



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ



ΒΟΥΓΙΟΥΚΑΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2022

**«ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΙΘΕΡΙΩΝ
ΕΛΑΙΑΩΝ ΑΠΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΑ ΤΗΣ
ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΜΠΛΟΚΗΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ
ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΗΤΗΣΗΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ»**

**“CHARACTERIZATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF
ESSENTIAL OILS PRODUCED BY MEDITERRANEAN MEDICINAL
AND AROMATIC PLANTS. INVESTIGATING THEIR INVOLVEMENT
IN THE REGULATION OF STEROID HORMONES SIGNALING”**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Αναπληρώτρια 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 αποτελούν στεροειδείς ορμόνες οι οποίες συντίθενται και εκκρίνονται από τα επινεφρίδια και είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της ομοιόστασης στον οργανισμό. Λόγω της λιπόφιλης φύσης τους, έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τις μεμβράνες των κυττάρων και να ασκούν τις δράσεις τους μέσω της πρόσδεσής τους στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), ενός κυτταροπλασματικού υποδοχέα με δράση μεταγραφικού παράγοντα εξαρτώμενου από τον προσδέτη. Μετά την πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών και την ενεργοποίησή του, ο GR, μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου επάγει ή καταστέλλει την μεταγραφή μεγάλου αριθμού γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που ρυθμίζουν πληθώρα σημαντικών για τον οργανισμό βιολογικών διαδικασιών. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται, η ανάπτυξη και φυσιολογική λειτουργία συστημάτων και οργάνων όπως το καρδιαγγειακό, το αναπνευστικό και το ανοσοποιητικό, η κυτταρική επιβίωση και απόπτωση, η ανοσολογική απόκριση και ο μεταβολισμός υδατανθράκων και λιπαρών οξέων. Παράλληλα, τα γλυκοκορτικοειδή λόγω του μεγάλου εύρους δράσεων τους διαθέτουν και πλήθος θεραπευτικών ιδιοτήτων. Για το λόγο αυτό εδώ και πολλά χρόνια συνθετικά γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως για την θεραπεία παθολογικών καταστάσεων όπως οι φλεγμονώδεις παθήσεις, τα αυτοάνοσα νοσήματα και διάφοροι τύποι καρκίνου του ανοσοποιητικού και του αιμοποιητικού συστήματος. Ωστόσο, η χρόνια χρήση τους μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση παρενεργειών όπως η ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη τύπου II, η ευαισθησία σε παθογόνους παράγοντες, η οστεοπόρωση, η μυϊκή ατροφία και η παχυσαρκία. Για τον λόγο αυτό, αποτελεί ανάγκη η έρευνα νέων μορίων που θα μπορούν να προσφέρουν τις θετικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών με όσο το δυνατόν λιγότερες παρενέργειες. Με την πάροδο του χρόνου αυξάνεται ο αριθμός των μελετών που υποστηρίζουν τις θεραπευτικές ιδιότητες και τη μεγάλη βιολογική αξία των αιθέριων ελαίων που παράγονται από φυτά, τα οποία αποτελούν πολύπλοκα μείγματα σύνθετων χημικών ενώσεων που στην πλειοψηφία τους ανήκουν στην κατηγορία των τερπενοειδών και αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Εδώ και αρκετά χρόνια ήταν γνωστές οι αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντιοξειδωτικές δράσεις των αιθέριων ελαίων που παράγονται από φυτά, ενώ πλέον μεγάλος είναι και ο αριθμός επιστημονικών μελετών που καταδεικνύουν τις αντικαρκινικές και τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις τους. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση των προαποπτωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντιυπεργλυκαιμικών δράσεων τεσσάρων αιθέριων ελαίων που παράγονται από τα φυτά *Pistacia lentiscus*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* και *Origanum vulgare*, καθώς και η διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής τους στο μονοπάτι σηματοδότησης του GR, ελέγχοντας ταυτόχρονα την πιθανή ενεργοποίηση και μετατόπισή του, σε κάποιο υποκυτταρικό διαμέρισμα. Η διερεύνηση αυτή πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο εύρεσης νέων εξειδικευμένων αγωνιστών του GR που διατηρούν τις θεραπευτικές του δράσεις, μειώνοντας στο ελάχιστο τις ανεπιθύμητες παρενέργειες.

Λέξεις-κλειδιά: Γλυκοκορτικοειδή, απόπτωση, υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών, αιθέρια έλαια

ABSTRACT

Glucocorticoids are steroid hormones that are produced and secreted by the adrenal cortex and are necessary for maintaining body homeostasis. Due to their lipophilic nature, they can penetrate cell membranes and exert their actions through binding to the glucocorticoid receptor (GR), a cytoplasmic receptor with ligand-dependent transcription factor activity. After the activation of GR through glucocorticoid binding, GR translocates to the nucleus and regulates the transcription of many genes that code for proteins that regulate a variety of important biological processes in the body, including the development and normal function of organs and systems such as cardiovascular, respiratory, and immune, cell survival and apoptosis, immune response and carbohydrate and fatty acid metabolism. In addition, due to their wide range of actions, glucocorticoids also have therapeutic properties. For this reason, synthetic glucocorticoids are widely used to treat pathological conditions such as inflammatory diseases, autoimmune diseases, and various types of immune and hematological cancers. However, the prolonged use of glucocorticoids can lead to many negative side effects such as type II diabetes, increased susceptibility to pathogens, osteoporosis, muscle atrophy and obesity. So, it is clear that there is need of new safer ligands that trigger the expression of the desirable glucocorticoid effects. Over time, the number of studies supporting the therapeutic properties and great biological value of essential oils produced by plants has been increased. Essential oils are complex mixtures of chemical compounds that mostly belong to the terpenoid category. Terpenoids are products of plant secondary metabolism. In the past only the antibacterial, antifungal and antioxidant effects of essential oils produced by plants were known, but now there is a great number of scientific studies demonstrating their anti-cancer and anti-inflammatory effects. The purpose of this thesis is to investigate the pro-apoptotic, anti-inflammatory, and anti-hyperglycemic activities of four essential oils that are produced by the plants *Pistacia lentiscus*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Origanum vulgare*, as well as the investigation of the possible involvement, in the GR signaling pathway. In addition, the possible interaction of Chios mastic oil and *Melissa officinalis* essential oil with GR as well as the subsequent translocation to a subcellular compartment was further investigated. This investigation aims to contribute in the finding of new selective GR agonists that maintain its therapeutic actions, and reduce the occurrence of negative side effects.

Keywords: Glucocorticoids, apoptosis, glucocorticoid receptor, essential oils

Περιεχόμενα

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ.....	8
1.1.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ.....	8
1.1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ.....	8
1.1.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ.....	9
1.2 Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ (GR)	11
1.2.1 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ GR.....	11
1.2.2 ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ GR.....	13
1.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ	13
1.3.1 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΟΥ GR.....	13
1.3.2 ΜΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΟΥ GR.....	15
1.4 ΑΠΟΠΤΩΣΗ.....	16
1.4.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ.....	16
1.4.2 ΕΞΩΓΕΝΕΣ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ.....	17
1.4.3 ΕΝΔΟΓΕΝΕΣ - ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ.....	18
1.4.4 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΑΠΟ ΤΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ.....	19
1.5 ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ	21
1.5.1 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΡΙΓΑΝΗΣ - ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	21
1.5.2 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΜΑΣΤΙΧΑΣ – ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ....	23
1.5.3 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΜΕΛΙΣΣΟΧΟΡΤΟΥ – ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ	24
1.5.4 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΛΕΒΑΝΤΑΣ – ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ...	26
1.6 ΣΚΟΠΟΣ.....	27
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	27
2.2 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	28
2.3 ΧΗΜΙΚΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	28
2.3.1 ΧΗΜΙΚΑ.....	28
2.3.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	29
2.4.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ.....	29
2.4.3 ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ	29
2.5 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	30
2.5.1 ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	30
2.5.2 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	30

2.6 ΜΕΘΟΔΟΙ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	30
2.6.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	30
2.6.2 ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	30
2.6.3 ΜΕΤΡΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΡΩΣΙΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	31
2.6.4 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΟΥΣΙΩΝ	32
2.6.5 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	32
2.6.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD – ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ WESTERN BLOT	33
2.6.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE) ..	33
2.6.8 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN	34
2.6.9 ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑ.....	35
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
3.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΡΙΓΑΝΗΣ, ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ, ΜΕΛΙΣΣΟΧΟΡΤΟΥ ΚΑΙ ΛΕΒΑΝΤΑΣ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ	37
3.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΡΙΓΑΝΗΣ, ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ, ΜΕΛΙΣΣΟΧΟΡΤΟΥ ΚΑΙ ΛΕΒΑΝΤΑΣ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ GR ΚΑΙ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ p65 ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NF-κΒ	39
3.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΡΙΓΑΝΗΣ, ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ, ΜΕΛΙΣΣΟΧΟΡΤΟΥ ΚΑΙ ΛΕΒΑΝΤΑΣ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ PERCK.....	42
3.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΜΕΛΙΣΣΟΧΟΡΤΟΥ ΚΑΙ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ (GR).....	43
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ

1.1.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Τα γλυκοκορτικοειδή ή γλυκοκορτικοστεροειδή αποτελούν στεροειδείς ορμόνες - απαραίτητες για τη ζωή - οι οποίες συντίθενται και εκκρίνονται από το φλοιό των επινεφριδίων, και πιο συγκεκριμένα, στη στηλιδωτή ζώνη, επιτελώντας πληθώρα βιολογικών διαδικασιών, με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης. [(Oakley et al., 2013) ; (Kadmiel et al., 2013)]. Η έκκρισή τους στην κυκλοφορία, πραγματοποιείται ως απόκριση στον κirkάδιο ρυθμό αλλά και σε στρεσογόνα για τον οργανισμό ερεθίσματα. Όσον αφορά την σύνθεσή τους, ως στεροειδείς ορμόνες, συντίθενται έχοντας ως πρόδρομο μόριο την χοληστερόλη που προέρχεται κυρίως από τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) και η διαδικασία περιλαμβάνει μία πληθώρα ενζυμικών μετατροπών που ονομάζεται στεροειδογένεση. Ειδικότερα, η σύνθεση της κορτιζόλης, που είναι το κύριο γλυκοκορτικοειδές στον άνθρωπο ξεκινά με την είσοδο της χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια των κυττάρων της στηλιδωτής ζώνης των επινεφριδίων, η οποία πραγματοποιείται μέσω της οξείας ρυθμιστικής πρωτεΐνης της στεροειδογένεσης (StAR, steroidogenic acute regulatory protein). Στη συνέχεια, μέσω ενζυμικών μετατροπών της χοληστερόλης κυρίως από ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια του κυτοχρώματος P450 (CYP450), συντίθεται τα πρόδρομα μόρια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή όλων των στεροειδών ορμονών που παράγονται από τα επινεφρίδια [(Papadimitriou A. & Priftis K.N., 2009) ; (Payne AH et. al., 2004)]. Αναφορικά με τη δράση τους, τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν τις βιολογικές τους δράσεις, λειτουργώντας ως προσδέτες του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid receptor, GR), ο οποίος διαθέτει δράση προσδετοεξαρτώμενου μεταγραφικού παράγοντα. Παρόλο που τα γλυκοκορτικοειδή αντλούν το όνομά τους κυρίως από τις δράσεις τους στο μεταβολισμό της γλυκόζης, ρυθμίζουν και πολύ μεγάλο αριθμό βιολογικών δράσεων ανάλογα με τον ιστό. Κάποιες από τις δράσεις τους, περιλαμβάνουν τη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου και της κυτταρικής επιβίωσης, την ανάπτυξη του μυοσκελετικού συστήματος, τη ρύθμιση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος, επηρεάζουν το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, ενώ συμμετέχουν και στην φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία διαφόρων συστημάτων όπως το γαστρεντερικό και το καρδιαγγειακό [(Oakley and Cidlowski, 2013);(Cain et al., 2015)].

1.1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

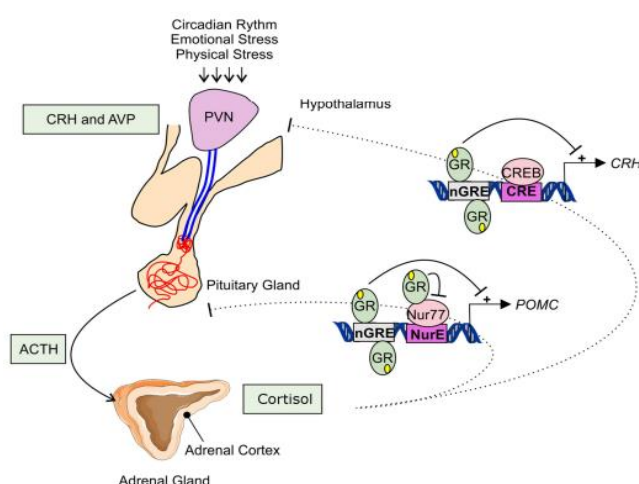
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν τη δράση τους μέσω της πρόσδεσής του στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), δρουν στα περισσότερα συστήματα οργάνων και σε πολύ μεγάλο αριθμό κυτταρικών τύπων, οδηγώντας σε διαφορετικές αποκρίσεις. Μάλιστα η πλειοτροπική δράση των γλυκοκορτικοειδών αντικατοπτρίζεται στο γεγονός πως σε ορισμένους τύπους κυττάρων, μπορεί να επηρεάζουν την έκφραση του 10%-20% των εκφραζόμενων γονιδίων του γονιδιώματος, καταστέλλοντας ή προωθώντας τη μεταγραφή τους [(Galon et al., 2002) ; (Ren R. & Oakley R.H, 2012)]. Έτσι λοιπόν τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν μείζονα ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης αλλά επιπλέον διαθέτουν και μεγάλο αριθμό φαρμακολογικών δράσεων. Στις φυσιολογικές τους δράσεις που στοχεύουν στη διατήρηση της ομοιόστασης συγκαταλέγεται η συμμετοχή τους στην

ρύθμιση της απόπτωσης στα κύτταρα του θύμου αδένος, καθώς απουσία της σηματοδότησης του GR, δεν πραγματοποιείται φυσιολογική ωρίμανση κατά τα εμβρυικά στάδια. Το ίδιο συμβαίνει και για τη φυσιολογική ανάπτυξη πολλών οργάνων και συστημάτων οργάνων, όπως το αναπνευστικό, το καρδιαγγειακό, το αναπαραγωγικό, το γαστρεντερικό, το ανοσοποιητικό, και το κεντρικό νευρικό σύστημα, όπου η σηματοδότηση μέσω του GR, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο [(Cain et al., 2015) ; (Kadmiel M. et al., 2013)]. Επιπλέον, διάφορα σήματα που σχετίζονται με το στρες εκφράζονται στον εγκέφαλο μέσω της σηματοδότησης του GR, και η απορρύθμιση αυτής ή αυξημένα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών και κατ' επέκταση εκτεταμένη σηματοδότηση του GR έχει συσχετιστεί με ψυχωσικές διαταραχές όπως η σχιζοφρένεια και η κατάθλιψη (Müller M. B., & Holsboer F., 2006). Ακόμη, τα γλυκοκορτικοειδή δρουν προστατεύοντας τα καρδιομυοκύτταρα, μέσω της αντιαποπτωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης τους, καταστέλλοντας τη μεταγραφή προαποπτωτικών κυτοκινών και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ αντίστοιχα (Kadmiel M. et al., 2013). Ακόμη, από τις πιο σημαντικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών, είναι η ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων και των λιπαρών οξέων, με αποτέλεσμα την διατήρηση της ενεργειακής ομοιόστασης. Πιο συγκεκριμένα, σε συνθήκες στρες όπως η έλλειψη θρεπτικών ή κατά την άσκηση, μέσω της σηματοδότησης των GCs, αποκαθίστανται τα επίπεδα γλυκόζης στο ήπαρ και στο αίμα, ενεργοποιώντας την γλυκονογένεση και τη γλυκογονόλυση και ενισχύοντας τη δράση της γλυκαγόνης. Παράλληλα, στους μύες και το λιπώδη ιστό, τα GCs, αναστέλλουν την πρόσληψη και τη χρήση της γλυκόζης, παρεμποδίζοντας το μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης και κατ' επέκταση της μετατόπισης του GLUT4 στη μεμβράνη, ενώ επιπλέον στις σκελετικές μυϊκές ίνες, επάγουν και τον καταβολισμό πρωτεϊνών. Έτσι, με βάση τα παραπάνω εξηγείται το γεγονός πως η παρατεταμένη χρήση GCs, έχει ως παρενέργειες την ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη αλλά και μυϊκή ατροφία (Rose A. J. et al., 2010). Τέλος, λόγω του γεγονότος πως τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν ισχυρούς ρυθμιστές των ανοσολογικών αποκρίσεων, εδώ και πολλά χρόνια τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή χορηγούνται ως πρώτης γραμμής άμυνας για την αντιμετώπιση πληθώρας ασθενειών όπως οι φλεγμονώδεις παθήσεις, διάφοροι τύποι κακοηθειών του ανοσοποιητικού και του αιμοποιητικού συστήματος και τα αυτοάνοσα νοσήματα. Ειδικότερα, στις ασθένειες στις οποίες χορηγούνται συνθετικά γλυκοκορτικοειδή για την αντιμετώπισή τους συμπεριλαμβάνονται το άσθμα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, χρόνιες αλλεργικές παθήσεις, λευχαιμίες και λεμφώματα [(Ramamoorthy et al., 2016); (Oakley et al., 2013)]. Ωστόσο, παρά τα θεραπευτικά οφέλη που διαθέτουν τα γλυκοκορτικοειδή για την αντιμετώπιση των παραπάνω ασθενειών, η παρατεταμένη χρήση τους σε πολλές περιπτώσεις οδηγεί σε σοβαρές παρενέργειες λόγω του μεγάλου φάσματος δράσης τους, μεταξύ των οποίων είναι η ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη, η μυϊκή ατροφία, η οστεοπόρωση, η ανάπτυξη γλαυκώματος αλλά και η αυξημένη ευαισθησία σε λοιμογόνους παράγοντες (Kadmiel, M., & Cidlowski, 2013). Με βάση λοιπόν τα παραπάνω, είναι μεγάλης σημασίας η εύρεση εξειδικευμένων αγωνιστών του GR, με σκοπό τη χρήση τους για την αντιμετώπιση των ανωτέρω ασθενειών, οι οποίοι θα διατηρούν τα θεραπευτικά οφέλη των συνθετικών γλυκοκορτικοειδών χωρίς όμως να επάγουν παράλληλα σοβαρές παρενέργειες.

1.1.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Τα γλυκοκορτικοειδή, όπως καθίσταται προφανές επηρεάζουν πολύ μεγάλο αριθμό βιολογικών δράσεων, και ρυθμίζουν πληθώρα διαδικασιών στον οργανισμό με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης. Έτσι, είναι πολύ σημαντικό να ρυθμίζεται με μεγάλη ακρίβεια η σύνθεση, η έκκριση αλλά και η βιοδιαθεσιμότητά τους στους ιστούς. Η σύνθεση των γλυκοκορτικοειδών πραγματοποιείται υπό τον έλεγχο του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis),

με βάση το κινκάρδιο ρυθμό. Ειδικότερα, υπό φυσιολογικές συνθήκες -χωρίς την ύπαρξη κάποιου στρεσογόνου ερεθίσματος- η κορτιζόλη, που είναι το κύριο γλυκοκορτικοειδές στον άνθρωπο, εκκρίνεται από το φλοιό των επινεφριδίων στην κυκλοφορία του αίματος κατά την ενεργή φάση. Η ενεργή φάση, ξεκινά τις πρωινές ώρες, όπου πραγματοποιείται ενεργοποίηση του άξονα HPA και παρατηρείται μία απότομη αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης στο αίμα ακριβώς πριν την αφύπνιση, ενώ η συγκέντρωσή της σταδιακά μειώνεται κατά την διάρκεια της ημέρας. Επίσης ο άξονας HPA, ενεργοποιείται και από ανώτερα κέντρα του εγκεφάλου όταν υπάρχουν στρεσογόνα ερεθίσματα, ή συναισθηματικό στρες [(Cain et al., 2015) ; (Bonfiglio J. J et al., 2011)]. Κατά την ενεργοποίηση του άξονα HPA, η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (corticotropin-releasing hormone, CRH) και η αργινίνη-βασοπρεσσίνη (AVP) , εκκρίνεται από νευρώνες του υποθαλαμικού παρακοιλιακού πυρήνα (hypothalamic paraventricular nucleus PVN), και εν συνεχεία προσδένονται αμφοτέρως στους υποδοχείς τους CRH-R1 και V1B, στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την διέγερση των κορτικοτροφικών κυττάρων ώστε να παράγουν και να εκκρίνουν στην κυκλοφορία την αδρενοκορτικοτροπίνη (ACTH). Η ACTH, με τη σειρά της, δρα στα κύτταρα της στηλιδωτής ζώνης του φλοιού των επινεφριδίων, τα οποία παράγουν και εκκρίνουν την κορτιζόλη στην κυκλοφορία του αίματος [(Papadimitriou A. & Priftis, K. N., 2009) ; (Timmerman S. et al., 2019) ; (Oakley and Cidlowski, 2013)]. Τέλος, ο άξονας HPA αναστέλλεται μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης από τα ίδια τα γλυκοκορτικοειδή, τα οποία δρουν με γονιδιωματικό και μη γονιδιωματικό τρόπο. Ειδικότερα, τα γλυκοκορτικοειδή δρουν τόσο στους νευρώνες του παρακοιλιακού πυρήνα (PVN) όσο και στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, και αναστέλλουν την μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για την CRH, τον υποδοχέα της (CRH-R1) στην υπόφυση, και το γονίδιο προοπιόμελανοκορτίνης (POMC), που αποτελεί πρόδρομο μόριο της ACTH, μέσω της πρόσδεσης του GR σε nGREs που βρίσκονται ανοδικά των παραπάνω γονιδίων (Timmerman S. et al., 2019). Επιπλέον, ο GR αναστέλλει τον άξονα HPA, δρώντας και με μη γονιδιωματικό τρόπο, μέσω της επαγωγής της έκκρισης ενδοκανναβινοειδών από CRH νευρώνες του υποθαλάμου, και την επαγόμενη από αυτά έκκριση γ-αμινοβουτυρικού οξέος στις ανασταλτικές συνάψεις των CRH νευρώνων (Timmerman S. et al., 2019).



Εικόνα 1. Η ρύθμιση του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης - επινεφριδίων. Ο άξονας HPA ενεργοποιείται από τον κινκάρδιο ρυθμό, στρεσογόνα ερεθίσματα και συναισθηματικό στρες. Μετά την ενεργοποίησή του παράγεται και εκκρίνεται η CRH και η AVP από τον υποθάλαμο, η οποία δρα στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και επάγει την έκκριση της ACTH. Η ACTH, με τη σειρά της δρα στον φλοιό των επινεφριδίων και επάγει την σύνθεση και την έκκριση της

κορτιζόλης. Ο άξονας HPA αναστέλλεται από την κορτιζόλη, που δρα τόσο στον υποθάλαμο αναστέλλοντας τη μεταγραφή του γονιδίου της CRH, όσο και στην υπόφυση αναστέλλοντας τη μεταγραφή των γονιδίων της POMC και του CRH-R1 (Timmerman S. et al., 2019).

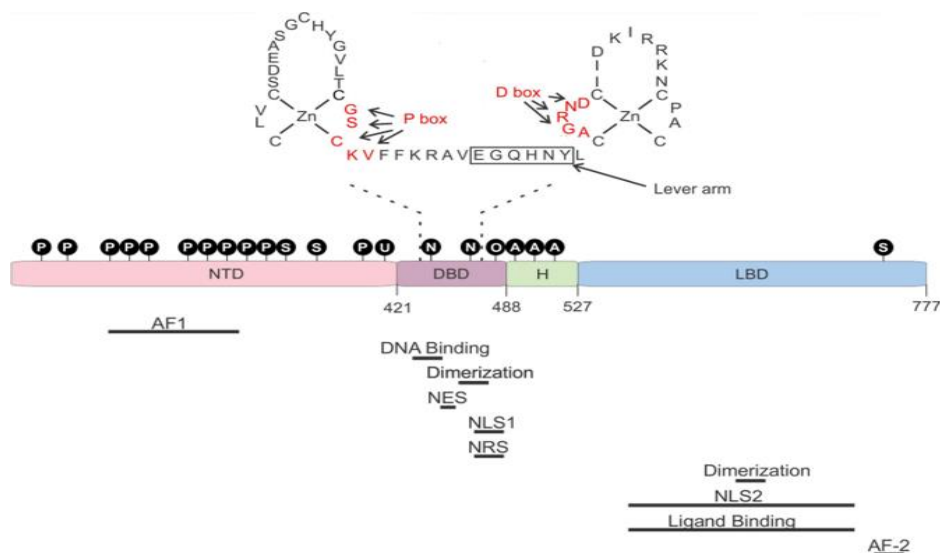
Λόγω του γεγονότος ότι τα γλυκοκορτικοειδή είναι λιπόφιλα μόρια, διαπερνούν με απλή διάχυση τις κυτταρικές μεμβράνες προκειμένου να ασκήσουν τις δράσεις τους στα κύτταρα. Έτσι, επειδή δεν καθίσταται δυνατό να αποθηκευτούν στο φλοιό των επινεφριδίων μετά τη σύνθεσή τους, απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος κατευθείαν, μετά τη σύνθεσή τους. Όμως η δράση τους στους ιστούς, εκτός από τον άξονα HPA, ρυθμίζεται και από τη βιοδιαθεσιμότητά τους σε αυτούς. Πιο συγκεκριμένα, σε επίπεδο ιστού, η βιοδιαθεσιμότητα των GCs, εξαρτάται από το ποσοστό πρόσδεσής του σε πρωτεΐνες του αίματος. Τα GCs, δεν είναι διαλυτά στο υδατικό περιβάλλον του αίματος, και για το λόγο αυτό, μεταφέρονται προσδεσμένα στη σφαιρίνη πρόσδεσης γλυκοκορτικοειδών (corticosteroid-binding globulin, CBG) και στην αλβουμίνη. Στον άνθρωπο, η κορτιζόλη είναι προσδεσμένη στην CBG σε ποσοστό 80%-90%, στην αλβουμίνη σε ποσοστό 5%-15%, ενώ μόνο το 5% της κορτιζόλης βρίσκεται σε ελεύθερη και ενεργή μορφή. Έτσι, η πρόσβαση της κορτιζόλης στους ιστούς, ελέγχεται από την συγκέντρωση της CBG του πλάσματος, περιορίζοντας έτσι τη δράση της (Ramamoorthy S., & Cidlowski J. A., 2016). Τέλος, η πραγματική βιοδιαθεσιμότητα των GCs σε κυτταρικό επίπεδο, αντιπροσωπεύεται από την ισορροπία μεταξύ της ενεργής και της ανενεργής μορφής τους. Η ισορροπία αυτή, εξαρτάται από τη δράση ενζύμων που δρουν ιστοειδικά, και ανήκουν στην οικογένεια 11β- αφυδρογονασών των υδροξυ-στεροειδών (11β- hydroxysteroid dehydrogenases, 11-β HSDs). Αναλυτικότερα, τα ισοένζυμα 11-β HSD-1 και 11-β HSD-2, δρουν μετατρέποντας το ανενεργό πρόδρομο μόριο κορτιζόνη, στην ενεργή κορτιζόλη και αντίστροφα, και η ισορροπία μεταξύ αυτών των δύο αντιδράσεων καθορίζει τη βιοδιαθεσιμότητα των GCs στα κύτταρα που εκφράζουν τα ένζυμα αυτά (Cain et al., 2015).

1.2 Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ (GR)

1.2.1 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ GR

Παρά το μεγάλο φάσμα των δράσεων των γλυκοκορτικοειδών, όλες αυτές, πραγματοποιούνται μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR). Ο GR ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων με δράση μεταγραφικού παράγοντα εξαρτώμενο από προσδέτη, και αποτελείται από μία πρωτεΐνη 97 kDa, η οποία εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς στον ανθρώπινο οργανισμό (Timmerman S. et al., 2019). Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον ανθρώπινο GR εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5 (5q31.3), ονομάζεται NR3C1 και αποτελείται από 9 εξόνια, όπου το εξόνιο 1 σχηματίζει την 5' αμετάφραστη περιοχή και τα εξόνια 2-9 κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη του GR (Vandevyver S., 2014). Η 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον GR, δεν διαθέτει την αλληλουχία TATA, αλλά έχουν αναγνωριστεί διάφορες παραλλαγές υποκινητών ανοδικά του γονιδίου του, που έχουν την ικανότητα να προσδένουν διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες, αλλά και να επιδέχονται επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως η μεθυλίωση και η ακετυλίωση. Επιπλέον, η μεταγραφή του γονιδίου του GR, σε ορισμένες περιπτώσεις ρυθμίζεται ακόμη και από την ίδια τη μεταγραφική δράση του υποδοχέα. Έτσι, ανάλογα τη δράση των διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων αλλά και των επιγενετικών τροποποιήσεων, επιτυγχάνεται η διαφορική έκφραση του GR μεταξύ των ιστών ή ακόμη και των κυτταρικών τύπων στον ίδιο ιστό (Timmerman S. et al., 2019). Όσον αφορά τη δομή της πρωτεΐνης του ανθρώπινου GR (human GR, hGR), αποτελείται -όπως και όλοι οι πυρηνικοί υποδοχείς- από τρεις επικράτειες. Μία αμινο-τελική επικράτεια (N-terminal Domain, NTD), μία επικράτεια πρόσδεσης στο DNA (DNA Binding Domain, DBD), και μία καρβόξυ-τελική επικράτεια, όπου είναι η περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (C-terminal Ligand-Binding Domain, LBD). Τέλος, υπάρχει και μία περιοχή εύκαμπτης άρθρωσης που συνδέει την DBD και την NTD με την LBD [(Ramamoorthy S., & Cidlowski J.

A., 2016) ; (Nicolaidis et al., 2010) ; (Cain et al., 2015)]. Στην NTD, εντοπίζεται μία περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης, η οποία είναι ανεξάρτητη από προσδέτη (Activation function 1, AF-1), και προσδένει συμπράγοντες, τροποποιητές της χρωματίνης και τη μεταγραφική μηχανή. Η DBD κωδικοποιείται από τα εξόνια 3 και 4 και διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση του υποδοχέα στο DNA , και πιο συγκεκριμένα στα στοιχεία απόκρισης των γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoids Responsive Elements, GREs), μέσω της υποπεριοχής P-box, όπως επίσης και στο διμερισμό του υποδοχέα μέσω της υποπεριοχής D-box. Οι δύο αυτές υποπεριοχές εντοπίζονται μεταξύ των δύο συντηρημένων περιοχών δακτύλων ψευδαργύρου (zinc finger). Η LBD, παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο διμερισμό του υποδοχέα, και φέρει και μία δεύτερη περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης AF-2, η οποία είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του υποδοχέα και με άλλα ρυθμιστικά μόρια κατά τη στρατολόγηση της μεταγραφικής μηχανής. Επιπλέον, στον GR, έχουν εντοπιστεί και περιοχές που αποτελούν σήματα εντοπισμού στον πυρήνα (Nuclear Localization Signals, NLS), σήματα παραμονής στον πυρήνα (Nuclear Retention Signals, NRS) και σήματα εξόδου από τον πυρήνα (Nuclear Export Signals, NES), και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην υποκυτταρική εντόπιση του GR (Timmerman S. et al., 2019). Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο NLSs, και το ένα εντοπίζεται στην DBD, το δεύτερο στην LBD, ενώ υπάρχει και ένα NES που εντοπίζεται μεταξύ των δύο δακτύλων ψευδαργύρου [(Ramamoorthy S., & Cidlowski J. A., 2016); (Timmerman S. et al., 2019)].



Εικόνα 2. Περιγραφή των δομικών στοιχείων του ανθρώπινου GR (hGR). Όπως διακρίνεται και στην παραπάνω εικόνα, ο hGR αποτελείται από την NTD, την DBD, και μία περιοχή εύκαμπτης άρθρωσης (h) που τις συνδέει με την LBD. Στην DBD, υπάρχει εστίαση στους δακτύλους ψευδαργύρου (zinc fingers), και είναι διακριτές οι υποπεριοχές P-box και D-box, που είναι υπεύθυνες για την εξειδικευμένη σύνδεση του υποδοχέα στα GREs και το διμερισμό του αντίστοιχα. Επιπλέον διακρίνεται μία αλληλουχία "Lever arm" που συμμετέχει επίσης στο διμερισμό του υποδοχέα, σταθεροποιώντας την αλληλεπίδραση μεταξύ δύο DBD επικρατειών. Επιπλέον, διακρίνονται η περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης AF-1 στην NTD, οι αλληλουχίες "σήματα" εξόδου, παραμονής και εντοπισμού στον πυρήνα (NES, NRS, NLS1 και NLS2) στην DBD και την LBD, και η δεύτερη περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης στην LBD. Τέλος, επισημαίνονται με μαύρους κύκλους οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις του GR (φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, οξειδωση, σουμοϋλίωση και ουβικουιτινυλίωση) (Timmerman S. et al., 2019).

1.2.2 ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ GR

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το γονίδιο NR3C1 που κωδικοποιεί για τον GR, διαθέτει 9 εξόνια, εκ των οποίων το πρώτο και το τελευταίο είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία πολλών ισομορφών του GR μέσω εναλλακτικού ματίσματος. Οι πιο συχνές ισομορφές του GR στον άνθρωπο, είναι ο GRα και ο GRβ, και βρίσκονται σε αφθονία σχεδόν σε όλους του ιστούς (Lu N.Z, Cidlowski, J.A, 2006). Όσον αφορά την αμινοξική τους αλληλουχία, ο GRα και ο GRβ, είναι πανομοιότυποι από το αμινοτελικό τους άκρο μέχρι και το αμινοξύ 727, και από αυτό το σημείο και μετά ο GRα διαθέτει μία επιπλέον αλληλουχία 50 αμινοξέων, ενώ ο GRβ διαθέτει μία αλληλουχία 15 μη ομόλογων αμινοξέων. Ο GRα εκφράζεται εκτενώς στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους και είναι, λειτουργικός όταν προσδένονται σε αυτόν τα γλυκοκορτικοειδή, σε αντίθεση με τον GRβ που εκφράζεται πιο εξειδικευμένα, σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, όπως για παράδειγμα στα επιθηλιακά κύτταρα που οριοθετούν τα τερματικά βραγχίδια των πνευμόνων. Επίσης, ο GRβ έχει φανεί ότι παρόλο που είναι μεταγραφικά ενεργός, δεν είναι ικανός να προσδέσει τα γλυκοκορτικοειδή, και να μετατοπιστεί στον πυρήνα, όπως ο GRα. Μάλιστα, σε κάποιες περιπτώσεις, έχει φανεί ότι μέσω αλληλεπίδρασης του με το GRα, και παρεμπόδιση του διμερισμού του, λειτουργεί ως αναστολέας του GRα [(Lu N.Z, Cidlowski, 2009) ; (Oakley and Cidlowski, 2013) ; (Kadmiel M. et al., 2013)].

1.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Ο GR διαθέτει ένα πολύ ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, τις οποίες επάγει μέσω της δράσης του ως παράγοντας της μεταγραφής, δηλαδή επάγοντας την de novo σύνθεση πρωτεϊνών, ή καταστέλλοντας τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Παρόλα αυτά, σε πιο πρόσφατες μελέτες αναφέρονται συχνά και μη γονιδιωματικές δράσεις, που δεν αφορούν την άμεση επαγωγή ή καταστολή της μεταγραφής γονιδίων, αλλά σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης- πρωτεΐνης (Revollo J. R. & Cidlowski J. A., 2009).

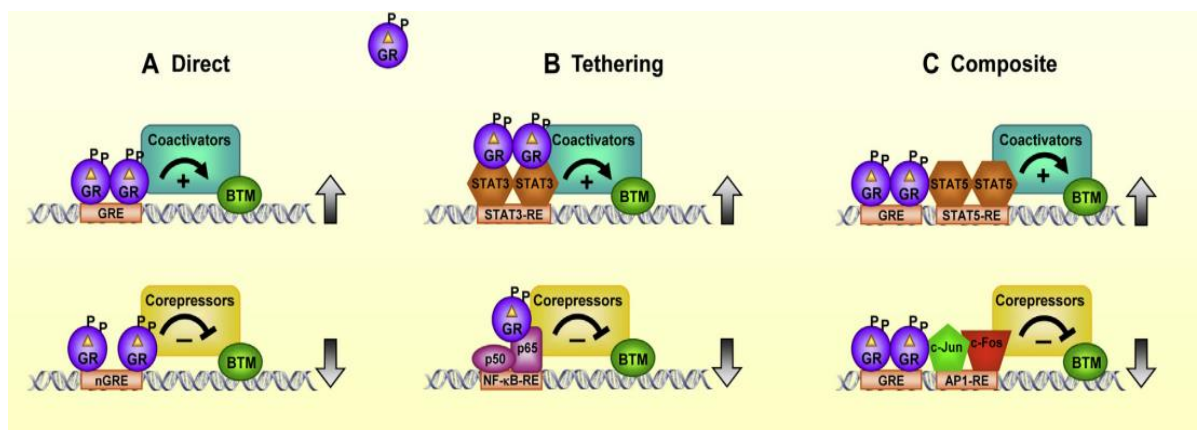
1.3.1 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΟΥ GR

Ο GR, κατά την απουσία του προσδέτη του, εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων σε ανενεργή μορφή, και πιο συγκεκριμένα αποτελεί μέρος ενός μεγάλου πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου, που περιλαμβάνει επίσης πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς όπως η p23 και πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins, hsp56, hsp70 και hsp90), ανοσοφιλίνες όπως οι FKBP51 και FKBP52 και κινάσες τυροσίνης όπως η c-Src. [(Ramamoorthy S., & Cidlowski J. A., 2016) ; (Oakley and Cidlowski, 2013) ; (Cain et al., 2015)]. Σε αυτό το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, ο GR βρίσκεται σε μία στερεοδιαμόρφωση, όπου είναι εκτεθειμένη η επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη (LBD) και έχει μεγάλη συγγένεια για την κορτιζόλη, το πιο άφθονο γλυκοκορτικοειδές στον άνθρωπο. Έπειτα από την σύνδεση του προσδέτη στον GR, υφίσταται μία αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης, κατά την οποία εκτίθενται οι αμινοξικές αλληλουχίες που αποτελούν "σήματα" πυρηνικής εντόπισης, τα NLS-1 και NLS-2, αλλά και η περιοχή "lever arm", και έτσι ο GR υφίσταται διμερισμό και εισέρχεται απευθείας στον πυρήνα μέσω των πυρηνικών πόρων, έπειτα από την πρόσδεσή του σε νουκλεοπορίνες και ιμπορτίνες [(Kadmiel M. et al., 2013) ; (Ramamoorthy S., & Cidlowski J. A., 2016)]. Μετά την είσοδό του στον πυρήνα, ο GR

προσδένεται στο DNA σε εξειδικευμένες αλληλουχίες που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Responsive Elements, GREs). Οι αλληλουχίες αυτές, είναι παλίνδρομες και αποτελούνται από δύο μισά τμήματα (GGAACAnnnTGTTCT), και χωρίζονται ενδιάμεσα από μία τυχαία τρινουκλεοτιδική αλληλουχία. Ο GR, προσδένεται στα GREs ως διμερές, και κάθε ένας υποδοχέας του διμερούς, αλληλεπιδρά με το ένα από τα δύο μισά τμήματα που αναφέρθηκαν. Έτσι, η ενδιάμεση τρινουκλεοτιδική αλληλουχία που χωρίζει τα δύο μισά τμήματα, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για την αλληλεπίδραση του διμερούς με το DNA (Ramamoorthy S., & Cidlowski J. A., 2016). Στη συνέχεια, μετά την αλληλεπίδραση του GR με το DNA, ο GR, υφίσταται εκ νέου δομικές αναδιατάξεις, που του επιτρέπουν να αλληλεπιδρά με διάφορους ρυθμιστές της μεταγραφής και παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, επηρεάζοντας έτσι την δραστηριότητα της RNA πολυμεράσης II, και κατ' επέκταση την επαγωγή ή την καταστολή της μεταγραφής του εκάστοτε γονιδίου στόχου.

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ο GR επάγει ή καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων ποικίλουν. Αρχικά, ο GR, μπορεί να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων μέσω της συμβολής του στην συναρμολόγηση της μεταγραφικής μηχανής. Ειδικότερα, αν η αλληλουχία GRE βρίσκεται σε μικρή απόσταση από το -TATA box, με την πρόσδεσή του ο GR σε αυτό, είναι ικανός να στρατολογήσει βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο TF_{II}D που είναι απαραίτητοι για την σύνθεση του ολοενζύμου της RNA πολυμεράσης II (Revollo J. R. & Cidlowski J. A., 2009). Στην περίπτωση, που η αλληλουχία GRE εντοπίζεται σε μακρινή από το -TATA box απόσταση, ο GR, μέσω της πρόσδεσής του στα GREs, μπορεί να στρατολογήσει συν-ενεργοποιητές, και μέσω της αλληλεπίδρασής του με αυτούς, να λειτουργήσει σαν γέφυρα για το σχηματισμό της βασικής μεταγραφικής μηχανής, ενώ επίσης, μπορεί να στρατολογήσει και άλλους ρυθμιστές όπως ακετυλ-τρανσφεράσες των ιστονών όπως οι CBP, p300 και p/CAF ή ATP-εξαρτώμενους παράγοντες αναδιάταξης της χρωματίνης όπως οι SWI/SNF (Revollo J. R. & Cidlowski J. A., 2009). Επιπλέον, ο GR μπορεί να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων, χωρίς να αλληλεπιδρά άμεσα με το DNA, αλλά μέσω της αλληλεπίδρασής του με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που είναι συνδεδεμένοι με το DNA. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να επάγει την στρατολόγηση συνενεργοποιητών που συμμετέχουν στο σχηματισμό της βασικής μεταγραφικής μηχανής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί η αλληλεπίδραση του GR με μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας STAT (Oakley and Cidlowski, 2013).

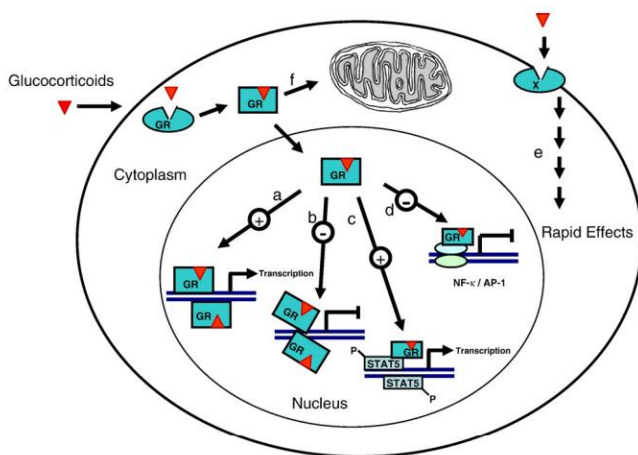
Άλλοι, γονιδιωματικοί μηχανισμοί σηματοδότησης του GR, αφορούν την καταστολή της μεταγραφής γονιδίων. Γονιδιωματικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι εκτός από τα στοιχεία απόκρισης των γλυκοκορτικοειδών, που ονομάζονται και θετικά στοιχεία απόκρισης γλυκοκορτικοειδών (positive GREs, pGREs), υπάρχουν και αρνητικά στοιχεία απόκρισης των γλυκοκορτικοειδών (negative GREs, nGREs). Οι αλληλουχίες αυτές, είναι παλίνδρομες αλληλουχίες του τύπου CTCC(n)0-2GGAGA, αλλά διαφέρουν από τα κλασσικά GREs, και διαθέτουν μία ενδιάμεση αλληλουχία που αποτελείται από 0 έως 2 νουκλεοτίδια και τα δύο τμήματα καταλαμβάνονται από 2 μονομερή του GR, χωρίς να πραγματοποιηθεί διμερισμός (Oakley and Cidlowski, 2013). Ο GR, μπορεί να καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων με άμεσο τρόπο, μέσω της πρόσδεσής του στα nGREs, και παρεμπόδισης της σύνθεσης της βασικής μεταγραφικής μηχανής, είτε χωρίς πρόσδεση στο DNA, μέσω έμμεσης αλληλεπίδρασης με μεταγραφικούς παράγοντες όπως στην περίπτωση της παρεμπόδισης της μεταγραφής προ-φλεγμονώδων κυτοκινών μέσω αλληλεπίδρασής του με τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, ασκώντας έτσι, τις αντιφλεγμονώδεις του δράσεις [(Cain et al., 2015) ; (Oakley and Cidlowski, 2013)]. Τέλος, τα δύο μονομερή του GR, μπορεί να προσδένονται σε nGREs και να επάγουν τη στρατολόγηση καταστολέων που παρεμποδίζουν την έναρξη της μεταγραφής. (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των γονιδιωματικών μηχανισμών σηματοδότησης του GR. Α. Μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με GREs/nGREs, επάγοντας ή καταστέλλοντας τη μεταγραφή. Β. Μέσω πρόσδεσης σε μεταγραφικούς παράγοντες που είναι ήδη προσδεδεμένοι στο DNA. Γ. Μέσω σύνθετης αλληλεπίδρασης με GREs/nGREs και μεταγραφικούς παράγοντες που είναι προσδεδεμένοι στο DNA και στρατολόγηση συνενεργοποιητών/συνκαταστολέων (Oakley and Cidlowski, 2013).

1.3.2 ΜΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΟΥ GR

Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, ο GR αυξάνει το φάσμα των βιολογικών του δράσεων, διαθέτοντας και μηχανισμούς σηματοδότησης που δεν αφορούν την επαγωγή ή την καταστολή της μεταγραφής γονιδίων και κατ' επέκταση την σύνθεση πρωτεϊνών, επομένως δεν λαμβάνουν χώρα σε μεγάλα χρονικά διαστήματα, αλλά πραγματοποιούνται σε διάστημα μεταξύ μερικών δευτερολέπτων έως μερικών λεπτών (Oakley and Cidlowski, 2013). Κάποιες από αυτές τις δράσεις, αφορούν την επαγωγή καταρρακτών φωσφορυλιώσεων από κινάσες, όπως πραγματοποιείται κατά την απελευθέρωση του GR και της κινάσης Src από το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα κατά την πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών (Ramamoorthy S., 2016). Επιπλέον, έχουν αναφερθεί και πολλοί σηματοδοτικοί μηχανισμοί του GR, μέσω των οποίων επηρεάζεται η δραστηριότητα κινάσων των μονοπατιών PI3K/Akt και MAPK (Revollo J. R. & Cidlowski J. A., 2009). Ακόμη, έχει εντοπιστεί ισομορφή του GR, συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη, επηρεάζοντας τις φυσικοχημικές ιδιότητες της, και μάλιστα η αλληλεπίδραση του GR με την καβεολίνη 1 της μεμβράνης, έχει συνδεθεί με τη ρύθμιση της διακυτταρικής επικοινωνίας μέσω χασμοσυνδέσμων και κατ' επέκταση την ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των προγονικών νευρικών κυττάρων [(Timmerman S. et al., 2019) ; (Oakley and Cidlowski, 2013)]. Τέλος, πολύ σημαντικές δράσεις του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών αφορούν τη δράση τους στο μιτοχόνδριο. Πιο συγκεκριμένα, έχει φανεί ότι ο GR μπορεί να προσδένεται σε εξειδικευμένες μιτοχονδριακές αλληλουχίες, επάγοντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, οδηγώντας έτσι στην αύξηση της παραγωγής ATP (Psarra, A.-M. G., & Sekeris, C. E., 2008 & 2011).



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

1.4 ΑΠΟΠΤΩΣΗ

1.4.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι μία βιολογική διαδικασία που πραγματοποιείται με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης, και ρυθμίζεται με μεγάλη ακρίβεια, ώστε κάθε κύτταρο να εξυπηρετεί τις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού. Κατά την απόπτωση πραγματοποιούνται συγκεκριμένες μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα, οι οποίες απορρέουν από πολλές βιοχημικές διαδικασίες που εξαρτώνται από την κατανάλωση ενέργειας. Σε αντίθεση με τον κυτταρικό θάνατο που πραγματοποιείται από τυχαία γεγονότα και ονομάζεται νέκρωση, η απόπτωση είναι ενεργή διαδικασία που εξελίσσεται από μία χαρακτηριστική σειρά κυτταρικών μεταβολών (Hengartner M. O., 2000). Ειδικότερα, κατά την απόπτωση, αρχικά το χρωμοσωμικό DNA τεμαχίζεται ανάμεσα στα νουκλεοσώματα με αποτέλεσμα την συρρίκνωση της χρωματίνης και κατ' επέκταση την συρρίκνωση ολόκληρου του πυρήνα του κυττάρου. Ακόμη, το ίδιο το κύτταρο μικραίνει σε μέγεθος και κατακερματίζεται σε μικρότερα τμήματα που περιβάλλονται από κυτταρική μεμβράνη. Τα μικρότερα αυτά τμήματα ονομάζονται αποπτωτικά σωμάτια (apoptotic bodies) (Elmore S., 2007). Αυτά, εκφράζουν στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης ειδικά σήματα -τα οποία δεν εντοπίζονται σε υγιή κύτταρα που δεν οδεύουν σε διαδικασία απόπτωσης- και αναγνωρίζονται άμεσα από μακροφάγα ή/και γειτονικά κύτταρα, ώστε να απομακρυνθούν ταχύτατα από τους ιστούς. Παράδειγμα, αυτών των σημάτων αποτελεί η φωσφατιδυλοσερίνη, ένα φωσφολιπίδιο που φυσιολογικά εντοπίζεται στην εσωτερική στιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ κατά την απόπτωση μετατοπίζεται στην εξωτερική, και εντοπίζεται από υποδοχείς φαγοκυττάρων, με σκοπό την άμεση απομάκρυνση τους, και την αποφυγή δημιουργίας φλεγμονής (Mousavi S. H., 2008).

Οι περισσότερες από τις μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται κατά την διαδικασία της απόπτωσης οφείλονται στην δράση των κασπασών, οι οποίες θεωρούνται οι εκτελεστές της απόπτωσης. Οι κασπάσες, αποτελούν μέρος μίας μεγάλης οικογένειας πρωτεασών κυστεΐνης, και είναι πολύ συντηρημένες από τους νηματώδεις μέχρι και τον άνθρωπο (Hengartner M. O., 2000). Περίπου τα 2/3 των κασπασών που έχουν εντοπιστεί στον άνθρωπο δρουν κατά την απόπτωση, και πέπτουν μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων. Οι κασπάσες, διαθέτουν ένα ενεργό κέντρο

κυστεΐνης, πέπτουν τα υποστρώματά τους σε δεσμούς μετά από κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος και το είδος των υποστρωμάτων που πέπτουν, καθορίζεται από τα 4 αμινοτελικά κατάλοιπα του ενεργού τους κέντρου [(Hengartner M. O., 2000) ; (Geske F. J., & Gerschenson L. E., 2001)]. Οι κασπάσες, διαθέτουν πολύ μεγάλο πλήθος υποστρωμάτων, και η δράση τους σχετίζεται με την αναστολή της δράσης πρωτεϊνών στόχων όπως αρνητικούς ρυθμιστές της απόπτωσης, ή με την ενεργοποίηση πρωτεϊνών στόχων, όπως για παράδειγμα νουκλεάσες που συμβάλλουν στον κατακερματισμό της χρωματίνης. Οι κασπάσες, συνήθως παράγονται ως ανενεργά προένζυμα, τα οποία ονομάζονται προκασπάσες και στη συνέχεια μετατρέπονται στις ενεργές κασπάσες έπειτα από πρωτεόλυση. Οι κασπάσες, έχουν την ικανότητα να αυτοενεργοποιούνται αλλά και να πρωτεολύουν και να ενεργοποιούν άλλες κασπάσες, προκαλώντας έτσι έναν καταρράκτη ενεργοποίησης. Αυτός ο καταρράκτης ενεργοποίησης, διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην επαγωγή και την ενίσχυση των αποπτωτικών σημάτων, οδηγώντας έτσι με ταχύτατο τρόπο το κύτταρο στην απόπτωση [(Fulda S., & Debatin, K.-M., 2008) ; (FAN T.-J. & HAN L.-H., 2005)]. Τέλος, οι κασπάσες διαφοροποιούνται με βάση το ρόλο τους στην απόπτωση σε δύο κατηγορίες, τις εναρκτήριες που ξεκινούν τον πρωτεολυτικό καταρράκτη ενεργοποίησης (κασπάσες 2,8,9 και 10) και τις εκτελεστικές κασπάσες, των οποίων ο ρόλος αφορά την πρωτεόλυση των πρωτεϊνών στόχων σε μετέπειτα στάδια της απόπτωσης (κασπάσες 3,6 και 7) (FAN T.-J. & HAN L.-H., 2005).

1.4.2 ΕΞΩΓΕΝΕΣ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

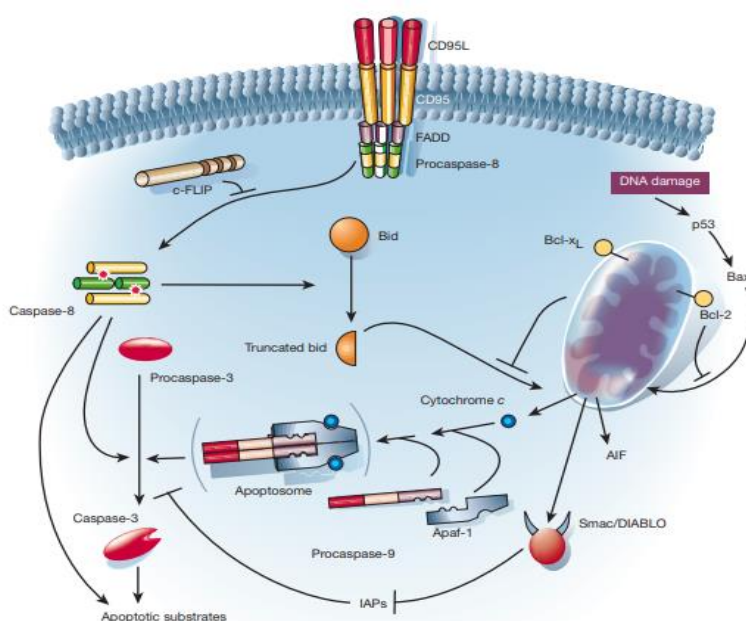
Η απόπτωση λαμβάνει χώρα -ανάλογα με το αρχικό ερέθισμα- κυρίως μέσω δύο μονοπατιών, που διαφοροποιούνται στην εναρκτήρια φάση όσον αφορά τους μηχανισμούς σηματοδότησης, αλλά καταλήγουν και τα δύο στην ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών. Το πρώτο μονοπάτι, αυτό της εξωγενούς οδού της απόπτωσης διαμεσολαβείται από διαμεμβρανικούς υποδοχείς θανάτου, που ανήκουν στην υπεροικογένεια του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor Receptor, TNF-R). Οι υποδοχείς αυτοί, διαθέτουν μία συντηρημένη εξωκυτταρική επικράτεια πλούσια σε κυστεΐνες, και μία κυτταροπλασματική επικράτεια περίπου 80 καταλοίπων, που ονομάζεται "επικράτεια θανάτου". Το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης είναι καλύτερα χαρακτηρισμένο για τους υποδοχείς FasL/FasR και TNF-α/TNFR1 με τους αντίστοιχους προσδέτες τους. Το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι, ξεκινά με την αλληλεπίδραση του προσδέτη με τον υποδοχέα, και στη συνέχεια στρατολογούνται πρωτεΐνες προσαρμογείς που διαθέτουν αντίστοιχες επικράτειες με την κυτταροπλασματική επικράτεια θανάτου του υποδοχέα. Για παράδειγμα, η πρόσδεση του Fas στον υποδοχέα του Fas-R, έχει ως αποτέλεσμα την πρόσδεση της πρωτεΐνης προσαρμογέα FADD στην επικράτεια θανάτου, ενώ η πρόσδεση του TNF-α στον TNFR1 επάγει την πρόσδεση της TRADD στην επικράτεια θανάτου. Εν συνεχεία, η επικράτεια θανάτου διμερίζεται και συνδέεται με την προκασπάση-8. Σε αυτό το σημείο, το σύμπλοκο που δημιουργείται, ονομάζεται σήμα επαγωγής κυτταρικού θανάτου (Death inducing signaling complex, DISC). Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου, έχει ως αποτέλεσμα την αυτοενεργοποίηση μέσω πρωτεόλυσης της προκασπάσης-8 και -10, μετατρέποντάς τις στις ενεργές κασπάσες -8 και -10 αντίστοιχα. Έπειτα αυτές, ενεργοποιούν τις κασπάσες -3, -6 και -7, οι οποίες ξεκινούν και πέπτουν τα υποστρώματά τους, οδηγώντας στην απόπτωση. Ο κύριος αρνητικός ρυθμιστής της επαγόμενης από κυτταρικούς υποδοχείς θανάτου απόπτωσης είναι η c-FLIP, η οποία αναστέλλει το σχηματισμό του DISC και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση των κασπασών -8 και -10 [(Elmore S., 2007) ; (Mita M., et al, 2006) ; (Mousavi S. H., 2008)].

1.4.3 ΕΝΔΟΓΕΝΕΣ - ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Το ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι, περιλαμβάνει σήματα που η δράση τους δεν διαμεσολαβείται από κάποιο υποδοχέα, και τα οποία στη συνέχεια επάγουν την παραγωγή άλλων ενδοκυτταρικών σημάτων που με τη σειρά τους ξεκινούν μία αλληλουχία γεγονότων που περιλαμβάνουν τη δράση διάφορων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Τα σήματα που επάγουν την έναρξη της απόπτωσης μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού, είναι πολυάριθμα και δρουν με θετικό ή αρνητικό τρόπο. Για παράδειγμα, στα αρνητικά σήματα, συμπεριλαμβάνεται η έλλειψη αυξητικών παραγόντων, συγκεκριμένων ορμονών ή κυτοκινών, που υπό φυσιολογικές συνθήκες επάγουν την καταστολή της απόπτωσης. Αντίθετα, τα θετικά σήματα επαγωγής της απόπτωσης περιλαμβάνουν ιικές μολύνσεις, ιονίζουσα ακτινοβολία που προκαλεί βλάβες στο DNA, συνθήκες υποξίας, υπερθερμία, παρουσία ελευθέρων ριζών και τοξίνες. Όλα τα παραπάνω ερεθίσματα, προκαλούν μεταβολές στην διαπερατότητα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, επάγοντας την έναρξη της απόπτωσης [(Fulda S., & Debatin K.-M., 2006) ; (Mousavi S. H., 2008)]. Πιο συγκεκριμένα, μέσω του σχηματισμού πόρων, μεταβάλλεται το δυναμικό μεταξύ των μιτοχονδριακών μεμβρανών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση προαποπτωτικών πρωτεϊνών από το διαμεμβρανικό χώρο στο κυτταρόπλασμα (Elmore S., 2007). Η πρώτη ομάδα πρωτεϊνών που απελευθερώνονται από στο κυτταρόπλασμα αποτελείται από το κυτόχρωμα c, τις Smac/DIABLO και την πρωτεάση σερίνης HtrA2/Omi. Μετά την απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα, το κυτόχρωμα c, προσδένεται στο C-τελικό άκρο του προσαρμογέα του παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης (Adaptor molecule apoptosis-inducing factor 1, Araf-1), μίας κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης που διαθέτει μία N-τελική επικράτεια στρατολόγησης της προκασπάσης-9 (caspase-recruitment domain, CARD), δημιουργώντας ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που ονομάζεται αποπτώσωμα. Ο σχηματισμός του αποπτωσώματος, έχει ως αποτέλεσμα την εξαρτώμενη από ATP πρωτεόλυση της προκασπάσης-9, μετατρέποντας την στην ενεργή κασπάση-9 [(Mita M., et al, 2006) ; (Fulda S., & Debatin K.-M., 2006)]. Ακολούθως, προσδένεται στο αποπτώσωμα η προκασπάση-3 και ενεργοποιείται μέσω πρωτεόλυσης από την ενεργή πλέον εναρκτήρια κασπάση-9, ενώ στη συνέχεια ενεργοποιούνται και οι εκτελεστικές κασπάσες -6 και -7, ξεκινώντας να πέπτουν τα υποστρώματά τους. Ο ρόλος των Smac/DIABLO και HtrA2/Omi, είναι να προωθούν την απόπτωση μέσω αναστολής των αναστολέων της απόπτωσης IAPs (Inhibitors of Apoptosis, IAPs) (Elmore S., 2007). Όπως λοιπόν περιγράφηκε ανωτέρω, το μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης, ξεκινά με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στον κυτταρόπλασμα, ωστόσο οι πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τον έλεγχο αυτής της διαδικασίας, είναι οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια Bcl-2. Μερικές από τις πρωτεΐνες της υπεροικογένειας Bcl-2 είναι προαποπτωτικές, δηλαδή είναι αγωνιστές του κυτταρικού θανάτου όπως οι Bak, Bcl-Xs, Bid, Bim και Bad, ενώ μερικές άλλες, είναι αντιαποπτωτικές, δηλαδή είναι ανταγωνιστές του κυτταρικού θανάτου όπως οι Bcl-2, Bcl-XL, Bfl-1 και Mcl-1. Οι περισσότερες αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της υπεροικογένειας Bcl-2, δρουν αναστέλλοντας ανοδικά το μονοπάτι ενεργοποίησης των κασπασών, ή μέσω απομάκρυνσης των ενεργών κασπασών. Για παράδειγμα οι Bcl-2 και Bcl-XL, δρουν ανταγωνιστικά, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 στο αποπτώσωμα, ενώ οι προαποπτωτικές Bax και Bak, όπου μέσω ετεροδιμερισμού τους, και το σχηματισμό πόρων στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, επάγουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα. Συνοπτικά, η απόπτωση μέσω της μιτοχονδριακής οδού, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ισορροπία μεταξύ προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 [(Ola M. S., Nawaz, M., & Ahsan H., 2011) ; (Kuwana T., & Newmeyer D. D., 2003) ; (Mita M., et al, 2006)].

Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση των δύο κύριων αποπτωτικών οδών.

Αριστερά, απεικονίζεται το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης, όπου μετά την σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα κυτταρικού θανάτου, ενεργοποιείται η κασπάση-8 στο DISC και επάγει την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, που πέπτει τα υποστρώματά της, οδηγώντας στην απόπτωση. Δεξιά, απεικονίζεται η μιτοχονδριακή αποπτωτική οδός. Οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bak, ετεροδιμερίζονται επάγοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 στο αποπτώσωμα. Αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί τις εκτελεστικές κασπάσες -3, -6 και -7, που πέπτουν τα υποστρώματά τους. Σημαντικό ρόλο παίζει και η κασπάση -8 που οδηγεί στην ενεργοποίηση της προαποπτωτικής Bid μέσω πρωτεόλυσης, όπου ενεργοποιεί την Bax (Hengartner M. O., 2000).



1.4.4 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΑΠΟ ΤΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ

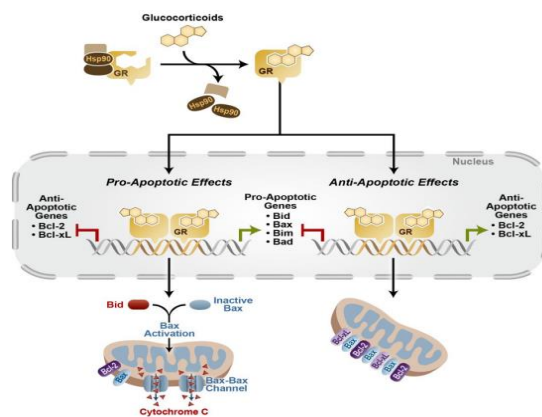
Τα γλυκοκορτικοειδή, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, έχουν πολύ μεγάλο εύρος δράσης στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς επηρεάζουν την έκφραση πολύ μεγάλου αριθμού γονιδίων, δρώντας με ιστοειδικό τρόπο. Παρόλο που χρησιμοποιούνται ευρέως τις τελευταίες δεκαετίες ως φαρμακευτικά σκευάσματα λόγω των ισχυρών ανοσοκατασταλτικών και των αντιφλεγμονωδών δράσεων τους, πολύ συχνά εμφανίζουν πληθώρα ανεπιθύμητων παρενεργειών. Κάποιες από τις παρενέργειες αυτές, απορρέουν από το γεγονός ότι ο GR, - ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο- λειτουργεί ως καθοριστικός ρυθμιστής της απόπτωσης. Σε κάποιους τύπους κυτάρων, ο GR διαθέτει ισχυρή προαποπτωτική δράση, ενώ σε άλλους δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της απόπτωσης (Gruver-Yates A., & Cidlowski J., 2013). Παραδείγματα συστημάτων στα οποία ο GR επηρεάζει την απόπτωση αποτελούν το νευρικό σύστημα, το ανοσοποιητικό, το σκελετικό, το κυκλοφορικό, το μυϊκό και το αναπαραγωγικό σύστημα.

Έχουν αναφερθεί σε μελέτες πολλοί μηχανισμοί μέσω των οποίων ο GR επηρεάζει την απόπτωση, αλλά ο κύριος μηχανισμός αφορά την ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής αποπτωτικής οδού και πηγάζει από την μεταβολή των επιπέδων προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, και κατά συνέπεια τη μεταβολή της ισορροπίας μεταξύ αυτών [(Smith, L. K., & Cidlowski, J. A. (2010) ; (Gruver-Yates A., & Cidlowski J., 2013). Ειδικότερα, τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν έμμεσα την μεταγραφή του γονιδίου της προαποπτωτικής Bid, η οποία, έπειτα από ενεργοποίηση από την κασπάση -8, επάγει την ενεργοποίηση των προαποπτωτικών Bax/Bak, μέσω των οποίων διαταράσσεται το δυναμικό της μεμβράνης των μιτοχονδρίων, και απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα το κυτόχρωμα c και άλλες προαποπτωτικές πρωτεΐνες που παρεμποδίζουν τη δράση των αναστολέων της απόπτωσης IAPs. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 στο αποπτώσωμα και την επακόλουθη ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασιών -3, -6 και -7. Επιπλέον, έχει φανεί πως η δράση των γλυκοκορτικοειδών σε πολλούς κυτταρικούς τύπους στους οποίους προωθεί την απόπτωση, επάγει την αυξορρύθμιση των γονιδίων των προαποπτωτικών Bad και Puma και την μειορρύθμιση των γονιδίων των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-XI [(Herr

I., et al., 2006) ; (Gruver-Yates A., & Cidlowski J., 2013)]. Τέλος, τα γλυκοκορτικοειδή, μπορούν να επάγουν την απόπτωση και μέσω της ενεργοποίησης του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης, επηρεάζοντας την μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για τους υποδοχείς κυτταρικού θανάτου (Herr I., et al., 2006).

Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα συστήματος που τα GCs ασκούν τις αποπτωτικές τους δράσεις, είναι το σκελετικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, τα GCs έχουν ισχυρή αντιπαραπλασματική και προαποπτωτική δράση στους οστεοβλάστες, τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό των οστών. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω προώθησης της μεταγραφής γονιδίων προαποπτωτικών πρωτεϊνών όπως οι η Bim, και παρεμπόδισης της μεταγραφής γονιδίων αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως Bcl-2, Bcl-Xl, και Mcl-1. Το γεγονός αυτό, εξηγεί και μία από τις σημαντικότερες ανεπιθύμητες παρενέργειες της χρόνιας χορήγησης γλυκοκορτικοειδών, που είναι η οστεοπόρωση. Παρόμοια είναι η δράση των γλυκοκορτικοειδών και στα χονδροκύτταρα (Gruver-Yates A., & Cidlowski J., 2013). Ακόμη, η μυϊκή ατροφία, αποτελεί επίσης σημαντική παρενέργεια της παρατεταμένης χορήγησης GCs, καθώς επάγουν τον καταβολισμό πρωτεϊνών στις μυϊκές ίνες, και προωθούν την απόπτωση. Στην περίπτωση αυτή έχει φανεί ότι πραγματοποιείται ενεργοποίηση του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης, καθώς τα GCs επάγουν την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα κυτταρικού θανάτου Fas-R, και η ενεργοποίηση του μετά τη σύνδεση του προσδέτη Fas-L, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 και κατ' επέκταση κι άλλων εκτελεστικών κασπασών (Gruver-Yates A., & Cidlowski J., 2013). Στο κυκλοφορικό σύστημα τα GCs, επάγουν επίσης τις προαποπτωτικές δράσεις τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην αύξηση της ενδοαγγειακής πίεσης μέσω της αλλοίωσης των τοιχωμάτων των αγγείων. Ακόμη, πολλοί τύποι κυττάρων του νευρικού συστήματος υφίστανται απόπτωση επαγόμενη από τα GCs. Σε αυτούς τους τύπους κυττάρων περιλαμβάνονται οφθαλμικά κύτταρα, και πιο συγκεκριμένα κύτταρα του δοκιδωτού πλέγματος που στραγγίζουν το υδατοειδές υγρό, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης και ανάπτυξη γλαυκώματος. Στα κύτταρα του νευρικού συστήματος που υφίστανται απόπτωση από τα GCs, συμπεριλαμβάνονται και νευρώνες του εγκεφάλου. Τέλος, η παρατεταμένη χρήση GCs έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαβήτη τύπου II. Εκτός από τις επιδράσεις τους στο μεταβολισμό της γλυκόζης, τα παγκρεατικά κύτταρα που παράγουν και εκκρίνουν την ινσουλίνη, είναι πολύ ευαίσθητα όσον αφορά τις προαποπτωτικές δράσεις των GCs, ενισχύοντας έτσι τις υπεργλυκαιμικές δράσεις του GR [(Herr I., et al., 2006) ; (Gruver-Yates A., & Cidlowski J., 2013)].

Παρόλο που υπάρχει μεγάλος αριθμός κυτταρικών τύπων, στους οποίους η δράση των GCs επάγει την απόπτωση, υπάρχουν και κάποιες περιπτώσεις κυτταρικών τύπων όπου τα GCs, δρουν προστατευτικά παρεμποδίζοντας την απόπτωση. Σε αυτούς τους τύπους κυττάρων συγκαταλέγονται κύτταρα του ανοσοποιητικού όπως τα ανώριμα δένδριτικά κύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killer cells, NK κύτταρα). Ακόμη, τα GCs, δρουν ως καρδιοπροστατευτικά καθώς αναστέλλουν την απόπτωση στα καρδιομυοκύτταρα, ενώ παρόμοια είναι η δράση τους και στα μεσαγγειακά κύτταρα των νεφρών, αναστέλλοντας την απόπτωση που επάγεται από στρες, μειώνοντας τα επίπεδα προαποπτωτικών και αυξάνοντας αυτά των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών. Τέλος, άλλοι τύποι κυττάρων όπου τα GCs τα προστατεύουν από την απόπτωση είναι ηπατικά κύτταρα, λιποκύτταρα και τα ωοθυλακικά κύτταρα. Όπως γίνεται λοιπόν αντιληπτό από τα παραπάνω, η δράση των GCs όσον αφορά την απόπτωση είναι πολύ εξειδικευμένη και διαφέρει ανάλογα με τον ιστό ή/και τον κυτταρικό τύπο (Gruver-Yates A., & Cidlowski J., 2013).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης των GCs στα πρωτεϊνικά επίπεδα και κατ' επέκταση στην ισορροπία μεταξύ προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένεια Bcl-2 (Gruver-Yates A., & Cidlowski J., 2013).

1.5 ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

Τα αιθέρια έλαια είναι εκχυλίσματα που παράγονται από αρωματικά φυτά, έχουν μεγάλη αντοχή στην υδρόλυση και αποτελούν πολύ σύνθετα μείγματα πολύπλοκων χημικών ενώσεων που αποτελούν κυρίως προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Η παραγωγή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω εκχύλισης που περιλαμβάνει συμπίεση ή απόσταξη και απομονώνονται από διάφορα ανατομικά μέρη του φυτού. Χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια σε διαφορετικούς βιομηχανικούς κλάδους, κυρίως σε αυτόν των καλλυντικών και των προϊόντων περιποίησης, ενώ επίσης χρησιμοποιούνται ευρέως και ως πρόσθετα αρωματικά τροφίμων. Είναι γνωστό εδώ και πολλά χρόνια, πως ορισμένα αιθέρια έλαια που εκχυλίζονται από αρωματικά φυτά διαθέτουν ισχυρές αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές δράσεις, ενώ πλέον έχει στραφεί το ερευνητικό ενδιαφέρον και στην αναζήτηση περισσότερων βιολογικών δράσεων και πιθανών θεραπευτικών ιδιοτήτων που διαθέτουν, καθώς ορισμένες από τις χημικές ενώσεις που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα μείγματα αυτά, υποστηρίζεται από αυξανόμενο αριθμό ερευνών πως πιθανόν να έχουν αντιφλεγμονώδεις ή/και αντικαρκινικές δράσεις (Elshafie H. S., & Camele I., 2017).

1.5.1 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΡΙΓΑΝΗΣ - ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Το φυτό της ρίγανης είναι ένα πολυετές αρωματικό φυτό, με αιθαλές φύλλωμα, το οποίο ανήκει στο γένος *Origanum*, και καλλιεργείται κυρίως σε μεσογειακές χώρες και σε ορισμένες χώρες της Κεντρικής Ασίας. Το φυτό της ρίγανης, φτάνει σε ύψος τα 30-90 εκατοστά, ενώ τα φύλλα του έχουν μήκος 2-3 εκατοστά. Στην πραγματικότητα, η ονομασία ρίγανη αναφέρεται σε πλήθος διαφορετικών φυτών που έχουν παρόμοια γεύση και οσμή, και ανήκουν σε 6 βοτανικές οικογένειες. Οι οικογένειες *Lamiaceae* και *Verbenaceae*, είναι αυτές με το μεγαλύτερο οικονομικό ενδιαφέρον, ενώ το είδος *Origanum vulgare* (*Lamiaceae*), είναι από τα καλύτερα μελετημένα είδη. Στην Ελλάδα, εκτός από το *Origanum vulgare*, είναι επίσης πολύ γνωστά και τα είδη *Origanum hirtum* και *Origanum Onites* [(Diniz do Nascimento et al., 2020) ; (Spyridopoulou K., et al., 2019)].

Εδώ και πάρα πολλά χρόνια αποξηραμένα φύλλα του φυτού της ρίγανης αλλά και το αιθέριο έλαιο που παράγεται μέσω απόσταξης χρησιμοποιούνται ως φυσικά αρωματικά και πρόσθετα τροφίμων, αποτελώντας πόρους μεγάλης οικονομικής σημασίας στην βιομηχανία τροφίμων, ενώ επιπλέον το αιθέριο έλαιο της ρίγανης χρησιμοποιούνταν τα παλαιότερα χρόνια και για την ήπια θεραπεία γαστρεντερικών διαταραχών, τη βρογχίτιδα, την ταχυκαρδία, την υπέρταση και διαταραχές του αναπνευστικού συστήματος (Tepe B., et al., 2016). Επιπλέον, εκτός από τις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, που είναι γνωστές εδώ και πολλά χρόνια, τα τελευταία χρόνια, ολοένα και αυξάνεται ο όγκος των επιστημονικών δεδομένων που υποστηρίζουν πιθανές αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες του, και οι οποίες πιθανόν να οφείλονται σε ενώσεις που ονομάζονται τερπενοειδή και περιέχονται σε αυτό [(Spyridopoulou K., et al., 2019) ; (Kaliora A. C., & Kountouri A. M., 2012)].

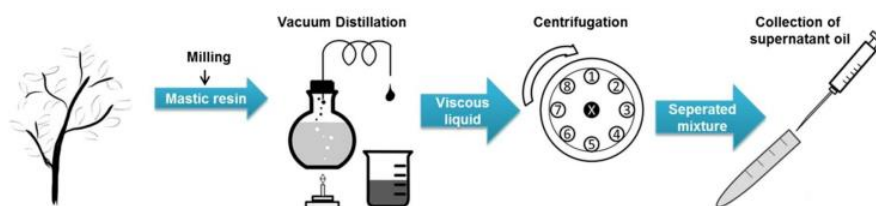
Το ριγανέλαιο στην πλειονότητα των περιπτώσεων παρασκευάζεται μέσω αποξήρανσης των φύλλων και του βλαστού των φυτών, και στη συνέχεια μέσω απόσταξης ατμού παράγεται το συμπυκνωμένο αιθέριο έλαιο. Όσον αφορά την ακριβή χημική του σύσταση και την περιεκτικότητα του στις διάφορες ενώσεις, αυτό είναι κάτι που εξαρτάται από μεγάλο πλήθος παραγόντων. Σε αυτούς συγκαταλέγεται το είδος στο οποίο ανήκει το φυτό από όπου παράγεται το αιθέριο έλαιο, οι συνθήκες καλλιέργειας και ανάπτυξης αλλά και η μέθοδος της απόσταξης (υδραπόσταξη ή ατμού). Ωστόσο, έχει φανεί σε μελέτες που χρησιμοποιήθηκε αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας (GC/MS) για την ανάλυση των χημικών ουσιών που περιέχονται σε ριγανέλαιο πως οι κυριότερες ενώσεις είναι η καρβακρόλη που βρίσκεται σε ποσοστό 50%-85% και η θυμόλη, που είναι αρωματικά τερπενοειδή, και το β-σιμένιο που είναι μονοτερπένιο. Άλλες ενώσεις που περιέχονται σε μικρότερα ποσοστά είναι μονοτερπένια όπως το σαμπινένιο, το γ-τερπινένιο και η λιναλόλη, ενώ τέλος περιλαμβάνονται και σесκιτερπένια όπως το β-καρυοφυλλένιο [(De Falco E. et al., 2013) ; (Spyridopoulou K., et al., 2019) (Leyva-López, N., et al., 2017)].

Όσον αφορά τις βιολογικές δράσεις του ριγανέλαιου, υπάρχει πληθώρα μελετών που αναφέρουν την ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης μεγάλου αριθμού ειδών βακτηρίων τόσο των Gram+ όσο και των Gram- αλλά και μυκήτων (Tepe B., et al., 2016). Επιπλέον, έχει φανεί πως έχει αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες, δρώντας ενάντια στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές A375 (κύτταρα μελανώματος), MCF-7 (κύτταρα καρκίνου του μαστού), HepG2 (κύτταρα ηπατοκαρκινώματος) και HT-29 (κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου), έπειτα από επώασή τους για 72h με το ριγανέλαιο, με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (Spyridopoulou K., et al., 2019). Επιπλέον, έχει φανεί *in vitro* πως το ριγανέλαιο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση σε μετασχηματισμένους εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικών (5RP7), ενώ επίσης φάνηκε πως αναστέλλει και τη διαδικασία σχηματισμού σωλήνων που είναι απαραίτητη κατά την αγγειογένεση (Leyva-López, N., et al., 2017). Ακόμα, οι αντικαρκινικές δράσεις του ριγανέλαιου έχουν φανεί και *in vivo*, καθώς σε μία μελέτη φάνηκε πως η χορήγηση σε χαμηλές δόσεις για χρονικό διάστημα 3 μηνών, σε ποντικούς με καρκίνωμα Lewis, είχε προστατευτική δράση, μειώνοντας το μέγεθος του όγκου κατά 1,5 φορές (Misharina T.A et al., 2013). Τέλος, εκτός από τις αντιπολλαπλασιαστικές, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν και αντιφλεγμονώδεις δράσεις του αιθέριου ελαίου της ρίγανης. Ειδικότερα, φάνηκε πως συστατικά που βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση στο ριγανέλαιο, όπως η καρβακρόλη και η θυμόλη, μειώνουν τα επίπεδα των ενεργών ριζών O₂ (ROS) και το μονοξείδιο του αζώτου, που είναι διαμεσολαβητές της φλεγμονής, σε ενεργοποιημένα από λιποσακχαρίτες του τοιχώματος βακτηρίων μακροφάγα RAW 264.7. Ακόμη, οι ίδιες ενώσεις, φάνηκε να μειώνουν την παραγωγή TNF-α, ιντερλευκίνης -1β και ιντερλευκίνης -6 σε ενεργοποιημένα ανθρώπινα μακροφάγα (THP-1). Οι παρατηρήσεις αυτές έγιναν και *in vivo*, όταν η καρβακρόλη του αιθέριου ελαίου λεβάντας χορηγήθηκε σε ποντίκια με οίδημα και παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της ιντερλευκίνης -1β, της προσταγλαδίνης E2 και των επιπέδων του mRNA της κυκλοξυγενάσης-2 (COX-2) (Leyva-López, N., et al., 2017).

1.5.2 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΜΑΣΤΙΧΑΣ – ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Το μαστιχόδεντρο (*Pistacia lentiscus*), είναι ένας αειθαλής θάμνος, ο οποίος εμφανίζει μεγάλη εξάπλωση στον Μεσογειακό χώρο. Ωστόσο, η μοναδική ποικιλία που παράγει τη μαστίχα Χίου, φύεται στο ελληνικό νησί της Χίου (*Pistacia lentiscus var Chia*), και πιο συγκεκριμένα στις νότιες περιοχές του νησιού και ονομάζεται και μαστιχοφόρος σχίνος. Η μαστίχα Χίου αποτελεί μία ρητινώδη έκκριση του μαστιχόδεντρου σε οβάλ σχήμα, η οποία συλλέγεται μέσω μικρών τομών που πραγματοποιούνται στον κορμό ή τους κλάδους του φυτού με τη χρήση αιχμηρού αντικειμένου. Η μαστίχα Χίου, αποτελεί ένα φυσικό προϊόν το οποίο χρησιμοποιείται ως φυσικό πρόσθετο τροφίμων, όπως αντίστοιχα και το μαστιχέλαιο, το οποίο είναι το αιθέριο έλαιο που παράγεται από τη μαστίχα Χίου. Ειδικότερα, μετά τη συλλογή της μαστίχας Χίου, όταν αποκτήσει στερεή μορφή η ρητίνη, ακολουθεί αποξήρανση με θερμό αέρα, και το αποξηραμένο προϊόν υφίσταται απόσταξη κενού με νερό. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι ένα διάλυμα με μεγάλο ιξώδες το οποίο στη συνέχεια φυγοκεντρείται. Μετά την απομάκρυνση του ιζήματος, συλλέγεται το υπερκείμενο που είναι το καθαρό αιθέριο έλαιο μαστίχας Χίου [(Spyridopoulou K. et al., 2017) ; (Chios Mastic Oil-Technical Specifications, Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου)].

Όσον αφορά τη χημική σύσταση του μαστιχέλαιου, όπως και όλα τα αιθέρια έλαια, έτσι και το μαστιχέλαιο, αποτελείται από μεγάλο αριθμό ενώσεων – ορισμένες από αυτές βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις- που αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες του φυτού, και πιθανόν οι βιολογικές δράσεις και οι θεραπευτικές ιδιότητες του μαστιχέλαιου να οφείλονται στη μεμονωμένη ή τη συνεργατική δράση των ουσιών αυτών. Πιο συγκεκριμένα, το μαστιχέλαιο αποτελείται κυρίως από τερπενοειδή και ειδικότερα μονοτερπένια και σεσκιτερπένια. Μελέτες ανάλυσης της χημικής σύστασης του μαστιχέλαιου, έχουν δείξει πως οι κύριες ενώσεις που περιέχονται είναι 2 μονοτερπένια, το α-πινένιο και το β- μυρσένιο, που η περιεκτικότητά τους είναι 75%-85% και 8%-15% αντίστοιχα. Επιπλέον, σε μικρότερες συγκεντρώσεις έχουν εντοπιστεί το β-πινένιο, το καμφένιο, το λιμονένιο και η λιναλοόλη που ανήκουν και αυτά στην κατηγορία των μονοτερπενίων, και το β-καρυοφυλλένιο που ανήκει στα σεσκιτερπένια [(Spyridopoulou K. et al., 2017) ; (Paraschos S. et al., 2016) ; (Miyamoto T. et al., 2014) ; (Koutsoudaki C. et al., 2005)].



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου παρασκευής του μαστιχέλαιου (Spyridopoulou K. et al., 2017).

Οι ευεργητικές ιδιότητες τόσο της μαστίχας Χίου (ρητίνη) όσο και το αιθέριου ελαίου που παρασκευάζεται από αυτή, έχουν αναφερθεί εδώ και πολλά χρόνια, και πλέον έχουν συγκεντρωθεί πολλές μελέτες που αναφέρουν την υψηλή βιολογική αξία των προϊόντων αυτών. Είναι μεγάλος ο αριθμός των μελετών που αναφέρουν την αντιβακτηριακή και την αντιμυκητιακή δράση του αιθέριου ελαίου μαστίχας Χίου, δρώντας κατά της ανάπτυξης πολλών ειδών βακτηρίων Gram+ και Gram- αλλά και μυκήτων, με πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα την αντιβακτηριακής του δράσης έναντι του *H.pylori*. Ειδικότερα, έχει φανεί πως ορισμένες χημικές ενώσεις που περιέχονται στο μαστιχέλαιο, όπως το α-πινένιο, έχουν την ικανότητα να δρουν ενάντια στο *H.pylori*, αναστέλλοντας την ανάπτυξη του. Το

H. pylori, αποτελεί ένα Gram- είδος βακτηρίου όπου σε πολλές περιπτώσεις ευθύνεται για χρόνιες λοιμώξεις του γαστρεντερικού συστήματος και η μόλυνση από αυτό έχει συσχετιστεί με έλκος του δωδεκαδακτύλου αλλά και την ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου (Miyamoto T. et al., 2014). Επιπροσθέτως, έχει φανεί πως το μαστιχέλαιο έχει και αντιλιπιδαιμικές και καρδιοπροστατευτικές δράσεις, προστατεύοντας από τη στεφανιαία νόσο. Αναλυτικότερα, έχει δείχθει πως η χορήγηση μαστιχέλαιου σε ποντικούς με υπερλιπιδαιμία, επάγει την μείωση της συγκέντρωσης της ολικής χοληστερόλης του ορού, της χοληστερόλης LDL αλλά και των τριγλυκεριδίων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Ακόμη, σε μία άλλη μελέτη, δείχθηκε πως η επώαση της ανθρώπινης ηπατικής καρκινικής κυτταρικής σειράς HepG2 με καμφένιο – ενός συστατικού του μαστιχέλαιου- έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης εστέρων χοληστερόλης μέσω της μείωσης του βιοσυνθετικού ρυθμού της χοληστερόλης (Vallianou et al., 2011). Επιπλέον, στις βιολογικές δράσεις του μαστιχέλαιου, συγκαταλλέγονται και οι αντιπολλαπλασιαστικές και αντικαρκινικές δράσεις του. Έχει φανεί, πως η χορήγηση από στόματος για 13 ημέρες σε ποντικούς που είχαν αναπτύξει καρκίνο του παχέος εντέρου, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης του όγκου σε σύγκριση με τα πειραματόζωα αναφοράς, ενώ επιπλέον η επώαση τριών καρκινικών κυτταρικών σειρών παχέος εντέρου (HT-29, CT-26 και Caco-2), επάγει την μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων MKI67, μίας πρωτεΐνης που σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και την μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της πρωτεΐνης *survivin*, που ανήκει στην οικογένεια των αναστολέων της απόπτωσης (IAPs) (Spyridoroulou K. et al., 2017). Ακόμη, μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ποντικούς με αδενοκαρκίνωμα Lewis, επίσης έδειξε πως η από στόματος χορήγηση μαστιχέλαιου αναστέλλει την αύξηση του μεγέθους του όγκου, ενώ επιπλέον, σε τομές που λήφθηκαν από τους όγκους φάνηκε μέσω της δοκιμασίας TUNEL, αυξημένος ρυθμός απόπτωσης των κυττάρων του όγκου στα πειραματόζωα που είχε χορηγηθεί το μαστιχέλαιο. Τέλος, στην ίδια έρευνα, φάνηκε μέσω ανοσοϊστοχημείας στις τομές του όγκου πως το μαστιχέλαιο μειώνει τα επίπεδα παραγόντων αγγειογένεσης που συμβάλουν στο σχηματισμό νέων αγγείων όπως ο VEGF, και το *fVIIIra*, ενώ παράλληλα μειώνει και τα επίπεδα παραγόντων της φλεγμονής που συμβάλλουν επίσης στην ανάπτυξη και την αύξηση του όγκου όπως η IL-6, ο TNF-α και η MCP-1. Έτσι, το μαστιχέλαιο, δείχθηκε πως δρα μέσω πολλών μηχανισμών ενάντια σε αυτόν τον τύπο καρκίνου (Magkouta et al., 2009).

1.5.3 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΜΕΛΙΣΣΟΧΟΡΤΟΥ – ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Το φυτό *Melissa officinalis* L. είναι ένα πολυετές ποώδες φυτό που ανήκει στην οικογένεια των χειλανθών (Lamiaceae). Θεωρείται ότι καλλιεργείται τουλάχιστον από τον 16^ο αιώνα, ενώ πλέον συναντάται κυρίως στην νοτιοκεντρική Ευρώπη, τη λεκάνη της Μεσογείου, και την κεντρική Ασία. Τους θερινούς μήνες αναπτύσσει μικρά λευκά άνθη, τα οποία προσελκύουν πολύ έντονα τις μέλισσες, από όπου αντλεί και την κοινή ονομασία του, Μελισσόχορτο. Τα φύλλα του χρησιμοποιούνται εδώ και πολλούς αιώνες για την παρασκευή αφεψημάτων που θεωρούνταν ότι διαθέτει πληθώρα ευεργετικών δράσεων κυρίως στο γαστρεντερικό σύστημα, και για την ήπια αντιμετώπιση διαταραχών του στομάχου. Το μελισσόχορτο, χρησιμοποιείται επίσης για την παραγωγή του αιθέριου ελαίου μελισσόχορτου, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων, σε αυτή των καλλυντικών αλλά και την αρωματοθεραπεία (Shakeri A. et al., 2016). Το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου συνήθως παράγεται μέσω μίας διαδικασίας απόσταξης με ατμό, από αποξηραμένα άνθη ή κλάδους του φυτού. Όσον αφορά την χημική του σύσταση, αυτή όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω και για τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια, μπορεί να εμφανίζει διαφορές στην περιεκτικότητα των διαφόρων ενώσεων και εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας την ακριβή μεθοδολογία απόσταξης, τις κλιματικές συνθήκες, την εποχή της συλλογής αλλά και την γεωγραφική τοποθεσία. Γενικά, το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου αποτελείται κυρίως από μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, τριτερπένια και φαινολικές ενώσεις. Ειδικότερα, από τα

συστατικά που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στο αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου είναι δύο μονοτερπενικές αλδεΐδες, η κιτράλη και το κιτρονελίδιο, η γερανιόλη, μία μονοτερπενική αλκοόλη, το λιμονένιο ένα κυκλικό μονοτερπένιο, σεσκιτερπένια όπως το β-καρυοφυλλένιο, το D- γερμακρένιο, το β-πινένιο και το σαμπινένιο, και σε μικρότερη ποσοστιαία περιεκτικότητα τριτερπένια όπως το ολεανολικό οξύ και το ουρσολικό οξύ. Ακόμη, έχει φανεί ότι περιέχονται και φαινολικές ενώσεις, όπως διάφορα ισομερή του ροσμαρινικού οξέος [(Mimica-Dukic N., et al., 2004) ; (Argyropoulos D. et al., 2014) ; (Shakeri A. et al., 2016)].

Όπως και πολλά άλλα αιθέρια έλαια που παράγονται από φυτά, έτσι και το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου, έχει φανεί ότι παρουσιάζει ισχυρή αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση. Ειδικότερα, έχει φανεί πως αναστέλλει την ανάπτυξη αρκετών ειδών Gram+ και Gram- βακτηρίων, αλλά και μυκήτων. Μάλιστα, τα Gram+ βακτήρια εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στο αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου, παρόλα αυτά φάνηκε πως είναι αποτελεσματικό έναντι αρκετών παθογόνων Gram- βακτηρίων όπως τα *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, και στελέχη της *Shigella*. (Mimica-Dukic N., et al., 2004). Ωστόσο, πέρα από τις αντιμικροβιακές δράσεις του, πλέον έχει αναγνωριστεί η υψηλή βιολογική αξία του αιθέριου ελαίου μελισσόχορτου, λόγω και πολλών άλλων βιολογικών του δράσεων και θεραπευτικών ιδιοτήτων. Σε αυτές, συμπεριλαμβάνονται οι αντιυπεργλυκαιμικές δράσεις του. Αναλυτικότερα, έχει φανεί πως η χορήγηση αιθέριου ελαίου μελισσόχορτου για 6 εβδομάδες σε ποντικούς που είχαν αναπτύξει σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο πλάσμα, αλλά και την αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης, σε σύγκριση με τα πειραματόζωα που δεν χορηγήθηκε αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου. Στην ίδια μελέτη, ερευνήθηκε περεταίρω ο μηχανισμός μέσω του οποίου το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου ασκεί τις αντιυπεργλυκαιμικές του δράσεις, και δείχθηκε πως επάγει την αύξηση των επιπέδων της ηπατικής γλυκοκινάσης και του μεταφορέα γλυκόζης GLUT4 – πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην είσοδο και το μεταβολισμό της γλυκόζης στο ήπαρ - , ενώ παράλληλα επάγει τη μείωση των επιπέδων της PEPCK και της φωσφατάσης της 6- φωσφορικής γλυκόζης (G6Pase), δύο ενζύμων που συμμετέχουν στη γλυκονεογένεση. Ακόμη, φάνηκε επίσης πως το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου, επάγει και την αύξηση των επιπέδων του PPAR-γ των λιποκυττάρων, του οποίου η ενεργοποίηση επάγει την έκφραση των GLUT-1 και GLUT-4, και κατ' επέκταση την πρόσληψη της γλυκόζης στα λιποκύτταρα (Chung M. J., et al., 2010). Άλλες βιολογικές δράσεις του αιθέριου ελαίου μελισσόχορτου, αφορούν τη νευροπροστασία, κι αυτό φάνηκε από *in vitro* δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας σε νευρώνες που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας. Στα πειράματα αυτά φάνηκε πως το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου έχει νευροπροστατευτική δράση, καταστέλλοντας την απόπτωση που σχετίζεται με συνθήκες υποξίας, μέσω αναστολής της δράσης της κασπάσης-3 και μείωση των επιπέδων του παράγοντα που επάγεται από υποξία HIF-1 και συμβάλλει στην επαγωγή της απόπτωσης (Bayat M., et al., 2012). Τέλος, υπάρχουν και αρκετές μελέτες που αναφέρουν τις αντικαρκινικές δράσεις του αιθέριου ελαίου που παράγεται από φύλλα του *Melissa officinalis* L. Πιο συγκεκριμένα, έχει φανεί πως το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου, αναστέλλει αποτελεσματικά την ανάπτυξη αρκετών καρκινικών σειρών όπως οι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές A549, MCF-7, Caco-2, HL-60 και K562, και η B16F10 που αποτελεί καρκινική κυτταρική σειρά ποντικού (De Sousa A. C., et al., 2004). Ακόμη, φάνηκε πως το αιθέριο έλαιο μαστιχέλαιου επάγει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου, επάγοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) και ενεργοποίησης των εκτελεστικών κασπασών -3 και -7 (Weidner C., et al., 2015). Επιπλέον, σε *in vivo* μελέτες σε ποντικούς, παρατηρήθηκε πως σε υψηλές συγκεντρώσεις το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου διαθέτει και αντιμεταλλαξιγόνο δράση, κάτι το οποίο φάνηκε μέσω της δοκιμασίας μικροπυρήνων σε ποντικούς που τους είχε χορηγηθεί προηγουμένως ο μεταλλαξιγόνος παράγοντας μεθανοσουλφονικό μεθύλιο (MMS) (Carvalho N. C. et al., 2011).

1.5.4 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΛΕΒΑΝΤΑΣ – ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Το φυτό της λεβάντας (*Lavandula*) αποτελεί γένος φυτών που ανήκουν στην οικογένεια των χειλανθών, και περιλαμβάνει πάνω από 40 είδη, όπου τα περισσότερα από αυτά είναι βραχύβια ποώδη φυτά και συναντάται κυρίως σε περιοχές από την Ευρώπη ως την βόρεια και την ανατολική Αφρική, τη Μεσόγειο και τη νοτιοδυτική Ασία. Τα πιο ευρέως διαδεδομένα και χρησιμοποιούμενα είδη είναι τα *Lavandula angustifolia*, *Lavandula stoechas* και *Lavandula latifolia*, ενώ από αυτά ξεχωρίζει το *Lavandula angustifolia*, το οποίο καλλιεργείται ευρύτατα και χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων, αρωμάτων και καλλωπιστικών προϊόντων, διαθέτοντας εξέχουσα οικονομική σημασία. Επιπλέον από το *Lavandula angustifolia*, παράγεται και το πιο γνωστό αιθέριο έλαιο λεβάντας, μέσω μίας διαδικασίας απόσταξης μέσω ατμού, από διάφορα αποξηραμένα ανατομικά μέρη του φυτού, αλλά κυρίως από τα άνθη του (Prusinowska R., et al., 2014). Το αιθέριο έλαιο λεβάντας ανήκει στα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιούνται εδώ και πολλές δεκαετίες στον τομέα της αρωματοθεραπείας λόγω της θετικής του επίδρασης στην αύξηση της διάρκειας του ύπνου, των μυοχαλαρωτικών ιδιοτήτων του αλλά των αγχολυτικών και ηρεμιστικών του δράσεων (Smigielski K., et al., 2018). Παράλληλα, πολύ διαδεδομένη είναι και χρήση του στον τομέα των τροφίμων, καθώς πέρα από τη χρήση του ως πρόσθετο αρώματος, χρησιμοποιείται σε πολλές περιπτώσεις και ως συντηρητικό λόγω της ισχυρής αντιβακτηριακής δράσης του (Hanamanthagouda M.S., et al., 2010). Όσον αφορά την χημική του σύσταση, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για την αναγνώριση των χημικών ενώσεων από τις οποίες αποτελείται, και υποστηρίζεται πως περιέχει τουλάχιστον 320 χημικές ενώσεις. Στην πλειονότητα των μελετών ανάλυσης της χημικής σύστασης αιθέριων ελαίων λεβάντας, ως επικρατέστερες ενώσεις αναφέρονται οξυγονομένα μονοτερπένια όπως η λιναλοόλη, η τερπινεν-4-όλη, η λεβαντουλόλη ενώ σε μικρότερη περιεκτικότητα ενοπίστηκαν και ενώσεις όπως το λιμενένιο, το β-καρυοφυλλένιο, ισομερή του β-οκιμενίου, η καμφορά και το οξικό λιναλύλιο, με την ποσοστιαία περιεκτικότητά τους να εξαρτάται από την προέλευση του φυτού από το οποίο παρασκευάστηκε το αιθέριο έλαιο [(Dong G., et al., 2020) ; (Cavanagh H. M. A., & Wilkinson J. M., 2005) ; (Prusinowska R., et al., 2014)].

Από τα παλαιότερα χρόνια ήδη, το αιθέριο έλαιο της λεβάντας είχε ένα ευρύ φάσμα χρήσεων, ειδικότερα στον τομέα των αρωμάτων, της αισθητικής αλλά και των τροφίμων. Με την πάροδο του χρόνου, ολοένα και αυξάνονται οι επιστημονικές μελέτες που φανερώνουν την πληθώρα των ευεργετικών του δράσεων για τον ανθρώπινο οργανισμό. Από τις πιο γνωστές πλέον δράσεις του αιθέριου ελαίου λεβάντας είναι οι αντιμικροβιακές. Πιο συγκεκριμένα, σε εύρος συγκεντρώσεων 0.94%–10% v/v έχει βακτηριοστατική δράση έναντι τουλάχιστον 65 ειδών βακτηρίων, τόσο Gram+ όσο και Gram-, ωστόσο φάνηκε πως ήταν πιο αποτελεσματικό στα Gram+ βακτήρια. Ακόμη κρίθηκε αποτελεσματικό, έναντι και πολλών μυκήτων όπως οι *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* και η *Candida albicans* [(Mayaud et al., 2008) ; (Prusinowska R., et al., 2014)]. Επιπροσθέτως, τα τελευταία χρόνια έχουν διενεργηθεί αρκετές μελέτες από τις οποίες έχει φανεί πως το αιθέριο έλαιο λεβάντας, δρα θετικά στην επούλωση πληγών (wound healing). Ειδικότερα, έχει φανεί σε in vivo μελέτες πως το αιθέριο έλαιο λεβάντας αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα του κολλαγόνου τύπου I και του TGF-β (Transforming Growth Factor – β), ο οποίος επάγει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και την διαφοροποίησή τους σε μυοϊνοβλάστες, γεγονός που έχει πολύ σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του τραύματος μέσω συρρίκνωσης του ιστού. Ακόμη, το αιθέριο έλαιο λεβάντας έχει δείξει πως αυξάνει επίσης τα επίπεδα του FGF-2 (Fibroblast Growth Factor -2), ο οποίος επάγει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών αλλά και του EGF (Epidermal Growth Factor), ο οποίος επάγει την επιθηλιοποίηση του τραύματος μέσω επαγωγής της μετανάστευσης ινοβλαστών και επιθηλιακών κυττάρων (Samuelson R., et al., 2020). Στις ευεργετικές ιδιότητες του αιθέριου ελαίου λεβάντας, συγκαταλέγονται επίσης και οι αγχολυτικές και ηρεμιστικές του ιδιότητες. Αναλυτικότερα, δύο χημικές ενώσεις που εντοπίζονται στο αιθέριο έλαιο λεβάντας, η τερπινεν-4-όλη και το λινολεϊκό οξύ, έχουν συσχετιστεί με θετικές επιδράσεις στο ΚΝΣ, και η δράση τους έχει ως αποτέλεσμα ελαττωμένη ενεργητικότητα, ηρεμιστική δράση και κατ' επέκταση

συμβάλει στην διευκόλυνση του ύπνου (Buchbauer et al., 1991). Τέλος, υπάρχουν τόσο in vitro όσο και in vivo μελέτες που καταδεικνύουν τις προαποπτωτικές και αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις του αιθέριου ελαίου λεβάντας. Πιο αναλυτικά, δείχθηκε στην καρκινική κυτταρική σειρά PC-3, πως η επώαση των κυττάρων με αιθέριο έλαιο λεβάντας, είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης και την αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M. Μάλιστα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της αποτελεσματικότητας μεταξύ του πλήρους μείγματος του αιθέριου ελαίου λεβάντας και δύο χημικών ενώσεων (λιναλοόλη και οξικό λιναλύλιο) που εντοπίζονται σε μεγάλη συγκέντρωση στο αιθέριο έλαιο λεβάντας, και φάνηκε πως το αιθέριο έλαιο λεβάντας είναι πιο αποτελεσματικό όσον αφορά την επαγωγή της απόπτωσης στα PC-3, μαρτυρώντας πιθανώς συνεργατική δράση των ενώσεων που περιέχονται σε αυτό. Στην ίδια μελέτη, τα κύτταρα PC-3 χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία όγκων σε υβριδικούς ποντικούς, και η υποδόρια έγχυση αιθέριου ελαίου λεβάντας, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του μεγέθους του όγκου, μέσω αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και επαγωγής της απόπτωσης σε μεγάλο βαθμό σε σχέση με τα πειραματόζωα αναφοράς (Zhao Y., et al., 2016).

1.6 ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση των προαποπτωτικών, των αντιφλεγμονωδών και των αντιυπεργλυκαιμικών δράσεων των αιθέριων ελαίων μελισσόχορτου, ρίγανης, μαστίχας Χίου και λεβάντας, ενώ παράλληλα διερευνήθηκε και η πιθανότητα εμπλοκής τους, στο μονοπάτι σηματοδότησης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, επάγοντας με άμεσο ή έμμεσο τρόπο κάποιες από τις δράσεις τους. Ακόμη, εξετάστηκε και η πιθανότητα αλληλεπίδρασης των αιθέριων ελαίων μελλισσόχορτου και μαστίχας Χίου, με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών διερευνώντας την ενδεχόμενη ενεργοποίησή του και την επακόλουθη μετακίνησή του σε κάποιο υποκυτταρικό διαμέρισμα.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Παρακάτω αναγράφονται αναλυτικά όλα τα υλικά, οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, καθώς και οι ονομασίες των κατασκευαστριών εταιριών.

2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

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

Ζυγός	KERN EW
Ζυγός	KERN 440-47 N
Quick spin	Nippon Genetics Europe GmbH
Σετ εμφάνισης μεμβρανών	W.B Kodak
Συνεστιακό μικροσκόπιο	Zeiss LSM 800

Πίνακας 1. Αναφέρονται όλα τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας.

2.2 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- ❖ Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons, 15mL & 50mL) : Sarstedt
- ❖ Διηθητικά χαρτιά Whatman (Sigma)
- ❖ Ειδικές φλάσκες για ανάπτυξη ευκαρυωτικών κυττάρων (T25 & T75) (Sarstedt)
- ❖ Καλυπτρίδες (coverslips) (Invitrogen)
- ❖ Μεμβράνη νιτροκυταρίνης 0,25 μm: (Amersham™ Protran™)
- ❖ Πιάτα ανάπτυξης κυττάρων (well plates, 6-well & 24-well) (Sarstedt)
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια τύπου eppendorfs (1.5 mL) (Sarstedt)
- ❖ Σιφώνια (2mL, 5mL, 10mL, 25mL) (Sarstedt)
- ❖ Φωτογραφικά φιλμ ανίχνευσης σήματος σε western blot (Fuji Medical)

2.3 ΧΗΜΙΚΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

2.3.1 ΧΗΜΙΚΑ

Acrylamide/Bis acrylamide 40% v/v (Bio-Rad)	ECL (Santa Cruz)	Sodium Dodecyl Sulfate, SDS (SIGMA)
Ammonium persulfate, APS (Sigma)	Fixer (Fuji)	TEMED (Applichem)
APS (Sigma)	FBS Gibco® (Life Technologies Invitrogen)	Trypsin-EDTA 5% v/v 10x (Gibco, Sigma)
Bradford protein assay (Bio-Rad)	L-Glutamine (Gibco)	Tween 20 (Euroclone, Sigma)
Bromophenol blue (Fluka)	PMSF (SERVA)	Αιθανόλη 100% (SIGMA)
Charcoal, dextran coated (Sigma)	Hoechst (Invitrogen)	β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haën)
MitoTracker Red CMXRos (Thermo Scientific)	Protease inhibitors (Sigma)	Γλυκίνη (SERVA)
Dexamethazone (Riedel-de Haën)	Phenyl Methyl Sulfonyl Floride, PMSF (SERVA)	Μάρτυρας μοριακών μεγεθών Pageruler (ThermoScientific Fermentas)
DTT (SERVA)	SDS (Sigma)	
Developer (Fuji)	Skimmed milk powder (Regilait)	

Πίνακας 2. Αναφέρονται όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας.

2.3.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Ammonium persulfate (APS 10% w/v)	Διάλυση 100mg σκόνης APS σε 1ml ddH ₂ O (Αποθήκευση -20°C)
Διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis Buffer)	Αποτελείται από 20mM Tris pH 7.5, 0.5% v/v Triton X100, 250mM NaCl και 3mM EDTA και αποθηκεύεται στο 4°C. Προστίθενται επίσης 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF και μείγμα αναστολέων πρωτεασών
Διάλυμα Bradford	Το stock βρίσκεται σε συγκέντρωση 5X, και χρησιμοποιείται έπειτα από αραίωση με ddH ₂ O, σε τελική συγκέντρωση 1X
Sample Buffer 4X (διάλυμα επιστοίβαξης δειγμάτων)	Αποτελείται από 1M Tris pH 6.8, 10% v/v γλυκερόλη, 10% v/v SDS, 5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% v/v κυανό της βρωμοφαινόλης (Αποθήκευση -20°C)
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	Για παρασκευή διαλύματος όγκου 0,2L ζυγίζονται 36,342g Tris που διαλύονται σε ddH ₂ O. Έπειτα, το pH ρυθμίζεται στο 8,8 με προσθήκη HCl 12N (Αποθήκευση 4°C).
Tris 20 mM pH 7.5	Ανάμειξη 20μl διαλύματος stock Tris 1 M pH 7.5 (4 °C) με 980ml ddH ₂ O (Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου).
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10x	Ζυγίζονται 30.3gr Tris base και 144 gr γλυκίνης, τα οποία διαλύονται σε 1lt ddH ₂ O (Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου).
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς(Transfer Buffer) 10x	Αποτελείται από 10% v/v Running Buffer 10x, 20% v/v MeOH και 0,05% v/v SDS. Συμπλήρωση του όγκου με ddH ₂ O (Αποθήκευση θερμοκρασία δωματίου)
PMSF 200mM	Πραγματοποιείται 10% w/v αραίωση σε ισοπροπανόλη για την παρασκευή PMSF συγκέντρωσης 20mM (Αποθήκευση -20°C)
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (TBS) 10x	Για Παρασκευή 1lt TBS 10X ζυγίζονται 24gr Tris-base και 88gr NaCl (MB 58,4). Το pH ρυθμίζεται στα 7,4-7,6 με προσθήκη πυκνού HCl 12N (Αποθήκευση θερμοκρασία δωματίου)
Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1x	Αποτελείται από 10% stock buffer TBS 10x και 1% v/v Tween-20. Συμπλήρωση του όγκου με ddH ₂ O (Αποθήκευση θερμοκρασία δωματίου)
Διαλύματα για εμφάνιση σήματος	Ανάμειξη Fixer και Developer solution της Kodak. Το Developer ευθύνεται για την ανάπτυξη του σήματος, ενώ το Fixer για τη μονιμοποίησή του.

Πίνακας 3. Αναφέρονται όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς και ο τρόπος παρασκευής τους.

2.4.2 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

2.4.3 ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

- ❖ Το αιθέριο έλαιο μαστίχας ελήφθη από την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου σε γυάλινο δοχείο, και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C).

- ❖ Τα αιθέρια έλαια ρίγανης, μελισσόχορτου και λεβάντας ελήφθησαν από την εταιρία THARROS Aromatic Plants Products, σε γυάλινο δοχείο και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C).

2.5 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

2.5.1 ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Για την παρασκευή των πρωτογενών αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκε η τελική σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, για την διάλυσή τους σε TBST 1x και γάλα σε τελική συγκέντρωση 2% w/v. Τα πρωτογενή αντισώματα αποθηκεύονται στους -20 °C. Παρακάτω αναγράφονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν έναντι των αντίστοιχων μορίων στόχων, καθώς και τα ονόματα των κατασκευαστριών εταιριών.

- ❖ Anti-β-actin (Sigma)
- ❖ Anti-GR G-5 (Santa cruz)
- ❖ Anti-procaspase 3 (Abcam)
- ❖ Anti-PEPCK (Santa cruz)
- ❖ Anti-p65 (Santa cruz)
- ❖ Anti-procaspase 9 (Cell signaling)

2.5.2 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν ενζυμοσύνδετα αντισώματα IgG, για mouse και για rabbit, με το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (HRP) για την ανάπτυξη του σήματος μέσω χημειοφωταύγειας. Για την παρασκευή τους, πραγματοποιήθηκε αραίωση σε TBST 1x και γάλα σε τελική συγκέντρωση 2% w/v. Αποθηκεύονται στους -20 °C.

- ❖ Mouse-HRP (Pierce Antibodies)
- ❖ Rabbit-HRP (Pierce Antibodies)
- ❖ Mouse με το φθοροφόρο μόριο Alexa Fluor 488

2.6 ΜΕΘΟΔΟΙ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.6.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

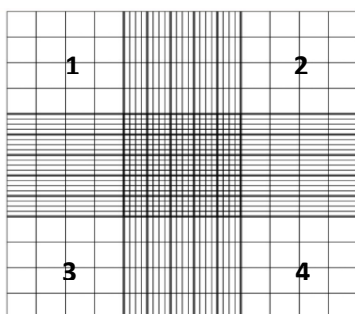
Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HEK-293 (Human Embryonic Kidney cells), μία κυτταρική σειρά που προέρχεται από ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού. Για την καλλιέργεια των κυττάρων HEK-293, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο DMEM με phenol red, εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS (Fetal Bovine Serum), 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% v/v L-γλουταμίνη και 1%πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε ειδική φλάσκα ανάπτυξης κυττάρων T25, σε επωαστικό θάλαμο με θερμοκρασία 37 °C και 5% περιεκτικότητα σε CO₂.

2.6.2 ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Καθώς τα κύτταρα HEK-293 αναπτύσσονται υπό προσκόλληση στην επιφάνεια της φλάσκας (Adherent) - δημιουργώντας μία στοιβάδα - , προκειμένου να αξιοποιηθούν σε οποιαδήποτε πειραματική διαδικασία, απαραίτητο βήμα αρχικά είναι η αποκόλλησή τους από την επιφάνεια της φλάσκας. Για να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει θρυψίνη, μία παγκρεατική πρωτεάση που υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ θέσεων που βρίσκονται αμινοξικά κατάλοιπα Arg ή Lys. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται όταν η μονοστρωματική καλλιέργεια κυττάρων έχει αναπτυχθεί καταλαμβάνοντας περίπου το 80% της επιφάνειας της φλάσκας. Αρχικά, αφαιρείται με τη χρήση ειδικού σιφωνίου το θρεπτικό μέσο που περιέχεται στην φλάσκα, και ακολούθως προστίθεται ο ανάλογος όγκος του διαλύματος θρυψίνης ανάλογα με το μέγεθος της φλάσκας και το είδος της κυτταρικής σειράς. Έπειτα, η φλάσκα που περιέχει τα προσκολλημένα κύτταρα και το διάλυμα θρυψίνης παραμένει στον επωαστικό θάλαμο για 3-5min ώστε να επιτευχθεί η υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών των γλυκοπρωτεϊνών που διατηρούν τα κύτταρα προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, τα κύτταρα βρίσκονται πλέον σε εναιώρημα, και η θρυψινοποίηση τερματίζεται μέσω της προσθήκης τετραπλάσιου όγκου – σε σχέση με αυτόν του διαλύματος θρυψίνης- θρεπτικού υλικού DMEM στη φλάσκα. Στη συνέχεια, μεταφέρεται όλο το περιεχόμενο της φλάσκας σε falcon, και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 1000rpm σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για 5min. Τέλος, απομακρύνεται το υπερκείμενο (θρυψίνη & θρεπτικό υλικό) και το ίζημα (κύτταρα) επαναδιαλυτοποιείται με κατάλληλο όγκο νέου θρεπτικού υλικού ώστε να επανατοποθετηθούν στην φλάσκα για ανακαλλιέργεια ή να χρησιμοποιηθούν σε κάποια πειραματική διαδικασία.

2.6.3 ΜΕΤΡΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΡΩΣΙΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Προκειμένου να υπολογιστεί ο ακριβής αριθμός κυττάρων που θα στρωθούν κάθε πηγαδάκι του πιάτου, ώστε να είναι ίδιος ο αριθμός μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών επώασης με τις εξεταζόμενες ουσίες, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία του μετρήματος κυττάρων ως εξής. Αρχικά πραγματοποιείται θρυψινοποίηση των κυττάρων στη φλάσκα όπως περιγράφηκε στο **2.6.2**, και στη συνέχεια, αφού πραγματοποιηθεί πολύ καλή ανάδευση ώστε να διασπαστούν τα συσσωματώματα κυττάρων, λαμβάνονται 10μl όπου και τοποθετούνται στην πλάκα Neubauer (αιματοκυτταρόμετρο). Τα κύτταρα που βρίσκονται στην πλάκα Neubauer, θα πρέπει να είναι μονήρη, ώστε να είναι εφικτή η μέτρησή τους. Εφόσον υπολογιστεί ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε τεταρτημόριο της πλάκας (**Εικόνα 8.**), αθροίζονται οι 4 αριθμοί, και το άθροισμα που προκύπτει διαιρείται με το 4, ώστε να υπολογιστεί ο μέσος όρος. Κατόπιν, για την αναγωγή του αριθμού των κυττάρων στο 1ml, ο αριθμός αυτός πολλαπλασιάζεται με το 10^4 , και το αποτέλεσμα αυτής της πράξης αποδίδει τον αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται ανά ml στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Τέλος, για το στρώσιμο των κυττάρων στα πηγαδάκια του πιάτου καλλιέργειας, λαμβάνεται ο κατάλληλος όγκος που περιέχει τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 1000rpm σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) και το ίζημα, επαναδιαλυτοποιείται με τον κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου ώστε να ισομοιαστεί στα πηγαδάκια του πιάτου.



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της πλάκας Neubauer. Ο υπολογισμός των κυττάρων που βρίσκονται σε 1ml θρεπτικού μέσου γίνεται μέσω της ως εξής: $\left(\frac{1+2+3+4}{4}\right) \times 10^4$ (Barbedo Jayme, 2013)

2.6.4 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΟΥΣΙΩΝ

Προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης, μελισσόχορτου, μαστίχας και λεβάντας στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων που μελετήθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, πραγματοποιήθηκε η εξής διαδικασία για την επώαση των κυττάρων HEK-293 με τα εν λόγω αιθέρια έλαια. Αρχικά την ημέρα 1 πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση, μέτρημα και στρώσιμο (**2.6.2, 2.6.3 & 2.6.4**) των κυττάρων σε 6-well plates με θρεπτικό μέσο DMEM με phenol red, εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% v/v L-γλουταμίνη και 1% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Ο αριθμός των κυττάρων που στρώθηκαν ήταν 100.000 cells/well. Την ημέρα 2, έπειτα από 24h, αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό από κάθε well με τη χρήση ειδικού σιφωνίου, και κατόπιν προστέθηκε σε κάθε well θρεπτικό μέσο DMEM απουσία phenol red, εμπλουτισμένο με 10% FBS-cis (ειδικά κατεργασμένο με ενεργό άνθρακα ώστε να απομακρυνθούν οι στεροειδείς ορμόνες που περιέχονται στον ορό), 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% v/v L-γλουταμίνη και 1% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού από αυτό που περιέχει FBS σε αυτό που περιέχει FBS-cis, πραγματοποιήθηκε λόγω του γεγονότος, ότι το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη του GR καθώς και μορίων στόχων του, έτσι, είναι απαραίτητο να απουσιάζουν οι ενδογενείς στεροειδείς ορμόνες του θρεπτικού μέσου, ώστε αν παρατηρηθεί οποιαδήποτε διαφορά στα επίπεδα των υπό μελέτη μορίων, να μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οφείλεται στην δράση των υπό μελέτη αιθέριων ελαίων. Την ημέρα 4, έπειτα δηλαδή από 48h, πραγματοποιήθηκε η προσθήκη ουσιών σε θρεπτικό μέσο DMEM με FBS-cis απουσία phenol red. Λόγω της λιποφιλικής τους φύσης, και τα 4 αιθέρια έλαια τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, αρχικά διαλυτοποιήθηκαν στον οργανικό διαλύτη DMSO 100%, διότι το θρεπτικό μέσο DMEM έχει ως βάση του το H₂O, με αποτέλεσμα να μην είναι διαλυτά σε αυτό. Έτσι, μέσω της αρχικής διάλυσής τους σε DMSO, δημιουργήθηκε μία αρχική συγκέντρωση (1/10 v/v) από την οποία προέκυψαν οι δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν 1/20.000 v/v και 1/40.000 v/v, μέσω διαδοχικής αραίωσης, θεωρώντας ότι το καθαρό έλαιο (stock) είναι το 100%. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η κάθε μία από τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν για κάθε έλαιο, μελετήθηκε σε 2 συνθήκες παρουσία Dex (δεξαμεθαζόνη, συνθετικό γλυκοκορτικοειδές) σε συγκέντρωση 10⁻⁸ M και απουσία αυτής, με σκοπό τη μελέτη ενδεχόμενης συνεργατικής ή ανταγωνιστικής δράσης του εκάστοτε ελαίου με αυτή. Τέλος, λόγω του γεγονότος ότι η Dex είναι διαλυμένη σε EtOH 100%, προστέθηκε επιπλέον στις συνθήκες που δεν περιείχαν Dex και ο αντίστοιχος όγκος EtOH (τελική συγκέντρωση 1/1000 v/v), ώστε οι συνθήκες να διαφέρουν μόνο στην παρουσία ή μη του εκάστοτε ελαίου. Το ίδιο πραγματοποιήθηκε για το DMSO, στο οποίο διαλυτοποιήθηκαν τα έλαια, για τις συνθήκες αναφοράς (τελική συγκέντρωση 1/1000 v/v).

2.6.5 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μετά το πέρας των 48h όπου επώαστηκαν τα κύτταρα με τις υπό μελέτη συνθήκες για το κάθε αιθέριο έλαιο, συλλέχθηκαν από κάθε well, ώστε να ακολουθήσει η λύση τους. Για τη συλλογή των κυττάρων, αρχικά, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο με τα αιθέρια έλαια από κάθε well, και πραγματοποιήθηκε μία πλύση σε κάθε well με 500μl PBS 1X. Κατόπιν, με τη χρήση ειδικού scraper, επιτεύχθηκε η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια του well, και το εναιώρημα κυττάρων στο PBS 1X μεταφέρθηκε σε σωληνάρια τύπου erppendorf. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και δεύτερη φορά για τη συλλογή των εναπομενόντων κυττάρων. Μετά το τέλος αυτής της διαδικασίας κάθε erppendorf που αντιπροσωπεύει από μία συνθήκη, περιείχε συνολικό όγκο 1ml από το εναιώρημα των

κυττάρων στο PBS 1X. Επόμενο βήμα, ήταν η φυγοκέντρωση στους 4 °C για 8 min στις 1500 rpm, και η απομάκρυνση του υπερκλειμένου. Σε αυτό το σημείο, το ίζημα μπορεί να αποθηκευτεί στους -80°C ή να προχωρήσει η διαδικασία της λύσης. Για τη λύση των κυττάρων προστίθεται ο κατάλληλος όγκος Lysis buffer ανάλογα με τον όγκο του ιζήματος για την επαναδιαλυτοποίηση του, και τα εppendorf παραμένουν στον πάγο (4°C) για 30 min. Έπειτα, προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαδικασία της λύσης και πιο συγκεκριμένα η κατάτμηση του DNA που περιέχεται στα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε συσκευή παραγωγής υπερήχων (Sonicator). Στο sonicator εφαρμόστηκαν για το κάθε δείγμα 5 κύκλοι του ενός δευτερολέπτου, με μεσοδιάστημα 35 δευτερολέπτων, και την ένταση ρυθμισμένη στο 40 %, ενώ τα δείγματα βρίσκονταν καθ' όλη τη διάρκεια στον πάγο (4°C).

2.6.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD – ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ WESTERN BLOT

Για να μελετηθούν οι διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα των υπό μελέτη μορίων μεταξύ διαφορετικών συνθηκών μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, είναι απαραίτητο κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, τα δείγματα να έχουν την ίδια συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης. Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα που περιείχε το κυτταρικό εκχύλισμα της κάθε συνθήκης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Πρόκειται για μία χρωματομετρική μέθοδο, μέσω της οποίας είναι εφικτό να προσδιοριστεί η συγκέντρωση πρωτεϊνών ενός δείγματος, εφόσον η τιμή της βρίσκεται μεταξύ των ορίων 20-500μg/ml. Η μέθοδος αυτή, βασίζεται στην ικανότητα μεταβολής του χρώματος από κοκκινωπό σε μπλε, της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, όταν βρίσκεται σε όξινο περιβάλλον και συνδεθεί με κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών (Sapan et al., 2015). Μέσω φωτομέτρησης στα 595nm, είναι δυνατό να προσδιοριστεί αυτή η μεταβολή. Για τη μέθοδο Bradford, αρχικά πραγματοποιήθηκε αραιώση του διαλύματος stock της Bradford, που είχε αρχική συγκέντρωση 5X ώστε να φτάσει σε τελική συγκέντρωση 1X, και προστέθηκε 1ml του διαλύματος 1X σε κάθε εppendorf που περιείχε 1 μl από το κάθε δείγμα. Ακολούθησε επώαση σε σκοτεινό μέρος για 15min και φωτομέτρηση στα 595nm. Η απορρόφηση που προκύπτει για κάθε δείγμα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης πρωτεϊνών που περιέχονται σε αυτό. Τέλος, για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα άγνωστης συγκέντρωσης, πραγματοποιείται αντικατάσταση στην εξίσωση της ευθείας που έχει προκύψει από πρότυπη καμπύλη που έχει δημιουργηθεί με τη χρήση μίας σειράς πρότυπων δειγμάτων BSA (Bovine Serum Albumin) αυξανόμενης – και γνωστής - συγκέντρωσης.

Όσον αφορά την δημιουργία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες, πραγματοποιείται προσθήκη Sample buffer και Tris pH 7.5 20 mM σε κατάλληλο όγκο κυτταρικού εκχυλίσματος έτσι ώστε με βάση την αρχική του συγκέντρωση σε πρωτεΐνες να προκύψει τελικά η επιθυμητή ποσότητα πρωτεϊνών που θα “φορτωθούν” σε κάθε well του gel ηλεκτροφόρησης. Το sample buffer καταλαμβάνει το ¼ του όγκου του δείγματος που θα φορτωθεί, ενώ ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με το Tris pH 7.5 20 mM.

2.6.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE)

Για να προσδιοριστούν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υπό μελέτη πρωτεϊνών αλλά και η ενδεχόμενη μεταβολή σε αυτά μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών για τα έλαια που μελετήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε η ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών από ένα σύνθετο πρωτεϊνικό μείγμα, βάση του μοριακού τους βάρους σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, την επακόλουθη μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, και τέλος στην στόχευσή τους μέσω ειδικών

αντισωμάτων και εμφάνιση του σήματος που αντιπροσωπεύει την εν λόγω σύνδεση. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, πραγματοποιείται παρουσία SDS, ενός απορρυπαντικού, που αποτελεί αποδιατακτικό παράγοντα που προκαλεί την μετουσίωση των πρωτεϊνών, όπου μέσω πρόσδεσής του σε αυτές, καταργεί τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Ακόμη, λόγω του γεγονότος ότι το SDS έχει αρνητικό φορτίο, με την πρόσδεσή του στις πρωτεΐνες, τους προσδίδει ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς τη μάζα τους, με αποτέλεσμα η κίνησή τους εντός ενός ηλεκτρικού πεδίου να πραγματοποιείται με ταχύτητα που είναι ανάλογη με το μοριακό τους βάρος. Έτσι, οι μικρότερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες, κινούνται ταχύτερα εντός των πόρων που δημιουργούνται στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου, με αποτέλεσμα να φτάνουν ταχύτερα προς την κάθοδο, ενώ αυτές που έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος κινούνται πιο αργά εντός της πηκτής, λόγω της αύξησης της τριβής και της ελάττωσης της ταχύτητάς τους. Επιπλέον, κατά την προετοιμασία των δειγμάτων, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, στα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση προστίθεται sample buffer, το οποίο περιέχει ένα πολύ σημαντικό συστατικό, τη β-μερκαπτοαιθανόλη. Η β-μερκαπτοαιθανόλη, είναι ένας αναγωγικός παράγοντας που επάγει τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών, με αποτέλεσμα την κατάργηση της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, ξεκινά με την θέρμανση των δειγμάτων που περιέχουν τα κυτταρικά εκχυλίσματα στους 95°C για 5 min, και στη συνέχεια φορτώνονται στις θέσεις υποδοχής της πηκτής (wells). Η πηκτή ακρυλαμίδιου αποτελείται από δύο επίπεδα. Το πρώτο, ονομάζεται πηκτή επιστοιβάξης έχει μικρότερη συγκέντρωση Bis-acrylamide σε σχέση με την πηκτή διαχωρισμού, και σε αυτή στοιβάζονται οι πρωτεΐνες των δειγμάτων ώστε να ξεκινήσουν την κίνησή τους κατά μήκος του ηλεκτρικού πεδίου από το ίδιο σημείο. Τα συστατικά της πηκτής ακρυλαμίδιου φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (**πίνακας 4.**) Τέλος, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδιου, πραγματοποιείται εντός της ειδικής συσκευής ηλεκτροφόρησης η οποία περιέχει Running buffer 1X, και στο οποίο τοποθετούνται τα ηλεκτρόδια για την εφαρμογή σταθερής διαφοράς δυναμικού 90V.

Πηκτή πολυακρυλαμίδιου	
Πηκτή επιστοιβάξης	Πηκτή διαχωρισμού
Tris-HCl pH 6.8	Tris-HCl pH 8.8
ddH ₂ O	
SDS 10% (w/v)	
Ακρυλαμίδιο 40% v/v	
APS 10% (w/v)	
TEMED	

Πίνακας 4. Τα συστατικά από τα οποία αποτελούνται η πηκτή επιστοιβάξης και διαχωρισμού. Ο όγκος του κάθε συστατικού διαφέρει μεταξύ των δύο πηκτών.

2.6.8 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

Εφόσον πραγματοποιηθεί επιτυχώς ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου, ακολουθεί η ηλεκτρομεταφορά (transfer) των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης διαμέτρου πόρων 0,2μM. Η διαδικασία αυτή αρχικά περιλαμβάνει την τοποθέτηση του gel, της μεμβράνης νιτροκυταρίνης, διηθητικών χαρτιών Whatman, και απορροφητικών σφουγγαριών, σε κρύο transfer buffer 1X (4°C) για 10min. Ακολουθώς τοποθετούνται σε ειδική κασετίνα κατά σειρά 1 απορροφητικό σφουγγάρι, 3 χαρτιά Watman, το gel, η μεμβράνη νιτροκυταρίνης, άλλα 3 χαρτιά Whatman και τέλος 1 ακόμη απορροφητικό σφουγγάρι. Σε κάθε στάδιο τοποθέτησης στην κασετίνα ασκείται ήπια πίεση ώστε να βρίσκεται σε πλήρη επαφή το gel με την μεμβράνη, ενώ επίσης το κλείσιμο της κασετίνας ασκεί ομοιόμορφα πίεση σε όλη την επιφάνεια για την επιτυχή μεταφορά των πρωτεϊνών.

Ακολουθώντας, η κασετίνα τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, και ο χώρος καλύπτεται με transfer buffer 1X. Οι πρωτεΐνες έχουν αρνητικό φορτίο που του έχει προσδοθεί από το SDS και μεταφέρονται οριζοντίως από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο, δηλαδή από το gel στην μεμβράνη, μέσω διαφοράς δυναμικού που εφαρμόζεται από τα ηλεκτρόδια της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς. Η ηλεκτρομαγνητική τάση που εφαρμόζεται για την μεταφορά των πρωτεϊνών είναι ρυθμισμένη στα 0,35A για χρονικό διάστημα 70min. Κατά την ηλεκτρομεταφορά, παράγεται θερμότητα λόγω της ηλεκτρομαγνητικής τάσης, και για να αποφευχθεί η μεγάλη αύξηση της θερμοκρασίας στο εσωτερικό της συσκευής, μέσα και γύρω από τη συσκευή τοποθετούνται παγοκύστες.

Μετά το πέρας των 70min που απαιτούνται για την επιτυχή μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη, πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος 10%w/v σε TBST 1X, για το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων σύνδεσης (blocking), για 1h. Ακολουθώντας, πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες, με διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος που στοχεύει το επιθυμητό μόριο-στόχο, για 16-18h υπό ανάδευση, στους 4°C. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, αφαιρείται το πρωτογενές αντίσωμα, και πραγματοποιούνται 5 πλύσεις των 5 min η καθεμία, με TBST 1X, με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας του πρωτογενούς αντισώματος που δεν έχει προσδεθεί σε κάποια ειδική θέση. Ακολουθεί η επώαση της μεμβράνης με διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται επιπλέον 3 πλύσεις της μεμβράνης με TBST 1X, και προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου που βρίσκεται συνδεδεμένο στο δευτερογενές αντίσωμα (HRP). Το υπόστρωμα (ECL) βρίσκεται σε δύο ξεχωριστά διαλύματα, τα οποία αναμειγνύονται σε αναλογία 1:1 (ECL A + ECL B). Η αντίδραση της οξειδωσης του ECL από το HRP, έχει ως παραπροϊόν φως το οποίο αξιοποιείται μέσω χημειοφωταύγειας για την αποτύπωση του σήματος πάνω σε φωτογραφικό film. Έτσι, η αποτύπωση του σήματος πραγματοποιείται μέσω τοποθέτησης του φιλμ πάνω στην μεμβράνη, μέσα σε ειδική κασετίνα, στον σκοτεινό θάλαμο. Η ανάπτυξη του σήματος πραγματοποιείται μέσω εμβάπτισης του φιλμ στο διάλυμα Developer και η μονιμοποίησή του, μέσω εμβάπτισης στο διάλυμα Fixer. Τέλος, για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών που έχουν εμφανιστεί στο film, μέσω του προγράμματος imageJ, και κανονικοποίηση των τιμών της κάθε ζώνης για τα υπό μελέτη μόρια, ως προς την αντίστοιχη ζώνη της ίδιας συνθήκης για το μόριο κανονικοποίησης (β -ακτίνη) αλλά και ως προς τις ζώνες των συνθηκών αναφοράς (control).

2.6.9 ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑ

Η ανοσοκυτταροχημεία αποτελεί μία μέθοδο η οποία χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση ενός πρωτεϊνικού μορίου ή αντιγόνου στα κύτταρα, και τον προσδιορισμό του υποκυτταρικού εντοπισμού του. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην οπτικοποίηση της πρωτεΐνης, μέσω της πρόσδεσης ενός ειδικού πρωτογενούς αντισώματος σε αυτή, και στη συνέχεια την πρόσδεση σε αυτό ενός δευτερογενούς αντισώματος που φέρει κάποιο φθοροφόρο. Τέλος, το φθοροφόρο του δευτερογενούς αντισώματος διεγείρεται με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος που ανήκει στο φάσμα διέγερσής του, και εκπέμπεται ακτινοβολία διαφορετικού μήκους κύματος που ανιχνεύεται από ανιχνευτές ενός συνεστιακού μικροσκοπίου ή μικροσκοπίου φθορισμού.

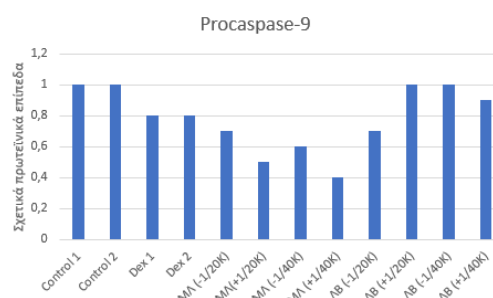
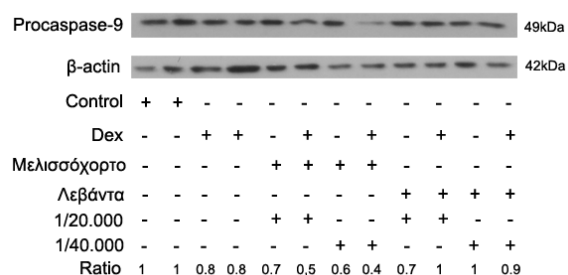
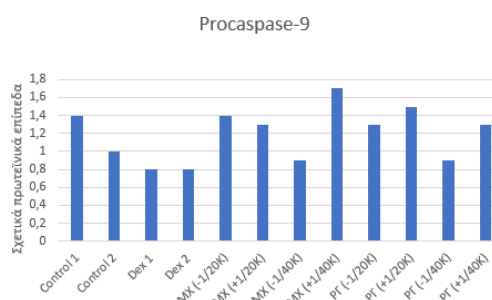
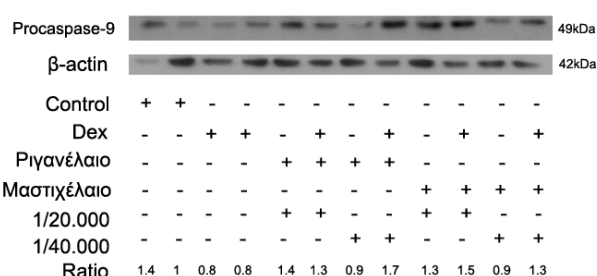
Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε ανοσοκυτταροχημεία στην κυτταρική σειρά HEK-293, με σκοπό τον προσδιορισμό της επίδρασης των αιθέριων ελαίων μελισσόχορτου και μαστίχας Χίου στον υποκυτταρικό εντοπισμό του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR). Για το σκοπό αυτό, αρχικά στρώθηκαν ειδικές καλυπτρίδες (coverslips) σε 24-well plate, και επωάστηκαν με EtOH 70% v/v, ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έκθεσή τους σε UV, έτσι ώστε να αποστειρωθούν. Την 1^η ημέρα της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση και στρώθηκαν στις καλυπτρίδες του 24-well plate 10.000 cells/well σε θρεπτικό μέσο DMEM με phenol red, εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS

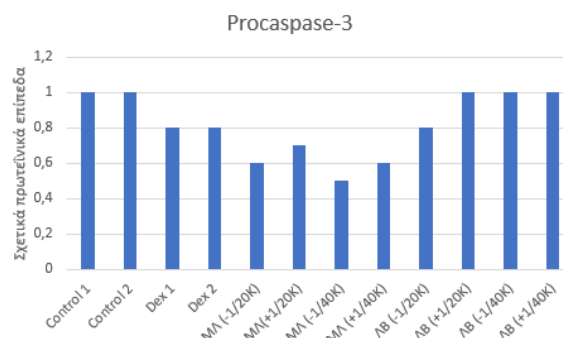
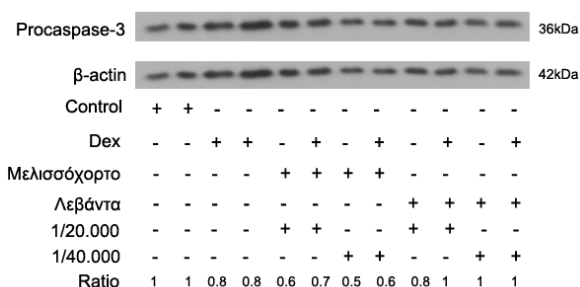
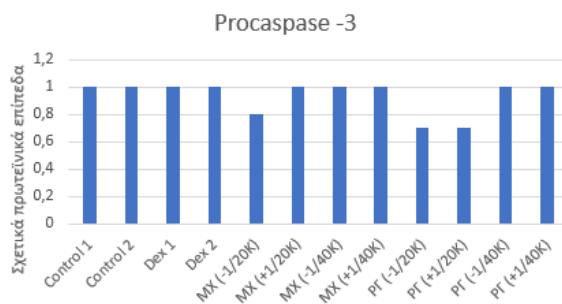
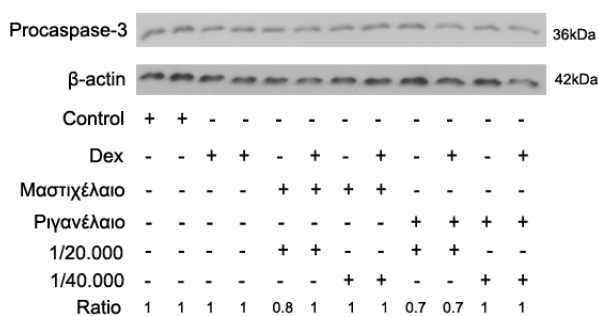
(Fetal Bovine Serum), 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% v/v L-γλουταμίνη και 1% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Μετά από 24h πραγματοποιήθηκε αλλαγή θρεπτικού, και προστέθηκε θρεπτικό μέσο DMEM χωρίς phenol red εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS-cis, 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% v/v L-γλουταμίνη και 1% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, έτσι ώστε τα κύτταρα να αναπτυχθούν απουσία στεροειδών ορμονών και να εξασφαλιστεί ότι ενδεχόμενη μετακίνηση του GR στον πυρήνα ή τα μιτοχόνδρια, πιθανόν να οφείλεται στη δράση των αιθέριων ελαίων που εξετάστηκαν. Έπειτα από 48h, πραγματοποιήθηκε η προσθήκη των αιθέριων ελαίων στη συγκέντρωση 1/20.000 v/v. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε αρνητικό control, που περιείχε EtOH σε τελική συγκέντρωση 10^{-3} M, καθώς σε αυτή ήταν διαλυμένη η Dex, ενώ επίσης χρησιμοποιήθηκε και θετικό control που περιείχε Dex σε τελική συγκέντρωση 10^{-7} M. Η χρονική περίοδος επώασης που εξετάστηκε ήταν 3h. Ακόμη, 30 min πριν τη συλλογή των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε προσθήκη της χρωστικής MitoTracker Red CMXRos, σε τελική συγκέντρωση 200 nM, με σκοπό τη χρώση των μιτοχονδρίων. Μετά το πέρας αυτού του διαστήματος, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο που περιείχε τα υπό μελέτη αιθέρια έλαια και πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με PBS 1X. Κατόπιν, ακολούθησε η μονιμοποίηση των κυττάρων στις καλυπτρίδες μέσω επώασής τους με μεθανόλη 100% για 10min στους -20°C και ακετόνης 100% για 1min στους -20°C . Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε επώαση των καλυπτρίδων με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι του GR (G5) σε αραιώση 1/50 v/v, διαλυμένο σε TBST 1X για χρονικό διάστημα 1h, και κατόπιν πραγματοποιήθηκε επώαση τους με το δευτερογενές anti-mouse αντίσωμα συνδεδεμένο με το φθοροφόρο μόριο Alexa- Fluor 488 σε αραιώση 1/500 v/v και της χρωστικής Hoechst 33342 σε τελική συγκέντρωση 0,1 mg/ml διαλυμένα σε TBST 1X, για 1h σε σκοτεινό μέρος. Τέλος, οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν και κολλήθηκαν με PVA σε αντικειμενοφόρους πλάκες και αποθηκεύτηκαν στους 4°C . Η παρατήρηση και η λήψη εικόνων πραγματοποιήθηκε μέσω του συνεστιακού μικροσκοπίου Zeiss LSM 800.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΡΙΓΑΝΗΣ, ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ, ΜΕΛΙΣΣΟΧΟΡΤΟΥ ΚΑΙ ΛΕΒΑΝΤΑΣ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

Προκειμένου να διερευνηθούν οι πιθανές προαποπτωτικές δράσεις των παραπάνω αιθέριων ελαίων, προσδιορίστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων που εμπλέκονται στην διαδικασία της απόπτωσης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Ειδικότερα, αναπτύχθηκαν κύτταρα HEK-293 σε 6-well plates (100.000 cells/well) για 24h σε DMEM με phenol red εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% v/v L-γλουταμίνη και 1% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Ακολούθως, το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και προστέθηκε DMEM με 10% v/v FBS-cis χωρίς phenol red, για 48h. Τα αιθέρια έλαια αραιώθηκαν αρχικά σε DMSO 100% και κατόπιν σε DMEM με 10% v/v FBS-cis χωρίς phenol red, και χρησιμοποιήθηκαν σε 2 συγκεντρώσεις το καθένα, 1/20.000 v/v και 1/40.000 v/v, όπου η καθεμία από αυτές τις συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν παρουσία και απουσία Dex (10^{-8} M). Οι συγκεντρώσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την επώαση των κυττάρων HEK-293, διότι σε αυτό το εύρος είχε φανεί από παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου ότι τα 4 αιθέρια έλαια δεν είναι κυτταροτοξικά. Τέλος, πραγματοποιήθηκε συλλογή και λύση των κυττάρων και τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9 και της προκασπάσης-3 μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Η προκασπάση-9 αποτελεί την εναρκτήρια κασπάση που ενεργοποιείται με το σχηματισμό του αποπτωσώματος στα αρχικά στάδια της απόπτωσης που λαμβάνει χώρα μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού, και στα μετέπειτα στάδια επάγει την ενεργοποίηση μέσω πρωτεόλυσης άλλων εκτελεστικών κασπασών όπως την προκασπάση-3. Ως μόριο κανονικοποίησης, χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη, της οποίας τα επίπεδα δεν μεταβάλλονται και είναι ανάλογα του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυτταρικών εκχυλισμάτων. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας:





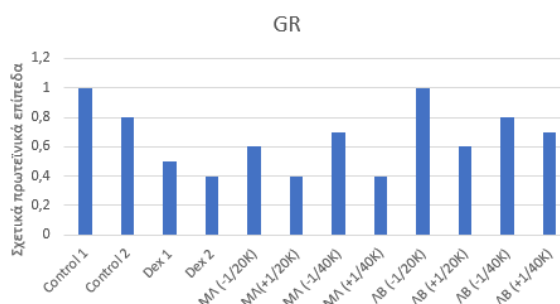
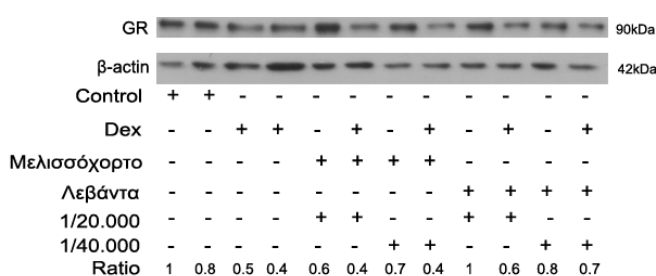
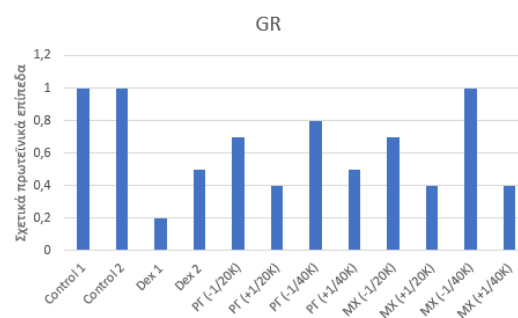
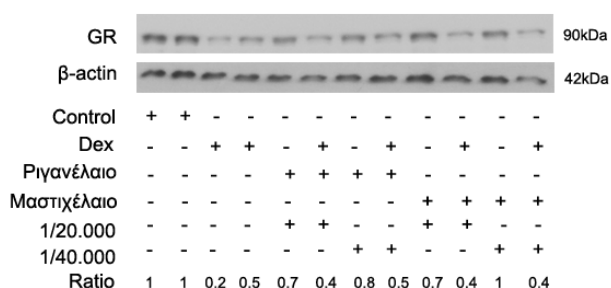
Εικόνα 9. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τη διερεύνηση της δόσοεξαρτώμενης επίδρασης των τεσσάρων αιθέριων ελαίων στην ενεργοποίηση μηχανισμών της απόπτωσης. Κύτταρα HEK-293 στρώθηκαν σε 6-well plate (100.000 cells/well) και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, παρουσία phenol red, 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% v/v L-γλουταμίνη και 1% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη για 24h. Ακολούθως, αφαιρέθηκε το θρεπτικό και τα κύτταρα επωάστηκαν για 48h με DMEM με FBS-cis χωρίς phenol red. Τέλος, τα κύτταρα επωάστηκαν με δύο συγκεντρώσεις (1/20.000 v/v και 1/40.000 v/v) για το κάθε έλαιο παρουσία και απουσία Dex για 48h. Στις παραπάνω εικόνες απεικονίζονται τα αποτελέσματα της western blot για την επίδραση του κάθε αιθέριου ελαίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3 και -9 (εικόνες αριστερά), ενώ στα δεξιά διαγράμματα απεικονίζονται τα ποσοτικοποιημένα αποτελέσματα της υπό μελέτη μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων των δύο μορίων στην αντίστοιχη συνθήκη σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο όρο (MO) για n=3 βιολογικές επαναλήψεις (PG=Ριγανέλαιο, MX=Μαστιχέλαιο, ΛΒ= Αιθέριο έλαιο λεβάντας, ΜΛ= Αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου, Dex = Δεξαμεθαζόνη).

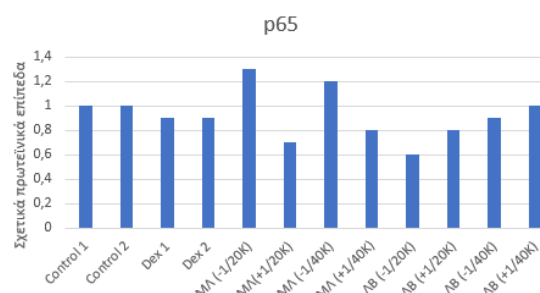
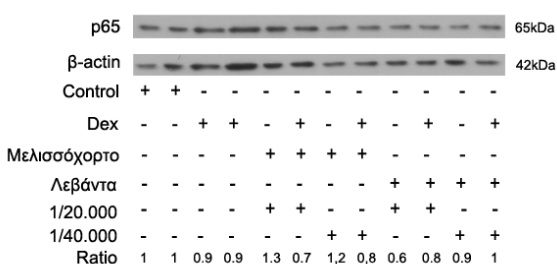
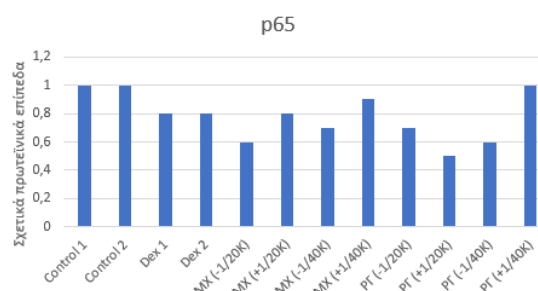
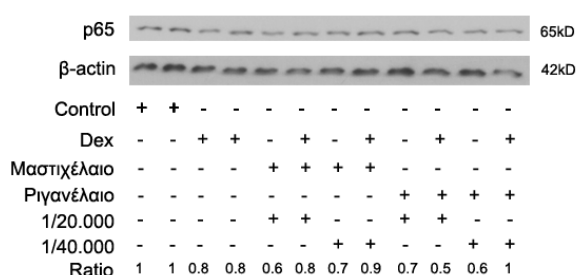
Όπως διακρίνεται και στις εικόνες παραπάνω, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της εναρκτήριας προκασπάσης-9 σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν για το αιθέριο έλαιο ρίγανης και μαστιχέλαιο τόσο παρουσία όσο και απουσία Dex, δεν μεταβάλλονται, ενώ οι ενδεχόμενες τάσεις αύξησης που παρατηρούνται πιθανώς οφείλονται σε πειραματικό σφάλμα. Για τις ίδιες συγκεντρώσεις των δύο αυτών αιθέριων ελαίων, παρατηρείται μία σχετική τάση για μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3 μόνο στις συγκεντρώσεις 1/20.000 v/v μαστιχέλαιο απουσία Dex (-1/20.000 v/v μαστιχέλαιο) και στις συγκεντρώσεις 1/20.000 v/v ριγανέλαιο τόσο παρουσία όσο και απουσία Dex (-1/20.000 v/v ριγανέλαιο και +1/20.000 v/v ριγανέλαιο), ωστόσο για την εξαγωγή κάποιου συμπεράσματος όσον αφορά την επίδρασή τους στην ενεργοποίηση της αποπτωτικής διαδικασίας απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση. Ακόμη, παρατηρήθηκε πως και στις 4 συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου (παρουσία και απουσία Dex), τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9, εμφανίζουν μία σχετική πτωτική τάση, ενώ μάλιστα στις

συγκεντρώσεις του αιθέριου ελαίου μελισσόχορτου παρουσία της Dex, η τάση για μείωση φαίνεται σχετικά μεγαλύτερη. Παρόλα αυτά, για την εξαγωγή βάσιμου συμπεράσματος όσον αφορά την ικανότητα του αιθέριου ελαίου μελισσόχορτου να επάγει την απόπτωση στα κύτταρα HEK-293, αλλά και την ενδεχόμενη συνεργατική δράση με τη Dex απαιτούνται επιπλέον πειράματα. Παράλληλα, και στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για το αιθέριο έλαιο λεβάντας, φάνηκε πως δεν υπάρχει κάποια μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9, με εξαίρεση μία μικρή τάση μείωσης τους στην συγκέντρωση 1/20.000 v/v απουσία Dex. Και σε αυτή την περίπτωση, δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο έγκυρο συμπέρασμα δίχως περαιτέρω διερεύνηση. Τέλος, στις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν προηγουμένως για το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου παρατηρήθηκε μία σχετική πτωτική τάση και στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3, χωρίς ωστόσο να εμφανίζεται κάποια ουσιαστική διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων που είναι παρουσία και της Dex και αυτών όπου η Dex απουσιάζει.

3.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΡΙΓΑΝΗΣ, ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ, ΜΕΛΙΣΣΟΧΟΡΤΟΥ ΚΑΙ ΛΕΒΑΝΤΑΣ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ GR ΚΑΙ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ p65 ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NF-κΒ

Στη συνέχεια, με σκοπό την αξιολόγηση των αντιφλεγμονωδών δράσεων των τεσσάρων υπό μελέτη αιθερίων ελαίων, προσδιορίστηκε μέσω western blot η επίδραση τους στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) και της υπομονάδας p65 του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HEK-293 επωάστηκαν με δύο συγκεντρώσεις (1/20.000 v/v και 1/40.000 v/v) για κάθε ένα από τα εν λόγω αιθέρια έλαια, παρουσία και απουσία Dex για 48h. Κατόπιν τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR και του p65 μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας:





Εικόνα 10. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τη διερεύνηση της δόσοεξαρτώμενης επίδρασης των τεσσάρων αιθέριων ελαίων στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) και της υπομονάδας p65 του NF-κΒ. Κύτταρα HEK-293 στρώθηκαν σε 6-well plate (100.000 cells/well) και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, παρουσία phenol red, 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% v/v L-γλουταμίνη και 1% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη για 24h. Ακολούθως, αφαιρέθηκε το θρεπτικό και τα κύτταρα επώαστηκαν για 48h με DMEM με FBS-cis χωρίς phenol red. Τέλος, τα κύτταρα επώαστηκαν με δύο συγκεντρώσεις (1/20.000 v/v και 1/40.000 v/v) για το κάθε έλαιο παρουσία και απουσία Dex για 48h. Οι παραπάνω εικόνες αναπαριστούν τα αποτελέσματα της western blot για την διερεύνηση της επίδρασης του καθενός αιθέριου ελαίου στην αντίστοιχη συγκέντρωση, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και της p65. Οι εικόνες στα δεξιά απεικονίζουν τις ζωνώσεις της ανοσοαποτύπωσης κατά western για το κάθε μόριο, ενώ αυτές στα αριστερά αποτελούν τα κανονικοποιημένα αποτελέσματα της υπό μελέτης μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων των εν λόγω μορίων σε κάθε συνθήκη σε σχέση με τις συνθήκες αναφοράς. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο όρο (MO) για n=4 βιολογικές επαναλήψεις. (ΡΓ=Ριγανέλαιο, ΜΧ=Μαστιχέλαιο, ΛΒ= Αιθέριο έλαιο λεβάντας, ΜΛ= Αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου, Dex = Δεξαμεθαζόνη).

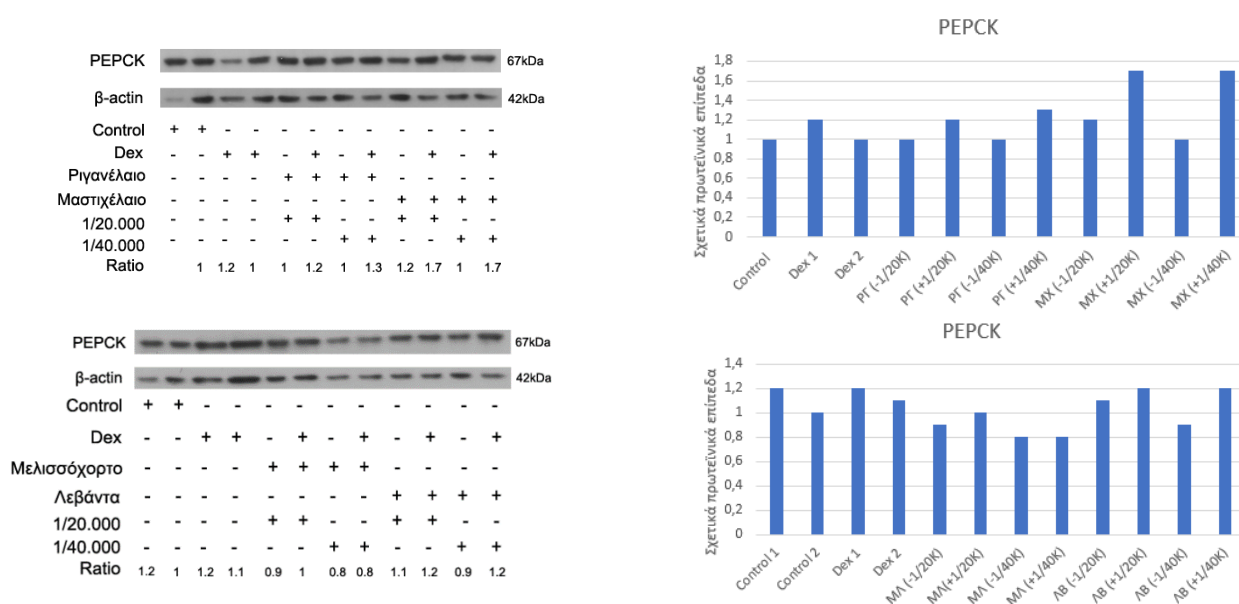
Η υπομονάδα p65 του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ αποτελεί μία από τις 5 πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ/Rel στα θηλαστικά. Η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ/Rel αποτελείται από τις δομικά σχετιζόμενες πρωτεΐνες NF-κΒ1 (p50), NF-κΒ2 (p52), RelA (p65), RelB και c-Rel, οι οποίες σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ, συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση και την επαγωγή της φλεγμονής, μέσω της πρόσδεσής του σε στοιχεία απόκρισης του στο DNA ή/και σε ενισχυτές -κΒ. Η ενεργοποίηση και η μετακίνηση του NF-κΒ από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, επάγεται από μεγάλο πλήθος σημάτων όπως προσδέτες υποδοχέων κυτοκινών, προφλεγμονώδη μόρια όπως οι ιντερλευκίνες, υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων (pattern recognition receptors, PRRs) και τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor- Receptor, TNF-R).

Απουσία αυτών των ερεθισμάτων, ο NF-κΒ εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα σε σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες Ικβ (inhibitors of NF-κΒ), οι οποίες φωσφορυλιώνονται και αποικοδομούνται μέσω ουβικουϊτίνωσης κατά την ενεργοποίηση του NF-κΒ, με αποτέλεσμα της έκθεση σημάτων πυρηνικού εντοπισμού και κατ' επέκταση την μετακίνησή του στον πυρήνα. Ο NF-κΒ, στην πλειονότητα των περιπτώσεων επάγει τη μεταγραφή προφλεγμονώδων γονιδίων που κωδικοποιούν για κυτοκίνες, χημειοκίνες και μόρια που προωθούν την κυτταρική επιβίωση, ενώ επιπλέον σε πολλές περιπτώσεις καταστέλλει και τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για προαποπτωτικές πρωτεΐνες (Liu T. Zhang et al., 2017). Αντίθετα, ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών μέσω του GR, αφορά την καταστολή της φλεγμονώδους απόκρισης, μέσω της παρεμπόδισης της μεταγραφής γονιδίων που επάγουν την φλεγμονή. Πιο συγκεκριμένα, ο GR μετά την ενεργοποίησή του και την είσοδό του στον πυρήνα, μπορεί να αλληλεπιδράσει με την υπομονάδα p65, παρεμποδίζοντας την πρόσδεση του NF-κΒ στα στοιχεία απόκρισής του στο DNA, ή μέσω αλληλεπίδρασης με τον NF-κΒ ενώ αυτός βρίσκεται προσδεμένος στο DNA αναστέλλοντας την στρατολόγηση ρυθμιστών της μεταγραφής (Revollo, J.& Cidlowski, 2009).

Όσον αφορά την επίδραση των τεσσάρων αιθέριων ελαίων στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, παρατηρήθηκε πως υπήρχε μία τάση για μείωση των επιπέδων του GR σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για το αιθέριο έλαιο ρίγανης και μαστίχας Χίου, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε πως στις συνθήκες που ήταν παρουσία της Dex αυτή η τάση για μείωση ήταν μεγαλύτερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη συνθήκη του ελαίου απουσία Dex, με εξαίρεση την συγκέντρωση 1/40.000 v/v του μαστιχέλαιο απουσία Dex (-1/40.000 v/v) όπου τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR δεν μεταβλήθηκαν. Ακόμη, και στις συνθήκες αναφοράς παρουσία της Dex (Dex 1 και Dex 2), τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, φάνηκαν επίσης μειωμένα. Το ίδιο φάνηκε και για τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τα αιθέρια έλαια μελισσόχορτου και λεβάντας, όπου σε όλες τις συνθήκες απουσία Dex παρατηρήθηκε μία σχετική τάση για μείωση των επιπέδων GR, με την τάση αυτή να είναι μεγαλύτερη στις αντίστοιχες συνθήκες παρουσία της Dex. Εξαίρεση αποτέλεσε, η συγκέντρωση 1/20.000 v/v του αιθέριου ελαίου λεβάντας απουσία της Dex (-1/20.000 v/v), όπου δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR. Σχετικά με την επίδραση των τεσσάρων αιθέριων ελαίων που μελετήθηκαν στα πρωτεϊνικά επίπεδα της p65, παρατηρήθηκε μία μικρή τάση για μείωση στις συγκεντρώσεις 1/20.000 v/v και 1/40.000 v/v του μαστιχέλαιο απουσία της Dex (-1/20.000 v/v και -1/40.000 v/v), ενώ επιπλέον παρατηρήθηκε και μία πτωτική τάση και στις αντίστοιχες συνθήκες για αιθέριο έλαιο ρίγανης, με τη μεγαλύτερη να αντιστοιχεί στη συγκέντρωση 1/20.000 v/v για το αιθέριο έλαιο ρίγανης παρουσία της Dex (+1/20.000 v/v). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μία μικρή τάση για μείωση των επιπέδων της p65 στις συνθήκες 1/20.000 v/v και 1/40.000 v/v του αιθέριου ελαίου μελισσόχορτου παρουσία της Dex (+1/20.000 v/v και +1/40.000 v/v), ενώ στις αντίστοιχες συνθήκες για το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου απουσία της Dex (-1/20.000 v/v και -1/40.000 v/v) φάνηκε μία σχετικά μικρή τάση αύξησης. Τέλος, σε όλες τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για το αιθέριο έλαιο λεβάντας παρατηρήθηκε μία μικρή πτωτική τάση των επιπέδων της p65, με εξαίρεση τη συγκέντρωση 1/40.000 v/v παρουσία της Dex (+1/40.000 v/v) όπου δεν φάνηκε κάποια μεταβολή. Ωστόσο, για να εξαχθούν έγκυρα συμπεράσματα για την επίδραση των εν λόγω αιθέριων ελαίων στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και της p65, καθώς και κάποια ενδεχόμενη συνεργατική ή ανταγωνιστική δράση αυτών με την Dex, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

3.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΡΙΓΑΝΗΣ, ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ, ΜΕΛΙΣΣΟΧΟΡΤΟΥ ΚΑΙ ΛΕΒΑΝΤΑΣ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ PEPCK

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μία πρωταρχική μελέτη διερεύνησης των αντι-υπεργλυκαιμικών δράσεων του τεσσάρων υπό μελέτη αιθέριων ελαίων, μέσω αξιολόγησης της επίδρασής τους στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK σε κύτταρα HEK-293. Η καρβοξυκινάση του φωσφοενολ-πυροσταφυλικού (PEPCK), αποτελεί ένα ηπατικό ένζυμο το οποίο καταλύει την μη αντιστρεπτή αντίδραση της μετατροπής του οξαλοξικού σε φωσφοενολ-πυροσταφυλικό. Η αντίδραση αυτή αποτελεί το πρώτο στάδιο της πορείας της γλυκονογένεσης. Το γονίδιο της PEPCK, αποτελεί ένα από τα κυριότερα γονίδια στόχους του GR, ο οποίος ρυθμίζει θετικά την μεταγραφή του. Η ρύθμιση της PEPCK, πραγματοποιείται κυρίως στο επίπεδο της μεταγραφής του γονιδίου της καθώς δεν έχει βρεθεί κάποιο αλλοστερικό κέντρο ρύθμισης του ενζύμου. Επομένως, με βάση τα παραπάνω, ο GR ρυθμίζοντας θετικά τη μεταγραφή του γονιδίου της PEPCK, επάγει την γλυκονογένεση και κατ' επέκταση τη αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Αυτό εξηγεί και το γεγονός πως η χρόνια χορήγηση γλυκοκορτικοειδών, έχει σαν παρενέργεια την ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη τύπου II (Yabaluri N. et al., 2010). Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα HEK επωάστηκαν για 48h με δύο συγκεντρώσεις για το κάθε αιθέριο έλαιο (1/20.000 v/v και 1/40.000 v/v) με την κάθε μία αυτές να βρίσκεται σε δύο συνθήκες, παρουσία και απουσία Dex. Κατόπιν το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στις παρακάτω εικόνες:



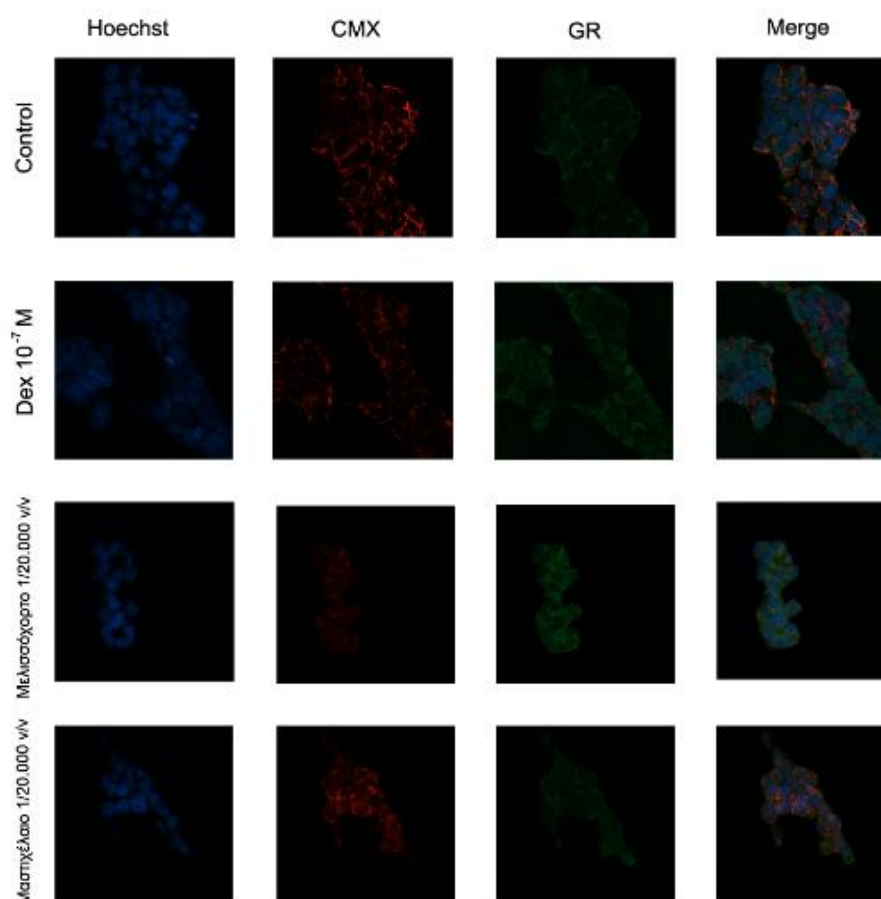
Εικόνα 11. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τη διερεύνηση της δόσοεξαρτώμενης επίδρασης των τεσσάρων αιθέριων ελαίων στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK. Κύτταρα HEK-293 στρώθηκαν σε 6-well plate (100.000 cells/well) και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, παρουσία phenol red, 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% v/v L-γλουταμίνη και 1% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη για 24h. Ακολούθως, αφαιρέθηκε το θρεπτικό και τα κύτταρα επωάστηκαν για 48h με DMEM με FBS-cis χωρίς phenol red. Τέλος, τα κύτταρα επωάστηκαν με δύο συγκεντρώσεις (1/20.000 v/v και 1/40.000 v/v) για το κάθε έλαιο παρουσία και απουσία Dex για 48h. Οι παραπάνω εικόνες αναπαριστούν τα

αποτελέσματα της western blot για την διερεύνηση της επίδρασης του καθενός αιθέριου ελαίου στην αντίστοιχη συγκέντρωση, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK. Στις εικόνες δεξιά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Western blot για την PEPCK σε κάθε συνθήκη, ενώ στις εικόνες στα αριστερά τα κανονικοποιημένα αποτελέσματα της μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK σε κάθε συνθήκη σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο όρο (MO) για $n=3$ βιολογικές επαναλήψεις (ΡΓ=Ριγανέλαιο, ΜΧ=Μαστιχέλαιο, ΛΒ=Αιθέριο έλαιο λεβάντας, ΜΛ= Αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου, Dex = Δεξαμεθαζόνη).

Όσον αφορά τη διερεύνηση της επίδρασης των τεσσάρων υπό μελέτη αιθέριων ελαίων, παρατηρήθηκε πως τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK παρουσιάζουν μία τάση αύξησης στις συνθήκες 1/20.000 v/v και 1/40.000 v/v για το αιθέριο έλαιο μαστίχας Χίου παρουσία της Dex, ενώ στις υπόλοιπες συνθήκες δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή. Ακόμη, φάνηκε και μία μικρή τάση μείωσης των επιπέδων της PEPCK στις συνθήκες 1/40.000 v/v για αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου τόσο παρουσία Dex όσο και απουσία αυτής. Παρόλα ταύτα, για να εξαχθούν έγκυρα συμπεράσματα σχετικά με τις αντιυπεργλυκαιμικές δράσεις των εν λόγω αιθέριων ελαίων, απαιτούνται περισσότερα πειράματα.

3.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΜΕΛΙΣΣΟΧΟΡΤΟΥ ΚΑΙ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ (GR)

Στη συνέχεια, με σκοπό μία αρχική προσπάθεια για τη διερεύνηση της επίδρασης των αιθέριων ελαίων μελισσόχορτου και μαστίχας Χίου στον υποκυτταρικό εντοπισμό του GR, ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή αλληλεπίδραση με τον GR και η πιθανότητα της μετατόπισής του από το κυτταρόπλασμα σε κάποιο υποκυτταρικό διαμέρισμα, πραγματοποιήθηκε ανοσοκυτταροχημεία σε κύτταρα HEK-293. Αρχικά, στρώθηκαν κύτταρα HEK-293, σε ειδικές καλυπτρίδες (coverslips), σε 24-well plate (10.000 cells/well) σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, παρουσία phenol red, 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% v/v L-γλουταμίνη και 1% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, και έπειτα από 24h πραγματοποιήθηκε αλλαγή θρεπτικού, με DMEM εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS-cis, απουσία phenol red, 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% v/v L-γλουταμίνη και 1% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, ώστε τα κύτταρα να αναπτυχθούν απουσία στεροειδών ορμονών. Μετά από 48h, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων με τα αιθέρια έλαια μελισσόχορτου και μαστίχας Χίου σε συγκέντρωση 1/20.000 v/v για χρονικό διάστημα 3h. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν με Dex σε τελική συγκέντρωση 10^{-7} M. Επιπλέον, 30 min πριν τη συλλογή των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε προσθήκη της χρωστικής MitoTracker Red CMXRos, σε τελική συγκέντρωση 200 nM, με σκοπό τη χρώση των μιτοχονδρίων. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση των κυττάρων στις καλυπτρίδες με μεθανόλη 100% για 10 min στους -20°C και ακετόνη 100% για 1 min στους -20°C . Στη συνέχεια, προστέθηκαν τα κατάλληλα αντισώματα (πρωτογενές αντίσωμα GR-G5 και δευτερογενές αντίσωμα anti-mouse συνδεδεμένο με το φθοροφόρο μόριο Alexa- Fluor 488) καθώς και η χρωστική Hoechst-33342 για τη σήμανση των πυρήνων. Τέλος, τοποθετήθηκαν και κολλήθηκαν οι καλυπτρίδες σε αντικειμενοφόρους πλάκες, και πραγματοποιήθηκε παρατήρηση και λήψη εικόνων σε συνεστιακό μικροσκόπιο, σε εστίαση 40X. Παρακάτω, απεικονίζονται τα αποτελέσματα της διαδικασίας:



Εικόνα 12. Έλεγχος της πιθανής επίδρασης των αιθέριων ελαίων μελισσόχορτου και μαστίχας Χίου στον υποκυτταρικό εντοπισμό του GR. Κύτταρα HEK-293 στρώθηκαν σε καλυπτρίδες, σε 24-well plate (10.000 cells/well) και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, παρουσία phenol red, 4.5mg/ml γλυκόζη, 1% v/v L-γλουταμίνη και 1% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη για 24h. Ακολούθως, αφαιρέθηκε το θρεπτικό και τα κύτταρα επωάστηκαν για 48h με DMEM με FBS-cis χωρίς phenol red. Τέλος, τα κύτταρα επωάστηκαν με τα αιθέρια έλαια μελισσόχορτου και μαστίχας Χίου σε συγκέντρωση 1/20.000 v/v για 3h. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε η Dex (10^{-7} M), οποία είναι γνωστό ότι επάγει την μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Στην εικόνα απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανοσοκυταροχημείας: με μπλε χρώμα (Hoechst) είναι σημασμένος ο πυρήνας των κυττάρων, με κόκκινο χρώμα (CMX) τα μιτοχόνδρια και με πράσινο σημασμένο αντίσωμα στοχεύεται ο GR.

Όπως γίνεται αντιληπτό από τις παραπάνω εικόνες, στο θετικό control των κυττάρων που επωάστηκαν με Dex σε τελική συγκέντρωση 10^{-7} M, ο GR εντοπίζεται εξ' ολοκλήρου στον πυρήνα των κυττάρων, ενώ στο αρνητικό control ο GR βρίσκεται στον κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Ακόμη, φάνηκε πως στην πιο πυκνή (1/20.000 v/v) εκ των δύο συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τα δύο αιθέρια έλαια στην ανασοαποτύπωση κατά Western σε HEK-293, κανένα από τα δύο αιθέρια δεν επάγει την μετατόπιση του GR στα μιτοχόνδρια ή τον πυρήνα των κυττάρων. Ωστόσο, προκειμένου να εξακριβωθεί αν κάποιο από τα αιθέρια έλαια μελισσόχορτου και μαστίχας Χίου, αλληλεπιδρά άμεσα με τον GR, και επάγει την μετατόπισή του σε κάποιο υποκυτταρικό διαμέρισμα, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση εξετάζοντας κάποια πιο πυκνή συγκέντρωση ή/και μεγαλύτερα ή μικρότερα χρονικά διαστήματα επώασης των κυττάρων με τα αιθέρια έλαια.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι στεροειδείς ορμόνες, που συντίθενται και εκκρίνονται από το φλοιό των επινεφριδίων, ως απόκριση στον κirkάδιο ρυθμό και σε στρεσογόνα για τον οργανισμό ερεθίσματα, ρυθμίζοντας μεγάλο πλήθος βιολογικών διαδικασιών με σκοπό την ομοίωση. Στον άνθρωπο, το κύριο γλυκοκορτικοειδές είναι η κορτιζόλη, η οποία λόγω της λιπόφιλης φύσης της μεταφέρεται στην κυκλοφορία του αίματος προσδεσμένη σε ειδικές πρωτεΐνες του πλάσματος. Επιπλέον, έχει την ικανότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, και ασκεί τις δράσεις της μέσω πρόσδεσης στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR), είναι ένας κυτταροπλασματικός υποδοχέας με δράση μεταγραφικού παράγοντα εξαρτώμενο από τον προσδέτη, που ενεργοποιείται έπειτα από πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών, με αποτέλεσμα την μετατόπιση του στον πυρήνα, και κατ' επέκταση την ρύθμιση της μεταγραφής μεγάλου αριθμού γονιδίων, με αποτέλεσμα να διαθέτει ένα πολύ ευρύ φάσμα δράσεων στον οργανισμό. Οι σημαντικότερες εξ αυτών αφορούν τη φυσιολογική ανάπτυξη συστημάτων οργάνων όπως το καρδιαγγειακό, το αναπνευστικό και το αναπαραγωγικό, την ρύθμιση των ανοσολογικών αντιδράσεων, την ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου και της κυτταρικής επιβίωσης και τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και των λιπαρών οξέων. Λόγω του μεγάλου εύρους δράσεων των γλυκοκορτικοειδών, εδώ και πολλά χρόνια, συνθετικά γλυκοκορτικοειδή αποτελούν μία ευρέως διαδεδομένη φαρμακευτική αγωγή για την αντιμετώπιση αρκετών ασθενειών, μεταξύ των οποίων είναι οι φλεγμονώδεις παθήσεις, διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα αλλά και αρκετοί τύποι καρκίνου του ανοσοποιητικού και του αιμοποιητικού συστήματος. Ωστόσο, παρόλο που τα γλυκοκορτικοειδή διαθέτουν πολύ αποτελεσματικές θεραπευτικές δράσεις έναντι των παραπάνω παθολογικών καταστάσεων, η παρατεταμένη χρήση τους οδηγεί σε πολλές περιπτώσεις σε ανεπιθύμητες παρενέργειες όπως η ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη τύπου II, η οστεοπόρωση, η μυϊκή ατροφία και η αυξημένη ευαισθησία στις λοιμώξεις από παθογόνα [(Ramamoorthy et al., 2016); (Oakley et al., 2013); (Kadmiel, M., & Cidlowski, 2013)]. Όπως γίνεται αντιληπτό από τα ανωτέρω, είναι πλέον μείζονος σημασίας η εύρεση εξειδικευμένων επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, οι οποίοι, να διαθέτουν τις θεραπευτικές ιδιότητες που αναφέρθηκαν περιορίζοντας παράλληλα στο ελάχιστο τις πολύ σοβαρές ανεπιθύμητες παρενέργειες.

Τα τελευταία χρόνια αυξάνεται συνεχώς ο αριθμός των επιστημονικών μελετών που καταδεικνύουν τα θεραπευτικά οφέλη των χημικών ενώσεων φυτικής προέλευσης και ειδικότερα των αιθέριων ελαίων που παράγονται από φυτά. Πιο συγκεκριμένα, τα αιθέρια έλαια φυτών αποτελούν εξαιρετικά σύνθετα μείγματα χημικών ενώσεων, οι οποίες στην πλειοψηφία τους αποτελούν μεταβολίτες που παράγονται από τον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών. Οι περισσότερες ενώσεις που περιέχονται σε μεγαλύτερη ποσοστιαία αναλογία στα αιθέρια έλαια που παράγονται από φυτά ανήκουν στην κατηγορία των τερπενοειδών και ειδικότερα είναι αρωματικά μονοτερπένια και σεσκιτερπένια. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν 4 αιθέρια έλαια που παράγονται από: το μαστιχόδεντρο (*Pistacia lentiscus*), το φυτό *Melissa officinalis*, το φυτό της λεβάντας (*Lavandula angustifolia*) και το φυτό της ρίγανης *Origanum vulgare*. Αναφορικά με τις βιολογικές δράσεις των τεσσάρων αυτών αιθέριων ελαίων υπάρχει πλήθος μελετών που αποδεικνύει τις αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες [(Tepe B., et al., 2016); (Miyamoto T. et al., 2014); (Mimica-Dukic N., et al., 2004); (Prusinowska R., et al., 2014)]. Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου έχει αυξηθεί και ο αριθμός των μελετών που ενισχύουν τη βιολογική αξία των εν λόγω αιθέριων ελαίων υποστηρίζοντας πως εκτός των γνωστών αντιμικροβιακών δράσεων, έχει φανεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* πως διαθέτουν αντικαρκινικές αλλά και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [(Leyva-López, N., et al., 2017); (Spyridopoulou K. et al., 2017); (Weidner C., et al., 2015); (Zhao Y., et al., 2016)].

Έτσι, βάσει των όσων αναφέρθηκαν ανωτέρω, ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση των προαποπτωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντιυπεργλυκαιμικών δράσεων των τεσσάρων αιθέριων ελαίων, ενώ παράλληλα διερευνήθηκε και η πιθανότητα εμπλοκής τους, στο μονοπάτι σηματοδότησης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, επάγοντας με άμεσο ή έμμεσο τρόπο κάποιες από τις δράσεις τους μέσω αυτού. Ακόμη, εξετάστηκε και η πιθανότητα αλληλεπίδρασης των αιθέριων ελαίων μελλισόχορτου και μαστίχας Χίου, με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών διερευνώντας την ενδεχόμενη ενεργοποίησή του και την επακόλουθη μετακίνησή του.

Με σκοπό την διερεύνηση των προαποπτωτικών δράσεων των τεσσάρων αιθέριων ελαίων, μελετήθηκε η επίδραση τους στη μεταβολή των επιπέδων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην αποπτωτική διαδικασία. Ειδικότερα, αξιολογήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της εναρκτήριας προκασπάσης-9 και της εκτελεστικής προκασπάσης-3 σε κύτταρα HEK-293 έπειτα από επώαση τους με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις για κάθε αιθέριο έλαιο, με την κάθε συγκέντρωση να βρίσκεται σε αντίστοιχη συνθήκη παρουσία και απουσία Dex. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για το αιθέριο έλαιο ρίγανης και μαστίχας Χίου και λεβάντας, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9 και της προκασπάσης-3 δεν μεταβάλλονται σημαντικά. Αντίθετα, και στις δύο συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου ($1/20.000$ v/v και $1/40.000$ v/v) παρατηρείται μία τάση μείωσης των επιπέδων της προκασπάσης-9, η οποία φαίνεται να ενισχύεται παρουσία της Dex, ενώ επίσης στις ίδιες συνθήκες παρατηρείται και μία σχετική πτωτική τάση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3, χωρίς ωστόσο να ενισχύεται περαιτέρω από την παρουσία της Dex. Με βάση τα παραπάνω, καταδεικνύεται πιθανώς το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου να επάγει την απόπτωση στα κύτταρα HEK-293, ενδεχομένως μέσω της ενεργοποίησης της ενδογενούς οδού της απόπτωσης, ωστόσο, για να εξακριβωθεί η εγκυρότητα των εν λόγω αποτελεσμάτων κρίνεται αναγκαίο να προσδιοριστεί η επίδραση των ίδιων συγκεντρώσεων του αιθέριου ελαίου μελισσόχορτου και στην μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων άλλων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην μιτοχονδριακή αποπτωτική οδό, όπως είναι οι πρωτεΐνες Bak, Bim και η Bad.

Παράλληλα, διερευνήθηκε στα ίδια κύτταρα και η επίδραση των ίδιων δύο συγκεντρώσεων για τα τέσσερα αιθέρια έλαια, και στη μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) και της υπομονάδας p65 του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Τα αποτελέσματα έδειξαν, πως σε όλες τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τα αιθέρια έλαια ρίγανης, μαστίχας Χίου, μελισσόχορτου και λεβάντας παρατηρήθηκε μία τάση για μείωση των επιπέδων του GR, ενώ η τάση για μείωση ήταν ακόμη μεγαλύτερη στις συνθήκες που ήταν παρουσία της Dex. Σχετικά με την επίδραση των τεσσάρων αιθέριων ελαίων που μελετήθηκαν στα πρωτεϊνικά επίπεδα της p65, παρατηρήθηκε μία μικρή τάση για μείωση στις συγκεντρώσεις $1/20.000$ v/v και $1/40.000$ v/v του μαστιχέλαιου απουσία της Dex ($-1/20.000$ v/v και $-1/40.000$ v/v), ενώ επιπλέον παρατηρήθηκε και μία πτωτική τάση και στις αντίστοιχες συνθήκες για αιθέριο έλαιο ρίγανης, με τη μεγαλύτερη να αντιστοιχεί στη συγκέντρωση $1/20.000$ v/v για το αιθέριο έλαιο ρίγανης παρουσία της Dex ($+1/20.000$ v/v). Ακόμη, παρατηρήθηκε πως σε όλες τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για το αιθέριο έλαιο λεβάντας παρατηρήθηκε μία μικρή πτωτική τάση των επιπέδων της p65, με εξαίρεση τη συγκέντρωση $1/40.000$ v/v παρουσία της Dex ($+1/40.000$ v/v) όπου δεν φάνηκε κάποια μεταβολή. Ωστόσο, προκειμένου να χαρακτηριστούν οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των εν λόγω αιθέριων ελαίων, κρίνεται αναγκαίο να προσδιοριστεί και η επίδρασή τους στην μεταγραφική ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ώστε να εξακριβωθεί αν στις ίδιες συνθήκες επώασης των κυττάρων HEK-293, επηρεάζεται η μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για προφλεγμονώδη πρωτεϊνικά μόρια.

Επιπλέον, με σκοπό τον προσδιορισμό των αντιυπεργλυκαιμικών δράσεων των τεσσάρων αιθέριων ελαίων, αξιολογήθηκε και η επίδραση τους στη μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων της

PEPCK, ενός ενζύμου που καταλύει την πρώτη αντίδραση στην πορεία της γλυκονεογένεσης και αποτελεί σημείο ρύθμισης της γλυκονεογένεσης στο επίπεδο της μεταγραφής του γονιδίου της, ενώ παράλληλα είναι γνωστό πως αποτελεί ένα από τα γονίδια-στόχους του GR. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως σε όλες τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για το αιθέριο έλαιο ρίγανης και μαστίχας Χίου απουσία της Dex, δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK, ενώ στις ίδιες συνθήκες παρουσία της Dex, παρατηρήθηκε μία μικρή τάση αύξησης των επιπέδων της PEPCK, η οποία πιθανώς να εξηγείται από το γεγονός πως το γονίδιο της PEPCK, αποτελεί ένα από τα κύρια γονίδια-στόχους για επαγωγή της μεταγραφής από τον GR, και η Dex αποτελεί συνθετικό γλυκοκορτικοειδές που συνδέεται ειδικά και ενεργοποιεί τον GR. Επιπλέον, παρατηρήθηκε στις συνθήκες 1/40.000 v/v για το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου τόσο παρουσία όσο και απουσία Dex, μία μικρή τάση μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK, και δεδομένου ότι στις αντίστοιχες συνθήκες τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR φάνηκαν μειωμένα, πιθανώς το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου σε αυτές τις συγκεντρώσεις να διαθέτει αντιυπεργλυκαιμικές ιδιότητες μέσω της μείωσης των επιπέδων του GR και κατ' επέκταση μείωση του ρυθμού μεταγραφής του γονιδίου της PEPCK. Παρόλα ταύτα, η εξαγωγή έγκυρων συμπερασμάτων απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μία πρώτη προσπάθεια διερεύνησης της πιθανής αλληλεπίδρασης των αιθέριων ελαίων μελισσόχορτου και μαστίχας Χίου με τον GR, εξετάζοντας την πιθανότητα ενεργοποίησής του και κατ' επέκταση την πιθανή μετατόπισή του σε κάποιο υποκυτταρικό διαμέρισμα. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ανοσοκυτταροχημεία σε κύτταρα HEK-293, έπειτα από επώασή τους με τα δύο αυτά αιθέρια έλαια σε τελική συγκέντρωση 1/20.000 v/v για το χρονικό διάστημα των 3h. Τα αποτελέσματα της ανοσοκυτταροχημείας, έδειξαν πως κανένα από τα δύο αιθέρια έλαια στην συγκέντρωση 1/20.000 v/v, δεν επάγει την μετακίνηση του GR στα μιτοχόνδρια ή τον πυρήνα των κυττάρων. Παρόλα ταύτα, προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση αυτών των δύο αιθέριων ελαίων στον υποκυτταρικό εντοπισμό του GR, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση, εξετάζοντας περισσότερες -πιο πυκνές- συγκεντρώσεις των αιθέριων ελαίων ή/και διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης των κυττάρων με τα εν λόγω αιθέρια έλαια.

Συνοψίζοντας, τα συμπεράσματα που εξάγονται με βάση όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι πως πιθανόν το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου να επάγει την απόπτωση στα κύτταρα HEK-293, ενδεχομένως με της μιτοχονδριακής αποπτωτικής οδού. Προκειμένου να διερευνηθεί ο πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου λαμβάνει χώρα η απόπτωση, μία πιθανή επιλογή αποτελεί η διερεύνηση της επίδρασης του αιθέριου ελαίου μελισσόχορτου στη μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων άλλων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη μιτοχονδριακά εξαρτώμενη αποπτωτική οδό, όπως είναι οι πρωτεΐνες Bak, Bim και η Bad. Επιπλέον, φάνηκε πως τα αιθέρια έλαια ρίγανης, μαστίχας Χίου, μελισσόχορτου και λεβάντας, έχουν την ικανότητα να επάγουν μία τάση μείωσης των επιπέδων του GR, ενώ η τάση μείωσης αυξάνεται όταν συνδυάζονται με τη Dex. Ακόμη, τα αιθέρια έλαια ρίγανης, μαστίχας Χίου και λεβάντας φαίνεται πως επάγουν την μείωση των επιπέδων της p65, ειδικά όταν συνδυάζονται με την Dex, όπου η μείωση που επάγεται είναι μεγαλύτερη. Ωστόσο, προκειμένου να χαρακτηριστούν περαιτέρω οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των εν λόγω αιθέριων ελαίων, κρίνεται αναγκαίο να προσδιοριστεί και η επίδρασή τους στην μεταγραφική ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Παράλληλα, φάνηκε πως το αιθέριο έλαιο μελισσόχορτου επάγει την μείωση των επιπέδων της PEPCK και του GR, και πιθανώς να διαθέτει αντιυπεργλυκαιμικές ιδιότητες μέσω της μείωσης των επιπέδων του GR και κατ' επέκταση μείωση του ρυθμού μεταγραφής του γονιδίου της PEPCK, που αποτελεί ένα από τα κύρια γονίδια-στόχους του GR. Κλείνοντας, τα εν λόγω αιθέρια έλαια θα μπορούσαν μελλοντικά να αποτελέσουν αντικείμενα μελέτης, ώστε να αξιοποιηθούν οι πιθανές ευεργετικές τους ιδιότητες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Argyropoulos, D., & Müller, J. (2014). *Changes of essential oil content and composition during convective drying of lemon balm (Melissa officinalis L.)*. *Industrial Crops and Products*, 52, 118–124.
2. Baig, S., Seevasant, I., Mohamad, J., Mukheem, A., Huri, H. Z., & Kamarul, T. (2016). *Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand?* *Cell Death and Disease*, 7(1), e2058.
3. Barbedo, Jayme. (2013). Automatic Object Counting In Neubauer Chambers.
4. Bayat, M., Azami Tameh, A., Hossein Ghahremani, M., Akbari, M., Mehr, S. E., Khanavi, M., & Hassanzadeh, G. (2012). *Neuroprotective properties of Melissa officinalis after hypoxic-ischemic injury both in vitro and in vivo*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(1), 42.
5. 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.
6. 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.
7. Carvalho, N. C. de, Corrêa-Angeloni, M. J. F., Leffa, D. D., Moreira, J., Nicolau, V., Amaral, P. de A., ... Andrade, V. M. de. (2011). *Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of Melissa officinalis in mice*. *Genetics and Molecular Biology*, 34(2), 290–297.
8. Cavanagh, H. M. A., & Wilkinson, J. M. (2005). *Lavender essential oil: a review*. *Australian Infection Control*, 10(1), 35–37.
9. Chung, M. J., Cho, S.-Y., Bhuiyan, M. J. H., Kim, K. H., & Lee, S.-J. (2010). *Anti-diabetic effects of lemon balm (Melissa officinalis) essential oil on glucose- and lipid-regulating enzymes in type 2 diabetic mice*. *British Journal of Nutrition*, 104(02), 180–188.
10. De Falco, E., Mancini, E., Roscigno, G., Mignola, E., Taglialatela-Scafati, O., & Senatore, F. (2013). *Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oils of Origanum vulgare L. subsp. vulgare L. under Different Growth Conditions*. *Molecules*, 18(12), 14948–14960.
11. De Sousa, A. C., Gattass, C. R., Alviano, D. S., Alviano, C. S., Blank, A. F., & Alves, P. B. (2004). *Melissa officinalis L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(5), 677–681.
12. Diniz do Nascimento, L., Moraes, A. A. B. de, Costa, K. S. da, Pereira Galúcio, J. M., Taube, P. S., Costa, C. M. L., ... Faria, L. J. G. de. (2020). *Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications*. *Biomolecules*, 10(7), 988.
13. Dong, G., Bai, X., Aimila, A., Aisa, H., & Maiwulanjiang, M. (2020). *Study on Lavender Essential Oil Chemical Compositions by GC-MS and Improved pGC*. *Molecules*, 25(14), 3166.
14. Elmore, S. (2007). *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
15. Elshafie, H. S., & Camele, I. (2017). *An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health*. *BioMed Research International*, 2017, 1-14.
16. 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.
17. Fulda, S. (2011). *Targeting Apoptosis Signaling Pathways for Anticancer Therapy*. *Frontiers in Oncology*, 1.
18. Fulda, S., & Debatin, K.-M. (2006). *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*. *Oncogene*, 25(34), 4798–4811.

19. Fulda, S., & Debatin, K.-M. (2008). *Apoptosis Signaling Pathways in Anticancer Therapy*. *Current Cancer Therapy Reviews*, 4(1), 14–20.
20. GALON, J., FRANCHIMONT, D., HIROI, N., FREY, G., BOETTNER, A., EHRHART-BORNSTEIN, M., ... BORNSTEIN, S. R. (2002). Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *The FASEB Journal*, 16(1), 61–71.
21. Geske, F. J., & Gerschenson, L. E. (2001). *The biology of apoptosis*. *Human Pathology*, 32(10), 1029–1038.
22. Gruver-Yates, A., & Cidlowski, J. (2013). *Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword*. *Cells*, 2(2), 202–223.
23. Hanamanthagouda, M.S., Kakkalameli, S.B., Naik, P.M., Nagellaa, P., Seetharamareddy, H.R. (2010). Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. *Food Chemistry*. 118: 836-39
24. Hengartner, M. O. (2000). *The biochemistry of apoptosis*. *Nature*, 407(6805), 770–776.
25. 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.
26. Kadmiel, M., & Cidlowski, J. A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(9), 518–530.
27. Kaliora, A. C., & Kountouri, A. M. (2012). *Chemopreventive Activity of Mediterranean Medicinal Plants. Cancer Prevention - From Mechanisms to Translational Benefits*.
28. 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.
29. Kuwana, T., & Newmeyer, D. D. (2003). *Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis*. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), 691–699.
30. Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. (2017). *Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties*. *Molecules*, 22(6), 989.
31. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). *NF-κB signaling in inflammation. Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, 17023.
32. Lu N.Z, Cidlowski, J.A, (2006), Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity, *Trends in Cell Biology*, 16 (6) , pp. 301-307.
33. Magkouta, S., Stathopoulos, G. T., Psallidas, I., Papapetropoulos, A., Kolisis, F. N., Roussos, C., & Loutrari, H. (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.
34. 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.
35. Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., & Simin, N. (2004). *Antimicrobial and Antioxidant Activities of Melissa officinalis L. (Lamiaceae) Essential Oil*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2485–2489.
36. Misharina, T.A.; Burlakova, E.B.; Fatkullina, L.D.; Alinkina, E.S.; Vorob'eva, A.K.; Medvedeva, I.B.; Erokhin, V.N.; Semenov, V.A.; Nagler, L.G.; Kozachenko, A.I. Effect of oregano essential oil on the engraftment and development of lewis carcinoma in f1 dba c57 black hybrid mice. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2013, 49, 432–436.
37. Mita, M. M., Mita, A. C., & Tolcher, A. W. (2006). *Apoptosis: mechanisms and implications for cancer therapeutics*. *Targeted Oncology*, 1(4), 197–214.
38. 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.

39. Müller, M. B., & Holsboer, F. (2006). Mice with Mutations in the HPA-System as Models for Symptoms of Depression. *Biological Psychiatry*, 59(12), 1104–1115.
40. Nicolaides, 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–
41. 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.
42. Ola, M. S., Nawaz, M., & Ahsan, H. (2011). *Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. Molecular and Cellular Biochemistry*, 351(1-2), 41–58.
43. Overview of the major scientific publications on the beneficial activity of Chios Mastiha”, (2015), Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, Chios Mastiha published scientific booklet
44. Papadimitriou, A., & Priftis, K. N. (2009). Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Neuroimmunomodulation*, 16(5), 265–271.
45. Papadimitriou, A., & Priftis, K. N. (2009). Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Neuroimmunomodulation*, 16(5), 265–271.
46. Paraschos, S., Magiatis, P., Gikas, E., Smyrnioudis, I., & Skaltsounis, A.-L. (2016). *Quality profile determination of Chios mastic gum essential oil and detection of adulteration in mastic oil products with the application of chiral and non-chiral GC–MS analysis. Fitoterapia*, 114, 12–17.
47. Payne AH, Hales DB: Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 2004;25:947–970.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. Ramamoorthy, S., & Cidlowski, J. A. (2016). Corticosteroids. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 42(1), 15–31.
52. Ren, R., Oakley, R. H., Cruz-Topete, D., & Cidlowski, J. A. (2012). Dual Role for Glucocorticoids in Cardiomyocyte Hypertrophy and Apoptosis. *Endocrinology*, 153(11), 5346–5360.
53. 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.
54. Rose, A. J., Vegiopoulos, A., & Herzig, S. (2010). *Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: Insights from genetic manipulations. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 122(1-3), 10–20.
55. Saini, K. S., & Walker, N. I. (1998). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 178(1/2), 9–25.
56. Samuelson, R., Lobl, M., Higgins, S., Clarey, D., & Wysong, A. (2020). *The Effects of Lavender Essential Oil on Wound Healing: A Review of the Current Evidence. The Journal of Alternative and Complementary Medicine*.
57. 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.
58. 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
59. Shakeri, A., Sahebkar, A., & Javadi, B. (2016). *Melissa officinalis L. – A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology*, 188, 204–228.
60. Smigielski, K., Prusinowska, R., Stobiecka, A., Kunicka-Styczyńska, A., & Gruska, R. (2018). *Biological Properties and Chemical Composition of Essential Oils from Flowers and Aerial Parts of Lavender (Lavandula angustifolia). Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 1–12.

61. Smith, L. K., & Cidlowski, J. A. (2010). *Glucocorticoid-Induced Apoptosis of Healthy and Malignant Lymphocytes. Progress in Brain Research*, 1–30.
62. Spyridopoulou, K., Fitsiou, E., Bouloukosta, E., Tiptiri-Kourpeti, A., Vamvakias, M., Oreopoulou, A., ... Chlichlia, K. (2019). *Extraction, Chemical Composition, and Anticancer Potential of Origanum onites L. Essential Oil. Molecules*, 24(14), 2612.
63. Spyridopoulou, K., Tiptiri-Kourpeti, A., Lampri, E., Fitsiou, E., Vasileiadis, S., Vamvakias, M., ... Chlichlia, K. (2017). Dietary mastic oil extracted from *Pistacia 50 lentiscus* var. *chia* suppresses tumor growth in experimental colon cancer models. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-03971-8
64. 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).
65. Tepe, B., Cakir, A., & Sihoglu Tepe, A. (2016). *Medicinal Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of Origanum onites(L.): A Review. Chemistry & Biodiversity*, 13(5), 504–520.
66. Timmermans, S., Souffriau, J., & Libert, C. (2019). A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Frontiers in Immunology*, 10.
67. Tsujimoto, Y. (1998). *Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? Genes to Cells*, 3(11), 697–707.
68. 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.
69. Vandevyver, S., Dejager, L., & Libert, C. (2014). Comprehensive Overview of the Structure and Regulation of the Glucocorticoid Receptor. *Endocrine Reviews*, 35(4), 671–693.
70. Weidner, C., Rousseau, M., Plauth, A., Wowro, S. J., Fischer, C., Abdel-Aziz, H., & Sauer, S. (2015). *Melissa officinalis* extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through formation of reactive oxygen species. *Phytomedicine*, 22(2), 262–270.
71. Yabaluri, N., & Bashyam, M. D. (2010). Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *Journal of Biosciences*, 35(3), 473–484
72. Yang, P.-C., & Mahmood, T. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429.
73. 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.