



ΤΜΗΜΑ

**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ
ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ

ΒΟΥΓΙΟΥΚΑΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2020

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ»

ΒΟΥΓΓΙΟΥΚΑΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

“INVESTIGATION OF THE EFFECT OF PLANT DERIVED COMPONENTS ON APOPTOTIC MECHANISMS REGULATION”

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Βασιλική Σκαμνάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Λεωνίδας Δημήτριος, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) αποτελούν στεροειδείς ορμόνες που παράγονται από το φλοιό των επινεφριδίων, και ακούν τη δράση τους μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), ενός υποδοχέα με δράση μεταγραφικού παράγοντα εξαρτώμενο από τον προσδέτη. Απουσία του προσδέτη, ο GR βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα στην ανενεργή του μορφή. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα μετά την πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών, έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνησή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, όπου και ρυθμίζει την έκφραση μεγάλου πλήθους γονιδίων-στόχων με αποτέλεσμα, πολλές κυτταρικές διεργασίες να ρυθμίζονται από τα γλυκοκορτικοειδή. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η κυτταρική ανάπτυξη, η ανοσολογική απόκριση, ο μεταβολισμός των υδατανθράκων και των λιπαρών οξέων καθώς και η απόπτωση. Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος επιτελείται με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού και ρυθμίζεται με μεγάλη ακρίβεια. Τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης, μεταβάλλοντας ιστοειδικά τα επίπεδα προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών. Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή αποτελούν ευρέως διαδεδομένα φάρμακα για την καταπολέμηση πολλών παθολογικών καταστάσεων, όπως διάφοροι τύποι αιματολογικών καρκίνων, αυτοάνοσων νοσημάτων και φλεγμονωδών παθήσεων, ωστόσο η παρατεταμένη χρήση τους μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα πολύ σοβαρές παρενέργειες, όπως ο διαβήτης, η οστεοπόρωση, η μυϊκή ατροφία και η ευαισθησία σε λοιμώξεις. Με το πέρασ του χρόνου ολοένα και αυξάνεται ο όγκος επιστημονικών δεδομένων που υποστηρίζουν τις θεραπευτικές ιδιότητες φυτικής προέλευσης συστατικών. Τα αιθέρια έλαια που παράγονται από φυτά αποτελούν εξαιρετικά περίπλοκα μείγματα χημικών ουσιών και αποτελούνται κυρίως από δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών. Υπάρχει μεγάλος αριθμός ερευνών που υποστηρίζουν τις αντιβακτηριακές, καρδιοπροστατευτικές αλλά και αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις του αιθέριου ελαίου μαστίχας Χίου, όπως και τις αντιβακτηριακές και αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες του αιθέριου ελαίου λεβάντας. Σκοπό της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελεί ο χαρακτηρισμός των αποπτωτικών δράσεων του αιθέριου ελαίου μαστίχας Χίου καθώς επίσης και η προσπάθεια διερεύνησης των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων λαμβάνει χώρα η απόπτωση. Ακόμη, μελετήθηκαν και οι αποπτωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις του αιθέριου ελαίου λεβάντας. Παράλληλα, δόθηκε έμφαση στη διερεύνηση πιθανής συμμετοχής των συστατικών των αιθέριων ελαίων στο μονοπάτι σηματοδότησης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκε επιπλέον η επίδραση του μαστιχέλαιου στις υπεργλυκαιμικές δράσεις του GR, όπως και η άμεση αλληλεπίδραση των συστατικών του μαστιχέλαιου με τον GR και η επαγωγή της μετατόπισής του στον πυρήνα του κυτάρου. Λόγω του γεγονότος ότι η παρατεταμένη χορήγηση γλυκοκορτικοειδών οδηγεί σε πλήθος παρενεργειών, η παρούσα μελέτη αποσκοπεί να συμβάλλει τόσο στην ανάδειξη των βιολογικών δράσεων των υπό μελέτη ελαίων όσο και στην εύρεση νέων επιλεκτικών αγωνιστών του GR όπου θα διατηρούν τις θεραπευτικές ιδιότητες του GR με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες.

ABSTRACT

Glucocorticoids (GCs) are steroid hormones produced by the adrenal cortex and they exert their action through the glucocorticoid receptor (GR), a receptor with ligand-dependent transcription factor activity. In the absence of the ligand, GR resides in the cytoplasm in its inactive form. Activation of the GR after the binding of glucocorticoids results in its transport from the cytoplasm to the nucleus, where it regulates the expression of a large number of target genes, resulting in the regulation of many cellular processes. These include cell growth, the immune response, carbohydrate and fatty acid metabolism and apoptosis. Apoptosis or programmed cell death is performed in order to maintain the body's homeostasis and is regulated with great precision. Glucocorticoids play a very important role in the regulation of apoptosis, controlling the expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins in a tissue specific manner. Synthetic glucocorticoids are widely used as drugs to combat many pathological conditions such as various types of blood cancers, autoimmune and inflammatory diseases. However, the prolonged use of glucocorticoids can result in very serious side effects such as diabetes, osteoporosis, muscle atrophy and susceptibility to infections. Nowadays, the number of scientific researches that support the therapeutic properties of plant derived components is increasing. Essential oils produced by plants are complex mixtures of chemical components and are composed mainly of secondary plant metabolites. There are many studies that support the antibacterial, cardioprotective and antiproliferative effects of Chios mastic oil as well as the antibacterial and antiproliferative properties of lavender essential oil. The purpose of this dissertation is the characterization of the apoptotic actions of Chios mastic oil as well as the investigation of the molecular mechanisms through which apoptosis occurs. The apoptotic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil were also studied. Emphasis was placed on investigating the possible involvement of the components of essential oils in the signaling pathway of the glucocorticoid receptor. For this reason, the effect of mastic oil on the hyperglycaemic actions of GR was further investigated, as well as the direct interaction of Chios mastic oil components with GR and the induction of its translocation in the cell nucleus. Due to the fact that prolonged administration of glucocorticoids leads to a number of side effects, the present study aims to contribute to the uncovering of novel functions of the above mentioned essential oils as well as to the investigation of new selective agonists of glucocorticoid receptor which will retain the therapeutic properties of GR with the least possible side effects.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ.....	6
1.1.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ.....	6
1.1.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ.....	6
1.2 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ (GR).....	8
1.2.1 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ GR.....	8
1.2.2 ΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΟΥ GR.....	9
1.2.3 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR.....	9
1.2.4 ΜΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR.....	11
1.3 Η ΑΠΟΠΤΩΣΗ.....	11
1.3.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	11
1.3.2 ΤΟ ΕΞΩΓΕΝΕΣ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ.....	13
1.3.3 ΤΟ ΕΝΔΟΓΕΝΕΣ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ.....	13
1.3.4 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΑΠΟ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ.....	15
1.4 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΜΑΣΤΙΧΑΣ.....	16
1.4.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ-ΣΥΣΤΑΣΗ.....	16
1.4.2 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΜΑΣΤΙΧΑΣ- ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	17
1.5 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΛΕΒΑΝΤΑΣ.....	19
1.5.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ-ΣΥΣΤΑΣΗ.....	19
1.5.2 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΜΑΣΤΙΧΑΣ-ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	20
1.6 ΣΚΟΠΟΣ.....	21
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	21
2.2-ΧΗΜΙΚΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	22
2.2.1 ΧΗΜΙΚΑ.....	22
2.2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ.....	23
2.2.3 ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ.....	23
2.2.4 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	23
2.2.5 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	24

2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
2.3.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	25
2.3.2 ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	25
2.3.3 ΜΕΤΡΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΡΩΣΙΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	25
2.3.4 ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	26
2.3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD.....	26
2.3.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ.....	26
2.3.7 ΑΝΟΣΟΑΠΩΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN.....	27
2.4.8 ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑ.....	28
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	30
3.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ.....	30
3.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ (GR) ΚΑΙ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ P65 ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NF-κΒ.....	31
3.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ ΡΕΡСК ΚΑΙ ΤΟ ΛΟΓΟ ΑΜΡΚ/ΡΗΟSΗO-ΑΜΡΚ.....	33
3.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΣΤΗΝ ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ (GR).....	37
3.5 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΛΕΒΑΝΤΑΣ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΣΑ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ.....	39
3.6 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΛΕΒΑΝΤΑΣ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ (GR) ΚΑΙ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NF-κΒ.....	40
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	46

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ

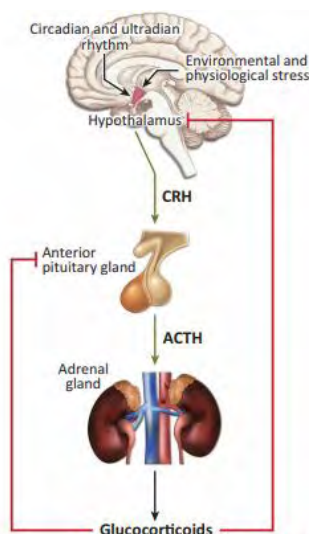
1.1.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι στεροειδείς ορμόνες που παράγονται και εκκρίνονται από τη στηλιδωτή ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων ως απόκριση στον κirkάδιο ρυθμό και σε ερεθίσματα που προκαλούν στρες. Η σύνθεση τους πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ως πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη που προέρχεται κυρίως από λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL), μέσω μίας διαδικασίας που περιλαμβάνει τη συμμετοχή πολλών ενζύμων και ονομάζεται στεροειδογένεση. Επιπλέον, ασκούν τη δράση τους μέσω της πρόσδεσής τους στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), ενός εξαρτώμενου από προσδέτη μεταγραφικό παράγοντα, που ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Η δράση τους στον οργανισμό είναι πολύπλευρη καθώς επηρεάζει μεγάλο πλήθος διεργασιών, όπως το μεταβολισμό υδατανθράκων και των λιπών, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση, την ανάπτυξη του σκελετικού συστήματος, τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και την αναπαραγωγή [(Oakley and Cidlowski, 2011); (Ramamoorthy et al., 2016)]. Ακόμη, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία συστημάτων όπως το καρδιαγγειακό, το γαστρεντερικό και το κεντρικό νευρικό σύστημα (Cain et al., 2015). Λόγω των πολυποίκιλων δράσεων των γλυκοκορτικοειδών στη ρύθμιση ανοσολογικών αποκρίσεων, συνθετικά γλυκοκορτικοειδή χορηγούνται εδώ και πολλά χρόνια για την αντιμετώπιση διαφόρων φλεγμονωδών παθήσεων, αυτοάνοσων νοσημάτων και κακοηθειών του λεμφικού συστήματος. Σε αυτές συγκαταλέγονται το άσθμα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το σηπτικό σοκ, οι αλλεργίες, οι λευχαιμίες, τα μυελώματα και τα λεμφώματα (Oakley et al., 2013). Ωστόσο, η μακροχρόνια χρήση γλυκοκορτικοειδών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα σοβαρές παρενέργειες, όπως η οστεοπόρωση, ο διαβήτης, η παχυσαρκία, η μυϊκή ατροφία, το γλαύκωμα, η ευαισθησία σε λοιμώξεις και η υπέρταση [(Ramamoorthy et al., 2016); (Oakley et al., 2013)]. Για τους λόγους αυτούς, είναι σημαντικό να βρεθούν αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, με σκοπό την αποφυγή των ανεπιθύμητων παρενεργειών, διατηρώντας παράλληλα τις ευεργετικές δράσεις του.

1.1.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Τα γλυκοκορτικοειδή, όπως αναφέρθηκε έχουν πολύ μεγάλο εύρος δράσης και συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στη διατήρηση της ομοιόστασης και τη σωστή λειτουργία του οργανισμού. Αυτό αποτυπώνεται από το γεγονός ότι πάνω από το 20% των εκφραζόμενων γονιδίων του ανθρώπου ρυθμίζεται θετικά ή αρνητικά από τα γλυκοκορτικοειδή [(Galon J. et al., 2002), (Chrousos GP, 2001)].

Έτσι, η παραγωγή και η έκκριση τους από το φλοιό των επινεφριδίων ρυθμίζεται με μεγάλη ακρίβεια από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA axis). Η έκκριση γλυκοκορτικοειδών ακολουθεί κινκάρδιο ρυθμό. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα τους είναι υψηλά τις πρώτες πρωινές ώρες, με μία απότομη αύξηση ακριβώς πριν την αφύπνιση και με σταδιακή μείωση στη διάρκεια της ημέρας, φτάνουν στα κατώτατα επίπεδα τις απογευματινές και πρώτες βραδινές ώρες. Επιπλέον, ο άξονας HPA, διεγείρεται και από μόρια που εκκρίνονται ως απόκριση σε παθογόνα, με αποτέλεσμα την άμεση παραγωγή και έκκριση κορτιζόλης, η οποία καταστέλλει τη φλεγμονή και μετριάξει την ανοσολογική απόκριση (Cain et al., 2015). Ακόμη, διάφορα ενδογενή και εξωγενή σήματα, όπως νευρικά μηνύματα από ανώτερα κέντρα του εγκεφάλου, ενδοκρινή σήματα, μεταβολές στην ομοιόσταση και στρεσογόνα ερεθίσματα επάγουν την έκκριση της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης (CRH) και της αργινίνης-βασοπρεσσίνης (AVP) - η οποία ενισχύει το σήμα της CRH- από τον υποθάλαμο. Στη συνέχεια, αυτές δρουν στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, διεγείροντας τα κορτικοτροφικά κύτταρα που παράγουν και εκκρίνουν την κορτικοτροπίνη (ACTH). Αυτή, μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας στο φλοιό των επινεφριδίων και επάγει την άμεση σύνθεση και έκκριση των γλυκοκορτικοειδών. Τα γλυκοκορτικοειδή, λόγω της λιποφιλικής τους φύσης δεν είναι δυνατόν να παραχθούν και να αποθηκευτούν στο φλοιό των επινεφριδίων, αλλά πρέπει να παραχθούν άμεσα και να εκκριθούν όταν αυτό απαιτείται. Τέλος, τα ίδια τα γλυκοκορτικοειδή, δρουν στον υποθάλαμο και



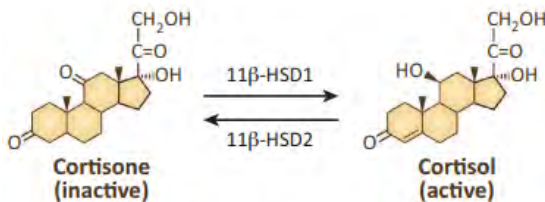
την υπόφυση, αναστέλλοντας την απελευθέρωση των CRH και ACTH αντίστοιχα, δημιουργώντας έτσι ένα κλειστό βρόγχο αρνητικής ανάδρασης, ρυθμίζοντας τα επίπεδα τους. [(Bonfiglio J. et al., 2001); (Ramamoorthy et al., 2016);(Oakley et al., 2013)].

ΕΙΚΟΝΑ 1.

Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης της έκκρισης γλυκοκορτικοειδών από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA-axis). Σήματα από ανώτερα κέντρα του εγκεφάλου διεγείρουν τον υποθάλαμο να εκκρίνει την εκλυτική ορμόνη κορτικοτροπίνης (CRH) όπου διεγείρει την έκκριση της ACTH από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, η οποία με τη σειρά της δρα στη σηλιδωτή ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων και επάγει τη σύνθεση γλυκοκορτικοειδών (Kadmiel, M., & Cidlowski, 2013).

Εκτός από την σύνθεση και έκκριση των γλυκοκορτικοειδών, ρυθμίζεται επίσης και η διαθεσιμότητά τους, και κατ' επέκταση και η δράση τους σε επίπεδο ιστού ή/και κυττάρου. Η κορτιζόλη, αποτελεί τη βιολογικά ενεργή μορφή και είναι διαθέσιμη στην κυκλοφορία σε ποσοστό μόλις 5%. Το μεγαλύτερο ποσοστό αυτής (80%-90%) είναι δεσμευμένη στη σφαιρίνη δέσμευσης κορτικοστεροειδών (CBG), ενώ το υπόλοιπο 5%-15% είναι δεσμευμένη στην αλβουμίνη. Έτσι, η διαθεσιμότητά της εξαρτάται από τη συγκέντρωση της CBG, η οποία ρυθμίζει με αυτόν τον τρόπο τη δράση της κορτιζόλης σε περιπτώσεις απότομης αύξησής της στην κυκλοφορία. Τέλος, η δράση των

γλυκοκορτικοειδών σε κυτταρικό επίπεδο ρυθμίζεται από ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια 11β-αφυδρογονάση υδροξυστεροειδών (11b-HSD). Αναλυτικότερα, η 11b-HSD2 καταλύει τη μετατροπή της κορτιζόλης στο ανενεργό πρόδρομο μόριο κορτιζόνη, περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο τη δράση των γλυκοκορτικοειδών σε κύτταρα που εκφράζουν το ένζυμο αυτό, ενώ η 11b-HSD1 καταλύει την αντίστροφη αντίδραση (Cain et al., 2015).



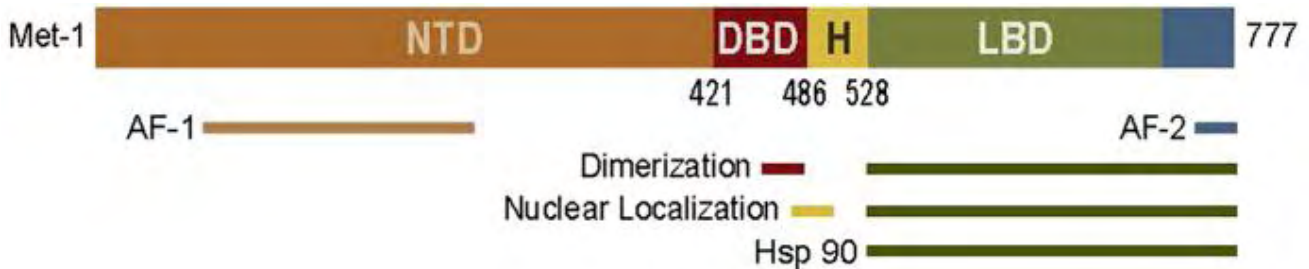
ΕΙΚΟΝΑ 2. Η μετατροπή της ενεργής κορτιζόλης σε ανενεργή κορτιζόνη και αντίστροφα από ένζυμα της οικογένειας 11b-HSD (Kadmiel, M., & Cidlowski, 2013).

1.2 Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ (GR)

1.2.1 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ GR

Τα γλυκοκορτικοειδή, ακούν τη δράση τους μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR). Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών ανήκει στην υπεροικογένεια πυρηνικών υποδοχέων που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, εξαρτώμενοι από προσδέτη. Ο hGR είναι προϊόν του γονιδίου NR3C1 που εδράζεται στο χρωμόσωμα 5 και αποτελείται από 9 εξόνια. Τα εξόνια 2-9 κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη ενώ μέσω εναλλακτικού ματίσματος του εξονίου 9 προκύπτουν οι δύο κύριες ισομορφές του, οι GR-α και GR-β. Η ενεργή ισομορφή του GR είναι η GR-α, και είναι ικανή να προσδέσει τα γλυκοκορτικοειδή, και έτσι επάγεται η μετατόπισή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα όπου και ασκεί τη δράση του επηρεάζοντας την έκφραση πολλών γονιδίων στόχων. Η ισομορφή GR-β, φαίνεται να είναι μεταγραφικά ενεργή, δεν μπορεί να προσδέσει τα γλυκοκορτικοειδή, ενώ υποκυτταρικά εντοπίζεται στον πυρήνα και ανταγωνίζεται τη δράση του GR-α, δρώντας ως αναστολέας. Ο GR είναι μία πρωτεΐνη περίπου 90 kDa, η οποία αποτελείται από τρεις επικράτειες. Φέρει μία επικράτεια trans-ενεργοποίησης (N-terminal transactivation domain, NTD) στο N-τελικό του άκρο, μία συντηρημένη κεντρική επικράτεια πρόσδεσης στο DNA (DNA binding domain, DBD), μία C-τελική επικράτεια στην οποία συνδέεται ο προσδέτης (Ligand binding domain, LBD) και μία εύκαμπτη περιοχή άρθρωσης που διαχωρίζει την DBD από την LBD. Η NTD, φέρει μία περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (Activation function 1, AF-1), υπεύθυνη για τη στρατολόγηση βοηθητικών ρυθμιστών της μεταγραφικής μηχανής. Η DBD φέρει 2 συντηρημένα μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου, υπεύθυνα για την πρόσδεση σε στοιχεία απόκρισης γλυκοκορτικοειδών στο DNA (glucocorticoid responsive elements, GREs) και για τη σταθεροποίηση του υποδοχέα στο DNA. Ακόμη, η LBD φέρει μία δεύτερη περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (AF-2), υπεύθυνη για την

αλληλεπίδραση με άλλα ρυθμιστικά μόρια. Τέλος, στην περιοχή μεταξύ της DBD και της περιοχής άρθρωσης αλλά και στην LDB βρίσκονται δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear localization, NL) NL-1 και NL-2 αντίστοιχα, υπεύθυνα για τη μετατόπιση του υποδοχέα στον πυρήνα, μέσω μηχανισμού εξαρτώμενου από ιμπορτίνες. [(Kadmiel, M., & Cidlowski, 2013); (Oakley, 2013); (Cain et al., 2015); (Ramamoorthy et al., 2016)]



ΕΙΚΟΝΑ 3. Σχηματική αναπαράσταση των δομικών και λειτουργικών περιοχών της κύριας ισομορφής (hGR-a) του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (Ramamoorthy & Cidlowski, 2016).

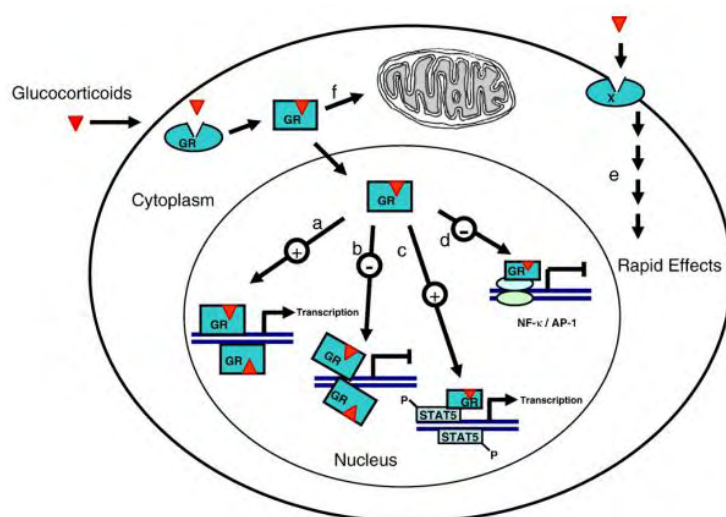
1.2.2 ΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΟΥ GR

Σε συνθήκες απουσίας προσδέτη, ο GR ενυπάρχει στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου στην ανενεργή του μορφή, ως μέρος ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου, το οποίο αποτελείται από πρωτεΐνες μοριακές συνοδούς όπως η Heat shock protein 90, (Hsp90), Hsp70, Hsp56, η συν-μοριακή συνοδός p23, η κυτταροπλασματική κινάση τυροσίνης Src και ανοσοφιλίνες της οικογένειας FK506 (FKBP51 και FKBP52) [(Revollo, J.& Cidlowski, 2009); (Oakley et al., 2013); (Ramamoorthy, 2016)]. Το πολυπρωτεϊνικό αυτό σύμπλοκο, διατηρεί τον GR σε μία στερεοδιαμόρφωση όπου εκθέτει την περιοχή σύνδεσης του προσδέτη με τέτοιον τρόπο ώστε να ευνοείται η πρόσδεσή του, ενώ, οι περιοχές πυρηνικού εντοπισμού αποκρύπτονται. Η πρόσδεση γλυκοκορτικοειδών, έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή διαμόρφωσης του υποδοχέα, την απόσπαση του από το σύμπλοκο, την έκθεση των περιοχών πυρηνικού εντοπισμού και την ταχύτατη μετατόπισή του στον πυρήνα μέσω της πρόσδεσης του σε νουκλεοπορίνες και ιμπορτίνες. Στη συνέχεια, υφίσταται διμερισμό και ασκεί τη δράση του επηρεάζοντας την έκφραση διαφόρων γονιδίων στόχων [(Timmermans et al., 2019);(Revollo, J.& Cidlowski, 2009),(Nicolaidis et al., 2010)].

1.2.3 ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR

Ο κύριος τρόπος δράσης του GR, αφορά τις μεταβολές που επάγει στα επίπεδα έκφρασης διαφόρων γονιδίων-στόχων. Ο GR, μετά την είσοδό του στον πυρήνα προσδένεται ως διμερές σε στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs) που βρίσκονται πριν τον υποκινητή ή εντός της κωδικής περιοχής των γονιδίων στόχων. Τα GREs είναι ατελείς παλίνδρομες αλληλουχίες που αποτελούνται από δύο τμήματα των 6 ζευγών βάσεων και ένα ενδιάμεσο κενό 3 ζευγών βάσεων. Το ενδιάμεσο κενό 3 βάσεων απαιτείται για το διμερισμό του GR πάνω στα στοιχεία αυτά (Oakley et al., 2013). Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί μέσω των οποίων η αλληλεπίδραση του GR με το DNA επάγει

τη μεταγραφή γονιδίων. Αρχικά, αν τα GREs βρίσκονται σε κοντινή απόσταση στο TATA-box, η πρόσδεση του GR στα GREs επάγει τη στρατολόγηση ρυθμιστικών παραγόντων της μεταγραφής, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας IID (Transcription factor, TF IID) που επάγει τη μεταγραφή μέσω της RNA πολυμεράσης II. Ένας άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου ο GR επάγει τη μεταγραφή γονιδίων, περιλαμβάνει GREs τα οποία βρίσκονται σε μεγαλύτερη απόσταση από το TATA-box. Στην περίπτωση αυτή, ο GR στρατολογεί συν-ενεργοποιητές, οι οποίοι λειτουργούν σαν γέφυρα για την προσέλκυση της βασικής μεταγραφικής μηχανής (basal transcriptional machinery). Ακόμη, ο GR μπορεί να επάγει τη στρατολόγηση παραγόντων αναδιάταξης της χρωματίνης, που μεταβάλλουν τη δομή νουκλεοσωμάτων του DNA, όπως οι CBP, p300, p/CAF, and SRC1, που είναι ακετυλ-τρανσφεράσες των ιστονών ή ATP-εξαρτώμενων παραγόντων αναδιάταξης της χρωματίνης όπως οι SWI/SNF (Revollo, J.& Cidlowski, 2009). Τέλος, ο GR μπορεί να επάγει τη μεταγραφή χωρίς να προσδεθεί απευθείας στο DNA, αλλά με αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Κάτι τέτοιο φαίνεται από το παράδειγμα της αλληλεπιδράσης του GR με μέλη της οικογένειας STAT. Πιο συγκεκριμένα η έμμεση σύνδεση του GR σε στοιχεία απόκρισης STAT επάγει ή καταστέλλει τη μεταγραφή πολλών γονιδίων στόχων (Psarra & Sekeris, 2008).



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση των μοριακών μηχανισμών σηματοδότησης του GR (Psarra & Sekeris, 2008)

Έχει φανεί ακόμη, ότι η άμεση αλληλεπιδράση του GR με το DNA, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής γονιδίων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της πρόσδεσής του σε αρνητικά στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (negative responsive elements, nGREs). Τα στοιχεία αυτά μοιάζουν δομικά με τα GREs, αλλά διαφέρουν ως προς την αλληλουχία και συνήθως βρίσκονται σε κοντινή απόσταση με άλλα στοιχεία πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων με αποτέλεσμα, ο GR να ανταγωνίζεται και να εκτοπίζει άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, αποτρέποντας έτσι την μεταγραφή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της οστεοκαλσίνης από τον GR, καθώς η περιοχή του TATA-box, αλληλοεπικαλύπτεται με nGRE, και η πρόσδεση του GR σε αυτό αποτρέπει την πρόσδεση της μεταγραφικής μηχανής [(Mitre-Aguilar et al., 2015); (Revollo, J.& Cidlowski, 2009)]. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα nGREs

καταλαμβάνονται από 2 μονομερή του GR χωρίς αυτά να διμερίζονται (Oakley et al., 2013). Επιπροσθέτως, ο GR μπορεί να προωθεί και την καταστολή της μεταγραφής χωρίς άμεση αλληλεπίδραση με το DNA. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτού αποτελεί η καταστολή της μεταγραφής γονιδίων που ρυθμίζονται από τον NF-κΒ, όταν αλληλεπιδρά με τον GR με διάφορους τρόπους. Έχει φανεί, ότι ο GR μπορεί να προσδεθεί στην υπομονάδα του p65, αποτρέποντας την πρόσδεση του NF-κΒ στην περιοχή πρόσδεσής του. Ακόμη, ο GR μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει με τον NF-κΒ, ενώ αυτός είναι προσδεμένος στο DNA, αναστέλλοντας την στρατολόγηση της μεταγραφικής μηχανής (Revollo, J.& Cidlowski, 2009). Τέλος, δεν θα μπορούσε να παραληφθεί η σημαντική παρατήρηση, που αφορά τη μετατόπιση του GR στα μιτοχόνδρια, την πρόσδεση τους σε μιτοχονδριακές αλληλουχίες που παρουσιάζουν ομοιότητα με τα GREs, και την επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που εμπλέκονται στην αναπνευστική αλυσίδα (OXPHOS), συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην αύξηση της παραγωγής μιτοχονδριακού ATP (Psarra et al., 2005, Psarra & Sekeris, 2008, 2009, 2011).

1.2.3 ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR

Πέρα από τις γενωμικές δράσεις του GR, οι οποίες μπορούν να χαρακτηριστούν ως σχετικά αργές, καθώς απαιτείται μεταγραφή γονιδίων και η σύνθεση πρωτεϊνών, έχουν παρατηρηθεί και μη γενωμικές δράσεις, μέσω μεταγωγής σήματος, οι οποίες είναι ταχύτατες. Για παράδειγμα, έχει φανεί, ότι η Src κινάση που απελευθερώνεται από το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, μετά την πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών στον GR, οδηγεί σε ένα καταρράκτη φωσφορυλιώσεων (Revollo, J.& Cidlowski, 2009). Άλλες μη γενωμικές δράσεις, περιλαμβάνουν τη μεταγωγή σήματος μέσω μονοπατιών διαφόρων κινασών όπως αυτά των MAPK, Akt και PI3Ks (Ramamoorthy, 2016). Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι υπάρχει ισομορφία του GR που εντοπίζεται στη μεμβράνη και συνδέεται με την καβεολίνη 1, και η ενεργοποίησή του εμπλέκεται στη διακυτταρική επικοινωνία και τον πολλαπλασιασμό των νευρικών προγονικών κυττάρων (Oakley et al., 2013). Τέλος, έχει φανεί ότι τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να συνδεθούν σε υποδοχείς που συνδέουν G πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors, GPCR) και να ενεργοποιούν το μονοπάτι μεταγωγής σήματος του κυκλικού AMP (cAMP) (Timmermans et al., 2019). Επομένως, οι ταχείες μη γενωμικές δράσεις του GR, συμβάλλουν στην περαιτέρω αύξηση της πολυπλοκότητας και της ποικιλίας των βιολογικών δράσεων του.

1.3 ΑΠΟΠΤΩΣΗ

1.3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αποτελεί μία φυσιολογική διαδικασία των κυττάρων του οργανισμού και ρυθμίζεται με μεγάλη ακρίβεια ώστε να εξυπηρετεί τις ανάγκες του, και προκειμένου να διατηρείται η ομοιόσταση. Πρόκειται για μία διεργασία που παρατηρείται

είτε ως μέρος φυσιολογικών αναπτυξιακών διαδικασιών, είτε ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα, ενδογενή ή εξωγενή. Απόπτωση πραγματοποιείται και κατά τη διάρκεια ανάπτυξης διαφόρων ιστών για την απομάκρυνση κυττάρων που δεν είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του οργανισμού. Για παράδειγμα, για την απομάκρυνση δραστικών T-λεμφοκυττάρων, τα οποία αναγνωρίζουν εαυτά συστατικά, απομάκρυνση κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος ως αντιστάθμιση της συνεχούς παραγωγής τους από το μυελό των οστών και μείωση του αριθμού των νευρώνων σε κάποια αναπτυξιακά στάδια (Mita M. M., 2006).

Επιπλέον, η απόπτωση λειτουργεί ως αμυντικός μηχανισμός για την εξουδετέρωση κυττάρων τα οποία έχουν υποστεί κάποια βλάβη. Κύτταρα τα οποία έχουν μολυνθεί από κάποιον ιό υφίστανται απόπτωση, προκειμένου να περιοριστεί η εξάπλωση του ιού στα γειτονικά κύτταρα του οργανισμού ξενιστή. Ακόμη, απόπτωση υφίστανται κύτταρα τα οποία φέρουν μεταλλάξεις στο DNA τους, λόγω επίδρασης ακτινοβολίας ή αδυναμίας επιδιόρθωσης αυτών, ώστε να αποφευχθεί δυνητικά η ανάπτυξη καρκίνου (Elmore S., 2007).

Η απόπτωση είναι μία διαδικασία εξαρτώμενη από ενέργεια, που ρυθμίζεται με μεγάλη ακρίβεια και περιλαμβάνει μία σειρά κυτταρικών μεταβολών. Το χρωμοσωμικό DNA πέπτεται ανάμεσα στα νουκλεοσώματα, η χρωματίνη συρρικνώνεται και ο πυρήνας κατακερματίζεται. Επίσης η μιτοχονδριακή μεμβράνη σπάει, και τέλος το ίδιο το κύτταρο συρρικνώνεται και κατακερματίζεται σε τμήματα που περιβάλλονται από μεμβράνη και ονομάζονται αποπτωτικά σωμάτια. Αυτά αναγνωρίζονται από γειτονικά κύτταρα και από μακροφάγα, φαγοκυτταρώνονται, και έτσι απομακρύνονται ταχύτατα από τους ιστούς χωρίς την απελευθέρωση του περιεχομένου τους και την πρόκληση φλεγμονής [(Geske, F. J., & Gerschenson., 2001);(Elmore S., 2007)].

Οι κύριοι τελεστές της διαδικασίας αυτής, είναι μία οικογένεια πρωτεασών, που πέπτουν μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων και ονομάζονται κασπάσες. Οι κασπάσες φέρουν κατάλοιπα κυστεΐνης στο ενεργό τους κέντρο, και πέπτουν τα υποστρώματά τους έπειτα από κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος (Hengartner, 2000). Αρχικά παράγονται ως ανενεργά προένζυμα, γνωστά ως προκασπάσες, ενώ μέσω πρωτεόλυσης του N-τελικού άκρου τους, που περιέχει μία ποικιλόμορφη δομή, προκύπτει η ενεργή τους μορφή. Οι κασπάσες, έχουν την ικανότητα της αυτό-ενεργοποίησης και της ενεργοποίησης άλλων κασπασών, μέσω πρωτεόλυσης. Οι κασπάσες διακρίνονται σε εναρκτήριες (2,8,9,10), όπου ενεργοποιούνται ως απόκριση στα διάφορα αποπτωτικά σήματα και στη συνέχεια πέπτουν και ενεργοποιούν τις εκτελεστικές (3,6,7) που ευθύνονται για την πέψη πρωτεϊνών-στόχων που σχετίζονται με το φαινόμενο της απόπτωσης. Με τον τρόπο αυτό ενισχύεται το αρχικό σήμα και το κύτταρο υφίσταται απόπτωση με γρήγορο ρυθμό [(FAN, T- J, 2005) ; (Cohen, 1997);(Geske, F. J., & Gerschenson., 2001)]. Η απόπτωση πραγματοποιείται κυρίως δια μέσου δύο μοναπατιών, του εξωγενούς, που διαμεσολαβείται από διαμεμβρανικούς υποδοχείς θανάτου, και του ενδογενούς το οποίο περιλαμβάνει την δράση διαφόρων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Ωστόσο,

οι δύο αυτές αποπτωτικές οδοί μοιράζονται μία κοινή τελική φάση ενεργοποίησης των εκτελεστικών κασπασών και καταστροφής παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για την επιβίωση του κυττάρου (Mousavi S. H., 2008).

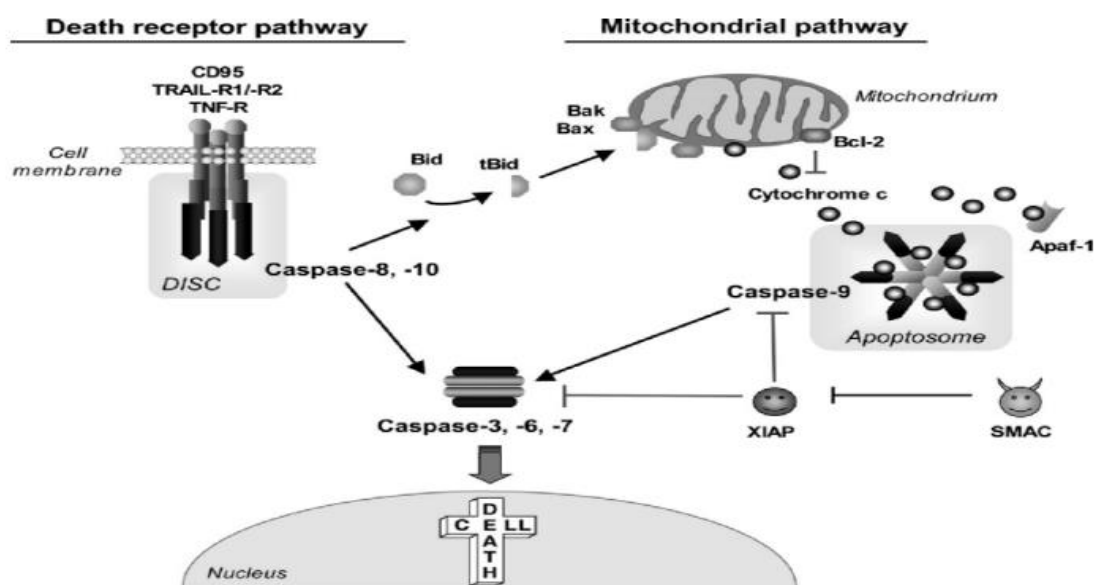
1.3.2 ΕΞΩΓΕΝΕΣ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ

Το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι πυροδοτείται από μία υπεροικογένεια διαμεμβρανικών υποδοχέων, αυτή του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF-R). Τα μέλη της οικογένειας του υποδοχέα TNF, διαθέτουν όμοιες εξωκυτταρικές επικράτειες πλούσιες σε κυστεΐνη και μία κυτταροπλασματική επικράτεια περίπου 80 αμινοξέων που ονομάζεται "επικράτεια θανάτου". Οι κυριότεροι υποδοχείς θανάτου με του αντίστοιχους προσδέτες τους είναι οι FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/ DR4 και Apo2L/DR5 (Mousavi S. H., 2008). Οι περισσότεροι υποδοχείς της υπεροικογένειας αυτής διαθέτουν τον δικό τους ξεχωριστό προσδέτη (Mita M. M., 2006). Μόλις ο προσδέτης αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα του, βοηθητικές πρωτεΐνες που ονομάζονται προσαρμογείς, αλλάζουν τη διαμόρφωση του υποδοχέα, εκθέτοντας την κυτταροπλασματική επικράτεια του (επικράτεια θανάτου), η οποία στη συνέχεια διμερίζεται και αλληλεπιδρά με τις κασπάσες -8 και -10 (εναρκτήριες) για την αλληλεπίδραση και τελικά τη δημιουργία ενός συμπλόκου-σήματος κυτταρικού θανάτου (death-inducing signaling complex, DISC). Ο σχηματισμός αυτού, διευκολύνει την αυτό-ενεργοποίηση των δύο εναρκτήριων κασπασών μέσω πρωτεόλυσης. Στη συνέχεια, οι ενεργοποιημένες κασπάσες, πέπτουν και ενεργοποιούν καθοδικά στον καταρράκτη τις εκτελεστικές κασπάσες -3, -6 και -7, οι οποίες πρωτεολύουν τις πρωτεΐνες-στόχους τους, οδηγώντας σε απόπτωση. Αρνητικός ρυθμιστής της διαδικασίας αυτής είναι η πρωτεΐνη c-FLIP, όπου προσδέεται και αναστέλλει το σχηματισμό του DISC και την επακόλουθη ενεργοποίηση των κασπασών -8 και -10 [(Mita M. M., 2006); (Elmore 2007; (Mousavi S. H., 2008)].

1.3.3 ΕΝΔΟΓΕΝΕΣ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ

Το ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης λαμβάνει χώρα ως απόκριση σε μεγάλο αριθμό σημάτων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών αποτελούν η έλλειψη αυξητικών παραγόντων, ορμονών ή κυτοκινών, ερεθίσματα κυτταρικού στρες, όπως η ιική μόλυνση, τοξίνες, βλάβη του DNA, υποξία και ελεύθερες ρίζες. Το μονοπάτι αυτό, πυροδοτείται και καταστέλλεται από τα μέλη της υπεροικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2, η οποία περιλαμβάνει προαποπτωτικές πρωτεΐνες, δηλαδή αγωνιστές του κυτταρικού θανάτου (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bid, Bik, Bim, and Hrk), όσο και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, δηλαδή ανταγωνιστές (Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-W, Bfl-1, and Mcl-1). Ουσιαστικά η ισορροπία μεταξύ αγωνιστών/ανταγωνιστών καθορίζει την κυτταρική επιβίωση ή την απόπτωση (Mita M. M., 2006).

Καθοριστικής σημασίας για την έναρξη του ενδογενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού, είναι η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Bax από προαποπρωτικές πρωτεΐνες όπως η Bid. Το μονοπάτι εξελίσσεται με τον ολιγομερισμό των πρωτεϊνών Bak και Bax στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, αυξάνοντας έτσι τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω του σχηματισμού πόρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων μιτοχονδριακών προαποπρωτικών πρωτεϊνών. Στη συνέχεια το κυτόχρωμα c προσδένεται στο C-τελικό άκρο της Araf-1, διευκολύνοντας έτσι τη σύνδεση του ATP και την επαγόμενη έκθεση του N-τελικού του άκρου, το οποίο αλληλεπιδρά με την κασπάση -9. Το σύμπλοκο αυτό ονομάζεται αποπρωσωμα, και έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης -9 [(Fulda S, 2006);(Mita M. M. , 2006);(Hengartner,2000)]. Η ενεργοποιημένη κασπάση -9, στη συνέχεια ενεργοποιεί μέσω πρωτεόλυσης άλλες εκτελεστικές κασπάσες καθοδικά του καταρράκτη, όπως είναι οι κασπάσες -3 , -6 και -7. Η δράση των κασπασών ελέγχεται από τις πρωτεΐνες IAP (inhibitors of apoptosis), οι οποίες επάγουν την αποικοδόμηση των εκτελεστικών κασπασών -3, -6 και -7. Οι IAPs καταστέλλονται από τις πρωτεΐνες Smac/DIABLO και την πρωτεάση σερίνης HtrA2/Omi που απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια μαζί με το κυτόχρωμα c [(Elmore 2007); (Mita M. M. , 2006); (Fulda S, 2006); (Mousavi S. H. et al , 2008)]. Άλλες προαποπρωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 είναι οι PUMA και Noxa, των οποίων η μεταγραφή επάγεται από τον p53 και επάγουν την απόπρωση. Ειδικότερα, η PUMA επάγει την έκφραση της Bax, αλλαγή της διαμόρφωσης της και μετατόπιση στην μιτοχονδριακή μεμβράνη ενισχύοντας έτσι περαιτέρω την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Mousavi S. H., 2008).



ΕΙΝΟΝΑ 5. Σύνοψη των δύο κύριων αποπρωτικών οδών (Mousavi S. H., 2008). Αριστερά απεικονίζεται το εξωγενές μονοπάτι της απόπρωσης, το οποίο πραγματοποιείται μέσω υποδοχέων που ανήκουν στην υπερικογένεια υποδοχέων θανάτου. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αναρκτήριας κασπάσης -8 που ενεργοποιεί μέσω πρωτεόλυσης τις εκτελεστικές κασπάσες -3,-6 και -7, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο. Δεξιά, απεικονίζεται το μιτοχονδριακό μονοπάτι, όπου διάφορα σήματα κυτταρικού στρες οδηγούν στην απελευθέρωση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, την ενεργοποίηση της κασπάσης -9 στο αποπρωσωμα, και τελικά στην ενεργοποίηση μέσω πρωτεόλυσης της εκτελεστικής κασπάσης -3 και τον επερχόμενο κυτταρικό θάνατο.

1.3.4 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΑΠΟ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν τη δράση τους μέσω του GR, και η ενεργοποίηση αυτού έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή ή την καταστολή της έκφρασης διαφόρων γονιδίων στόχων. Τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια ως φάρμακα για διάφορες παθολογικές καταστάσεις λόγω της ισχυρής αντιφλεγμονώδους και ανοσοκατασταλτικής τους δράσης. Παρόλα αυτά, η παρατεταμένη χρήση τους οδηγεί σε πλήθος ανεπιθύμητων παρενεργειών. Μερικές από αυτές εν μέρη οφείλονται στη διαφορετική δράση που έχουν όσον αφορά τη ρύθμιση της απόπτωσης στους διάφορους ιστούς ή ακόμη και κυτταρικούς τύπους. Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν τόσο προαποπτωτικές όσο και αντιαποπτωτικές δράσεις σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, μεταβάλλοντας την έκφραση και κατ' επέκταση την ισορροπία μεταξύ προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών (Gruver-Yates and Cidlowski, 2013).

Τα γλυκοκορτικοειδή, ασκούν τις προαποπτωτικές τους δράσεις κυρίως μέσω της ενεργοποίησης του ενδογενούς ή μιτοχονδριακού μονοπατιού. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία γλυκοκορτικοειδών, αυξάνεται η έκφραση των Bim και PUMA, που αποτελούν μέλη των προαποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2. Στη συνέχεια, ακολουθεί η ενεργοποίηση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών Bak/Bax. Αυτές, σχηματίζουν πόρους στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και οδηγούν σε μεταβολή του δυναμικού της, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, την ενεργοποίηση της κασπάσης 9 που στη συνέχεια ενεργοποιεί την κασπάση 3 και άλλες εκτελεστικές κασπάσες, και τελικά την επαγωγή απόπτωσης [(Gruver-Yates and Cidlowski, 2013); (Herr et al., 2007)]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα κυτταρικού τύπου που τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν την απόπτωση είναι οι οστεοβλάστες, κύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό του οστού. Στους οστεοβλάστες, τα γλυκοκορτικοειδή, ασκούν αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις μέσω της αυξορύθμισης προαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η Bim και η NOXA και μειορύθμισης των αντιαποπτωτικών Bcl-2, Bcl-XL, και Mcl-1. Αποπτωτικές δράσεις, έχουν επίσης και στα χονδροκύτταρα. Για το λόγο αυτό, και η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών για μεγάλο χρονικό διάστημα οδηγεί στην ανάπτυξη οστεοπόρωσης. Στους σκελετικούς μύες η επαγωγή της απόπτωσης από τα γλυκοκορτικοειδή και η ανάπτυξη μυοπάθειας συνδέεται με την ενεργοποίηση του εξωγενούς μονοπατιού που περιλαμβάνει τον υποδοχέα Fas και την ενεργοποίηση της κασπάσης 8 και αύξηση της έκφρασης των προαποπτωτικών Bax, Bad και Bid (Gruver-Yates and Cidlowski, 2013). Άλλα συστήματα στα οποία τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν την απόπτωση είναι το αναπνευστικό, το κυκλοφορικό, το νευρικό, το πεπτικό και το ανοσοποιητικό σύστημα. Στο κυκλοφορικό, φαίνεται πως προάγουν την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων και οδηγούν στην υπέρταση. Στο αναπνευστικό, επάγουν την απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων των αεραγωγών μέσω της αύξησης της έκφρασης της Bax και μείωση της Bcl-2, ενώ επίσης επάγουν και την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών. Επιπλέον, στο πεπτικό σύστημα φαίνεται πως προωθούν την απόπτωση διαφόρων ενδοθηλιακών κυττάρων. Κύτταρα του νευρικού συστήματος που

οδηγούνται επίσης σε απόπτωση ως απόκριση στη χορήγηση γλυκοκορτικοειδών είναι νευρικά κύτταρα του οφθαλμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης και την πρόκληση γλαυκώματος. Τέλος, τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το ανοσοποιητικό σύστημα, και οι δράσεις τους σε αυτό είναι οι καλύτερα χαρακτηρισμένες. Είναι γνωστό, ότι τα γλυκοκορτικοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο για την επιλογή κλώνων T-λεμφοκυττάρων και την απόρριψη αυτών που αναγνωρίζουν εαυτά συστατικά. Ακόμη είναι υπεύθυνα για την διατήρηση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού και τον τερματισμό της ανοσολογικής απόκρισης μετά το πέρας της λοίμωξης. Τα γλυκοκορτικοειδή προωθούν την απόπτωση σε διάφορους τύπους κυττάρων του ανοσοποιητικού όπως τα θυμοκύτταρα, τα B-, τα T-κύτταρα, τα μακροφάγα και τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα. Αντιθέτως, δεν επάγουν την απόπτωση στα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, τα ηωσινόφιλα και τα NK-κύτταρα, ενώ επίσης δρουν προστατεύοντας τα ουδετερόφιλα από απόπτωση (Gruver-Yates and Cidlowski, 2013).

Παρόλο που τα γλυκοκορτικοειδή προωθούν την απόπτωση σε διάφορους τύπους κυττάρων, επηρεάζοντας τη λειτουργία πολλών συστημάτων οργάνων, υπάρχουν και περιπτώσεις όπου έχουν αντιαποπτωτικές δράσεις. Παραδείγματα των περιπτώσεων αυτών είναι τα ωοθυλακικά κύτταρα, ηπατοκύτταρα, λιποκύτταρα, καρδιομυοκύτταρα και νεφρικά κύτταρα. Σε αυτούς του τύπους κυττάρων έχει παρατηρηθεί ότι αναστέλλουν την απόπτωση μεταβάλλοντας τα επίπεδα έκφρασης προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών (Gruver-Yates and Cidlowski, 2013). Όπως γίνεται αντιληπτό από τα ανωτέρω, τα γλυκοκορτικοειδή εμφανίζουν πλειοτροπική δράση και η επίδραση που ασκούν στην επαγωγή ή μη της απόπτωσης διαφέρει ανάλογα με τον ιστό ακόμη και με τον τύπο κυττάρου.

1.4 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ

1.4.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ- ΣΥΣΤΑΣΗ

Η μαστίχα Χίου είναι μία ρητινώδης έκκριση που εκκρίνεται σε σχήμα σταγόνας από το μαστιχοφόρο αειθαλές φυτό *Pistacia Lentiscus var Chia*, όταν πληγωθεί ο κορμός ή κάποιος κλάδος του με τη χρήση αιχμηρού αντικειμένου. Το *Pistacia Lentiscus var Chia* καλλιεργείται κυρίως σε νότιες περιοχές της Χίου. Τόσο η μαστίχα όσο και το αιθέριο έλαιο μαστίχας, γνωστό και ως μαστιχέλαιο χρησιμοποιούνται εδώ και πάρα πολλά χρόνια ως φυσικό αρωματικό και πρόσθετο τροφίμων. Ακόμη, από πολύ παλιά έχει αναφερθεί η χρήση τους και για θεραπευτικούς σκοπούς, κυρίως για την αντιμετώπιση προβλημάτων του πεπτικού συστήματος αλλά και την μείωση της χοληστερόλης, βάσει παρατηρήσεων που είχαν γίνει. Τα τελευταία χρόνια, ολοένα και αυξάνεται ο αριθμός των ερευνών που υποστηρίζουν πως η μαστίχα Χίου και το μαστιχέλαιο έχουν μεγάλη βιολογική σημασία, και

διαθέτουν πληθώρα θεραπευτικών ιδιοτήτων (S. Paraschos et al., 2012), ενώ το 2015 η μαστίχα Χίου ορίστηκε από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA, European Medicines Agency) ως φυσικό φαρμακευτικό προϊόν για τη θεραπεία ήπιων πεπτικών διαταραχών και ελαφρών τραυμάτων και φλεγμονών του δέρματος (The European Medicines Agency (EMA) Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) Assessment Report on Pistacia Lentiscus L., Resin (Mastix) [(accessed on 7 February 2019).

Το μαστιχέλαιο, είναι ένα πλήρως φυσικό προϊόν, το οποίο προκύπτει από την απόσταξη της ρητινώδους έκκρισης του μαστιχόδεντρου. Τα μαστιχόδεντρα καλλιεργούνται αποκλειστικά στη Χίο, και αξιοποιούνται οι ρητινώδεις εκκρίσεις μικρότερων θάμνων. Όταν παραχθούν αυτές, αφήνονται να στερεοποιηθούν και στη συνέχεια συλλέγονται και από αυτές προκύπτει η μαστίχα Χίου. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αποξήρανση μέσω θερμού αέρα. Το προϊόν που προκύπτει υπόκειται σε απόσταξη κενού με νερό, και το παχύρευστο αυτό διάλυμα ακολούθως φυγοκεντρείται. Τέλος, απομακρύνεται και συλλέγεται το υπερκείμενο, το οποίο είναι το αιθέριο έλαιο μαστίχας [(Chios Mastic Oil-Technical Specifications, Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου);(Spyridopoulou K. et al., 2017)]

Το αιθέριο έλαιο μαστίχας αποτελείται από ένα μίγμα βιολογικά δραστικών ουσιών, οι οποίες ευθύνονται για την πληθώρα των βιολογικών του δράσεων. Ειδικότερα, έχει φανεί από την ανάλυση της σύστασής του μέσω αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS), ότι η κύρια κατηγορία χημικών συστατικών που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο είναι ισοπρενικά παράγωγα που περιλαμβάνουν μονοτερπένια και σεσκιτερπένια. Γενικότερα, τα τερπενοειδή αποτελούνται από τη συνένωση ομάδων ισοπρενίου, και μπορεί να είναι κυκλικά ή γραμμικά παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο μεγάλη ποικιλία ενώσεων. Τα μονοτερπένια αποτελούνται από 2 μονάδες ισοπρενίου, δηλαδή από 10 άτομα άνθρακα (C₁₀), ενώ τα σεσκιτερπένια από 3 μονάδες ισοπρενίου, δηλαδή από 15 άτομα άνθρακα (C₁₅). Με βάση την χημική ανάλυση των συστατικών του μαστιχέλαιου, φάνηκε πως τα κύρια συστατικά που περιέχονται σε αυτό είναι δύο αρωματικά μονοτερπένια, το α-πινένιο, και το β-μυρσένιο (79-88% και 7-14% αντίστοιχα) ,ενώ σε μικρότερα ποσοστά περιέχονται και άλλα μονοτερπένια όπως: το β-πινένιο, το λιμονένιο και το καμφένιο, και σεσκιτερπένια όπως το β-καρυοφυλλένιο [(Spyridopoulou K. et al., 2017); (Miyamoto et al., 2014);(Koutsoudaki et al., 2005); (Chios Mastic Oil-Technical Specifications, Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου)].

1.4.2 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ – ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Παρότι από τα παλαιότερα χρόνια είχαν παρατηρηθεί πολλές από τις ευεργετικές ιδιότητες της μαστίχας Χίου, στις μέρες μας συνεχώς αυξάνεται ο όγκος των επιστημονικών δεδομένων που υποστηρίζουν τη μεγάλη βιολογική αξία τόσο της μαστίχας όσο και του αιθέριου ελαίου που παράγεται από αυτή. Έχει αναφερθεί πως ο συνδυασμός όλων αυτών των συστατικών που περιέχονται στη μαστίχα και το μαστιχέλαιο προσφέρει μία μεγάλη ποικιλία φαρμακευτικών ιδιοτήτων. Μία εξ' αυτών,

η εξάλειψη βακτηρίων και μυκήτων που προκαλούν πεπτικά έλκη, ή συμβάλλουν στο σχηματισμό οδοντικής πλάκας και στη δυσσομία του στόματος (Dimas et al.,2012). Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί πως συστατικά τα οποία περιέχονται στο μαστιχέλαιο έχουν αντιβακτηριακές ιδιότητες, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την ιδιότητα του μαστιχέλαιου να δρα αρνητικά στην ανάπτυξη του *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), ενός αρνητικού κατά Gram βακτηρίου, το οποίο ευθύνεται σε πολλές περιπτώσεις για χρόνιες μολύνσεις του γαστρεντερικού, έλκη του δωδεκαδακτύλου και καρκίνο του στομάχου [(Miyamoto et al., 2014);(S. Paraschos et al.,2012); (Dimas et al.,2012)]. Επιπλέον, έχει φανεί *in vitro* πως το μαστιχέλαιο έχει αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη κι άλλων βακτηρίων τόσο θετικών κατά Gram (*Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis*) όσο και αρνητικών κατά Gram (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* και *Pseudomonas aeruginosa*) αλλά και στην ανάπτυξη παθογόνων μυκήτων όπως οι *Candida albicans*, *Candida tropicalis* και *Torulopsis glabrata* (Magiatis et al.,1999). Παρότι, εξετάστηκαν έλαια διαφορετικής προέλευσης από το *Pistacia Lentiscus* (φύλλα, κλάδοι, ρητίνη), φάνηκε πως το μαστιχέλαιο το οποίο εξάγεται από τη μαστίχα (ρητίνη) έχει την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα όσον αφορά την αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή ικανότητα, πιθανότατα λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσής του σε α-πινένιο (Magiatis et al.,1999).

Επιπροσθέτως, υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν πως η χορήγηση του μαστιχέλαιου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ολικής χοληστερόλης του ορού, της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) καθώς και των τριγλυκεριδίων και ως εκ τούτου μπορεί να θεωρηθεί πως έχει προστατευτικό ρόλο στο καρδιαγγειακό σύστημα, προστατεύοντας από την αθηροσκλήρωση και την στεφανιαία νόσο. Πιο συγκεκριμένα, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε αρουραίους, φάνηκε πως η χορήγηση μαστιχέλαιου επάγει σημαντική μείωση της ολικής χοληστερόλης του ορού, της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) και των τριγλυκεριδίων, και πως το ποσοστό της μείωσης αυτής εξαρτάται από τη χορηγούμενη δόση. Το συστατικό το οποίο περιέχεται στο μαστιχέλαιο και φάνηκε πως επάγει τις δράσεις αυτές είναι το καμφένιο. Ακόμη, η επώαση ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 με καμφένιο, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης εστέρων χοληστερόλης και μείωση του ρυθμού βιοσύνθεσης της χοληστερόλης, με μηχανισμό διαφορετικό από τα συμβατικά υπολιπιδαιμικά φάρμακα που δρουν ως αναστολείς της αναγωγής του HMG-CoA, του ενζύμου που καταλύει την καθοριστικό βήμα του μονοπατιού βιοσύνθεσης της χοληστερόλης. Έτσι, τα αποτελέσματα αυτά καθιστούν το μαστιχέλαιο ως πιθανή εναλλακτική θεραπεία για καρδιαγγειακές νόσους, αποφεύγοντας τις παρενέργειες των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων ή την ανοχή σε αυτά (Vallianou et al., 2011).

Μεγάλος επίσης είναι και ο όγκος των επιστημονικών δεδομένων που υποστηρίζουν τις αντι-πολλαπλασιαστικές και προ-αποπτωτικές δράσεις του αιθέριου ελαίου μαστίχας. Πιο συγκεκριμένα, το μαστιχέλαιο ελέγχθηκε *in vitro* ενάντια σε δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου, ανθρώπου και τρωκτικών και φάνηκε πως αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών,

μειώνοντας την έκφραση της Ki-67, μίας πρωτεΐνης που αποτελεί δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και έχει διάφορους λειτουργικούς ρόλους σε διαφορετικά στάδια της μίτωσης, και της BIRC5a, που αποτελεί μέλος της οικογένειας IAP (inhibitor of apoptosis) και εμποδίζει την ενεργοποίηση των κασπασών. Ακόμη, φάνηκε in vitro μέσω της δοκιμασίας wound healing σε τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου πως το μαστιχέλαιο μετριάζει την ικανότητα εισβολής και κατ' επέκταση τη μετάσταση. Επιπλέον, αναφέρθηκε πως η από στόματος χορήγηση μαστιχέλαιου για 13 μέρες σε μοντέλα ποντικών οδήγησε στην αναστολή της ανάπτυξης του όγκου του παχέος εντέρου (Spyridoroulou K. et al., 2017). Σε μία άλλη έρευνα, διαπιστώθηκε πως το μαστιχέλαιο καταστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση στην κυτταρική σειρά ανθρώπινου λεμφοβλαστώματος K562, επάγει την απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και μειώνει την έκφραση του VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ενός πολύ σημαντικού παράγοντα αγγειογένεσης, με τρόπο που εξαρτάται από το χρόνο και τη συγκέντρωση του μαστιχέλαιου. Η ίδια έρευνα επίσης έδειξε, πως το μαστιχέλαιο μετριάζει την οργάνωση ενδοθηλιακών κυττάρων για το σχηματισμό αγγείων τόσο in vitro με το σύστημα Matrigel, όσο και in vivo στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου όρνιθας, και πως οι μηχανισμοί μέσω των οποίων δρα το μαστιχέλαιο περιλαμβάνουν την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης σημαντικών μορίων των μονοπατιών των κυττάρων στόχων όπως Erk1/2 στα καρκινικά και RhoA στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Loutrari et al., 2006). Τέλος, η χορήγηση μαστιχέλαιου σε ποντίκια με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, έδειξε πως το μαστιχέλαιο δρα ενάντια σε αυτόν τον τύπο καρκίνου, καθώς επάγει απόπτωση των καρκινικών κυττάρων τόσο in vivo όσο και in vitro και εμποδίζει το σχηματισμό νέων αγγείων. Παράλληλα, μειώνει την έκφραση φλεγμονωδών παραγόντων και παραγόντων αγγειογένεσης που προάγουν την ανάπτυξη του όγκου (Magkouta et al., 2009).

1.5 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΛΕΒΑΝΤΑΣ

1.5.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ – ΣΥΣΤΑΣΗ

Η λεβάντα (*Lavandula*) είναι γένος φυτών που ανήκει στην οικογένεια *Labiatae*, και περιλαμβάνει περίπου 25 είδη. Πρόκειται για αειθαλή μακρόβια θαμνώδη φυτά που αναπτύσσονται κυρίως σε παραμεσόγειες χώρες. Τα πιο γνωστά -και ευρέως χρησιμοποιούμενα εδώ και εκατοντάδες χρόνια- είδη είναι τα *Lavandula angustifolia*, *L. latifolia* και *L. stoechas*. Πολύ συχνά, τα φύλλα της λεβάντας χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του αιθέριου ελαίου λεβάντας, το οποίο παράγεται μέσω μίας διαδικασίας απόσταξης. Εδώ και πολλά χρόνια υποστηρίζεται πως η λεβάντα (*Lavandula angustifolia*), είναι ένα φυτό το οποίο έχει πολλές ευεργετικές ιδιότητες για το ανθρώπινο σώμα, και χρησιμοποιείται ευρέως σε βιομηχανίες όπως της αισθητικής και αρωματοθεραπείας και των πρόσθετων τροφίμων. Με την πάροδο του χρόνου, ολοένα και αυξάνεται ο αριθμός των ιδιοτήτων που υποστηρίζεται πως διαθέτει το αιθέριο έλαιο λεβάντας, με πολλές αναφορές να αφορούν

αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και εντομοαπωθητικές δράσεις αλλά και μυοχαλαρωτικές ιδιότητες και θεραπευτικές ιδιότητες όσον αφορά πεπτικές διαταραχές [(Prusinowska et al., 2014);(Cavanagh et al.,2002 & 2005)]. Τα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά της σύστασης του ελαίου λεβάντας διαφέρουν ανάλογα με το γονότυπο, τις κλιματικές συνθήκες, τις συνθήκες σποράς και ανάπτυξης και από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, και υποστηρίζεται πως τα αιθέριο έλαιο λεβάντας περιλαμβάνει πάνω από 300 χημικές ενώσεις. Στα περισσότερα αιθέρια έλαια λεβάντας διαφορετικής προέλευσης των οποίων η χημική σύσταση εξετάστηκε, οι επικρατέστερες ενώσεις που βρέθηκαν ήταν οι εξής: το λινολεϊκό οξύ, το λιμονένιο, η 1,8-κινεόλη, η τερπινεν-4όλη, η λεβαντουλόλη, η λιναλουόλη, το οκιμένιο, το οξικό λιναλύλιο και η καμφορά, σε διαφορετικές αναλογίες ανάλογα με την περιοχή προέλευσης [(Prusinowska et al., 2014);(Cavanagh et al.,2002 & 2005);(SILVA et al.,2015)]. Ειδικότερα, στο αιθέριο έλαιο λεβάντας ελληνικής προέλευσης οι επικρατέστερες ενώσεις που βρέθηκαν ήταν η λιναλουόλη, το οξικό λιναλύλιο, η 1,8-κινεόλη, το π-κυμένιο, η καμφορά, η βορνεόλη και σε μικρότερα ποσοστά το α-πινένιο, και το καμφένιο (Białoń et al. 2019).

1.5.2 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΛΕΒΑΝΤΑΣ – ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Παρόλο που οι χρήσεις του αιθέριου ελαίου λεβάντας τα παλαιότερα χρόνια σχετίζονταν σε μεγάλο βαθμό με τον τομέα της αισθητικής, των αρωμάτων και των πρόσθετων τροφίμων, με την πάροδο του χρόνου φάνηκε πως έχει και πολλές άλλες σημαντικές ιδιότητες. Μία εξ' αυτών αφορά τη δράση του ενάντια σε βακτήρια. Παρατηρήθηκε πως το έλαιο λεβάντας σε εύρος συγκεντρώσεων 0,94%-10%v/v έχει αντιβακτηριακή δράση ενάντια σε 65 στελέχη βακτηρίων, και πως η αποτελεσματικότητα του ενάντια σε Gram θετικά βακτήρια ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με Gram αρνητικά (Mayaud et al., 2008). Επιπλέον, κάποια συστατικά που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο λεβάντας όπως το λινολεϊκό και η τερπινεν-4όλη, επιδρούν στο κεντρικό νευρικό σύστημα, μειώνοντας την ενεργητικότητα, το άγχος και διευκολύνοντας τον ύπνο (Buchbauer et al., 1991). Ακόμη, η χορήγηση μέσω εισπνοής ελαίου λεβάντας βελτιώνει τα συμπτώματα πεπτικών διαταραχών, ρυθμίζοντας την κινητικότητα του εντέρου, την έκκριση χολής και την αποκατάσταση της ενεργότητας οξειδωτικών ενζύμων που συμμετέχουν στον καταβολισμό των μακροθρεπτικών συστατικών της τροφής (Prusinowska et al., 2014). Τέλος, υπάρχουν επιστημονικά δεδομένα που υποστηρίζουν πως το αιθέριο έλαιο λεβάντας έδειξε πως έχει αντικαρκινική δράση in vitro και in vivo. Ειδικότερα, φάνηκε πως όταν πραγματοποιήθηκε επώαση σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου του προστάτη PC-3, υπήρξε επαγωγή της απόπτωσης και αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, η υποδόρια χορήγηση ελαίου λεβάντας σε μοντέλα ποντικών με επαγόμενο καρκίνο του προστάτη, είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και της ανάπτυξης του όγκου (Zhao et al.,2016).

1.6 ΣΚΟΠΟΣ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, γενικότερα τα αιθέρια έλαια που παράγονται από φυτά, είναι εξαιρετικά πολύπλοκα μείγματα πολλών διαφορετικών ενώσεων που αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και στις οποίες αποδίδεται και η πολύ μεγάλη ποικιλία βιολογικών δράσεων των αιθέριων ελαίων. Η σύσταση τους, και η ποσοστιαία περιεκτικότητά τους σε αυτές τις ενώσεις εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως οι συνθήκες αλλά και οι τόπος ανάπτυξης των φυτών. Η πλειονότητα των ενώσεων, που περιέχονται στα αιθέρια έλαια, εντάσσονται στην κατηγορία των τερπενοειδών και πιθανώς να είναι υπεύθυνες για τις βιολογικές δράσεις τους. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η πρωταρχική μελέτη της διερεύνησης των εν δυνάμει προαποπρωτικών, υπογλυκαιμικών και αντιφλεγμονωδών δράσεων δύο αιθέριων ελαίων που παράγονται από το μαστιχόδεντρο (*Pistacia Lentiscus var Chia*) και το φυτό της λεβάντας (*Lavandula angustifolia*) αντίστοιχα, καθώς και των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων επιτελούνται, με έμφαση στην πιθανή εμπλοκή των συστατικών τους στο μονοπάτι σηματοδότησης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Παράλληλα, διερευνήθηκε και η αλληλεπίδραση των συστατικών του αιθέριου ελαίου μαστίχας με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, ώστε να διαπιστωθεί αν επάγεται η ενεργοποίησή του και η επακόλουθη μεταφορά του, από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Η μελέτη αυτή επιτελείται στο πλαίσιο εύρεσης εκλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, που θα επάγουν τις ευεργετικές δράσεις του με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες, για την καταπολέμηση ασθενειών όπως οι φλεγμονώδεις νόσοι, ο διαβήτης, τα αυτοάνοσα νοσήματα και ο καρκίνος.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

- Συσσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminar Flow Hood) Tel Star AV-30/70
- Επωαστήρας: Thermo Electron Corporation
- Υδατόλουτρο: P SELECTA
- Φυγόκεντρος: Entrofriger- BLII/ PS Selecta®
- Φυγόκεντρος: Eppendorf 5417R
- Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): A. Kruss Optronik Germany
- Φωτόμετρο Spectronic® 20 GENESYSTM
- Heat blocker: KISKER
- Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S
- Vortex: Bio Vortex V1
- Συσσκευή ηλεκτροφόρησης: Biorad mini-PROTEAN® tetra cell

- Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (transfer): Biorad mini-trans Blot
- Ζυγοί: KERN EW + KERN 440-47 N
- Quick spin: Nippon Genetics Europe GmbH
- Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών από W.B Kodak

2.2 ΧΗΜΙΚΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

2.2.1 ΧΗΜΙΚΑ

- Acrylamide/Bis acrylamide 40% (Bio-Rad)
- Ammonium persulfate, APS (Sigma)
- Bradford protein assay (Bio-Rad)
- Bromophenol blue (Fluka)
- Dexamethazone (Riedel-de Haën)
- DTT (SERVA)
- Developer (Fuji)
- ECL A + ECL B (Santa Cruz)
- FBS (Gibco®)
- FBS cis (Biosera)
- Fixer (Fuji)
- L-Glutamine (Gibco)
- Phenyl Methyl Sulfonyl Floride, PMSF (SERVA)
- Protease inhibitors (Sigma)
- Sodium Dodecyl Sulfate, SDS (SIGMA)
- Skimmed milk powder (Regilait)
- TEMED (Applichem)
- Trypsin-EDTA 5% 10x (Gibco, Sigma)
- Tween 20 (Euroclone, Sigma)
- Αιθανόλη 100% (SIGMA)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haën)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών PAGERULER (ThermoScientific Fermentas)

2.2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

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

2.2.3 ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

- Το αιθέριο έλαιο μαστίχας λήφθηκε από την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου σε γυάλινο δοχείο, και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).
- Το αιθέριο έλαιο λεβάντα λήφθηκε από την εταιρία THARROS Aromatic Plants Products και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).

2.2.4 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- **PMSF 200mM:** Πραγματοποιείται 10% w/v αραιώση σε ισοπροπανόλη για την παρασκευή PMSF συγκέντρωσης 20mM. Αποθηκεύεται στους -20°C.
- **Διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis Buffer):** Αποτελείται από 20mM Tris pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 250mM NaCl και 3mM EDTA και αποθηκεύεται στο 4°C. Πριν τη χρήση πραγματοποιείται προσθήκη 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF και μείγματος αναστολέων πρωτεασών στην απαιτούμενη συγκέντρωση.
- **Διάλυμα Bradford:** Το Stock είναι σε συγκέντρωση 5X. Το διάλυμα χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1X, αραιωμένο με ddH₂O. Το δείγμα πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται βρίσκεται σε αναλογία 1/1000 σε σχέση με τον όγκο του διαλύματος Bradford.
- **Sample Buffer 4X (διάλυμα επιστοίβαξης δειγμάτων):** Αποτελείται από 1M Tris pH 6.8, 10% γλυκερόλη, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% κυανό της βρωμοφαινόλης. Αποθηκεύεται στο -20 °C.
- **Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 :** Για την παρασκευή 0.2 L διαλύματος ζυγίζονται 36,342 g Tris τα οποία έπειτα διαλύονται σε dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με προσθήκη HCl 12 N και ο όγκος συμπληρώνεται με dH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.
- **Tris 20 mM pH 7.5:** Σε πλαστικό σωληνάριο τύπου erpendorf (1.5 ml) αναμειγνύονται 20μl διαλύματος stock Tris 1 M pH 7.5 (4 °C) με 980ml ddH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ammonium persulfate (APS 10%) :** Παρασκευάζεται διαλύοντας 100 mg APS σε 1ml ddH₂O. Αποθηκεύεται στους -20 °C.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10x:** Για να παρασκευαστεί, ζυγίζονται 30.3gr Tris base και 144.00 gr γλυκίνης, τα οποία διαλύονται σε όγκο 1lt ddH₂O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10x:** Αποτελείται από 10% Running Buffer 10x, 20% MeOH και 0.05% SDS. Ο όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη ddH₂O και το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10x:** Ζυγίζονται 2gr KCl, 2,4gr KH₂PO₄, 17,8gr Na₂HPO₄·2H₂O και 80gr NaCl, όπου διαλύονται σε 1lt ddH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1x:** Αποτελείται από 10% buffer PBS 10x και 1% Tween-20, ο όγκος συμπληρώνεται με ddH₂O και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (TBS) 10x:** Για τη δημιουργία 1lt TBS 10X ζυγίζονται 24gr Tris-base (MB 121,1) και 88gr NaCl (MB 58,4). Ακολούθως ρυθμίζεται το pH στα 7,4-7,6 με προσθήκη πυκνού HCl 12N. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1x:** Αποτελείται από 10% stock buffer TBS 10x και 1% Tween-20. Ο όγκος συμπληρώνεται με ddH₂O και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διαλύματα για εμφάνιση σήματος:** Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό παρασκεύασμα της Kodak. Αποτελείται από ένα διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution) και ένα διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Fixer solution). Τα εκάστοτε διαλύματα παρασκευάζονται με ανάμειξη 1 : 3,5 % v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (fixer ή developer) σε ddH₂O.

2.2.5 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Για να χρησιμοποιηθούν τα πρωτογενή αντισώματα διαλύονται σε TBST 1X και γάλα τελικής συγκέντρωσης 2% w/v. Αποθηκεύονται στους -20°C.

Πρωτογενή αντισώματα:

- Anti-procaspase 9 (Cell signaling),
- Anti-β-actin (Sigma)
- Anti-GR G-5 (Santa cruz)
- Anti-procaspase 3 (Abcam)
- Anti-PEPCK (Santa cruz)
- Anti-GAPDH (Santa cruz)
- Anti AMPK-α (Cell signaling)
- Anti phospho-AMPK-α (Cell signaling)
- Anti-p65 (Santa cruz)

Για να χρησιμοποιηθούν τα δευτερογενή αντισώματα διαλύονται σε TBST 1X και γάλα τελικής συγκέντρωσης 2% w/v. Αποθηκεύονται στους -20°C.

Δευτερογενή αντισώματα:

- Mouse-HRP (Pierce Antibodies)
- Rabbit-HRP (Pierce Antibodies)

2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HeLa. Τα κύτταρα HeLa είναι καρκινικά κύτταρα ενδομήτριου. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε φλάσκα T25, στον επωαστήρα όπου επικρατούν συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Για την καλλιέργεια τους χρησιμοποιήθηκε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FBS, (Fetal Bovine Serum), με phenol red, 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% L-γλουταμίνη και 1%πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

2.3.2 ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται όταν η πληρότητα της φλάσκας φτάσει περίπου το 80% της επιφάνειάς της, με την προσθήκη του πρωτεολυτικού ενζύμου θρυψίνη. Ακολούθως, τα κύτταρα στη φλάσκα, παρατηρούνται στο ανάστροφο μικροσκόπιο ώστε να διαπιστωθεί αν έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια της φλάσκας. Για τον τερματισμό της θρυψινοποίησης προστίθεται νέο θρεπτικό μέσο σε ποσότητα 4 φορές μεγαλύτερη του όγκου της θρυψίνης. Μεταφέρεται όλο το περιεχόμενο της φλάσκας σε falcon και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 1000 rpm και θερμοκρασία δωματίου (20-25°C). Το επόμενο βήμα είναι η απομάκρυνση του υπερκείμενου και η επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος (κύτταρα) σε θρεπτικό μέσο για να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω τα κύτταρα σε πείραμα ή να επανατοποθετηθούν στη φλάσκα για ανακαλλιέργεια.

2.3.3 ΜΕΤΡΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΡΩΣΙΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για τη μέτρηση του επιθυμητού αριθμού των κυττάρων, ώστε να υπολογιστεί ο όγκος που πρέπει να ληφθεί από τη φλάσκα για την διεξαγωγή του πειράματος και την προσθήκη των κυττάρων στα well του plate, χρησιμοποιείται η πλάκα Neubauer (αιματοκυτταρόμετρο). Πραγματοποιείται θρυψινοποίηση (όπως αναφέρθηκε 2.3.3) και ποσότητα 10 μl τοποθετούνται στο αιματοκυτταρόμετρο. Έπειτα από παρατήρηση, υπολογίζεται ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε τεταρτημόριο της πλάκας Neubauer και στη συνέχεια γίνεται αναγωγή στο 1ml. Ακολούθως, μεταφέρεται ο τελικός όγκος που περιέχει τον επιθυμητό αριθμό των κυττάρων σε falcon το οποίο φυγοκεντρείται σε 1000rpm για 5 λεπτά στους 25°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα (κύτταρα) επαναδιαλυτοποιείται σε θρεπτικό μέσο DMEM που περιέχει 10% FBS, phenol red, 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τέλος, μετά την ισοκατανομή των κυττάρων εντός των πηγαδιών, πραγματοποιείται μικροσκοπικός έλεγχος και μεταφορά τους στο κλίβανο για επώαση

2.3.4 ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μετά το στρώσιμο των κυττάρων και την προσθήκη των ουσιών που ελέγχεται η δράση τους, ακολουθεί η συλλογή των κυττάρων από κάθε well που αντιπροσωπεύει την κάθε συνθήκη και στη συνέχεια η λύση των κυττάρων αυτών. Για τη συλλογή των κυττάρων από κάθε well αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από κάθε well και πραγματοποιείται έκπλυση με 500μl PBS 1X. Με τη χρήση ειδικού scraper επιτυγχάνεται η αποκόλληση των κυττάρων και το εναιώρημα προστίθεται σε erpendorf. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται 2 φορές. Έπειτα, λαμβάνει χώρα φυγοκέντρηση για 8 min στις 1500rpm στους 4 °C, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C. Στη συνέχεια, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis Buffer) και αφήνεται για 25-30 min στον πάγο (4°C). Ο όγκος του Lysis Buffer εξαρτάται από την ποσότητα του ιζήματος. Ακολούθως, χρησιμοποιείται η συσκευή υπερήχων (sonicator) για να επιτευχθεί η λύση των κυττάρων και η κατάτμηση του DNA. Στο sonicator εφαρμόζονται 5 κύκλοι σε κάθε δείγμα του 1 sec με 35 sec μεσοδιάστημα, με την ένταση ρυθμισμένη στο 40%.

2.3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD

Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιείται η μέθοδος Bradford. Η μέθοδος αυτή είναι χρωματική και είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε δείγματα των οποίων η συγκέντρωση είναι μεταξύ 20-500μg/ml (Sapan & Lundblad, 2015). Η αρχή της μεθόδου Bradford βασίζεται στη μεταβολή του μήκους κύματος στο οποίο απορροφά η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 από τα 465nm στα 595nm όταν αυτή συνδέεται σε πρωτεΐνες. Ανάλογα με την τιμή της απορρόφησης που παρατηρείται στο δείγμα άγνωστης συγκέντρωσης, υπολογίζεται η συγκέντρωση με τη χρήση της εξίσωσης της ευθείας $y = ax + \beta$. Η πρότυπη καμπύλη στη συγκεκριμένη περίπτωση δημιουργήθηκε με τη χρήση μίας σειράς πρότυπων διαλυμάτων αλβουμίνης βόειου ορού (BSA).

Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης κάθε δείγματος, χρησιμοποιείται 1μl του κυτταρικού εκχυλίσματος που προέκυψε από την λύση των κυττάρων σε erpendorf και έπειτα το 1ml του διαλύματος Bradford 1X, δηλαδή σε τελική αναλογία 1/1.000. Στη συνέχεια, τα δείγματα αφήνονται σε σκοτεινό μέρος για 30min και μετά το πέρας αυτών, πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 595nm.

2.3.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των επιθυμητών πρωτεϊνών στο κυτταρικό εκχύλισμα, χρησιμοποιήθηκε η ανασοαποτύπωση κατά Western (Western Blot). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην διαφορική κίνηση των πρωτεϊνών κατά μήκος ενός ηλεκτρικού πεδίου, με τη σχετική τους ταχύτητα

να εξαρτάται από το μοριακό τους βάρος. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων όπως το SDS. Το SDS, είναι απορρυπαντικό, το οποίο μετουσιώνει τις πρωτεΐνες, και προσδένεται σε περιοχές αυτών, καταργώντας τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, έχει αρνητικό φορτίο και τους προσδίδει ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα. Έτσι, οι πρωτεΐνες καθώς ηλεκτροφορούνται στην πηκτή διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Οι μικρότερες πρωτεΐνες κινούνται ταχύτερα, φτάνοντας πιο γρήγορα σε χαμηλότερα επίπεδα της πηκτής, ενώ οι μεγαλύτερες, συναντούν αντίσταση στους πόρους που δημιουργεί το πολυμερές, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η τριβή και να ελαττώνεται η ταχύτητα κίνησής τους. (Yang et al., 2012)

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο επιμέρους επίπεδα, την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (separating gel). Η συγκέντρωση της πηκτής διαχωρισμού εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών προς ταυτοποίηση, ενώ η πυκνότητα της πηκτής επιστοίβαξης είναι σταθερή κάθε φορά. Τα συστατικά από τα οποία αποτελείται η πηκτή είναι τα εξής: ddH₂O, Tris-HCl 1.5M pH 8.8, Tris-HCl 0.125M pH=6.8, SDS 10%, Bis- Acrylamide 40%, APS 10% και TEMED.

Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση, αποτελούνται από το κυτταρικό εκχύλισμα, sample buffer και Tris pH 7.5 20 mM. Βασικό συστατικό του sample buffer είναι η β-μερκαπτοαιθανόλη, η οποία λειτουργεί ως αναγωγικός παράγοντας, διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς και καταργεί την τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνών. Η επιθυμητή ποσότητα πρωτεϊνών που θα φορτωθούν στην πηκτή για ηλεκτροφόρηση είναι 50mg. Έτσι, ο όγκος του κυτταρικού εκχυλίσματος που λαμβάνεται, εξαρτάται από την πρωτεϊνική συγκέντρωση που υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Το sample buffer καταλαμβάνει το 1/4 του όγκου του δείγματος, ενώ ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με Tris-HCl pH 7.5 20 mM. Πριν το φόρτωμα στις υποδοχές της πηκτής (wells), τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά, και ακολουθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών, καθώς εφαρμόζεται σταθερή διαφορά δυναμικού μέσω της συσκευής ηλεκτροφόρησης 80V.

2.4.7 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος που απαιτείται για τον επιτυχή διαχωρισμό των πρωτεϊνών, στη συνέχεια ακολουθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0,2 μM και 0,4 μM. Η διαδικασία αυτή ξεκινά, με την προσθήκη του πηκτώματος σε κρύο (4°C) διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer), προκειμένου να γίνει εξισορρόπηση για περίπου 10min. Παράλληλα, σε κρύο (4°C) transfer buffer, τοποθετούνται απορροφητικά χαρτιά Watman και 2 απορροφητικά σφουγγάρια ίδιου μεγέθους, ενώ σε transfer buffer τοποθετείται και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Έπειτα, σε μία ειδική κασετίνα η οποία κλείνει με τέτοιο τρόπο ώστε να

ασκεί ομοιόμορφα πίεση σε όλη την επιφάνεια του περιεχομένου της, τοποθετούνται κατά σειρά: 1 σφουγγάρι, 3 χαρτιά Watman, το gel, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ακόμη 3 χαρτιά Watman και στο τέλος το άλλο σφουγγάρι. Σε αυτό το σημείο δίνεται ιδιαίτερη προσοχή, ώστε η μεμβράνη να εφάπτεται καλά στο gel, και να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα ανάμεσα, ώστε να πραγματοποιηθεί επιτυχώς η μεταφορά των πρωτεϊνών. Μετά το κλείσιμο της κασετίνας, αυτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτρομεταφοράς και ο χώρος σε αυτή καλύπτεται με transfer buffer. Ακόμη, μέσα στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, τοποθετείται μία παγοκύστη ώστε να μην ανεβαίνει η θερμοκρασία λόγω της ηλεκτρομαγνητικής τάσης και επηρεαστεί η μεταφορά των πρωτεϊνών. Η ηλεκτρομαγνητική τάση που εφαρμόζεται για την μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης είναι 0.35 A, για χρονικό διάστημα 70min.

Μετά το πέρας των 70min, η μεμβράνη αφαιρείται και πραγματοποιείται έκπλυση της με ρυθμιστικό διάλυμα TBST 1X. Ταυτόχρονα, σημειώνονται με μολύβι οι θέσεις του μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών. Στη συνέχεια προετοιμάζεται διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος 10% w/v για το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης (blocking), το οποίο πραγματοποιείται υπό ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Εν συνεχεία, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες, με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι του επιθυμητού μορίου για 12-16 ώρες στους 4 °C υπό ανάδευση. Την επόμενη ημέρα, μετά την απομάκρυνση του πρωτογενούς αντισώματος, πραγματοποιούνται 5 πλύσεις των 5 λεπτών η κάθε μία με διάλυμα TBST 1X προκειμένου να απομακρυνθούν ποσότητες αντισώματος που δεν έχουν προσδεθεί σε ειδική θέση. Έπειτα, η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα, έναντι του πρωτογενούς, υπό ανάδευση για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος πραγματοποιούνται ξανά 3 πλύσεις των 5 λεπτών η κάθε μία με διάλυμα TBST 1X. Ακολουθεί η προσθήκη των ECL A και B σε αναλογία 1:1. Το ECL αποτελεί το υπόστρωμα του ενζύμου υπεροξειδάση του χρένου (horseradish peroxidase, HRP), το οποίο είναι συνδεδεμένο στο δευτερογενές αντίσωμα. Μέσω της οξειδωσης του υποστρώματος από το ένζυμο, παράγεται ως παραπροϊόν της αντίδρασης φως και έτσι μέσω φωταύγειας αποτυπώνεται το σήμα σε φιλμ. Γι' αυτό, ακολούθως η μεμβράνη τοποθετείται στην ειδική κασετίνα και εκτίθεται σε φιλμ στο σκοτεινό θάλαμο. Η ανάπτυξη και η μονιμοποίηση του σήματος πάνω στο φιλμ πραγματοποιείται μέσω εμβάπτισης του φιλμ σε δοχεία που περιέχουν τα διαλύματα developer και fixer αντίστοιχα.

2.4.8 ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑ

Η ανοσοκυτταροχημεία είναι μία διαδικασία που χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης στα κύτταρα με τη χρήση ενός ειδικού αντισώματος που προσδένεται σε

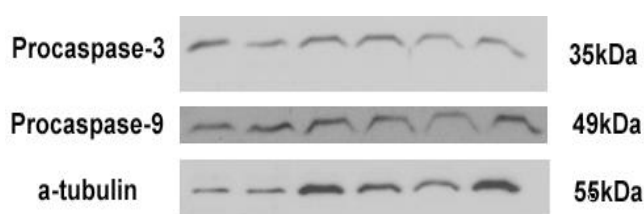
αυτή. Η οπτικοποίηση πραγματοποιείται, με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος που αναγνωρίζει και συνδέεται στο πρώτο, καθώς το δεύτερο φέρει ένα συνδεδεμένο φθοροφόρο το οποίο εκπέμπει σήμα που ανιχνεύεται σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Στην προκειμένη περίπτωση, στόχος ήταν να εξακριβωθεί αν η προσθήκη του μαστιχέλαιου στα κύτταρα HeLa, ενεργοποιούσε τον GR, και οδηγούσε στην μετατόπιση του στον πυρήνα. Η πειραματική διαδικασία ξεκινά με την τοποθέτηση καλυπτρίδων (coverslips) σε 24-well plate, ενώ ακολούθησαν 2 πλύσεις με 70% EtOH, και έκθεση του plate σε ακτινοβολία UV με σκοπό την αποστείρωσή του. Την **ημέρα 0** πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση και επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων σε DMEM-cis (απουσία στεροειδών ορμονών). Τα κύτταρα στρώθηκαν σε 8 από τα 24 wells του plate, όσες δηλαδή και οι υπό εξέταση συνθήκες (4) και 2 επαναλήψεις για το θετικό και αρνητικό control. Στρώθηκαν 10.000 κύτταρα/well. Την **ημέρα 2** πραγματοποιήθηκε προσθήκη ουσιών. Οι συγκεντρώσεις του μαστιχέλαιου που εξετάστηκαν ήταν οι εξής: 1/7500, 1/10000, 1/20000 και 1/50000 (το stock θεωρείται 100%). Το αρνητικό control περιείχε μόνο θρεπτικό και EtOH καθώς σε αυτή είναι διαλυμένη η δεξαμεθαζόνη (Dex), που χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1μM ως θετικό control. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 h με το μαστιχέλαιο, ενώ στη συνέχεια ακολούθησε αφαίρεση των ουσιών, έπειτα 2 πλύσεις με PBST 1X και τέλος μονιμοποίηση των κυττάρων στις καλυπτρίδες με μεθανόλη και ακετόνη. Εν συνεχεία, προστέθηκε το πρωτογενές αντίσωμα έναντι του GR (sc-393232, Santa Cruz) σε αραιώση 1/50, διαλυμένο σε TBST 1X για 1 h σε σκοτεινό μέρος. Μετά το πέρας της, πραγματοποιήθηκε επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα red-mouse anti-donkey (Lab Supplies) αραιωμένο 1/500, διαλυμένο σε PBST 1X και με τη χρωστική Hoechst 33342 (10mg/ml) για τη χρώση του πυρήνα, σε αραιώση 1/1000, διαλυμένη PBST 1X. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες χρησιμοποιώντας κόλλα PVA για την ακινητοποίησή τους. Οι πλάκες αποθηκεύονται στους 4°C. Τέλος, παρατηρούνται στο μικροσκόπιο φθορισμού (DM 2000, LEICA) και με τη χρήση της κάμερας που διαθέτει (Qimaging optiMOS) λαμβάνονται οι εικόνες.

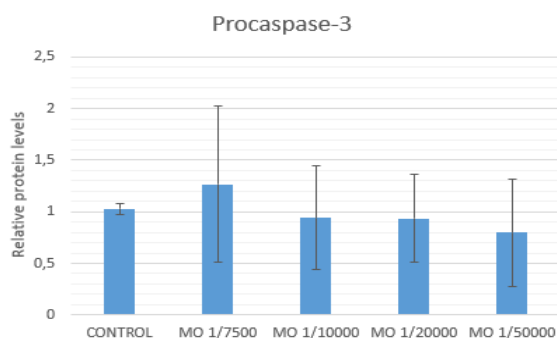
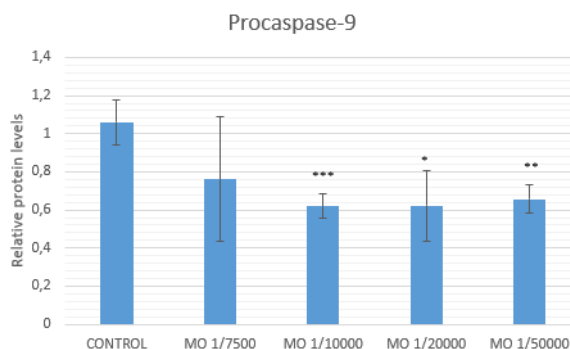
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αξιολόγηση της επίδρασης του αιθέριου ελαίου μαστίχας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα αποπτωτικών πρωτεϊνών

Με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης που έχει η επώαση των κυττάρων HeLa με το αιθέριο έλαιο μαστίχας Χίου, στα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της απόπτωσης, αρχικά αναπτύχθηκαν κύτταρα HeLa σε 6-well plate για 24h (200.000cells/well) και ακολούθως πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων με το μαστιχέλαιο για χρονικό διάστημα 48h. Οι διαφορετικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι αραιώσεις 1/7500, 1/10000, 1/20000 και 1/50000 σε θρεπτικό μέσο, δεδομένου ότι το καθαρό έλαιο που παραλήφθηκε από την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου θεωρείται 100%. Οι συγκεντρώσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν καθώς βρίσκονται εντός του εύρους που δεν είναι κυτταροτοξικό το έλαιο, όπως αυτό είχε προσδιοριστεί από μελέτες άλλων μελών του εργαστηρίου. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων και το κυτταρικό εκχύλισμα μελετήθηκε ως προς τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9 και της προκασπάσης-3 μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Η προκασπάση-9 είναι η εναρκτήρια κασπάση που ενεργοποιείται στα πρώτα στάδια του μιτοχονδιακού μονοπατιού της απόπτωσης μέσω της δημιουργίας του αποπτωσώματος, ενώ η προκασπάση-3 είναι μία από τις εκτελεστικές κασπάσες που ενεργοποιούνται μέσω πρωτεόλυσης καθοδικά του μονοπατιού. Ως μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η α-τουμπουλίνη. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης:



Control 1	+	-	-	-	-
Control 2	-	+	-	-	-
MO 1/7500	-	-	+	-	-
MO 1/10000	-	-	-	+	-
MO 1/20000	-	-	-	-	+
MO 1/50000	-	-	-	-	+



ΕΙΚΟΝΑ 1. Δοσοεξαρτώμενη επίδραση μαστιχέλαιου σε ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών σε κύτταρα HeLa.

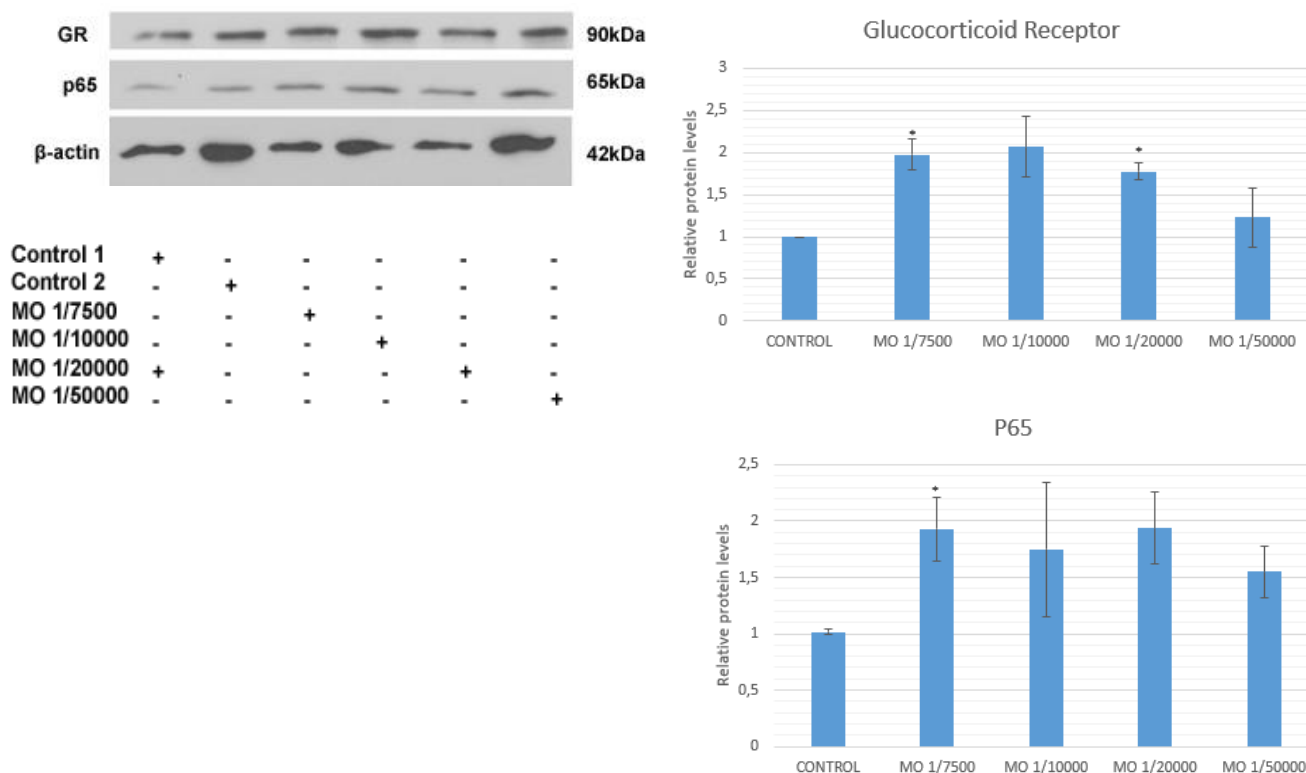
Κύτταρα HeLa στρώθηκαν σε 6-well plate (200.000cells/well) και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS, παρουσία phenol red, 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη για 24h. Ακολούθως, αφαιρέθηκε το θρεπτικό, και τα κύτταρα επώαστηκαν με το υπό μελέτη έλαιο για 48h στις αραιώσεις που αναφέρθηκαν ανωτέρω. Αριστερά φαίνεται το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τα δύο μόρια, ενώ δεξιά, στα διαγράμματα φαίνεται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων διερεύνησης της μεταβολής των επιπέδων των δύο υπό μελέτη πρωτεϊνών παρουσία ελαίου στην αντίστοιχη αραιώση, σε σχέση με τις συνθήκες αναφοράς, απουσία ελαίου (control, κύτταρα μάρτυρες). Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο όρο (MO) \pm SD, $n \geq 3$ τεχνικές επαναλήψεις. Relative protein levels: Σχετική μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων.

Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9, όπως φαίνεται και παραπάνω η επώαση των κυττάρων με το έλαιο, έχει ως αποτέλεσμα την τάση μείωσης των επιπέδων της σε όλες τις αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, και ειδικότερα στην αραιώση 1/10000. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να καταδεικνύει πως έχει ξεκινήσει η διαδικασία της απόπτωσης. Ωστόσο, δεν παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα της πρωτεολυμένης προκασπάσης-9 (ενεργοποιημένη), πιθανόν λόγω περιορισμένης ευαισθησίας του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε, σε συνδυασμό με τα χαμηλά επίπεδα ενεργής κασπάσης. Ομοίως τα επίπεδα της προκασπάσης-3, παρουσιάζουν σχετική μείωση στις συγκεντρώσεις 1/10000, 1/20000 και 1/50000. Στην περίπτωση που το έλαιο επάγει πράγματι την απόπτωση στα κύτταρα HeLa, ο μικρός βαθμός μείωσης στα επίπεδα της προκασπάσης-3 μπορεί να εξηγηθεί λόγω του γεγονότος πως η πρωτεόλυση της πραγματοποιείται σε μετέπειτα στάδιο της απόπτωσης, δηλαδή βρίσκεται καθοδικά στον καταρράκτη ενεργοποίησης. Επομένως, τη χρονική στιγμή που συλλέχθηκαν τα κύτταρα, πιθανώς να μην είχε εξελιχθεί σε αυτό το στάδιο η αποπτωτική διαδικασία.

3.2 Αξιολόγηση της επίδρασης του αιθέριου ελαίου μαστίχας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών GR και της υπομονάδας p65 του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB

Με σκοπό την αξιολόγηση των αντιφλεγμονωδών δράσεων του μαστιχέλαιου διερευνήθηκε η επίδρασή του στα επίπεδα του GR και της p65. Κύτταρα HeLa στρώθηκαν σε 6-well plate και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο για 24h. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με το εν λόγω έλαιο για 48h και προσδιορίστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των δύο μορίων, μέσω ανοσοαποτύπωσης

κατά Western με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Ως μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα:



ΕΙΚΟΝΑ 2. Δοσοεξαρτώμενη επίδραση μαστιχέλαιου στα επίπεδα GR και p65 σε κύτταρα HeLa. Κύτταρα HeLa στρώθηκαν σε 6-well plate (200.000cells/well) και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS, παρουσία phenol red, 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη για 24h. Ακολούθως, αφαιρέθηκε το θρεπτικό, και τα κύτταρα επωάστηκαν με το υπό μελέτη έλαιο για 48h στις αραιώσεις που αναφέρθηκαν ανωτέρω. Αριστερά φαίνεται το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τα δύο μόρια, ενώ δεξιά, στα διαγράμματα φαίνεται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της διερεύνησης της μεταβολής των επιπέδων των δύο υπό μελέτη πρωτεϊνών στην αντίστοιχη αραιώση, σε σχέση με τις συνθήκες αναφοράς, απουσία ελαίου (Control, κύτταρα μάρτυρες. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο όρο (MO) ± SD, n≥2 τεχνικές επαναλήψεις. Relative protein levels: Σχετική μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων.

Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, φαίνεται πως υπάρχει μία τάση αύξησης παρουσία του μαστιχέλαιου σε όλες τις συγκεντρώσεις συγκριτικά με το Control, ενώ η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται στις συνθήκες 1/7500 και 1/20000.

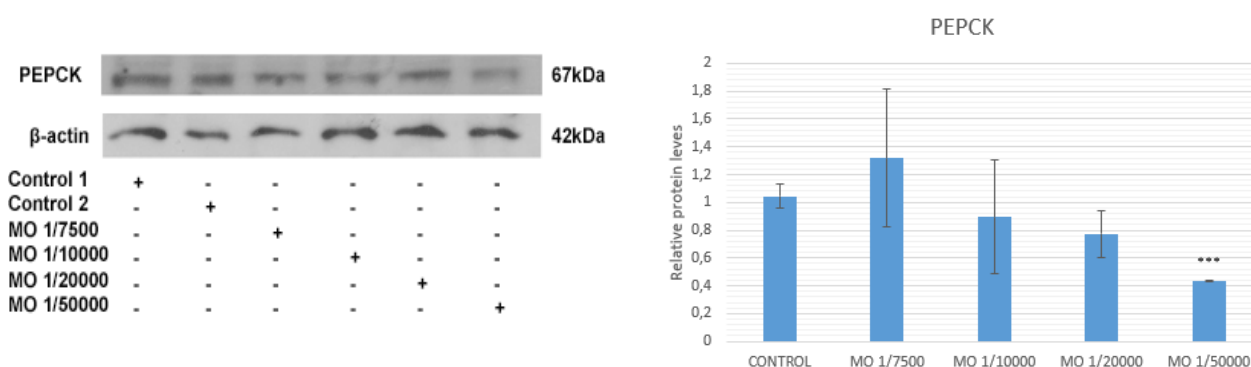
Η p65 είναι η μία υπομονάδα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Ειδικότερα, στα θηλαστικά η οικογένεια NF-κB/Rel αποτελείται από 5 μέλη, τις πρωτεΐνες p50, p52, p65 (Rel-A), c-Rel, και Rel-B, όπου σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή. Ο NF-κB απουσία ερεθίσματος, βρίσκεται απενεργοποιημένος στο κυτταρόπλασμα σε σύμπλοκο με τις ανασταλτικές πρωτεΐνες IκB, οι οποίες καλύπτουν τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού NLSs (Nuclear Localization Signals), αποτρέποντας έτσι τη μετακίνησή του στον πυρήνα. Η ενεργοποίησή του NF-κB επάγεται από πολλά διαφορετικά ερεθίσματα, όπως προφλεγμονώδη μόρια όπως ο TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α), και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), που απελευθερώνονται ταχύτατα σε περίπτωση τραυματισμού ή μόλυνσης του ιστού καθώς και από μοτίβα αναγνώρισης παθογόνων. Η ενεργοποίησή του εξαρτάται από την φωσφορυλίωση και την επακόλουθη ουβικουϊτίνωση των πρωτεϊνών IκB, όπου στη συνέχεια αποικοδομούνται, τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού του NF-κB αποκαλύπτονται και έτσι επάγεται η μετακίνηση του στον πυρήνα όπου ρυθμίζει την έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων (Lawrence, T., 2009). Τα γονίδια στόχοι των οποίων η μεταγραφή ρυθμίζεται θετικά από τον NF-κB, στις περισσότερες περιπτώσεις, κωδικοποιούν για μόρια που εμπλέκονται στη επαγωγή της έναρξης της φλεγμονής, όπως προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και χημειοκίνες και μόρια που προωθούν την κυτταρική επιβίωση ενώ αντιθέτως, στην πλειονότητα των περιπτώσεων καταστέλλει την έκφραση γονιδίων προαποπτωτικών πρωτεϊνών (Mitchell, S., Vargas, J., & Hoffmann, A., 2016). Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις έχει φανεί πως ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και το ερέθισμα, ο NF-κB, μπορεί να επάγει την έκφραση προαποπτωτικών πρωτεϊνών, οδηγώντας τελικά στην απόπτωση του κυττάρου (Radhakrishnan, S. K., & Kamalakaran, S., 2006). Ο GR καταστέλλει την επαγωγή της φλεγμονής μέσω του NF-κB, μέσω της καταστολής της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για προφλεγμονώδη μόρια. Συγκεκριμένα, η καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων αυτών, επιτυγχάνεται είτε μέσω πρόσδεσης του GR στην υπομονάδα p65 αποτρέποντας την πρόσδεση του NF-κB στα στοιχεία πρόσδεσής του, είτε αλληλοεπιδρώντας με τον NF-κB, ενώ αυτός είναι προσδεμένος στο DNA, αναστέλλοντας την στρατολόγηση της μεταγραφικής μηχανής (Revollo, J. & Cidlowski, 2009).

Όσον αφορά την επίδραση του μαστιχέλαιου στα πρωτεϊνικά επίπεδα του p65, φαίνεται πως αυξάνονται σε όλες τις συγκεντρώσεις συγκριτικά με το control. Παρόλα ταύτα, τα αποτελέσματα αυτά μένει να επαληθευτούν σε επιπλέον βιολογικές επαναλήψεις, ώστε να εξαχθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές και κατά συνέπεια ασφαλή συμπεράσματα

3.3 Αξιολόγηση της επίδρασης του αιθέριου ελαίου μαστίχας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK και το λόγο AMPK/Phospho-AMPK

Επόμενο βήμα ήταν η μελέτη της επίδρασης του ελαίου μαστίχας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολ-πυροσταφυλικού (PEPCK) καθώς και στο λόγο της AMPK προς τη φωσφορυλιωμένη μορφή της. Η PEPCK, είναι γλυκονογενετικό ένζυμο το οποίο καταλύει την πρώτη αντίδραση στη γλυκονογενετική πορεία. Πιο συγκεκριμένα, καταλύει τη μετατροπή του οξαλοξικού σε φωσφοενολπυροσταφυλικό, το οποίο εισάγεται έτσι στο μονοπάτι της γλυκονογένεσης. Η δραστηριότητα της PEPCK, φαίνεται να ελέγχεται μόνο στο επίπεδο μεταγραφής, καθώς μέχρι τώρα δεν υπάρχουν γνωστές αλλοστερικές τροποποιήσεις που να επηρεάζουν τη δράση της (Yabaluri, N., & Bashyam, M. D., 2010). Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη PEPCK, αποτελεί ένα από τα γονίδια-στόχους του GR, καθώς στις ρυθμιστικές του περιοχές περιλαμβάνονται στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή. Επομένως, ο GR μέσω της δράσης του, προωθεί τη γλυκονογένεση μέσω επαγωγής της μεταγραφής του γονιδίου της PEPCK. Για το λόγο αυτό, μία από τις παρενέργειες της χρόνιας χορήγησης γλυκοκορτικοειδών είναι η επαγωγή σακχαρώδους διαβήτη τύπου II -λόγω της υπερέκφρασης του γονιδίου της PEPCK- που οδηγεί στα αυξημένα επίπεδα σακχάρου στο αίμα.

Με σκοπό λοιπόν την διερεύνηση της επίδρασης του ελαίου μαστίχας Χίου όσον αφορά τις γλυκονογενετικές δράσεις του GR, προσδιορίστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK. Ομοίως και σε αυτή την περίπτωση στρώθηκαν κύτταρα HeLa σε 6-well plate και αναπτύχθηκαν για 24h σε θρεπτικό μέσο. Ακολούθησε η επώαση των κυττάρων για 48h με μαστιχέλαιο στις συγκεντρώσεις 1/7500, 1/10000, 1,20000 και 1/50000. Πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων και το κυτταρικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Ως μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα:



ΕΙΚΟΝΑ 3. Δοσοεξαρτώμενη επίδραση μαστιχέλαιου στα επίπεδα της PEPCK σε κύτταρα HeLa. Κύτταρα HeLa στρώθηκαν σε 6-well plate (200.000cells/well) και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS, παρουσία phenol red,

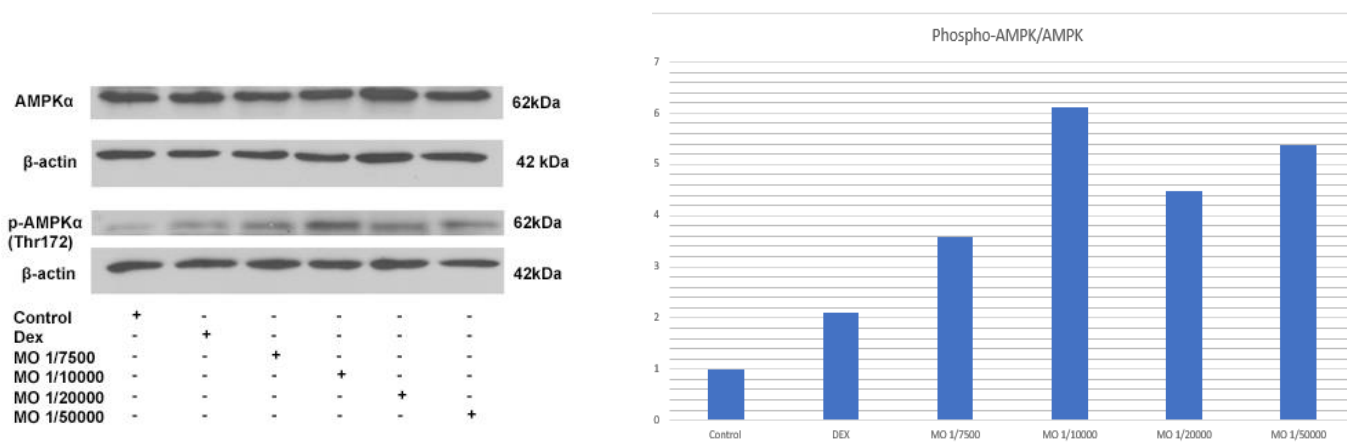
4.5mg/ml γλυκόζη, 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη για 24h. Ακολούθως, αφαιρέθηκε το θρεπτικό, και τα κύτταρα επωάστηκαν με το υπό μελέτη έλαιο για 48h στις αραιώσεις που αναφέρθηκαν ανωτέρω. Αριστερά φαίνεται το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, ενώ δεξιά, στο διάγραμμα φαίνεται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων διερεύνησης της μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK παρουσία ελαίου στην αντίστοιχη συγκέντρωση, σε σχέση με τις συνθήκες αναφοράς, απουσία ελαίου (Control, κύτταρα αναφοράς). Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο όρο (MO) \pm SD, n=2 τεχνικές επαναλήψεις. Relative protein levels: Σχετική μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK φαίνεται πως μειώνονται παρουσία του μαστιχέλαιου στις συγκεντρώσεις 1/10000 και 1/20000, ενώ μεγαλύτερη μείωση παρατηρείται στη συγκέντρωση 1/50000, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη πιθανού πειραματικού σφάλματος. Η μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK, ενδεχομένως να οφείλεται στο γεγονός ότι πιθανόν παρουσία του μαστιχέλαιου καταστέλλεται η σύνθεση της, πιθανώς ρυθμίζοντας αρνητικά σε μικρό όμως βαθμό τη μεταγραφική ενεργότητα του GR.

Η AMPK (AMP-activated protein kinase), είναι ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο, και διαθέτει κεντρικό ρόλο στην ομοιόσταση της ενέργειας του κυττάρου. Η AMPK είναι μία κινάση σερίνης/θρεονίνης και αποτελείται από μία καταλυτική α-υπομονάδα, μία ρυθμιστική γ-υπομονάδα και μία β-υπομονάδα με δομικό ρόλο. Ενεργοποιείται σε συνθήκες έλλειψης ενέργειας ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα, όπως η ανεπάρκεια θρεπτικών, η υποξία και η έκθεση σε τοξίνες που αναστέλλουν την μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα (Kim, J et al., 2016). Η ενεργοποίησή της πραγματοποιείται μέσω αλλοστερικής ρύθμισης και μετα-μεταφραστικής τροποποίησης, οι οποίες δρουν σε συνεργασία. Πιο συγκεκριμένα, η AMPK ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από κινάσες που βρίσκονται ανοδικά του μονοπατιού όπως η LKB1 (Liver kinase B1) και η CaMKKβ (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase β). Η φωσφορυλίωση από τις κινάσες αυτές πραγματοποιείται στο κατάλοιπο T172 στην α-υπομονάδα, ενώ ταυτόχρονα η αύξηση του AMP ή του ADP έχει ως αποτέλεσμα την πρόσδεσή τους στην γ-υπομονάδα της AMPK, αναστέλλοντας την αποφωσφορυλίωσή της από φωσφατάσες, συμβάλλοντας έτσι στο να παραμένει ενεργοποιημένη. Αντίθετα, όταν το ATP είναι αυξημένο ανταγωνίζεται την πρόσδεση στη γ-υπομονάδα, και η πρόσδεσή του επιτρέπει σε φωσφατάσες να έχουν πρόσβαση στην T172 ώστε να την αποφωσφορυλιώσουν, συμβάλλοντας έτσι στην απενεργοποίησή της [(Jeon, S.-M.,2016); (Yan, Y., Zhou, X., Xu, H., & Melcher, K., 2018)]. Η ενεργοποιημένη (φωσφορυλιωμένη) AMPK, λειτουργεί έχοντας ως κύριο άξονα δράσης την καταστολή αναβολικών διεργασιών που απαιτούν την κατανάλωση ενέργειας, όπως η σύνθεση λιπαρών οξέων, χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, η σύνθεση γλυκογόνου, η γλυκονεογένεση και η πρωτεϊνοσύνθεση. Έτσι, τα υποστρώματα της είναι ένζυμα που συμμετέχουν στις διαδικασίες αυτές, είτε ρυθμιστικά μόρια είτε μεταγραφικοί παράγοντες (Jeon, S.-M.,2016). Αντίθετα, προωθεί επίσης διεργασίες που συμβάλλουν στην παραγωγή ενέργειας

όπως την πρόσληψη της γλυκόζης από τους σκελετικούς μύες προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στη γλυκόλυση και την πρόσληψη των λιπαρών οξέων προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στη β-οξειδωση, ρυθμίζοντας θετικά ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή και μεταφορείς που ευθύνονται για την πρόσληψη των μακρομορίων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι έχει φανεί πως η AMPK συμβάλει ακόμη στη ρύθμιση των μεταβολικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών μέσω της επαγωγής της φωσφορυλίωσής του GR από την p38 MAPK, και κατ' επέκταση τροποποιώντας την μεταγραφή γονιδίων στόχων του με ιστοειδικό ή/και ειδικό για τον υποκινητή τρόπο (Nader N. et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα, φάνηκε πως η AMPK επάγει τη φωσφορυλίωση του hGR στη S211, έμμεσα, μέσω φωσφορυλίωσης και επακόλουθης ενεργοποίησης της p38 MAPK, μεταβάλλοντας έτσι την προσέλκυση ρυθμιστών της μεταγραφής στον δεσμευμένο στο DNA GR. Χαρακτηριστικό παράδειγμα το οποίο παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον είναι πως η συγχορήγηση δεξαμεθαζόνης (συνθετικό γλυκοκορτικοειδές) και AICAR (εκλεκτικός ενεργοποιητής της AMPK) σε αρουραίους, είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της PEPCK στο ήπαρ, δρώντας κατασταλτικά στην αναμενόμενη αύξηση που θα προκαλούσε η Dex μέσω του GR στην PEPCK (Nader N. et al., 2010).

Με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης του μαστιχέλαιου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της AMPK και της phospho-AMPK, και κατ' επέκταση στο λόγο της ενεργοποιημένης προς την απενεργοποιημένη AMPK σε κύτταρα HeLa, τα κύτταρα στρώθηκαν σε 6-well plate, και αναπτύχθηκαν για 24h σε θρεπτικό μέσο DMEM απουσία στεροειδών ορμονών. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε η επώαση τους με το μαστιχέλαιο αλλά και τη Dex ως θετικό control για 90min. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν, πραγματοποιήθηκε λύση και το ολικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων της AMPK και της φωσφορυλιωμένης μορφής της μέσω της ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τη χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων. Ως μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα:



ΕΙΚΟΝΑ 4. Δοσοεξαρτώμενη επίδραση μαστιχέλαιου στην ενεργοποίηση της AMPK σε κύτταρα HeLa.

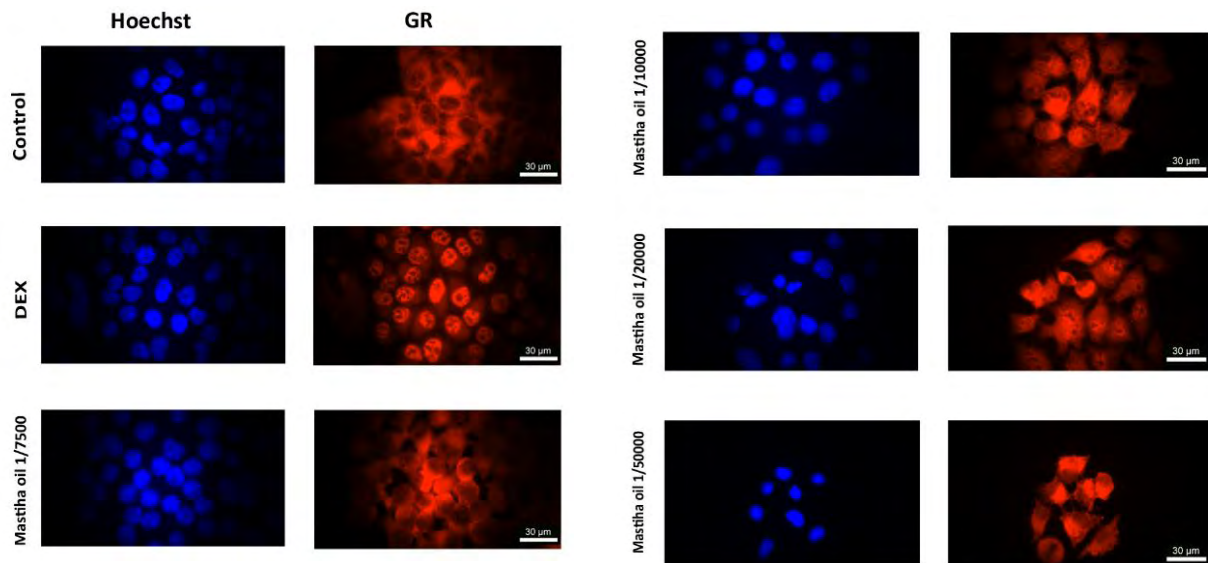
Κύτταρα HeLa στρώθηκαν και αναπτύχθηκαν για 24h σε θρεπτικό μέσο DMEM without phenol red, εμπλουτισμένο με 10% FBS Cis (επεξεργασμένο κατάλληλα FBS, ώστε να απομακρυνθούν οι στεροειδείς ορμόνες), 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάστηκαν για 90min με το μαστιχέλαιο στις συγκεντρώσεις 1/7500, 1/10000, 1/20000, 1/50000. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε η δεξαμεθαζόνη (Dex). Αριστερά φαίνεται το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, ενώ δεξιά στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μεταβολή του λόγου phospho-AMPKα/AMPKα στις διάφορες συγκεντρώσεις του μαστιχέλαιου σε σύγκριση με το θετικό control (Dex) και τη συνθήκη αναφοράς (Control). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της AMPK και της φωσφορυλιωμένης μορφής της είναι κανονικοποιημένα ως προς την β-ακτίνη.

Όσον αφορά τη μελέτη της επίδρασης του μαστιχέλαιου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της AMPK, παρατηρούμε ότι δεν μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά, σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής της AMPK, αυξήθηκαν σε σχέση με το Control, παρουσία μαστιχέλαιου. Για το λόγο αυτό και ο λόγος phospho-AMPKα/AMPKα, παρουσιάζει αύξηση σε όλες συνθήκες όπου έχει χρησιμοποιηθεί το μαστιχέλαιο. Το γεγονός αυτό, καταδεικνύει πως πιθανόν το μαστιχέλαιο προκαλεί την ενεργοποίηση της AMPKα μέσω της φωσφορυλίωσής της. Με βάση τα ανωτέρω, συμπεραίνουμε ότι η μείωση των επιπέδων της PEPCK παρουσία του μαστιχέλαιου, ενδεχομένως να οφείλεται στην ενεργοποίηση της AMPKα, γεγονός που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

3.4 Αξιολόγηση της επίδρασης του αιθέριου ελαίου μαστίχας Χίου στην πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR)

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα συστατικά που περιέχονται στο μαστιχέλαιο μπορούν να επάγουν την μετατόπιση του GR από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, πραγματοποιήθηκε ανοσοκυτταροχημικός εντοπισμός GR σε κύτταρα HeLa, παρουσία ή απουσία διαφόρων συγκεντρώσεων μαστιχέλαιου. Αρχικά, τα κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν πάνω σε καλυπτρίδες σε 24-well plate σε θρεπτικό μέσο απουσία στεροειδών ορμονών για 48h, ενώ στη συνέχεια επωάστηκαν με το έλαιο μαστίχας και την δεξαμεθαζόνη για 2h, καθώς τόσο είναι το χρονικό διάστημα μέσα στο οποίο η Dex επάγει τη μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Κατόπιν, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν στις καλυπτρίδες, προστέθηκαν τα κατάλληλα αντισώματα και η μπλε χρωστική Hoechst για την απεικόνιση του πυρήνα των κυττάρων. Τέλος οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε

αντικειμενοφόρους πλάκες και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού. Στην παρακάτω εικόνα παρατίθενται τα αποτελέσματα:



ΕΙΚΟΝΑ 5. Επίδραση μαστιχέλαιου στην υποκυτταρική κατανομή του

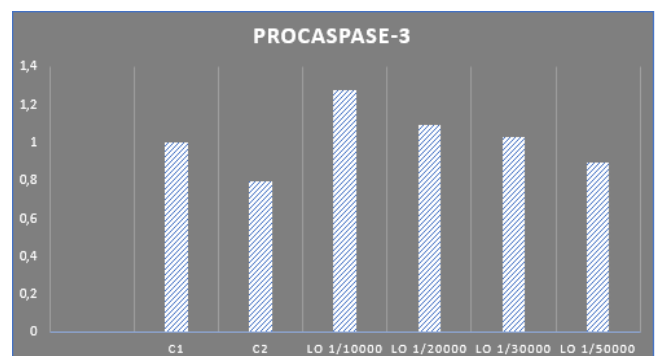
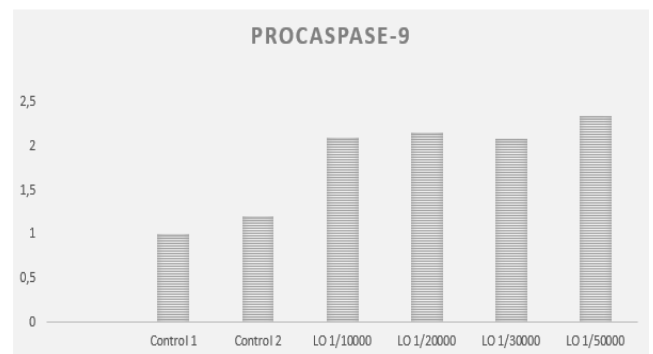
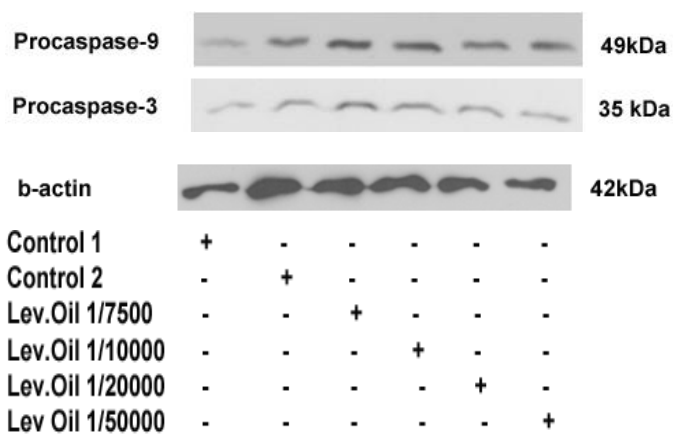
GR. Κύτταρα HeLa στρώθηκαν και αναπτύχθηκαν για 48h σε θρεπτικό μέσο DMEM without phenol red, εμπλουτισμένο με 10% Cis (επεξεργασμένο κατάλληλα FBS, ώστε να απομακρυνθούν οι στεροειδείς ορμόνες), 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάστηκαν για 2h με το μαστιχέλαιο στις συγκεντρώσεις 1/7500, 1/10000, 1/20000, 1/50000. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε η δεξαμεθαζόνη (Dex), ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές που προκαλεί μετατόπιση του GR στον πυρήνα σε μεγάλο βαθμό. Στις παραπάνω εικόνες, με μπλε αναπαρίσταται ο πυρήνας των κυττάρων, ενώ με σημασμένο κόκκινο αντίσωμα στοχεύεται ο GR.

Όπως ήταν αναμενόμενο η προσθήκη της Dex έχει ως αποτέλεσμα την εξ' ολοκλήρου μεταφορά του GR στον πυρήνα των κυττάρων, όπως και φαίνεται στην αντίστοιχη εικόνα, ενώ στο αρνητικό control φαίνεται πως ο GR βρίσκεται εξ' ολοκλήρου στο κυτταρόπλασμα. Όσον αφορά τις συνθήκες που έχουν χρησιμοποιηθεί για το μαστιχέλαιο, πέρα από την συγκέντρωση 1/20000, σε καμία άλλη δεν φαίνεται το μαστιχέλαιο να επάγει τη μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Στη συνθήκη 1/20000, παρατηρείται σε μικρό όμως βαθμό σε σχέση με τη Dex, πως προωθείται η πυρηνική μετατόπιση μερικών μορίων του GR. Το γεγονός αυτό επομένως, μπορεί να καταδεικνύει πως κάποια από τα συστατικά που περιέχονται στο μαστιχέλαιο, υπάρχει πιθανότητα να προσδένεται και να αλληλεπιδρά με τον GR και να επάγει την μετατόπισή του στον πυρήνα. Κατ' επέκταση ενδεχομένως και κάποιες από τις δράσεις τις οποίες επιφέρει το μαστιχέλαιο, να πραγματοποιούνται μέσω της δράσης του GR σε γονίδια-στόχους. Ωστόσο, για να εξαχθούν έγκυρα συμπεράσματα, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Αυτό που αξίζει να σημειωθεί ως

παρατήρηση, είναι πως στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για το μαστιχέλαιο, οι πυρήνες των κυττάρων φαίνεται να παρουσιάζουν κάποια συρρίκνωση. Αυτό, πιθανόν να μαρτυρά πως η επώαση των κυττάρων με το μαστιχέλαιο προωθεί την απόπτωση.

3.5 Αξιολόγηση της επίδρασης του αιθέριου ελαίου λεβάντας στα πρωτεϊνικά επίπεδα αποπτωτικών πρωτεϊνών

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της επώασης των κυττάρων HeLa με το αιθέριο έλαιο λεβάντας όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων που εμπλέκονται στην απόπτωση, πραγματοποιήθηκε επώαση με το εν λόγω έλαιο για 48h. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 1/10000, 1/20000, 1/30000 και 1/50000 σε θρεπτικό μέσο, δεδομένου ότι το έλαιο λεβάντας όπως αυτό παραλήφθηκε ήταν 100%. Οι συγκεντρώσεις αυτές βρίσκονται εντός του εύρους των μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων, όπως αυτό προσδιορίστηκε από άλλα μέλη του εργαστηρίου προηγουμένως. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων, ηλεκτροφόρηση του ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος σε αποδιατακτικές συνθήκες, μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης και τέλος ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της εναρκτήριας προκασπάσης-9 και της εκτελεστικής προκασπάσης-3 μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τα κατάλληλα αντισώματα. Ως μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Στην εικόνα κατωτέρω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν:



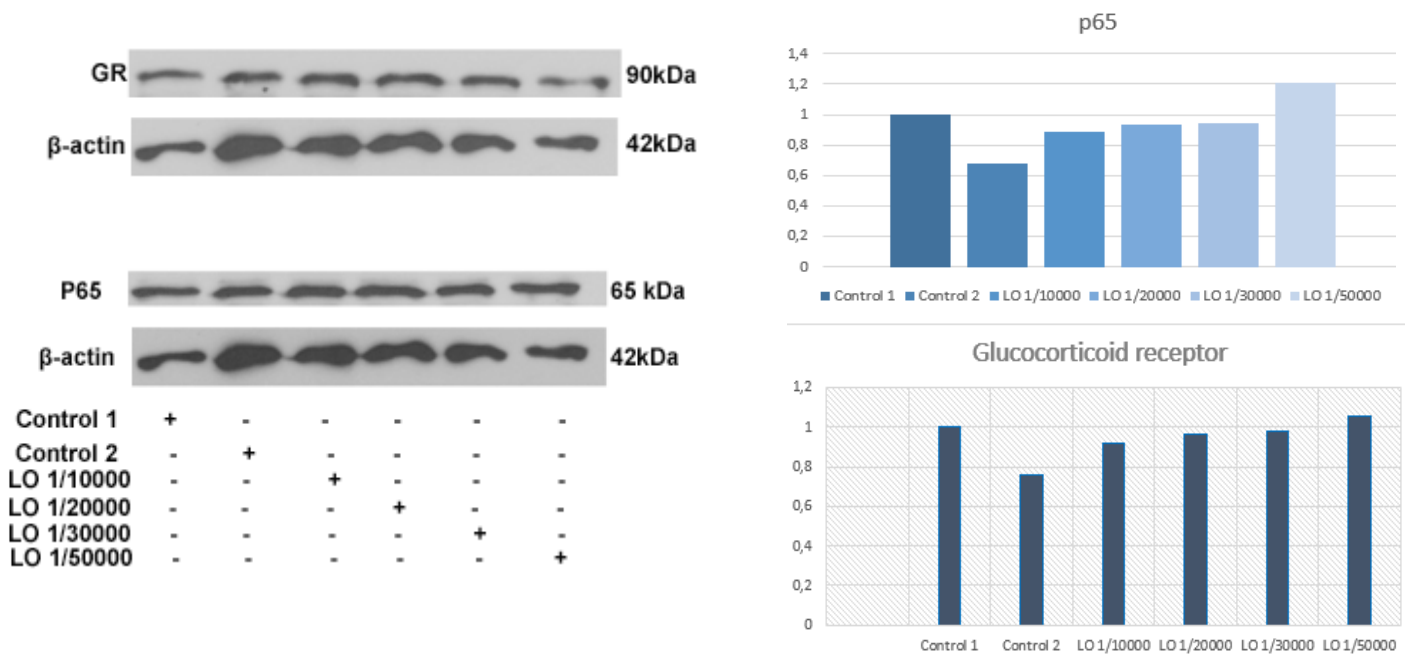
ΕΙΚΟΝΑ 6. Δοσοεξαρτώμενη επίδραση του αιθέριου ελαίου λεβάντας στην ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών σε κύτταρα HeLa. Αρχικά, κύτταρα HeLa στρώθηκαν και σε αυτή την περίπτωση σε 6-well plate (200.000cells/well) και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS, παρουσία phenol red, 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη για 24h. Ακολούθως, αφαιρέθηκε το θρεπτικό, και τα κύτταρα επώαστηκαν με το υπό μελέτη έλαιο για 48h στις αραιώσεις που αναφέρθηκαν ανωτέρω. Αριστερά φαίνεται το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τα δύο μόρια, ενώ δεξιά, στα διαγράμματα, φαίνεται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων διερεύνησης της μεταβολής των επιπέδων των δύο υπό μελέτη πρωτεϊνών παρουσία ελαίου στην αντίστοιχη αραιώση, σε σχέση με τις συνθήκες αναφοράς, απουσία ελαίου (Control, κύτταρα μάρτυρες).

Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω, τα επίπεδα της εναρκτήριας προκασπάσης-9 παρουσιάζουν μία μικρή αύξηση σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα των control, γεγονός που υποδηλώνει πως δεν ξεκινάει διαδικασία απόπτωσης και πιθανώς η αύξηση να οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα. Η προκασπάση-9 είναι η εναρκτήρια κασπάση που ενεργοποιείται μέσω πρωτεόλυσης -και μετατρέπεται στην ενεργή κασπάση 9- στο αποπτώσωμα και είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών καθοδικά. Επομένως, κάποια μείωση στα επίπεδα αυτής ενδεχομένως να υποδηλώνει πως έχει αρχίσει η αποπτωτική διαδικασία. Αντίστοιχα, και τα επίπεδα της εκτελεστικής προκασπάσης-3 δεν παρουσιάζουν κάποια μείωση σε καμία από τις συνθήκες που εξετάστηκαν, αντιθέτως παρουσιάζονται ελαφρώς αυξημένα συγκριτικά με αυτά των control. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν από μία και μόνο βιολογική επανάληψη, συνεπώς δεν είναι δυνατόν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Για να εξαχθεί κάποιο στέρεο συμπέρασμα, απαιτούνται τουλάχιστον 3 βιολογικές επαναλήψεις, και προσδιορισμός της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων.

3.6 Αξιολόγηση της επίδρασης του αιθέριου ελαίου λεβάντας στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) και της υπομονάδας p65 του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ

Η ίδια διαδικασία ανάπτυξης των κυττάρων και επώασης με τις ίδιες συγκεντρώσεις του αιθέριου ελαίου λεβάντας πραγματοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση. Ακολούθησε η λύση των κυττάρων, ηλεκτροφόρηση του κυτταρικού εκχυλίσματος σε αποδιατακτικές συνθήκες και μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων με σκοπό τον προσδιορισμό της επίδρασης του

ελαίου λεβάντας στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και του p65. Ως μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



ΕΙΚΟΝΑ 7. Κύτταρα HeLa στρώθηκαν σε 6-well plate (200.000cells/well) και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS, παρουσία phenol red, 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη για 24h. Στη συνέχεια, το θρεπτικό αφαιρέθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αραιώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω για 48h. Αριστερά, φαίνονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τα δύο μόρια, ενώ δεξιά στα διαγράμματα, παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων διερεύνησης της μεταβολής των επιπέδων των δύο υπό μελέτη μορίων παρουσία ελαίου στην αντίστοιχη συγκέντρωση, σε σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς, απουσία ελαίου (control, κύτταρα μάρτυρες).

Όπως γίνεται αντιληπτό από τα ανωτέρω διαγράμματα η επώαση των κυττάρων HeLa με το αιθέριο έλαιο λεβάντας δεν φαίνεται να προκαλεί σημαντικές μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και του p65 συγκριτικά με τα control. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά αφορούν μία μόνο βιολογική επανάληψη και χρήζουν επαλήθευσης. Προκειμένου να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα όσον αφορά την επίδραση του ελαίου λεβάντας στα πρωτεϊνικά επίπεδα αυτών των δύο μορίων, απαιτούνται τουλάχιστον 3 βιολογικές επαναλήψεις ώστε να αξιολογηθεί η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων αυτών. Επομένως, η αξιολόγηση της επίδρασης του, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) αποτελούν στεροειδείς ορμόνες που παράγονται από το φλοιό των επινεφριδίων ως απόκριση στον κιρκάδιο ρυθμό και διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα. Είναι λιπόφιλα μόρια, όπου διαπερνούν την μεμβράνη του κυττάρου, και προσδένονται στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), ενός υποδοχέα με δράση μεταγραφικού παράγοντα εξαρτώμενου από τον προσδέτη, επάγοντας τη μετατόπισή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα όπου επηρεάζει την έκφραση μεγάλου πλήθους γονιδίων (Oakley and Cidlowski, 2013). Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζουν μεγάλο αριθμό διεργασιών -απαραίτητων για τη διατήρηση της ομοιόστασης- όπως είναι η απόπτωση. Η απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, και αποτελεί μία πολύ σημαντική διεργασία που πραγματοποιείται είτε ως μέρος αναπτυξιακών διαδικασιών είτε για την αποφυγή δυσμενών καταστάσεων για τον οργανισμό. Η απόπτωση πραγματοποιείται ως απόκριση σε διαφορετικά ερεθίσματα, ενδογενούς ή εξωγενούς προέλευσης, όπως είναι η ιϊκή μόλυνση και η αδυναμία επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA, και βασικοί τελεστές της διαδικασίας αυτής είναι μία οικογένεια πρωτεασών, οι κασπάσες [Elmore S., 2007];(Mita M. M. ,2006)]. Οι δύο κύριες αποπτωτικές οδοί, είναι η εξωγενής, η οποία διαμεσολαβείται από υποδοχείς κυτταρικού θανάτου, και η ενδογενής ή μιτοχονδριακή όπου περιλαμβάνει τη δράση πολλών πρωτεϊνών που απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια (Mousavi S. H., 2008). Λόγω του πολύ σημαντικού ρόλου που διαδραματίζει η απόπτωση στην καταστολή της ανάπτυξης καρκίνου, αποτελεί μία διαδικασία-κλειδί, της οποίας ρύθμιση μελετάται προκειμένου να αντιμετωπιστούν πολλοί τύποι καρκίνου.

Τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης και εμφανίζουν τόσο προαποπτωτικές όσο και αντιαποπτωτικές δράσεις ανάλογα με τον ιστό ή ακόμη και τον κυτταρικό τύπο μεταβάλλοντας την έκφραση και κατ' επέκταση την ισορροπία μεταξύ προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών. Η επαγωγή της απόπτωσης από τα γλυκοκορτικοειδή περιλαμβάνει κυρίως την ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού μονοπατιού, καθώς επάγουν την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για προαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 [(Gruver-Yates and Cidlowski, 2013); (Herr et al., 2007)].

Εδώ και πολλά χρόνια συνθετικά γλυκοκορτικοειδή χορηγούνται λόγω του μεγάλου φάσματος δράσης τους, για την αντιμετώπιση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, όπως οι φλεγμονώδεις παθήσεις, τα αυτοάνοσα νοσήματα και διάφοροι τύποι αιματολογικών καρκίνων. Ωστόσο, η παρατεταμένη χρήση τους μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα πολύ σοβαρές παρενέργειες, όπως ο διαβήτης, η οστεοπόρωση, η μυϊκή ατροφία και η ευαισθησία σε λοιμώξεις [(Ramamoorthy et al., 2016); (Oakley et al., 2013)]. Για το λόγο αυτό, είναι σημαίνουσας σημασίας η ανάπτυξη

εκλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, με σκοπό τη διατήρηση των ευεργετικών ιδιοτήτων του και όσο το δυνατόν λιγότερες παρενέργειες.

Τα τελευταία χρόνια συνεχώς αυξάνεται το πλήθος των επιστημονικών αποδείξεων όσον αφορά τις θεραπευτικές ιδιότητες διάφορων αιθέριων ελαίων τα οποία παράγονται από φυτά. Τα έλαια αυτά, αποτελούν εξαιρετικά σύνθετα μείγματα ουσιών και στην πλειονότητά τους αποτελούνται κυρίως από τερπενοειδή. Το μεγάλο εύρος των βιολογικών τους δράσεων θεωρείται ότι οφείλεται στην πληθώρα των ουσιών που περιέχουν, οι οποίες μπορεί να δρουν μεμονωμένα είτε σε συνεργασία. Πιο συγκεκριμένα, το αιθέριο έλαιο που παράγεται από τη μαστίχα Χίου, αποτελείται κατά κύριο λόγο από αρωματικά μονοτερπένια και σесκιτερπένια. Όσον αφορά τις βιολογικές του δράσεις, έχει φανεί πως έχει δράση ενάντια σε διάφορα είδη παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων [(Dimas et al.,2012) [(Miyamoto et al., 2014);(S. Paraschos et al.,2012) (Magiatis et al.,1999)], έχει προστατευτικό ρόλο στο καρδιαγγειακό σύστημα (Vallianou et al., 2011), ενώ επίσης έχει φανεί πως εμφανίζει αντιπολλαπλασιαστικές και αντικαρκινικές δράσεις τόσο σε διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, όσο και σε *in vivo* μοντέλα (Spyridoroulou K. et al., 2017), (Loutrari et al., 2006) (Magkouta et al., 2009). Σχετικά με το αιθέριο έλαιο λεβάντας, υπάρχουν αναφορές πως διαθέτει επίσης αντιβακτηριακές (Mayaud et al., 2008) αλλά και αντικαρκινικές ιδιότητες (Zhao et al.,2016).

Με βάση τα ανωτέρω, στόχος της παρούσας έρευνας αποτελεί ο χαρακτηρισμός των προαποπτωτικών δράσεων των εν λόγω αιθέριων ελαίων καθώς επίσης και των αντιφλεγμονωδών και αντι-υπεργλυκαιμικών δράσεων τους. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε προσπάθεια διερεύνησης των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων επιτελούνται οι διαδικασίες αυτές, δίνοντας έμφαση σε πιθανή εμπλοκή των συστατικών τους στο μονοπάτι σηματοδότησης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

Για το σκοπό αυτό, αρχικά διερευνήθηκε η επίδραση του αιθέριου ελαίου μαστίχας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην απόπτωση, προκειμένου να χαρακτηριστούν οι αποπτωτικές δράσεις του. Το πείραμα διενεργήθηκε σε κύτταρα HeLa, και φάνηκε πως το μαστιχέλαιο επάγει τη μείωση των επιπέδων της ανενεργής προκασπάσης-9 σε όλες τις αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, και ειδικότερα η μεγαλύτερη μείωση παρατηρείται στην συγκέντρωση 1/10000, ενώ τα επίπεδα της ανενεργής προκασπάσης-3, μειώνονται σε μικρό μόνο βαθμό στις συγκεντρώσεις 1/10000, 1/20000 και 1/50000. Τα παραπάνω, ίσως αποτελούν ένδειξη ότι το μαστιχέλαιο επάγει την απόπτωση στα κύτταρα HeLa, πιθανώς μέσω της μιτοχονδριακής αποπτωτικής οδού, ενώ η μικρή μείωση της προκασπάσης-3 ενδεχομένως καταδεικνύει πως στο χρονικό διάστημα επώασης των κυττάρων με το μαστιχέλαιο το αποπτωτικό μονοπάτι δεν εξελίχθηκε μέχρι το σημείο όπου πραγματοποιείται η πρωτεόλυση και η ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Παράλληλα, στα ίδια κύτταρα διερευνήθηκε και η επίδραση του μαστιχέλαιου στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και της υπομονάδας p65 του μεταγραφικού

παράγοντα NF-κB. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το μαστιχέλαιο επάγει την αύξηση των επιπέδων του GR στις συγκεντρώσεις 1/7500, 1/10000 και 1/20000, ενώ επίσης παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα της p65 σε όλες τις συνθήκες. Ωστόσο, προκειμένου να χαρακτηριστούν οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις του μαστιχελαιου, απαιτείται και ο προσδιορισμός της ενεργότητας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ώστε να καταστεί σαφές αν η επώαση των κυττάρων με το μαστιχέλαιο έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη της φλεγμονής μέσω του NF-κB.

Ακόμη, με σκοπό τον χαρακτηρισμό των αντι-υπεργλυκαιμικών δράσεων του μαστιχελαιου, διερευνήθηκε η μεταβολή που επάγει στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK καθώς και το λόγο AMPK/Phospho-AMPK. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HeLa, και τα αποτελέσματα έδειξαν πως το μαστιχέλαιο επάγει τη μείωση των επιπέδων της PEPCK στις συγκεντρώσεις 1/10000, 1/20000 και 1/50000, με τη μείωση αυτή να είναι μεγαλύτερη όσο μειώνεται και η συγκέντρωση του μαστιχελαιου. Δεδομένου ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR αυξάνονται στις αντίστοιχες συνθήκες, ενδεχομένως το μαστιχέλαιο να έχει αντι-υπεργλυκαιμικές δράσεις επάγονται μερική μεταγραφική καταστολή του GR. Επιπλέον, η μείωση του λόγου AMPK/Phospho-AMPK, δηλαδή η αύξηση της της φωσφορυλιωμένης-ενεργής AMPK -η οποία καταστέλλει αναβολικές διεργασίες όπως η γλυκονεογένεση- ενδεχομένως να αποτελεί ένδειξη ότι με αυτόν τον τρόπο ενισχύονται περαιτέρω οι αντι-υπεργλυκαιμικές δράσεις του μαστιχελαιου.

Επιπροσθέτως, προκειμένου να διερευνηθεί η άμεση αλληλεπίδραση συστατικών του μαστιχελαιου με τον GR, και να διαπιστωθεί αν μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίησή του και την μετατόπισή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων του μαστιχελαιου σε μεταβολές του υποκυτταρικού εντοπισμού του GR, εφαρμόζοντας τη διαδικασία της ανοσοκυτταροχημείας, σε κύτταρα HeLa, με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι σε καμία από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν δεν προκλήθηκε ενεργοποίηση και μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Εξαιρέση αποτέλεσε η συγκέντρωση μαστιχελαιου 1/20000, όπου φάνηκε σε μικρό βαθμό μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Το γεγονός αυτό, πιθανώς να καταδεικνύει πως ίσως υπάρχει κάποια άμεση αλληλεπίδραση του GR με κάποιο από τα συστατικά που περιέχονται στο μαστιχέλαιο σε μικρή συγκέντρωση, και πως η αλληλεπίδραση εξαρτάται από τη συγκέντρωση που θα χρησιμοποιηθεί.

Τέλος, διερευνήθηκε και η επίδραση του αιθέριου ελαίου λεβάντας στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9 και προκασπάσης-3, όπως επίσης και στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και της p65. Το πείραμα διενεργήθηκε σε κύτταρα HeLa, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα κανενός από τα παραπάνω μόρια. Ωστόσο, προκειμένου να εξαχθεί κάποιο σαφές συμπέρασμα όσον αφορά τις αποπτωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις του

ελαίου λεβάντας, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση. Μία επιλογή αποτελεί η διεξαγωγή πειραμάτων όπου η επώαση των κυττάρων πραγματοποιείται με πιο πυκνές συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου λεβάντας -οι οποίες βρίσκονται εντός των ορίων κυτταροτοξικότητας- σε σχέση με αυτές που δοκιμάστηκαν στο παραπάνω πείραμα.

Συνοψίζοντας, με βάση τα παραπάνω μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως το μαστιχέλαιο επάγει αύξηση των επιπέδων του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και εμφανίζει αποπτωτική δράση πιθανώς μέσω του μιτοχονδριακά εξαρτώμενου μονοπατιού. Για την περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου επιτελείται η απόπτωση, μία επιλογή αποτελεί μελλοντικά ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων μορίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι απόπτωσης που επιτελείται μέσω του μιτοχονδρίου, όπως οι πρωτεΐνες Bax και Bcl-2. Παράλληλα φαίνεται πως το μαστιχέλαιο καταστέλλει και την επαγωγή υπεργλυκαιμικών δράσεων του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, πιθανόν μέσω παρεμβολής του σε οδούς μεταγωγής σήματος που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της AMPK. Για το λόγο αυτό, το αιθέριο έλαιο μαστίχας Χίου, θα μπορούσε μελλοντικά να αποτελέσει αντικείμενο περαιτέρω έρευνας, έτσι ώστε να αξιοποιηθούν οι ευεργετικές αυτές δράσεις του.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Białoń, M., Krzyśko-Łupicka, T., Nowakowska-Bogdan, E., & Wieczorek, P. P. (2019). *Chemical Composition of Two Different Lavender Essential Oils and Their Effect on Facial Skin Microbiota*. *Molecules*, 24(18), 3270. doi:10.3390/molecules24183270
2. Bonfiglio, J. J., Inda, C., Refojo, D., Holsboer, F., Arzt, E., & Silberstein, S. (2011). *The Corticotropin-Releasing Hormone Network and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Molecular and Cellular Mechanisms Involved*. *Neuroendocrinology*, 94(1), 12–20
3. Buchbauer, G., Jirovetz, L., & Jäger, W. (1991). *Aromatherapy: Evidence for Sedative Effects of the Essential Oil of Lavender after Inhalation*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 46(11-12), 1067–1072. doi:10.1515/znc-1991-11-1223
4. Cain, D. W., & Cidlowski, J. A. (2015). *Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease*. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29(4), 545–556.
5. Cavanagh, H. M. A., & Wilkinson, J. M. (2002). *Biological activities of Lavender essential oil*. *Phytotherapy Research*, 16(4), 301–308. doi:10.1002/ptr.1103
6. Cavanagh, H. M. A., & Wilkinson, J. M. (2005). *Lavender essential oil: a review*. *Australian Infection Control*, 10(1), 35–37. doi:10.1071/hi05035
7. Chios Mastic oil -Technical specifications (Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου).
8. Chrousos GP, (2001) Glucocorticoid therapy. In: Felig P, Frohman L, eds. *Endocrinology and metabolism*. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 609–632
9. Cohen GM. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 326 (Pt 1):1-16.
10. Elmore, S. (2007). *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
11. FAN, T.-J., HAN, L.-H., CONG, R.-S., & LIANG, J. (2005). *Caspase Family Proteases and Apoptosis*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11), 719–727.
12. Fulda, S., & Debatin, K.-M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798–4811.
13. Galon J, Franchimont D, Hiroi N, et al. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J Official Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2002;16:61e71.
14. Geske, F. J., & Gerschenson, L. E. (2001). *The biology of apoptosis*. *Human Pathology*, 32(10), 1029–1038.

15. Gruver-Yates, A., & Cidlowski, J. (2013). *Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword*. *Cells*
16. Hengartner, M. O. (2000). *The biochemistry of apoptosis*. *Nature*, 407(6805), 770–776.
17. Herr, I., Gassler, N., Friess, H., & Büchler, M. W. (2006). *Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids*. *Apoptosis*, 12(2), 271–291.
18. Jeon, S.-M. (2016). *Regulation and function of AMPK in physiology and diseases*. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(7), e245–e245.
19. Kadmiel, M., & Cidlowski, J. A. (2013). *Glucocorticoid receptor signaling in health and disease*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(9), 518–530.
20. Kim, J., Yang, G., Kim, Y., Kim, J., & Ha, J. (2016). *AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities*. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(4), e224–e224.
21. Konstantinos S. Dimas, Panayotis Pantazis & Rama Ramanujam (2012). *Chios Mastic Gum: A Plant-produced Resin Exhibiting Numerous Diverse Pharmaceutical and Biomedical Properties, in vivo* 26: 777-786
22. Koutsoudaki, C., Krsek, M., & Rodger, A. (2005). *Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil and the Gum of Pistacia lentiscus Var. chia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7681–7685. doi:10.1021/jf050639s
23. Lawrence, T. (2009). *The Nuclear Factor NF- B Pathway in Inflammation*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), a001651–a001651.
24. Loutrari, H., Magkouta, S., Pyriochou, A., Koika, V., Kolisis, F. N., Papapetropoulos, A., & Roussos, C. (2006). *Mastic Oil from Pistacia lentiscus var. chia Inhibits Growth and Survival of Human K562 Leukemia Cells and Attenuates Angiogenesis*. *Nutrition and Cancer*, 55(1), 86–93. doi:10.1207/s15327914nc5501_11
25. Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounis, A.-L., Chinou, I., & Mitaku, S. (1999). *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Pistacia lentiscus var. chia*. *Planta Medica*, 65(08), 749–752. doi:10.1055/s-2006-960856
26. Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A., & Aubert, G. (2008). *Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics*. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3), 167–173. doi:10.1111/j.1472-765x.2008.02406.x
27. Mita, M. M., Mita, A. C., & Tolcher, A. W. (2006). *Apoptosis: mechanisms and implications for cancer therapeutics*. *Targeted Oncology*, 1(4), 197–214.
28. Mitchell, S., Vargas, J., & Hoffmann, A. (2016). *Signaling via the NFκB system*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 8(3), 227–241.

29. Mitre-Aguilar I., Cabrera-Quintero A., Zentella-Dehesa A., (2015) Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer, *Int J Clin Exp Pathol*, 8(1):1-10
30. Miyamoto, T., Okimoto, T., & Kuwano, M. (2014). *Chemical Composition of the Essential Oil of Mastic Gum and their Antibacterial Activity Against Drug-Resistant Helicobacter pylori*. *Natural Products and Bioprospecting*, 4(4), 227–231. doi:10.1007/s13659-014-0033-3
31. Nader, N., Ng, S. S. M., Lambrou, G. I., Pervanidou, P., Wang, Y., Chrousos, G. P., & Kino, T. (2010). *AMPK Regulates Metabolic Actions of Glucocorticoids by Phosphorylating the Glucocorticoid Receptor through p38 MAPK*. *Molecular Endocrinology*, 24(9), 1748–1764
32. Nicolaidis, N. C., Galata, Z., Kino, T., Chrousos, G. P., & Charmandari, E. (2010). *The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function*. *Steroids*, 75(1), 1–12. doi:10.1016/j.steroids.2009.09.002
33. Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2010). *Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue-specific Actions of Glucocorticoids*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(5), 3177–3184.
34. Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2013). *The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(5), 1033–1044.
35. Overview of the major scientific publications on the beneficial activity of Chios Mastiha”, (2015), Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, Chios Mastiha published scientific booklet
36. Pachi, V. K., Mikropoulou, E. V., Gkiouvetidis, P., Siafakas, K., Argyropoulou, A., Angelis, A., ... Halabalaki, M. (2020). *Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Chios mastic gum (Pistacia lentiscus var. Chia, Anacardiaceae): A review*. *Journal of Ethnopharmacology*, 112485. doi:10.1016/j.jep.2019.112485
37. Prusinowska, R., & Śmigielski, K. B. (2014). *Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (Lavandula angustifolia L). A review*. *Herba Polonica*, 60(2), 56–66. doi:10.2478/hepo-2014-0010
38. Psarra, A.-M. G., & Sekeris, C. E. (2008). *Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(1), 1–11.
39. Psarra, A.-M. G., & Sekeris, C. E. (2009). *Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787(5), 431–436.

40. Psarra, A.-M. G., & Sekeris, C. E. (2011). *Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1813(10), 1814–1821.*
41. Psarra, A.-M. G., Solakidi, S., Trougakos, I. P., Margaritis, L. H., Spyrou, G., & Sekeris, C. E. (2005). *Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: Presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 37(12), 2544–2558.*
42. Radhakrishnan, S. K., & Kamalakaran, S. (2006). *Pro-apoptotic role of NF-κB: Implications for cancer therapy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 1766(1), 53–62*
43. Ramamoorthy, S., & Cidlowski, J. A. (2016). *Corticosteroids. Rheumatic Disease Clinics of North America, 42(1), 15–31.*
44. Revollo, J. R., & Cidlowski, J. A. (2009). *Mechanisms Generating Diversity in Glucocorticoid Receptor Signaling. Annals of the New York Academy of Sciences, 1179(1), 167–178.*
45. S. Paraschos, S. Mitakou, & A.-L. Skaltsounis. (2012). *Chios Gum Mastic: A Review of its Biological Activities. Current Medicinal Chemistry, 19(14), 2292–2302. doi:10.2174/092986712800229014*
46. Sapan, C. V., & Lundblad, R. L. (2015). *Review of methods for determination of total protein and peptide concentration in biological samples. PROTEOMICS - Clinical Applications, 9(3-4), 268–276.*
47. Seyed Hadi Mousavi, Zahra Tayarani-Najaran, Peter Hersey (2008). *Apoptosis: from Signalling Pathways to Therapeutic Tools, Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 11(3) 121-142*
48. SILVA, G. L. D., LUFT, C., LUNARDELLI, A., AMARAL, R. H., MELO, D. A. D. S., DONADIO, M. V. F., ... OLIVEIRA, J. R. D. (2015). *Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. Anais Da Academia Brasileira de Ciências, 87(2 suppl), 1397–1408.*
49. Sophia Magkouta , Georgios T. Stathopoulos , Ioannis Psallidas , Andreas Papapetropoulos , Fragiskos N. Kollis , Charis Roussos & Heleni Loutrari (2009) *Protective Effects of Mastic Oil from Pistacia Lentiscus Variation Chia Against Experimental Growth of Lewis Lung Carcinoma, Nutrition and Cancer, 61:5, 640-648, DOI: 10.1080/01635580902825647*
50. Spyridopoulou, K., Tiptiri-Kourpeti, A., Lampri, E., Fitsiou, E., Vasileiadis, S., Vamvakias, M., ... Chlichlia, K. (2017). *Dietary mastic oil extracted from Pistacia*

- lentiscus var. chia suppresses tumor growth in experimental colon cancer models. Scientific Reports, 7(1).* doi:10.1038/s41598-017-03971-8
51. Timmermans, S., Souffriau, J., & Libert, C. (2019). *A General Introduction to Glucocorticoid Biology. Frontiers in Immunology, 10.*
52. Vallianou, I., Peroulis, N., Pantazis, P., & Hadzopoulou-Cladaras, M. (2011). *Camphene, a Plant-Derived Monoterpene, Reduces Plasma Cholesterol and Triglycerides in Hyperlipidemic Rats Independently of HMG-CoA Reductase Activity. PLoS ONE, 6(11), e20516.* doi:10.1371/journal.pone.0020516
53. Yabaluri, N., & Bashyam, M. D. (2010). *Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. Journal of Biosciences, 35(3), 473–484*
54. Yan, Y., Zhou, X., Xu, H., & Melcher, K. (2018). *Structure and Physiological Regulation of AMPK. International Journal of Molecular Sciences, 19(11), 3534*
55. Yang, P.-C., & Mahmood, T. (2012). *Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. North American Journal of Medical Sciences, 4(9), 429.*
56. Zhao, Y., Chen, R., Wang, Y., Qing, C., Wang, W., & Yang, Y. (2016). *In Vitro and In Vivo Efficacy Studies of Lavender angustifolia Essential Oil and Its Active Constituents on the Proliferation of Human Prostate Cancer. Integrative Cancer Therapies, 16(2), 215–226.* doi:10.1177/1534735416645408
57. The European Medicines Agency (EMA) Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) Assessment Report on Pistacia Lentiscus L., Resin (Mastix) [(accessed on 7 February 2019)]

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα της πτυχιακής μου Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία υπό την επίβλεψη της, καθώς και για τη βοήθεια και τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής μου, τη Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και τον Δρ. Δημήτριο Λεωνίδα, Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη Δρ. Αικατερίνη Καρρά και τον υποψήφιο διδάκτωρ Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο, για την υπομονή, τη βοήθεια και την συνεχή καθοδήγηση που μου προσέφεραν, όπως επίσης και τους υποψήφιους διδάκτορες Ιωάννη Τσιάλτα και Φωτεινή Καλούση, για την πολύτιμη βοήθειά τους. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για το ωραίο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο όλον αυτό τον καιρό.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στην οικογένεια μου αλλά και τους φίλους μου, για τη διαρκή υποστήριξη και την κατανόηση τους καθ' όλη τη διάρκεια των έως τώρα σπουδών μου.