



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ



ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ ΣΤΕΦΑΝΟΣ
ΛΑΡΙΣΑ 2019

ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ ΣΤΕΦΑΝΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΔΡ. ΆΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ ΨΑΡΡΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF PLANT EXTRACTS

CHRISTODOULOU STEFANOS

SUPERVISOR: Dr. ANNA-MARIA PSARRA

*LABORATORY OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL
BIOCHEMISTRY*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας
Φυτών

Λεωνίδα Δημήτριο, Καθηγητή Βιοχημείας

ΠΕΡΙΛΙΨΗ

Στην σύγχρονη εποχή όλο και περισσότερα ευρήματα αποδεικνύουν τις ευεργετικές επιδράσεις της Μαστίχας Χίου. Το πλήθος των συστατικών που εμπεριέχονται στο εκχύλισμα του φυτού είναι υπεύθυνο για τις πλούσιες θεραπευτικές ικανότητες του. Τα τριτερπένια αποτελούν κύρια συστατικά των εκχυλισμάτων που απομονώνονται από το φυτό. Έρευνες αποδεικνύουν την ενεργοποίηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών από τα τριτερπένια, λόγω της δομικής ομοιότητας τους με τα γλυκοκορτικοειδή. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση του στον πυρήνα και τη ρύθμιση συγκεκριμένων γονιδίων στόχων. Τα δεδομένα αυτά ανοίγουν νέους ορίζοντες όσον αφορά την εύρεση νέων φαρμάκων με πιθανόν μειωμένες παρενέργειες, για τη θεραπεία πλήθους ασθενειών. Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής είναι η διερεύνηση των αντικαρκινικών και υπογλυκαιμικών δράσεων του πολικού εκχυλίσματος Μαστίχας Χίου καθώς και η διερεύνηση των βιοχημικών μηχανισμών μέσω των οποίων επιτελούνται αυτές οι δράσεις, με έμφαση στη διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής του στη ρύθμιση της σηματοδότηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Δεδομένων των παρενεργειών που προκύπτουν από τη συστηματική χρήση των γλυκοκορτικοειδών η μελέτη αυτή αποσκοπεί στην εύρεση νέων επιλεκτικών αγωνιστών του GR προκειμένου να καταπολεμηθούν πλήθος ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, ο διαβήτης, τα αυτοάνοσα νοσήματα με όσο το δυνατόν λιγότερες παρενέργειες.

ABSTRACT

Nowadays an increasing number of research results have shed on the beneficiary effects of Chios Mastiha. Chemical composition of Chios Mastiha (resin) is responsible for its therapeutic capacity. Triterpenes constitute the main component of the resin. Studies have shown the activation of the glucocorticoid receptor by certain triterpenes due to their structural similarity with the glucocorticoids. The receptor's activation results in its translocation to the nucleus, its transcriptional activation and the regulation of the expression of its target genes. This study aims to contribute to the investigation of new pharmaceutical approaches towards the treatment of many diseases. The aim of the present study is firstly to explore the anti-cancer and hypoglycemic action of polar extract of Chios Mastiha, and secondly to investigate the biochemical mechanism through which these actions are performed, with emphasis on investigating its potential involvement in the regulation of receptor signaling. to investigate the interaction of the extract, the receptor and glucocorticoids. In this light, it will be attempted to clarify the molecular mechanisms that take place in the above mentioned processes. Bearing in mind the side effects deriving from the systematic use of glucocorticoids, this study aims to find new selective GR agoists, with a view to facing a number of serious diseases, such as cancer, diabetes, autoimmune diseases

Περιεχόμενα

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1 ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ: ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ	5
1.2 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ	6
1.2.1 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ: ΔΟΜΗ.....	6
1.2.2 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ: ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ	8
1.3 ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ.....	9
1.3.1 ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	9
1.3.2 ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ	10
1.3.3 ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ	10
1.4 ΧΡΗΣΗ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ.....	11
1.5 ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ.....	12
1.6 ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ: ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	13
1.6.1 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ	13
1.6.2 ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	13
1.6.3 ΚΑΡΔΙΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ	14
1.6.4 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ	14
1.7 ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ: ΣΥΣΤΑΣΗ.....	15
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	16
2.1.1 ΟΡΓΑΝΑ	16
2.1.2 ΧΗΜΙΚΑ.....	16
2.1.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑΥΛΙΚΑ	17
2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ	17
2.3 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	19
2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ	19
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	22
3.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΕΠΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΡΕΡСК	22
3.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΕΠΠΙΠΕΔΑ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ.....	24
4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	26
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	29

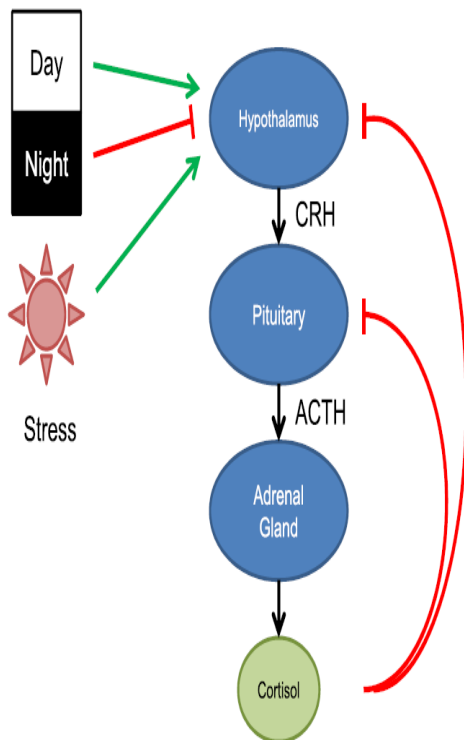
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γλυκοκορτικοειδή: Ρύθμιση της σύνθεσης και έκκρισης

Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν μέλη της οικογένειας των στεροειδών ορμονών, οι οποίες συντίθενται και εκκρίνονται από το φλοιό των επινεφριδίων. Πιο συγκεκριμένα ο φλοιός των επινεφριδίων αποτελείται από τρεις στιβάδες κυττάρων την δικτυωτή, την στηλιδωτή και την σπειροειδή ζώνη που περιβάλλονται από μία κάψα που αποτελείται από συνδετικό ιστό. Η σπειροειδής ζώνη είναι υπεύθυνη για την παραγωγή των αλατοκορτικοειδών, ενώ στην στηλιδωτή και δικτυωτή συντίθενται τα γλυκοκορτικοειδή και διάφορες φυλετικές ορμόνες. Πρόδρομο μόριο όλων των στεροειδών ορμονών αποτελεί η χοληστερόλη η οποία υφίσταται μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων προκειμένου να παραχθούν οι ενεργές ορμόνες. (Εισαγωγή στη φυσιολογία του ανθρώπου, Sherwood, 2016)

Τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε ένα ευρύ φάσμα διαδικασιών που συντελούνται στον ανθρώπινο οργανισμό, μερικές εκ των οποίων είναι η ομοιόσταση, η ρύθμιση του μεταβολισμού, η προσαρμογή στο στρες, και συνεπώς η ρύθμιση των επιπέδων τους είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η ρύθμιση της έκκρισής τους επιτυγχάνεται μέσω του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-φλοιού των επινεφριδίων. Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) διεγείρει την έκκριση κορτικοτροπίνης (ACTH) από τα κορτικοτρόπα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Στη συνέχεια, η ACTH με την σειρά της δρα στο φλοιό των επινεφριδίων προάγοντας την σύνθεση και απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών. Μετά την έκκριση τους τα γλυκοκορτικοειδή, εκτός των οργάνων στόχων, επιδρούν στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και τον υποθάλαμο αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την περαιτέρω

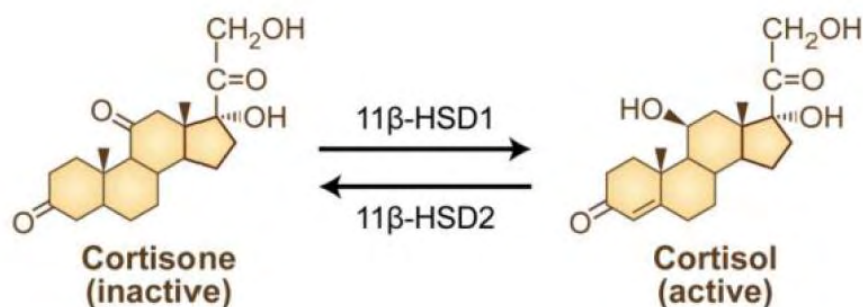
παραγωγή και έκκριση ACTH και CRH δημιουργώντας ένα κύκλο αρνητικής ανατροφοδότησης. Παράγοντες όπως ο κirkάδιος ρυθμός και οι στρεσογόνες καταστάσεις μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών (Cain D.W. *et al.*, 2013).



Εικόνα 1

*Ρύθμιση της έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων. (Cain D.W. *et al.*, 2013)*

Εκτός από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν η ρύθμιση της δράσης των γλυκοκορτικοειδών μπορεί να επιτευχθεί τόσο σε επίπεδο ιστού όσο και σε επίπεδο κυττάρου. Η κορτιζόλη για παράδειγμα αποτελεί το πιο κοινό γλυκοκορτικοειδές. Η ικανότητα της να προσδένεται σε πρωτεΐνες του πλάσματος, όπως η αλβουμίνη και η σφαιρίνη πρόσδεσης των κορτικοστεροειδών (CBG), έχει ως αποτέλεσμα μόνο το 5% της κορτιζόλης που βρίσκεται στην κυκλοφορία να μπορεί να επιφέρει κάποιο βιολογικό αποτέλεσμα. Αύξηση των επιπέδων της CBG μειώνει την βιοδιαθεσιμότητα της κορτιζόλης. Εντός του κυττάρου τη διαδικασία της ρύθμισης αναλαμβάνουν τα ένζυμα της οικογένειας 11β-αφυδρογονάσης των υδροξυστεροειδών (11β-HSD). Η 11β-HSD1 είναι υπεύθυνη για την μετατροπή της κορτιζόνης σε κορτιζόλη αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την δράση της, ενώ η 11β-HSD2 καταλύει την αντίθετη αντίδραση (Cain D.W. *et al.*, 2013).



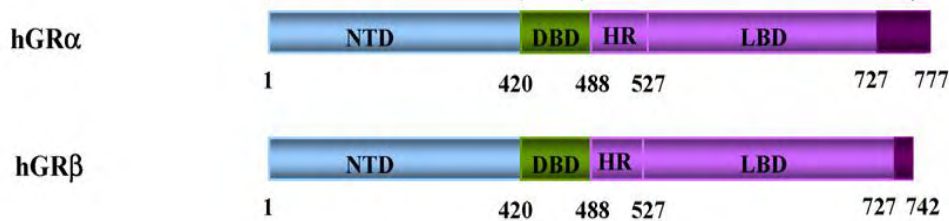
Εικόνα 2

*Η μετατροπή της κορτιζόνης στην ενεργή κορτιζόλη και αντίστροφα. (Kadmiel M. *et al.*, 2013)*

1.2 Υποδοχέας τω γλυκοκορτικοειδών

1.2.1 Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών: Δομή

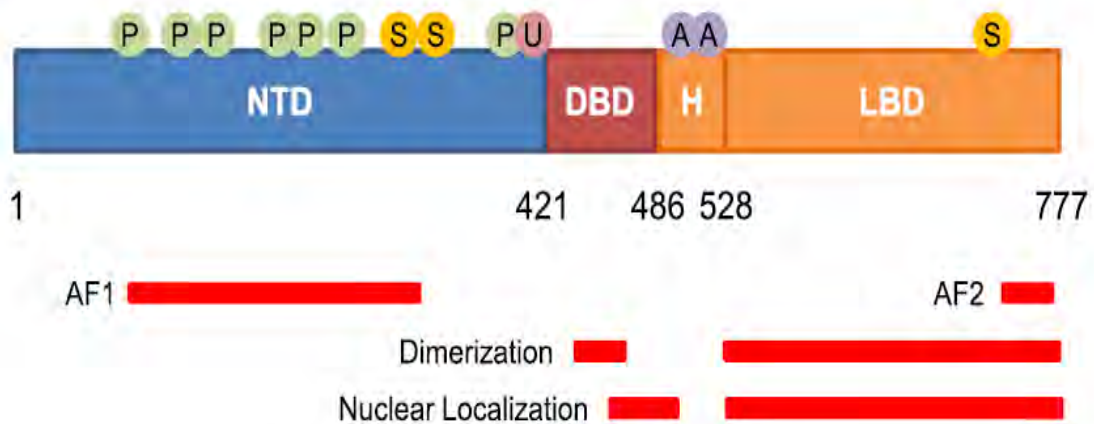
Τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν τις δράσεις τους μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR), το γονίδιο του οποίου εδράζεται στο χρωμόσωμα 5 (NR3C1) του ανθρώπινου γονιδιώματος και διαθέτει 9 εξόνια. Δύο είναι οι κύριες ισομορφές του υποδοχέα η α και β με την α να είναι επικρατέστερη και να έχει προσελκύσει το μεγαλύτερο επιστημονικό ενδιαφέρον μέχρι σήμερα. Αυτές οι δύο ισομορφές προκύπτουν εξαιτίας του εναλλακτικού ματίσματος στο εξόνιο 9 του γονιδίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι δύο ισομορφές του υποδοχέα να είναι πανομοιότυπες ως το αμινοξύ 727. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός πως στην ισομορφή α μετά το αμινοξύ 727 ακολουθούν άλλα 50 μη ομόλογα αμινοξέα ενώ στην ισομορφή β άλλα 15. Η αμινοξικές διαφορές επιφέρουν και αλλαγές στη λειτουργικότητα των δύο ισομορφών με την ισομορφή α να συμπεριφέρεται κυρίως ως προσδετοεξαρτώμενος μεταγραφικός παράγοντας που στοχεύει συγκεκριμένα γονίδια και την ισομορφή β να εμφανίζει μεταγραφική ενεργότητα για συγκεκριμένα γονίδια και να λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της ισομορφής α. (Nicolaidis N.C. *et al.*, 2009)



Εικόνα 3

Οι δύο ισομορφές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. (Nicolaidis N.C. et al. 2009)

Τρία είναι τα βασικά μέρη που συγκροτούν την πρωτεΐνη του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών: μια περιοχή η οποία βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο (N-Terminal Domain, NTD), μια περιοχή που έχει τη ικανότητα να δεσμεύεται στο DNA (DNA Binding Domain, DBD) και μια περιοχή αλληλεπίδρασης με τον προσδέτη (Ligand Binding Domain, LBD). Η NTD αποτελεί στόχο πολλών μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων και διαθέτει μια επικράτεια (AF-1) η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η πρόσδεση στο DNA καθίσταται δυνατή με δύο μοτίβα δακτυλίου ψευδαργύρου που βρίσκονται στη DBD, όπου αποτελεί και την πιο συντηρημένη περιοχή στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Στην συγκεκριμένη περιοχή εντοπίζεται και η θέση διμερισμού του υποδοχέα. Στη LBD δημιουργείται ένας υδρόφοβος θύλακας όπου προσδένονται τα γλυκοκορτικοειδή που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα. Επίσης στην περιοχή αυτή εντοπίζεται και μια επικράτεια (AF-2) που συμμετέχει στην ενεργοποίηση της μεταγραφής. Οι DBD και LBD συνδέονται μεταξύ του μέσω μια εύκαμπτης περιοχής που αποτελεί την περιοχή άρθρωσης. Δύο αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Location Sequencing, NLS) που εντοπίζονται η μία (NLS1) μεταξύ της περιοχής της DBD και της περιοχής της άρθρωσης και η δεύτερη (NLS2) εντός της περιοχής της LBD, είναι υπεύθυνες για την μεταφορά του υποδοχέα εντός του πυρήνα (Cain D.W. et al., 2013).



Εικόνα 4

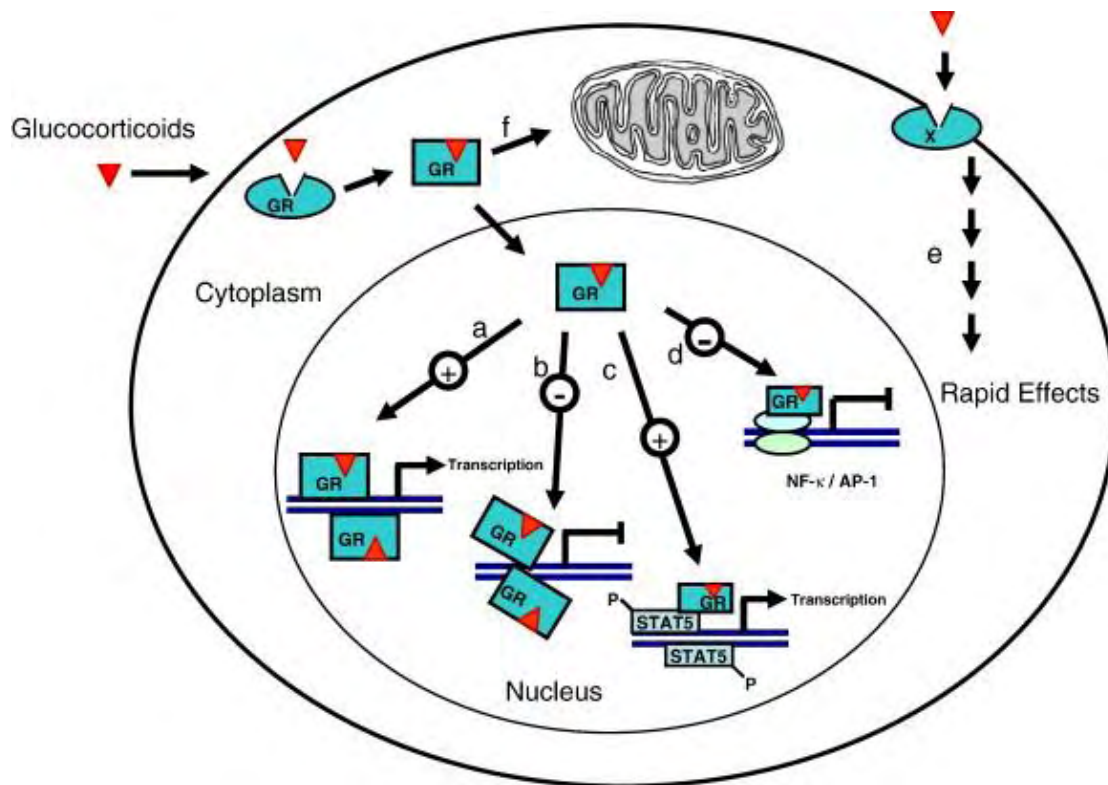
Η κύρια δομή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Cain D.W. et al., 2013)

1.2.2 Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών: Σηματοδότηση

Όταν απουσιάζει ο αγωνιστής του GR, δηλαδή τα γλυκοκορτικοειδή ο υποδοχέας βρίσκεται σε μια κατάσταση μεταγραφικής αδράνειας διατηρώντας παράλληλα την υψηλή συγγένεια με τον αγωνιστή του. Ο μεταγραφικά αδρανής υποδοχέας εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα σε σύμπλεγμα με διάφορες πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος, όπως μέλη της οικογένειας των ανοσοφιλινών, πρωτεΐνες θερμικού σοκ καθώς και κινάσες όπως η c-Src. Η πρόσδεση του αγωνιστή επάγει αλλαγές στην διαμόρφωση του υποδοχέα με αποτέλεσμα την αποδέσμευση των πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος και την μετατόπιση του υποδοχέα στο πυρήνα. Ο υποδοχέας εντός του πυρήνα προσδένεται ως διμερές σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Elements, GREs) και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων στόχων. Επιπλέον σημαντικό ρόλο για την ρύθμιση της μεταγραφής διαδραματίζουν και οι συνενεργοποιητές που εντοπίζονται στον πυρήνα, όπως ακετυλοτρανσφεράσες και μεθυλοτρανσφεράσες. Ενώ τα στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή εμφανίζονται πολλές φορές στο γονιδίωμα, λίγα εξ' αυτών προσεγγίζονται από τον GR. Η συγκεκριμένη επιλεκτικότητα του υποδοχέα οφείλεται στο γεγονός πως η δομή της χρωματίνης διαφέρει από ιστό σε ιστό, συνεπώς ενδέχεται ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου η χρωματίνη να είναι περισσότερο ή λιγότερο προσεγγίσιμη για τον υποδοχέα (Cain D.W. *et al.*, 2013).

Περεταίρω έρευνες κατέδειξαν την ικανότητα του GR να συμμετέχει στην ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στόχων του, με έμμεσο τρόπο, μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Η ρύθμιση αυτή μπορεί να υλοποιηθεί σε συνδυασμό είτε όχι με αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τα GRE. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η αλληλεπίδραση του GR με μέλη της οικογένειας STAT (signal transducer and activator of transcription) όπου διεγείρει την μεταγραφή καθώς και η αλληλεπίδραση του υποδοχέα με μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο NF-κβ (nuclearfactor κβ) και ο AP1 (activatorprotein 1) όπου σε αυτήν την περίπτωση το αποτέλεσμα είναι καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του (Oakley R.H. *et al.*, 2013).

Η επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στην γονιδιακή έκφραση μέσω του GR είναι υπεύθυνη για τις βραχυπρόθεσμες κυτταρικές αποκρίσεις. Νεότερες έρευνες δείχνουν πως τα γλυκοκορτικοειδή έχουν την ικανότητα να επάγουν και γρήγορες κυτταρικές αποκρίσεις χωρίς να επεμβαίνουν στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η κινάση c-Src. Όταν ο αγωνιστής προσδεθεί στον GR και επάγει αλλαγές στην διαμόρφωση η c-Src αποδεσμεύεται από τον ενεργό πια υποδοχέα και ενεργοποιεί ένα καταρράκτη σηματοδότησης που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή του αραχιδονικού οξέος. Επιπροσθέτως μία μορφή του GR στο κυτταρόπλασμα έχει βρεθεί πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία και τον πολλαπλασιασμό των νευρικών κυττάρων μια διαδικασία που προϋποθέτει την ταχεία ενεργοποίηση των κινασών MAP και c-Src. (Oakley R.H. *et al.*, 2013)



Εικόνα 5

Η σηματοδότηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. (Psarra & Sekeris, 2008)

Τέλος ένα ακόμη σημαντικό κεφάλαιο που ασχολείται με την σηματοδότηση του υποδοχέα είναι έρευνες που αποδεικνύουν την μεταφορά του GR εντός των μιτοχονδρίων και την ρύθμιση γονιδίων της αναπνευστικής αλυσίδας. (Psarra 2005, Psarra & Sekeris, 2008, 2009, 2011)

1.3 Δράσεις γλυκοκορτικοειδών

Τα οφέλη της δράσης των γλυκοκορτικοειδών καθώς και οι παρενέργειες τους ώθησαν πολλούς επιστήμονες να ερευνήσουν και να αποσαφηνίσουν τους μηχανισμούς με τους οποίους δρουν.

1.3.1 Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Η πιο χαρακτηριστική δράση των γλυκοκορτικοειδών είναι η καταστολή της φλεγμονής. Τα γλυκοκορτικοειδή μέσω του GR επεμβαίνουν στην ρύθμιση γονιδίων που κωδικοποιούν προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες και χημειοκίνες καθώς και βασικά ένζυμα που εμπλέκονται στην έναρξη και / ή τη διατήρηση της φλεγμονώδους απόκρισης του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, ο GR ενεργοποιεί τον καταστολέα Iκb του μεταγραφικού παράγοντα NF-κb με αποτέλεσμα την καταστολή μεταγραφής πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση. Επίσης η πρωτεΐνη GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper) έχει βρεθεί πως αλληλεπιδρά και αναστέλλει την λειτουργία μεταγραφικών παραγόντων της ανοσολογικής απόκρισης όπως ο NF-κb και ο AP-1 (Coutinho A. E. *et al.*, 2011).

1.3.2 Αποπτωτικές δράσεις

Εκτός των αντιφλεγμονωδών δράσεων ιδιαίτερη προσοχή έχει στραφεί επίσης στο διττό ρόλο των γλυκοκορτικοειδών όσον αφορά την απόπτωση. Δυο χαρακτηριστικά παραδείγματα αποπτωτικών αποτελεσμάτων των γλυκοκορτικοειδών συναντούμε στο σκελετικό σύστημα και στα ηωσινόφιλα. Στο σκελετικό σύστημα τα γλυκοκορτικοειδή είναι υπεύθυνα για την απόπτωση των οστεοβλαστών. Ειδικότερα τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν τα επίπεδα των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bim και Bak και μειώνουν τον παράγοντα Bcl-xL που απαιτείται για την επιβίωση τους. Ακόμη αυξάνουν το ενδοκυτταρικό Ca^{++} και τις ROS ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Τέλος η αποπτωτική δράση τους ενισχύεται καταστέλλοντας την δράση της κινάσης Akt εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ενεργοποίηση μονοπατιών που συμμετέχουν στην γένεση των οστεοβλαστών και την αποτροπή του θανάτου τους. (T. Komori, 2016)

Τα γλυκοκορτικοειδή επίσης επάγουν την απόπτωση στα ηωσινόφιλα. Τα ηωσινόφιλα είναι συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος και ελέγχουν μηχανισμούς που σχετίζονται με αλλεργίες και άσθμα. Τα κύτταρα αυτά έχουν σχετικά μικρό χρόνο ζωής και παράγουν σε υψηλά επίπεδα τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bid. Τα γλυκοκορτικοειδή δρουν αναστέλλοντας ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας και μειώνοντας τα επίπεδα του αντιοξειδωτικού ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου. Τα δύο αυτά γεγονότα έχουν ως συνέπεια την αύξηση των ROS και την διαταραχή στην διαπερατότητα των μιτοχονδριακών μεμβρανών. Έτσι με την βοήθεια της πρωτεΐνης Bid το κυτόχρωμα C εξέρχεται από τα μιτοχόνδρια, επάγει τον σχηματισμό του αποπτωσώματος και επάγει την έναρξη της απόπτωσης. (Ilmarinen P. *et al.*, 2014)

1.3.3 Αντί-αποπτωτικές δράσεις

Αντίθετο φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα της δράσης των γλυκοκορτικοειδών στους οστεοκλάστες, όπου αυξάνουν τον χρόνο ζωής τους. Στο μηχανισμό αυτό εμπλέκονται οι πρωτεΐνες Rankl και οστεοπροτογερίνη που παράγονται από τα κύτταρα του στομάχου και τους οστεοβλάστες και ένας υποδοχέας Rank που εντοπίζεται στα προγονικά κύτταρα των οστεοκλαστών και στους οστεοκλάστες. Όταν η πρωτεΐνη Rankl προσδεθεί στον υποδοχέα Rank τότε επάγεται οστεοκλαστογένεση. Η οστεοπροτογερίνη μπορεί να λειτουργήσει ως δόλωμα αλληλοεπιδρώντας με τον υποδοχέα αποτρέποντας έτσι την πρόσδεση του με την πρωτεΐνη Rankl. Η δράση των γλυκοκορτικοειδών έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων του mRNA της οστεοπροτογερίνης και την ήπια αύξηση των επιπέδων της Rankl αυξάνοντας με αυτόν την γένεση και λειτουργία των οστεοκλαστών. (T. Komori, 2016)

Αντι-αποπτωτικές ιδιότητες των γλυκοκορτικοειδών εντοπίστηκαν επίσης σε επιθηλιακά κύτταρα, ηπατοκύτταρα καθώς και λιποκύτταρα. Σε καλλιέργεια πρόδρομων ηπατοκυττάρων βρέθηκε πως η δεξαμεθαζόνη, ένα από τα πιο γνωστά συνθετικά γλυκοκορτικοειδή και αγωνιστής του GR αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Στα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε δεξαμεθαζόνη αυξήθηκαν επίπεδα των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-XL ενώ

μειώθηκαν τα επίπεδα και η δράση των προ-αποπτωτικών Bax και Bad. Συμπερασματικά το μεγαλύτερο ενδιαφέρον που παρουσιάζουν τα γλυκοκορτικοειδή είναι πως μπορούν ανάλογα με τον ιστό να επάγουν διαφορετικό αποτέλεσμα. (Gruver-Yates A. L. *et al.*, 2013)

1.4 Χρήση γλυκοκορτικοειδών και παρενέργειες

Οι ισχυρές αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες των γλυκοκορτικοειδών σε συνδυασμό με τις ιστοειδικές αποπτωτικές δράσεις καθιστά τα γλυκοκορτικοειδή ιδανικά φάρμακα για την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών. Στην σημερινή εποχή τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση αυτοάνοσων νοσημάτων, της οξείας και χρόνιας φλεγμονής καθώς και για την αντιμετώπιση συγκεκριμένων τύπου καρκίνου. Ωστόσο, εκτός των ευεργετικών τους αποτελεσμάτων έρευνες έδειξαν πως η χρόνια χρήση τους και η υψηλές δοσολογίες αυτών των φαρμάκων εγκυμονεί κινδύνους και μπορεί να επιφέρει μια σειρά από παρενέργειες στον οργανισμό. Μερικά ανεπιθύμητα αποτελέσματα από την χρόνια χρήση γλυκοκορτικοειδών είναι η απώλεια μυών, η πρόκληση διαβήτη, η επαγωγή της γλυκονεογένεσης, η ανακατανομή του λίπους και ο αυξημένος καταβολισμός λίπους και πρωτεϊνών. Επίσης, εκτός από τις αρνητικές επιδράσεις στον μεταβολισμό η χρόνια χρήση γλυκοκορτικοειδών είναι υπεύθυνη για την καταστολή του κέντρου του υποθαλάμου καθώς και ασθένειες όπως είναι η οστεοπόρωση (Karra AG. *et al.*, 2019).

Ο συνδυασμός των θεραπευτικών αλλά και ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων που επιφέρουν τα γλυκοκορτικοειδή έχει προσεγγίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτά. Το ευρύ θεραπευτικό φάσμα των γλυκοκορτικοειδών καθιστά επιτακτική την ανάγκη να εντατικοποιηθούν οι έρευνες προκειμένου να βρεθούν αγωνιστές του GR που επάγουν τα θεραπευτικά αποτελέσματα περιορίζοντας όσον το δυνατόν περισσότερο της αρνητικές επιδράσεις. (Karra AG. *et al.*, 2019)

1.5 Μαστίχα Χίου

Η Μαστίχα Χίου είναι η ρητινώδης έκκριση του μαστιχόδεντρου *Pistacia Lentiscus* var. *Chia*. Όταν μιλάμε για μαστίχα Χίου αναφερόμαστε στη φυσική, αρωματική ρητίνη, που εκκρίνεται σε σχήμα δακρύων από τον κορμό και τα μεγάλα κλαδιά του μαστιχόδενδρου. Η έκκριση των δακρύων πραγματοποιείται μέσα από επιφανειακές τομές που προξενούν στα μαστιχόδενδρα οι παραγωγοί με αιχμηρά εργαλεία. (Chios Mastiha published scientific booklet)

Το μαστιχόδενδροσχίνος – επιστημονικά *Pistacia Lentiscus* var. *Chia* (οικογένεια *Anacardaceae*), είναι θάμνος αειθαλής ύψους 2-3 μέτρων που αναπτύσσεται αργά και απαιτούνται 40-50 χρόνια μέχρι να αναπτυχθεί πλήρως. Ο σχίνος είναι φυτό ανθεκτικό και έχει ελάχιστες απαιτήσεις, γι' αυτό ευδοκیمی σε άγονα, πετρώδη και φτωχά εδάφη. Οι εδαφικές απαιτήσεις του δέντρου σε υγρασία δεν είναι μεγάλες. Σε εδάφη μάλιστα με μεγάλη υγρασία δυσχεραίνεται η ανάπτυξη του, επειδή εμποδίζεται ο αερισμός των ριζών του. Αντιθέτως, είναι ευάλωτο στο ψύχος, σε περιπτώσεις παγετών (φαινόμενο σπάνιο στη νότια Χίο) οπότε τα μαστιχόδενδρα καίγονται αφού η παγωνιά σκάει τις φλέβες του κορμού τους, γεγονός που καθιστά το νότιο κομμάτι της Χίου ένα ιδανικό μέρος για να αναπτυχθεί. Η Χίος έχει μακρόστενο σχήμα, με ψηλά, δασωμένα βουνά στο βόρειο τμήμα, που συγκρατούν την υγρασία και εξασθενούν τους βοριάδες. Έτσι, το νότιο, λοφώδες κομμάτι αποκτά ένα ιδιαίτερο κλίμα, ήπιο το χειμώνα και πολύ ξηρό το καλοκαίρι. (Chios Mastiha published scientific booklet)



Εικόνα 6

Καλλιέργεια μαστιχόδεντρων στην Χίο. (Chios Mastiha published scientific booklet)

1.6 Μαστίχα Χίου: Βιολογικές Δράσεις

Η πολύπλοκη σύνθεση της Μαστίχας Χίου δεν είναι ακόμη γνωστή με ακρίβεια. Μια εξαιρετική ποικιλία από αρωματικά και θεραπευτικά συστατικά απαντώνται στη μοναδική αυτή ρητίνη. Πιο συγκεκριμένα εντοπίζονται συστατικά όπως φυσικό πολυμερές, πτητικά και αρωματικά συστατικά που συνθέτουν το αιθέριο έλαιο, το μαστιχέλαιο, τερπενικά οξέα, φυτοστερόλες, πολυφαινολικά μόρια κι ένας μεγάλος αριθμός από άλλα δραστικά συστατικά. (Srygidoroulou *et al.*, 2017)

Ο συνδυασμός των εβδομήντα και επιπλέον συστατικών που εμπεριέχονται στην μαστίχα και το μαστιχέλαιο έχει προσεγγίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον. Πολλές έρευνες καταδεικνύουν της ευεργετικές ιδιότητες των ουσιών αυτών συμπεριλαμβάνοντας αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, καρδιοπροστατευτικές και αντικαρκινικές δράσεις. (Dimas *et al.*, 2012)

1.6.1 Αντιμικροβιακές δράσεις

Όσον αφορά τις αντιμικροβιακές δράσεις, μελέτες σε ασθενείς που έπασχαν από έλκος του δωδεκαδακτύλου έδειξαν πως η μαστίχα Χίου μπορεί να μειώσει την ένταση των συμπτωμάτων χωρίς να επιφέρει κάποια παρενέργεια. Αυτή η ένδειξη κινητοποίησε το επιστημονικό ενδιαφέρον ώσπου περαιτέρω έρευνες απέδειξαν την αντιμικροβιακή δράση της μαστίχας έναντι του βακτηρίου *Helicobacter pylori*, το οποίο είναι κύριος αιτιολογικός παράγοντας για ασθένειες όπως η γαστρίτιδα, το έλκος του στομάχου και του δωδεκαδακτύλου. Επόμενη μελέτη κατέδειξε την αντιμικροβιακή δράση του μαστιχέλαιου στα παθογόνα βακτήρια *Escherichia coli* (Gram-negative rod), *Staphylococcus aureus* (Gram-positive cocci), και *Bacillus subtilis* (Gram-positive rod). Εκτός από την αντιμικροβιακή δράση η παραπάνω μελέτη πρότεινε πως ο συνδυασμός των ουσιών που εμπεριέχονται στο μαστιχέλαιο ήταν υπεύθυνος για το ευρύ φάσμα της αντιμικροβιακής δράσης καθώς διαφορετικά βακτήρια είναι ευαίσθητα σε διαφορετικές ουσίες. (Dimas *et al.*, 2012)

1.6.2 Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Μελέτες σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού RAW264.7 που είχαν ενεργοποιηθεί με λιποσακχαρίτη (Lipopolysaccharide, LPS) έφεραν στο φως αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της Μαστίχας Χίου. Ειδικότερα η χορήγηση Μαστίχας Χίου σε στερεή ή υγρή μορφή κατάφερε να αναστείλει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών συστατικών όπως είναι το μονοξειδίο του αζώτου και οι προσταγλαδίνες. Ακόμη, η συγκεκριμένη έρευνα απέδειξε πως τα μειωμένα επίπεδα οφείλονταν στην μείωση τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου και του COX-2 (Cyclooxygenase-2), ενός ενζύμου υπεύθυνο για την παραγωγή προσταγλαδινών. (Triantafyllou A. *et al.*, 2011). Επίσης σε μία ακόμα μελέτη που διεξήχθη σε άτομα τα οποία έπασχαν από την νόσο του Crohn, ένα αυτοάνοσο νόσημα του εντέρου, βρέθηκε πως η δράση της Μαστίχας Χίου είχε ως αποτέλεσμα την μείωση

κυτοκινών της φλεγμονής όπως του TNF-1 (tumor necrosis factor 1) και την αύξηση του παράγοντα MIF (migration inhibitory factor) στα μοποκύρηνα κύτταρα της κυκλοφορίας του αίματος.(Kaliora AC *et al.*, 2007)

1.6.3 Καρδιοπροστατευτικές δράσεις και μεταβολισμός

Σημαντικές επίσης είναι οι ευεργετικές επιδράσεις της Μαστίχας Χίου στην προστασία της καρδιάς και του κυκλοφορικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα σε παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι για παράδειγμα η υπερλιπιδαιμία, συστατικά των λιποπρωτεϊνών LDL (LowDensityLipoprotein) οξειδώνονται με αποτέλεσμα την μη φυσιολογική συσσώρευση χοληστερόλης σε μακροφάγα που βρίσκονται στα τοιχώματα των αγγείων. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τις παρούσες προ φλεγμονώδεις αντιδράσεις, είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης. Μελέτη σε ανθρώπους έδειξε πως η Μαστίχα Χίου μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα και να προστατεύσει την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών LDL. Ωστόσο για να προσκολληθούν λευκοκύτταρα και κύτταρα άλλων ειδών στα αγγεία απαιτούνται κάποια μόρια κυτταρικής προσκόλλησης. Έρευνα πάνω σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής έδειξε πως η Μαστίχα Χίου είναι ικανή να μειώσει την έκφραση των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein 1) και ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) με αποτέλεσμα την εξασθένιση της σύνδεσης μεταξύ των κυττάρων των αγγείων και άλλων ειδών κυττάρων. Τέλος σημαντικό είναι επίσης να αναφερθεί μια μελέτη σε ανθρώπους κατά την οποία εξετάστηκε η επίδραση που είχε η Μαστίχα Χίου σε βιοδείκτες που αφορούν το ήπαρ και την καρδιά. Το αποτέλεσμα έδειξε πως η θεραπεία με Μαστίχα μείωσε την ολική χοληστερόλη στο αίμα, τα επίπεδα της LDL, της απολιποπρωτεΐνης A-1, της απολιποπρωτεΐνης B καθώς και τα επίπεδα γλυκόζης στους άντρες.(Dimas *et al.*, 2012)

1.6.4 Αντικαρκινικές δράσεις

Τέλος από τις ευεργετικές δράσεις της πλούσιας αυτής ρητίνης δεν θα μπορούσαν να λείπουν και οι αντικαρκινικές δράσεις. Μελέτη πάνω σε καρκινικά κύτταρα προστάτη έδειξε πως η Μαστίχα Χίου μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα της μασπίνης τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Η μασπίνη είναι ένας ενδοθηλιακός παράγοντας, μέλος της οικογένειας αναστολέων πρωτεασών σερίνης που έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να καταστείλει την ανάπτυξη του όγκου και την μετάσταση *in vivo*.(He ML *et al.*, 2007). Σε μία άλλη έρευνα πάλι σε καρκινικά κύτταρα προστάτη η δράση της Μαστίχας Χίου ήταν ικανή να μειώσει τα επίπεδα των πρωτεϊνών της κυκλίνης D1, ενός σημαντικού ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου, και του NF-κβ, αναστέλλοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σημαντικά επίσης ήταν και τα αποτελέσματα ενός πειράματος όπου εξετάστηκαν η συνδυαστική δράση που έχει η Μαστίχα με το αντικαρκινικό φάρμακο γεμισιταβίνη σε καρκινικά κύτταρα παγκρέατος. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση των επιπέδων των επιπέδων του αναστολέα του NF-kb και της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης BAX και μείωση της αντί-αποπτωτικής Bcl-2 προτείνοντας πως η Μαστίχα θα μπορούσε να λειτουργήσει

συνδυαστικά με άλλα φάρμακα προκειμένου να επιτευχθεί ένα καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Τέλος σε μία ακόμα μελέτη που αξίζει να αναφερθεί η Μαστίχα Χίου ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό και προκάλεσε απόπτωση σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (HCT116). Το σημαντικό με αυτήν την έρευνα είναι πως η Μαστίχα κατάφερε να επάγει απόπτωση σε κύτταρα HCT116 τα οποία υπερεξέφραζαν την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 υποδεικνύοντας πως το σηματοδοτικό μονοπάτι που προκαλεί την απόπτωση είναι ανεξάρτητο του μονοπατιού που εξαρτάται από τα μιτοχόνδρια.(Dimas *et al.*, 2012)

1.7 Μαστίχα Χίου: Σύσταση

Αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν σε εκχύλισμα μαστίχας Χίου και σε αιθέριο έλαιο μαστιχόδεντρου έφεραν στο φως αρκετά δεδομένα όσον αφορά την χημική της σύσταση.Ειδικότερα το όξινο και ουδέτερο κλάσμα της Μαστίχα Χίου φαίνεται να είναι πλούσια σε τριτερπένια. Στο όξινο κλάσμα εντοπίζονται κυρίως τριτερπένια όπως το ισομαστιχαδιενονικό οξύ (12%), το μαστιχοδιενονικό οξύ (12%), το ολεανονικό οξύ ενώ στο ουδέτερο τα κύρια τριτερπενικά συστατικά είναι η ολεανολική αλδεύδη, η ισομαστιχαδιενολική αλδεύδη και η 28-νορολεαν-17-εν-3-όνη. Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο της Μαστίχας Χίου φαίνεται ότι το α-πινένιο (67%) και το μυρσένιο (18%) αποτελούν τα κύρια συστατικά του. Τα παραπάνω συστατικά που αναφέρθηκαν είτε μεμονωμένα είτε συνδυάστηκα είναι υπεύθυνα για τις ευεργετικές επιδράσεις του θαυματουργού αυτού φυτού. (Spyridopoulou*etal.*, 2017)

Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν πως τα τριτερπένια τα οποία εμφανίζουν αρκετές δομικές ομοιότητες με τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν προσδεθούν στο υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και να επάγουν την μετατόπιση του στον πυρήνα επεμβαίνοντας με αυτόν τον τρόπο στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων.(Karra AG. *et al.*, 2019).

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής περιλαμβάνει τον χαρακτηρισμό των εν δυνάμει αντικαρκινικών και υπογλυκαιμικών δράσεων του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου UPO131c καθώς και τη διερεύνηση της εμπλοκής συστατικών του εκχυλίσματος στο μονοπάτι σηματοδότησης που ενεργοποιείται από τα γλυκοκορτικοειδή. Στα πλαίσια του σκοπού θα πραγματοποιηθεί και μια προσπάθεια αποσαφήνισης των μοριακών μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στις παραπάνω διεργασίες. Η μελέτη αυτή αποσκοπεί να βοηθήσει στην ανακάλυψη ενός εκλεκτικού αγωνιστή του GR προκειμένου να καταπολεμηθούν πλήθος ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, ο διαβήτης, τα αυτοάνοσα νοσήματα με όσο το δυνατόν λιγότερες παρενέργειες

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1 ΟΡΓΑΝΑ

Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν:

1. Συσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminar Flow Hood) Tel Star AV-30/70
2. Επωαστήρας: Thermo Electron Corporation
3. Υδατόλουτρο: P SELECTA
4. Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): A. Kruss Optronik Germany
5. Φυγόκεντρος στις κυτταροκαλλιέργειες: Entrofriger- BLII/ PS Selecta®
6. Φυγόκεντρος: erpendorf 5417R
7. Ζυγοί: KERN EW + KERN 440-47 N
8. Heat blocker: KISKER
9. Quick spin: Nippon Genetics Europe GmbH
10. Vortex: Bio Vortex V1
11. Συσκευή ηλεκτροφόρησης: Biorad mini-PROTEAN® tetra cell
12. Συσκευή μεταφοράς (transfer): Biorad mini-trans Blot
13. Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S
14. Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών από W.B Kodak

2.1.2 ΧΗΜΙΚΑ

Χημικά που χρησιμοποιήθηκαν:

1. Acrylamide/Bis acrylamide 40% (Bio-Rad)
2. Ammonium persulfate, APS (Sigma)
3. Bradford protein assay (Bio-Rad)
4. Bromophenol blue (fluka)
5. Dexamethazone (Riedel-de Haën)
6. DMSO (Sigma)
7. Developer (Fuji)
8. ECL A, B (Santa Cruz)
9. FBS (Gibco®)
10. FBS cis (biosera)
11. Fixer (Fuji)
12. L-Glutamine (Gibco)
13. Phenyl Methyl Sulfonyl Floride, PMSF (SERVA)
14. Protease inhibitors (Sigma)
15. Sodium Dodecyl Sulfate, SDS (SIGMA)
16. Skimmed milk powder (Regilait)
17. TEMED (Applichem)
18. Tris-base (Merk, SERVA)
19. Trypsin-EDTA 5% 10× (Gibco, Sigma)
20. Tween 20 (Euroclone, Sigma)
21. Αιθανόλη 100% (SIGMA)
22. Βιοαιθανόλη (Kalochem)

23. β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haën)

24. Μάρτυρας μοριακών μεγεθών PAGERULER (ThermoScientific Fermentas)

25. Μεθανόλη 100% (Sigma)

26. DTT (SERVA)

27. NaCl (Panreac)

28. HCl (Merck)

29. Glycine (SERVA)

30. Πενικιλίνη – Στρεπτομυκίνη (Gibco)

2.1.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑΥΛΙΚΑ

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

2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Dexamethazone (DEX):

Διαλύεται σε 100% αιθανόλη. Αποθηκεύεται στους -20°C.

DTT 1M:

Για την δημιουργία 10ml απαιτείται διάλυση 1,54 gr DTT 1M σε ddH₂O. Στην συνέχεια αναδεύεται και μοιράζεται σε aliquots. Αποθηκεύεται στους -20°C.

PMSF 200mM:

Για την δημιουργία 2ml PMSF 200mM χρειάζεται να διαλυθούν 0.07gr PMSF σε 2ml ισοπροπανόλης. Η αποθήκευση του διαλύματος γίνεται στους -20°C. Με αραιώση του διαλύματος 10% σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20mM.

Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων (Lysis Buffer):

Περιέχει 0.5% TritonX-100, 20mM Tris pH 7.5, 250mM NaCl και 3mM EDTA. Αποθηκεύεται στους 4°C. Σε 1ml από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται επιπλέον 2μl DTT 1M (-20°C), 0.5μl PMSF 20mM (-20°C) και 10μl μείγματος Proteaseinhibitors.

Διάλυμα επιστοίβαξης δείγματος (samplebuffer)

Περιέχει 10% SDS, 1M Tris pH 6.8, 10% γλυκερόλη, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη και 1% κυανούν της βρωμοφαινόλης. Αποθηκεύεται στους -20 °C.

Ammonium persulfate (APS) 10 %:

Για την παρασκευή του προστίθενται 100mg APS σε 1ml ddH₂O. Αποθηκεύεται στους -20°C.

Sample buffer 4x:

Για την παρασκευή 10ml αναμειγνύονται 4ml glycerol 100%, 2ml Tris-HCl 1M pH 6,8, 1ml EDTA 0,5M, 0,8g SDS, 80μl bromophenol blue 100ng/ml, 400μl β-μερκαπτοαιθανόλη και ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με ddH₂O. Φυλάσσεται στους -20°C.

Tris 20mM pH 7.5:

Για την παρασκευή του αναμειγνύονται 20μl stock διαλύματος Tris 1 M pH 7.5 (4 °C) με 980μl ddH₂O και το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:

Για την δημιουργία 0.2 Lt διαλύματος απαιτούνται 36,342gr Tris τα οποία εν συνεχεία διαλύονται σε dH₂O. Η ρύθμιση του pH στο 8,8 πραγματοποιείται με προσθήκη HCl 12N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH₂O. Αποθηκεύεται στους 4°C.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10x:

Για την Παρασκευή του απαιτείται η διάλυση 144.00gr γλυκίνης και 30.3gr Tris base σε 1Lt ddH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1x:

Προκύπτει από την αραιώση Running Buffer 10x σε dH₂O με αναλογία 1:9 και την προσθήκη SDS στο διάλυμα που δημιουργείται σε αναλογία 0,1%. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 1x:

Περιέχει 20% MeOH, 10% Running Buffer 10x και 0.05% SDS. Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη dH₂O. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (TBS) 10x:

Για την παρασκευή 1Lt TBS 10X ζυγίζονται και διαλύονται σε dH₂O 88gr NaCl (MB 58,4) και 24gr Tris-base (MB 121,1). Το pH ρυθμίζεται στα 7,4-7,6 με προσθήκη πυκνού HCl 12N και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου

Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1x:

Περιέχει 10% stock buffer TBS 10x και 1% Tween-20 ενώ ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με dH₂O και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διαλύματα για εμφάνιση σήματος:

Για την δημιουργία τους απαιτείται ανάμιξη 1:3,5 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (fixer ή developer) σε dH₂O και διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.

2.3 ANTIΣΩΜΑΤΑ

Τα αντισώματα χρησιμοποιούνται αφού διαλυθούν σε TBSTx1, milk 2% και αποθηκεύονται στους -20°C.

Πρωτογενή

Anti-Bcl-2 (Cell signaling), 1:1000

Anti-procaspase 9 (Cell signaling), 1:500

Anti-β-actin (Sigma), 1:4000

Anti-GR H-300 (Santa cruz), 1:1000

Anti-GR G-5 (Santa cruz), 1:1000

Anti-procaspase 3 (Abcam), 1:4000

Anti-PEPCK (Santa cruz), 1:2500

Δευτερογενή

Mouse-HRP (Pierce), 1:50.000

Rabbit-HRP (Pierce), 1:50.000

2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΥΤΤΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΙΕΣ

Οι κυτταρικές σειρές HEK 293 και HeLa που χρησιμοποιήθηκαν καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂ σε T25 φλάσκες στον επωαστήρα. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη τους είναι DMEM με phenol red και 4,5mg/ml γλυκόζη το οποίο εμπλουτίσαμε με 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Όταν ο αριθμός των κυττάρων πληροί τις προϋποθέσεις του πειράματος ο οποίος υπολογίζεται προσεγγιστικά με τη βοήθεια πλακίδιο Neubauer ακολουθεί το στρώσιμο σε six well plates με την χρήση θρεπτικού DMEM χωρίς phenol red εμπλουτισμένο με 10% FBS cis από το οποίο απουσίαζαν τα στεροειδή καθώς και με 1% L-γλουταμίνη και 1% Pen Strep (starvation). Μετά την διαδικασία του starvation, που διαρκεί 48 ώρες, προστίθονται οι ουσίες, δηλαδή το εκχύλισμα από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου και η δεξαμεθαζόνη, που αποτελεί το θετικό μας control. Τέλος, μετά το πέρας της επώασης των κυττάρων με τις ουσίες προς μελέτη ακολουθεί η λύση και συλλογή του ολικού κυτταρικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.

Κατά το πάγωμα το οποίο πραγματοποιείται σε DMSO και FBS σε αναλογία 1:9 τα κύτταρα μεταφέρονται σε cryovials και αποθηκεύονται στους -80 C.

ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη του lysis Buffer. Μετά την προσθήκη του lysis buffer τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον πάγο για 20 λεπτά. Για να ολοκληρωθεί η διαδικασία ακολούθησε η χρήση υπερήχων (sonication). Πραγματοποιήθηκαν 5 κύκλοι έκθεσης του ενός δευτερολέπτου σε ένταση 40% και μεσοδιάστημα μεταξύ των κύκλων έκθεσης 35 δευτερόλεπτα.

ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD

Αρχή της μεθόδου

Χρωματική μέθοδος που βασίζεται στον προσδιορισμό της αλλαγής χρώματος της χρωστικής Coomassie brilliant blue από κόκκινο καφέ κατά την σύνδεση της σε πρωτεΐνες κάτω από όξινες συνθήκες

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αραίωση του διαλύματος Bradford από το 5X σε 1X. Στην συνέχεια προστέθηκε 1 μ L του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε 1 mL του αντιδραστηρίου Bradford 1X και αμέσως τα δείγματα επώαστηκαν στο σκοτάδι για 20 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 595nm. Οι τιμές των απορροφήσεων που ελήφθησαν χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συνολικής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα. Ο προσδιορισμός έγινε με την βοήθεια του τύπου $y=0,0345x+0,01$, που προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA, που έγινε στο εργαστήριο.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Για την προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση μείγμα χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, Tris 20 mM και sample buffer 4X σε κατάλληλες ποσότητες που υπολογίζονται με βάση την περιεκτικότητα του πρωτεϊνικού φορτίου των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. Πριν τοποθετηθούν τα δείγματα στην συσκευή της ηλεκτροφόρησης θερμαίνονται στους 95°C για 3 με 5 λεπτά, κι έπειτα ηλεκτροφορούνται στα 0,02A. Χρησιμοποιήθηκαν πηκτές ακρυλαμίδιου 10% με την ακριβή σύσταση του gel επιστοιβαξης και διαχωρισμού να φαίνονται στον παρακάτω πίνακα

	Stalking gel	Separatinggel 10%
Tris HCl pH= 6,8	0,21 ml	-
SDS	25 μ l	50 μ l
ddH ₂ O	2.025 ml	2.425 ml
Tris HCl pH= 8,81,5M	-	1.25 ml
APS 10%	12.5 μ l	25 μ l
Bis Acr.40%	0.25 ml	1.25 ml
Temed	2.5 μ l	2.5 μ l

ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων ακολουθεί η μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,2 μM διαμέτρου πόρων. Αυτό πραγματοποιείται με την εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικής τάσης ύψους 0,35A για χρονική διάρκεια 70 λεπτών σε transfer buffer σε ψυχρό περιβάλλον.

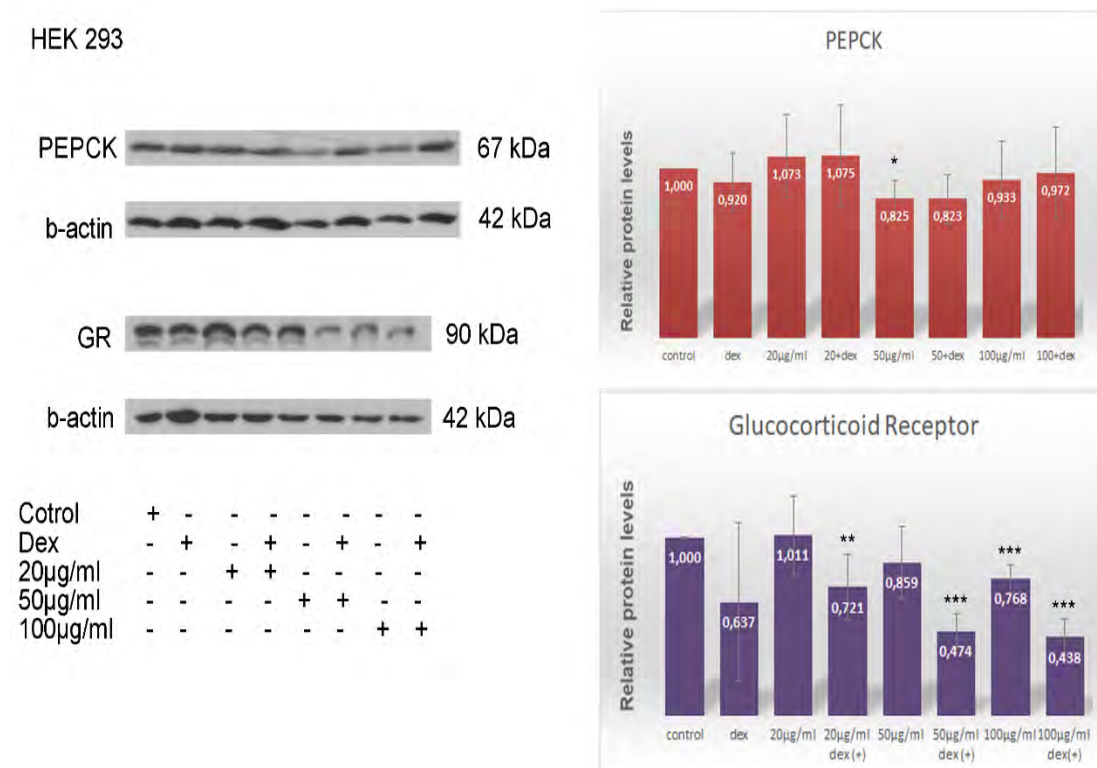
ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

Μετά την μεταφορά των δειγμάτων η μεμβράνη αναδεύεται σε διάλυμα 10% w/v αποβουτυρωμένου γάλακτος σκόνης σε TBST 1X (blocking), για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας η μεμβράνη επώαζεται με πρωτογενές αντίσωμα για μια ολόκληρη νύχτα στο 4°C . Αφού ολοκληρωθεί η επώαση ακολουθούν 5 πλύσεις των 5 λεπτών με TBST 1X και επώαση με δευτερογενές αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα . Μετά το δευτερογενές αντίσωμα πραγματοποιούνται πάλι 3 πλύσεις των 5 λεπτών με TBST 1X και ακολουθεί η προσθήκη των ECL A και B σε αναλογία 1:1. Τέλος η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδική κασετίνα και εκτίθεται σε φιλμ σε δωμάτιο απουσία φωτός. Η εμφάνιση του αποτελέσματος και η μονιμοποίηση του φιλμ πραγματοποιείται με την εμφάνιση του φιλμ στα διαλύματα developer πρώτα και fixer στη συνέχεια, για ένα λεπτό στο καθένα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ PEPCK

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και της PEPCK πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων HEK293 και HeLa σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζαν στεροειδείς ορμόνες. Έπειτα, έγινε προσθήκη του προς μελέτη εκχυλίσματος σε συγκεντρώσεις 20-100μg/ml, καθώς και της δεξαμεθαζόνης (Dex), σε συγκέντρωση 10nM και τα κύτταρα HEK293 και HeLa επώαστηκαν για 72 και 48 ώρες, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών από ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση κατά Western, με χρήση κατάλληλων αντισώματων. Ως μόριο κανονικοποίησης και για τα δύο μόρια χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

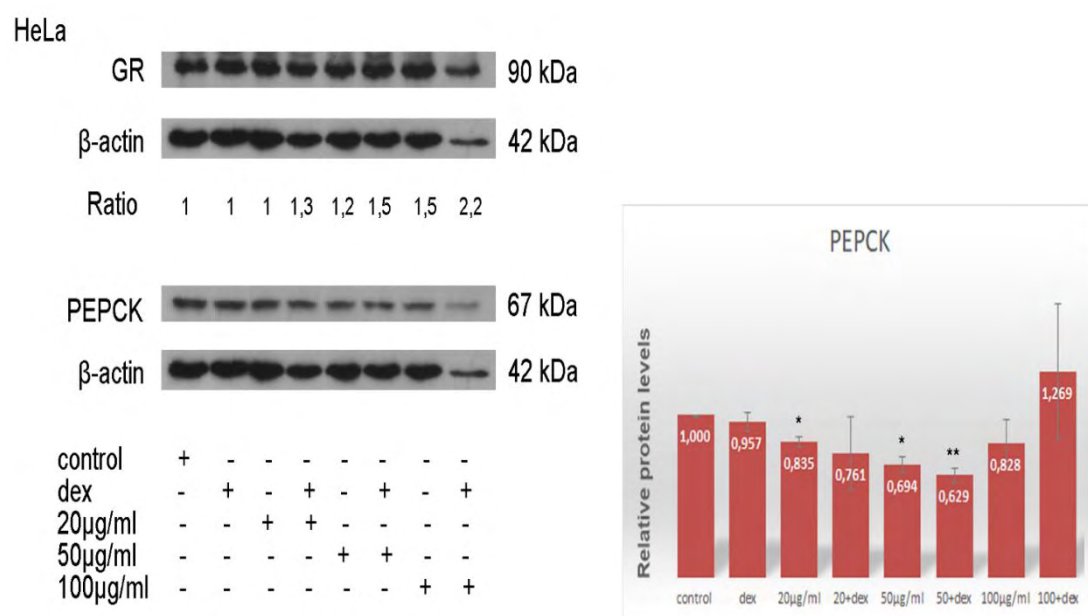


ΕΙΚΟΝΑ 1

Κύτταρα HEK293 αναπτύσσονται σε six well plates για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς phenol red εμπλουτισμένο με 10% FBS cis (από το οποίο απουσίαζαν τα στεροειδή), 1% L-γλουταμίνη και 1% Pen/Strep (starvation). Στην συνέχεια προστέθηκε το προς μελέτη εκχύλισμα στις συγκεντρώσεις που φαίνονται στην παραπάνω εικόνα και τα κύτταρα επώαστηκαν για 72 ώρες.

Αριστερά βλέπουμε το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης, ενώ δεξιά παρατίθενται τα διαγράμματα όπου φαίνονται η αυξομείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK και του GR σε σχέση με το control, ύστερα από κανονικοποίηση με τη β-ακτίνη. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο όρο \pm SD, n=3 τεχνικές επαναλήψεις)

Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK (ΕΙΚΟΝΑ 1) παρατηρούμε πως παραμένουν σχετικά στα ίδια επίπεδα συγκριτικά με το control. Η μεγαλύτερη μείωση της PEPCK παρατηρείται σε συγκεντρώσεις 50μg/ml, τόσο απουσία όσο και παρουσία DEX. Όσο αφορά τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) βλέπουμε μια δοσοεξαρτώμενη μείωση των πρωτεϊνικών του επιπέδων η οποία αυξάνεται (ή ενισχύεται) με τη συνδυαστική δράση της DEX



ΕΙΚΟΝΑ 2

Κύτταρα HeLa αναπτύσσονται σε six well plates για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς phenol red εμπλουτισμένο με 10% FBS cis (από το οποίο απουσίαζαν τα στεροειδή), 1% L-γλουταμίνη και 1% Pen Strep (starvation). Στην συνέχεια προστέθηκε το προς μελέτη εκχύλισμα στις συγκεντρώσεις που φαίνονται στην παραπάνω εικόνα και τα κύτταρα επωάστηκαν για 48 ώρες. Η δεξαμεθαζόνη (DEX) προστέθηκε 24 ώρες πριν τη συλλογή των κυττάρων.

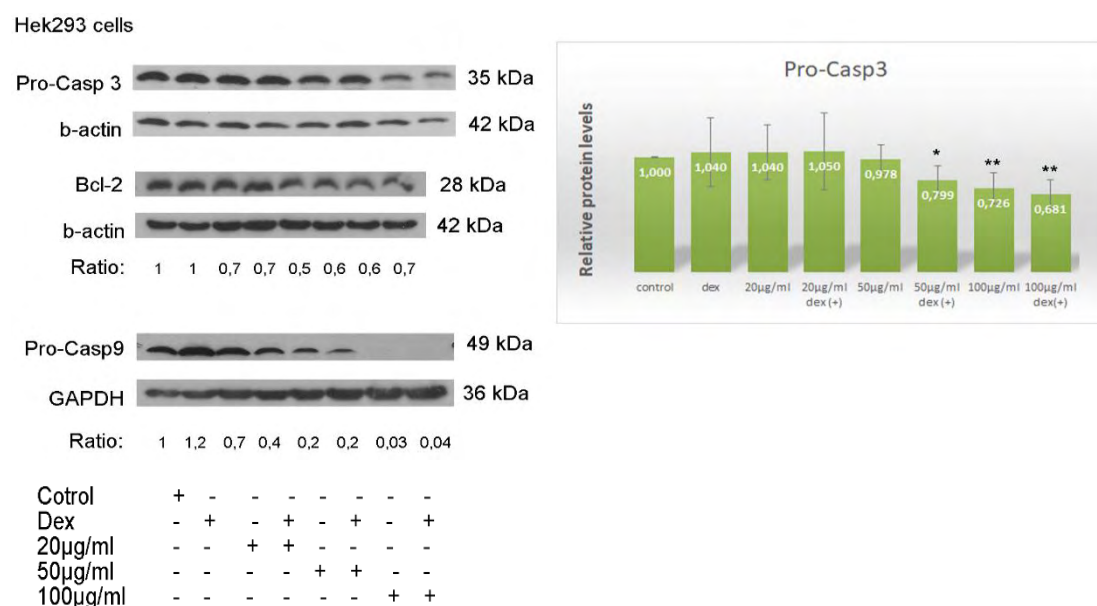
Αριστερά βλέπουμε το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western και τον λόγο (ratio) των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR σε σχέση με τα κύτταρα control, κανονικοποιημένο ως προς τη β-ακτίνη, ενώ δεξιά παρατίθεται το διάγραμμα όπου φαίνεται η δοσοεξαρτώμενη αυξομείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK σε σχέση με τα κύτταρα control ύστερα από κανονικοποίηση με τη β-ακτίνη.

Σε αντίθεση με τα κύτταρα HEK293 τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στα κύτταρα HeLa παρουσιάζουν αύξηση με τη μεγαλύτερη να

παρατηρείται στην συγκέντρωση 100μg/ml, παρουσία DEX, όπου τα επίπεδα διπλασιάζονται. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK με την σειρά τους παρουσιάζουν σταδιακή μείωση σε σχέση με τα κύτταρα control έως και τη συγκέντρωση των 50μg/ml, παρουσία DEX, ενώ στη συγκέντρωση των 100μg/ml, παρουσία DEX παρατηρείται αύξηση. Γι' αυτό το λόγο, η διερεύνηση της επίδρασης του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και της PEPCK, σε κύτταρα HeLa χρήζει επανάληψης προκειμένου να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα.

3.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου σε προ- και αντι-αποπτωτικά μόρια, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων HEK293 και HeLa σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζαν στεροειδείς ορμόνες. Έπειτα, έγινε προσθήκη του προς μελέτη εκχυλίσματος σε συγκεντρώσεις 20-100μg/ml, καθώς και της δεξαμεθαζόνης (Dex), σε συγκέντρωση 10nM και τα κύτταρα HEK293 και HeLa επώαστηκαν για 72 και 48 ώρες, αντίστοιχα. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση κατά Western, χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα αντισώματα. Τα μόρια που μελετήθηκαν ήταν η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Pro-caspase 3, Pro-caspase 9 και Bcl-2, ενώ ως μόρια κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκαν η β-ακτίνη και η GAPDH. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



ΕΙΚΟΝΑ 3

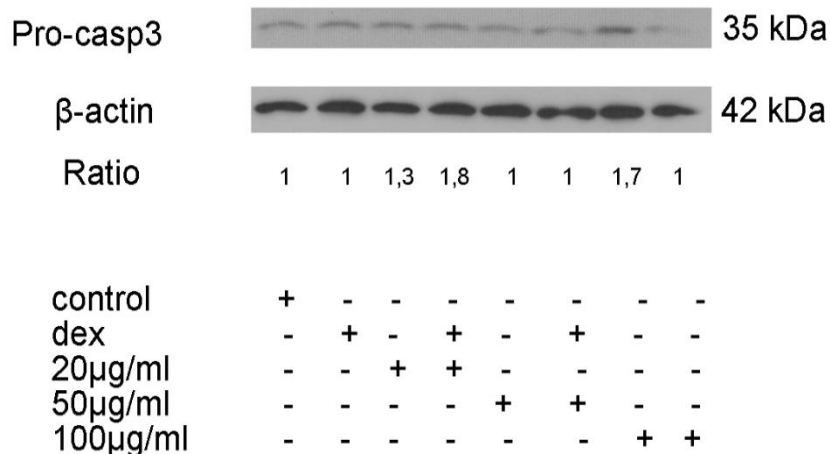
Κύτταρα HEK293 αναπτύχθηκαν σε six well platew και αναπτύχθηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς phenol red εμπλουτισμένο με 10% FBS cis (από το οποίο

απουσίαζαν τα στεροειδή), 1% L-γλουταμίνη και 1% PenStrep (starvation). Στην συνέχεια προστέθηκε το προς μελέτη εκχύλισμα στις συγκεντρώσεις που φαίνονται στην παραπάνω εικόνα και τα κύτταρα επωάστηκαν για 72 ώρες.

Αριστερά βλέπουμε το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western και τον λόγο (ratio) των πρωτεϊνικών επιπέδων των προς διερεύνηση μορίων σε σχέση με τα κύτταρα control, κανονικοποιημένα ως προς τη β-ακτίνη ή τη GAPDH, ενώ δεξιά παρατίθεται το διάγραμμα όπου φαίνεται η δόσοεξαρτώμενη αυξομείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Pro-caspase 3, σε σχέση με τα κύτταρα control, ύστερα από κανονικοποίηση με τη β-ακτίνη.

Στα κύτταρα HEK293, τα επίπεδα της Pro-caspase 3 φαίνεται να παρουσιάζουν μείωση σε συγκεντρώσεις 50-100μg/ml, τόσο απουσία όσο και παρουσία Dex. Επίσης και η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 εμφανίζει μείωση υπό την επίδραση του εκχυλίσματος με την μεγαλύτερη να εντοπίζεται στη συγκέντρωση των 50μg/ml. Τέλος, όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Pro-caspase 9 κι εδώ παρατηρείται μία δόσο-εξαρτώμενη μείωση, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου. Ωστόσο δεν παρατηρείται αύξηση της ενεργοποιημένης (πρωτεολυμένης) Pro-caspase 9 όπως θα αναμενόταν, γεγονός που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση για να διαπιστωθεί αν οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα ή όχι.

HeLa



ΕΙΚΟΝΑ 4

Κύτταρα HeLa στρώθηκαν σε six well plates και αναπτύχθηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς phenol red εμπλουτισμένο με 10% CIS (charcoal inactivation serum, κατάλληλα κατεργασμένο FBS, προς απομάκρυνση στεροειδών ορμονών), 1% L-γλουταμίνη και 1% PenStrep (starvation). Στην συνέχεια προστέθηκε το προς μελέτη εκχύλισμα στις συγκεντρώσεις που φαίνονται στην παραπάνω εικόνα και τα κύτταρα επωάστηκαν για 48 ώρες. Η δεξαμεθαζόνη προστέθηκε 24 ώρες πριν τη συλλογή των κυττάρων.

Στον πίνακα βλέπουμε το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western και τον λόγο (ratio) των πρωτεϊνικών επιπέδων σε σχέση με το control κανονικοποιημένο ως προς τη β-ακτίνη.

Όσο αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Pro-caspase3, στα κύτταρα HeLa δεν παρατηρείται η μείωση που παρατηρήθηκε στα HEK293, με τα επίπεδά της να βρίσκονται λίγο πιο πάνω από τα κύτταρα control. Για το λόγο αυτό, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση ώστε να εξακριβωθεί αν αυτό οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα ή αν το εκχύλισμα παρουσιάζει ιστοειδικότητα.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το πλήθος των ευεργετικών επιδράσεων της Μαστίχα Χίου έχει πλέον αποδειχθεί μέσα από ένα μεγάλο όγκο επιστημονικών ερευνών. Οι αντιφλεγμονώδεις, καρδιοπροστατευτικές, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, και υπογλυκαιμικές δράσεις του ευεργετικού αυτού φυτού δεν τίθενται υπό αμφισβήτηση. Με την πάροδο του χρόνου νέες έρευνες φέρνουν στο φως όλο και περισσότερα στοιχεία που έρχονται συμπληρώσουν το παζλ και να αποσαφηνίσουν του μοριακούς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για τις παραπάνω δράσεις. (Dimas *et al.*, 2012, προσθεστε και άλλες βιβλιογραφίες από το αρχείο που είχα δώσει στη φωτεινή)

Το πλούσιο σε συστατικά εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου και το αιθέριο έλαιο που παραλαμβάνουμε από το φυτό είναι υπεύθυνα για το ευρύ φάσμα δράσεων του. Φυσικά πολυμερή, πτητικά και αρωματικά συστατικά που συνθέτουν το αιθέριο έλαιο, το μαστιχέλαιο, τερπενικά οξέα, φυτοστερόλες, πολυφαινολικά μόρια κι ένας μεγάλος αριθμός από άλλα δραστικά συστατικά δρουν μεμονωμένα είτε συνδυαστικά και επάγουν τα επιθυμητά αποτελέσματα. (Spyridoroulou *et al.*, 2017)

Η υψηλή περιεκτικότητα του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου σε τριτερπένια, σε συνδυασμό με έρευνες που αποκαλύπτουν τη δράση αυτών στη ρύθμιση της ενεργότητας του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, εξαιτίας της δομικής τους ομοιότητας με τα γλυκοκορτικοειδή, ανοίγουν τον δρόμο για μια νέα προσέγγιση όσον αφορά την θεραπεία ενός ευρύ φάσματος ασθενειών. (Georgatza *et al.*, 2016, Karra AG. *et al.*, 2019). Τα γλυκοκορτικοειδή είναι στεροειδείς ορμόνες που εκκρίνονται από τον φλοιό των επινεφριδίων προσδένονται στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, επάγουν την μετατόπιση του στον πυρήνα, όπου ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων στόχων. (Oakley R.H. *et al.*, 2013). Στην σημερινή εποχή τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή αποτελούν από τα πιο συχνά συνταγογραφούμενα φάρμακα που χορηγούνται σε ασθένειες, όπως ο καρκίνος και τα αυτοάνοσα νοσήματα. Ωστόσο η συστηματική χρήση τους οδηγεί και σε μία πληθώρα παρενεργειών όπως είναι ο διαβήτης, η οστεοπόρωση, η απώλεια μυών, η επαγωγή της γλυκονογένεσης, η ανακατανομή του λίπους και ο αυξημένος καταβολισμός λίπους και πρωτεϊνών. (Karra AG. *et al.*, 2019).

Με βάση τα παραπάνω, και στηριζόμενοι στην υπόθεση ότι αντίστοιχες δράσεις ενδεχομένως να προκύπτουν και από συστατικά των φύλλων του μαστιχόδεντρου, σκοπός της παρούσας έρευνας περιλαμβάνει τον χαρακτηρισμό των αντικαρκινικών και αντι-υπεργλυκαιμικών δράσεων του πολικού κλάσματος από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου, καθώς και τη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στις παραπάνω διεργασίες. Σε αυτό το πλαίσιο, στόχος της παρούσας έρευνας είναι η διερεύνηση του κατά πόσο τα υπό μελέτη συστατικά εμπλέκονται στη σηματοδότηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, ώστε να συμβάλλει στην ανακάλυψη εκλεκτικών αγωνιστών του GR και κατά συνέπεια στην θεραπεία πλήθους ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, ο διαβήτης, τα αυτοάνοσα νοσήματα, με όσο το δυνατόν λιγότερες παρενέργειες.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων PEPCK και GR προκειμένου να διερευνηθούν οι υπογλυκαιμικές δράσεις του εκχυλίσματος και οι βιοχημικοί μηχανισμοί επιτέλεσης αυτών. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HEK293 και HeLa. Στα κύτταρα HEK293 παρατηρείται μία δόσοεξαρτώμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR (έως 56,1%) η οποία αυξάνεται παρουσία DEX. Τα επίπεδα PEPCK παραμένουν στα ίδια επίπεδα σε σχέση με τα κύτταρα control, με εξαίρεση μια μικρή μείωση στη συγκέντρωση των 50μg/ml, παρουσία και απουσία DEX, υποδηλώνοντας μια αντι-υπεργλυκαιμική δράση και επιβεβαιώνοντας αδημοσίευτες έρευνες του εργαστηρίου μας που έχουν δείξει την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποδοχέα. Αντίθετα, στα κύτταρα HeLa φαίνεται πώς τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR αυξάνονται με την μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται στην συγκέντρωση των 100μg/ml, παρουσία DEX, ενώ τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK, μειώνονται με εξαίρεση τη συγκέντρωση των 100μg/ml παρουσία DEX, όπου παρατηρείται αύξηση. Τόσο στα κύτταρα HEK όσο και στα κύτταρα HeLa απαιτείται επανάληψη και περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να αποσαφηνιστεί αν το διαφορετικό πρότυπο της αυξομείωσης που εμφανίζεται οφείλεται σε ιστοειδικότητα ή πειραματικό σφάλμα.

Τέλος αξιολογήθηκε και η αποπτωτική δράση του εκχυλίσματος στους δύο τύπους κυττάρων. Στα κύτταρα HEK293 μελετήθηκαν τρία μόρια που σχετίζονται με την απόπτωση, η Pro-caspase 3, η Pro-caspase 9 και η Bcl-2. Τα επίπεδα των μορίων Pro-caspase 3 και της αντι-αποπτωτικής Bcl-2 δείχνουν πως σε υψηλές συγκεντρώσεις του πολικού κλάσματος από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου τα κύτταρα ανταποκρίνονται στην απόπτωση, μειώνοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα των παραπάνω μορίων. Παράλληλα, το γεγονός της μείωσης και των πρωτεϊνικών επιπέδων της Pro-caspase 9 (έως 96%), υποδηλώνει πιθανόν έναν μιτοχονδριακά εξαρτώμενο αποπτωτικό μηχανισμό. Ωστόσο, στα κύτταρα HeLa, όπου μελετήθηκε το μόριο της Pro-caspase 3, δεν παρατηρείται κάποια αποπτωτική δράση, γεγονός που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης

Συνοψίζοντας, λοιπόν, καθίσταται σαφές πως το πολικό κλάσμα από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και επάγει απόπτωση στα κύτταρα HEK293, πιθανόν μέσω του μιτοχονδριακά εξαρτώμενου αποπτωτικού μηχανισμού. Ταυτόχρονα, το συγκεκριμένο εκχύλισμα, φαίνεται να επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών που έδειξαν καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, εφόσον εδώ παρατηρείται μη επαγωγή των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK και πιθανή αντι-υπεργλυκαιμική δράση.. Ωστόσο, στα κύτταρα HeLa δεν παρατηρήθηκαν τα ίδια πρότυπα αυξομείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων των προς μελέτη μορίων, γεγονός που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να αποσαφηνιστεί αν το διαφορετικό πρότυπο που εμφανίζεται οφείλεται σε ιστοειδικότητα ή πειραματικό σφάλμα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cain D.W., Cidlowski J.A., (2015), “Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease”, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, ELSEVIER*, 29, 545-556
2. Coutinho A.E., Chapman K.E., (2011), “The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights”, *Molecular and Cellular Endocrinology, ELSEVIER*, 335, 2-13
3. Dimas K, Pantazis P, Ramanujam R, (2012), “Chios Mastic Gum: A Plantproduced Resin Exhibiting Numerous Diverse Pharmaceutical and Biomedical Properties”, *In vivo* 26: 777-786
4. Georgatza D, Gorgogietas VA, Kylindri P, Charalambous MC, Papadopoulou KK, Hayes JM, Psarra AM, (2016), “The triterpene echinocystic acid and its 3-Oglucoside derivative are revealed as potent and selective glucocorticoid receptor agonists”, *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology, Vol 79*, 277-287
5. Gruver-Yates A and Cidlowski J, (2013), “Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword”, *Cells*, 2, 202-223
6. He ML, Chen WW, Zhang PJ, Jiang AL, Fan W, Yuan HQ, Liu WW and Zhang JY, (2007), ‘Gum mastic increases maspin expression in prostate cancer cells’, *Acta Pharmacol Sin* 28: 567-572
7. Ilmarinen P., Moilanen E., Kankaanranta H., (2014), “Mitochondria in the Center of Human Eosinophil Apoptosis and Survival”, *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 3952-3969
8. Kadmiel M and Cidlowski J, (2013), “Glucocorticoid receptor signaling in health and disease”, *Trends Pharmacol Sci.*, 34(9): 518–530
9. Kaliora AC, Stathopoulou MG, Triantafillidis JK, Dedoussis GV and Andrikopoulos NK., (2007), ‘Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn’s disease treated with mastic’, *World J Gastroenterol* 13: 6031-6036
10. Karra AG. ,Konstantinou M., Tzortziou M, Tsialtas I., Kalousi F.D., Garagounis K., Hayes J., Psarra AM., (2019), “Potential Dissociative Glucocorticoid Receptor Activity for Protopanaxadiol and Protopanaxatriol”, *International Journal of Molecular Sciences*
11. Komori T. “Glucocorticoids and Bone Biology” (2016), *Horm Metab Res*, 48: 755–763
12. Nicolaides N, Galata Z, Tomoshige Kino, Chrousos G, and Charmandari E, (2010), “The Human Glucocorticoid Receptor: Molecular Basis of Biologic Function”, *NIH Steroids, Vol. 75, No. 1* Oakley R and Cidlowski J, (2013), “The

Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease”, *NIH J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 132, No. 5, pp. 1033-1044

13. Psarra AM, Sekeris C, (2008) “Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment”, *Biochimica et Biophysica Acta, ELSEVIER*, 1783, 1 – 11
14. Psarra AM, Sekeris C, (2009), “Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions”, *Biochimica et Biophysica Acta, ELSEVIER*, 1787:431-6
15. Psarra AM, Sekeris C, (2011), “Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: Role of the mitochondrial glucocorticoid receptor”, *Biochimica et Biophysica Acta, ELSEVIER*, 1813, 1814– 1821
16. Spyridopoulou K, Tiptiri-Kourpeti A, Lampri E, Fitsiou E, Vasileiadis S, Vamvakias M, Bardouki H, Goussia A, Malamou-Mitsi V, Panayiotidis MI, Galanis A, Pappa A, Chlichlia K, (2017), “Dietary mastic oil extracted from *Pistacia lentiscus* var. *chia* suppresses tumor growth in experimental colon cancer models”, *Scientific RepoRts*, 7: 3782
17. Triantafyllou A, Chaviaras N, Sergentanis TN, Protopapa E, Tsaknis J, (2007), “Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population”, *ELSEVIER Journal of Ethnopharmacology* 111, 43–49
Triantafyllou A, Bikineyeva A, Dikalova A, Nazarewicz R, Lerakis S and Dikalov S, (2011), “Anti-inflammatory activity of Chios mastic gum is associated with inhibition of TNF-alpha induced oxidative stress”, *Nutrition Journal*, 10:64
18. “Overview of the major scientific publications on the beneficial activity of Chios Mastiha”, (2015), Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, *Chios Mastiha published scientific booklet*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια Δρ. Άννα Μαρία Ψαρρά, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη βοήθεια, την ενθάρρυνση και τη εμπιστοσύνη καθ' όλη της διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας

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

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής την Δρ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών και τον Δρ. Λεωνίδα Δημήτριο Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτωρ Φωτεινή Καλούση για την υπομονή, τις γνώσεις την όρεξη και την καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο καθώς επίσης και τους υποψήφιους διδάκτορες Κατερίνα Καρρά και Ιωάννη Τσιάλτα για την υποστήριξη και βοήθεια τους. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την εξαιρετική και άψογη συνεργασία μας.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην απονέμω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου και τους φίλους μου, που ήταν για μια ακόμα φορά στο πλευρό και με ηθική στήριξη με βοήθησαν να ολοκληρώσω ένα ακόμη σημαντικό βήμα για μένα.