του υποδοχέα, σε συνδυασμό με τους υποδοχείς G-πρωτεΐνης ή ακόμη αγνώστων μορίων και μηχανισμών μεταγωγής σήματος. Στα μιτοχόνδρια (f), το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα, από την αλληλεπίδραση με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, μπορεί να ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. GR, υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών: NF-κB, πυρηνικός παράγοντας κB: AP-1, ενεργοποιητής πρωτεΐνης-1: STAT5, μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 5 [προσαρμοσμένο από 5].

#### 4.10 Επαγωγή μεταγραφής αντιφλεγμονωδών γονιδίων από τα γλυκοκορτικοειδή

Όταν τα κορτικοστεροειδή χορηγούνται σε υψηλή δόση, το σύμπλοκο γλυκοκορτικοειδών/υποδοχέα προσδένεται σε ειδικές περιοχές του υποκινητή γονιδίων ανταποκρινόμενων σε στεροειδή (γνωστές ως στοιχεία απόκρισης γλυκοκορτικοστεροειδών GRE [glucocorticosteroid response elements]), επάγοντας την ενεργοποίηση παραγόντων, όπως CBP και PCAF. Οι παράγοντες αυτοί ακετυλιώνοντας τις ιστόνες επάγουν την μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν αντιφλεγμονώδεις πρωτεΐνες



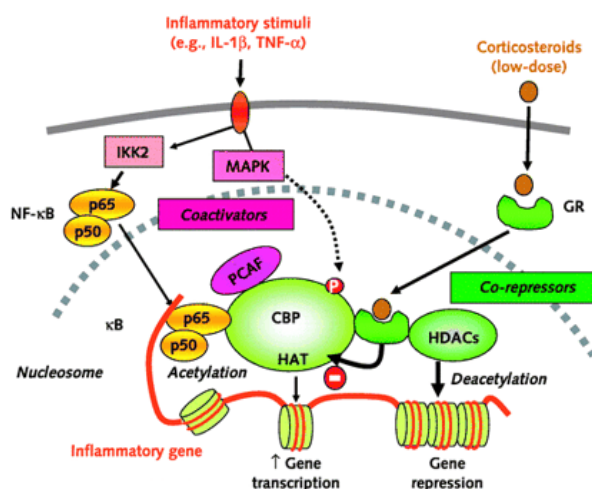
**Εικόνα 4: Επαγωγή έκφρασης αντιφλεγμονωδών γονιδίων από τα γλυκοκορτικοειδή.**

Τα γλυκοκορτικοειδή διαπερνούν την μεμβράνη, προσδένονται σε κυτταροπλασματικούς υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών, μεταφέρονται στον πυρήνα, διμερίζονται, προσδένονται σε ειδικές περιοχές, γνωστές ως GRE, του υποκινητή γονιδίων ανταποκρινόμενων σε στεροειδή, επάγουν την ενεργοποίηση παραγόντων όπως, CBP και PCAF, οι οποίοι ακετυλιώνουν τις ιστόνες και επάγουν την μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν αντιφλεγμονώδεις πρωτεΐνες.

#### 4.11 Αναστολή της μεταγραφής φλεγμονωδών γονιδίων

Η κύρια δράση των γλυκοκορτικοειδών βασίζεται στην αναστολή της σύνθεσης φλεγμονωδών πρωτεϊνών μέσω της καταστολής των γονιδίων που τις κωδικοποιούν. Για να επιτευχθεί η δράση αυτή, τα κορτικοστεροειδή χορηγούνται σε χαμηλές δόσεις και ο μηχανισμός μέσω του οποίου δρουν διαφέρει από αυτόν που αναφέρεται παραπάνω.

Τα γλυκοκορτικοειδή προσδένονται στους κυτταροπλασματικούς υποδοχείς τους, μεταφέρονται στον πυρήνα και αλληλεπιδρούν με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, τους οποίους όταν έχουν δράση ακετυλοτρανσφεράσης τους απενεργοποιούν, ενώ εκείνους με δράση απακυλάσης τους ενεργοποιούν. Γενικότερα, στόχος είναι να μην είναι ακετυλιωμένες οι ιστόνες έτσι ώστε το DNA να βρίσκεται σφιχτά τυλιγμένο και να μην ξεκινάει μεταγραφή του γονιδίου.



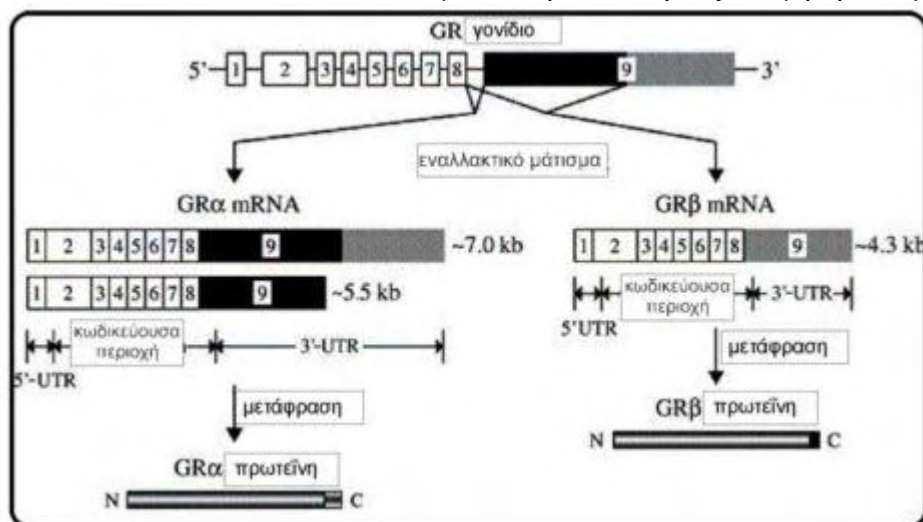
#### Εικόνα 5: Η καταστολή της έκφρασης φλεγμονωδών γονιδίων από τα κορτικοστεροειδή.

Τα γονίδια που σχετίζονται με την φλεγμονή ενεργοποιούνται από παράγοντες όπως η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β) και ο TNF-α, οι οποίοι ενεργοποιούν το μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ (p56/p50), ο οποίος στη συνέχεια αλληλεπιδρά με άλλους παράγοντες που έχουν δράση ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών (HAT) και τους ενεργοποιούν. Τα κορτικοστεροειδή χορηγούμενα σε χαμηλή δόση αναστέλλουν τις HATs ή ενεργοποιούν τις HDACs, αναστέλλοντας και στις δυο περιπτώσεις την έκφραση φλεγμονωδών γονιδίων.

## 5. Ο Υποδοχέας Γλυκοκορτικοειδών (GR)

Τα γλυκοκορτικοειδή επιτυγχάνουν τις πολλαπλές επιρροές τους με την ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Ο GR ανήκει στην υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (NR), οι οποίοι είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούν την μεταγραφή των γονιδίων στόχων τους σε απάντηση σε ειδικούς υποκαταστάτες (*Kumar και Thompson 2005*). Σήμερα περιγράφονται περισσότεροι από 60 διαφορετικοί πυρηνικοί υποδοχείς, μεταξύ των οποίων υποδοχείς για τις γνωστές πυρηνικές ορμόνες (ανοργανοκορτικοειδή, προγεστερόνη, ανδρογόνων, οιστρογόνων, και θυρεοειδικές ορμόνες, η βιταμίνη D, και ρετινοϊκό οξύ) και ένας απέραντος αριθμός των αποκαλούμενων ορφανών υποδοχέων χωρίς, ή άγνωστων, και ενδεχομένως νέων προσδεμάτων (*Mangelsdorf et al 1995, Beato & Klug 2000*). Οι NRs μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες (*Beato et al 1996*). Σύμφωνα με την επιτροπή ονοματολογίας πυρηνικών υποδοχέων (1999), οι υποδοχείς στεροειδών (SHR) και οι παρόμοιοι υποδοχείς των SHR διαμορφώνουν την υποοικογένεια 3 πυρηνικού υποδοχέα NR3. Η NR3 περιλαμβάνει δύο υποδοχείς για τα οιστρογόνα (ERα και ERβ ή NR3A1 και NR3A2 αντίστοιχα), δύο οιστρογόνο-σχετικούς ορφανούς υποδοχείς (ERRα/ERR1 και ERRβ/ERR2 ή NR3B1 και NR3B2 αντίστοιχα) και από ένα υποδοχέα για τις άλλες σημαντικές κατηγορίες στεροειδών: τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR ή NR3C1), τον υποδοχέα των μεταλλοκορτικοειδών (MR ή NR3C2), τον υποδοχέα της προγεστίνης (PR ή NR3C3) και τον υποδοχέα των ανδρογόνων (AR ή NR3C4).

Οι δύο ισομορφές του ανθρώπινου GR, ο GRα και ο GRβ παράγονται από εναλλακτικό μάτισμα ενός μόνο γονιδίου. Ο GRα αποτελείται από 777 αμινοξέα, δεσμεύει ορμόνη, και ενεργοποιεί γλυκοκορτικοειδούς απόκρισης γονίδια. Αντιθέτως, GRβ έχει μήκος μόνο 742 αμινοξέα, διαφέρει από GRα C-τελικό άκρο του, και δεν συνδέεται κάθε γλυκοκορτικοειδή αξιολογήθηκαν μέχρι σήμερα.



**Εικόνα 6: Η έκφραση των ανθρώπινων GRα και GRβ.** Στην κορυφή του σχήματος παρουσιάζεται η δομή του DNA από το ανθρώπινο γονίδιο του GR. Τα εξόνια παρουσιάζονται ως πλαίσια και είναι αριθμημένα από 1 έως 9, ενώ τα ιντρόνια παρουσιάζονται ως γραμμές. Ένα προ-mRNA μεταγράφεται από αυτό το DNA και ματίζεται με δύο διαφορετικούς τρόπους. Στο αριστερό μέρος του σχήματος το προεπιλεγμένο μονοπάτι ματίσματος περιλαμβάνει τα εξόνια 1 έως 8 και συνδέει το τέλος του εξονίου 8 με την αρχή του εξονίου 9, παράγοντας τα διαφορετικά μεγέθη των mRNAs του GRα που οφείλεται στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση. Το προεπιλεγμένο μονοπάτι ματίσματος παράγει την πρωτεΐνη GRα. Στο δεξιό μέρος του σχήματος παρουσιάζεται το εναλλακτικό μονοπάτι ματίσματος, το οποίο περιλαμβάνει τα εξόνια 1 έως 8 και συνδέει το τέλος του εξονίου 8 με το κατάρρους εξόνιο 9. Αυτή η μορφή του mRNA μεταφράζεται στην πρωτεΐνη GRβ. (Από: *Dong και Cidlowski, Encyclopedia of Hormones 2003*)

Η N-τελική περιοχή του GR (κατά προσέγγιση 1-417 αμινοξέα) περιέχει τη λειτουργία 1 ενεργοποίησης (AF-1), δραστηριότητα που διέπει ένα συστατικό



μεταγραφικό ρόλο και είναι ο στόχος διάφορων πρωτεϊνών αλληλεπίδρασης και κινασών (Hittelman *et al* 1999). Τα αμινοξέα 418 – 487 περιέχουν τη DNA προσδένουσα περιοχή (DBD) του GR. Η κρυσταλλογραφική ανάλυση αυτής της περιοχής έδειξε ότι αυτή η περιοχή αναδιπλώνεται σε μια διαμόρφωση τύπου δακτύλων ψευδαργύρου και δημιουργεί άμεση και συγκεκριμένη ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το DNA. Επιπλέον, διαμορφώνεται μια καλά καθορισμένη μεσόφαση διμερούς, δεδομένου ότι δύο DBD υπομονάδες δεσμεύουν την DNA έλικα σε παρακείμενες μείζονες αύλακες. Μετά από μία σύντομη έκταση της ακολουθίας (κατά προσέγγιση 488-520 αμινοξέα) γνωστή ως περιοχή “αρθρώσεων”, το C-τελικό άκρο του GR (αμινοξέα 521-777) περιέχει μία αναδιπλούμενη μονάδα που διατηρεί την ικανότητα να δεσμεύει τα προσδεδεμένα μόρια. Αυτή η περιοχή αναφέρεται ως περιοχή δεσμεύσεως του προσδεδεμένου μορίου (LBD). Εκτός από αυτά τα τρία σημαντικά μοτίβα, προσδιορίζονται τα πυρηνικά σήματα εντοπισμού εγκλειόμενα και στις δύο περιοχές DBD και LBD. Κάθε μία από αυτές τις περιοχές εκτελεί μία ξεχωριστή λειτουργία για να ρυθμίσει τη μεταγωγή σημάτων και τις μεταγραφικές δραστηριότητες του GR.

### 5.1 Εκλεκτικός αγωνιστής υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRA)

Οι εκλεκτικοί αγωνιστές υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs) είναι ενώσεις με στεροειδή δομή.

Ο εκλεκτικός αγωνιστής υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRA), είναι ένα είδος του πειραματικού φαρμάκου που έχει σχεδιαστεί να έχει πολλές από τις επιθυμητές αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες των γλυκοκορτικοειδών φαρμάκων, αλλά με λιγότερες παρενέργειες.

Συνθετικά στερεοειδή με SEGRA- ιδιότητες έχουν ήδη ανακαλυφθεί στα τέλη του 1990 (Vayssière *BM et al* 1997). Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 2000, συντέθηκαν πολλά δυνητικά SEGRAs, τα περισσότερα από αυτά έχουν μη-στεροειδή δομή. Οι ενώσεις ερευνήθηκαν σε κυτταρικά μοντέλα, στα οποία αποδείχτηκε ότι αυτά τα μόρια συνδέονται με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με μια συγγένεια παρόμοια με τη δεξαμεθαζόνη, ένα ισχυρό γλυκοκορτικοειδές, και ότι είναι σε θέση να καταστείλει την παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως η ιντερλευκίνη 6 και προσταγλανδίνη E2 (Lin *CW et al* 2002).

#### Μηχανισμός δράσης.

Οι μη-εκλεκτικοί γλυκοκορτικοειδή και οι εκλεκτικοί αγωνιστές υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών λειτουργούν με σύνδεση και ενεργοποίηση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR). Σε αντίθεση με τα γλυκοκορτικοειδή, τα οποία ενεργοποιούν το GR να εργαστούν μέσω δύο οδών μεταγωγής σήματος, οι SEGRAs ενώσεις ενεργοποιούν το GR με τέτοιο τρόπο ώστε να λειτουργεί μόνο μέσα από μία από τις δύο πιθανές οδούς.

Ελλείψει γλυκοκορτικοειδή, το GR βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή κατάσταση. Η πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών στον GR ενεργοποιεί τον υποδοχέα προκαλώντας διάσπαση του συνδεδεμένου HSPs. Το ενεργοποιημένο GR στη συνέχεια μπορεί να ρυθμίσει την γονιδιακή έκφραση μέσω ενός από τα δύο μονοπάτια: (Rhen *T, Cidlowski JA Oct* 2005)

Το πρώτο (άμεσο) μονοπάτι ονομάζεται **τρανσενεργοποίηση** οπότε τα ενεργοποιημένα GR διμερίζονται, μετατοπίζονται στον πυρήνα και συνδέονται με ειδικές αλληλουχίες του DNA που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης γλυκοκορτικοειδούς. Το σύμπλοκο DNA/GR προσλαμβάνει άλλες πρωτεΐνες οι οποίες μεταγράφουν το τμήμα DNA σε mRNA και τελικά πρωτεΐνη.

Το δεύτερο (έμμεσο) μονοπάτι ονομάζεται **μετακαταστολή**, στην οποία ενεργοποιείται το μονομερές GR, συνδέεται με άλλους παράγοντες μεταγραφής όπως

NP-κB και AP-1 και τα αποτρέπει από το να ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων στόχων τους. Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες-στόχους, όπως την κυκλοοξυγενάση, την NO συνθάση, την φωσφολιπάση A2, τον παράγοντα νέκρωσης όγκων, τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού βήτα, την ICAM-1, και ένα αριθμό άλλων προ-φλεγμονωδών πρωτεϊνών.

### **Πιθανές εφαρμογές**

Σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του δέρματος, όπως η ατοπική δερματίτιδα, οι παρενέργειες των κορτικοειδών είναι προβληματικές λόγω της αναγκαίας μακροχρόνιας θεραπείας. Ως εκ τούτου, τα SEGRAs είναι υπό διερεύνηση ως εναλλακτική τοπική θεραπεία.

Συστηματική μακροχρόνια θεραπεία των φλεγμονών με κορτικοειδή είναι ιδιαίτερα ικανή να προκαλέσει μεταβολικές παρενέργειες και έτσι καθιστά την ανάπτυξη των SEGRAs έναν ενδιαφέροντα στόχο.

Οι φλεγμονώδεις ασθένειες του οφθαλμού είναι επίσης μια πιθανή εφαρμογή επειδή τα κορτικοειδή μπορεί να προκαλέσουν γλαύκωμα, καταρράκτη και οφθαλμικές μολύνσεις. Μένει να φανεί εάν οι SEGRAs προκαλούν σημαντικά λιγότερες παρενέργειες από ότι τα κλασικά κορτικοειδή στην κλινική εφαρμογή. (Schäcke H, Hennekes H, Schottelius A, Jaroch S, Lehmann M, Schmees N et al. 2002).

Οι ατροφικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών δεν είναι πάντα ένα μειονέκτημα. Η θεραπεία των υπερπολλαπλασιαστικών νοσημάτων, όπως η ψωρίαση, κάνει χρήση της ιδιότητας αυτής. Τα SEGRAs θα ήταν πιθανόν να είναι λιγότερο αποτελεσματικά σε τέτοιες συνθήκες.

( [en.wikipedia.org/wiki/Selective\\_glucocorticoid\\_receptor\\_modulator](https://en.wikipedia.org/wiki/Selective_glucocorticoid_receptor_modulator))

## 6. Μιτοχόνδρια και μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

### Βιολογία και Προέλευση

Τα μιτοχόνδρια κατέχουν κεντρική θέση στη βιολογία των κυττάρων και είναι απαραίτητα για την ύπαρξη ζωής. Παρέχουν περισσότερο από 90% της ενέργειας που χρειάζεται το κύτταρο μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην αναπνευστική αλυσίδα. Τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε πολλά βήματα του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή ουρίας, στη βιοσύνθεση αίμης και β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια είναι τα βασικά συστατικά της απάντησης στο στρες, παίζουν ένα κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικού στρες μέσω της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), στην ανοσοτροποποίηση, στη διαφοροποίηση των κυττάρων και στη γήρανση. Διαταραχές των μιτοχονδριακών λειτουργιών έχουν συσχετισθεί αιτιολογικά με νευρομυϊκές εκφυλιστικές ασθένειες, (όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος του Parkinson, η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση) και στον καρκίνο.

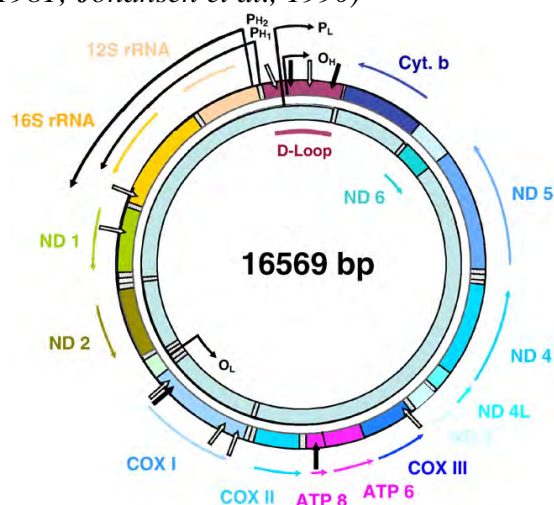
Αυτός ο κεντρικός ρόλος των μιτοχονδρίων στο μεταβολισμό των κυττάρων, απαιτεί επίσης το συντονισμό των λειτουργιών τους με εκείνες των άλλων οργανιδίων κυττάρου, κυρίως με τον πυρήνα του κυττάρου. Η παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι μια τέτοια λειτουργία, στην οποία και τα δύο πυρηνικά και μιτοχονδριακά ένζυμα που κωδικοποιούν την οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) είναι αναγκαία για το σχηματισμό του ενεργού αναπνευστικού συμπλέγματος. Το μιτοχόνδριο είναι ένας αισθητήρας των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου. Εάν οι ανάγκες για ενέργεια δεν είναι υπερβολικές, η αναπνευστική αλυσίδα αυξάνει την παραγωγή ATP από την αλλοστερική ενεργοποίηση του OXPHOS από τους μεταβολίτες, όπως ADP. Σε περιπτώσεις υψηλότερων ενεργειακών αναγκών, από γλυκοκορτικοειδείς και θυρεοειδικές ορμόνες σε κύτταρα-στόχους και κατά τη διάρκεια ορισμένων αναπτυξιακών περιόδων, τα κύτταρα αντιδρούν με αυξημένη βιοσύνθεση OXPHOS ή, σε ακραίες περιπτώσεις, με μιτοχονδριακή βιογένεση, ενοχοποιώντας αυξημένη μεταγραφή πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων OXPHOS και την αύξηση σε γονιδιακά.

Ο συντονισμός της γονιδιακής μεταγραφής OXPHOS στα δύο διαμερίσματα κυττάρων προέρχεται από τις ορμόνες του πυρήνα, όπου το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα αλληλεπιδρά με τις αντίστοιχες HREs για την επαγωγή της μεταγραφής των πυρηνικών γονιδίων OXPHOS και επίσης παραγόντων μεταγραφής για αυτά τα γονίδια.

Τα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν πολλά μιτοχόνδρια, τα οποία περιέχουν πολλά αντίγραφα mtDNA μορίων. Τα μιτοχόνδρια είναι ικανά να συντήκονται, να χωρίζονται και να μετακινούνται μέσα στο κύτταρο (*Berater-Hann J., Voth M. 1994*). Συνολικά, μπορούν να αντιστοιχούν στο 25% του όγκου του κυτταροπλάσματος. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών αποτελείται από ένα κυκλικό, δίκλωνο μόριο DNA που έχει μήκος 15.000-17.000 ζεύγη βάσεων, ένα μέγεθος που αντιστοιχεί περίπου στο 1/10.000 του μικρότερου ζωικού πυρηνικού γονιδιώματος.

Μέχρι πρόσφατα, επικρατούσε η αντίληψη ότι υπάρχει συγκεκριμένη διάταξη των γονιδίων στο μιτοχονδριακό DNA. Ο λόγος που πιστευόταν κάτι τέτοιο ήταν ότι οι πρώτες ολοκληρωμένες αλληλουχίες μιτοχονδριακού γονιδιώματος που καθορίστηκαν σε τάξεις σπονδυλωτών δεν είχαν καμία διαφοροποίηση στη θέση των γονιδίων κατά μήκος του μορίου. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι έχουν βρεθεί διάφορες ανακατατάξεις και διαφοροποιήσεις από την επικρατούσα τυπική δομή που αναφέρεται για το μιτοχονδριακό γονιδίωμα σε διάφορες κατηγορίες οργανισμών (*Mindell D.P., et al. 1998*). Το τυπικό μιτοχονδριακό γονιδίωμα των σπονδυλωτών

υποστηρίζεται ότι αποτελείται από μία μη κωδικοποιούσα ρυθμιστική περιοχή, 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, δύο ριβοσωμικά RNA (rRNA) και 22 μεταφορικά RNA (tRNA) καταναμεμένα στο κυκλικό μόριο DNA. (Anderson *et al.* 1981; Bibb *et al.*, 1981; Johansen *et al.*, 1990)



**Εικόνα 7.** Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα θηλαστικών και οι θέσεις στο γονιδίωμα του αλληλουχίες που δείχνει ομοιότητα με το αποκρινόμενο στοιχείο των ορμονών (HREs) για στεροειδείς και θυρεοειδικές ορμόνες. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα θηλαστικού είναι ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο περίπου 16 Kb (ανθρώπινο: 16569 βάσεις). Οι δύο κλώνοι του DNA έχουν ασύμμετρη κατανομή των πουρινών και πυριμιδινών, δημιουργώντας βαριές (H) και ελαφριές (L) αλυσίδες. Ο κλώνος L μεταγράφεται από μία κυρίαρχη προαγωγό (PL), ενώ το σκέλος H μεταγράφεται από δύο γειτονικούς υποκινητές (PH1 και PH2), που βρίσκεται στην περιοχή έλεγχου που περιλαμβάνει μια μετατόπιση (D) βρόχου. Η απουσία ενδογονιδιακού χώρου υποδηλώνει ότι η διαμόρφωση της έκφρασης των γονιδίων περιορίζεται στο D-loop, αν και η πιθανή παρουσία ενδογονικών ρυθμιστικών αλληλουχιών θα μπορούσαν να προσφέρουν δυνατότητες της ρύθμισης των άλλων σταδίων της διαδικασίας της μεταγραφής. Μεταγραφή που προέρχονται από PH2 και PL δημιουργεί πολλά, πολυκιστρονικά προϊόντα, μερικά από τα οποία είναι σχεδόν το μήκος πλήρους γονιδιώματος, στη συνέχεια σε επεξεργασία στις θέσεις του μεταφορικού RNA γονιδίων που κωδικοποιούν, απελευθερώνοντας ώριμο mRNA, και τα tRNAs. Μεταγραφή από PH1 παράγει ένα σύντομο μήνυμα που περιέχει τα δύο rRNAs, που καταλήγει στο ειδική θέση στο γονίδιο tRNA-Leu. Ένας παράγοντας τερματισμού μεταγραφής (mTERF) που προωθεί την λήξη της μεταγραφής ξεκίνησε στο χώρο PH1. Τα mRNAs κωδικοποιούν τρεις υπομονάδες οξειδάσης κυτοχρώματος (I, II και III, COX I, COX II, COXIII), επτά NADH-CoQ-ρεδουκτάσης (ND 1-6 και ND4L), ένα του κυτοχρώματος b (Cyt- b), δύο ATP-συνθάσης (ATP 6, 8), δύο ριβοσωμικά RNAs (12S και 16S rRNA) και 22 τα tRNAs. Μόνο ND6 και το Gln, Ala, Asn, Cys, Tyr, Ser, Glu και τα Pro-tRNA που δημιουργούνται από τη μεταγραφή (L) αλυσίδας. Τρεις μεταγραφές παραγόντων που έχουν χαρακτηριστεί, mTFA, mTFB1 και mTFB2. Οι θέσεις στο γονιδίωμα της προβλεπόμενης και επαληθεύονται πειραματικά οι θέσεις πρόσδεσης για στεροειδείς και θυρεοειδικές ορμόνες που απεικονίζονται: Ανοιχτά βέλη: HREs για την κατηγορία I υποδοχείς, κλειστά βέλη: HREs για τους υποδοχείς κατηγορίας II [προσαρμοσμένο από 5].

Αρκετές νευροεκφυλιστικές ασθένειες, π.χ. η νόσο του Alzheimer, η νόσος Parkinson και η νόσος (χορεία) του Huntington, φαίνεται να σχετίζεται αιτιολογικά με μιτοχονδριακές ανωμαλίες του DNA. Εκτός από τις μεταλλάξεις στα δομικά γονίδια, με γνωστές συνέπειες τους στη μιτοχονδριακή λειτουργία, ο ρόλος των ελαττωμάτων στις ρυθμιστικές θέσεις του μιτοχονδριακού γονιδιώματος θα πρέπει να εξεταστεί από την άποψη αυτή. Αυτό τονίστηκε προηγουμένως και μάλιστα πειραματικά αποδείχθηκε στην περίπτωση της νόσου του Alzheimer, όπου μεταλλάξεις στο D-βρόχου των μιτοχονδρίων του εγκεφάλου κατέστειλε τη μιτοχονδριακή μεταγραφή και αντιγραφή. (A.-M.G. Psarra, C.E. Sekeris 2008)

## 7. Ο μηχανισμός της απόπτωσης

Είναι γνωστό ότι υπάρχουν δύο μορφές κυτταρικού θανάτου: η απόπτωση και η νέκρωση. (Ameisen JC 1996). Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αποτελεί φυσιολογική μορφή «αυτοκτονίας» των κυττάρων και σχετίζεται με χαρακτηριστικές μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές στα κύτταρα στόχους που διαφέρουν σημαντικά από τα αντίστοιχα φαινόμενα που παρατηρούνται στη νέκρωση. Αυτές περιλαμβάνουν την εμφάνιση αλλοιώσεων στην κυτταρική μεμβράνη και τροποποιήσεων στο μοριακό προσανατολισμό των μεμβρανικών λιπιδικών συστατικών (αλλαγή στην κυτταρική συμμετρία), την απορύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, καθώς και την ενεργοποίηση ειδικών νουκλεασών που υδrolύουν το χρωμοσωμικό DNA σε ποικίλου μεγέθους γενομικά θραύσματα. Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος συνιστά μια γενετικά προκαθορισμένη διεργασία, όπου το κυτταρικό σώμα σταδιακά συρρικνώνεται, εμφανίζοντας υψηλά συμπυκνωμένα κυτταροπλασματικά και πυρηνικά θραύσματα, τα οποία συγκροτούνται σε αποπτωτικά σωμάτια απλής ή πολλαπλής μεμβρανικής προέλευσης. Η επακόλουθη φαγοκυττάρωση αυτών από λειτουργικά εξειδικευμένα γειτονικά κύτταρα (μακροφάγα) διασφαλίζει την πλήρη απομάκρυνση τοξικών ενδοκυτταρικών συστατικών και την επακόλουθη προστασία των παρακείμενων ιστών (.Gregory CY, Bird AC. 1995).

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος παρατηρείται συχνά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την εξέλιξη των οργάνων και συμβάλλει στην ομοιόσταση των ιστών. Ο κυτταρικός θάνατος μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης είναι ένα φαινόμενο το οποίο απαιτεί κατανάλωση ενέργειας για να πραγματοποιηθεί σε αντίθεση με τη νέκρωση όπου δεν απαιτείται ενέργεια. Η μορφή του κυτταρικού θανάτου, αποπτωτική ή νεκρωτική, εξαρτάται από το είδος, την ένταση και τη διάρκεια των τραυματικών ερεθισμάτων και από τα ενεργειακά αποθέματα του κυττάρου. Κύτταρα τα οποία έχουν εισέλθει στη διαδικασία της απόπτωσης, μπορεί στη συνέχεια να υποστούν νέκρωση λόγω ελάττωσης των ενεργειακών επιπέδων (Saikumar P, et al 1998.). Αυτή η αλληλοεπικάλυψη νεκρωτικών και αποπτωτικών φαινομένων είχε σαν αποτέλεσμα τη λανθασμένη ερμηνεία μηχανισμών κυτταρικού θανάτου σε ιστούς που νοσούν και ιδιαίτερα σε ιστούς που εμφανίζουν ισχαιμία.

Η νέκρωση είναι η μορφή του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από οξείες κυτταρικές βλάβες, όπως είναι η ισχαιμία, η υπερθερμία, η υποθερμία, η υποξεία, ο φυσικός ή χημικός τραυματισμός κ.τ.λ. Χαρακτηρίζεται από ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, οίδημα του κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων, διαρροή κυτταροπλασματικού περιεχομένου και πλήρη λύση του κυττάρου. Το άμεσο αποτέλεσμα αυτής της διεργασίας είναι συχνά η απελευθέρωση επιβλαβών ενδοκυτταρικών συστατικών, τα οποία προκαλούν φλεγμονές καθώς και επιπρόσθετες αλλοιώσεις στους περιβάλλοντες ιστούς. Σε πλήρη αντίθεση με τους μηχανισμούς της κυτταρικής νέκρωσης, οι στερεότυπες αλλαγές που συνοδεύουν τη διαδικασία της απόπτωσης εισηγούνται την παρουσία ενός άριστα οργανωμένου κυτταρικού προγράμματος, το οποίο βρίσκεται κάτω από συνεχή γενετικό έλεγχο (Aravind L, et al).

Η πολυπλοκότητα του αποπτωτικού μηχανισμού οφείλεται στο γεγονός ότι οι ίδιες οδοί χρησιμοποιούνται και για τη μετάδοση σημάτων αύξησης και διαφοροποίησης.

Η απόπτωση επιτελείται σε τρία διαδοχικά στάδια: (Sen S. *Biological Review of the Cambridge Philosophical Society* 67)

- Προγραμματισμός σε θάνατο από εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια σήματα,
- Ολοκλήρωση του κυτταρικού θανάτου μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών

- Απομάκρυνση των διαλυμένων κυττάρων με φαγοκυττάρωση και διάσπασή τους από λυσοσωματικά ένζυμα.

### 7.1 Γονίδια που Σχετίζονται με την Απόπτωση

Εκτενής γενετική ανάλυση αποκάλυψε την ύπαρξη τριών κυρίως γονιδίων που ελέγχουν τον αποπτωτικό θάνατο σε όλα τα σωματικά του κύτταρα. Από αυτά τα δύο ced-3 και ced-4 προάγουν την κυτταρική απόπτωση, ενώ το τρίτο το ced-9 δρα ανασταλτικά.

Μέχρι σήμερα μεγάλος αριθμός γονιδίων έχουν συσχετισθεί με τη ρύθμιση της απόπτωσης:

- Τα επαγωγικά, όπως η οικογένεια των γονιδίων ICE (Interleukin-1β Converting Enzyme), τα γονίδια ced-3, ced-4, bax, bcl-xS, bad κ.α. (*Steller H. 1995*)
- Τα ανασταλτικά, όπως τα bcl-2, bcl-XL, bcl-w κ.α. και
- Οι παράγοντες μεταγραφής, όπως c-myc, p53, p21/waf-1, c-fos, jun, cdc25 κ.α.

Κεντρικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης παίζουν και τα γονίδια fas και fas ligand, τα οποία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Fas και Fas ligand. (*Nagata S. 1996*).

#### 7.1.1 Fas-Fas ligand

Το γονίδιο fas ligand, που βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 1, κωδικοποιεί το προσδετικό μόριο του υποδοχέα Fas, το μόριο Fas Ligand (FasL), γνωστό και ως CD95L. Η οικογένεια των υποδοχέων τύπου Fas (CD95) περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών μελών, όπως είναι οι δύο υποδοχείς του TNF (TNFR1 και TNFR2), ο υποδοχέας της λεμφοτοξίνης-β, τα CD40, CD27 και CD30 μεμβρανικά αντιγόνα.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, που παρατηρείται τόσο κατά τη μορφογένεση όσο και κατά τη λειτουργική απόκριση του ανοσολογικού συστήματος σε πλήθος ενδογενών ή εξωγενών αντιγόνων, αποδίδεται ουσιαστικά στην ενδοκυττάρια μεταγωγή του TNF και FasL αποπτωτικού σήματος. Μελέτες έδειξαν τη συμμετοχή των πρωτεϊνών Fas/Fas ligand στην εξάλειψη ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων κατά τη λήξη μιας ανοσολογικής αντίδρασης, στην καταστροφή κυττάρων στόχων (όπως κύτταρα προσβεβλημένα από ιούς ή καρκινικά κύτταρα) μέσω των T-κυτταροτοξικών κυττάρων και των NK και στην εξάλειψη κυττάρων φλεγμονής σε ανοσολογικά προνομιακούς ιστούς, όπως ο όρχις και ο οφθαλμός. Ο τερματισμός της ανοσολογικής απάντησης επιτυγχάνεται ουσιαστικά δια μέσου του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των ενεργοποιημένων κυτταρικών υποπληθυσμών. Ο εκφυλισμός των μολυσμένων από ιό κυτταρικών κλώνων πραγματοποιείται δια μέσου παρόμοιων αποπτωτικών διαδικασιών, οι οποίες όμως επάγονται από τους γειτονικούς T-κυτταροτοξικούς υποπληθυσμούς. Η συνεχής ιδιοσυστατική έκφραση του FasL στην κυτταρική μεμβράνη τόσο των ανοσοπροστατευμένων ιστών (οφθαλμός και όρχις), όσο και άλλων νεοπλαστικών πληθυσμών προκαλεί τον κατευθυνόμενο προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των γειτονικών T-κυτταροτοξικών κλώνων και την επακόλουθη αποφυγή επιπρόσθετης ιστολογικής καταστροφής.

Αρχικά εθεωρείτο ότι, ο FasL είναι ειδικός για λεμφικούς ιστούς και ανιχνεύεται κυρίως σε ενεργοποιημένα T-κύτταρα, σε NK: natural killer κύτταρα, καθώς και σε ανοσολογικά προνομιούχους ιστούς, οι έρευνες όμως έδειξαν την έκφραση του και σε μη λεμφικούς ιστούς όπως η καρδιά και το πάγκρεας. Τελευταία διαπιστώθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών Fas/Fas ligand και σε θυρεοειδικά κύτταρα και

πιθανολογείται η συμμετοχή της οδού Fas στην παθογένεια αυτοάνοσων θυρεοειδικών αλλά και άλλων νοσημάτων του ενδοκρινικού συστήματος. Πειράματα σε επίμυες με ελλείμματα των υποδοχέων Fas και FasL έδειξαν συσσώρευση λεμφοκυττάρων και ένα θανατηφόρο αυτοάνοσο σύνδρομο με μαζική διόγκωση λεμφαδένων (*Mitsiades N, et al 1998*).

### 7.1.2 Οικογένεια των γονιδίων ICE

Από τους πιο σημαντικούς παράγοντες της απόπτωσης είναι και η οικογένεια των γονιδίων ICE. Η υπερέκφραση του γονιδίου ICE φαίνεται ότι προάγει τον αποπτωτικό μηχανισμό. Η αποπτωτική δράση του γονιδίου ICE αναστέλλεται από την έκφραση του bcl-2 και του γονιδίου crmA. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο crmA είναι ειδικός αναστολέας της πρωτεΐνης ICE. Ένα δυνητικό υπόστρωμα για τις πρωτεάσες ICE/CED3, κατά τη διαδικασία της απόπτωσης, είναι η πολύ-ADPριβο-πολυμεράση (PARP). Το PARP είναι ένα ένζυμο που σχετίζεται με την επιδιόρθωση του DNA και την προστασία της ακεραιότητας του γενώματος. Άρα, η πρωτεόλυση του ενζύμου PARP από ένα ένζυμο της οικογένειας ICE θα έχει ως αποτέλεσμα τη μη επιδιόρθωση του DNA και την έναρξη της απόπτωσης (*Tanaka Y, et al 1984*).

### 7.1.3 Οικογένεια Bcl-2

Το πρωτοοικογονίδιο Bcl-2 συνιστά τον ced-9-ομόλογο αντι-αποπτωτικό σηματοδότη των θηλαστικών, το οποίο βρέθηκε ότι προάγει την κυτταρική επιβίωση, όταν υπερεκφραστεί, είτε σε ced-9 ανεπαρκείς σκώληκες, είτε σε αθανатоποιημένα κύτταρα θηλαστικών, τα οποία αναπτύσσονται απουσία των αντίστοιχων τροφικών τους παραγόντων (νευροτροφικών ή μυελοτροφικών). Η ced-9 / Bcl-2 υπεροικογένεια των θηλαστικών αριθμεί τουλάχιστον δεκαεννέα πρωτεϊνικά μέλη, τα οποία συμμετέχουν είτε επαγωγικά είτε κατασταλτικά στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (*Kumar S. 1997*). Τα Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-w, Bfl-1 και Mcl-1 πρωτεϊνικά μέλη αναστέλλουν την αποπτωτική διαδικασία, ενώ αντίθετα τα αντίστοιχα Bad, Bax, Bak, Bik, Bid, Bim, Hrk και Bcl-xS την ενεργοποιούν. Η δυνατότητα δημιουργίας πλήθους ετεροδιμερών συμπλόκων ενισχυτικής ή ανασταλτικής δράσης μεταξύ διαφορετικών μελών της Bcl-2 οικογένειας καθορίζει και την τελική αποπτωτική συμπεριφορά των αντίστοιχων κυττάρων στόχων. Συγκεκριμένα, σε αναστολή της έκφρασης του γονιδίου bcl-2, η διέγερση της απόπτωσης απαιτεί την έκφραση του γονιδίου bax. Όταν όμως συνεκφράζονται τα γονίδια bcl-2 και bax, η πρωτεΐνη Bax ενώνεται με την Bcl-2 και έτσι εξουδετερώνεται η δράση των γονιδίων αυτών στην απόπτωση. Η αποτυχία σύνδεσης της πρωτεΐνης Bax γύρω από την Bcl-2 προκαλεί την έναρξη της απόπτωσης, καθώς επίσης και τη δημιουργία Bax ομοδιμερών (*Oltvai ZN, et al 1993*). Τελευταία παρατηρήθηκε ότι μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης Bcl-2, μπορεί να προάγουν τον κυτταρικό θάνατο σε ορισμένες περιπτώσεις, ενώ οι μεγάλες ποσότητες των πρωτεϊνών Bax και Bak μπορεί να έχουν κυτταροπροστατευτική δράση (*Chen J, et al. 1996*).

Τόσο η ced-9 όσο και η Bcl-2 αντιαποπτωτική πρωτεΐνη εμπεριέχουν ένα διαμεμβρανικό δομικό πυρήνα, ο οποίος επιτρέπει την εντόπιση αυτών στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, του ενδοπλασματικού δικτύου και του κυτταρικού πυρήνα.

Η δυνατότητα των μελών της Bcl-2 οικογένειας να δημιουργούν διαφορετικής λειτουργικότητας πόρους-κανάλια στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων σχετίζεται άμεσα με τροποποίηση της ενδοκυτταρικής κατανομής του κυτοχρώματος c μετά την επαγωγή του αποπτωτικού θανάτου. Τόσο η πρόκληση γενοτοξικών αλλοιώσεων (γ-ακτινοβολία), όσο και η στέρση νευροτροφικών (NGF: παράγοντας

αύξησης νεύρων) ή μυελοτροφικών (IL-3: Ιντερλευκίνη 3) παραγόντων από τα αντίστοιχα κύτταρα στόχους, επάγει την άμεση μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, με αποτέλεσμα την αλλαγή του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού, την παραγωγή ελευθέρων ενεργών ριζών οξυγόνου, τη διάνομιση του πόρου μετάπτωσης και διαπερατότητας και την απελευθέρωση, από το μεσομεμβρανικό μιτοχονδριακό χώρο, στο κυτταρόπλασμα του κυτοχρώματος c (Antonsson B. 2001). Αυτή ακριβώς η μετακίνηση του κυτοχρώματος c στον κυτταροπλασματικό χώρο μπορεί να ανασταλεί μετά την υπερέκφραση της Bcl-2 πρωτεΐνης ή να προαχθεί από την επαγωγή της Bax ενεργότητας. Σε αντίθεση με τα Bcl-2 / Bcl-2 ομοδιμερή και τα Bcl-2 / Bax ετεροδιμερή, τα Bax / Bax ομοδιμερή επιτρέπουν την εισροή ιόντων διαμέσου της μιτοχονδριακής μεμβράνης, κινητοποιώντας είτε άμεσα είτε έμμεσα την επακόλουθη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Η εκλεκτική σύνδεση του κυτοχρώματος c με τον κυτταροπλασματικό προσαρμοστή Araf1, ο οποίος συνιστά το ced-4 ομόλογο γονίδιο των θηλαστικών, προάγει την ενεργοποίηση του πρωτεολυτικού συστήματος των κασπασών, οδηγώντας τελικά στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Η Araf1 πρωτεΐνη λειτουργεί ως μοριακή γέφυρα ανάμεσα στα Bcl-2 και Bcl-X1 μιτοχονδριακά συστατικά και στο κυτταροπλασματικό σύστημα των διαδοχικά ενεργοποιούμενων κασπασών. Τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας, όπως οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-X1 δρουν επίσης παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση των κασπασών και κατ' επέκταση την απόπτωση. Η υπερέκφραση των αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2 αναστέλει την απόπτωση που πυροδοτείται από μια σειρά ερεθισμάτων, όπως η ελάττωση των παραγόντων ανάπτυξης, η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή ή με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες και η έλλειψη του NGF σε νευρώνες. Σε κάποιες κυτταρικές σειρές φαίνεται ότι προστατεύει το κύτταρο και από την απόπτωση που επάγεται μέσω των TNFR ή Fas. Τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 που μελετήθηκαν περισσότερο είναι οι πρωτεΐνες Bax και Bid. Η πρωτεΐνη Bax εντοπίζεται φυσιολογικά στο κυτταρόπλασμα. Παρατηρείται μετατόπισή της προς τα μιτοχόνδρια, ύστερα από τη δράση αποπτωτικών ερεθισμάτων. Διαπιστώθηκε επίσης ότι αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης, σχηματίζοντας πόρους και απελευθερώνοντας με αυτόν τον τρόπο κυτόχρωμα c. Δεν απαιτείται ενεργοποίηση των κασπασών ούτε για τη μετακίνηση της πρωτεΐνης, ούτε για το σχηματισμό των πόρων. Αντίθετα, η πρωτεΐνη Bid απαιτεί πρωτεόλυση μέσω της κασπάσης-8 για την αποπτωτική της δράση. Μετά την διάσπασή της, η πρωτεΐνη Bid μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια και απελευθερώνει κυτόχρωμα c αυξάνοντας εκλεκτικά τη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης, πιθανόν μέσω της αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη Bax. Οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-X1 δεν αναστέλλουν τη διάσπαση της Bid μέσω της κασπάσης-8 ούτε τη μετατόπισή της στα μιτοχόνδρια, παρεμποδίζουν όμως την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c.

#### 7.1.4 Γονίδια c-myc και p53

Σημαντικό ρόλο στην απόπτωση παίζουν και τα γονίδια c-myc και p53. Το c-myc φαίνεται να διεγείρει τόσο τον πολλαπλασιασμό όσο και την απόπτωση, ανάλογα με τη δράση άλλων σημάτων, όπως για παράδειγμα την παρουσία αυξητικών παραγόντων. Η επαγωγή της απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης του γονιδίου c-myc απαιτεί την παρουσία λειτουργικής πρωτεΐνης P53. Η συνεχής έκφραση του γονιδίου c-myc αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων στην απόπτωση που επάγεται από τις πρωτεΐνες θερμικού shock (heat shock proteins) την κυκλοεξαμίδη, καθώς επίσης και από μια σειρά αντικαρκινικών παραγόντων (*Hermeking H, et al 1994*).

Το γονίδιο p53 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη P53, η οποία προκαλεί διακοπή του πολλαπλασιασμού και κατευθύνει το κύτταρο στη διαδικασία της διαφοροποίησης. Γι



αυτό και το γονίδιο p53 χαρακτηρίζεται ως ογκοκατασταλτικό, ενώ μεταλλάξεις του έχουν παρατηρηθεί σε ορισμένους τύπους καρκίνου, όπως στον καρκίνο του μαστού.

## 7.2 Επαγωγή της απόπτωσης

Υπάρχουν δύο κύριοι οδοί που μπορούν να οδηγήσουν ένα κύτταρο σε αποπτωτικό θάνατο : η θετική επαγωγή μέσω της σύνδεσης ενός υποκαταστάτη σε υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης και η αρνητική επαγωγή με την απώλεια ενός κατασταλτικού σήματος. Πολλές ορμόνες, κυτταροκίνες και παράγοντες ανάπτυξης, είναι γνωστό ότι δρουν ως παράγοντες επιβίωσης, παρεμποδίζοντας την έναρξη της απόπτωσης. Αντίθετα, άλλοι παράγοντες επάγουν ή ενισχύουν την αποπτωτική διαδικασία. Παράγοντες όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία ή τοξίνες που δρουν στο DNA, ενεργοποιούν άμεσα την επαγωγή της απόπτωσης, προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό ή ανάπτυξη νεοπλασίας. Η θετική επαγωγή της απόπτωσης επιτυγχάνεται με κυτταρικούς υποδοχείς ή/και διαλυτά προσδετικά μόρια (ligands). Με τη σύνδεση των προσδετικών μορίων σε τέτοιους υποδοχείς, όπως στον TNFR1 ή στον Fas, τα αποπτωτικά σήματα μεταβιβάζονται σε μόρια-προσαρμοστές και οδηγούν στην ενεργοποίηση ενζύμων που έχουν δομική ομοιότητα με το μετατρεπτικό ένζυμο της ιντερλευκίνης 1β (ICE: Interleukin-1β Converting Enzyme) (Nagata S. 1996).

Θετική επαγωγή της απόπτωσης παρατηρείται κατά την εξάλειψη ενεργοποιημένων περιφερικών Τ-λεμφοκυττάρων στο τέλος μιας ανοσολογικής αντίδρασης. Η θετική επαγωγή της απόπτωσης είναι άμεση και ενισχύεται με αναστολείς της πρωτεϊνολύσεως. Κεντρικό ρόλο παίζουν οι υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας (death receptors), οι οποίοι μεταδίδουν σήματα από ειδικούς υποκαταστάτες και ενεργοποιούν τον αποπτωτικό μηχανισμό των κασπασών. Οι υποδοχείς θανάτου (death receptors) που γνωρίζουμε μέχρι σήμερα είναι μέλη της υπερικογενείας των γονιδίων που κωδικοποιούν τον υποδοχέα του Παράγοντα Νέκρωσης των Όγκων TNF ( CD95/Fas/Apo 1, TNFR1, DR3, DR4, DR5, κ.α.).

Στις περιπτώσεις αρνητικής επαγωγής της απόπτωσης τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση, όταν σταματούν να λαμβάνουν σήματα επιβίωσης είτε από το περιβάλλον τους (π.χ. έλλειψη νευροτροφικών παραγόντων) είτε ενδοκυττάρια, όπως για παράδειγμα, όταν ένα κύτταρο υποστεί μια μη αναστρέψιμη εσωτερική βλάβη (Nagata S. 1996). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται στους νευρώνες, οι οποίοι οδηγούνται σε απόπτωση, όταν σταματούν να λαμβάνουν ηλεκτρικά ερεθίσματα ή όταν στερηθούν νευροτροφικούς παράγοντες (Masters SA, et al 1999). Σε αντίθεση με τη θετική επαγωγή, η αρνητική επαγωγή της απόπτωσης είναι μια πολύπλοκη διαδικασία μετάδοσης σημάτων, με πολλά στάδια, κατά τα οποία είναι απαραίτητη η σύνθεση πρωτεϊνών. Η αρνητική επαγωγή της απόπτωσης, με την απώλεια κατασταλτικού σήματος αφορά τα μιτοχόνδρια. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα πυροδοτεί την ενεργοποίηση των κασπασών. Οι μεταβολές στη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της απόπτωσης μέσω αυτής της οδού, ενώ οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια Bcl-2 ρυθμίζουν την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης για τα ιόντα και το κυτόχρωμα c (Liu X, et al 1996).

## 7.3 Κασπάσες και απόπτωση

Οι κασπάσες αποτελούν ένζυμα τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεασών και συμμετέχουν σε μια αλυσιδωτή αντίδραση που πυροδοτείται από προαποπτωτικά σήματα και οδηγεί στην κατάτμηση του DNA και στη διάλυση του κυττάρου. Το πλέον κριτικό στάδιο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου εντοπίζεται στην

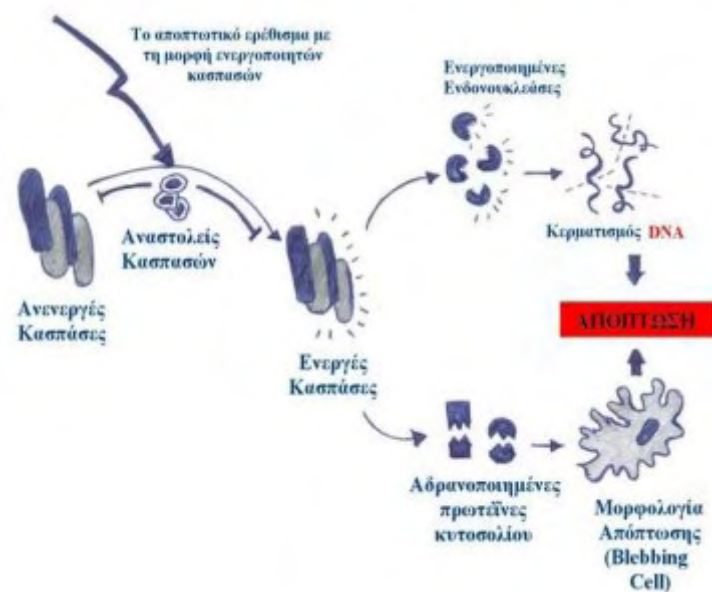
εκλεκτική σχάση-διάσπαση των υποστρωμάτων στόχων, μετά τη διαφορική ενεργοποίηση του πρωτεολυτικού συστήματος των κασπασών.

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 14 κασπάσες θηλαστικών με διαφορετικούς ρόλους στη φλεγμονή και στην απόπτωση. Ένας τρόπος δράσης των κασπασών είναι η απενεργοποίηση των πρωτεϊνών που προστατεύουν το κύτταρο από τον αποπτωτικό θάνατο. Ένας άλλος τρόπος είναι η άμεση καταστροφή κυτταρικών σκελετών, όπως η πυρηνική lamina, που βρίσκεται κάτω από την κυτταρική μεμβράνη και συμβάλει στην οργάνωση της χρωματίνης (Orth K et al 1996). Επιπλέον, οι κασπάσες απορρυθμίζουν τη δράση των πρωτεϊνών με διαχωρισμό των ρυθμιστικών και καταλυτικών περιοχών τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ή την απόκτηση κάποιας πρωτεϊνικής λειτουργίας. Για παράδειγμα, απορρυθμίζουν τη δράση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA, στην ωρίμανση του m-RNA, και στην αντιγραφή του DNA. Αυτά φαίνεται να συμβάλλουν στη δυσλειτουργία των ομοιοστατικών και επιδιορθωτικών μηχανισμών και να οδηγούν στη διάλυση του κυττάρου. Επίσης, προκαλούν την αποστολή σημάτων από τα κύτταρα, με κατάληξη τη δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων και τη φαγοκυττάρωση.

Στην απόπτωση οι κασπάσες λειτουργούν είτε ως initiators «εναρκτές», είτε ως effectors «τελεστές» της διαδικασίας διάλυσης του κυττάρου, ως απάντηση σε προαποπτωτικά σήματα.

Οι κασπάσες εντοπίζονται με τη μορφή πρόδρομων ανενεργών ενζύμων - ζυμογόνων (προκασπάσες) στον κυτταροπλασματικό χώρο όλων σχεδόν των κυτταρικών τύπων. Η αποπτωτικά ρυθμιζόμενη ενεργοποίηση των προ-κασπασών σε λειτουργικές πρωτεάσες επιτυγχάνεται δια μέσου δύο αλληλέπληλων πρωτεολυτικών σχάσεων της πρόδρομης μορφής, με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο υπομονάδων διαφορετικού μοριακού μεγέθους, καθώς και ενός ακραίου αμινοτελικού θραύσματος. Η αυτοσυγκρότηση των δύο υπομονάδων σε ετεροτετραμερή συμπλέγματα με δύο συμμετρικά ενεργά κέντρα διαμορφώνει την τελική μορφή της ενεργοποιημένης κασπάσης.

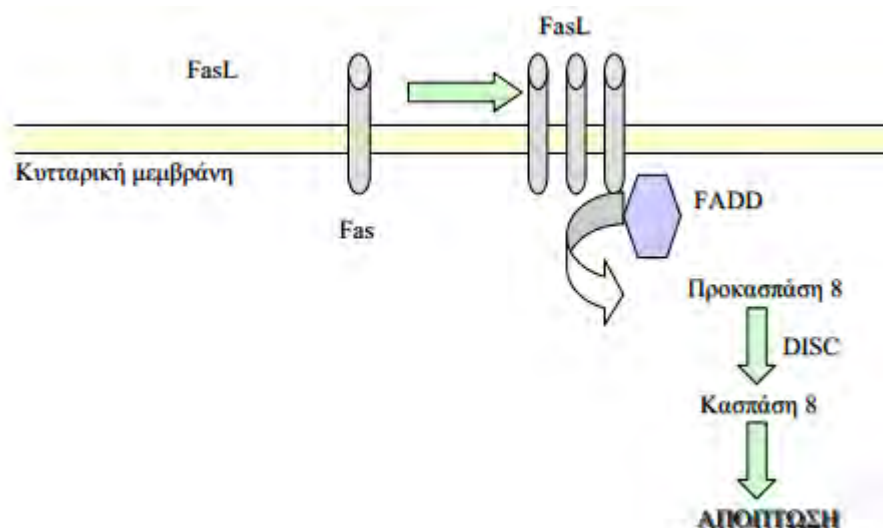
Η ενεργοποίηση των κασπασών-εναρκτών απαιτεί τη σύνδεσή τους με ειδικούς cofactors (συμπαράγοντες). Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 προϋποθέτει τη σύνδεσή της με τον συμπαράγοντα APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1), επιπλέον όμως απαιτούνται και το κυτόχρωμα-c και ATP. Η δημιουργία του επαγόμενου από εξωγενή αποπτωτικά ερεθίσματα Araf1/Κυτόχρωμα-c κυτταροπλασματικού συμπλόκου προάγει την πρωτεολυτική επεξεργασία της προκασπάσης-9 σε λειτουργικά ενεργή κασπάση-9. Ακολουθώντας το μηχανισμό διαδοχικών πρωτεολύσεων τύπου καταρράκτου, η ενεργοποιημένη κασπάση-9 πρωτεολύει εκλεκτικά την προκασπάση-3 μετατρέποντάς την στην ενζυμικά δραστική της μορφή, κασπάση-3, η οποία και είναι ο κυριότερος ενδοκυτταρικός σηματοδότης της απόπτωσης. Πρέπει να σημειωθεί ότι από τη στιγμή που ξεκινάει η αλυσιδωτή αντίδραση των παραπάνω ενζύμων, η διαδικασία του κυτταρικού θανάτου δεν είναι αναστρέψιμη. Η ενεργοποιημένη κασπάση-3 εκτελεί το γενετικά καθορισμένο πρόγραμμα του αποπτωτικού θανάτου δια μέσω εκλεκτικής αναγνώρισης και πρωτεόλυσης πλήθους υποστρωμάτων στόχων, όπως την πυρηνική πρωτεΐνη PARP (poly ADP-ribose polymerase), τις λαμίνες του πυρηνικού σκελετού, καθώς και τα δομικά και ρυθμιστικά συστατικά του κυτταρικού σκελετού. Ο χαρακτηριστικός αποπτωτικός φαινότυπος του θρυμματισμού του DNA σχετίζεται άμεσα με την πρωτεολυτική απενεργοποίηση ενός κυτταροπλασματικού αναστολέα (ICAD: Inhibitor of Caspase Activated DNase), ο οποίος ελέγχει την αποικοδομητική



**Εικόνα 8.** Ενεργοποίηση Κασπασών-Απόπτωση

ενεργότητα πυρηνικών νουκλεασών (CADs). Ο ICAD νουκλεολυτικός αναστολέας συνιστά χαρακτηριστικό υπόστρωμα αναγνώρισης και πρωτεολυτικής σχάσης, της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 (Varfolomeev *et al* 1999), (Juo *P et al* 1998)

Στην απόπτωση μέσω Fas και TNFR1 σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα μετάδοσης αποπτωτικών σημάτων, γνωστό ως DISC (death-inducing signaling complex), το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση της προκασπάσης-8 και στη συνέχεια των κασπασών-3, -6 και -7. Προσφάτως ταυτοποιήθηκε και μια νέα ομάδα πρωτεϊνών, οι FLIPs (FLICE inhibitory proteins), οι οποίες αναστέλουν το σχηματισμό του συμπλέγματος DISC μέσω του Fas ή του TNF-α και την ενεργοποίηση της κασπάσης-8.



**Εικόνα 9.** Ενεργοποίηση της εξωγενούς οδού της απόπτωσης και ο ρόλος των Fas, FADD, DISC (Τροποποίηση από Robbins και Contran 2003)

#### 7.4 Μιτοχόνδρια και απόπτωση

Σημαντικά στάδια της αποπτωτικής διαδικασίας παρατηρούνται στα μιτοχόνδρια. Αυτά περιλαμβάνουν την απελευθέρωση ενεργοποιητών των κασπασών, όπως του κυτοχρώματος c, τις μεταβολές στη μεταφορά ηλεκτρονίων, την απώλεια του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων, την τροποποίηση της κυτταρικής

οξειδοαναγωγής και τη συμμετοχή προ- και αντι- αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 (*Jacobson MD et al 1993*).

Έχει διαπιστωθεί ότι η πρωτεΐνη Bax μπορεί να προκαλέσει μιτοχονδριακή καταστροφή και κυτταρικό θάνατο, ακόμη και όταν οι κασπάσες είναι απενεργοποιημένες. Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχει πιθανός μηχανισμός, ανεξάρτητος των κασπασών που σχετίζεται με την απόπτωση και ότι στον μηχανισμό αυτό εμπλέκονται τα μιτοχόνδρια. Μέχρι σήμερα είναι γνωστοί τρεις μηχανισμοί πυροδότησης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου από τα μιτοχόνδρια:

1. Η διακοπή της μεταφοράς ηλεκτρονίων, της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και της παραγωγής ATP. Η απώλεια μεταφοράς ηλεκτρονίων μπορεί να έχει ως συνέπεια την παραγωγή ATP. Τέτοια μείωση έχει παρατηρηθεί κατά την απόπτωση αλλά εμφανίζεται σε σχετικά όψιμα στάδια.
2. Η απελευθέρωση πρωτεϊνών που ενεργοποιούν τις κασπάσες. Απελευθέρωση πρωτεϊνών από τα μιτοχόνδρια μπορεί να επιτευχθεί είτε ως αποτέλεσμα της διαταραχής της ωσμωτικής ισορροπίας, οιδήματος του μιτοχονδρίου και ρήξης της μεμβράνης του, είτε ως αποτέλεσμα της διάνοιξης διαύλων στην εξωτερική μεμβράνη με συνέπεια την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τον ενδομεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα. Εν συνεχεία το κυτόχρωμα c ενεργοποιεί τις κασπάσες, συνδεδεμένο με τον παράγοντα Araf-1 (συνένωση του Araf-1 με την προκασπάση-9) και πυροδοτείται η αλυσιδωτή αντίδραση των κασπασών που οδηγεί σε απόπτωση.
3. Η μετατροπή του κυτταρικού δυναμικού οξειδοαναγωγής. Είναι γνωστό ότι η στέρηση νευροτροφικών ή μυελοτροφικών παραγόντων, όπως επίσης και η πρόκληση γενοτοξικών αλοιώσεων, επάγει τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και την αλλαγή του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού και την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

## **7.5 Ο ρόλος της απόπτωσης στον ανθρώπινο οργανισμό**

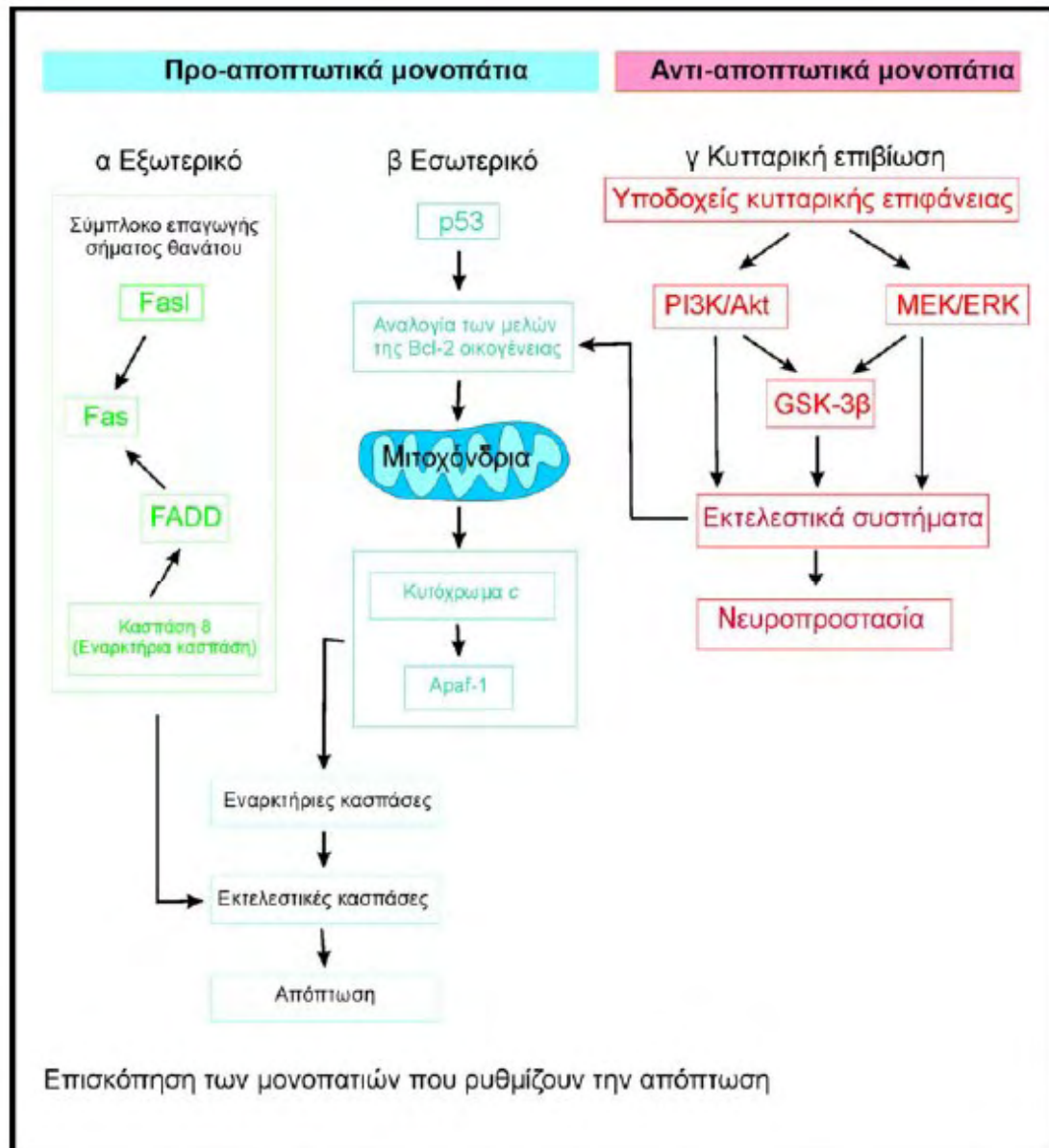
Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι απαραίτητος για τη φυσιολογική ανάπτυξη και ομοιόσταση των ιστών και έχει αποδειχθεί ότι ενέχεται παθογενετικά σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις, όπως η ογκογένεση, εκφυλιστικά και αυτοάνοσα νοσήματα. Η ομοιόσταση διατηρείται στους πολυκυττάριους οργανισμούς με την ισορροπία μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού θανάτου. Η απόπτωση είναι η μορφή του κυτταρικού θανάτου, χάρη στην οποία επιτυγχάνεται η συνεχής ανανέωση των ιστών με κυτταρική διαίρεση, ενώ ταυτόχρονα διατηρείται το επίπεδο σταθερότητας των διαφόρων ιστολογικών διαμερισμάτων (*Ameisen JC 1996*). Η απόπτωση απαντάται συχνά στην εμβρυογένεση και μορφογένεση κατά τη ρύθμιση του μεγέθους και του σχήματος των οργάνων με τη δράση πάνω στα επιλεγμένα κύτταρα (*Halevy O. 1995*).

Είναι γνωστό ότι τα T-λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα είναι ικανά να προκαλέσουν απόπτωση. Η απόπτωση που επάγεται από κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος φαίνεται να εμπλέκεται στην ογκογένεση και σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η αυτοάνοση θυρεοειδική νόσος και ο σακχαρώδης διαβήτης.

Η αποτυχία των κυττάρων να υποστούν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μπορεί να σχετίζεται με την παθογένεια ενός μεγάλου αριθμού νοσημάτων, όπως ο καρκίνος, τα αυτοάνοσα νοσήματα και οι λοιμώξεις

Ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η απόπτωση παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης ενός όγκου, όπως και στην ανταπόκρισή του στην αντικαρκινική θεραπεία. Οι διάφορες μορφές θεραπείας του καρκίνου, όπως οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες και οι μέτριες δόσεις ακτινοβολίας επάγουν

εκτεταμένη απόπτωση σε ταχέως αναπτυσσόμενους κυτταρικούς πληθυσμούς. Η αποπτωτική ανταπόκριση είναι στενά συνδεδεμένη με την αποτελεσματικότητα της αντικαρκινικής θεραπείας. Ο θεραπευτικός στόχος θα μπορούσε να επιτευχθεί είτε με την επαγωγή της απόπτωσης σε ιστούς με καρκίνο ή με την αναστολή της απόπτωσης σε φυσιολογικούς ιστούς (Milas L, 1994).

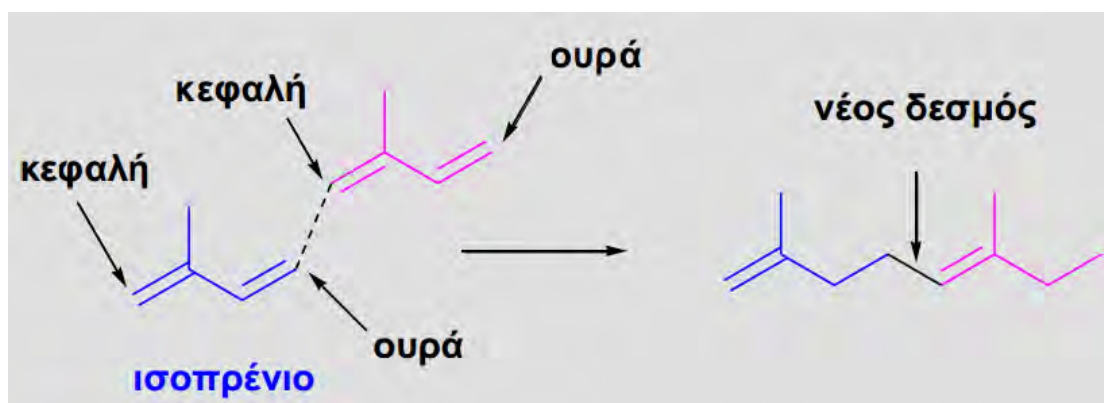


**Εικόνα 10.** Επισκόπηση των μονοπατιών που ρυθμίζουν την απόπτωση. [Από: Rowe και Chuang, *Expert reviews in molecular medicine* 2004]

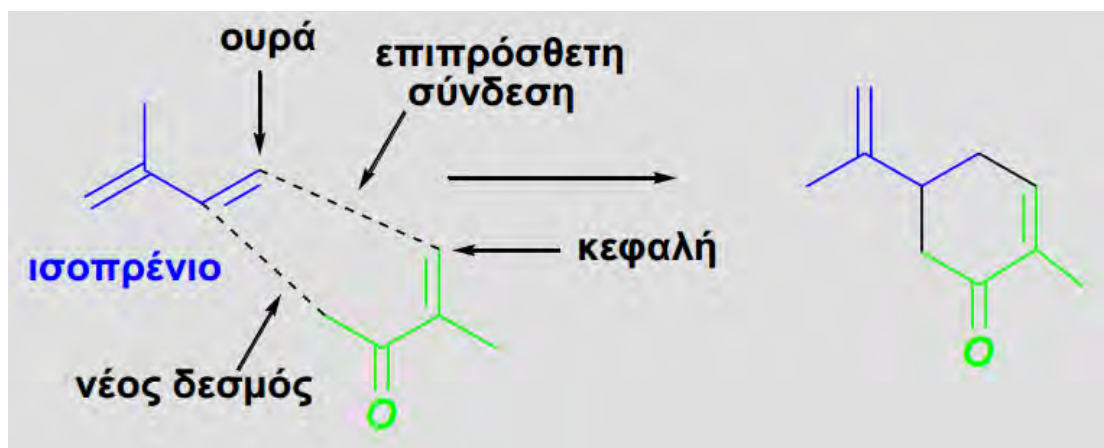
## 8.Τερπένια

Τα τερπένια είναι μια φυσικής προέλευσης ετερογενής ομάδα λιποειδών που αριθμεί περισσότερα από 20.000 μόρια. Κοινό χαρακτηριστικό των τερπενίων είναι ότι το μόριο τους είναι πολλαπλάσιο της πενταμελούς δομικής μονάδας του ισοπρενίου (2-μεθυλο-1,3-βουταδιένιο).

Για παράδειγμα, δυο μόρια ισοπρενίου είναι δυνατόν να ενωθούν (κεφαλή με ουρά) μέσω ενός απλού δεσμού, δίνοντας ένα τερπένιο με 10 άτομα C.



Αντίστοιχα είναι δυνατόν να συντεθούν κυκλικά τερπένια (με πενταμελή ή εξαμελή δακτύλιο). Στην περίπτωση αυτή υπάρχουν και επιπρόσθετες συνδέσεις μεταξύ των μονάδων που συνθέτουν το τερπένιο.



Τα τερπένια είναι φυσικά προϊόντα που παίζουν σημαντικό βιολογικό ρόλο σε όλους τους φυτικούς και ζωϊκούς οργανισμούς.

Ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό ατόμων C που περιέχουν σε:

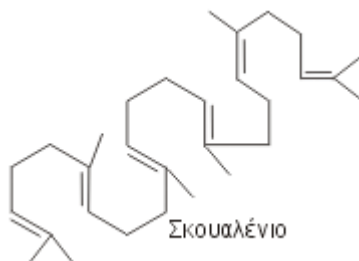
- Μονοτερπένια, που έχουν 10 άτομα C (αποτελούνται από δυο μονάδες ισοπρενίου). Είναι γνωστά ως τα μόρια που προσδίδουν άρωμα και γεύση στα φυτά.
- Σεσκιτερπένια, που έχουν 15 άτομα C (αποτελούνται από τρεις μονάδες ισοπρενίου). Είναι γνωστά ως συστατικά των αιθερίων ελαίων.
- Διτερπένια, με 20 άτομα C (αποτελούνται από τέσσερις μονάδες ισοπρενίου).

Με την ίδια λογική υπάρχουν τα σεσιτερπένια (25 άτομα C), τα τριτερπένια (30 άτομα C) και τα τετρατερπένια (40 άτομα C). (*en.wikipedia.org*)



## 8.1 Τριτερπένια

Συνοπτική ονομασία υδρογονανθράκων, παραγώγων του ισοπρενίου, ισομερών μεταξύ τους, που περιγράφονται από τον χημικό τύπο  $C_{30}H_{48}$ , καθώς επίσης και των παραγώγων τους, που προέρχονται από μια αντίδραση οξείδωσης ή κυκλοποίησης. Τα τριτερπένια συνιστούν μία ιδιαίτερα σημαντική τάξη φυσικών προϊόντων, που απαντούν στο φυτικό και στο ζωικό βασίλειο. Είναι δυνατόν να θεωρηθούν όλα ως παράγωγα του σκουαλενίου, το οποίο με τη σειρά του σχηματίζεται από το πυροφωσφορικό εστέρα της φαρνεσόλης. Τα στεροειδή αποτελούν παράγωγα των τριτερπενίων.

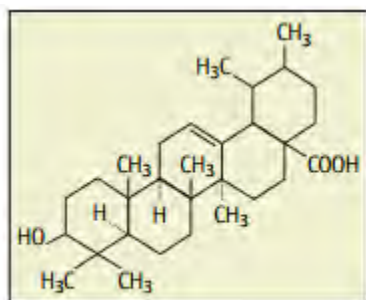


### 8.1.1 Ουρσολικό οξύ και Ολεανολικό οξύ

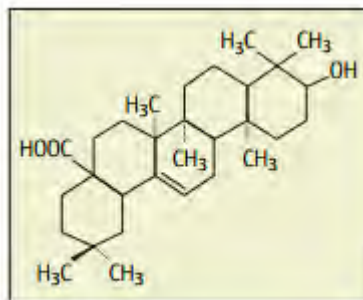
Και τα δύο οξέα ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των σαπωνινών και στην υποομάδα των πεντακυκλικών τριτερπενίων ([wikipedia](#)). Το μεν ουρσολικό οξύ προέρχεται από το ουρσάνιο, το δε ολεανικό οξύ από το ολεάνιο (Gunnar Samuelsson, 2004). Όπως βλέπουμε από τους παρατιθέμενους τύπους των δύο οξέων, διαπιστώνουμε ότι το ένα είναι ισομερές του άλλου. Και τα δύο οξέα υπάρχουν σε ένα πλήθος φυτών κυρίως υπό μορφή κηρώδους επικάλυψης των καρπών και των φύλλων. Αναφέρουμε αυτά που περιέχουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε ουρσολικό οξύ και ολεανολικό οξύ. Φαρμακευτικά φυτά που περιέχουν ουρσολικό οξύ: βασιλικός, δενδρολίβανο, βατόμουρο, μέντα, μυρτιά, λεβάντα, είδη ρίγανης, θυμάρι, δάφνη, μήλα, αχλάδια, δαμάσκηνα, φασκόμηλο.

Φαρμακευτικά φυτά που περιέχουν ολεανολικό οξύ: διάφορα είδη *Syzygium*, *Viscum album*, *Prosopis glandulosa*, *Phoradendron juniperium*, *Ternstroemia gymnanthemum*, *Hyptis capitata*, *Jumbolana*, *Ziziphora clinopodioides*, *Phytolaca americana*, *Olea europea*, *Olea africana*.

Από τον παρατιθέμενο πίνακα διαπιστώνουμε ότι ένα μεγάλο ποσοστό από τα φυτά αυτά ευδοκιμούν στην Ελλάδα, είτε ως αυτοφυή, είτε ως καλλιεργήσιμα. Ήταν λοιπόν φυσικό να εμφανισθεί και να αναπτυχθεί εδώ, από αρχαιοτάτων χρόνων, η χρήση αυτών στη θεραπευτική. Παράλληλα, οι άνθρωποι που τα εφήρμοζαν, ελατρεύοντο για τη θεραπεία που προσέφεραν ως ημίθεοι.



Ουρσολικό Οξύ



Ολεανολικό Οξύ

Οι σπουδαιότερες θεραπευτικές ιδιότητες αυτών είναι:

1. Αναστέλλουν την καρκινογένεση και πιθανόν συντελούν στη θεραπεία ορισμένων μορφών καρκίνου.
2. Ενεργούν ηπατοπροστατευτικά και ενισχυτικά του αμυντικού συστήματος του οργανισμού.
3. Ασκούν αντιφλεγμονώδη δράση ρυθμίζοντας τη LOX, COX, MMP9 και κυκλίνη D1.
4. Έχουν επίσης τις ακόλουθες δράσεις
  - αντιμικροβιακή,
  - αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή,
  - αντιλιπιδική,
  - αντι-υπερτασική,
  - αντιδιαβητική,
  - αντι-ιική.
5. Χρησιμοποιούνται στην κοσμητολογία ως γαλακτοποιητές στην παρασκευή αντιγηραντικών αλοιφών κατά της φωτογήρανσης της επιδερμίδος, κατά των ρυτίδων και ως προληπτικά του καρκίνου του δέρματος.

Η διαδικασία της ογκογένεσως συνεπάγεται κυτταρικό μετασχηματισμό, υπερπολλαπλασιασμό, εισβολή, αγγειογένεση, μετάσταση (A. Petronelli, et al, 2009). Η αναστολή της καρκινογένεσης συντελείται με την αντίστοιχο αναστολή της ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντος NF-Κβ που προκαλείται από καρκινογόνους παράγοντες και φλεγμονές, μέσω της καταστολής IKΒαlpha κινάσης και Ρ65 .

(*Σημείωση:* η ενδοκυττάρειος πρωτεΐνη NF-Κβ είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που δρουν ως διακόπτης για την ενεργοποίηση γονιδίων που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τον θάνατο (απόπτωση) των κυττάρων, τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού και την καταστολή των φλεγμονών.) Όντως, τα U.A. και O.A. αναστέλλουν την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντος NF-Κβ19. Επίσης, παίζουν ρόλο στη φωσφοριλίωση με τη ρύθμιση της κυκλοεξωγενάσης 2 (COX2), matrix metalloproteinase 9 (MMP9) και κυκλίνης D1.

Παράγοντες όπως το U.A., που έχουν δυνατότητες καταστολής, ενεργοποίησης STAT3, έχουν δυνατότητες πρόληψης και θεραπείας μορφών καρκίνου, όπως του πολλαπλού μυελώματος HT1080, Fibrosarcoma (ινοσάρκωμα) και HT29 καρκίνωμα παχέος εντέρου. Επίσης, εξετάστηκε η αναστολή του κυτοχρώματος Ρ450 (CYP) από το U.A. και το O.A. σε μικροσώματα του ανθρώπινου ήπατος με θετικά αποτελέσματα, με συνέπεια την αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και ηπατοπροστατευτική δραστηριότητα του O.A. Γενικά, τα τριτερπενοειδή έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τον πυρηνικό παράγοντα ενεργοποίησης NF-Κβ αυξάνοντας την απόπτωση και αποτρέποντας την αγγειογένεση στα μιτοχόνδρια. Το O.A. υποκινεί σε απόπτωση τα κύτταρα της ανθρώπινης λευκαϊμίας HL-60 μέσω της επιδράσεως επί των  $Ca^{++}$  των ευρισκομένων εντός των κυττάρων. Επίσης, υποκινεί σε απόπτωση των κυττάρων του μελανώματος M4Bea επιδρώντας μέσω των μιτοχονδρίων και ενεργοποιώντας την Ρ53 και του Caspase3 (Szakiel A et al., *Phytochem Rev* 2012, 11, 263).

Ανέστειλε σημαντικά την κυτταρική βιωσιμότητα προκαλώντας απόπτωση στον καρκίνο του προστάτου. Δρα ως προληπτικό της καρκινογένεσης των κυττάρων της μήτρας θεραπεύοντας τον ιό HPV (κονδυλώματα) που σχετίζεται με τη νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας, αλλά και προκαλώντας αντι-πολλαπλασιασμό και απόπτωση των τυχόν υπαρχόντων καρκινικών κυττάρων.

Το U.A. παρεμπόδιζε τη διάδοση των κυττάρων HT-29 προκαλώντας απόπτωση και καταστολή του καρκίνου του παχέος εντέρου. Ανέστειλε την εξάπλωση των



καρκινικών κυττάρων ηπατώματος R-HepG2 μέσω αποπτώσεως και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου του μαστού, MCF-7.

Τόσο το U.A. όσο και το O.A. ασκούν ηπατοπροστατευτικό ρόλο από την επίδραση εξωγενών παραγόντων (φαρμάκων, χημικών ουσιών, μετάλλων κ.τ.λ.) αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της τοξικής ουσίας και ενισχύοντας την άμυνα του οργανισμού, καταστέλλοντας το κυτόχρωμα P450. Πρέπει να τονίσουμε ότι το U.A. επιδρά μόνο επί των καρκινικών κυττάρων και όχι επί των κανονικών.

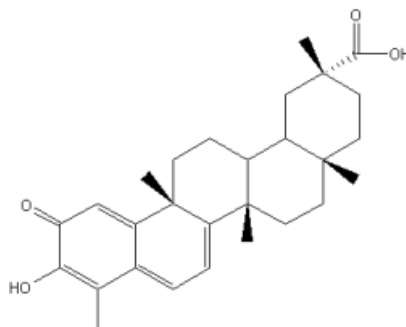
Για να βελτιωθεί η δράση κατά των όγκων, έχουν συντεθεί παράγωγα τριτερπενοειδών. Το 1999, ένα τέτοιο συνθετικό τριτερπενοειδές, 2-κυανο-3,12-διοξολεαν-1,9-διεν-28-οϊκό οξύ (CDDO), το οποίο έχει βρεθεί να είναι 100-500 φορές πιο ισχυρό από ότι οποιαδήποτε προηγούμενο τριτερπενοειδές στην καταστολή της επαγωγίμης συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (iNOS) στα πρωτογενή μακροφάγα όταν διεγείρονται με ιντερφερόνη-γ (IFN $\gamma$ ) και της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX-2) - δύο φλεγμονωδών ενζύμων που έχουν σημαντικούς ρόλους στην ανάπτυξη κακοήθειας, έχει αναπτυχθεί επιτυχώς.

Προκειμένου να αυξηθεί η δραστηριότητα του CDDO, έχουν συντεθεί διάφορα C-28 παράγωγα. Το CDDO-Me, ένα από τα παράγωγα του CDDO, που έχει εμφανίσει αποτελέσματα στην πρόληψη ή στην αγωγή του καρκίνου σε μια ποικιλία μελετών. Το CDDO και τα παράγωγά του αναπτύχθηκαν αρχικά ως αναστολείς της παραγωγής νιτρικού οξειδίου σε μακροφάγα και ως αντιπολλαπλασιαστικοί παράγοντες για καρκινικά κύτταρα. Ο C-28 μεθυλεστέρας (CDDO-Me) και η C-28 ιμιδαζολίδη (CDDO-Im) παράγωγα του CDDO έχουν δείξει βελτίωση σε δραστηριότητες κατά του όγκου για διάφορους τύπους όγκων σε σύγκριση με το CDDO, με IC<sub>50s</sub> στην κλίμακα nanomolar. Ταυτόχρονα, πολύ λίγες ανεπιθύμητες ενέργειες ανιχνεύθηκαν σε κλινικά σχετικές συγκεντρώσεις του CDDO-Me και CDDO-Im. Άλλα παράγωγα αμιδίου C-28 έχουν επίσης έχουν συντεθεί. Νέες ενώσεις που μελετήθηκαν εδώ περιλαμβάνουν το CDDO-αιθυλαμίδιο (CDDO-EA), το CDDO-διαιθυλο αμίδιο (CDDO -DE), ο CDDO-τριφθοροαιθυλεστέρας αμιδίου (CDDO-TFEA), και το CDDO-μεθυλ αμίδιο (CDDO-MA).

Το CDDO-Me είναι ένα παράγωγο μεθυλεστέρα του CDDO, και αυτή η ένωση χρησιμοποιείται σε κλινικές δοκιμές φάσης για την αγωγή της λευχαιμίας, συμπαγών όγκων, και άλλες μη νεοπλασματικές ασθένειες. Ως ομάδα, αυτά τα συνθετικά τριτερπενοειδή ολεανάνια είναι ισχυρά πολυλειτουργικά μόρια σε αναλύσεις κυτταρικής καλλιέργειας. Ανάλογα με τη δόση, μπορούν να καταστείλουν την φλεγμονή, να ενεργοποιήσουν τις κυτταροπροστατευτικές οδούς, να επάγουν τη διαφοροποίηση, να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό και να επάγουν την απόπτωση (A. Petronelli, et al, 2009) .

**8.1.2 Μασλινικό οξύ** (2-άλφα, 3-βητα-διυδροξυολεαν-12-εν-28-οϊκό οξύ) είναι ένα τριτερπενοειδές που βρίσκεται στα φυτά όπως *Olea europaea*. Έχει σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ιδιότητες, καθώς και αντικές δραστηριότητες.

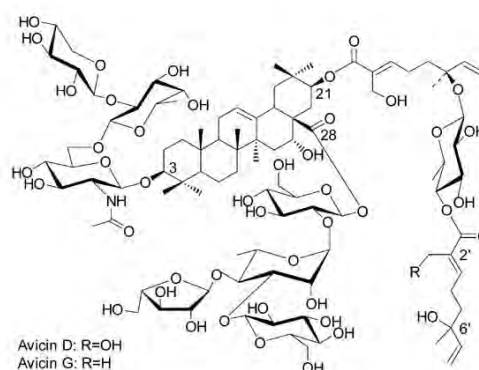
**8.1.3 Celastrol** είναι ένα hopanoid τριτερπένιο, ένα μεθίδιο κινόνης τριτερπενοειδές που εξάγεται από το φυτό *Tripterygium wilfordii* που χρησιμοποιείται στην κινεζική ιατρική. Είναι χρήσιμη για τη θεραπεία φλεγμονωδών και αυτοάνοσων ασθενειών γιατί έχει αντιοξειδωτικές και αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες. Νέα έρευνα έχει αποδείξει ότι είναι ένας ισχυρός αναστολέας



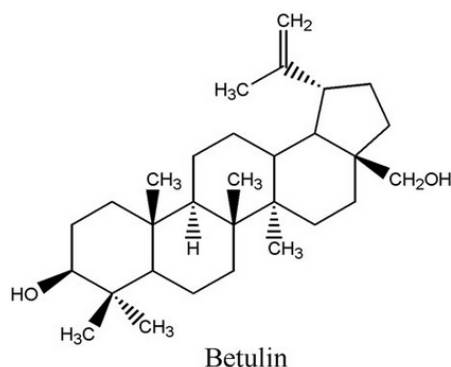
πρωτεασώματος και μπορούν να βοηθήσουν στη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη και της λευχαιμίας. Αρκετές βιοχημικές ιδιότητές της έχει επιφέρει αρκετές έρευνες στον τομέα της θεραπείας του καρκίνου ή την πρόληψη του. Οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της υπήρξε η βάση της έρευνας για τις ασθένειες που προκαλούνται από τα μονοκύτταρα και μακροφάγα ενεργοποίησης, περιλαμβανομένης της διαδικασίας νευροεκφυλιστικών.

**8.1.4 Celastrol μεθυλεστέρας (pristimerin)** είναι ένα φυσικό τριτερπενοειδές που έχει απομονωθεί από τα φυτά *Celastrus* και *Maytenus* spp.. Οι αντικαρκινικές ιδιότητές του που έχουν αναφερθεί, δείχνουν ότι αυτή η ένωση είναι πιο ισχυρή από ό,τι η celastrol στην αναστολή του NF-κΒ, στη δραστηριότητα πρωτεασώματος και στην επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων του μυελώματος *in vitro* και *in vivo*. Ο μεθυλεστέρας celastrol (pristimerin) έχει ισοδύναμη ή περισσότερο ισχυρή δράση από ό,τι η celastrol, στην επαγωγή της απόπτωσης ενός κυττάρου όγκου.

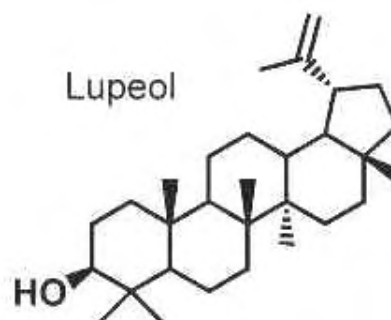
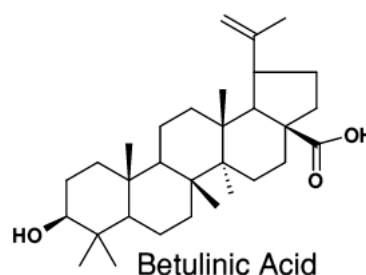
**8.1.5 Avicins** αντιπροσωπεύουν μια οικογένεια τριτερπενίων που έχουν απομονωθεί από τους λοβούς του σπόρου από ένα αυστραλιανό δέντρο που ονομάζεται *Acacia victoriae*. Avicins ήταν οι πρώτες που ταυτοποιούνται από την ικανότητά τους να επάγουν εκλεκτικά την απόπτωση σε διάφορα ανθρώπινα κύτταρα όγκου με άμεση διατάραξη των μιτοχονδρίων. Avicin D και G έχουν δύο σημαντικές ιδιότητες ως δυνητικά αντικαρκινικά φάρμακα: (i) αναστέλλουν τη δέσμευση DNA του συμπλόκου NF-κΒ και την έκφραση των NF-κΒ εξαρτώμενων γονιδίων, και (ii) επάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω της μιτοχονδριακής διαταραχή (Haridas V, et al. (2011)).



**8.1.6 Λουπεόλη, βετουλίνης και βετουλινικό οξύ** είναι φυσικά πεντακυκλικά τριτερπένια των σαπωνινών του τύπου λουπανίου που



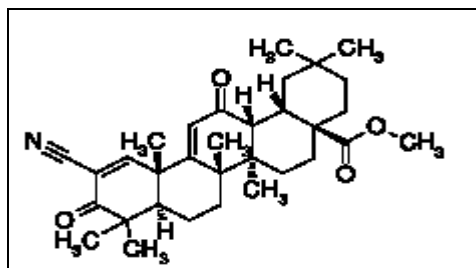
βρέθηκε στον εξωτερικό φλοιό διαφόρων δένδρων *Betula* spp., όπως *B. papyrifera*, και πρόσφατα έχουν διερευνηθεί για τις διάφορες φαρμακολογικές και τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες. Η λουπεόλη (Lup-20 (29) -εν-3H-



όλη) βρέθηκε σε φρούτα, σε πολλά λαχανικά (π.χ. ελαιόλαδο, μάνγκο και σύκο) και πολλά φαρμακευτικά φυτά. Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, αντιφλεγμονώδη, αντιαρθριτική, αντιμεταλλαξιγόνο, και αντι-ελονοσιακή δραστηριότητα σε *in-vitro* και *in-vivo* συστήματα. Επίσης, δρα ως ισχυρός αναστολέας των κινάσων πρωτεΐνης και σερίνης πρωτεάσες, και αναστέλλει τη δράση της DNA τοποϊσομεράσης II, ένας στόχος για την αντικαρκινική χημειοθεραπεία. Η λουπεόλη αναστέλλει τον πυρηνικό παράγοντα σηματοδότησης (NF) -  $\kappa$ B, περιλαμβανομένης φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης I $\kappa$ B $\alpha$ , τη δέσμευση DNA του συμπλόκου NF- $\kappa$ B, και NF- $\kappa$ B -εξαρτώμενη δραστηριότητα γονιδίου αναφοράς. Έχει επίσηςδειχθεί ότι η λουπεόλη επάγει τη διαφοροποίηση και αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων του μελανώματος ποντικού και ανθρώπου στα κύτταρα λευχαιμίας. Πρόσφατα,δείχθηκε σε ένα μοντέλο δύο σταδίων της καρκινογένεσης στο δέρμα ποντικού που η λουπεόλη αναστέλλει σημαντικά αντικαρκινική δραστηριότητα προαγωγής (Saleem M, et al (2005 Dec)).

**8.1.7 Bardoxolone μεθύλιο** (γνωστό επίσης ως "RTA 402", "CDDO-μεθυλεστέρα», και

CDDO-Me) είναι ένα πειραματικό και από του στόματος διαθέσιμο ημι-συνθετικό τριτερπενοειδές, με βάση το ικρίωμα του φυσικού προϊόντος ολεανολικού οξέος. Προκλινικές μελέτες δείχνουν ότι η ένωση δρα ως ενεργοποιητής του Nrf2 οδού και ενός αναστολέα του NF- $\kappa$ B μονοπατιού.



## 9. Πειραματικό μέρος

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που υπήρχαν σε καλλιέργειες στο εργαστήριο. Τα κύτταρα αυτά, επειδή παρέμειναν για μεγάλο χρονικό διάστημα, ήταν σε καλλιεργητικό υλικό το οποίο έχει ορό βοδιού. Ο ορός αυτός έχει μέσα του και όλες τις ορμόνες του βοδιού. Οι υποδοχείς των κυττάρων είναι ενεργοποιημένοι με τις ορμόνες αυτές.

Πριν γίνει κατεργασία των κυττάρων με τα υπό μελέτη φυτικά εκχυλίσματα ή τις απομονωμένες ουσίες (2 μέρες πριν) τα κύτταρα μεταφέρονται σε ένα καλλιεργητικό υλικό που είναι έτσι φτιαγμένο ώστε να απουσιάζουν οι ορμόνες και έτσι τα κύτταρα αναπτύσσονται σε περιβάλλον απουσία ορμονών για σύντομο χρονικό διάστημα. Οι υποδοχείς απενεργοποιούνται και μεταφέρονται προς το κυτταρόπλασμα.

Στη συνέχεια προστίθεται δεξαμεθαζόνη και οι ουσίες των οποίων θέλουμε να μελετήσουμε τη δράση. Ακολούθησε ανοσοϊστοχημεία με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων και ειδικών χρωστικών για την απεικόνιση των μιτοχονδρίων και του πυρήνα των κυττάρων και στη συνέχεια τα παρασκευάσματα μας παραδόθηκαν προς περαιτέρω μελέτη. Φωτογραφήσαμε τα κύτταρα με κάμερα (Optimos της εταιρείας Qimaging, ευγενική προσφορά του ιδρύματος Μποδοσάκη) στο μικροσκόπιο (DM 2000, της εταιρείας Leica) με χρήση φακού X63 και με ειδικό λογισμικό (Q capture pro 7.0, της εταιρείας Q imaging) έγινε προσθήκη διαφορετικών χρωμάτων που αντιστοιχούσαν στις επιμέρους επισημάνσεις των προς μελέτη μορίων-παραγόντων. Με πράσινο χρωματίζεται ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (χρήση δευτερογενούς αντισώματος σημασμένο με πράσινη χρωστική Alexa 488), με κόκκινο τα μιτοχόνδρια (χρωστική CMX ROS), με μπλε οι πυρήνες (Χρωστική Hoechst 33342) και υπάρχει η συγχώνευση του πράσινου και του κόκκινου.

### Οι κωδικοί των ουσιών που μελετήθηκαν αντιστοιχούν στις εξής ουσίες:

TFC 33 στη lupenone

TFC 35 στη Lupeol acetate

TFC 39 στη protopanaxadiol

και τα φυτικά εκχυλίσματα προέρχονται από τα φυτά

Tarassacum officinalis	UPO-1 a3 ( <b>up01 a3</b> )
Pistacia Lentiscus	UPO-4 a3 ( <b>up04 a3</b> )
Boswellia serrata	UPO-6 a3 ( <b>up a3 06</b> )
Ecballium elaterium	UPO-8 a3 ( <b>up a3 08</b> )
Pistacia Lentiscus	UPO-4 b3 ( <b>ub 04 b3</b> )
Boswellia serrata	UPO-6 b3 ( <b>UB 06 B3</b> )
Ecballium elaterium	UPO-8 b3 ( <b>UB 08 B3</b> )
Centella asiatica	UPO-10 b3 ( <b>ub10 b3</b> )

## 10. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στην συνέχεια παραθέτονται ενδεικτικά εικόνες που ελήφθησαν ανά περίπτωση και σχολιασμός της ανάλυσης των αποτελεσμάτων.

Οι εικόνες ανά δείγμα για τον **υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών** είναι:

**Control:** Ο υποδοχέας υπάρχει παντού γιατί σε ένα ποσοστό είναι ενεργοποιημένος και σε ένα ποσοστό μη ενεργοποιημένος. Αυτό είναι αναμενόμενο γιατί στα control κύτταρα ο υποδοχέας βρίσκεται εντοπισμένος και στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα.

**DEX (Δεξαμεθαζόνη):** Η δεξαμεθαζόνη είναι συνθετικό γλυκοκορτικοειδές και δρα όπως η κορτιζόλη. Στα κύτταρα με την δεξαμεθαζόνη παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν υποδοχείς στο κυτταρόπλασμα. Η δεξαμεθαζόνη προσδένεται στους υποδοχείς και μεταφέρονται στον πυρήνα. (Η δεξαμεθαζόνη ενεργοποιεί τους υποδοχείς, τους στέλνει στον πυρήνα και έτσι δεν υπάρχουν υποδοχείς στο κυτταρόπλασμα.)

**x63 TFC 35:** Παρουσιάζει μία σχετική ενεργοποίηση στον πυρήνα η οποία είναι μικρότερη της DEX αλλά δεν είναι και η μορφή του control. Έτσι η ουσία x63 35 μπορεί να δράσει ως ένα βαθμό ως γλυκοκορτικοειδές.

**x63 TFC 39:** Ο υποδοχέας εντοπίζεται σε όλο το κύτταρο και έχει περίπου τη μορφή του control. Η ουσία δεν ενεργοποιεί τους υποδοχείς και έτσι δεν μπορεί να δράσει ως γλυκοκορτικοειδές.

**up01 a3:** Παρουσιάζει μία σχετική ενεργοποίηση στον πυρήνα. Έτσι η ουσία μπορεί να δράσει ως ένα βαθμό ως γλυκοκορτικοειδές.

**up04 a3:** Παρουσιάζει ενεργοποίηση στον πυρήνα. Έτσι η ουσία μπορεί να δράσει ως ένα βαθμό ως γλυκοκορτικοειδές.

**tfc 33:** Ο υποδοχέας εντοπίζεται σε όλο το κύτταρο. Η ουσία δεν ενεργοποιεί τους υποδοχείς και έτσι δεν μπορεί να δράσει ως γλυκοκορτικοειδές.

**up a3 06:** Παρουσιάζει μία σχετική ενεργοποίηση στον πυρήνα. Έτσι η ουσία μπορεί να δράσει ως ένα βαθμό ως γλυκοκορτικοειδές.

**up a3 08:** Παρουσιάζει μία σχετική ενεργοποίηση στον πυρήνα. Έτσι η ουσία μπορεί να δράσει ως ένα βαθμό ως γλυκοκορτικοειδές.

**ub 04 b3:** Ο υποδοχέας εντοπίζεται σε όλο το κύτταρο. Η ουσία δεν ενεργοποιεί τους υποδοχείς και έτσι δεν μπορεί να δράσει ως γλυκοκορτικοειδές.

**ub10 b3:** Ο υποδοχέας εντοπίζεται σε όλο το κύτταρο. Η ουσία δεν ενεργοποιεί τους υποδοχείς και έτσι δεν μπορεί να δράσει ως γλυκοκορτικοειδές.

**UB a1 b3:** Ο υποδοχέας εντοπίζεται σε όλο το κύτταρο. Η ουσία δεν ενεργοποιεί τους υποδοχείς και έτσι δεν μπορεί να δράσει ως γλυκοκορτικοειδές.

**UB 06 B3:** Ο υποδοχέας εντοπίζεται σε όλο το κύτταρο. Η ουσία δεν ενεργοποιεί τους υποδοχείς και έτσι δεν μπορεί να δράσει ως γλυκοκορτικοειδές.

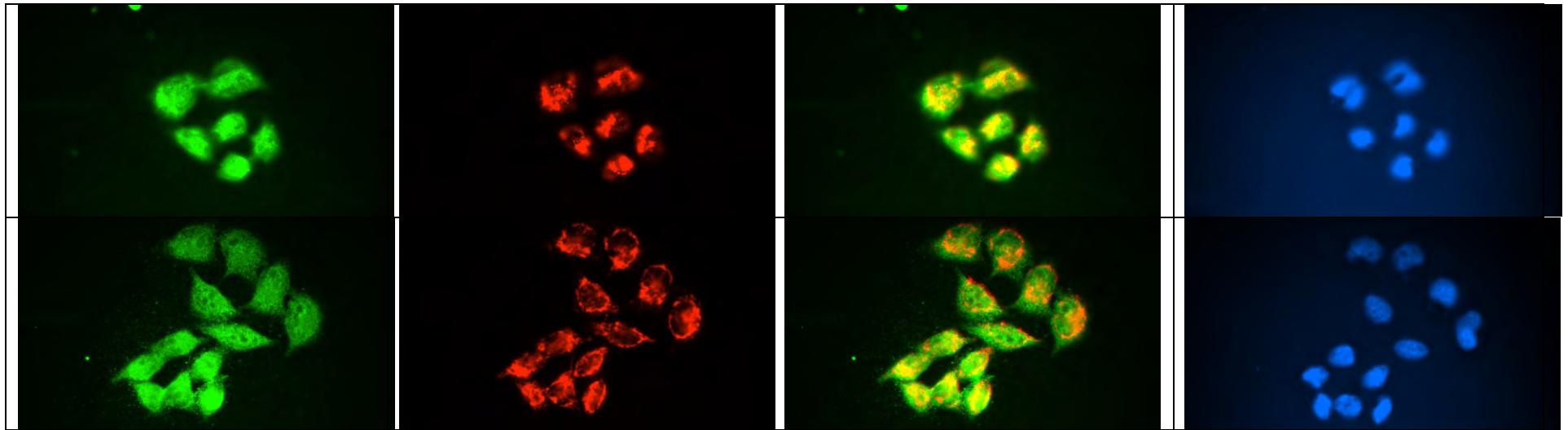
**UB 08 B3:** Ο υποδοχέας εντοπίζεται σε όλο το κύτταρο. Η ουσία δεν ενεργοποιεί τους υποδοχείς και έτσι δεν μπορεί να δράσει ως γλυκοκορτικοειδές.

**Δράση μιτοχονδρίων:** Τα μιτοχόνδρια βάφονται έντονα κόκκινα όταν είναι πλήρως ενεργά δηλαδή λειτουργικά. Όταν τα μιτοχόνδρια είναι δυσλειτουργικά δεν είναι τόσο έντονη η χρώση, η ουσία μπορεί να δράσει σαν αντικαρκινικό φάρμακο.

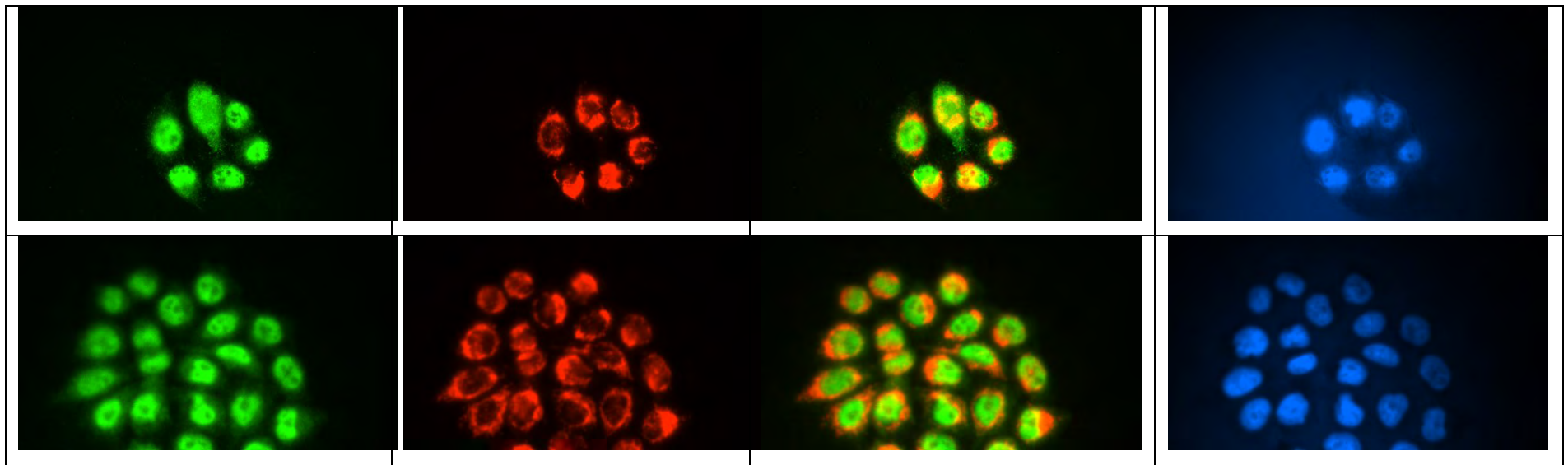
Παρατηρώντας τις εικόνες μπορούμε να διακρίνουμε μία μη έντονη χρώση στις ουσίες **x63 TFC 35, up01 a3, UB a1 b3 και UB 06 B3** και συνεπώς αυτές οι ουσίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αντικαρκινικά φάρμακα. Η ουσία TFC 33 προκαλεί συρρίκνωση των μιτοχονδρίων, συγκέντρωσή τους περιφερηγικά και

αλλαγή της κυτταροπλασματικής τους δομής. Η ουσία TFC 33 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μελέτη ως αντικαρκινικό φάρμακο. Οι υπόλοιπες ουσίες παρουσιάζουν έντονη χρώση, τα μιτοχόνδρια είναι λειτουργικά και συνεπώς δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντικαρκινικά φάρμακα.

### 8-2-15 x63 Control

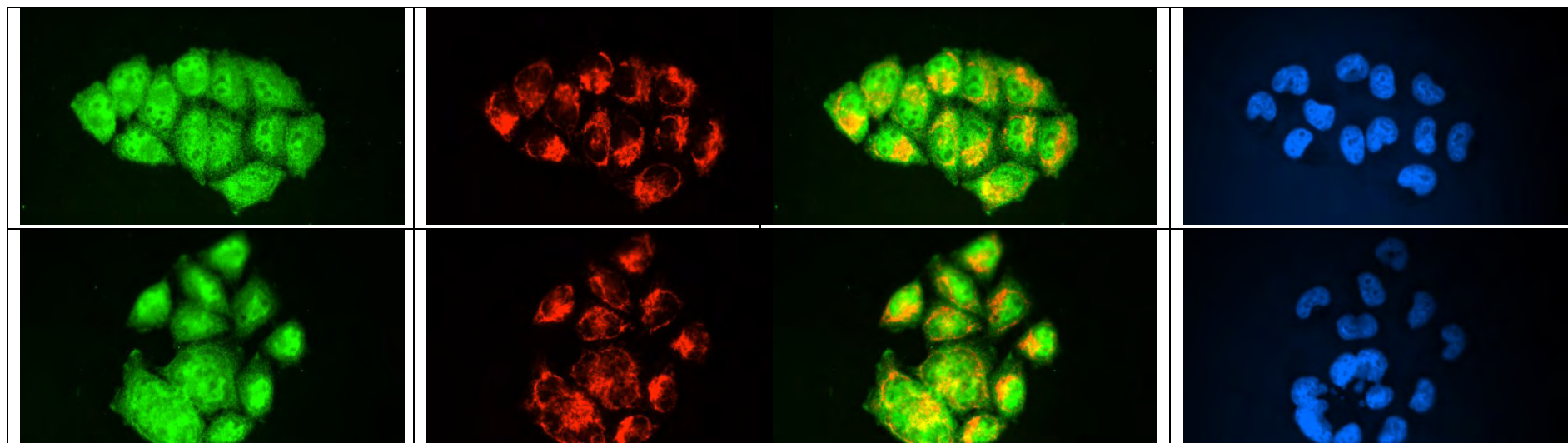


### 14-2-15 x63 DEX

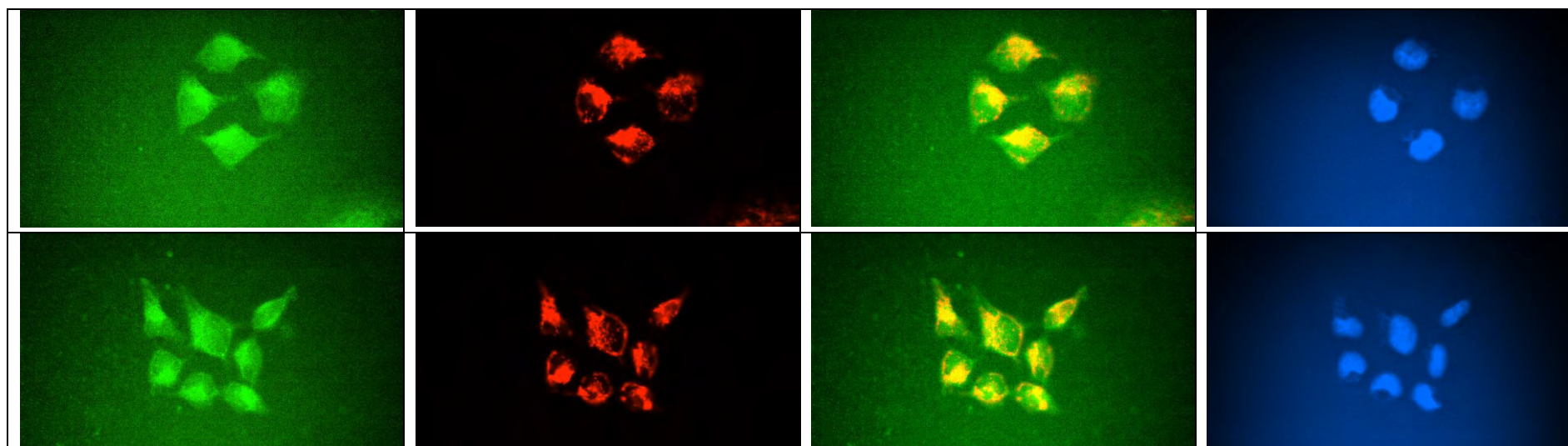




**8-2-15 x63 TFC 35**

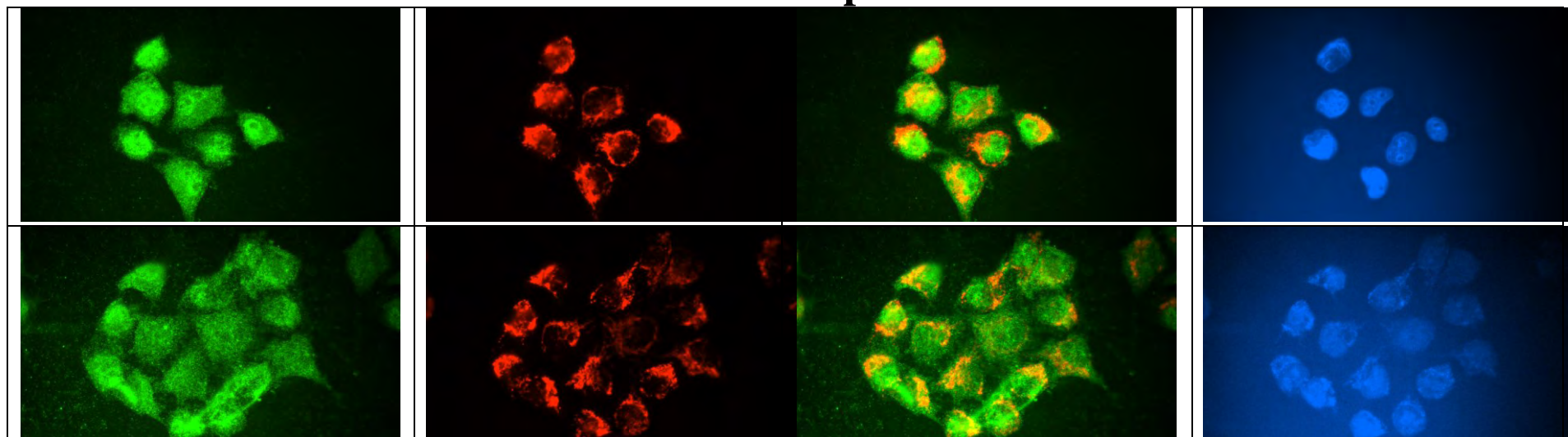


**8-2-15 x63 TFC 39**

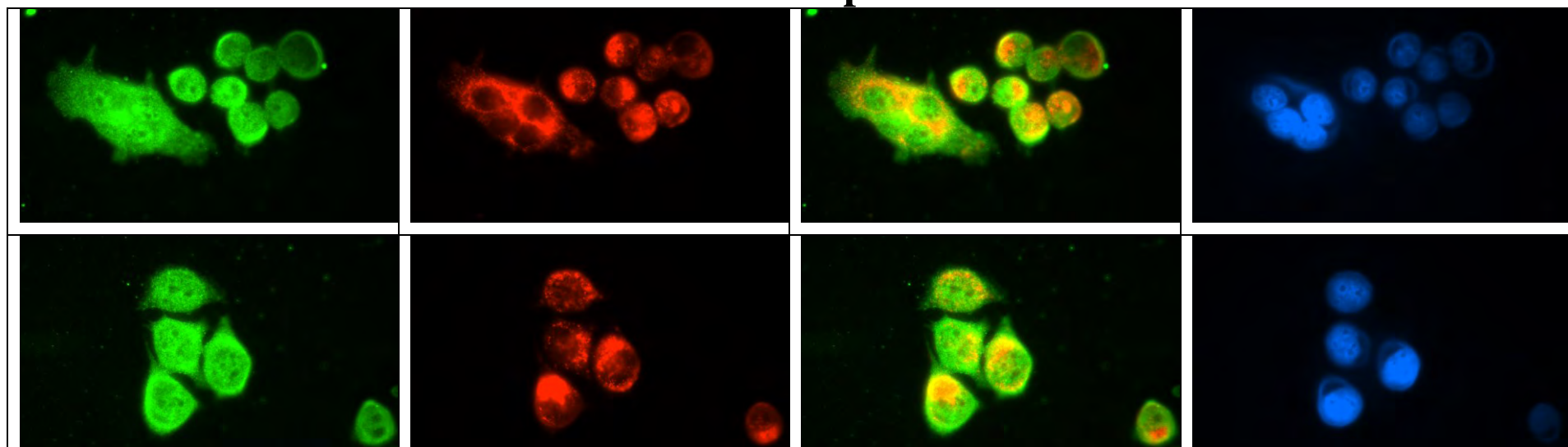




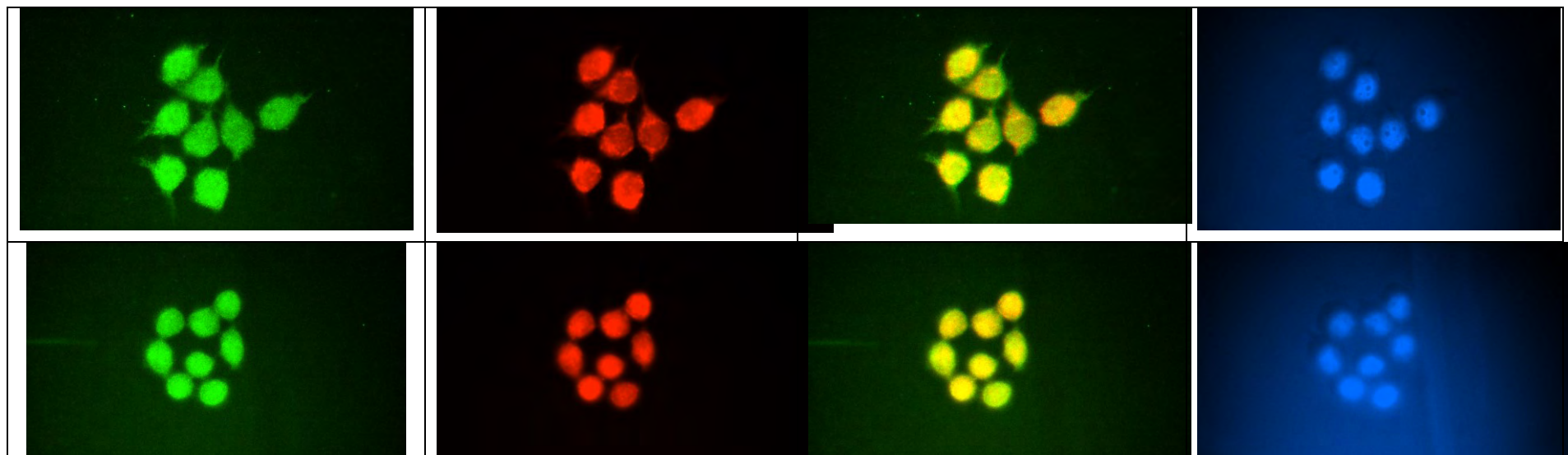
**8-2-15 x63 up01 a3**



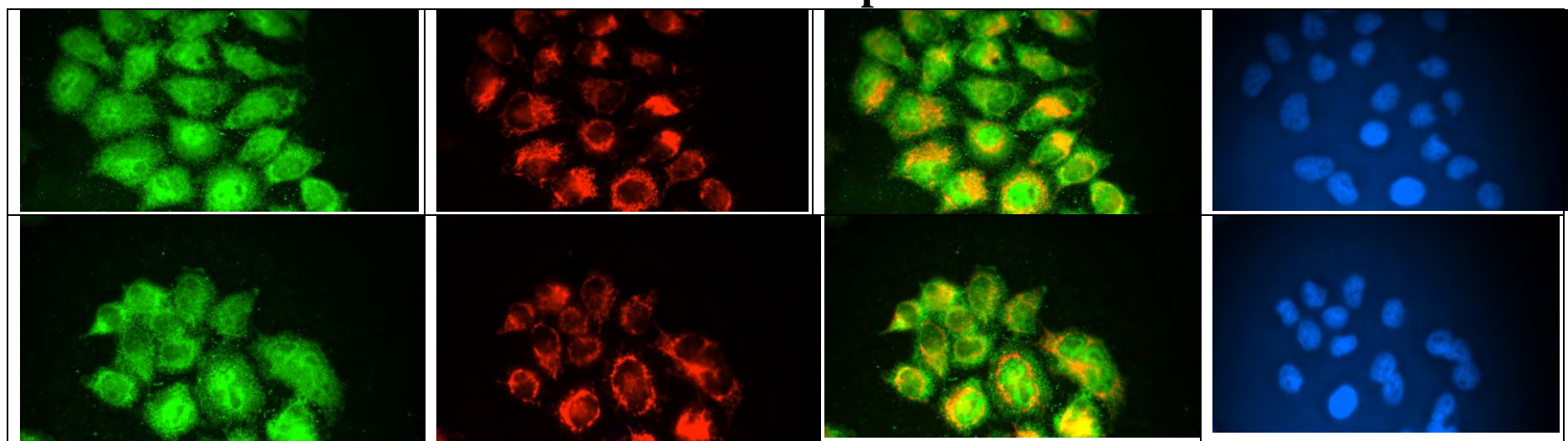
**8-2-15 x63 up04 a3**



### 12-2-15 TFC 33

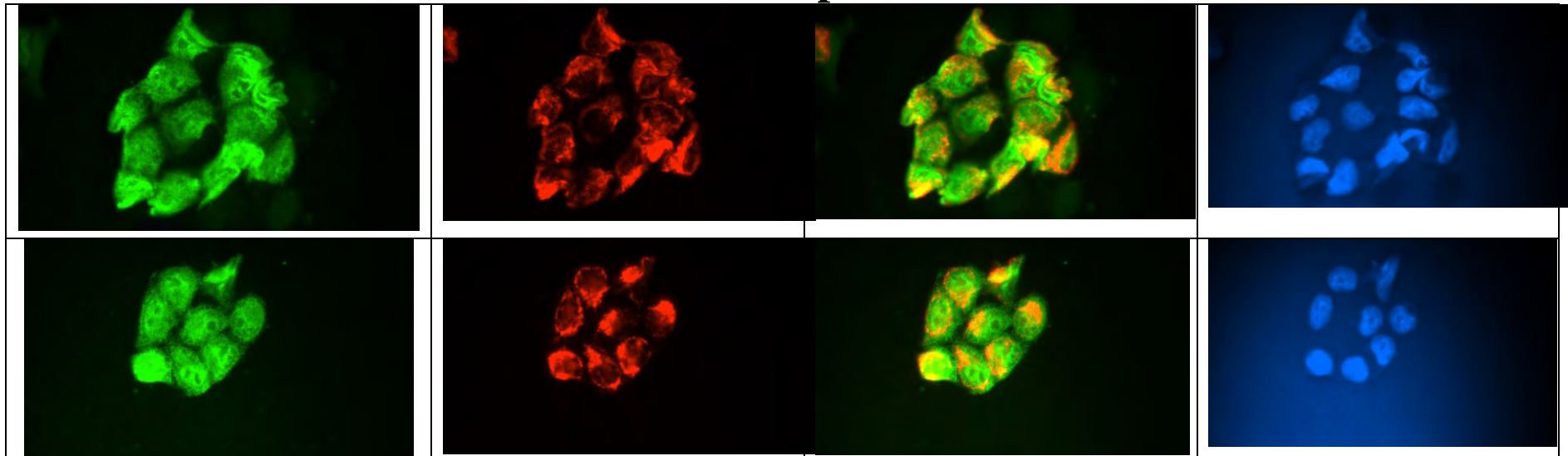


### 12-2-15 up a3 06

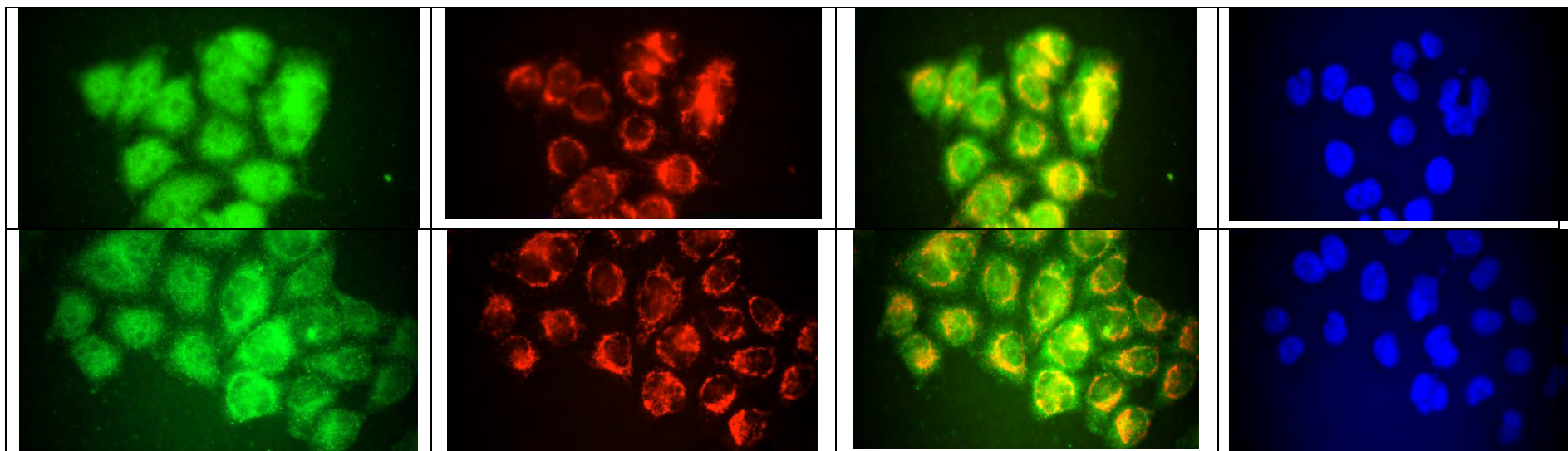




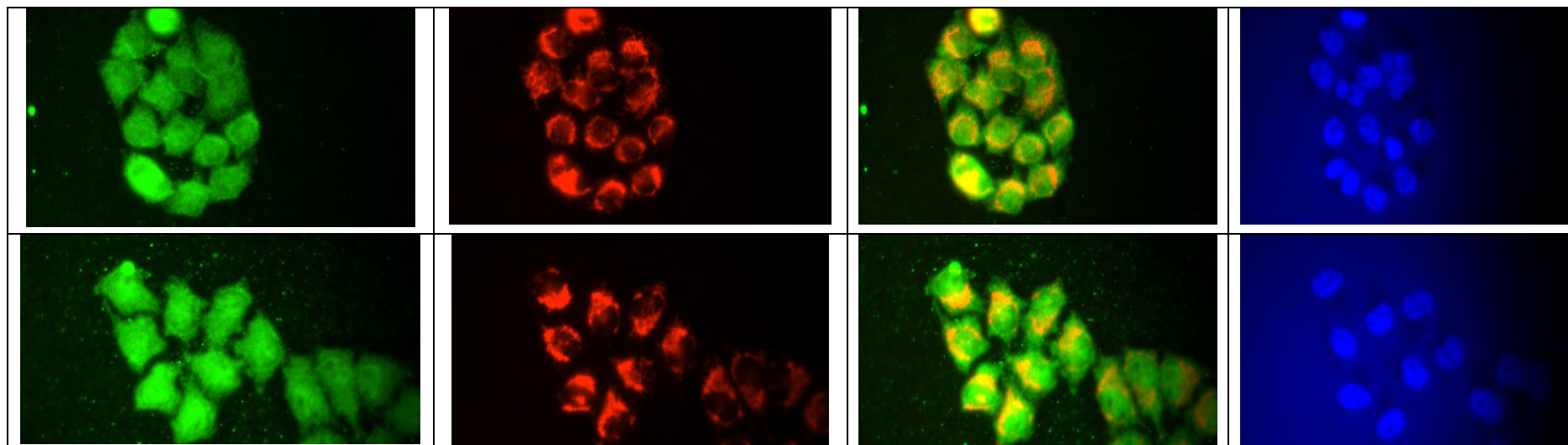
**12-2-15 up a3 08**



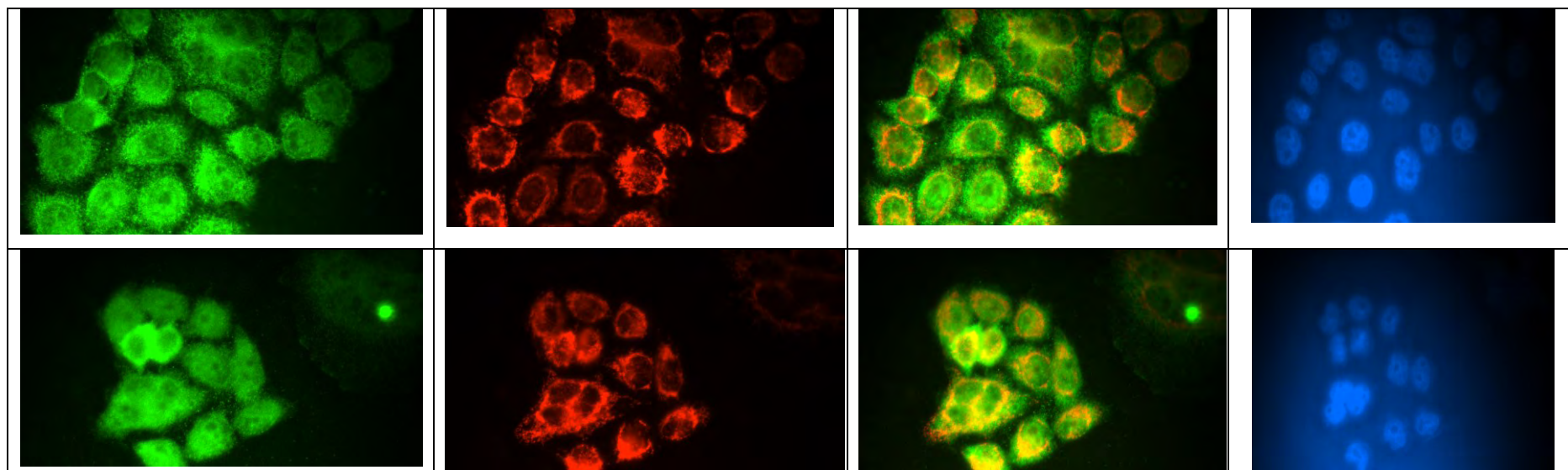
**14-02-15 ub 04 b3**



### 14-02-15 ub10 b3

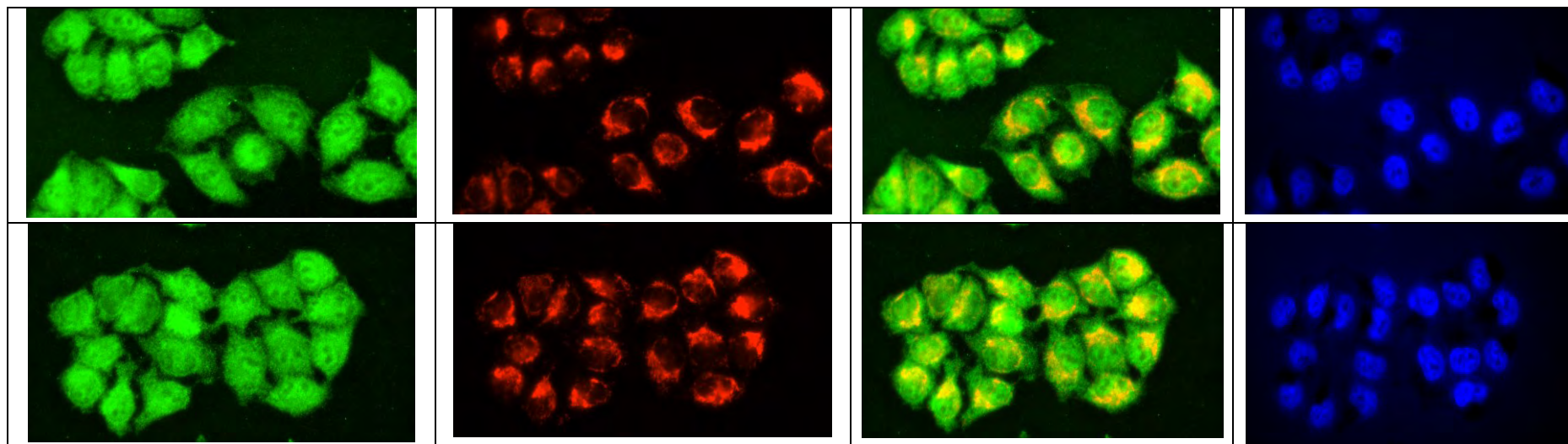


### 14-3-15 UB a1 b3

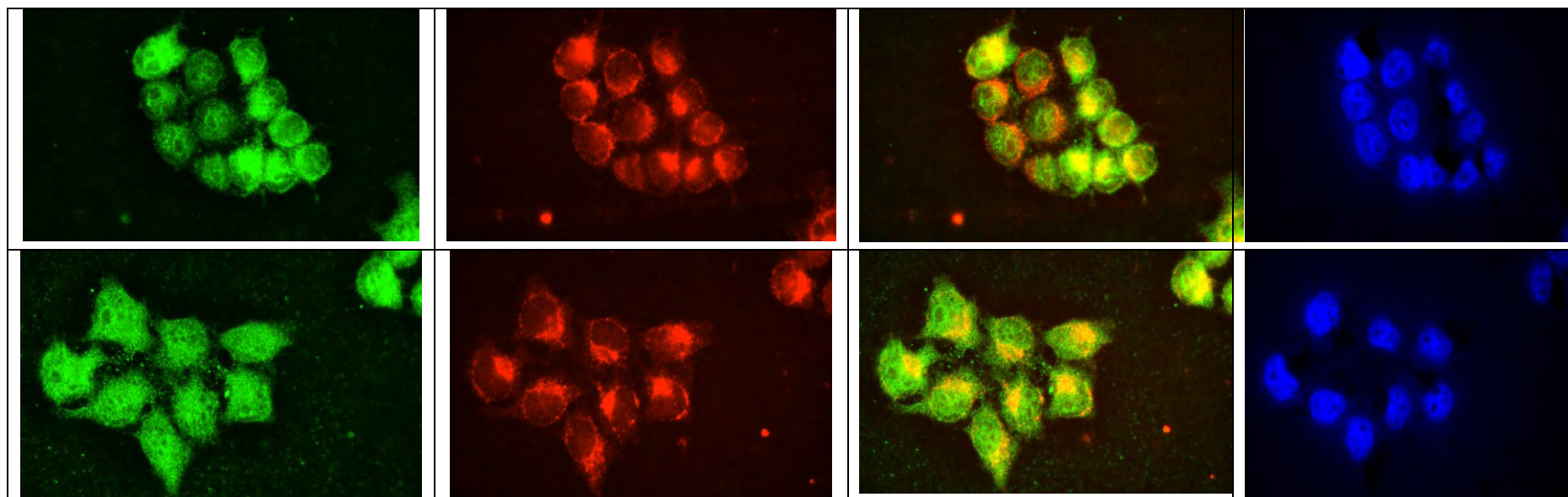




## UB 06 B3



## UB 08 B3



## 11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. A.-M.G. Psarra, C.E. Sekeris / *Biochimica et Biophysica Acta* 1783 (2008) 1–11 «Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment»
2. A.-M.G. Psarra, C.E. Sekeris 2007: *Steroid and Thyroid Hormone Receptors in Mitochondria*
3. Carlberg C. (2004). *Mechanisms of Signal Transduction and Inducible gene Expression*, 77-95. “Principles of gene regulation by bioactive lipids through members of the nuclear receptor superfamily”.
4. Glass C.K. and Rosenfeld M.G. (2000), *Genes Dev.*, **14**, 121-141. “The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors”.
5. Shao D. and Lazar M.A. (1999), *J Clin Invest.*, 103, 1617-1618. “Modulating nuclear receptor function: may the phos be with yo
6. Glass C.K., (1994). *Endocrine Rev.*, 15 (3), 391-407. “Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimmers and heterodimer.
7. Kurokawa R., Yu V.C., Naar A., Kyakumoto S., Han Z., Silverman S., Rosenfeld M.G. and Glass C.K. (1993). *Genes Dev*, **7**, 1423-1435. “Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization in interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers
8. Kersten S., Gronemeyer H., Noy N., (1997), *J Biol Chem.*, **272**, 12771-12777. “The DNA binding pattern of the retinoid X receptor is regulated by ligand-dependent modulation of its oligomeric state
9. Dong D. and Noy N. (1998), *Biochemistry*, **37**, 10691-10700. “Heterodimer formation by retinoid X receptor: regulation by ligands and by receptor’s selfassociation properties.
10. Chen Z.P., Iyer J., Bourguet W., Held P., Mioskowski C., Lebeau L., Noy N.,Champon P., Gronemeyer H. (1998), *J Mol Biol.*, **275**, 55-65. “Ligand- and DNA-induced dissociation of RXR tetramers
11. Mader S., Kumar V., de Verneuil H., Chambon P. (1989), *Nature*, 338, 271-274. “Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element”.
12. Umesono K., Evans R.M. (1989), *Cell*, 57, 1139-1146. “Determinants of target gene specificity for steroid / thyroid hormone receptors
13. Luisi B.V., Xu W.X., Otwinowski Z., Freedman L.P., Yamamoto K.R., Singler P.B. (1991), *Nature*, **352**, 497-505. “Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA”.
14. Hirst M.A., Hinck L., Danielsen M., Ringold G.M. (1992), *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, **89**, 5527-5531. “Discrimination of DNA response elements for thyroid hormone and estrogen is dependent on dimerization of receptor DNA binding domains”.
15. Wilson T.E., Paulsen R.E., Radgett K.A., Milbrandt J. (1992), *Science*, **256**,107-110. “Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors”.
16. Nolte R.T., Wisely G. B., Westin S., Cobbs J.E., Lambert M.H., Kurokawa R., Rosenfeld M.G., Willson T.M., Glass C.K., Milburn M.V. (1998), *Nature*,**395**, 137-143. “Ligand binding and co-activator assembly of the Peroxisome proliferator-activated receptor-γ”.
17. Hu X. and Lazar M.A.(1999), *Nature*, **402**, 93-96. “The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors”.

18. Nagy L, Kao H.-Y., Love J.D., Li C., Banayo E., Gooch J.T., Krishna V., Chatterjee K., Evans R.M., Schwabe J.W.R. (1999), *Genes Dev.*, **13**, 3209-3216. "Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors".
19. Towers T.L. and Freedman L.P. (1998), *J Biol Chem.*, **273**, 10338-10348. "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transcription is directly repressed by the vitamin D3 receptor. Implications for allosteric influences on nuclear receptor structure and function by a DNA element".
20. Towers T.L., Staeva T.P., Freedman L.P. (1999), *Mol Cell Biol.*, **19**, 4191-4199. "A two-hit mechanism for vitamin D3-mediated transcriptional repression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene: vitamin D receptor competes for DNA binding with NFAT1 and stabilizes c-Jun
21. Robyr D., Wolffe A.P., and Wahli W. (2000), *Mol Endocrinol*, **14** (3), 329-347. "Nuclear Hormone Receptor Coregulators In Action: Diversity For Shared Tasks".
22. Laudet V. and Gronemeyer H. (2002), *Academic Press*, "*The Nuclear Receptor, Facts Book*".
23. Kumar R, Thompson EB (2005): Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol* **94**(5):383-394
24. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995): The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**(6):835-839.
25. Beato M, Klug J (2000): Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* **6**(3):225-236.
26. Beato M, Sanchez-Pacheco A (1996): Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* **17**:587-609.
27. Dong D, Cidlowski JA (2003): Glucocorticoid receptor structure and function. *Encyclopedia of Hormones*. Elsevier Science (USA).
28. Hittelman AB, Burakov D, Iñiguez-Lluhi JA, Freedman LP, Garabedian MJ (1999): Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *EMBO J* **18**(19):5380-5388.
29. [en.wikipedia.org/wiki/Selective\\_glucocorticoid\\_receptor\\_modulator](https://en.wikipedia.org/wiki/Selective_glucocorticoid_receptor_modulator)
30. Vayssière BM, Dupont S, Choquart A, Petit F, Garcia T, Marchandeu C et al. (Aug 1997). "Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo". *Molecular Endocrinology*
31. Lin CW, Nakane M, Stashko M, Falls D, Kuk J, Miller L et al. (Aug 2002)
32. Rhen T, Cidlowski JA (Oct 2005). "Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs"
33. Beraiter-Hann J., Voth M. 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy Research Techniques* **27**: 198- 219.
34. Mindell D.P., Sorenson M.D., Dimcheff D.E. 1998. Multiple independent origins of mitochondrial gene order in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**: 10693-10697.
35. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijin M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Poe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Standen R., Young I.G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-465.
36. Bibb MJ, Vanetten RA, Wright CT, Walberg MW, Clayton DA. 1981. Sequence and Gene Organization of Mouse Mitochondrial-DNA. *Cell*. **26**:167-180.
37. Johansen S., Guddal P.H., Johansen T. 1990. Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Nucleic Acids Research*. **18**: 411-419.

38. Δημόπουλος Κ.Α., Αντωνοπούλου Σ., (2000) *Βασική Βιοχημεία*. Αθήνα: Εκδόσεις Τεχνολογία
39. Vander A., Sherman J., Luciano D., (2001) *Φυσιολογία του ανθρώπου 8η έκδοση*. Μτφ. Ν. Γελαδάς, Μ. Τσακόπουλος. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
40. McPhee S., Μοντσόπουλος Χ., (2000) *Παθολογική Φυσιολογία*. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας
41. Paquot N. et al, "Effects of glucocorticoids and sympathomimetic agents on basal and insulin-stimulated glucose metabolism". Clin Physiol. 1995 May; 15(3): 231-40
42. Chrousos GP, "The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immunemediated inflammation". N Engl J Med 1995; 332: 1351-62
43. Janeway C.A. Jr, Travers P., (1999) *Κλινική Ανοσοβιολογία 2η έκδοση*. Μτφ. Π.Γ. Βλαχογιαννόπουλος. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
44. Andreoli T.E., Bennett J.C., Carpenter C.C.J., Plum F., (2000) *Cecil Βασική Παθολογία*. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας
45. Mycek M.J., Harvey R.A., Champe P.C, (2003) *Φαρμακολογία 2η έκδοση*. Μτφ. Ι. Στ. Παπαδόπουλος, Γ. Παπαδόπουλος. Αθήνα: Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου.
46. Elders M.J. et al, Am J Dis Child. 1975; 129: 1329
47. <http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-C120/480/3166,12758/>
48. Φαρμακευτικά Προϊόντα Φυσικής Προελεύσεως, Gunnar Samuelsson, Πανεστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 2004, σελ. 45-46
49. [http://en.wikipedia.org/wiki/Oleanolic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Oleanolic_acid)
50. Triterpenoids as new anti-cancer drugs. A. Petronelli, G. Pannitteri, U. Testa. Anti-cancer Drugs, 2009 November, 20 (10): 880-92.
51. Haridas V, Xu Z-X, Kitchen D, Jiang A, Michels P, et al. (2011) The Anticancer Plant Triterpenoid, Avicin D, Regulates Glucocorticoid Receptor Signaling: Implications for Cellular Metabolism
52. Saleem M, Kweon MH, Yun JM, Adhami VM, Khan N, Syed DN, Mukhtar H. Cancer Res. (2005 Dec)
53. Szakiel A et al., *Phytochem Rev* 2012, 11, 263
54. [en.wikipedia.org/?title=Terpene](http://en.wikipedia.org/?title=Terpene)
55. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 1995; 267:1445-1449
56. Nagata S. Fas Ligand and immune evasion. Nature Medicine 1996;2:1306.
57. Sen S. Programmed cell death: concept, mechanism and control. Biological Review of the Cambridge Philosophical Society 67: 287-319
58. Saikumar P, Dong Z, Weinberg IM, Venkatachalam MIA. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. Oncogene 1998;17:3341-3349.
59. Aravind L, Dixit VM, Koonin EV. The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. TIBS 24:47-53.
60. Mitsiades N, Poulaki V, Tsokos M et al. Fas/Fas Ligand up-regulation and Bcl-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1998
61. Tanaka Y, Yoshihara K, Itaya A, Kamiya T Koide SS Mechanism of the inhibition of  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ -dependent endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation. Journal of Biological Chemistry 1984;259(10): 6579-6585.
62. . Kumar S. The bcl-2 family of proteins and activation of the ICE-CED-3 family of proteases: a balancing act in apoptosis. Cell Death Differentiation 1997;4:2-3
63. Oltvai ZN, Williman CL, Korsmayer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, the accelerates programmed cell death. Cell 1993;74:609-619.
64. Nagata S. Fas ligand and immune evasion. Nature Medicine 1996;2:1306.



65. Masters SA, Pitti RM, Sheridan JP, Asnkenazi A. Control of apoptosis signaling by Apo2 ligand. *Recent Progress in Hormone Research* 1999;54:225-234.
66. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for Dap. *Cell* 1996;86(1):147-157.
67. Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:16443-16446.
68. Varfolomeev EE, Schucjmann VI, et al. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:5053-5060.
69. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, BSenis J. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic caspase. *Current Biology* 1998;8:1001-1008.
70. Jacobson MD, Burne Jr, King MP, Mjyashita T, Reed JC, Raff MC. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 1993;361:365-369.
71. Ameisen JC. The origin of programmed cell death. *Science* 1996;272:1278-1279.
72. Halevy O. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 1995;267:1018-1021
73. Milas L, Stephents LC, Meyn RE. Relation of apoptosis to cancer therapy. *In Vivo* 1994;8:665-673.
74. Gregory CY, Bird AC. Cell loss in retinal dystrophies by apoptosis-death by informed consent. *Br J Ophthalmol* 1995;79:186-190.
75. Δελτίο Α Παιδιατρικής κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Τόμος 51, τεύχος 3 «Παρενέργειες από τη χρήση των κορτικοστεροειδών» Α. Δάκου-Βουτετάκη