



ΤΜΗΜΑ

**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**

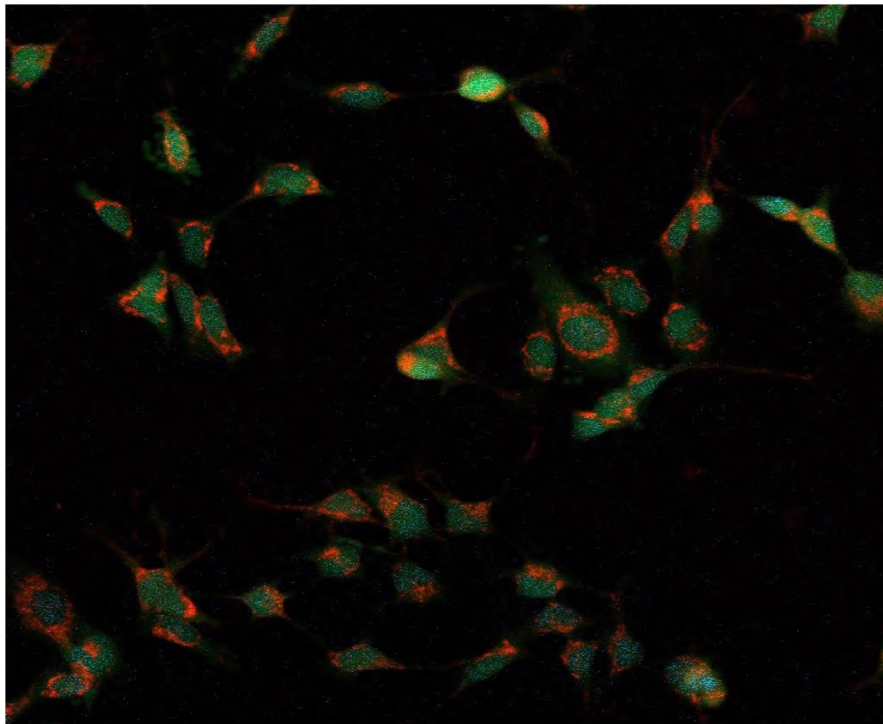
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΕ
ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

**CHARACTERIZATION OF THE APOPTOTIC
ACTIVITIES OF PLANT-DERIVED EXTRACTS IN
NEURAL CELLS**



Πτυχιακή Εργασία
Ονοματεπώνυμο: Βικτωρία Καράλη
Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Δρ. Άννα – Μαρία Ψαρρά
Λάρισα 2023

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια

Ψαρρά Άννα - Μαρία

Αν. Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα.

Τριμελής Επιτροπή

Ψαρρά Άννα - Μαρία

Αν. Καθηγήτρια Βιοχημείας, 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.

Τσίκου Δανιέλα

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή, Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα πρωτίστως να εκφράσω τις θερμές και ειλικρινείς ευχαριστίες μου, πάνω από όλα, στην κα. Άννα-Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής μου εργασίας, για τις σημαντικές γνώσεις την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθεια που προσέφερε σε οποιοδήποτε πρόβλημα/απορία παρουσιαζόταν, για την ανιδιοτελή υποστήριξή της, σε όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε να γίνω μέλος της ερευνητικής της ομάδας.

Ακόμα θέλω να ευχαριστήσω θερμά και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής της, τον κ. Λεωνίδα Δημήτριο, Καθηγητή Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την κα. Τσίκου Δανιέλα, Επίκουρο Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο για την εκπαίδευση, καθοδήγηση και βοήθεια που προσέφερε στα αρχικά μου βήματα στον χώρο του εργαστηρίου, αλλά και για την υπομονή του και άπογη συνεργασία σε όλη τη διάρκεια της συμμετοχής μου στην ερευνητική μελέτη και την πειραματική διαδικασία, καθώς επίσης και όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη συνεργασία.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συνάδελφο Σταυρούλα Σουλιμεμέζη, μέλος της ερευνητικής ομάδας της κας Άννας Μαρίας Ψαρρά, για την ευχάριστη και ομαλή συνεργασία μας κατά τη διάρκεια εκπόνησης της κοινής μας πειραματικής μελέτης.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου που με τη συνεχή ηθική και ψυχική στήριξη αλλά και βοήθειά τους συνέβαλαν στο να ολοκληρώσω ένα μεγάλο και πολύ σημαντικό κομμάτι της ζωής μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περιεχόμενα	3
Περίληψη	5
Abstract	6
Κεφάλαιο	Σελίδα
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1. ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ	7
1.1.1. Γλυκοκορτικοειδή και Οιστρογόνα.....	7
1.1.2. Υποδοχείς Γλυκοκορτικοειδών και Οιστρογόνων	8
1.1.3. Γενωμικές και Μη-Γενωμικές Δράσεις Οιστρογόνων και Γλυκοκορτικοειδών ...	9
1.2. ΑΠΟΠΤΩΣΗ	11
1.2.1. Γενικές Πληροφορίες	11
1.2.2. Εξωγενές Μονοπάτι	13

1.2.3. Ενδογενές Μονοπάτι	16
1.2.4. Γλυκοκορτικοειδή – Οιστρογόνα και Απόπτωση	19
1.3. ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ	21
1.3.1. Γενικές Πληροφορίες	21
1.3.2. Σύσταση της Μαστίχας Χίου	22
1.3.3. Αντιφλεγμονώδεις Δράσεις.....	23
1.3.4. Αντικαρκινικές Δράσεις.....	24
1.3.5. Αντιμικροβιακές Δράσεις.....	24
1.3.6. Αντιποπρωτικές Δράσεις.....	25
1.4. ΣΚΟΠΟΣ	25
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
2.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	26
2.2. ΧΗΜΙΚΑ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΥΛΙΚΑ, ΚΥΤΤΑΡΑ	26
2.2.1. Χημικά.....	26
2.2.2. Θρεπτικά Μέσα Κυτταροκαλλιιεργειών	27
2.2.3. Κλάσματα Μαστίχας Χίου	28
2.2.4. Διαλύματα	28
2.2.5. Αντισώματα.....	28
2.2.6. Αναλώσιμα Υλικά	29
2.2.7. Κυτταρικές Σειρές.....	29
2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	30
2.3.1. Τεχνικές Κυτταροκαλλιιεργειών	30
2.3.2. Βιοχημικές Τεχνικές.....	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
3.1. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ SH-SY5Y ΕΠΩΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ	37
3.2. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ Bcl-2, ΠΡΟΚΑΣΠΑΣΗ-9 ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΣΠΑΣΗ-3 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ SH-SY5Y ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	38
3.3. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ Bcl-2, ΠΡΟΚΑΣΠΑΣΗ-9 ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΣΠΑΣΗ-3 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ SH-SY5Y ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	42
3.4. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ Bcl-2, ΠΡΟΚΑΣΠΑΣΗ-9 ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΣΠΑΣΗ-3 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ SH-SY5Y ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΟΡΜΟΝΗΣ E2.....	45
3.5. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ SH-SY5Y ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	48
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	53
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

Περίληψη

Οι στεροειδείς ορμόνες είναι μια σημαντική ομάδα ορμονών και διαχωρίζονται στα φυλετικά στεροειδή και στα γλυκοκορτικοειδή. Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs), ειδικότερα, παράγονται στο φλοιό των επινεφριδίων και δρουν μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), ρυθμίζοντας ποικιλία κυτταρικών αποκρίσεων, όπως η μεταγραφή, ελέγχοντας την έκφραση γονιδίων στόχων του υποδοχέα GR μετά την μετατόπισή του στον πυρήνα και η απόπτωση. Η απόπτωση είναι μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, που επιτελείται για τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού και ρυθμίζεται με μεγάλη ακρίβεια. Πραγματοποιείται από πρωτεάσες κυστεΐνης-ασπαρτικού, γνωστές ως κασπάσες – εκκινήτες και – τελεστές/εκτελεστές, μέσω εξωγενών και ενδογενών οδών. Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν είτε να επάγουν διφασικά την απόπτωση ή βιωσιμότητα, με μεταβολή των επιπέδων προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών μέσω των μιτοχονδρίων και άλλων μορίων της απόπτωσης, είτε να ενισχύουν την προστασία από αυτή, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Από την άλλη, τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή αποτελούν ευρέως διαδεδομένα φάρμακα για την αντιμετώπιση πολλών παθολογικών καταστάσεων, λόγω κυρίως των αντιφλεγμονωδών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών. Πλέον ολοένα και αυξάνονται τα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι φυσικής προέλευσης μόρια ή και εκχυλίσματα, όπως τα τριτερπένια που περιέχονται στην ρητίνη από το ενδημικό φυτό *Pistacia lentiscus* L. var *Chia*, παρουσιάζουν πέρα από τις δομικές ομοιότητες και λειτουργικές ομοιότητες με τα γλυκοκορτικοειδή, αναδεικνύοντας τις σημαντικές θεραπευτικές και εν δυνάμει φαρμακευτικές ιδιότητές τους ως υποκατάστατα των στεροειδών ορμονών.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη και διερεύνηση του τρόπου δράσης τριών διαφορετικών κλασμάτων της ρητίνης της Μαστίχας Χίου, στους αποπτωτικούς μηχανισμούς κυττάρων νευροβλαστώματος SH-SY5Y, παρουσία ή απουσία παραγόντων οξειδωτικού στρες. Παράλληλα, δόθηκε έμφαση και στη διερεύνηση του πιθανού υποστηρικτικού ρόλου της ορμόνης οιστραδιόλη E2, γνωστή για την νευροπροστατευτική της δράση στη διαδικασία αυτή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κλάσματα ήταν ικανά να περιορίσουν τη δράση οξειδωτικών παραγόντων, όπως το H₂O₂, και να προστατεύσουν τα κύτταρα νευροβλαστώματος από την απόπτωση, με την ορμόνη E2 να ενισχύει αυτή την θετική επίδραση. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για τον σχεδιασμό μορίων ως υποκατάστατα στεροειδών ορμονών, και να συμβάλλουν στην πιθανή αξιοποίηση και χρήση της Μαστίχα Χίου και συστατικών αυτής, για την Παρασκευή φαρμακευτικών σκευασμάτων, για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων με πιθανή αποφυγή των παρενεργειών από τη μακροχρόνια χρήση των στεροειδών.

Abstract

Steroid hormones, including glucocorticoids and estrogens are important hormones, acting through their cognate receptors. Glucocorticoids (GCs), in particular, are produced in the adrenal cortex and act through the glucocorticoid receptor (GR), modulating a variety of cellular responses, such as apoptosis and transcription, regulating the expression of its target genes, and acting as nuclear transcription factor. Apoptosis is a form of programmed cell death, which is carried out to maintain the homeostasis of the organism, being very precisely regulated. It is carried out by cysteine-aspartate proteases, known as initiator and effector caspases, through extrinsic and intrinsic pathways. Glucocorticoids can promote or inhibit apoptosis, by altering the levels of pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins affecting mitochondria functions in a tissue specific manner. On the other hand, synthetic glucocorticoids are widespread drugs for treatment of many pathological conditions, including cancer and inflammation. There is an abundance of evidence that plant-derived components and extracts, such as triterpenes that show structural similarities with glucocorticoids, exhibit also functional similarities. Thus extracts from resin from the endemic plant *Pistacia lentiscus L. var. Chia*, rich in triterpenes, may have therapeutical or pharmaceutical applications as glucocorticoids substitutes.

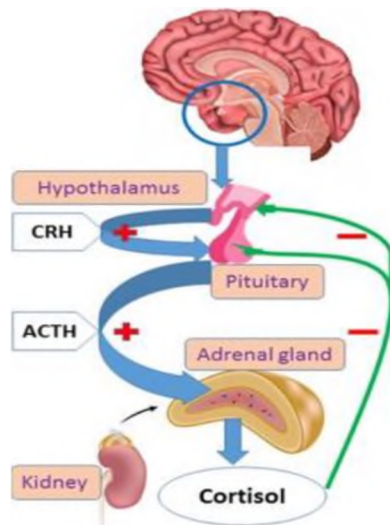
The aim of this thesis was to study and investigate the possible anti-apoptotic actions of three different polarity fractions from the Chios Mastic (resin of *Pistacia lentiscus L. var. Chia*), on SH-SY5Y cells, upon oxidative stress conditions. Moreover, emphasis was given on the investigation of the possible anti-apoptotic role of estradiol E2 in this process. The results showed that the fractions were able to suppress the apoptotic actions of oxidative factors, such as H₂O₂, with the E2 hormone enhancing this positive effect. Results from the study can form the basis for the design and generation of molecules with steroid hormone-like actions with possible less adverse side effects. Furthermore the study highlights the beneficial effects of Chios Mastic and its components, and their potential applications for pharmaceutical or therapeutical purposes.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ

1.1.1. Γλυκοκορτικοειδή και Οιστρογόνα

Οι στεροειδείς ορμόνες είναι μια σημαντική ομάδα ορμονών προερχόμενες από τη χοληστερόλη, όπου προκύπτουν από μια πολύπλοκη σειρά αντιδράσεων, γνωστή ως στεροειδογένεση, και χωρίζονται στις φυλετικές ορμόνες και στα γλυκοκορτικοειδή. Σημαντικές φυλετικές ορμόνες αποτελούν τα οιστρογόνα (οιστριόλη, οιστραδιόλη, οιστρόνη), τα οποία παράγονται κυρίως από τις ωθήκες και τον πλακούντα στις γυναίκες, καθορίζοντας τα δευτερογενή χαρακτηριστικά των θηλυκών ατόμων (Chen et al, 2022). Τα γλυκοκορτικοειδή (κορτιζόλη, κορτικοστερόνη, κορτιζόνη), από την άλλη, είναι οι κύριες ορμόνες του στρες, που συντίθενται και απελευθερώνονται από το φλοιό των επινεφριδίων στην κυκλοφορία του αίματος με κινκάρδιο τρόπο μέσω του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων. Συγκεκριμένα οι ορμόνες κορτικοτροφίνη (CRH) και αγγειοπρεσίνη (AVP) απελευθερώνονται από τον υποθάλαμο και δρουν στην πρόσθια υπόφυση στον εγκέφαλο. Ύστερα ενεργοποιούν τα κορτικοτροφικά κύτταρα για έκκριση της αδρενοκορτικοτροπίνου ορμόνης (ACTH) στη γενική κυκλοφορία, η οποία εν τέλει επιδρά στο φλοιό των επινεφριδίων για να διεγείρει τη σύνθεση και την απελευθέρωση κορτιζόλης (Ramamoorthy et al, 2016).



Εικόνα 1 : Σχηματική αναπαράσταση του Άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων

Πηγή : Deng, J., Chalhoub, N. E., Sherwin, C. M., Li, C., & Brunner, H. I. (2019). Glucocorticoids pharmacology and their application in the treatment of childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 49 (2), 251–259.

Λόγω της λιπόφιλης φύσης των ορμονών, αυτές δεν μπορούν να συντεθούν πριν τη δράση τους και άρα να αποθηκευτούν, αλλά πρέπει να παραχθούν ταχύτατα τη στιγμή που πρέπει να επιδράσουν, ενώ παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές δράσεις. Αυτές οι 2 κατηγορίες ορμονών επηρεάζουν σχεδόν κάθε όργανο και ιστό του σώματος, επηρεάζοντας τον μεταβολισμό και ρυθμίζοντας διαδικασίες, όπως η ανοσοποιητική λειτουργία, η σκελετική ανάπτυξη, η αναπαραγωγή, η συμπεριφορά/γνωστική λειτουργία, ο πολλαπλασιασμός, η φλεγμονή και η επιβίωση

ή όχι των κυττάρων (Ramamoorthy et al, 2016). Τα γλυκοκορτικοειδή συγκεκριμένα είναι από τα πιο ευρέως συνταγογραφούμενα φάρμακα στον κόσμο, που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία πολλών φλεγμονωδών και αυτοάνοσων ασθενειών, όπως το άσθμα, η αλλεργία, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου και η σκλήρυνση κατά πλάκας, με αρκετές όμως ανεπιθύμητες παρενέργειες. Αυτές οι ανεπιθύμητες ενέργειες μπορούν να περιλαμβάνουν οστεοπόρωση, ατροφία των μυών και του δέρματος, διαβήτη, κοιλιακή παχυσαρκία, γλαύκωμα, καταρράκτη, αγγειακή νέκρωση και λοίμωξη, καθυστέρηση ανάπτυξης και υπέρταση (Oakley et al, 2011).

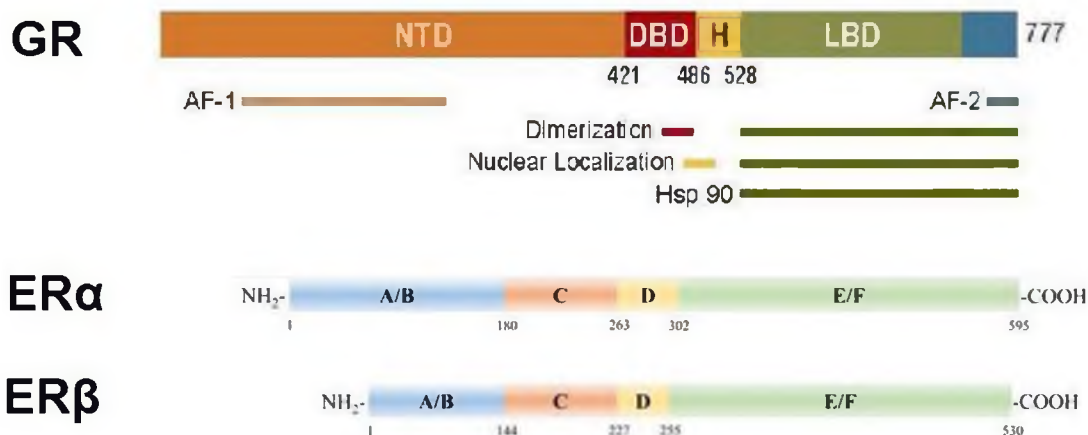
1.1.2. Υποδοχείς Γλυκοκορτικοειδών και Οιστρογόνων

Τόσα τα οιστρογόνα, όσο και τα γλυκοκορτικοειδή εκτελούν τους φυσιολογικούς και φαρμακολογικούς τους ρόλους μέσω της αλληλεπίδρασης με τους ενδοκυτταρικούς υποδοχείς οιστρογόνων (ERs), ή με τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (GRs) αντίστοιχα (Chen et al, 2022). Οι GRs και οι ERs ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (Nuclear Receptors, NRs) και λειτουργούν με τον ίδιο τρόπο, δηλαδή ως μεταγραφικοί παράγοντες. Όσο βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα είναι ανενεργοί, ενώ όταν συνδεθεί κάποιος προσδέτης, οι υποδοχείς διμερίζονται και ενεργοποιούνται, και εν τέλει μετατοπίζονται μέσα στον πυρήνα, όπου έπειτα συνδέονται σαν σύμπλοκο σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, τα στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (HREs) και ελέγχουν την μεταγραφή γονιδίων (Oakley et al, 2011).

Οι ERs είναι ενδοκυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τη γονιδιακή μεταγραφή μέσω στοιχείων απόκρισης οιστρογόνων (EREs). Οι κυριότερες μορφές είναι οι ERα και ERβ, και παρατηρούνται σε ιστούς, όπως ο εγκέφαλος, τα οστά, το ουροποιητικό σύστημα, οι ωοθήκες, η μήτρα και το καρδιαγγειακό σύστημα. Περιέχουν περιοχές A/B, C, D και E/F, οι οποίες αντιστοιχούν στη N-τερματική περιοχή (NTD) μεταγραφικής ενεργοποίησης των γονιδίων-στόχων, στην περιοχή σύνδεσης με το DNA (DBD), στην περιοχή άρθρωσης/σύνδεσης των C και E στο καρβοξυλικό άκρο με την περιοχή σύνδεσης προσδέτη (LBD) (Chen et al, 2022). Στην ανενεργή τους μορφή, βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα σε σύμπλοκο με διάφορες πρωτεΐνες, όπως η πρωτεΐνη-συνοδός hsp90 και η p23. Από την άλλη, με την πρόσδεση του κατάλληλου προσδέτη (όπως η οιστραδιόλη E2) στους ERs ή στον υποδοχέα GPER1 ασκούνται οι βιολογικές δράσεις τους είτε με τον γενωμικό είτε με τον μη-γενωμικό τρόπο.

Όσον αφορά τον υποδοχέα GR, αυτός αποτελεί μια αρθρωτή πρωτεΐνη που περιλαμβάνει τρεις ξεχωριστές λειτουργικές περιοχές. Αυτές είναι, πάλι, μια N-τερματική περιοχή (NTD), μια κεντρική περιοχή δέσμευσης του DNA (DBD) και μια C-τερματική περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (LBD). Η κεντρική DBD περιοχή είναι η πιο διατηρημένη περιοχή και φιλοξενεί δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου, τα οποία δεσμεύουν αλληλουχίες DNA στόχους του GR, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης γλυκοκορτικοειδών ή αλλιώς GREs (Ramamoorthy et al, 2016). Με απουσία ορμόνης, ο μη δεσμευμένος GR βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ως μέρος ενός μεγάλου πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου που περιλαμβάνει διάφορες πρωτεΐνες, όπως για

παράδειγμα πάλι η πρωτεΐνη-συνοδός hsp90. Η πρόσδεση του κατάλληλου προσδέτη στον υποδοχέα GR πυροδοτεί, και σε αυτή την περίπτωση, μια αλλαγή στη διαμόρφωση του GR, που οδηγεί στη διάσπαση του ετεροσυμπλόκου, την έκθεση των σημάτων πυρηνικού εντοπισμού και την μετατόπιση του υποδοχέα GR μέσα στον πυρήνα για ρύθμιση των γονιδίων που ελέγχει (Oakley et al, 2011).

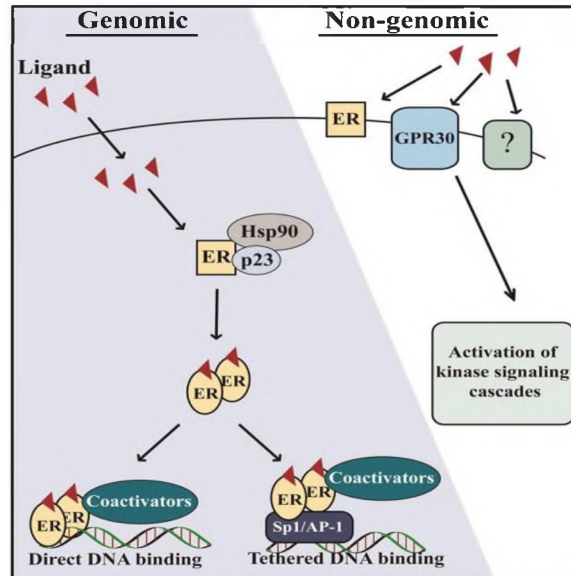


Εικόνα 2 : Οι δομές του υποδοχέα Γλυκοκορτικοειδίων (GR) και των οιστρογόνων (ERα / ERβ)

Πηγές : Ramamoorthy, S., & Cidlowski, J. A. (2016). Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 42(1), 15–vii. Chen,P.Li, B., & Ou-Yang, L.(2022). Role of estrogen receptors in health and disease. *Frontiers in endocrinology*, 13, 839005.

1.1.3. Γενωμικές και Μη-Γενωμικές Δράσεις Οιστρογόνων και Γλυκοκορτικοειδών

Με την μετατόπιση από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, το σύμπλεγμα του προσδέτη και του υποδοχέα ERα ή ERβ συνδέεται με τα εξειδικευμένα στοιχεία απόκρισης οιστρογόνων (EREs) στο DNA, με παράλληλη συμμετοχή της πρωτεΐνης Sp-1 και της πρωτεΐνης-ενεργοποιητή Ap-1 στους υποκινητές των γονιδίων που ανταποκρίνονται στους προσδέτες. Έτσι ρυθμίζεται η μεταγραφική δραστηριότητα των γονιδίων στόχων, που σχετίζονται με τους ιστούς στους οποίους δρουν οι υποδοχείς αυτοί, μια διαδικασία που γίνεται σε διάστημα ωρών. Τα προϊόντα της έκφρασης αυτών των γονιδίων γίνεται να συμμετέχουν σε φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η απόπτωση, η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση. Παράλληλα, πέρα από την περίπτωση γενωμικής δράσης και μετατόπισης του συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα στον πυρήνα, η εναλλακτική μη-γενωμική οδός περιλαμβάνει την σύνδεση του προσδέτη σε υποδοχείς οιστρογόνων ERα, ERβ και GPER1, που σε αυτή την περίπτωση είναι καθηλωμένοι στην μεμβράνη του κυττάρου. Έτσι ταχύτατα ρυθμίζεται η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του ασβεστίου Ca^{2+} , ενεργοποιούνται οι σηματοδοτικές οδοί, όπως η MAPK και η PI3K, με την παραγωγή δεύτερων συντελεστών και έκφραση γονιδίων, που ενεργοποιούν πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες για έκφραση των γονιδίων (Chen et al,2022).



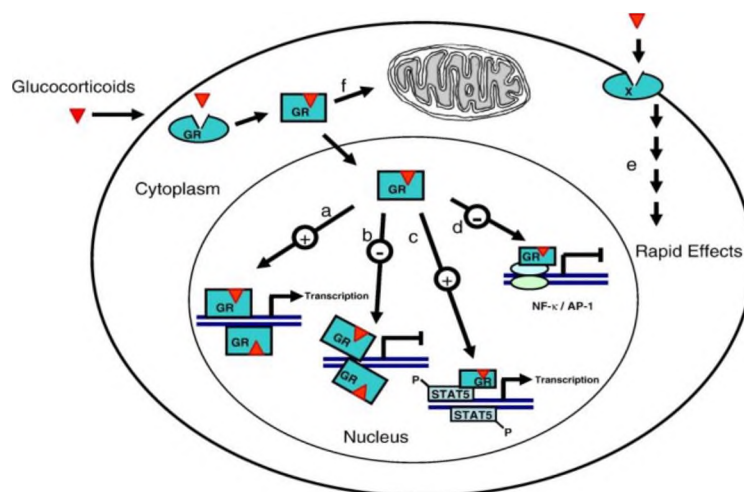
Εικόνα 3: Οι γενωμικές και μη-γενωμικές δράσεις των ER

Πηγή : Shanle, E. K., & Xu, W. (2011). Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. *Chemical research in toxicology*, 24(1), 6–19. <https://doi.org/10.1021/tx100231n>

Αντίστοιχα, το σύμπλοκο του προσδέτη και του GR μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, με τον GR να μπορεί να συνδεθεί απευθείας με τα GREs, τα οποία προκαλούν αλλαγές στη δομή του. Στην συνέχεια στρατολογούνται συμπλέγματα συν-ρυθμιστών, δημιουργείται ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που επηρεάζουν τη δραστηριότητα της RNA πολυμεράσης II και αναδιαμορφώνεται η χρωματίνη, γεγονότα που μαζί ενεργοποιούν τη μεταγραφή ή/και την καταστολή γονιδίων-στόχων (Ramamoorthy et al, 2016). Πέρα από τα GREs, όμως, υπάρχουν και τα nGREs (Negative GREs), στα οποία πάλι συνδέεται ο GR με τον προσδέτη του και ρυθμίζουν αρνητικά αυτή την φορά την έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν τα nGREs. Επιπλέον, ο GR μπορεί και αλληλεπιδρά έμμεσα και με τα μέλη της οικογένειας STAT, είτε σε συνδυασμό με τη δέσμευση σε GREs είτε χωριστά, για να ενισχύσει τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων-στόχων, ενώ ταυτόχρονα ο GR παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές δράσεις μέσω της αλληλεπίδρασής του με την Ap-1 και τον παράγοντα NF-κB και την καταστολή αυτών. Ακόμα έχει φανεί πως και στα μιτοχόνδρια υπάρχουν περιοχές παρόμοιες των GREs, οπότε και όταν ο GR μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια, ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που αφορούν την οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) (Kokkinoroulou et al, 2021).

Η εναλλακτική, μη-γενωμική οδός του GR, δεν απαιτεί ύπαρξη πρωτεϊνοσύνθεσης και οι επιδράσεις εμφανίζονται μέσα σε δευτερόλεπτα έως λεπτά από την ενεργοποίησή του. Όπως και στην περίπτωση των ERs, ο GR είναι καθηλωμένος στην κυτταρική μεμβράνη και χρησιμοποιείται η δραστηριότητα διαφόρων κινασών, όπως η PI3K, η AKT και οι ενεργοποιημένες από μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs), ενώ ελευθερώνονται και βοηθητικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στους δευτερογενείς καταρράκτες σηματοδότησης. Ακόμα γίνεται τα γλυκοκορτικοειδή να συνδεθούν και σε υποδοχείς που συνδέουν G πρωτεΐνες (GPCRs)

και να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι μεταγωγής σήματος του κυκλικού AMP (cAMP), προσφέροντας μεγαλύτερη πολυπλοκότητα στις σηματοδοτικές οδούς (Ramamoorthy et al, 2016).



Εικόνα 4: Οι γενωμικές και μη-γενωμικές δράσεις του GR

Πηγή : Psarra, A. M., & Sekeris, C. E. (2008). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochimica et biophysica acta*, 1783(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.10.021>

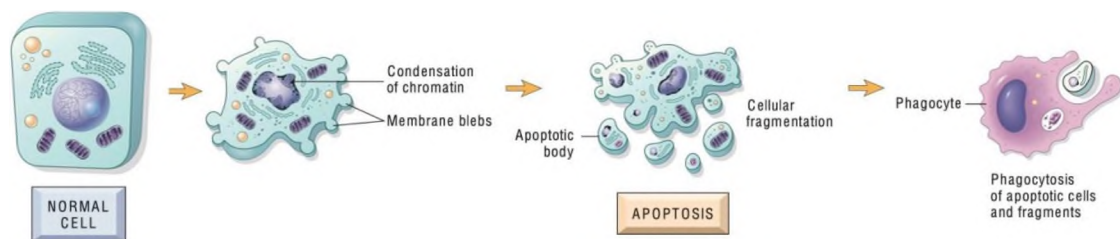
1.2. ΑΠΟΠΤΩΣΗ

1.2.1. Γενικές Πληροφορίες

Η Απόπτωση (Αποptosis) είναι μια διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (PCD: Programmed Cell Death), και μια από τις καλύτερα μελετημένες, μαζί με την Αυτοφαγία (Autophagy), τη Νέκρωση (Necrosis) και την Πυρόπτωση (Pyroptosis) (Bertheloot et al, 2021). Σε φυσιολογικές συνθήκες, λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και της ανάπτυξης, λόγω της ανάγκης σχηματισμού των ιστών, αλλά και κατά τη γήρανση ως ένας φυσιολογικός μηχανισμός ομοιοστατικής ρύθμισης, έτσι ώστε να ελέγχεται ο πληθυσμός των κυττάρων στους ιστούς στις διαδικασίες της συνεχούς κυτταρικής ανανέωσης και αναγέννησης των ιστών. Ακόμα γίνεται να συμβεί απόπτωση και σε περιπτώσεις αντιδράσεων του ανοσοποιητικού συστήματος ως ένας μηχανισμός προστασίας και καταπολέμησης των λοιμώξεων ή όταν τα κύτταρα καταστρέφονται ανεπανόρθωτα λόγω ασθένειας ή βλαβερών παραγόντων και πρέπει να απομακρυνθούν (Elmore, 2007).

Έτσι, από τα παραπάνω διαφαίνεται ότι η οποιαδήποτε αποτυχία ρύθμισης της απόπτωσης είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων των αυτοάνοσων διαταραχών, του Συνδρόμου Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (AIDS) και των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η Νόσος Alzheimer, όπου ο θάνατος των νευρικών κυττάρων φαίνεται να ξεκινά από την ενεργοποίηση των κασπασών, τη βασική ομάδα ενζύμων που εμπλέκονται στην απόπτωση (Fleischer et al, 2006)(D'Arcy, 2019). Πολύ μικρός ρυθμός απόπτωσης, από την άλλη, μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και διαίρεση των κυττάρων που παρατηρείται στον καρκίνο (D'Arcy, 2019).

Η απόπτωση προτιμάται σαν είδος κυτταρικού θανάτου με την έκθεση σε μια ποικιλία ερεθισμάτων, που όμως απαντώνται σε μικρές δόσεις, όπως ακτινοβολία, υποξία, θερμοκρασία ή κυτταροτοξικοί παράγοντες. Σαν βιολογική διεργασία, είναι ενεργοβόρα και περιλαμβάνει τη γενετικώς καθορισμένη καταστροφή κυττάρων, καθώς εκκινείται όταν ενεργοποιηθεί μια ομάδα πρωτεασών κυστεΐνης-ασπαρτικού/τελεστές της απόπτωσης, που λέγονται κασπάσες (caspases), και ακολουθεί μια πολύπλοκη ακολουθία γεγονότων που συνδέει το πρωταρχικό ερέθισμα για απόπτωση με τον τελικό θάνατο του κυττάρου (Elmore, 2007). Ειδικότερα, οι κασπάσες ενεργοποιούν κυτταροπλασματικές ενδονουκλεάσες και πρωτεάσες, που με τη σειρά τους θα αποικοδομήσουν τους πυρήνες και τις πυρηνικές/κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες.



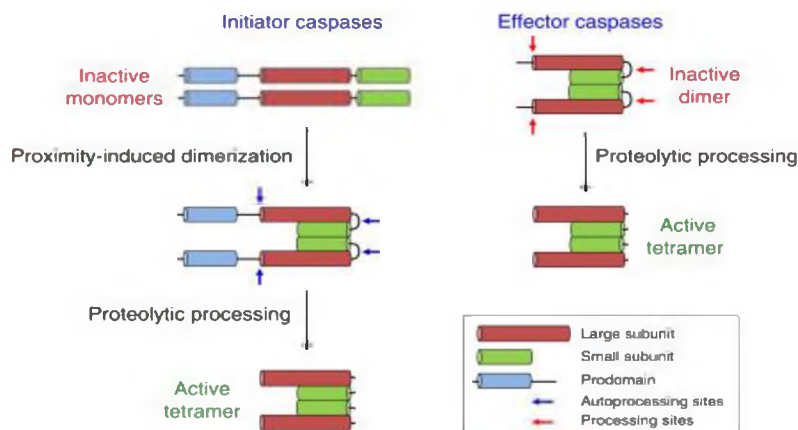
Εικόνα 5 : Μορφολογία κυττάρων προς απόπτωση

Πηγή : Astier, A.L.P. (2021) *Necrosis and apoptosis - what are the differences and their significances?*. *Andréas Astier*. Available at: <https://www.andreasastier.com/blog/necrosis-and-apoptosis-what-are-the-differences-and-their-significances> (Accessed: 23 September 2023).

Τα κύτταρα προς απόπτωση παύουν να αναπτύσσονται και να διαιρούνται, απεναντίας υφίστανται συρρίκνωση, μικραίνουν σε μέγεθος και φαίνονται στο μικροσκόπιο ως στρόγγυλα ή οβάλ, το κυτταρόπλασμα γίνεται πυκνότερο και τα οργανίδια οργανώνονται πολύ στενά μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, τα μιτοχόνδρια χάνουν την ακεραιότητα της μεμβράνης τους, ενώ εμπλέκονται σε τουλάχιστον τρεις γενικούς μηχανισμούς δραστηριότητας που σχετίζονται με την απόπτωση: (1) μεταβολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, μεταφοράς ηλεκτρονίων και παραγωγής ATP, (2) διακοπή του δυναμικού οξειδοαναγωγής και (3) απελευθέρωση μορίων που εκκινούν τη δραστηριοποίηση κασπασών (Fleischer et al, 2006). Παράλληλα ο πυρήνας και το DNA κατακερματίζονται, αφότου γίνει η έκφραση προσδετών ειδικών για φαγοκυτταρικά κύτταρα. Το κυριότερο χαρακτηριστικό, όμως, της απόπτωσης, είναι η πυκνωση εξαιτίας της συμπύκνωσης της χρωματίνης. Έπειτα ακολουθεί ο σχηματισμός του αποπτωτικού σώματος (D'Arcy, 2019).

Τα αποπτωτικά σωματίδια που σχηματίζονται προσλαμβάνονται, φαγοκυτταρώνονται και εξαλείφονται από συγκεκριμένη τάξη μακροφάγων (Tingible Body Macrophages) και γειτονικά τους κύτταρα, όπως παρενχυματικά κύτταρα ή νεοπλασματικά κύτταρα, έτσι ώστε να διαλυθούν εν τέλει στα φαγολυσοσώματα. Αυτή είναι η τελευταία συνιστώσα της απόπτωσης και κύριο χαρακτηριστικό της είναι η ασυμμετρία στα φωσφολιπίδια της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων, αλλά και η μετατόπιση πλέον της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική πλευρά των αποπτωτικών κυττάρων και των θραυσμάτων τους. Η φαγοκυτταρική τους αναγνώριση δεν δημιουργεί κάποια ανοσολογική αντίδραση ή φλεγμονή, καθώς: (1) Τα αποπτωτικά κύτταρα δεν απελευθερώνουν το κυτταροπλασματικό περιεχόμενό τους στον ιστό που

τα περιβάλλει, (2) Φαγοκυτταρώνονται σχετικά γρήγορα από τα κοντινά κύτταρα, (3) Η απόπτωση γίνεται στα «κρυφά» και συνήθως εμφανίζεται σε ένα μικρό αριθμό κυττάρων ανά φορά και (4) Τα κύτταρα αυτά δεν παράγουν καμία κατηγορία κυτοκινών φλεγμονής (Li et al, 2021), (Elmore, 2007).



Εικόνα 6 : Ενεργοποίηση των Κασπασών

Πηγή : J. Puccini, S. Kumar, 2016. Caspases. Encyclopedia of Cell Biology. Academic Press. Editors: Ralph A. Bradshaw, Philip D. Stahl. p. 364-373. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.30049-9>

Οι κασπάσες αποτελούν τις κύριες πρωτεΐνες - ένζυμα που συμμετέχουν στην απόπτωση και αρχικά εκφράζονται σε μια δομή απενεργοποιημένου προ-ενζύμου, ονόματι προ-κασπάση. Κατηγοριοποιούνται σε κασπάσες – εκκινήτες (κασπάσες-2,-8,-9,-10), κασπάσες – τελεστές/εκτελεστές (κασπάσες-3,-6,-7) και κασπάσες σχετιζόμενες με φλεγμονή (κασπάσες,-1,-4,-5) (D'Arcy, 2019). Μόλις ανιχνευτεί η οποιαδήποτε κυτταρική βλάβη, οι κασπάσες - εκκινήτες (κασπάσες-8,-9) ενεργοποιούνται από ανενεργές προκασπάσες και ενεργοποιούν με τη σειρά τους τις κασπάσες – τελεστές (κασπάσες-3,-6,-7), με την ενεργοποίηση των τελευταίων να κάνει τη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου μη αναστρέψιμη.

Έπειτα ενεργοποιούνται και άλλες προκασπάσες, ξεκινώντας έτσι τον καταρράκτη των κασπασών και των πρωτεασών. Ο πρωτεολυτικός αυτός καταρράκτης ενεργοποίησης των κασπασών είναι το βήμα που ενισχύει το αποπτωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι, οδηγώντας τελικά στον κυτταρικό θάνατο (Elmore, 2007).

Δύο είναι τα κύρια αποπτωτικά μονοπάτια που μπορεί να ακολουθήσει ένα κύτταρο: Το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι ή αλλιώς η οδός του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF-α και το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι ή αλλιώς η μιτοχονδριακή οδός. Και τα δυο μονοπάτια της απόπτωσης λειτουργούν συνεργικά για να διασφαλιστεί ότι οι πολυκύτταροι οργανισμοί παραμένουν υγιείς και τα ελαττωματικά κύτταρα αφαιρούνται από το σώμα, ενώ παράλληλα έχει φανεί πως και οι στεροειδείς ορμόνες (γλυκοκορτικοειδή και οιστρογόνα συγκεκριμένα), μπορούν να παρουσιάσουν αντι-αποπτωτικούς ή προ-αποπτωτικούς ρόλους.

1.2.2. Εξωγενές Μονοπάτι

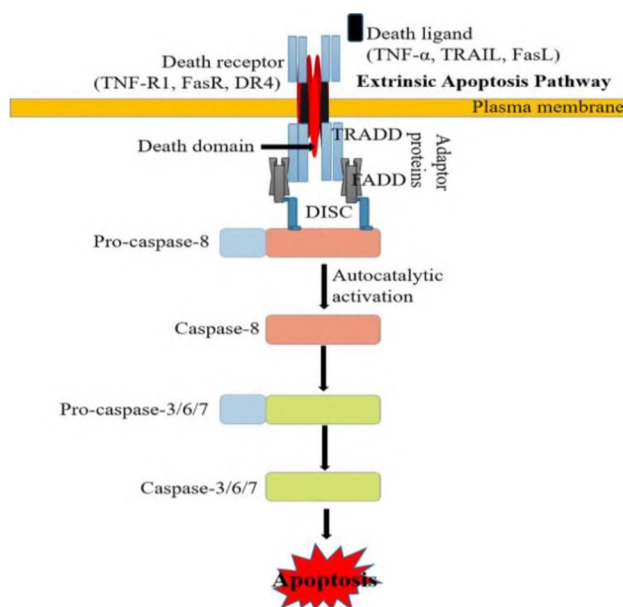
Η απόπτωση μπορεί να προκύψει από την αλληλεπίδραση μεταξύ ενός κυττάρου του ανοσοποιητικού συστήματος και ενός κατεστραμμένου κυττάρου, η οποία είναι

γνωστή ως η εξωκυτταρική οδός της απόπτωσης. Η εξωτερική οδός σηματοδότησης που εκκινεί την απόπτωση διακρίνεται από αλληλεπιδράσεις που προκαλούνται από διαμεμβρανικούς υποδοχείς, που χαρακτηρίζονται ως προ-αποπτωτικοί (Bertheloot et al, 2021). Αυτές περιλαμβάνουν τους υποδοχείς θανάτου, που είναι μέλη της υπερικογένειας των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF). Τα μέλη αυτής της οικογένειας έχουν ως κοινό γνώρισμα τον πλούσιο σε κυστείνες εξωκυτταρικό τομέα, με την κυτταροπλασματική περιοχή να αποκαλείται "τομέας θανάτου", με 80 περίπου αμινοξέα. Η τελευταία αυτή περιοχή είναι απολύτως απαραίτητη για τη μετάδοση του σήματος θανάτου από το εξωτερικό περιβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου. Μερικά από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα ζεύγη προσδέτη-υποδοχέα που συμμετέχουν στο εξωγενές μονοπάτι, είναι τα FasL/FasR, TNF- α /TNFR1 και Apo3L/DR3 (Elmore, 2007).

Η μετάδοση του σήματος από το εξωτερικό περιβάλλον, ώστε να ολοκληρωθεί το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι, ξεκινά με την ομαδοποίηση, ενεργοποίηση και ολιγομερισμό των υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη και τη δέσμευση τους με τον αντίστοιχο ομόλογο τριμερή προσδέτη. Κατά τη δέσμευση του προσδέτη, στρατολογούνται πρωτεΐνες κυτταροπλασματικής προσαρμογής που φέρουν τους αντίστοιχους τομείς θανάτου που συνδέονται με τους υποδοχείς. Η δέσμευση, παραδείγματος χάρι, του προσδέτη FasL στον υποδοχέα του FasR, έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεση της κατάλληλης πρωτεΐνης προσαρμογής FADD. Από την άλλη, η δέσμευση του προσδέτη TNF- α στον υποδοχέα του TNFR οδηγεί στη δέσμευση της πρωτεΐνης προσαρμογής TRADD με την ταυτόχρονη στρατολόγηση των FADD και RIP (Wajant, 2002). Στη συνέχεια, η FADD συνδέεται με την προκασπάση-8 μέσω διμερισμού της περιοχής θανάτου του τελεστή.

Καταλήγουμε έτσι, στο σχηματισμό ενός σηματοδοτικού συμπλόκου θανάτου (DISC), που έχει ως αποτέλεσμα την αυτοκαταλυτική ενεργοποίηση της προκασπάσης-8, που τη μετατρέπει στην κανονική ενεργή κασπάση-8/εκκινητή της απόπτωσης (Bertheloot et al, 2021). Η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 οδηγεί και στην ενεργοποίηση μιας από τις βασικότερες κασπάσες-τελεστές, της κασπάσης-3. Είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση και του υπολοίπου καταρράκτη κασπασών, που τελικά θα οδηγήσουν στην απόπτωση (Zhou et al, 2018). Η κασπάση-3 υπάρχει αρχικά ως προκασπάση-3 (PC-3), η οποία είναι η ανενεργή μορφή και αποτελείται από έναν προτομέα, μια μεγάλη υπομονάδα και μια μικρή υπομονάδα. Αυτό γίνεται καθώς η προκασπάση-3 διασπάται σε ένα υπόλειμμα ασπαρτικού για να παραχθεί μια υπομονάδα p12 και p17 για να σχηματιστεί η διασπασμένη ενεργή κασπάση-3 (Silva et al, 2022). Η μετατροπή του PC-3 συχνά θεωρείται ως «σημείο μη επιστροφής» για ένα κύτταρο, ενώ σε περιπτώσεις παρουσιάζει και αυτοκαταλυτικές ιδιότητες, οδηγώντας στην επικείμενη ενεργοποίηση κασπασών. Η χαμηλή έκφραση της έχει συνδεθεί με πιθανή αποτυχία στον αποπτωτικό μηχανισμό, επιτρέποντας το συνεχή πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και ευνοώντας την ανάπτυξη καρκίνου (Boudreau et al, 2019).

Η κασπάση-8 γίνεται να ρυθμιστεί από μια άλλη πρωτεΐνη, που μοιάζει με κασπάση και είναι παρούσα μέσα στο σύμπλοκο DISC, την FLIP (Bertheloot et al, 2021). Όλα τα παραπάνω οδηγούν στην ενεργοποίηση της εκτελεστικής φάσης της απόπτωσης, καθώς η κασπάση-8/εκκινήτης ενεργοποιεί με τη σειρά της την ομάδα των κασπασών-εκτελεστών, είτε απευθείας μέσω της πρωτεολυτικής διάσπασής τους, είτε έμμεσα ενεργοποιώντας το μέλος της πρωτεϊνικής οικογένειας BCL-2, BID, δημιουργώντας μια ανατροφοδότηση στην ενδογενή αποπτωτική οδό. Ως συνέπεια η μιτοχονδριακή μεμβράνη γίνεται διαπερατή (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization), κατακερματίζονται DNA και πυρήνας και συρρικνώνεται το κύτταρο (Elmore, 2007). Η απόπτωση προκαλούμενη από τους υποδοχείς θανάτου μπορεί και να ανασταλεί από την c-FLIP, η οποία διαθέτει προ-αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές ιδιότητες, ανάλογα με το ερέθισμα, και δεσμεύεται με το FADD και την κασπάση-8, καθιστώντας τα αναποτελεσματικά, εφόσον τα αδρανοποιεί (Scaffidi et al, 1999).

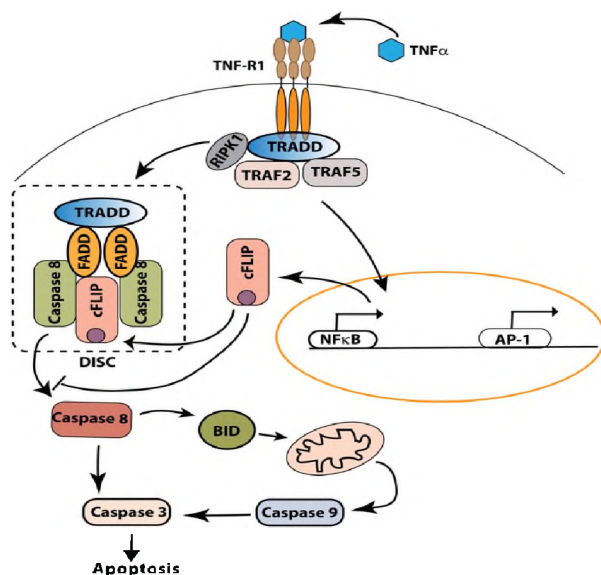


Εικόνα 7 : Η Εξωγενής Οδός της Απόπτωσης.

Πηγή : Kashyap D., Garg V. K., Goel N. (2021). Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 125, 73–120. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.003>

Μια εναλλακτική ρύθμιση της απόπτωσης περιλαμβάνει μια πρωτεΐνη που ονομάζεται Tosso, η οποία έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να εμποδίζει την επαγόμενη από το Fas απόπτωση των T κυττάρων μέσω της αναστολής της μετατροπής της κασπάσης-8 (Elmore, 2007). Παράλληλα η ενεργοποίηση της εξωγενούς αποπτωτικής οδού φαίνεται να ρυθμίζεται και από την πρωτεΐνη RIPK1. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη στρατολογεί το DISC, αλληλεπιδρώντας με τα FADD και TRADD μέσω της δέσμευσης της με τους τομείς θανάτου των πρωτεϊνών αυτών. Έτσι, με τη στρατολόγηση του TRADD, της προκασπάσης-8, της ουβικιτινοποιημένης RIPK1 και της ρυθμιστικής πρωτεΐνης FLIP στο DISC περιορίζεται η προ-αποπτωτική λειτουργία της κασπάσης-8 και προάγεται το προφλεγμονώδες μονοπάτι σηματοδότησης εξαρτώμενο από τον NFκB. Το σύμπλοκο αυτό αποκόπτεται έπειτα από τον υποδοχέα ώστε να σχηματιστεί

ένα δεύτερο σύμπλοκο με προαποπτωτικές δράσεις. Μέσα σε αυτό, η προκασπάση-8 και η προκασπάση-10 ενεργοποιούνται, όπως και πριν, μέσω της αυτοκαταλυτικής διάσπασης (Bertheloot et al, 2021).



Εικόνα 8 : Ρύθμιση του Εξωγενούς Μονοπατιού Απόπτωσης

Πηγή : Huangfu J., Hao C., Wei Z., Wormstone I. M., Yan H., & Fan X. (2021). Cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) critically maintains apoptotic resistance in human lens epithelial cells. *Cell death & disease*, 12(4), 386. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03683-y>

1.2.3. Ενδογενές Μονοπάτι

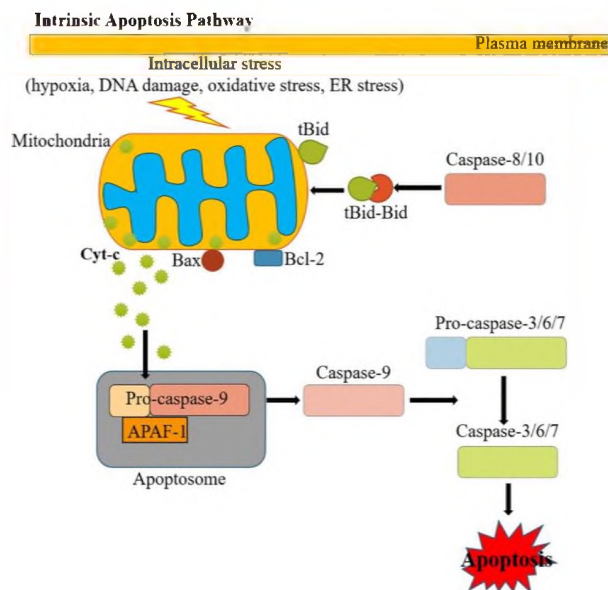
Η διαδικασία της απόπτωσης μπορεί να ξεκινήσει και από το ίδιο το κύτταρο όταν ανιχνεύει βλάβη μέσω ενός αριθμού ενδοκυτταρικών αισθητήρων, ένας μηχανισμός γνωστός ως ενδογενές μονοπάτι. Το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι σηματοδότησης περιλαμβάνει μια ποικιλία ερεθισμάτων που δεν προκαλούνται από υποδοχείς αυτή τη φορά αλλά δρουν απευθείας σε στόχους εντός του κυττάρου και είναι γεγονότα που ξεκινούν από τα μιτοχόνδρια. Τα ερεθίσματα μπορούν να δράσουν είτε θετικά είτε αρνητικά, με τα θετικά να περιλαμβάνουν, ακτινοβολία, τοξίνες, υποξία, υπερθερμία, ιογενείς λοιμώξεις, ελεύθερες ρίζες και τα αρνητικά να σχετίζονται με την απουσία ορισμένων αυξητικών παραγόντων, ορμονών και κυτοκινών, που οδηγούν σε απώλεια της αποπτωτικής καταστολής και επακόλουθη ενεργοποίηση της απόπτωσης. Όλα αυτά τα ερεθίσματα προκαλούν αλλαγές στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη που οδηγεί σε άνοιγμα πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (MPT), απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, και εν τέλει στη διαπερατότητα, πλέον, της μιτοχονδριακής εξωτερικής μεμβράνης (MOMP).

Ένας από τους κύριους πρωταγωνιστές του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης είναι η πρωτεΐνη Bcl-2. Το γονίδιο της συγκεκριμένα αποτελείται από τρία εξόνια, με τα δύο πρώτα εξόνια να κωδικοποιούν τις τέσσερις περιοχές της BH, ενώ το τρίτο εξόνιο κωδικοποιεί τη διαμεμβρανική περιοχή που θα καθηλώσει την πρωτεΐνη στις ενδοκυτταρικές μεμβράνες. Αυτές οι περιοχές BH διευκολύνουν τις αλληλεπιδράσεις των μελών της οικογένειας της Bcl-2 μεταξύ τους και μπορούν να υποδηλώνουν προ-αποπτωτική ή αντι-αποπτωτική λειτουργία. Στα κύτταρα υπάρχουν 2

ισομορφές του Bcl-2 με όμοιες BH περιοχές, τα Bcl-2α και Bcl-2β, με το πρώτο να παρουσιάζει ξεκάθαρες αντι-αποπτωτικές δράσεις, ενώ η δράση της τελευταίας ισομορφής δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως. Ανάλογα με το ερέθισμα που λαμβάνουν τα κύτταρα, αλλάζει η αναλογία μεταξύ προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2. Μερικές από τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w και BAG, ενώ μερικές από τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik και Blk. Μάλιστα αυτή η λεπτή ισορροπία, επηρεάζει την ενεργοποίηση των κασπασών εκκίνησης (κασπάση-8,-9,-10) και κασπασών τελεστών (κασπάση-3,-6,-7), και είναι αυτή που θα «δημιουργήσει» τους πόρους στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, προκαλώντας το MOMP (Elmore, 2007). Παράλληλα ορίζει και το αν τα μέλη της Bcl-2 οικογένειας (π.χ. Bax, Bak και PUMA) θα δράσουν προ-αποπτωτικά ή αντι-αποπτωτικά (Warren et al, 2019). Το Bcl-2α συγκεκριμένα, έχει φανεί πως συνδέεται με το BAX μέσω των περιοχών του BH1 / BH2 / BH3 και αυτή η αλληλεπίδραση είναι κεντρική στο ρόλο του στη ρύθμιση της απόπτωσης, καθώς έχει φανεί πως η περιοχή BH3 παίζει σημαντικό ρόλο στη μιτοχονδριακή αποπτωτική οδό (Edlich et al, 2018). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι όταν φωσφορυλιώνεται σερίνη στην πρωτεΐνη Bad, η τελευταία συνδέεται και παγιδεύεται από την πρωτεΐνη 14-3-3, ένα μέλος μιας οικογένειας πολυλειτουργικών μορίων πρόσδεσης φωσφοσερίνης. Με τη φωσφορυλίωσή της, η Bad απομονώνεται στο κυττόσολιο, αλλά μόλις αποφωσφορυλιωθεί, θα μετατοπιστεί στα μιτοχόνδρια για να απελευθερώσει το κυτόχρωμα C (Zha, et al., 1996). Συνεπώς απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα δύο κύριες ομάδες απομονωμένων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών από το διαμεμβρανικό χώρο, δηλαδή το κυτόχρωμα c, η Smac/DIABLO και η πρωτεάση σερίνης HtrA2/Omi, και ενεργοποιούν την εξαρτώμενη από κασπάση μιτοχονδριακή οδό.

Το κυτόχρωμα c στη συνέχεια συνδέεται με β-έλικες στον παράγοντα ενεργοποίησης πρωτεάσης απόπτωσης 1 (Araf-1), προκαλείται σταδιακή συναρμολόγηση ενός επταμερούς αποπτοσώματος, που περιλαμβάνει πολλαπλά αντίγραφα της προκασπάσης-9 στο δακτύλιο Araf-1 για να σχηματίσουν το ολο-αποπτόσωμα (Yuan et al, 2013), ένα ογκώδες σύμπλοκο που περιλαμβάνει το κυτόχρωμα c, την Araf-1, dATP και την προκασπάση-9 (Bertheloot et al, 2021). Η προκασπάση-9 εκφράζεται ως ένα πλήρους μήκους ανενεργό ζυμογόνο, η οποία διασπάται λόγω σχηματισμού του αποπτοσώματος στην κασπάση-9, μια κασπάση-εκκινήτη, που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση κυττάρων, και ειδικά των SH-SY5Y (Soni et al, 2021). Στη συνέχεια η κασπάση-9 διασπά το ISL των προκασπασών-3 και -7, ενεργοποιώντας έτσι την ώριμη μορφή τους και απελευθερώνοντας την αποπτωτική τους λειτουργία. Η ενεργοποιημένη κασπάση-3 μεσολαβεί στη διάσπαση της αντίστοιχης ISL της προκασπάσης-6 για την ενεργοποίηση της κασπάσης-6, με τις κασπάσες-εκτελεστές εν τέλει να πρωτεολύουν τα αντίστοιχα και κοινά υποστρώματά τους προκαλώντας απόπτωση (Soni et al, 2021). Τα Smac/DIABLO και το HtrA2/Omi προάγουν την απόπτωση αναστέλλοντας τη δραστηριότητα των IAP (αναστολείς των πρωτεϊνών απόπτωσης). Το σημείο όπου ο κυτταρικός θάνατος είναι μονόδρομος, καθορίζεται από την ενεργοποίηση της

κασπάσης-3 εξαιτίας της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c και του MOMP (Bertheloot et al, 2021).



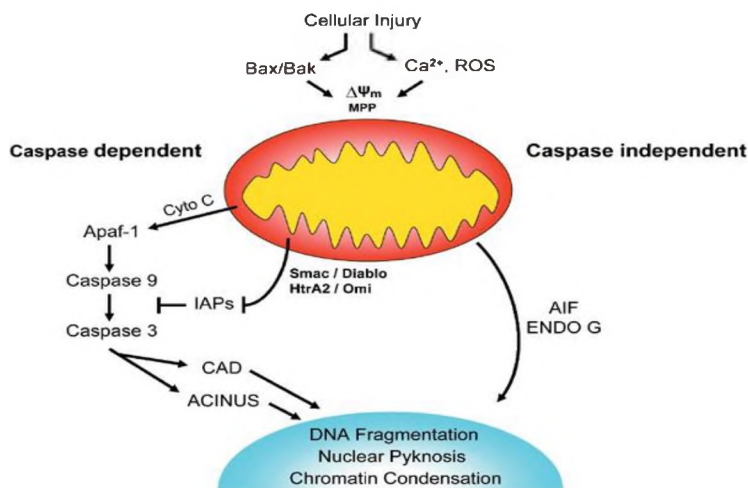
Εικόνα 9 : Η Ενδογενής Οδός της Απόπτωσης

Πηγή : Kashyap, D., Garg, V. K., & Goel, N. (2021). Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 125, 73–120. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.003>

Η δεύτερη ομάδα προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, η AIF, η ενδονουκλεάση G και η CAD, απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, αφού έχει αποφασιστεί ότι το κύτταρο οδηγείται σε θάνατο. Η AIF και η ενδονουκλεάση G λειτουργούν με τρόπο ανεξάρτητο από κασπάσες και μετατοπίζονται στον πυρήνα και κατακερματίζουν το DNA σε κομμάτια περίπου 50-300 kb και συμπυκνώνουν και διασπών τη χρωματίνη αντίστοιχα (Joza et al., 2001), (Li et al., 2001). Το CAD στη συνέχεια απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια και συνδράμει στις δράσεις της AIF και της ενδονουκλεάσης G, με τον έλεγχο και τη ρύθμιση αυτών των αποπτωτικών μιτοχονδριακών συμβάντων να γίνεται μέσω μελών της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 (Elmore, 2007).

Την ίδια στιγμή, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 παίζει καθοριστικής σημασίας ρόλο στη ρύθμιση της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2. Αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να προσδιορίσουν εάν το κύτταρο δεσμεύεται σε απόπτωση ή ματαιώνει τη διαδικασία, με ρύθμιση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια μέσω της τροποποίησης της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Ως το τελευταίο στάδιο της αποπτωτικής διαδικασίας, η κασπάση-3 και η κασπάση-7 ενεργοποιούνται και διασπών και άλλες προκασπάσες (προκασπάσες-2,-6,-8,-10) στις ενεργές τους μορφές, δημιουργώντας έναν καταρράκτη που ενισχύει την απόπτωση. Ειδικά, η κασπάση-8, από το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι, είναι ικανή να διασπά το Bid στο ενδογενές μονοπάτι, κάνοντας έτσι ορατή τη στενή σχέση μεταξύ εξωγενούς και ενδογενούς μονοπατιού. Η αποπτωτική διαδικασία κορυφώνεται με τη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης από την κασπάση-6, τη διάσπαση πολλών ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών (π.χ. PARP και λαμίνη) (Elmore, 2007),(Bertheloot et al, 2021).

Όσον αφορά τη ρύθμιση του ενδογενούς μονοπατιού, οι πρωτεΐνες της οικογένειας IAP (IAP1/2 και XIAP) έχουν φανεί να αναστέλουν την ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Επιπλέον, το XIAP μπορεί και αλληλεπιδρά με τις κασπάσες-9 και -7, διατηρώντας έτσι τον αυστηρό έλεγχο της αποπτωτικής διαδικασίας. Ωστόσο, το Smac, το HTRA2 σε συνεργασία με το κυτόχρωμα c λειτουργούν ως αναστολείς του XIAP, προάγοντας έτσι την απόπτωση. Η ίδια η κασπάση-3 μπορεί να προάγει την περαιτέρω απόπτωση με διάσπαση ενός θραύσματος, ονόματι p10, από την κασπάση-9, χωρίς περιοχή σύνδεσης XIAP και έτσι να αποτρέπεται η αναστολή από το XIAP.



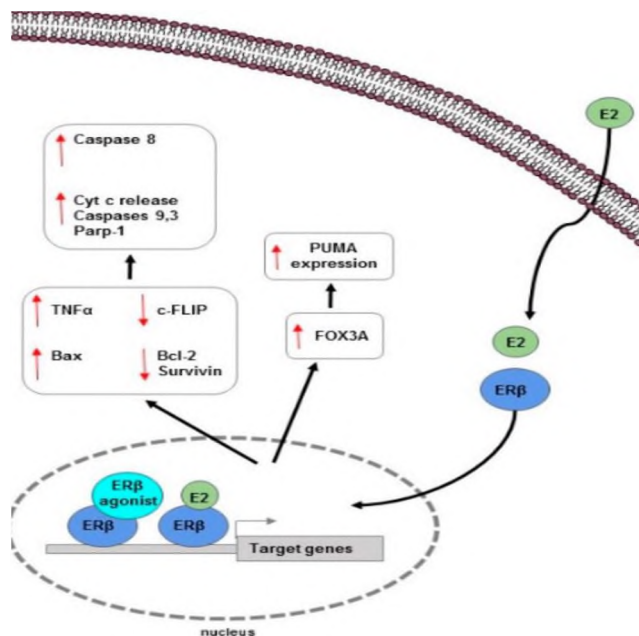
Εικόνα 10 : Συνδρομή των AIF, CAD, IAP στο Ενδογενές Μονοπάτι

Πηγή : Cregan, S. P., Dawson, V. L., & Slack, R. S. (2004). Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene*, 23(16), 2785–2796. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207517>

1.2.4. Γλυκοκορτικοειδή – Οιστρογόνα και Απόπτωση

Η παρουσία των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών στα μιτοχόνδρια έχει συσχετιστεί με την άμεση επίδραση τόσο στη μιτοχονδριακή μεταγραφή όσο και στην απόπτωση (Solakidi et al, 2007). Τα μιτοχόνδρια λαμβάνουν μια σειρά εξωγενών και ενδογενών αποπτωτικών σημάτων ή σημάτων επιβίωσης. Μεταξύ των σημαντικότερων εξωγενών σημάτων είναι οι στεροειδείς ορμόνες, που μπορούν να λειτουργήσουν ως αποπτωτικοί ή ως παράγοντες επιβίωσης, ανάλογα με τη φύση του κυττάρου στόχου. Τα οιστρογόνα, ως σύμπλεγμα με τον υποδοχέα τους ERα (για παράδειγμα E2/ERα) λειτουργούν συνήθως ως αντιαποπτωτικοί παράγοντες για πολλούς τύπους κυττάρων, όπως τα ενδοθήλια και τα εγκεφαλικά κύτταρα. Το σύμπλοκο αυτό έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί γρήγορα πολλαπλές οδούς μεταγωγής σήματος (ERK/MAPK, PI3K/AKT), είτε μέσω του γενωμικού ή του μη-γενωμικού μονοπατιού που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, στη ρύθμιση της δραστηριότητας των μιτοχονδρίων, στην εξάλειψη ελεύθερων ριζών (όπως το H₂O₂) και στην πρόληψη της απόπτωσης (Psarra et al, 2008). Από την άλλη, το σύμπλεγμα με τον ERβ (E2/ERβ), μέσω των γονιδιωματικών δράσεων, μπορεί και οδηγεί σε φωσφορυλίωση της p38/MAPK η οποία, με τη σειρά της, εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3, οδηγώντας σε απόπτωση. Οι υποδοχείς οιστρογόνων σχετίζονται και με τις οδούς σηματοδότησης NF-κB, ειδικά σε κύτταρα όγκου. Ο NF-κB είναι προφλεγμονώδης παράγοντας εμπλεκόμενος σε διεργασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση,

η απόπτωση και η φλεγμονή. Συγκεκριμένα μπορεί και ρυθμίζει τη μεταγραφή του αντι-αποπτωτικού παράγοντα Bcl-2, ο οποίος είτε σχηματίζει ένα ετεροδιμερές με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη BAX, λειτουργώντας ως προ-αποπτωτικός παράγοντας για το κύτταρο, είτε μέσω της οδού NF-κB/Bcl-2 ρυθμίζει και την ογκογένεση (Yang et al, 2019).



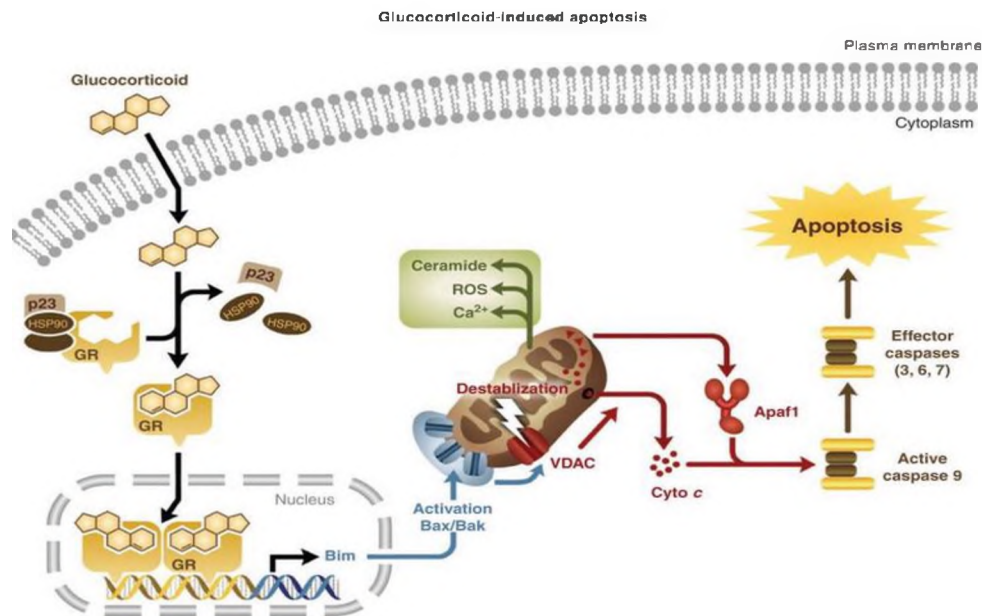
Εικόνα 11 : Ρόλος των Οιστρογόνων στην Απόπτωση

Πηγή : Chimento, A., De Luca, A., Avena, P., De Amicis, F., Casaburi, I., Sirianni, R., & Pezzi, V. (2022). Estrogen Receptors-Mediated Apoptosis in Hormone-Dependent Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1242. <https://doi.org/10.3390/ijms23031242>

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι ικανά να επάγουν την απόπτωση, ειδικά στην περίπτωση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς προκαλούν απόπτωση στα T/B λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα και σε νευρικά κύτταρα. Αυτού του είδους η απόπτωση φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα διαμεσολάβησης των γλυκοκορτικοειδών στη μιτοχονδριακή οδό, που περιλαμβάνει και αλληλεπίδραση ή αλλαγή κατανομής των μελών της οικογένειας Bcl-2 (Tóth et al, 2010). Όταν μετατοπιστεί στα μιτοχόνδρια, η ύπαρξη του GR οδηγεί σε ενεργοποίηση των γονιδίων που εμπλέκονται στην έναρξη της απόπτωσης, όπως το Bim, με το οποίο αλληλεπιδρά ισχυρά (διμερισμός του GR). Ακολουθεί δραστηριοποίηση του Bax (μεσολαβητής απόπτωσης), διατάραξη του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, απελευθέρωση του Araf-1 και του κυτοχρώματος c στο κυτταρόσωμα, κυρίως προτίμηση του ενδογενούς καταρράκτη κασπασών (Smith et al, 2010). Πέρα από αυτό φαίνεται πως μπορούν να επάγουν την απόπτωση και με ενεργοποίηση/φωσφορυλίωση της PI-PLC, εν τέλει συμβάλλοντας στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8 (Tóth et al, 2010).

Σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών GCs και χρόνιου στρες, η εύρυθμη μιτοχονδριακή λειτουργία εξασθενεί, και επάγεται νευροτοξικότητα λόγω μείωσης του συμπλέγματος GR/Bcl2. Απεναντίας σε φυσιολογικές συνθήκες GCs, τα τελευταία ενισχύουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία και τη νευροπροστασία μέσω της αύξησης του

παραπάνω συμπλέγματος. Έτσι καθίσταται σαφές ότι η σηματοδότηση του GR που σχετίζεται με την απόπτωση στο επίπεδο των μιτοχονδρίων ρυθμίζεται με ένα διφασικό τρόπο που εξαρτάται από το στρες, ρυθμίζοντας έτσι τη μιτοχονδριακή λειτουργία και βιωσιμότητα των νευρώνων ή την απόπτωση (Kokkinoroulou et al, 2021).



Εικόνα 12 : Ρόλος των Γλυκοκορτικοειδών στην Απόπτωση

Πηγή : Smith, L. K., & Cidlowski, J. A. (2010). Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Progress in brain research*, 182, 1–30.

1.3. ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ

1.3.1. Γενικές Πληροφορίες

Η Μαστίχα Χίου είναι η ρητίνη που εκκρίνεται και έπειτα λαμβάνεται σε σχήμα δακρύων από τον κορμό και τα μεγάλα κλαδιά του ενδημικού φυτού *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* (Μαστιχόδεντρο/σχίνος). Η έκκριση των δακρύων αυτών πραγματοποιείται με επιφανειακές τομές που προξενούν στα μαστιχόδενδρα οι παραγωγοί με αιχμηρά εργαλεία. Το συγκεκριμένο δέντρο καλλιεργείται αποκλειστικά στο νότιο τμήμα της Χίου, όπου επικρατούν ήπιοι χειμώνες και πολύ ξηρά καλοκαίρια, ανήκει στην οικογένεια Anacardaceae, είναι αειθαλής θάμνος με ύψος 2-3 μέτρα που αναπτύσσεται αργά, ενώ χρειάζεται περίπου 40-50 χρόνια μέχρι να αναπτυχθεί πλήρως, με ελάχιστες απαιτήσεις σε νερό, γι' αυτό και ευδοκιμεί σε άγονα, πετρώδη, φτωχά εδάφη. Αυτό συμβαίνει, καθώς σε εδάφη με μεγάλα ποσοστά υγρασίας δυσχεραίνεται η ανάπτυξη του, επειδή εμποδίζεται ο αερισμός των ριζών του. Στην περίπτωση του μαστιχόδεντρου αυτό αποτρέπεται, μιας και τα δασωμένα βουνά στο βόρειο τμήμα συγκρατούν την υγρασία και εξασθενούν τους βοριάδες, δημιουργώντας νότια ευνοϊκό κλίμα ανάπτυξης¹.

¹ (Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου. (n.d.). Overview of the major scientific publications on the beneficial activity of chios mastiha. <https://kreta24.pl/userdata/public/assets/Blog/Mastiha%20Scientific%20References%202019.pdf>).



Εικόνες 13-14 : Μαστιχέλαιο από τα δέντρα Μαστίχας Χίου (Pistacia lentiscus L. var. Chia)
Πηγές : Γιατί η Μαστίχα Χίου είναι μοναδική~Οφέλη και Χρήσεις. Προϊόντα της Φύσης. (2017, January 22). <https://www.proionta-tis-fisis.com/giati-i-mastiha-hiou-einai-monadiki-ofeli-kai-hriseis/>. Μάθε τα πάντα για τη Μαστίχα Χίου. Mastic Spa Blog. (2019, July 17). <https://blog.masticspa.com/mastiha-chiou/>

Η Μαστίχα Χίου είναι η πρώτη φυσική τσίχλα παγκοσμίως και χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή μεσογειακή μαγειρική και στα ροφήματα λόγω του ξεχωριστού αρώματος και γεύσης της. Ακόμα ικανοποιεί ανάγκες συμπληρώματος διατροφής (περιπτώσεις έλλειψης ιχνοστοιχείων) και περιέχεται σε προϊόντα αρωματοποίησης, οδοντιατρικής και καλλυντικών, ενώ πηγές μαρτυρούν τη χρήση της στην παραδοσιακή ιατρική της αρχαίας Ελλάδας (π.χ. από Διοσκουρίδη και Γαληνό) για τη θεραπεία γαστρεντερικών και φλεγμονωδών διαταραχών. Όλες αυτές οι εφαρμογές της, αλλά και οι όλο περισσότερες *in vitro* και κλινικές μελέτες, της έδωσαν το 2015 την αναγνώριση της ως παραδοσιακό φυτικό φάρμακο για μικρές δυσπεψίες και θεραπείες δερματικών φλεγμονών από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Ιατρικής (EMA) (Kalousi et al, 2023).

1.3.2. Σύσταση της Μαστίχας Χίου

Η απόσταξη της ρητινώδους ουσίας της Μαστίχας Χίου μας δίνει το Μαστιχέλαιο Χίου, ένα αιθέριο έλαιο, με τη σύστασή του να απαρτίζουν μια μεγάλη ποικιλία πολύπλοκων ενώσεων. Σε αυτό κυριαρχούν, με βάση χημικές αναλύσεις, πτητικά τερπένια (μονοτερπένια και σεσκιτερπένια) και ενώσεις, όπως τα κύρια α-πινένιο και β-μυρσένιο, (Georgantopoulos et al, 2023), και άλλες, όπως λιμονένιο, δ-γερμακρένιο, α-καδινόλη, α-καδινένιο, α-χουμουλένιο, α-κουμπεμπένιο και β-κουμπεμπένιο (Kalousi et al, 2022). Τα μονοτερπένια, ειδικά, αποτελούνται από 2 ισοπρενικές μονάδες C₁₀ και μπορούν να είναι είτε γραμμικά είτε κυκλικά, οπότε και είναι επιτρεπτή η ποικιλία στη δομή τους (Spyridopoulou et al, 2017). Από την άλλη, η ακατέργαστη αρχικά Μαστίχα Χίου είναι πλούσια σε τριτερπένια, όπως το ολεανονικό, μασטיκαδιενονικό, μασטיκαδιενολικό, αλλά και από τριτερπενικά οξέα, που λέγονται 24Z-μασטיκαδιενονικό οξύ και 24Z-μασטיκαδιενολικό οξύ (σε ποσοτό 65%-70%). Ταυτόχρονα το υπόλοιπο 25-30% περιλαμβάνει ένα κολλώδες πολυμερές, γνωστό ως β-μυρκενίου, ενώ χημικές αναλύσεις έχουν εντοπίσει και σημαντικές συγκεντρώσεις

φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων (π.χ. γαλλικό οξύ, τυροσόλη, βενζοϊκό οξύ, φαινυλοξικό οξύ, κινναμικό οξύ, ολεανολικό οξύ) (Kalousi et al, 2023). Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 3 κλάσματα μαστίχας, χαρακτηρισμένα ως Α, Β και C, με διαφορετική πολικότητα, ξεκινώντας από το μη-πολικό κλάσμα, το ημι-πολικό και το πολικό κλάσμα (Kalousi et al, 2023). Η κλασμάτωση των φύλλων και της ρητίνης από τα Μαστιχόδεντρα της Χίου και ο χημικός χαρακτηρισμός των κλασμάτων περιγράφονται αναλυτικά στη διδακτορική διατριβή της διδάκτορος Φωτεινής Καλούση, με τίτλο «Χαρακτηρισμός των βιολογικών δράσεων και των βιοχημικών μηχανισμών δράσης κλασμάτων από ρητίνη και φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* και η εμπλοκή τους στη σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών ορμονών», και έγιναν σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα του Dr. Giovanni Appendino, Professor of Chemistry, Università del Piemonte Orientale (UPO), Faculty of Pharmacy, Novara (Italy). Το καθένα από αυτά τα κλάσματα περιλαμβάνει πολλές και διαφορετικές ενώσεις από τα συστατικά της αρχικής μη επεξεργασμένης Μαστίχας Χίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Εξίσου σημαντικά φαίνεται να είναι και τα μη-πολικά συστατικά των κλασμάτων, που περιέχουν τα παράγωγα τριτερπενίων, όπως οι λουπεόλη, λουπενόνη, β-αμυρίνη, λουπανόλη και βιταμίνη τοκοφερόλη (Kalousi et al, 2022). Το τόσο πλούσιο περιεχόμενο της Μαστίχας σε ενώσεις προκαλεί ενδιαφέρον, καθώς φαίνεται να έχει ιδιαίτερη βιολογική αξία, λόγω για παράδειγμα των αντιφλεγμονωδών, αντικαρκινικών, αντιμικροβιακών και αντιαιμοπεπτικών ιδιοτήτων της.

1.3.3. Αντιφλεγμονώδεις Δράσεις

Αρκετοί παθογόνοι μικροοργανισμοί εισβάλλουν στον οργανισμό μας, έχοντας προσπεράσει τους εξωτερικούς φραγμούς της έμφυτης ανοσίας (δέρμα, βλεννογόνο) και οδηγώντας στη μόλυνση και ιστική βλάβη. Ένα τέτοιο γεγονός οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας περίπλοκης σειράς φαινομένων, που συγκροτούν τη φλεγμονή, που διακρίνεται σε οξείας και χρόνιας μορφής, ενώ είναι στενά συνδεδεμένη με κυτοκίνες (IL-4, IL-5, IL-13)(Kalousi et al, 2023), τον παράγοντα νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF-α) και συνεπώς το οξειδωτικό στρες. Ειδικότερα ο TNF-α ενεργοποιεί τις NADPH οξειδάσες, που θα παράξουν H₂O₂, ενεργοποιώντας έναν καταρράκτη φλεγμονωδών μονοπατιών. Αν χορηγηθεί Μαστίχα Χίου, μειώνει τα επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF-α), άρα αποτρέπει την παραγωγή του H₂O₂ (Triantafyllou et al, 2011). Η αναστολή αυτή του TNF-α μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα και του NF-κB, ένα σύμπλεγμα ελέγχου της μεταγραφής του DNA, παραγωγής κυτοκινών και προαγωγής της κυτταρικής επιβίωσης, εξαιτίας ενώσεων όπως η λουπεόλη και τα υπόλοιπα τριτερπένια (Kalousi et al, 2022). Ακόμα η Μαστίχα Χίου έχει την ικανότητα να περιορίσει την παραγωγή μορίων που ευνοούν την εξάπλωση της φλεγμονής, όπως το μονοξειδίο του αζώτου (NO) και η προσταγλανδίνη (PG)E₂. Αυτό το κάνει μέσω καταστολής της έκφρασης πρωτεϊνών, που συνδράμουν στην έκφραση των παραπάνω, όπως η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS), και η κυκλοοξυγενάση (COX)-2 (Zhou et al, 2009). Επιπλέον έχει φανεί πως μπορεί να κατευνάσει τα συμπτώματα αυτοάνοσων, όπως είναι η νόσος Crohn, μέσω της μείωσης της ιντερλευκίνης IL-6 και

της αντιδρώσας πρωτεΐνης C του πλάσματος ασθενών που μελετήθηκαν. Ακόμα αυξάνει τον ανασταλτικό παράγοντα μετανάστευσης των μακροφάγων (MIF), αποδεικνύοντας ότι καταστέλλει την τυχαία μετανάστευση / χημειοτακτισμό των μονοκύτταρων και των μακροφάγων (Kaliora et al, 2007).

1.3.4. Αντικαρκινικές Δράσεις

Τα τελευταία χρόνια, η βιβλιογραφία σχετικά με το αντικαρκινικό δυναμικό των εκχυλισμάτων που προέρχονται από την ρητίνη της Μαστίχας Χίου αυξάνεται συνεχώς. Αυτό συμβαίνει καθώς η εμφάνιση του καρκίνου σε όλο τον κόσμο σημειώνει άνοδο, εξαιτίας του επιβαρυσμένου περιβάλλοντος, της διατροφής και του δυτικοποιημένου τρόπου ζωής. Μεγάλο πλήθος ερευνών έχουν δείξει πως τα μονοτερπένια της Μαστίχας Χίου παρουσιάζουν αντιμεταστατικές και κυτταροκατασταλτικές ιδιότητες σε μοντέλα ποντικών με μελάνωμα και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως η λευχαιμία, το γλοιβλάστωμα και κυρίως η LLC, φάνηκε πως η ρητίνη μπορεί να καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς φάνηκε πως διαφοροποιείται η έκφραση γονιδίων, που αφορούν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση, την επιβίωση κυττάρων, αλλά και τον καταρράκτη NF-κB (Spyridopoulou et al, 2017) (Moulos et al, 2009). Πέρα από αυτήν τη δράση, φάνηκε πως μπορούσε να επάγει τη συνολική έκφραση της μασπίνης, μιας ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης (Paraschos et al, 2012) (He et al, 2007). Στα παραδείγματα του καρκίνου του παχέος εντέρου και της λευχαιμίας, ο μηχανισμός της Μαστίχας είναι ίδιος, καθώς διαφαίνεται πως η δράση της ως αντικαρκινική ουσία έγγειται στην μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών Ki-67 και Survivin (BIRC5a) και στην προ-αποπτωτική μέσω κασπασών δράση της, σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου και λευχαιμίας (K562) με παράλληλη καταστολή παραγωγής του αυξητικού παράγοντα VEGF (vascular endothelial growth factor) αντίστοιχα (Paraschos et al, 2012).

1.3.5. Αντιμικροβιακές Δράσεις

Επιπροσθέτως, η Μαστίχα Χίου παρουσιάζει και εντυπωσιακή θεραπευτική αντιμικροβιακή δράση σε περιστατικά γαστρίτιδας, και γαστρικού ή δωδεκαδακτυλικού έλκους, χωρίς παρενέργειες. Η κύρια αιτιολογία εμφάνισης των παραπάνω παθήσεων είναι το βακτήριο *Helicobacter pylori* (Dimas et al, 2012), το οποίο μετά την χορήγηση της Μαστίχας, με βάση *in vitro* πειράματα και παρατηρήσεις, παρουσιάζει παραμορφώσεις, όπως προεξοχές και κυτταρικό κατακερματισμό, ή αναστέλλεται η δημιουργία φλεγμονής λόγω απενεργοποίησης των ουδετερόφιλων (Choli-Papadopoulou et al, 2011). Έχει δειχθεί, ακόμα, πως είναι αποτελεσματική στην εξουδετέρωση και άλλων ομάδων μικροβίων πέρα από το *H.pylori*, όπως είναι τα *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis*, λόγω της συνεργατικής δράσης των συστατικών της (Dimas et al, 2012), αλλά δρα και ενάντια σε αναερόβια βακτήρια της στοματικής κοιλότητας που προκαλούν περιοδοντίτιδα μέσω εξουδετέρωσης υδροξυλίων και μείωσης της πλάκας, βελτιώνοντας τη στοματική υγιεινή (Sakagami et al, 2009). Θα πρέπει να σημειωθεί, επιπλέον, πως η Μαστίχα μπορεί και αποτρέπει την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη Gram θετικών (+) και Gram αρνητικών (-) που αναπτύσσονται κατά τη μη σωστή συντήρηση των τροφίμων, όπως

είναι τα βακτηριακά στελέχη των *S. aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas fragi* και *Salmonella enteridis* αντίστοιχα (Paraschos et al, 2012).

1.3.6. Αντιποπρωτικές Δράσεις

Η λουπεόλη, η καμφεόλη αλλά και άλλα τριτερπένια που βρίσκονται στα κλάσματα Μαστίχας Χίου που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματα, παρουσιάζουν παρόμοια δομή με τα γλυκοκορτικοειδή GCs, οπότε μπορούν να δρουν με όμοιο τρόπο με αυτά. Συγκεκριμένα η λουπεόλη έχει την ικανότητα να προωθεί και να αυξάνει τα επίπεδα προ-αποπρωτικών πρωτεϊνών, όπως η BAX, μειώνει τα επίπεδα αντι-αποπρωτικών πρωτεϊνών, όπως η Bcl-2, οδηγώντας έτσι στην ενεργοποίηση του καταρράκτη κασπασών στα μιτοχόνδρια (και συνεπώς ενεργοποίηση της κασπάσης-3), που θα οδηγήσουν στην απόπτωση, και τελικό θάνατο του κυττάρου (Liu et al, 2021). Ταυτόχρονα, ένα από τα μαστικοδιενονικά οξέα του μέτριας πολικότητας κλάσματος έχει την ίδια ικανότητα προώθησης της απόπτωσης και διακοπής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ σημειώνεται και μείωση της δραστηριότητας του NF-κB (Kalouisi et al, 2023) (Georgantopoulos et al, 2023).

1.4. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη και διερεύνηση της δράσης των τριών διαφορετικών κλασμάτων της Μαστίχας Χίου, χαρακτηρισμένα ως A,B και C (μη πολικό, ημι-πολικό, πολικό), στους πιθανούς προ-αποπρωτικούς ή αντι-αποπρωτικούς μηχανισμούς της ανθρώπινης νευρικής κυτταρικής σειράς SH-SY5Y, υπό την επίδραση παραγόντων που προκαλούν οξειδωτικό στρες. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, τα κλάσματα της Μαστίχας Χίου μελετήθηκαν σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, τόσο παρουσία όσο και απουσία του παράγοντα οξειδωτικού στρες H_2O_2 . Έτσι προσδιορίστηκε αρχικά ο βαθμός της κυτταρικής βιωσιμότητας μέσω της μεθόδου του MTT. Ακολούθησαν ανοσοαποτοπώσεις κατά Western για τα μόρια Bcl-2, προκασπάση-9 και προκασπάση-3 σε κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y, που κατεργάστηκαν με κλάσματα σε εύρος συγκεντρώσεων (10 μ g/ml και 20 μ g/ml για το κλάσμα A, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml και 20 μ g/ml για το κλάσμα B, 10 μ g/ml και 20 μ g/ml για το κλάσμα C), παρουσία ή απουσία υπεροξειδίου H_2O_2 . Επίσης για την εκτίμηση της πιθανής αντι-οξειδωτικής δράσης των κλασμάτων προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ελεύθερων ριζών, με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού, με παράλληλη σήμανση των μιτοχονδρίων και των πυρήνων. Επιπλέον, με στόχο να διερευνηθεί η πιθανή συμμετοχή των υποδοχέων των οιστρογόνων ERs στους μηχανισμούς της απόπτωσης, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη της δράσης των κλασμάτων παρουσία και απουσία της στεροειδούς ορμόνης οιστραδιόλης E2 σε κύτταρα στα οποία προκλήθηκε οξειδωτικό στρες παρουσία H_2O_2 . Η πιθανή επικουρική δράση των κλασμάτων της Μαστίχας Χίου αλλά και της ορμόνης E2 στη διαδικασία επαγόμενης από το H_2O_2 , θα μπορέσει να αναδεικνύει τις προστατευτικές δράσεις της Μαστίχας Χίου στοχευμένα στο νευρικό σύστημα. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορέσουν να συγκροτήσουν σημαντικό εύρημα για την ανάπτυξη φαρμακευτικών σκευασμάτων που θα μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν στην

καταπολέμηση πληθώρας νοσημάτων που σχετίζονται στενά με το νευρικό σύστημα ειδικά, όπως νευροεκφυλιστικές ή αυτοάνοσες ασθένειες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 1 και είναι τα εξής :

Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν		Εταιρείες
1	Συσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminar Flow Hood)	Tel Star AV-30/70
2	Επωαστήρας Κυττάρων	Thermo Electron Corporation
3	Υδατόλουτρο	P SELECTA
4	Φυγόκεντρος Εργαστηρίου	Eppendorf 5417R
5	Φυγόκεντρος Καλλιεργείων	Entrofriger- BLII/ PS Selecta®
6	Φυγόκεντρος Quick Spin	Nippon Genetics Europe GmbH
7	Heatblocker για θέρμανση δειγμάτων	KISKER
8	Sonicator για λύση κυττάρων	Hielscher Ultrasound Technologies, Overhead laboratory stirrer, model UP100H
9	Vortex	Bio Vortex V1
10	Αναδευτήρας εργαστηρίου	Heildolf Rotamax
11	Συσκευή Ηλεκτροφόρησης	Biorad mini-PROTEAN® tetra cell
12	Συσκευή Ηλεκτρομεταφοράς	Biorad mini-trans Blot
13	Ζυγοί Εργαστηρίου	KERN EW και KERN 440-47 N
14	Μικροσκόπιο Φθορισμού	ZEISS LSM900 with Airyscan 2
15	Πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων από το μικροσκόπιο φθορισμού	ZEN Microscopy Software
16	Συνεστιακό Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης) Καλλιεργείων	A. Kruss Optronik Germany
17	Πλάκα Neubauer για καταμέτρηση κυττάρων	Neubauer
18	Plate Reader για δείγματα Bradford	EnSpire™ Multimode Plate Reader (Revvity)
19	Σκοτεινός θάλαμος (Dark Room) και σετ εμφάνισης μεμβρανών από W.B	Kodak
20	Πεχάμετρο για σταθεροποίηση pH των διαλυμάτων	827 pH lab (Metrohm Swiss Made)

Πίνακας 1

2.2. ΧΗΜΙΚΑ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΥΛΙΚΑ, ΚΥΤΤΑΡΑ

2.2.1. Χημικά

Τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 2 και είναι τα εξής :

Χημικά που χρησιμοποιήθηκαν		Εταιρείες
1	Acrylamide/Bis acrylamide 40%	Bio-Rad®
2	Ammonium persulfate, APS	SIGMA
3	Κυανό της Βρωμοφαινόλης Bromophenol blue	Honeywell Fluka®
4	Sodium Dodecyl Sulfate, SDS	SIGMA
5	TEMED	Applichem
6	β-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel-de Haën®

7	Bradford protein assay	Bio-Rad [®]
8	Διεθιοθρεϊτόλη DTT	SERVA
9	Φθοριούχο φαινυλομεθυλοσουλφονύλιο, Phenyl Methyl Sulfonyl Floride, PMSF	SERVA
10	Αναστολείς Πρωτεασών Protease inhibitors	SIGMA
11	Γάλα σε σκόνη Skimmed milk powder	Regilait
12	Tween 20	SIGMA
13	Μάρτυρας πρωτεϊνών διαφόρων μοριακών βαρών	Pageruler [™] Prestained Protein Ladder 10 to 180 kDa -26616 ThermoScientific
14	Αιθανόλη 100%	SIGMA
15	Trypsin-EDTA 5% 10×	Gibco [®]
16	Αντιβιοτικά Θρεπτικού Μέσου Πενικιλίνη - Στρεπταμυκίνη	Gibco [®]
17	L-γλουταμίνη, L-Glutamine	Gibco [®]
18	ECL A + ECL B για εμφανίσεις	Santa Cruz [®]
19	Διάλυμα ανάπτυξης Developer (Διαλύματα A και B)	Fuji [®]
20	Διάλυμα μονιμοποίησης σήματος Fixer (Διαλύματα A και B)	Fuji [®]
21	MTT	SIGMA
22	Διμέθυλοσουλφοξείδιο DMSO	SIGMA
23	DCF-DA Dye	Thermo Fisher Scientific [®]
24	JC-1 Dye	Thermo Fisher Scientific [®]
25	Triton X-100	Appllichem
26	PBS 1x	Gibco [®]
27	Hoechst	Life Technologies
28	MitoTracker [™] Red CMXRos	Thermo Fisher Scientific [®]
29	Alexa Fluor 488 Dye	Thermo Fisher Scientific [®]
30	Glycine	SERVA
31	Tris	SERVA
32	E2	SIGMA
33	Εμβρυϊκός ορός βοοειδών (Fetal Bovine Serum) FBS	Gibco [®]
34	FBS – cis	Biosera [®]
35	HCl	Merck
36	EDTA	SERVA
37	Ρυθμιστικό διάλυμα με άλατα φωσφόρου(Phopshate Buffered Saline, PBS	Gibco [®]

Πίνακας 2

2.2.2. Θρεπτικά Μέσα Κυτταροκαλλιιεργειών

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

2.2.3. Κλάσματα Μαστίγας Χίου

- Η Μαστίγα Χίου παραλήφθηκε από την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου. Η κλασμάτωση και χημικός χαρακτηρισμός του μη-πολικού, ημι-πολικού και πολικού κλάσματος έγιναν σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα του Dr. Giovanni Appendino, Professor of Chemistry, Università del Piemonte Orientale (UPO), Faculty of Pharmacy, Novara (Italy).

2.2.4. Διαλύματα

- Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :

Διαλύματα			
1	PMSF 200mM	9	Διάλυμα Bradford 5x
2	Διάλυμα λύσης κυττάρων(Lysis Buffer) : 20mM Tris pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 250mM NaCl, 3mM EDTA, προσθήκη 0.5μl 20mM PMSF, 2μl 1M DTT και 10μl μείγματος αναστολέων πρωτεασών.	10	Sample Buffer 4X(διάλυμα επιστοιβαξης δειγμάτων) : 1M Tris pH 6.8, 10% v/v γλυκερόλη, 10% v/v SDS, 5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% v/v κυανούν της βρωμοφαινόλης
3	Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	11	Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10x : 3% w/v Tris base και 14.4% w/v γλυκίνη, σε όγκο 1 L ddH ₂ O
4	Tris 20 mM pH 7.5	12	Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1x : 10% v/v Running Buffer 10X. 0,1% v/v SDS, σε ddH ₂ O
5	Υπερθειικό Αμμώνιο Ammonium persulfate (APS 10%)	13	Ρυθμιστικόδιάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10x : 10% v/v Running Buffer 10x, 20% v/v MeOH και 0.05% v/v SDS, όγκος 1L
6	TEMED	14	Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1x
7	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)10x : 2gr KCl, 2,4gr KH ₂ PO ₄ , 17,8gr Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O και 80gr NaCl σε όγκο 1L	15	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (TBS) 10x : pH 7,4-7,6, 24gr Tris-base και 88gr NaCl σε όγκο 1L. Ρύθμιση pH με HCl 12N
8	Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1x : 10% v/v Stock Buffer TBS 10x και 0.06% v/v Tween-20, όγκος μέχρι 1L με ddH ₂ O	16	Διαλύματα για εμφάνιση σήματος : Developer Solution 1L: 250ml A, 25ml B. 725ml dH ₂ O, Fixer Solution 1L: 225ml A, 25ml B, 750ml dH ₂ O

Πίνακας 3

2.2.5. Αντισώματα

Πρωτογενή Αντισώματα

Διαλύονται σε διάλυμα TBST 1X και με σκόνη γάλακτος σε τελική συγκέντρωση 2% w/v και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -20°C. Οι τελικές συγκεντρώσεις των

προκασπάση-9, προκασπάση-3 και Bcl-2 είναι αραιώση 1/1000, και της β-ακτίνης είναι 1/2000. Επίσης τα Μοριακά Βάρη είναι 47 kDa, 35 kDa, 28 kDa, και 42 kDa αντίστοιχα.

Πρωτογενή Αντισώματα		Εταιρείες
1	Anti - Procaspase 9	Cell Signaling
2	Anti - Procaspase 3	ProteinTech
3	Anti - Bcl-2	Cell Signaling
4	Anti - β-actin	SIGMA

Πίνακας 4

Δευτερογενή Αντισώματα

Διαλύονται σε διάλυμα TBST 1X και με σκόνη γάλακτος σε τελική συγκέντρωση 2% w/v και τελικό όγκο 20 ml. Η τελική αραιώση είναι 1/50.000 v/v.

Δευτερογενή Αντισώματα		Εταιρείες
1	Αντίσωμα έναντι mouse IgG-HRP	Cell Signaling
2	Αντίσωμα έναντι rabbit IgG-HRP	Cell Signaling

Πίνακας 5

2.2.6. Αναλώσιμα Υλικά

Τα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήσαμε φαίνονται στον Πίνακα 5 :

Αναλώσιμα Υλικά		Εταιρείες
1	Πλαστικά Σωληνάρια – Eppendorf (1.5 ml, 2.0 ml)	Sarstedt
2	Σωληνάρια για φύλαξη κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη(cryovials)	Sarstedt
3	Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
4	Ειδικές φιάλες - φλάσκες για ανάπτυξη των κυττάρων (flasks)	Sarstedt
5	Πιπέττες ορολογικές - Serological (2, 5, 10 και 25ml)	Sarstedt
6	Ρύγχοι (0.2-10 μL, 20-200 μl και 100-1000 μl)	Sarstedt
7	Πλάκες-πιατάκια κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) με 1x, 6x, 24x, 96x wells	Sarstedt
8	Γυάλινα σιφώνια	Kimble
9	Φωτογραφικά φιλμ ανίχνευσης σήματος σε μεμβράνη κατά τη διαδικασία Western Blot	FUJI MEDICAL
10	Διηθητικά Χαρτιά Whatman	SIGMA
11	Μεμβράνες νιτροκυταρίνης 0,22μm και 0,45μm	Amersham™ Protran
12	Σφουγγαράκια για ηλεκτρομεταφορά	

Πίνακας 6

2.2.7. Κυτταρικές Σειρές

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά SH-SY5Y, κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος, η οποία προέρχεται από την κυτταρική σειρά SK-N-SH, που καλλιεργήθηκε από προϊόν καλλιέργειας βιοψίας μυελού των οστών μιας 4χρονης ασθενούς με μεταστατικό νευροβλάστωμα (μορφή καρκίνου). Αποτελούν μη-διαφοροποιημένα κύτταρα που χαρακτηρίζονται από λίγες προεξοχές και έντονο πολλαπλασιαστικό ρυθμό. Χρησιμοποιούνται για την έρευνα των μηχανισμών

νευροεκφυλιστικών ασθενειών, καθώς χρησιμεύουν ως μοντέλο για τη μεταφορά φαρμάκων στον εγκεφαλικό ιστό (Gangras et. al, 2022).

2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.3.1. Τεχνικές Κυτταροκαλλιέργειών

2.3.1.1 Ξεπάγωμα Κυττάρων

Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y φυλάσσεται σε βαθιά κατάψυξη -80°C . Στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (Laminar Flow Hood) τοποθετούμε το θρεπτικό DMEM 1g/mol Glucose σε δοκιμαστικό σωλήνα falcon, που το έχουμε από πριν τοποθετήσει μέσα στο Hood και βγάζουμε νέα φιάσκα καλλιέργειας. Βγάζουμε και το cryovial από την κατάψυξη και το τοποθετούμε εντός του υδατόλουτρου. Ύστερα τοποθετείται στο θάλαμο σε στατώ και εισάγουμε το περιεχόμενο σε δοκιμαστικό σωλήνα με το θρεπτικό. Φυγοκεντρούμε και γράφουμε τα στοιχεία των κυττάρων στη φιάσκα. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε θρεπτικό DMEM 1g/mol Glucose (low Glucose) και τοποθετείται στη φιάσκα. Τοποθετούμε την φιάσκα στο μικροσκόπιο, ώστε να εξετάσουμε τη μορφή των ξεπαγωμένων κυττάρων. Φυσιολογικά, τα νευρικά κύτταρα, πρέπει να είναι επιπλέοντα, πολλά, σχετικά μεγάλα, και στρογγυλά. Μετά τη μικροσκοπική παρατήρηση, τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο.

2.3.1.2 Θρυψινοποίηση

Στην θρυψινοποίηση, αφαιρούμε το θρεπτικό και προσθέτουμε θρυψίνη για λίγα μόνο λεπτά λόγω πιθανότητας παρατεταμένης πρωτεόλυσης των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Προσθέτουμε θρεπτικό, φυγοκεντρούμε και επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα εκ νέου και συμπληρώνουμε με θρεπτικό υλικό DMEM 1g/mol Glucose.

2.3.1.3 Μέτρηση και Επίστρωση Κυττάρων

Για να καταμετρήσουμε τον κυτταρικό πληθυσμό, εισάγουμε ποσότητα κυττάρων εντός της καλυπτρίδας στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Παρατηρούμε στο μικροσκόπιο, και σημειώνουμε τον αριθμό των κυττάρων που παρατηρούμε σε κάθε τεταρτημόριο, βρίσκοντας τον κατά προσέγγιση αριθμό των κυττάρων που έχουμε ανά ml. Επαναδιαλυτοποιούμε, παίρνουμε την κατάλληλη ποσότητα των κυττάρων, τοποθετείται σε νέο Falcon και φυγοκεντρούμε. Επαναδιαλυτοποιούμε στην υπολογισμένη ποσότητα θρεπτικού 10% charcoal inactivated FBS (CIS charcoal inactivated serum), 1% L-γλουταμίνη διαλυμένα σε DMEM 1g/mol χωρίς phenol red.

2.3.1.4 Προσθήκη Ουσιών και Συλλογή Κυττάρων

Απαραίτητη ήταν η συλλογή ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων, που έχουν επωαστεί με τα κλάσματά μας A, B, C, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, παρουσία ή απουσία υπεροξειδίου H_2O_2 και οιστραδιόλης E2, με τα τελευταία να χρησιμοποιούνται πάντα σε σταθερές συγκεντρώσεις 700 μM και 10^{-9} M αντίστοιχα. Όσον αφορά τις

ανοσοαποτυπώσεις κατά Western, στρώθηκαν 250.000 κύτταρα σε 6x plates για 48 ώρες επώασης με θρεπτικό υλικό DMEM 1g/mol Glucose (low Glucose), ώστε να πολλαπλασιαστούν. Έπειτα αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε τις συγκεντρώσεις των κλασμάτων A, B, C, στα well-plates που θα περιέχουν τα κλάσματα παρουσία ή απουσία H₂O₂. Προηγουμένως τα κλάσματα συγκέντρωσης stock 100mg/ml έχουν υποστεί διαδοχικές αραιώσεις από ένα αρχικό διάλυμα για κάθε κλάσμα (mastermix), με την χρήση eppendorfs και παρουσία DMSO αραιώσης 1/1000 και καταλήγουμε στις τελικές συγκεντρώσεις. Έτσι έχουμε A, B, C 20μg/ml για τη πρώτη Western Blot, συγκεντρώσεις A 20μg/ml, A 10μg/ml, B 10μg/ml, B 5μg/ml, C 20μg/ml και C 10μg/ml για την δεύτερη Western Blot, και συγκεντρώσεις A 20μg/ml και C 20μg/ml για την τρίτη Western Blot. Τα κλάσματα παραμένουν για επώαση για 24 ώρες, ενώ τις τελευταίες 6 ώρες αυτής της επώασης προστίθεται και το H₂O₂ συγκέντρωσης 700μM, στα plates με την επώαση με το H₂O₂, αλλά και στις περιπτώσεις συνδυασμού των κλασμάτων με αυτό. Ειδικότερα στα τελευταία plates, αφαιρούνται οι συγκεντρώσεις των κλασμάτων και προστίθενται εκ νέου οι ίδιες συγκεντρώσεις με πριν ταυτόχρονα με το H₂O₂, ώστε να φαίνεται η πραγματική δράση των κλασμάτων. Στην Western Blot παρουσία της οιστραδιόλης E2 συγκέντρωσης 10⁻⁹ M, αυτή προστίθεται για 24 ώρες, και το H₂O₂, προστέθηκε στις τελευταίες 6 ώρες της 24ωρης επώασης.

Στην συνθήκη control η επώαση των κυττάρων γινόταν με το θρεπτικό μας υλικό, ενώ το H₂O₂ έχει συγκέντρωση stock 1M και αραιώνεται με νερό H₂O στην τελική του 700μM, ενώ πριν το βωρο της επώασης των κυττάρων παρουσία H₂O₂, αυτά επωαζόταν μόνο με θρεπτικό υλικό. Όταν οι αραιώσεις των ουσιών μας είναι έτοιμες τοποθετούμε τις διαλυμένες ουσίες από τα eppendorfs στα plates με πιπέτα. Μετά ξεκινάει η συλλογή των κυττάρων. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και γίνεται πλύση με το διάλυμα PBS 1x. Έπειτα χρησιμοποιούμε μια πλαστική ράβδο με εύκαμπτη άκρη ώστε να συλλέξουμε τα κύτταρα, τα οποία χρησιμοποιούνται για τα πειράματα που θα ακολουθήσουν.

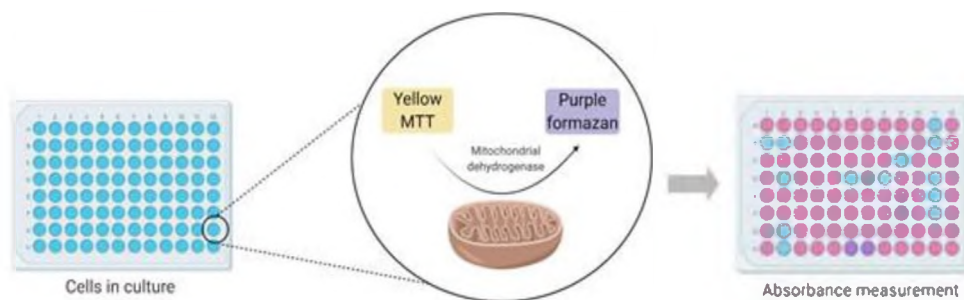
2.3.2. Βιοχημικές Τεχνικές

2.3.2.1 Δοκιμασία MTT

Το MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) είναι ένα αντιδραστήριο, συγκεκριμένα ένα κίτρινο άλας τετραζολίου που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και τη μεμβράνη των μιτοχονδρίων, έχοντας θετικό φορτίο και μεταβολίζεται από μεταβολικά ενεργά κύτταρα μέσω αναγωγής σε ιώδεις κρυστάλλους φορμαζάνης, χρώματος μπλε-μωβ. Χρησιμεύει ως ποσοτική χρωματομετρική δοκιμασία για μέτρηση κυρίως της βιωσιμότητας και μεταβολικής ενεργότητας κυττάρων (Ghasemi et al, 2021). Χρησιμοποιούμε πιάτο 96-well plate, και κάθε συνθήκη έχει 5 επαναλήψεις. Το κάθε well έχει 10.000 κύτταρα, και στα κατάλληλα πηγαδάκια προσθέτουμε είτε σκέτο θρεπτικό DMEM 4.5 g/L glucose, 10% v/v FBS, 2 mM L-glutamine and 100 units/mL penicillin/streptomycin με DMSO (control), είτε τα κλάσματα μαστίχας A,B,C μαζί με το θρεπτικό και το DMSO, για να εξετάσουμε μόνο

τη δράση των κλασμάτων, σε όλες τις συγκεντρώσεις τους (A 10μg/ml, A 20μg/ml, B 20μg/ml, B 10μg/ml, B 5μg/ml, C 10μg/ml, C 20μg/ml). Οι συνθήκες αυτές επωάζονται για 24 ώρες στον επωαστικό κλίβανο.

Έπειτα 6 ώρες πριν τη λήξη της επώασης, προσθέτουμε τον οξειδωτικό παράγοντα της παρούσας πτυχιακής εργασίας, το υπεροξείδιο του υδρογόνου H₂O₂ συγκέντρωσης 700μM, στη συνθήκη του H₂O₂, και στις συνδυαστικές συνθήκες, αφαιρούμε το θρεπτικό με τα κλάσματα A,B,C και προσθέτουμε ταυτόχρονα το H₂O₂ με ίδια ποσότητα των κλασμάτων μας.



Εικόνα 15 : Δοκιμασία MTT

Πηγή: Cell viability assays: Why, what and how. CytoSMART. (n.d).
<https://cytosmart.com/resources/resources/cell-viability-assays-why-what-and-how>

Στο control ανανεώνουμε το θρεπτικό, ενώ στις συνθήκες των κλασμάτων, κάνουμε μια ανανέωση θρεπτικού με τα κλάσματα. Μετά την επώαση, αφαιρούμε όλα τα διαλύματα από τα wells, και προσθέτουμε το αντιδραστήριο MTT (Stock 5mg/ml και αραιώση 1:10, τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml), επωάζοντας για 3 ώρες. Ύστερα προσθέτουμε ισοπροπανόλη, ώστε να σπάσουν οι κρύσταλλοι σε συνθήκες σκοταδιού, και μετράμε την κυτταροτοξικότητα και τη βιωσιμότητα των κυττάρων, με την απορρόφηση να βρίσκεται σε μήκος κύματος 570 nm και 690 nm στο PlateReader.

2.3.2.2 Λύση Κυττάρων με Χρήση Υπερήχων

Το ίζημα των κυττάρων που έχουμε μαζέψει στα erpendorfs επαναδιαλύεται σε ένα διάλυμα που λέγεται Lysis Buffer. Ο όγκος που θα χρειαστούμε συνήθως εξαρτάται από την ποσότητα του ιζήματος των κυττάρων. Αναδεύουμε με μια πιπέτα και τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο. Μετά από αυτό, ακολουθεί η λύση των κυττάρων με τη χρήση μηχανήματος παραγωγής υπερήχων, με τον κάθε υπέρηχο να διαρκεί λίγα δευτερά (Sonication).

2.3.2.3 Μέτρηση Συνολικού Πρωτεϊνικού Περιεχομένου (Μέθοδος Bradford)

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου των λυμένων κυττάρων. Η αρχή της έγκειται στην αλλαγή της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, που υπό όξινες συνθήκες, από καφέ- κόκκινη να μετατρέπεται σε μπλε, καθώς προσδένεται με τις πρωτεΐνες στο προς εξέταση διάλυμα. Η μεταβολή της απορρόφησης μετράται στα

595nm. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες που αντιστοιχούν στα δείγματά που διαθέτουμε και έναν για τυφλό, τοποθετούμε αντιδραστήριο Bradford συγκέντρωσης 1x (Νόμος Αραιώσης από 5x), και ταυτόχρονα τα δείγματά μας. Μετά από vortex, τα δείγματα τοποθετούνται σε σκοτάδι για 20 έως 40 λεπτά. Μόλις ολοκληρωθεί ο χρόνος αντίδρασης, τα δείγματα φωτομετρούνται στα 595nm στο Plate Reader του εργαστηρίου.

2.3.2.4 Παρασκευή Πηκτής Πολυακρυλαμίδης - Ηλεκτροφόρηση

Υπολογίζουμε την σύσταση των δειγμάτων που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, και προχωρούμε στην παρασκευή τους και περιέχουν το κυτταρικό εκχύλισμα που αντιστοιχεί σε ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης (Total cell extract), Tris HCl pH 7,5 και Sample buffer 4x. Οι όγκοι του Tris-HCl και του κυτταρικού εκχυλίσματος καθορίζονται ανάλογα με την πρωτεϊνική συγκέντρωση του κυτταρικού εκχυλίσματος. Τα δείγματα φόρτωσης παραμένουν στον πάγο. Παράλληλα ξεκινάμε την κατασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης, με παρασκευή του gel διαχωρισμού (separating gel), η σύσταση της οποίας περιλαμβάνει τα εξής:

Συστατικά	Περιεκτικότητα 12%
ddH ₂ O	2.175 ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	1.25 ml
37% BIS/Acrylamide	1.5 ml
10% SDS	50 μl
10% APS	25 μl
TEMED	2.5 μl

Σημαντικό είναι, κατά την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού, το APS και το TEMED να μπουν σχεδόν ταυτόχρονα. Μόλις ετοιμαστεί το gel, αναδεύεται και εκχύνεται μεταξύ των τζαμιών της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Από πάνω προσθέτουμε ισοπροπανόλη, προκειμένου να διατηρηθεί υγρό και να μην έρθει σε επαφή με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας, όσο πήζει. Όταν περάσουν 25 λεπτά, ξεκινάμε τη δημιουργία του gel επιστοίβαξης (stalking gel), η σύσταση του οποίου είναι:

Συστατικά	Περιεκτικότητα (Σταθερή)
ddH ₂ O	2.025 ml
1.5M Tris-HCl pH 6.8	0.21 ml
10% SDS 10%	25 μl
37% BIS/Acrylamide	0.25 ml
10% APS	12.5 μl
TEMED	2.5 μl

Ανακατεύουμε το gel επιστοίβαξης, έχοντας αφαιρέσει την ισοπροπανόλη και κατευθείαν εισάγονται τα ειδικά χτενάκια για δημιουργία πηγαδιών-θέσεων, όπου θα φορτώσουμε τα δείγματά μας. Περιμένοντας την ολοκλήρωση της αντίδρασης πολυμερισμού της ακρυλαμίδης, ενεργοποιούμε τη συσκευή του Heat Blocker, στήνουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης, και γεμίζουμε εξωτερικά με διάλυμα

ηλεκτροφόρησης. Τα τζαμάκια εξάγονται και τοποθετούνται στην κασετίνα που έχουμε εισάγει στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, αφαιρείται το χτενάκι. Ύστερα με φρέσκο διάλυμα ηλεκτροφόρησης και τοποθετούμε τα δείγματα στο Heat Blocker. Φορτώνονται στα πηγαδάκια, ενώ προσθέτουμε και τον δείκτη γνωστού μοριακού βάρους. Τοποθετείται το καπάκι με τα ηλεκτρόδια της συσκευής και ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό ρεύματος στα 90V, για να ξεκινήσει η εφαρμογή τάσης. Όταν τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, ξεκινάνε οι προετοιμασίες για την ηλεκτρομεταφορά.

2.3.2.5 Ηλεκτροφορά (Ανοσοαποτύπωση κατά Western)

Μετά την ηλεκτροφόρηση, ξεκινά η εξισορρόπηση, δηλαδή η εμβάπτιση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, των σφουγγαριών, των χαρτιών whatman σε φρέσκο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς για 10 λεπτά, πριν την ανοσοαποτύπωση. Το gel, από την άλλη, εμβαπτίζεται με χρησιμοποιημένο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς. Στήνουμε την κασετίνα της ηλεκτρομεταφοράς, ενώ με την τοποθέτηση κάθε χαρτιού whatman πατάμε με scraper, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων, που θα σχηματίσει κενά σημείων στη μεμβράνη. Η κλεισμένη κασετίνα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς και λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται από την εφαρμογή της τάσης, χρησιμοποιούνται παγοκύστες. Τοποθετείται τέλος, το καπάκι με τα ηλεκτρόδια, ενεργοποιείται το τροφοδοτικό και απαιτεί τάση ίση με 0.35 A και χρόνος 70 λεπτά.

2.3.2.6 Blocking με Γάλα και Επώαση με Πρωτογενές Αντίσωμα

Ύστερα η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (που φέρει τις πρωτεΐνες που είχαν ηλεκτροφορηθεί), τοποθετείται σε διάλυμα PBST 1x προκειμένου να σημειωθεί ο δείκτης γνωστού μοριακού βάρους. Για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων από τα αντισώματα του γάλακτος, επωάζουμε τη μεμβράνη για μία ώρα υπό, σε διάλυμα γάλακτος 10% w/v, κάνουμε πλύση με PBST 1x και η μεμβράνη τοποθετείται στο πρωτογενές αντίσωμα, που έχει ξεπαφώσει ομαλά από τους -20°C. Η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα καθόλη τη διάρκεια της νύχτας.

2.3.2.7 Επώαση με Δευτερογενές Αντίσωμα και Εμφάνιση Σήματος από Western Blot

Μετά την overnight επώαση το πρωτογενές αντίσωμα αφαιρείται και η μεμβράνη πλένεται με TBST 1x, σε μηχανήμα ανάδευσης. Έτσι στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης να μείνει μόνο ότι έχει δέσει ειδικά στους συγκεκριμένους επιτόπους. Το δεύτερο αντίσωμα αναγνωρίζει ειδικά σταθερές περιοχές επιτόπων IgG του πρωτογενούς, ενώ είναι προσδεδεμένο με κατάλληλο προσδέτη υπεροξειδάση HorseRadish Peroxidase (HRP). Το προσθέτουμε για 1 ώρα. Αφού αφαιρεθεί και το δευτερογενές αντίσωμα, γίνονται ξανά πλύσεις με TBST 1X. Προσθέτουμε στη μεμβράνη ίση ποσότητα από καθένα από τα διαλύματα ECL-A και ECL-B που επιτρέπουν εμφάνιση του σήματος. Επωάζουμε για χρονικό διάστημα 3 λεπτών και σε σκοτάδι. Έπειτα βάζουμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μέσα στην κασετίνα, κάτω από την πλαστική διαφανή

μεμβράνη, όπου δεν επιτρέπεται διέλευση φωτός. Η υπόλοιπη διαδικασία εμφάνισης της Western λαμβάνει χώρα σε σκοτεινό θάλαμο. Μεταφέρουμε την κασετίνα εκεί, προσθέτουμε μέσα στην κασετίνα και πάνω από την πλαστική διάφανη μεμβράνη ένα ειδικό φιλμ, για συγκεκριμένο χρόνο επώασης, που εξαρτάται από το πρωτογενές αντίσωμα και επωάζουμε με τα διαλύματα εμφάνισης σήματος.

2.3.2.8 Ανοσοκυτταροχημεία, Μικροσκοπία Φθορισμού, DCF-DA

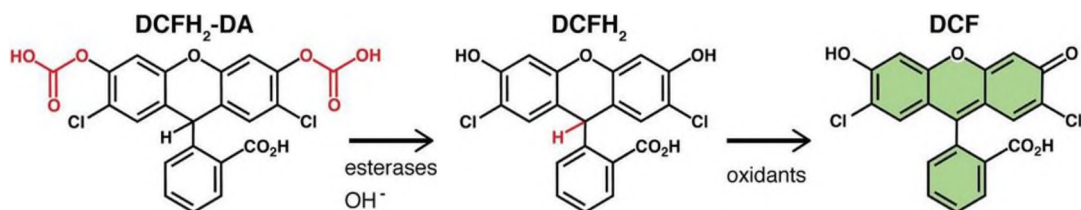
Η ανοσοκυτταροχημική μελέτη επιτρέπει τον προσδιορισμό μορίων στα κύτταρα με χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων ή δεικτών, ειδικά για κυτταρικά οργανίδια και υπό μελέτη μόρια. Σε πείραμα της παρούσας πτυχιακής εργασίας, στα πλαίσια χρησιμοποιήθηκε η τεχνική DCF-DA, που μετρά τα ποσά ελεύθερων ριζών που παράγονται κατά τη φυσιολογική κυτταρική αναπνοή, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες υπό την επίδραση οξειδωτικών παραγόντων. Μια από τις βασικότερες ελεύθερες ρίζες είναι το H_2O_2 , το οποίο σε μικρές δόσεις οδηγεί σε απόπτωση, και σε μεγάλες ποσότητες σε νέκρωση ή απόπτωση ανεξάρτητη από τις κασπάσες (Eruslanov et al, 2009). Η ουσία DCFH-DA, από την οποία πήρε το όνομά της η τεχνική, είναι μη φθορίζουσα πρόδρομη ουσία του DCF. Διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και χρησιμεύει καθώς όταν διασπάται από την ενδοκυτταρική εστεράση, δίνει τη μη φθορίζουσα μορφή DCDHF, η οποία πλέον οξειδώνεται μέσω του H_2O_2 και άλλων ενεργών ριζών οξυγόνου στην πράσινη φθορίζουσα DCF (Ortega-Camarillo et al, 2006). Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν οι φθορίζουσες χρωστικές - δείκτες, Hoechst 33342 (μπλε χρωστική), μια χρωστική που σημαίνει πυρηνικό DNA ζωντανών ή μη κυττάρων, και η CMX MitoTracker (κόκκινη χρωστική), που σημαίνει τα μιτοχόνδρια ζωντανών κυττάρων.

Έτσι γίνεται εύκολη η ποσοτική και ποιοτική μελέτη της παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου υπό την επίδραση οξειδωτικών παραγόντων παρουσία ή απουσία των υπό μελέτη κλασμάτων. Οι συνθήκες πειράματος είναι (Συνθήκη αναφοράς control, H_2O_2 , κλάσματα A10 μ g/ml, B5 μ g/ml και C10 μ g/ml παρουσία ή απουσία H_2O_2). Η λογική της τεχνικής είναι πως αρχικά κάθε συνθήκη έχει το δικό της μοναδικό plate, όπου έχουν πολλαπλασιαστεί τα κύτταρα, με θρεπτικό ώστε ο αριθμός τους να είναι ικανοποιητικός, που στην περίπτωση μας είναι το 100.000 κύτταρα. Έπειτα προστίθενται στις 6 συνθήκες οι συγκεντρώσεις των κλασμάτων A,B,C της Μαστίχας Χίου, για 24 ώρες επώαση.

Στις τελευταίες 6 ώρες επώασης προστίθεται το H_2O_2 στην αντίστοιχη συνθήκη, αλλά και στις 3 συνθήκες, όπου θα υπάρχουν οι συνδυασμοί των κλασμάτων με το H_2O_2 , με ταυτόχρονη ανανέωση των κλασμάτων στις συγκεκριμένες, ώστε η δράση των κλασμάτων της Μαστίχας Χίου να εμφανίζουν την ίδια δράση που θα εμφάνιζαν και στην αρχή της επώασης, για να είναι τα αποτελέσματά μας πιο αξιόπιστα. Όταν τελειώσει και η 6ωρη επώαση στον κλίβανο, αφαιρούμε το θρεπτικό και το H_2O_2 .

Προσθέτουμε σε κάθε συνθήκη το διάλυμα των χρωστικών στα 8 plates για 30 λεπτά (Hoechst σε αραιώση 1:1000, τελική συγκέντρωση 1 μ g/ml, CMX MitoTracker σε τελική συγκέντρωση 200nM, χρωστική DCF σε αραιώση/αναλογία 1:1000, τελική

συγκέντρωση 10μM), με τη χρωστική DCF να διαλύεται σε διάλυμα PBS 1x και τα κύτταρα μπαίνουν στον επωαστήρα. Μετά αφαιρείται το περιεχόμενο των plates και κάνουμε με θρεπτικό DMEM 10% phenol red/ without FBS, ώστε να φύγει η περίσσεια χρωστικών, και αφαιρείται και το θρεπτικό.



Εικόνα 16 : Πορεία αντιδράσεων μέχρι την χρωστική DCF

Πηγή : Reiniers, M. J. et al (2017). Preparation and Practical Applications of 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein in Redox Assays. *Analytical chemistry*, 89(7), 3853–3857

Κατευθείαν ακολουθεί η παρατήρηση των plates και συλλογή των απαραίτητων φωτογραφιών στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. Το μήκος κύματος διέγερσης της DCF είναι 488 nm, ενώ το μήκος κύματος εκπομπής μεταξύ 530nm – 550nm. Και στα 2 πειράματα του μικροσκοπίου χρησιμοποιήθηκε ο φακός με μεγέθυνση 40X.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

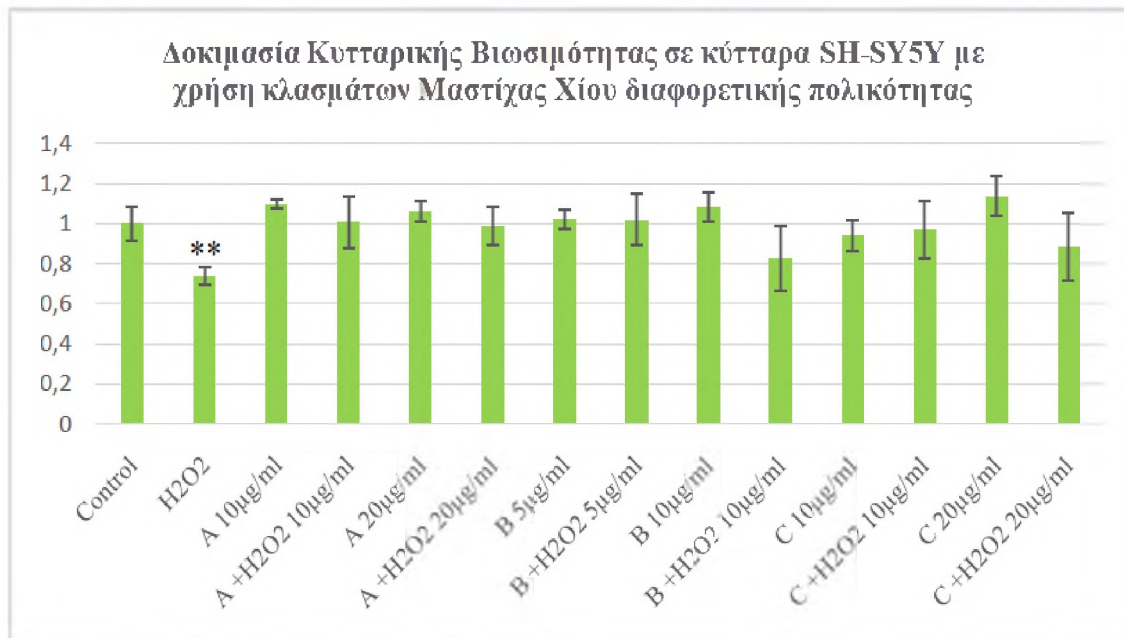
3.1. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ SH-SY5Y ΕΠΩΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ

Αρχικά εξετάστηκε η κυτταροτοξικότητα των κλασμάτων. Για να εκτιμηθεί αυτή η δράση, εφαρμόστηκε η δοκιμασία βιωσιμότητας των κυττάρων, με την μέθοδο του MTT. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε κυτταρικό κλίβανο, μέχρι να φτάσουν σε έναν ικανοποιητικό αριθμό μέσα στην φλάσκα. Ακολούθησε θρυψινοποίηση, παύση αυτής και επαναδιαλυτοποίηση, και τοποθετούμε 10μl με πιπέτα στην καλυπτρίδα του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer, όπου μετράμε τα κύτταρα σε κάθε τεταρτημόριο, βρίσκουμε τον μέσο όρο αυτών και βρίσκουμε το σύλλογο των κυττάρων ανά ml. Στην συνέχεια παίρνουμε τον απαραίτητο όγκο διαλύματος, επαναδιαλυτοποιούμε σε falcon και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά, 1000 rpm και θερμοκρασία δωματίου 20-25°C. Κάνουμε μια τελευταία επαναδιαλυτοποίηση με θρεπτικό DMEM cis και μοιράζουμε στα wells που θα χρειαστούμε.

Έτσι επιστρώθηκαν σε κάθε θέση στο 96αρι πιάτο καλλιέργειας 10.000 κύτταρα με συγκεντρώσεις και των 3 κλασμάτων της Μαστίχας Χίου (Κλάσματα A, C 20μg/ml και A, C 10μg/ml, B 5μg/ml και B 10μg/ml) για διάρκεια 24 ωρών, όπως φαίνεται και στο παρακάτω Σχήμα 1, ενώ το υπεροξείδιο του υδρογόνου H₂O₂ σε συγκέντρωση 700μM προστέθηκε στις τελευταίες 6 ώρες της overnight επώασης. Η προεργασία και αρχική παρατήρηση μέσω MTT των πιθανών ευεγερτικών δράσεων της Μαστίχας Χίου, στα κύτταρα SH-SY5Y, έγινε από τον υποψήφιο διδάκτορα, Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο, στα πλαίσια της διδακτορικής του διατριβής, με τίτλο «Υποδοχείς στεροειδών ορμονών: χαρακτηρισμός των βιοχημικών μηχανισμών ρύθμισης της δράσης τους». Από το Σχήμα 1 παρατηρούμε πως το H₂O₂, στη συγκεκριμένη συγκέντρωση και χρόνο επώασης, προκαλεί απόπτωση σε μικρό βαθμό, εύρημα χρήσιμο για την καλύτερη ανάλυση των αποτελεσμάτων μας, καθώς η κυτταρική βιωσιμότητα μειώνεται κατά 27%. Επιπροσθέτως δεν παρατηρείται μεγάλη διαφορά στην ικανότητα διαβίωσης των κυττάρων μας στις περιπτώσεις όπου τα κύτταρα επώαστηκαν μόνο με τα κλάσματα A, B και C. Ειδικότερα οι συγκεντρώσεις 20μg/ml, 10μg/ml και 20μg/ml των κλασμάτων A, B και C αντίστοιχα φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικά και λιγότερο τοξικά από τις συγκεντρώσεις 10μg/ml, 5μg/ml και 10μg/ml των κλασμάτων A, B και C αντίστοιχα, με μικρή όμως διαφορά.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί επίσης πως οι συνδυασμοί και των 3 κλασμάτων A,B,C σε όλες τις συγκεντρώσεις τους μαζί με το H₂O₂, συγκριτικά με το control, εμφανίζουν μείωση μεταξύ 2%-18%, οπότε και διαπιστώνεται η ικανότητα της Μαστίχας Χίου να αντιστέκεται στην επαγόμενη απόπτωση που προκαλείται από τον οξειδωτικό παράγοντα, H₂O₂, στην συγκεκριμένη τελική συγκέντρωση και ώρα επώασης. Με άλλα λόγια δεν παρατηρούμε κυτταροτοξικότητα από τη δράση των κλασμάτων μας, καθώς παρατηρούμε τα ίδια επίπεδα βιωσιμότητας με τα αντίστοιχα control, τα οποία control περιέχουν μόνο DMSO. Παράλληλα ο πιο κυτταροτοξικός

συνδυασμός είναι αυτός συγκέντρωσης 10μg/ml του κλάσματος B παρουσία H₂O₂, με μικρή όμως διαφορά από τα άλλα κλάσματα ενώ πιο αποτελεσματικοί οι συνδυασμοί είναι οι συγκεντρώσεις 10μg/ml, 20μg/ml του κλάσματος A, 5μg/ml του B και 20μg/ml του C.



Σχήμα 1 : Διάγραμμα κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων SH-SY5Y υπό την επίδραση κλασμάτων Μαστίχας Χίου και H₂O₂. Η αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων γίνεται με προσθήκη κλασμάτων Μαστίχας Χίου διαφορετικής πολικότητας A, B και C σε 96-well plate και επώαση με τα κλάσματα για 24 ώρες. Στις τελευταίες 6 ώρες αυτής της επώασης προστίθεται και H₂O₂ συγκέντρωσης 700μM στις συνθήκες που φαίνονται παραπάνω, με ταυτόχρονη ανανέωση των κλασμάτων στις συνθήκες συνεπώασης. Γίνεται προσθήκη του αντιδραστηρίου MTT, με αρχική συγκέντρωση 5mg/ml και τελική αραιώση 1/10, και διαλυμένο σε θρεπτικό low glucose με επώαση διάρκειας 3 ωρών. Στο τέλος μετράμε την παραγωγή κρυστάλλων (μωβ απόχρωση) φασματοφωτομετρικά με σάρωση στο Plate Reader. Έπειτα με στατιστική ανάλυση και χρήση του ONE-WAY ANOVA προκύπτουν τα παραπάνω αποτελέσματα για αριθμό επαναλήψεων των συνθηκών n=5.

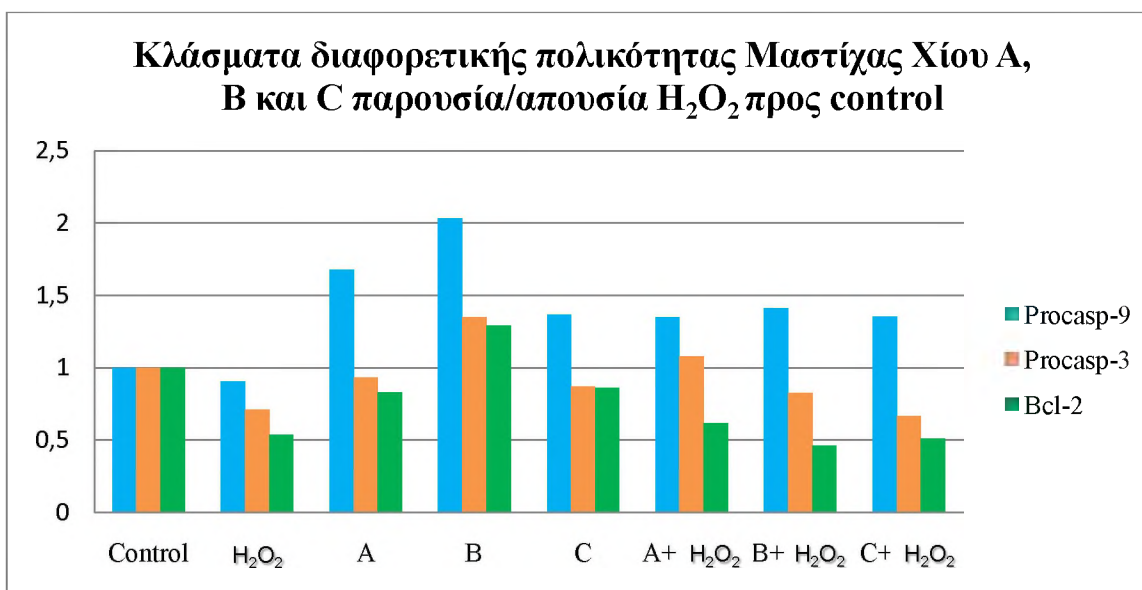
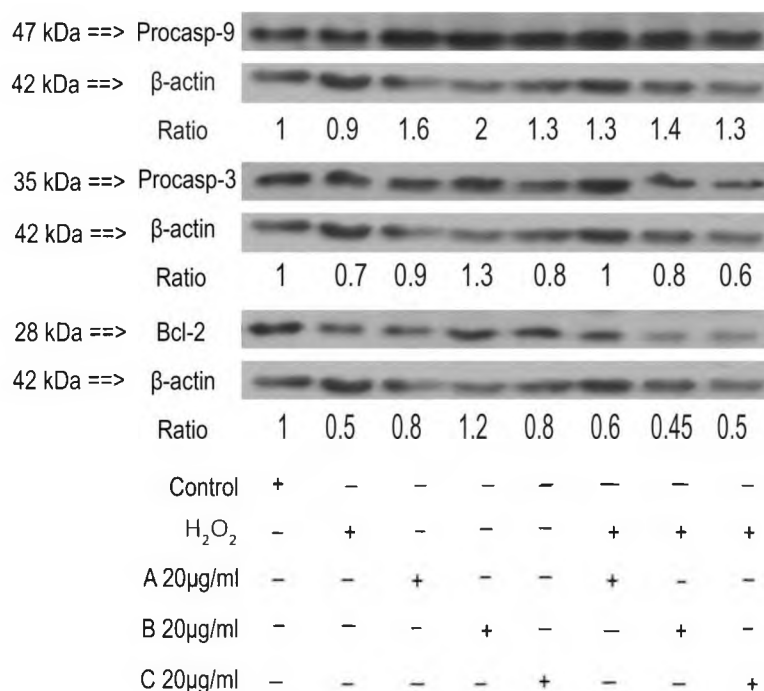
3.2. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ Bcl-2, ΠΡΟΚΑΣΠΑΣΗ-9 ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΣΠΑΣΗ-3 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ SH-SY5Y ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ

Στην προσπάθεια κατανόησης των μηχανισμών απόπτωσης στα νευρικά κύτταρα SH-SY5Y, έπρεπε να μελετηθούν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων της απόπτωσης σε όλες τις συνθήκες του πειράματος. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες της Bcl-2, και των προ-κασπασών -9 και -3, οι οποίες με διάσπαση και ενεργοποίηση δίνουν τις κασπάσες-9 και -3 αντίστοιχα του εξωγενούς και ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Έτσι μπορούμε να έχουμε μια πρώτη ποιοτική/ποσοτική «εικόνα» ώστε να συμπεράνουμε αν τα κλάσματα της Μαστίχας Χίου A,B,C, σε τελική συγκέντρωση 20μg/ml, έχουν τη δυνατότητα να δρουν προστατευτικά ενάντια της επαγόμενης

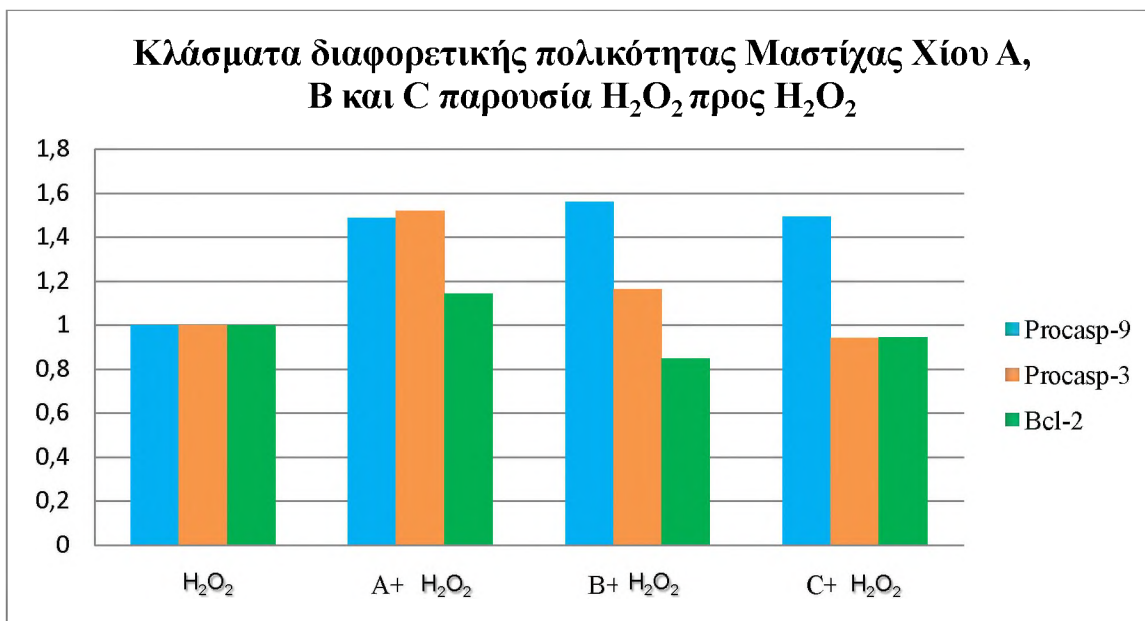
απόπτωσης των νευρικών κυττάρων. Πραγματοποιήθηκαν συγκριτικές μελέτες της επίδρασης του κάθε κλάσματος, αλλά και της συνεπώασης με τον οξειδωτικό παράγοντα H_2O_2 , τελικής συγκέντρωσης $700\mu M$, για 6 ώρες, στα πρωτεϊνικά επίπεδα των πρωτεϊνών-πρωταγωνιστών της απόπτωσης, με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Για τη μελέτη των επιπέδων αυτών των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα ειδικά πρωτογενή αντισώματα έναντι των Bcl-2, προκασπάσης-9 και προκασπάσης-3. Σκοπός αυτής της πειραματικής διαδικασίας ήταν πρώτα από όλα η επαλήθευση της αρχικής υπόθεσης εργασίας μας περί νευροπροστατευτικής δράσης της Μαστίχας Χίου. Στο Σχήμα 2 φαίνονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα σε όλες τις πειραματικές συνθήκες των κυτταροπλασματικών προκασπασών-9 και -3, αλλά και της μιτοχονδριακής Bcl-2 σε σχέση με το μόριο κανονικοποίησης, που είναι η β-ακτίνη.

Όπως φαίνεται συγκριτικά με τη συνθήκη control, στη συνθήκη επώασης των κυττάρων παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 , που είναι ο βασικός παράγοντας, στην συνθήκη των πειραμάτων, που θέτει τα κύτταρα σε απόπτωση, παρατηρήσαμε ελαττωμένα επίπεδα όλων των μορίων που μας ενδιαφέρουν. Η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων ποικίλλει από 10%, 50% έως και 30%. Η παρατήρηση είναι αναμενόμενη εφόσον το H_2O_2 αποτελεί παράγοντα οξειδωτικού στρες και άρα κυτταρικού θανάτου. Όσον αφορά την αντι-αποπτωτικό Bcl-2 του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης, φαίνεται αυξημένη στη συνθήκη συγκέντρωσης $20\mu g/ml$ του κλάσματος B κατά 20% σε σχέση με το control, ενώ παράλληλα στις υπόλοιπες συνθήκες συγκέντρωσης $20\mu g/ml$ των κλασμάτων A και C παρουσιάζει μικρή μείωση των επιπέδων της, της τάξης του 20% επίσης, κάτι που φαίνεται πιο καθαρά και στην ανοσοαποτύπωση κατά Western του Σχήματος 2.

Όσον αφορά την προκασπάση-3, όπως και πριν, έτσι και τώρα, η μεγαλύτερη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της σημειώνεται στη συνθήκη του κλάσματος B, με ποσοστό 30%. Από την άλλη, τα επίπεδά της στα κλάσματα A και C παρουσιάζονται ελάχιστα μειωμένα, σε ποσοστό μόλις 10% και 20% αντίστοιχα. Τέλος τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9 φαίνονται αυξημένα και στις συνθήκες των τριών κλασμάτων A, B και C απουσία H_2O_2 . Συγκεκριμένα εμφανίζει τα διπλάσια επίπεδα στην περίπτωση του κλάσματος B, και αύξηση της τάξης του 60% στο κλάσμα A και 30% στο κλάσμα C, όταν αυτά έχουν ίδια συγκέντρωση ίση με $20\mu g/ml$. Στις συνδυαστικές περιπτώσεις όμως, όπου έχουμε τα κλάσματα A, B και C παρουσία H_2O_2 , τα επίπεδα των προκασπασών-9 και -3 φαίνονται σχετικά υψηλά, σε σχέση με τη συνθήκη control (Σχήμα 2), και συγκεκριμένα ιδιαίτερα αυξημένα στην περίπτωση συγκέντρωσης $20\mu g/ml$ κλάσματος A παρουσία H_2O_2 , σε ποσοστό 30% (προκασπάση-9) και χωρίς κάποια μεταβολή για την προκασπάση-3. Στις περιπτώσεις προσθήκης συγκέντρωσης $20\mu g/ml$ κλασμάτων B και C παρουσία του H_2O_2 παρουσιάζουν παρόμοια πρωτεϊνικά επίπεδα, σχετικά χαμηλά, εξαιτίας της επίδρασης του H_2O_2 . Η Bcl-2, από την άλλη, φαίνεται και στις 3 περιπτώσεις με μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα, της τάξης του 40%, 50%, 55% από αριστερά προς τα δεξιά.



Σχήμα 2 : Διερεύνηση των πρωτεϊνικών επιπέδων Bcl-2, procasp-9 και procasp-3 σε κύτταρα SH-SY5Y που έχουν υποστεί οξειδωτικό στρες παρουσία και απουσία των κλασμάτων Μαστίγας Χίου, σε σύγκριση με την συνθήκη αναφοράς. Κυτταρικά εκχυλίσματα SH-SY5Y ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% SDS πηκτή πολυακρυλαμίδιου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης 0,22 μM με Western Blot και μελετήθηκαν ως προς τις μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων: Προκασπάση-9, Προκασπάση-3, Bcl-2. Ως μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο λόγος μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπό μελέτη μορίων ως προς τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Στο πάνω μέρος του διαγράμματος φαίνονται τα αποτελέσματα της Western Blot, με τις ζώνες των πρωτεϊνών, μετά και την κανονικοποίηση ως προς την β-ακτίνη (Προκασπάση-9 47 kDa, Προκασπάση-3 35 kDa, Bcl-2 28 kDa, β-ακτίνη 42 kDa), και στο κάτω μέρος φαίνονται αναλυτικά σε διάγραμμα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης σε όλες τις συνθήκες προς τη συνθήκη control.



Σχήμα 3 : Διερεύνηση των πρωτεϊνικών επιπέδων Bcl-2, procasp-9 και procasp-3 σε κύτταρα SH-SY5Y που επωάστηκαν με τα κλάσματα Α, Β, C παρουσία H₂O₂, συγκριτικά με την συνθήκη επαγωγής οξειδωτικού στρες H₂O₂. Το διάγραμμα αντιστοιχεί στην ανοσοαποτύπωση κατά Western στο Σχήμα 2 με συγκεντρώσεις 20μg/ml κλασμάτων Α, Β, C, και H₂O₂ 700μΜ. Όλες οι συνδυαστικές συνθήκες των κλασμάτων έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την συνθήκη παρουσία του H₂O₂ για 6 ώρες.

Για την καλύτερη απεικόνιση των αποτελεσμάτων που φαίνονται στο Σχήμα 2, αλλά και για την διεξοδικότερη ανάλυση του τρόπου δράσης των κλασμάτων, ακολούθησε και δεύτερη κανονικοποίηση μετά την κανονικοποίηση προς την συνθήκη αναφοράς. Η δεύτερη κανονικοποίηση έγινε ως προς την συνθήκη κατεργασίας με υπεροξείδιο του υδρογόνου H₂O₂, στην οποία και πάλι μελετήσαμε τα αποτελέσματα της επίδρασης των κλασμάτων στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων Bcl-2, προκασπάση-9 και προκασπάση-3. Ως προς την συνθήκη του H₂O₂, συγκρίναμε μόνο τις συνθήκες των κλασμάτων παρουσία του H₂O₂, όπως φαίνονται στο Σχήμα 3. Παρατηρούμε πως τα πρωτεϊνικά επίπεδα των προκασπασών-9 και -3 διατηρούν σχετικά μη μεταβαλλόμενα και υψηλά πρωτεϊνικά επίπεδα, ειδικά στις συνδυαστικές συνθήκες των κλασμάτων Α και Β, κατά ποσοστά από 16% - 56%, άρα μπορούν και προκαλούν αντίσταση στα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα που θα προκαλούσε το H₂O₂, καθώς σε σχέση με το H₂O₂ τα επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών είναι αυξημένα σε αυτά τα κλάσματα. Η προκασπάση-9 είναι η μόνη από τα αποπτωτικά μόρια που παρουσιάζεται αυξημένη στη συνθήκη συγκέντρωσης 20μg/ml C παρουσία H₂O₂ κατά 50%, με την προκασπάση-3 και τη Bcl-2 να μειώνονται σε πρωτεϊνικά επίπεδα κατά 10%. Ταυτόχρονα η Bcl-2 σημειώνει αύξηση κατά 15% μόνο στη συνδυαστική συνθήκη συγκέντρωσης 20μg/ml του Α παρουσία H₂O₂, καθώς φαίνεται να προκαλείται αντίσταση στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων που προκαλεί το υπεροξείδιο, ενώ στις υπόλοιπες συνθήκες η μείωσή του είναι σχετικά μικρή της τάξης του 20% και 10% αντίστοιχα.

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις συμπεραίνουμε πως και τα τρία κλάσματα είναι αποτελεσματικά ως προς τον σκοπό τους και δεν επιβεβαιώνεται πως δεν είναι κυτταροτοξικά, ενώ είναι ικανά να αντιστέκονται στην απόπτωση εξαιτίας του υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 και να προστατεύουν τα κύτταρα, ειδικά όταν τα τελευταία επωάζονται με Μαστίχα Χίου και H_2O_2 , εφόσον αυξάνεται η αντι-αποπτωτική Bcl-2, και μειώνονται τα επίπεδα των ενεργών κασπασών-9 και -3.

3.3. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ Bcl-2, ΠΡΟΚΑΣΠΑΣΗ-9 ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΣΠΑΣΗ-3 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ SH-SY5Y ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ

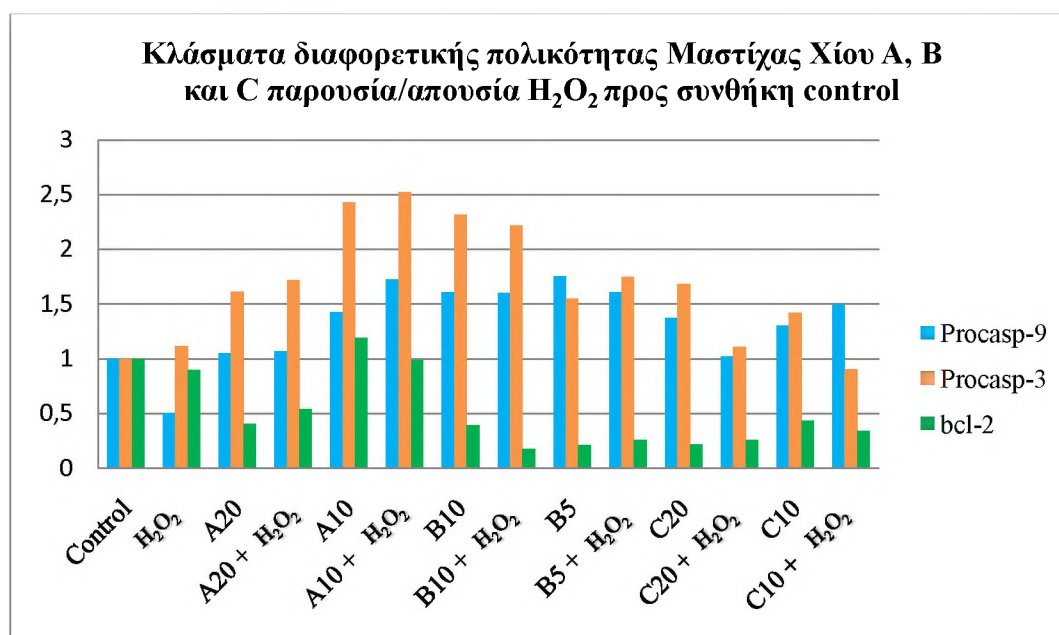
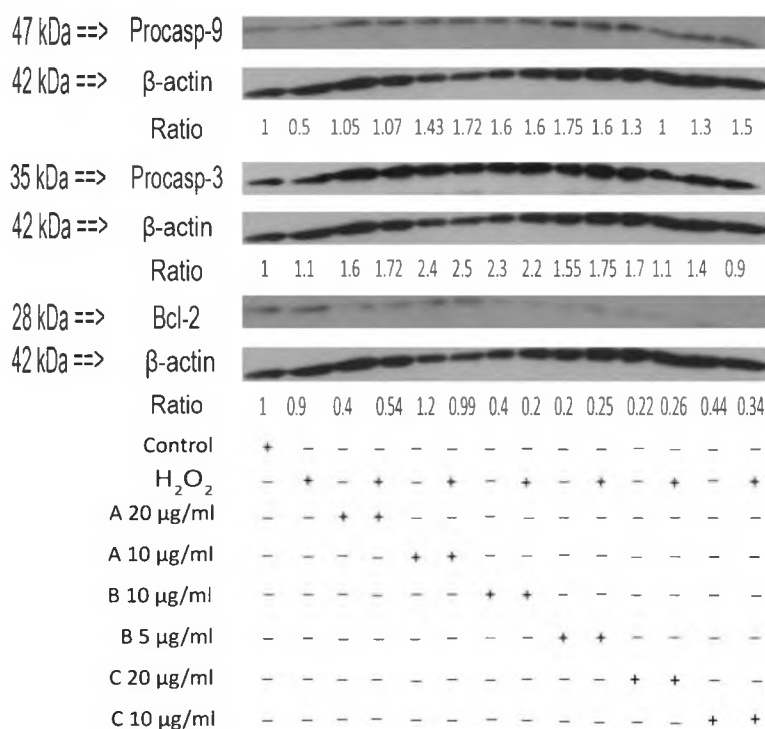
Με βάση τα παραπάνω θετικά αποτελέσματα, αποφασίσαμε να ερευνήσουμε τις ίδιες προστατευτικές ιδιότητες της Μαστίχας Χίου, για τα ίδια κλάσματα A,B, και C, με χαμηλότερες όμως συγκεντρώσεις, ώστε να εξακριβωθεί ποιο ή ποια κλάσματα είναι πιο αποτελεσματικά, αλλά και να βρεθεί ποια συγκέντρωση εμφανίζει τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη μικρότερη δυνατή συγκέντρωση. Η ανάλυση έγινε και πάλι με εφαρμογή της Western Blot, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.

Έτσι παρατηρούμε πως στη συνθήκη κατεργασίας με υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 , τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9 και της Bcl-2 παρουσιάζονται μειωμένα κατά 50% και 10% αντίστοιχα, ενώ η προκασπάση-3 στα ίδια περίπου επίπεδα με το control, χωρίς κάποια μεταβολή. Αυτό το αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο, καθώς μας δείχνει πως όντως κύτταρα θανατώνονται και άρα τα μόρια αυτά απαντώνται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, και μάλιστα η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9 υποδεικνύει την επαγωγή απόπτωσης μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού.

Όσον αφορά τις συνθήκες των κλασμάτων απουσία του H_2O_2 ως προς το control, μη τοξικές φαίνονται οι συγκεντρώσεις 10μg/ml και 20μg/ml του κλάσματος A. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τόσο η πρωτεΐνη Bcl-2, όσο και οι προκασπάσες-9 και -3 παρουσιάζονται αυξημένες κατά 20%, 43% και 200% (παρουσία 10μg/ml A) αντίστοιχα. Ταυτόχρονα σε συγκέντρωση 20μg/ml του κλάσματος A, αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα παρουσιάζουν οι 2 προκασπάσες-9 και -3. Μόνο η πρωτεΐνη Bcl-2 φαίνεται μειωμένη κατά μεγάλο ποσοστό, δηλαδή 60%. Παράλληλα οι συγκεντρώσεις 5μg/ml και 10μg/ml του κλάσματος B και 10μg/ml και 20μg/ml του C φαίνονται να είναι μη τοξικά, αυξάνοντας τα επίπεδα των προκασπασών-9 και -3, κατά 1.5 ή 2 φορές σε σύγκριση με τα επίπεδα του control. Την ίδια στιγμή τα επίπεδα της Bcl-2 φαίνονται να μειώνονται σε ποσοστά μεγαλύτερα του 50%.

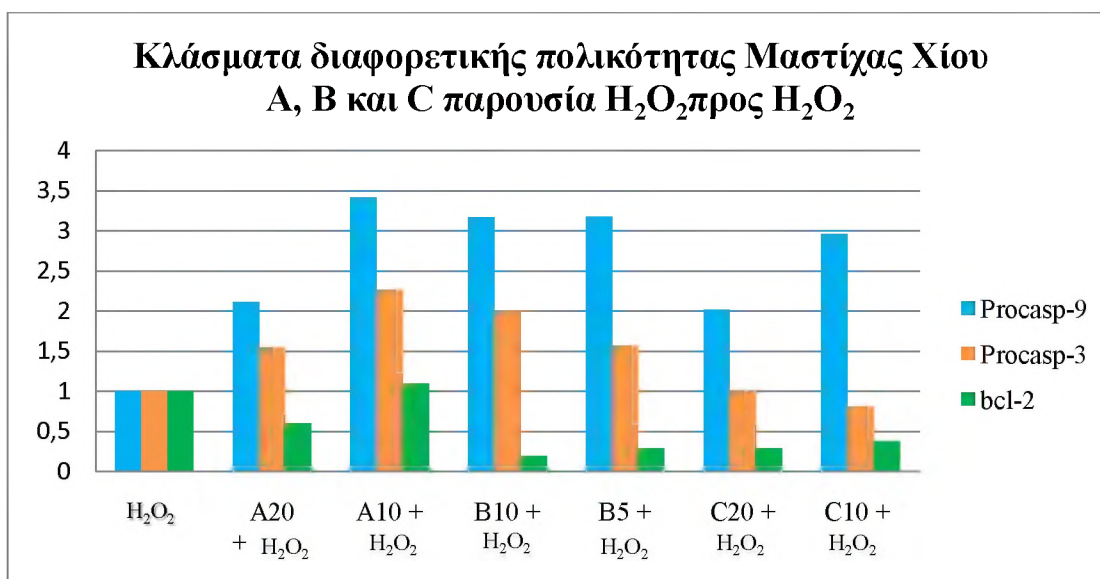
Αναφορικά με τις συνδυαστικές συνθήκες, στην συνθήκη συγκέντρωσης 10μg/ml του κλάσματος A με ταυτόχρονη παρουσία H_2O_2 , η προκασπάση-3 και η προκασπάση-9 αυξάνονται κατά 1.5 φορά και 70%, συγκριτικά με την συνθήκη αναφοράς control, ενώ η Bcl-2 παραμένει σχετικά σταθερό με την συνθήκη αναφοράς. Ομοίως και στη συνθήκη συγκέντρωσης 20μg/ml του A παρουσία H_2O_2 αναδεικνύεται η προστατευτική

δράση του κλάσματος A, παρότι σε μικρότερο βαθμό. Οι συνδυασμοί H₂O₂ και των κλασμάτων B και C αυξάνουν τα ποσοστά των προκασπασών-9 και -3, μέχρι και 1.5 φορές, εκτός από τη συνθήκη συγκέντρωσης 20μg/ml C παρουσία H₂O₂, όπου τα επίπεδα των προκασπασών πλησιάζουν αυτά του control. Παρατηρούμε άρα πως λιγότερο αποτελεσματική, φαίνεται η συγκέντρωση 20μg/ml του κλάσματος C, όμως η μεγαλύτερη μείωση της Bcl-2 απαντάται στο κλάσμα B. Αυτό μας δείχνει πως μπορούν και αυτά να προσδίδουν ανθεκτικότητα στα κύτταρα SH-SY5Y στην επαγωγή απόπτωσης παρουσία H₂O₂, μιας και δεν μειώνουν τα επίπεδα των ανενεργών προκασπασών-9 και -3, όχι όμως σε τόσο ικανοποιητικό ποσοστό όσο η συγκέντρωση 10μg/ml του A παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου H₂O₂.



Σχήμα 4 : Διερεύνηση των πρωτεϊνικών επιπέδων Bcl-2, procasp-9 και procasp-3 σε κύτταρα SH-SY5Y που έχουν υποστεί οξειδωτικό στρες παρουσία και απουσία των κλασμάτων Μαστίγας Χίου, σε σύγκριση με την συνθήκη αναφοράς. Κυτταρικά εκχυλίσματα SH-SY5Y ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% SDS πηκτή πολυακρυλαμίδιου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,22 μM με Western Blot και μελετήθηκαν ως προς τις μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων: Προκασπάση-9, Προκασπάση-3, Bcl-2. Ως μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο λόγος μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπό μελέτη μορίων ως προς τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Στο πάνω μέρος του διαγράμματος φαίνονται τα αποτελέσματα της Western Blot, με τις ζώνες των πρωτεϊνών, μετά και την κανονικοποίηση ως προς την β-ακτίνη (Προκασπάση-9 47 kDa, Προκασπάση-3 35 kDa, Bcl-2 28 kDa, β-ακτίνη 42 kDa), και στο κάτω μέρος φαίνονται αναλυτικά σε διάγραμμα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης σε όλες τις συνθήκες προς τη συνθήκη control.

Για την καλύτερη απεικόνιση των αποτελεσμάτων που φαίνονται στο Σχήμα 4, αλλά και για την διεξοδικότερη ανάλυση του τρόπου δράσης των κλασμάτων, ακολούθησε και δεύτερη κανονικοποίηση μετά την κανονικοποίηση προς την συνθήκη αναφοράς. Η δεύτερη κανονικοποίηση έγινε ως προς την συνθήκη κατεργασίας με υπεροξείδιο του υδρογόνου H₂O₂, στην οποία και πάλι μελετήσαμε τα αποτελέσματα της επίδρασης των κλασμάτων στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων Bcl-2, προκασπάση-9 και προκασπάση-3. Ως προς την συνθήκη του H₂O₂, συγκρίναμε μόνο τις συνθήκες των κλασμάτων παρουσία του H₂O₂. Συγκριτικά με το υπεροξείδιο του υδρογόνου H₂O₂, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5, τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται να επιβεβαιώνονται, καθώς στην κάθε συνδυαστική συνθήκη συγκέντρωσης των κλασμάτων Β και C, τα επίπεδα έκφρασης της προκασπάσης-9 είναι αυξημένα, ακόμα και μέχρι 1.5 φορά σε σχέση με την συνθήκη προσθήκης του H₂O₂. Ταυτόχρονα αυξημένα είναι και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάση-3, η οποία στις συνθήκες του κλάσματος Β απαντάται και στα διπλάσια επίπεδα, ενώ στις αντίστοιχες του C δεν παρουσιάζει κάποια μεταβολή σε σχέση με το control.



Σχήμα 5 : Διερεύνηση των πρωτεϊνικών επιπέδων Bcl-2, procasp-9 και procasp-3 σε κύτταρα SH-SY5Y που επωάστηκαν με τα κλάσματα Α, Β, C παρουσία H₂O₂, συγκριτικά με την συνθήκη επαγωγής οξειδωτικού στρες H₂O₂. Το διάγραμμα αντιστοιχεί στην

ανοσοαποτίπωση κατά Western στο Σχήμα 4 με συγκεντρώσεις 20μg/ml, 10μg/ml, 10μg/ml, 5μg/ml, 20μg/ml και 10μg/ml κλασμάτων A, B, C αντίστοιχα και H₂O₂ 700μM. Όλες οι συνδυαστικές συνθήκες των κλασμάτων έχουν κανονικοποιηθεί και ως προς το H₂O₂.

Από την άλλη η Bcl-2 μειώνεται σε όλες αυτές τις συνθήκες, ειδικά στις συνθήκες του κλάσματος B που η μείωση είναι της τάξης του 80% - 90%, δείχνοντας πως η απόπτωση που συμβαίνει ακολουθεί το ενδογενές μιτοχονδριακό μονοπάτι, εφόσον υπάρχει μείωση της αντι-αποπτωτικής Bcl-2. Η συγκέντρωση 20μg/ml κλάσματος A παρουσία H₂O₂ φαίνεται να λειτουργεί, καθώς οι προκασπάσες-9 και -3 αυξήθηκαν σε πρωτεϊνικά επίπεδα κατά 2 και 1.5 φορές αντίστοιχα, ενώ πιο αυξημένη είναι και η Bcl-2, σε σχέση με τα άλλα 2 κλάσματα, με μια μικρή μείωση της τάξης του 40%. Όμως η πιο αποτελεσματική και προφανώς λιγότερο τοξική είναι η συγκέντρωση 10μg/ml του κλάσματος A παρουσία H₂O₂ γιατί φαίνεται να είναι αυτή που προστατεύει τα κύτταρα πιο αποτελεσματικά, και αντιστέκεται στην αποπτωτική δράση του H₂O₂. Συγκεκριμένα υπάρχει αύξηση στις προκασπάσες-9 και -3 2.5 και 3 φορές πάνω, ενώ αυξημένο είναι και η Bcl-2 κατά 10%. Έτσι επιβεβαιώνεται η παρατήρηση πως αντιστέκεται στην αποπτωτική δράση του H₂O₂, όντας μη τοξικό προς τα κύτταρα και επιβεβαιώνοντας πως όντως τα πιο προστατευτικά και αποτελεσματικά κλάσματα απαντώνται στις ενώσεις των A και C.

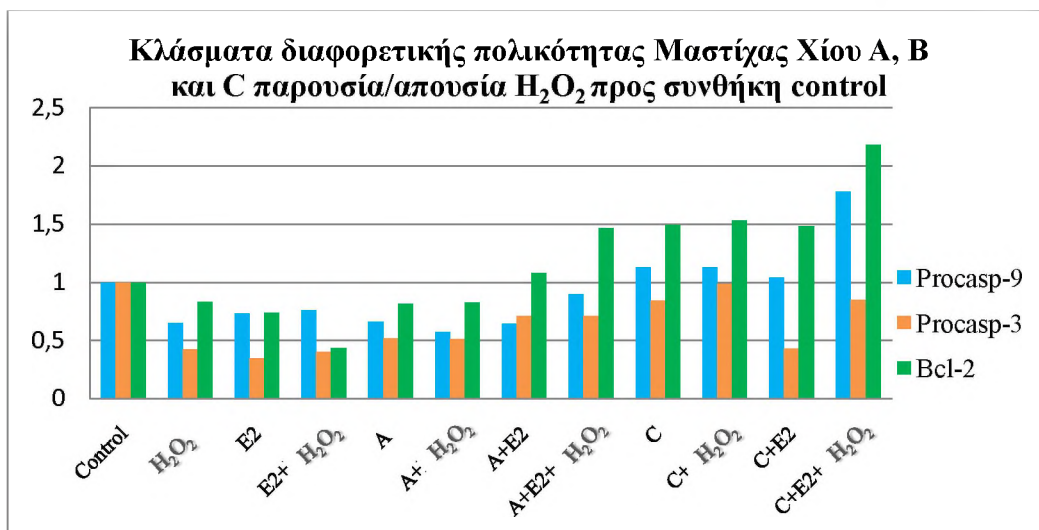
3.4. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ Bcl-2, ΠΡΟΚΑΣΠΑΣΗ-9 ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΣΠΑΣΗ-3 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ SH-SY5Y ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΟΡΜΟΝΗΣ E2.

Ακολουθώντας με στόχο να ελεγχθεί η επίδραση των κλασμάτων της Μαστίχας Χίου, τόσο παρουσία του H₂O₂, όσο και ορμονών, συγκεκριμένα της οιστραδιόλης E2. Έτσι μπορούμε να διερευνήσουμε επικουρική δράση της ορμόνης αυτής, άρα και την πιθανή εμπλοκή συστατικών της Μαστίχας Χίου στο σηματοδοτικό μονοπάτι των υποδοχέων οιστρογόνων, ως προς την ρύθμιση αποπτωτικών μηχανισμών. Από τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία αφαιρέθηκε το κλάσμα B, το οποίο με βάση τις προηγούμενες αναλύσεις, φάνηκε να είναι το λιγότερο αποτελεσματικό στην προστασία των κυττάρων. Η αντίστοιχη ανάλυση Western Blot και το διάγραμμα φαίνονται στο Σχήμα 6.

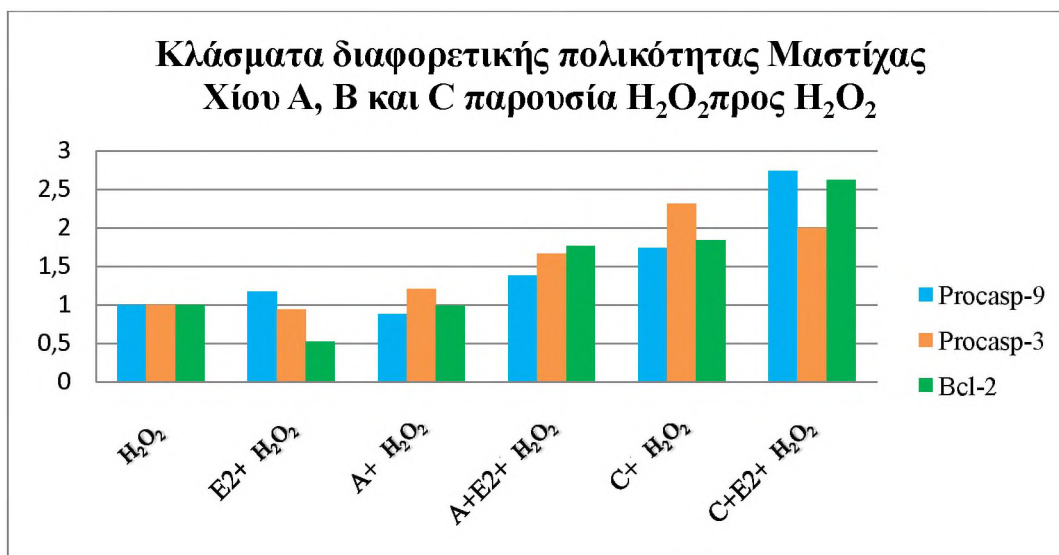
Έτσι, στην προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου H₂O₂, βλέπουμε τη φυσιολογική και αναμενόμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των Bcl-2, προκασπάση-9 και προκασπάση-3 κατά 20%, 35% και 60% αντίστοιχα, λόγω του οξειδωτικού στρες και του κυτταρικού θανάτου είτε μέσω του εξωγενούς ή ενδογενούς μονοπατιού. Το ίδιο παρατηρείται και στη συνθήκη συνεπώασης της ορμόνης E2 και του H₂O₂, όπου τα χαμηλά πρωτεϊνικά επίπεδα των προκασπασών και της Bcl-2 υφίστανται εξαιτίας του κυτταρικού θανάτου, αλλά φαίνεται πως υπάρχει αντίσταση στην περαιτέρω μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων, ιδίως της προκασπάσης-9, εξαιτίας της παρουσίας της ορμόνης. Μεταξύ των συνθηκών συγκέντρωσης 20μg/ml των

κλασμάτων Α και C απουσία H₂O₂ προς την συνθήκη αναφοράς, πιθανές προστατευτικές δράσεις παρουσιάζει η συγκέντρωση 20μg/ml του κλάσματος C, εφόσον η προκασπάση-9 και η Bcl-2 σημειώνουν αύξηση κατά 10% και 50%, ενώ μόνο η προκασπάση-3 μειώνεται ελάχιστα κατά 20% σε σχέση με την συνθήκη αναφοράς. Φαίνεται πως η συγκέντρωση 20μg/ml του κλάσματος Α οδηγεί σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των Bcl-2, προκασπάση-9 και -3 κατά 20%, 40% και 50% αντίστοιχα. Με την προσθήκη της ορμόνης E2 μαζί με συγκέντρωση 20μg/ml των κλασμάτων Α και C, τα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα στην συνθήκη του κλάσματος Α αναιρούνται και φαίνονται κάπως αυξημένα, με τη Bcl-2 και την προκασπάση-9 να εμφανίζουν αυτές τις αλλαγές. Παράλληλα οι συνεπώσεις κλασμάτων Α και C παρουσία H₂O₂ μόνο, δείχνουν πως το κλάσμα Α αδυνατεί να αντισταθεί στη δράση του H₂O₂, ενώ στο κλάσμα C παρουσία H₂O₂ αυξάνονται μόνο τα πρωτεϊνικά επίπεδα των προκασπασών. Οι συνεπώσεις κλασμάτων Α και C με ορμόνη E2 και H₂O₂ επιδρούν, όπως φαίνεται, στα επίπεδα της Bcl-2 και της προκασπάσης-9 με ποσοστά αύξησης 40% και διπλάσια επίπεδα αντίστοιχα, σε σχέση με το control. Όμως οι προκασπάσες-9 και -3 δεν φαίνεται να παρουσιάζουν κάποια αξιόλογη αλλαγή.

47 kDa ==> Procasp-9	[Western Blot Image]												
42 kDa ==> β-actin	[Western Blot Image]												
Ratio	1	0.65	0.7	0.7	0.6	0.57	0.65	0.9	1.1	1.3	1.1	1.78	
35 kDa ==> Procasp-3	[Western Blot Image]												
42 kDa ==> β-actin	[Western Blot Image]												
Ratio	1	0.4	0.3	0.4	0.5	0.5	0.7	0.7	0.85	0.98	0.4	0.85	
28 kDa ==> Bcl-2	[Western Blot Image]												
42 kDa ==> β-actin	[Western Blot Image]												
Ratio	1	0.8	0.7	0.43	0.8	0.8	1	1.4	1.5	1.5	1.48	2.15	
Control	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H ₂ O ₂	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
E2	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	
A 20μg/ml	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	
C 20μg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	



Σχήμα 6 : Διερεύνηση των πρωτεϊνικών επιπέδων Bcl-2, procasp-9 και procasp-3 σε κύτταρα SH-SY5Y που έχουν υποστεί οξειδωτικό στρες παρουσία και απουσία των κλασμάτων Μαστίγας Χίου, σε σύγκριση με την συνθήκη αναφοράς. Κυτταρικά εκχυλίσματα SH-SY5Y ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% SDS πηκτή πολυακρυλαμίδιου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης 0,22 μΜ με Western Blot και μελετήθηκαν ως προς τις μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων: Προκασπάση-9, Προκασπάση-3, Bcl-2. Ως μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Στο πάνω μέρος του διαγράμματος φαίνονται τα αποτελέσματα της Western Blot, με τις ζώνες των πρωτεϊνών, μετά και την κανονικοποίηση ως προς την β-ακτίνη (Προκασπάση-9 47 kDa, Προκασπάση-3 35 kDa, Bcl-2 28 kDa, β-ακτίνη 42 kDa) για όλες τις συγκεντρώσεις και των τριών κλασμάτων αλλά και για την ορμόνη οιστραδιόλη E2, και στο κάτω μέρος φαίνονται αναλυτικά σε διάγραμμα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης σε όλες τις συνθήκες προς τη συνθήκη control με τα SH-SY5Y. Η συγκέντρωση της οιστραδιόλης είναι 10^{-9} M.



Σχήμα 7 : Διερεύνηση των πρωτεϊνικών επιπέδων Bcl-2, procasp-9 και procasp-3 σε κύτταρα SH-SY5Y που επώαστηκαν με τα κλάσματα A και C παρουσία H₂O₂ και E2, συγκριτικά με την συνθήκη επαγωγής οξειδωτικού στρες H₂O₂. Το διάγραμμα αντιστοιχεί στην ανοσοαποτύπωση κατά Western στο Σχήμα 6 με συγκέντρωση κλασμάτων 20μg/ml του A και C, με H₂O₂ 700μΜ και E2 10^{-9} M. Όλες οι συνδυαστικές συνθήκες των κλασμάτων έχουν κανονικοποιηθεί ως προς το H₂O₂.

Για την καλύτερη απεικόνιση των αποτελεσμάτων που φαίνονται στο Σχήμα 6, αλλά και για την διεξοδικότερη ανάλυση του τρόπου δράσης των κλασμάτων, ακολούθησε και δεύτερη κανονικοποίηση μετά την κανονικοποίηση προς την συνθήκη αναφοράς. Η δεύτερη κανονικοποίηση έγινε ως προς την συνθήκη κατεργασίας με υπεροξείδιο του υδρογόνου H₂O₂, στην οποία και πάλι μελετήσαμε τα αποτελέσματα της επίδρασης των κλασμάτων στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων Bcl-2, προκασπάση-9 και προκασπάση-3. Ως προς την συνθήκη του H₂O₂, συγκρίναμε μόνο τις συνθήκες των κλασμάτων παρουσία του H₂O₂. Έτσι προς το υπεροξείδιο του υδρογόνου H₂O₂, αυξάνονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3 στη συνθήκη συγκέντρωσης 20μg/ml κλάσματος A παρουσία H₂O₂, σε ποσοστό 20%, με τη Bcl-2 και την προκασπάση-9 να μένουν σταθερά. Με την συνεπάωση κλάσματος A παρουσία τόσο E2 όσο και H₂O₂ φαίνεται πως αυτή η αύξηση ενισχύεται, καθώς οι προκασπάσες-9 και -3 αυξάνονται σε πρωτεϊνικά επίπεδα κατά περίπου 40% και 65% και τη Bcl-2

κατά 76%. Ταυτόχρονα το κλάσμα C παρουσία H_2O_2 , αντιστέκεται στην απόπτωση του H_2O_2 και δρα προστατευτικά για τα κύτταρα, καθώς προκασπάση-3, Bcl-2 και προκασπάση-9 σημειώνουν αύξηση περισσότερο από 1.5 φορές. Αυτή η προστατευτική δράση φαίνεται να ενισχύεται ακόμα περισσότερο, όπως και πριν, στην περίπτωση της συνεπώασης κλάσματος C παρουσία E2 και H_2O_2 , με τη Bcl-2 να φέρει αύξηση πρωτεϊνικών επιπέδων έως και 2.5 φορές και οι προκασπάσες-9 και -3 αντίστοιχη αύξηση κατά 2.5 και 2 φορές πάνω αντίστοιχα.

Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε με σιγουριά πως τόσο το κλάσμα A όσο και το κλάσμα C δρουν προστατευτικά ενάντια της απόπτωσης στα κύτταρα, κάτι το οποίο ενισχύεται ακόμα περισσότερο με την παρουσία και επικουρική δράση της ορμόνης οιστραδιόλη E2, ανταποκρινόμενα στον αρχικό σκοπό των πειραμάτων ως φυτικά κλάσματα με μόρια-ενώσεις με δράσεις παρόμοιες με αυτές των γλυκοκορτικοειδών.

3.5. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ SH-SY5Y ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Συνδυαστικά με τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, έπρεπε να εξεταστεί και να οπτικοποιηθεί σε πραγματικό χρόνο η παραγωγή ελεύθερων ριζών, η οποία οδηγεί σε απόπτωση των SH-SY5Y, και να μελετηθεί περαιτέρω η πιθανή προστατευτική δράση των διαφορετικής πολικότητας κλασμάτων της Μαστίχας Χίου. έχουν την ικανότητα να αντισταθούν στον κυτταρικό αυτό θάνατο. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, έγινε παρατήρηση σε ζωντανά κύτταρα, σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. Για την οπτικοποίηση των ελεύθερων ριζών, έγινε χρήση της χρωστικής DCF-DA, η οποία αναγνωρίζει και χρωματίζει με έντονο πράσινο τα σημεία στα οποία υπάρχουν ελεύθερες ρίζες. Η πειραματική διαδικασία που ακολούθησε είναι: (1) Ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός κυττάρων (σύνολο 100.000 κύτταρα) σε ατομικά πιατάκια καλλιέργειας διαστάσεων 60mm x 15mm, σύμφωνα με τις συνθήκες που επιλέξαμε (control, H_2O_2 700μM, A 10μg/ml, B 5μg/ml, C 10μg/ml παρουσία και απουσία H_2O_2), (2) Προσθήκη κλασμάτων A,B,C στα 6 από τα 8 πιατάκια καλλιέργειας για 24 ώρες επώαση, (3) Προσθήκη H_2O_2 συγκέντρωσης 700μM 6 ώρες πριν την λήξη της επώασης και ανανέωση των κλασμάτων ειδικά στις συνδυαστικές συνθήκες, (4) Αφαίρεση ουσιών, προσθήκη χρωστικών DCF-DA (τελική συγκέντρωση/αραίωση 1:1000), CMX MitoTracker (τελική συγκέντρωση 200nM) και Hoechst (αραίωση 1:1000), και 30 λεπτά επώαση, (5) Αφαίρεση χρωστικών, πλύσεις με θρεπτικό, γρήγορη παρατήρηση στο μικροσκόπιο, και συλλογή φωτογραφιών

Έτσι συλλέξαμε τις παρακάτω φωτογραφίες (Σχήμα 8). Στο Σχήμα 8 παρατηρούμε από 4 στήλες, που από αριστερά προς τα δεξιά απεικονίζουν τα κύτταρα SH-SY5Y σημασμένα με τις χρωστικές, όπως υποδεικνύεται. Στην πρώτη στήλη φαίνεται η χρωστική Hoechst, που σημαίνει τους πυρήνες με μπλε χρώμα και στη δεύτερη στήλη η CMX, που σημαίνει με κόκκινο τα ενεργά μιτοχόνδρια. Στην τρίτη στήλη φαίνεται η DCF, που με πράσινο χρώμα μαρτυρά την ύπαρξη ελεύθερων ριζών και τέλος στην τελευταία στήλη φαίνονται οι ολοκληρωμένες merged εικόνες με όλες

τις χρωστικές στα κύτταρα. Στο σχήμα 9, φαίνονται τα ευρήματα των εικόνων του Σχήματος 8 συγκεντρωτικά, για καλύτερη μελέτη.

Συνεπώς παρατηρούμε πως, πρώτα από όλα, όπου έχουμε τις συνθήκες του control και των κλασμάτων A, B και C απουσία του H_2O_2 , τα επίπεδα της DCF, άρα και των ελεύθερων ριζών είναι ελάχιστα, με τις τιμές του λόγου στα κλάσματα να πλησιάζουν την αντίστοιχη τιμή control. Την καλύτερη απόδοση εμφανίζει η συγκέντρωση 5μg/ml του κλάσματος B, σε σχέση με το control, εφόσον ο λόγος πράσινου της DCF προς τον αριθμό των κυττάρων είναι σχεδόν 1,2 και παρουσιάζει μικρή μεταβολή, ενώ η συγκέντρωση 10μg/ml των κλασμάτων A και C αυξάνουν αυτόν το λόγο κατά σχεδόν 1,3 και 1,67 αντίστοιχα. Πιθανόν αυτή η αύξηση να οφείλεται στην ελάχιστη κυτταροτοξική δράση που παρουσιάζουν τα κλάσματα αυτά, η οποία οδηγεί σε μια μικρή μείωση της έντασης του κόκκινου της CMX. Συγκρίνοντας και το διάγραμμα των χρωστικών DCF/CMX, καταλαβαίνουμε πως πιο αποτελεσματικό και προστατευτικό φαίνεται το κλάσμα A (λόγος 0,8), λόγω πάλι της στατιστικά σημαντικής αντίστασης στην απόπτωση στην συνθήκη A παρουσία H_2O_2 , με τα κλάσματα B και C να μπορούν να επάγουν την προστασία σε μικρότερο βαθμό, πιθανόν εξαιτίας της προηγούμενης μικρής κυτταροτοξικότητας που εμφανίζουν σε αυτές τις συγκεντρώσεις.

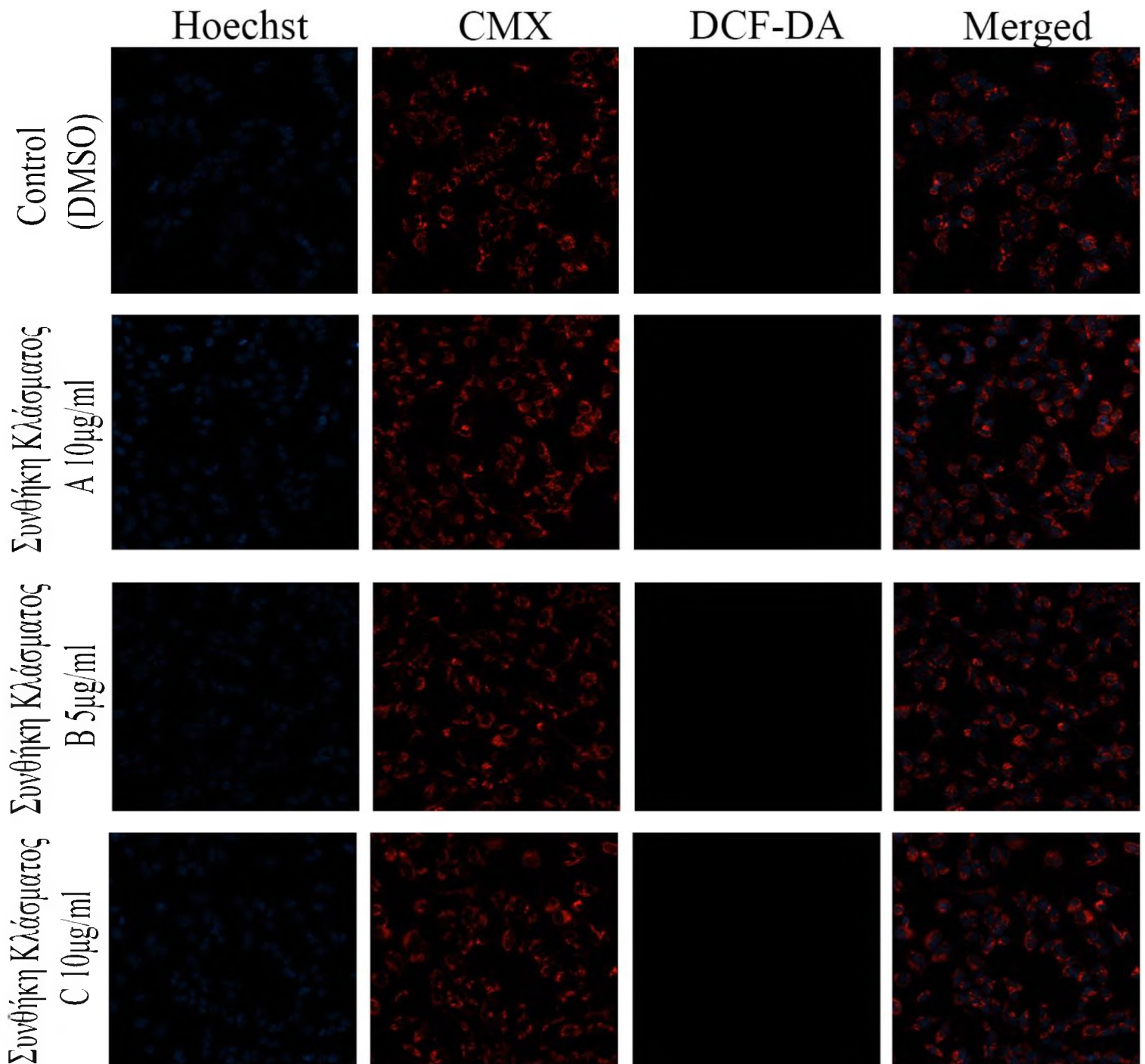
Επίσης παρατηρούμε πως στις 4 πρώτες συνθήκες του Σχήματος 8, τα κύτταρα διατηρούν τη δομή τους, με τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα να έχουν τη φυσιολογική διαμόρφωσή τους, ενώ δεν παρουσιάζουν τις μορφολογικές ιδιότητες των κυττάρων προς απόπτωση. Παράλληλα φαίνονται και παραπάνω σε αριθμό συγκριτικά με τις αντίστοιχες συνθήκες του Σχήματος 9, ακριβώς λόγω της προστασίας τους από τα κλάσματα από τον κυτταρικό θάνατο.

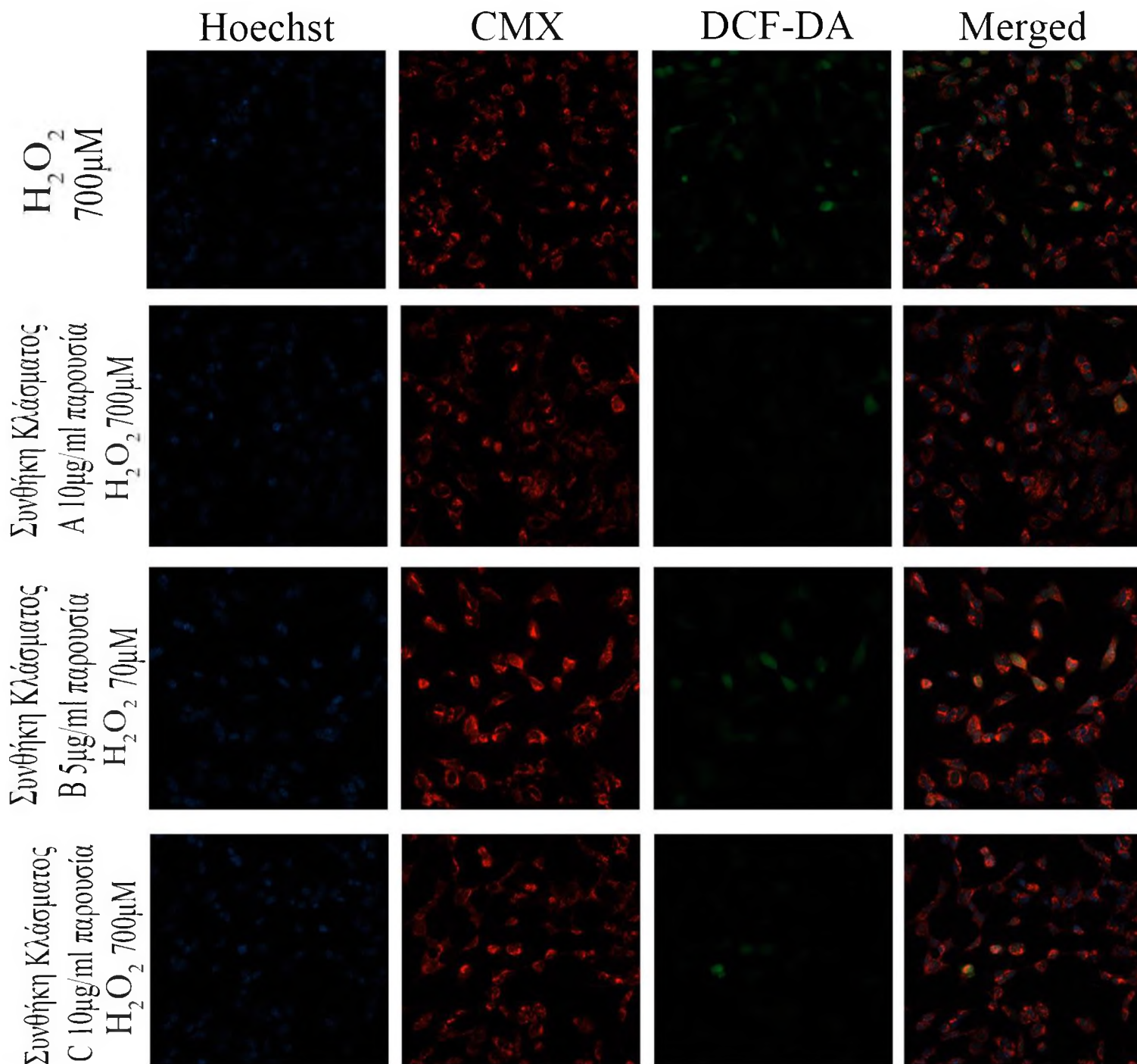
Προχωρώντας έχουμε τις συνθήκες του υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 και των κλασμάτων συνδυαστικά με το H_2O_2 . Πρώτα από όλα παρατηρούμε στην τρίτη στήλη, την παρουσία του πράσινου της DCF, άρα και την ύπαρξη οξειδωτικού στρες λόγω του H_2O_2 , με το τελευταίο να έχει τον μεγαλύτερο λόγο DCF/Κύτταρα, όντας 3,5 φορές μεγαλύτερος από τον λόγο του control. Ακόμα στην συνθήκη H_2O_2 ο αριθμός των κυττάρων παρουσιάζεται μειωμένος, λόγω της εκκίνησης του κυτταρικού θανάτου, μέσω απόπτωσης, ενώ και η μορφολογία των κυττάρων έχει διαταραχθεί με τους πυρήνες να φαίνονται πιο διαλυμένοι, ενώ και το σχήμα των κυττάρων δεν διαφέρει από τα φυσιολογικά νευρικά κύτταρα. Στις φωτογραφίες παρουσία των κλασμάτων και συνεπώασης με H_2O_2 , φαίνεται ξεκάθαρα η αντίσταση των κλασμάτων στην απόπτωση και άρα η προστασία των κυττάρων.

Συγκεκριμένα οι λόγοι των κλασμάτων παρουσία του H_2O_2 , βρίσκονται ανάμεσα στις τιμές των αντίστοιχων λόγων των συνθηκών των κλασμάτων και του H_2O_2 ξεχωριστά, δείχνοντας πως σημειώνεται μεν κυτταρικός θάνατος μέσω απόπτωσης, αλλά σημειώνεται αντίσταση στην επαγόμενη απόπτωση που παρατηρείται από την δράση του H_2O_2 . Την καλύτερη απόδοση εμφανίζει η συγκέντρωση 10μg/ml του κλάσματος A παρουσία του H_2O_2 , σε σχέση με το control, με λόγο κοντά στο 2,8, με δεύτερο καλύτερο να φαίνεται η συνθήκη με 10μg/ml του C παρουσία του H_2O_2 , με

λόγο κοντά στο 3,3, το οποίο όμως δεν εμφανίζει μεγάλη διαφορά με την κυτταροτοξική επίδραση του κλάσματος Β παρουσία H_2O_2 με λόγο, που φαίνεται να μην προστατεύει τόσο αποτελεσματικά.

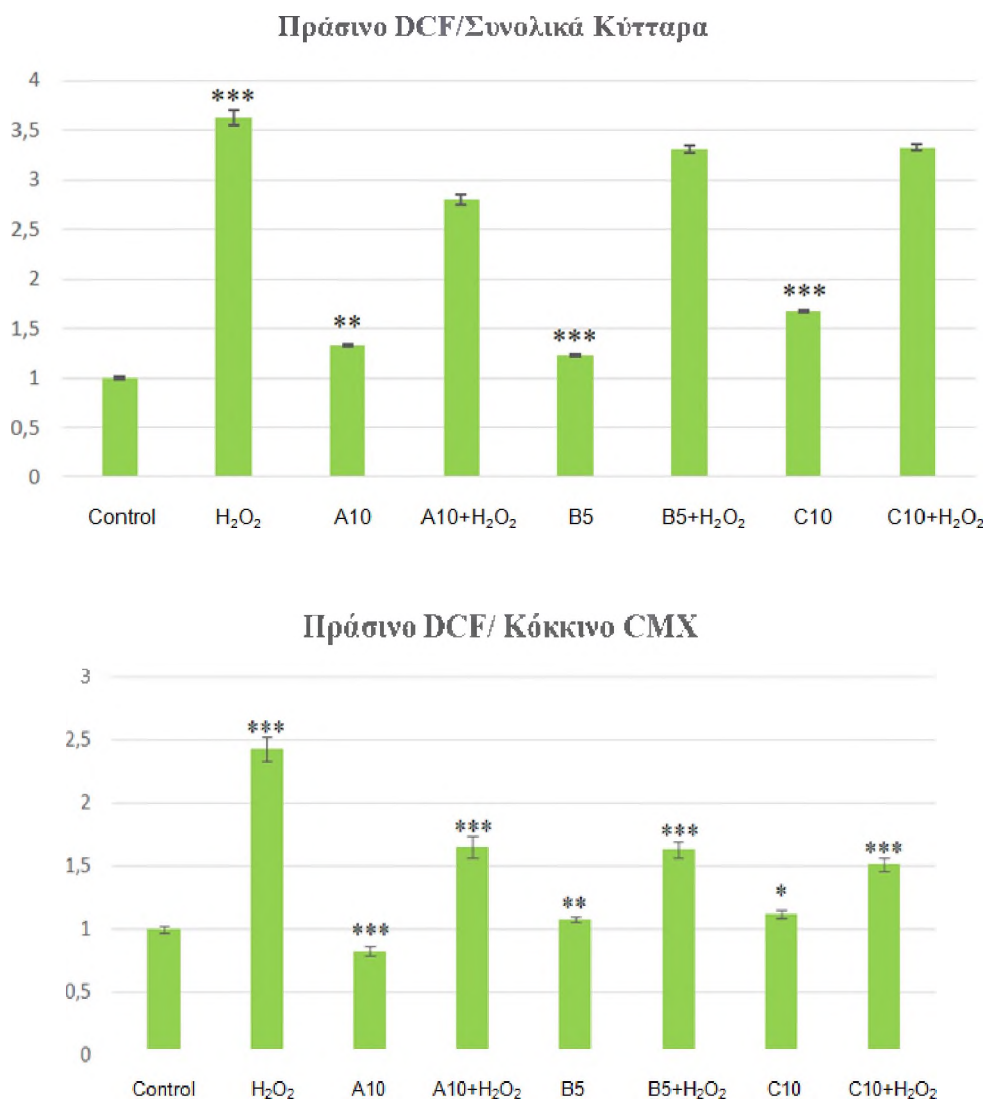
Άρα συνολικά συμπεραίνουμε πως τα κλάσματα Μαστίχας Χίου διαφορετικής πολικότητας Α, Β και C μπορούν να επάγουν έως ένα βαθμό μια νευροπροστατευτική δράση σε ζωντανά κύτταρα, όταν αυτά εκτεθούν σε παράγοντες οξειδωτικού στρες, πιθανότατα λόγω των ενώσεων που περιέχονται σε αυτά τα εκχυλίσματα. Ειδικότερα πιο προστατευτικά φάνηκαν τα εκχυλίσματα του πολικού και μη-πολικού κλάσματος, τόσο μόνα τους όσο και παρουσία H_2O_2 , επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση της εργασίας.





Σχήμα 8 : Αντιπροσωπευτικές εικόνες από το συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού για τις συνθήκες control, 10 μ g/ml κλάσματος A, 5 μ g/ml B και 10 μ g/ml C για επώαση 24 ωρών και για τις συνθήκες υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 , επώασης 6 ωρών σε συγκέντρωση 700 μ M και για τις συνθήκες 10 μ g/ml κλάσματος A, 5 μ g/ml B και 10 μ g/ml C παρουσία του H_2O_2 Επίστρωση 100.000 κυττάρων SH-SY5Y στα ατομικά πιατάκια καλλιέργειας των συνθηκών. Μετά το πέρας επώασης με τις ουσίες και το H_2O_2 , επώαστηκαν με χρωστικές Hoechst, CMX, και DCF. Από αριστερά προς τα δεξιά, στην πρώτη στήλη απεικονίζεται η χρώση των κυττάρων με Hoechst, όπου φαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων, στη δεύτερη στήλη φαίνονται τα μιτοχόνδρια των κυττάρων με χρώση με CMX, στην τρίτη στήλη η απουσία ελεύθερων ριζών για τις πρώτες 4 συνθήκες και η παρουσία ελεύθερων ριζών για τις συνθήκες

παρουσία H₂O₂, και στην τέταρτη στήλη η συνολική εικόνα (merged) με ολόκληρα τα κύτταρα χρωματισμένα ταυτόχρονα, και με τις 3 χρωστικές .



Σχήμα 9 : Απεικόνιση της σχετικής έντασης της χρωστικής DCF προς τον πληθυσμό των SH-SY5Y στις συνθήκες του πειράματος (Διάγραμμα πρώτο) και του λόγου της πράσινης χρωστικής DCF προς την κόκκινη χρωστική CMX στις συνθήκες του πειράματος (Διάγραμμα δεύτερο). Μετράμε τον συνολικό αριθμό κυττάρων και την ένταση του πράσινου. Κανονικοποιούμε την ένταση του χρώματος της DCF προς τον αντίστοιχο αριθμό των κυττάρων. Έπειτα κανονικοποιούμε τις τιμές που προκύπτουν προς την συνθήκη αναφοράς, ώστε να προκύψει η σχετική παραγωγή της χρωστικής DCF σε κάθε συνθήκη. Επίσης μετράμε την ένταση και του κόκκινου χρώματος σε κάθε συνθήκη, και βρίσκουμε τους λόγους του πράσινου/κόκκινο σε κάθε συνθήκη και κανονικοποιούμε τις τιμές που προκύπτουν προς την συνθήκη αναφοράς, ώστε να προκύψει ο σχετικός λόγος της χρωστικής DCF προς την CMX σε κάθε συνθήκη.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Μαστίχα Χίου (ρητίνη από το φυτό *Pistacia Lentiscus* Var. Chia), αλλά και τα κλάσματα αυτής, αποτελούν πολύπλοκα μείγματα διαφορετικών σύνθετων ενώσεων, κυρίως τριτερπενοειδών που είναι ικανά να δρουν ως δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά. Παράλληλα παρουσιάζουν δομικές, άρα πιθανότατα και λειτουργικές ομοιότητες με φυσιολογικά γλυκοκορτικοειδή του οργανισμού (GCs), ρυθμίζοντας ακολούθως και τη σηματοδότηση του GR. Αυτό τους δίνει τη δυνατότητα να λειτουργήσουν ως εκλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Αυτή η δυνατότητα των τριτερπενοειδών, φαίνεται να είναι αυτή που χαρίζει στην Μαστίχα Χίου τη μεγάλη ποικιλία βιολογικών δράσεων. Η σύσταση των κλασμάτων, άρα ακολούθως και η ποσοστιαία περιεκτικότητά τους σε αυτές τις ενώσεις εξαρτάται από την εκάστοτε επεξεργασία της Μαστίχας Χίου, με το κάθε κλάσμα να φέρει περισσότερο ή λιγότερο πολικές ενώσεις.

Ως εκ τούτου, έγινε προσπάθεια από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας ώστε να διερευνηθεί η πιθανή δράση των κλασμάτων της Μαστίχας Χίου, στην προστασία έναντι των αποπτωτικών μηχανισμών που επάγονται από τον παράγοντα οξειδωτικού στρες H_2O_2 . Για την επίτευξη αυτού του σκοπού χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα της σειράς SH-SY5Y, που είναι ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος. Προηγήθηκε η πειραματική διαδικασία εκτίμησης της κυτταρικής βιωσιμότητας μέσω MTT των SH-SY5Y, με προσθήκη των κλασμάτων, χαρακτηρισμένα ως A, B, C σε εύρος συγκεντρώσεων, από τον υποψήφιο διδάκτορα Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο προκειμένου να εκτιμηθεί η πιθανή νευροπροστατευτική δράση των συγκεκριμένων κλασμάτων Μαστίχας Χίου στη κυτταρική σειρά SH-SY5Y. Τα τρία κλάσματα A, B, και C που χρησιμοποιήσαμε, διαφοροποιούνται ως προς την πολικότητά τους, δηλαδή μη πολικό, ημι-πολικό και πολικό αντίστοιχα και μπορούν να επάγουν την απόπτωση μέσω διαμεσολάβησης του μιτοχονδριακού μονοπατιού. Κατά τη διάρκεια της μελέτης που έλαβε χώρα στα πλαίσια εκπόνησης της παρούσας πτυχιακής εργασίας, επαναλήφθηκε η διαδικασία του MTT, με συγκεντρώσεις κλασμάτων A 20μg/ml, A 10μg/ml, B 10μg/ml, B 5μg/ml, C 20μg/ml και C 10μg/ml παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα H_2O_2 συγκέντρωσης 700μM και επώασης 6 ωρών, που είναι μια από τις κυριότερες ελεύθερες ρίζες, που προκαλούν κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα κλάσματα A, B και C της Μαστίχας Χίου φάνηκε να προκαλούν την προστατευτική δράση και να αντιστέκονται από την επαγωγή της απόπτωσης, προκαλούμενη από το H_2O_2 σε επώαση 6 ωρών στην τελική συγκέντρωση των 700μM, ενώ τα κλάσματα δεν προκαλούσαν κυτταροτοξικότητα, ειδικότερα στις συγκεντρώσεις 10μg/ml, 5μg/ml και 10μg/ml των κλασμάτων A, B, C αντίστοιχα. Σε δεύτερο στάδιο, αποφασίστηκε να διερευνηθεί η μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων που σχετίζονται με τη διαδικασία της απόπτωσης, όπως είναι οι πρωτεΐνες του αντι-αποπτωτικού μορίου Bcl-2, της προκασπάσης-9 (Procasp-9) του ενδογενούς

μονοπατιού απόπτωσης, αλλά και της προκασπάσης-3 (Procasp-3), που είναι ο κύριος τελεστής της απόπτωσης. Η μελέτη έγινε μέσω ανοσοαποτύπωσης Western Blot, με τα κλάσματα να απαντώνται σε συγκεντρώσεις 20μg/ml το καθένα, είτε παρουσία είτε απουσία H₂O₂. Φάνηκε πως κανένα από τα κλάσματα δεν είναι κυτταροτοξικό, με τα A και B να δείχνουν ξεκάθαρη αντίσταση στην απόπτωση, και τα επίπεδα της προκασπάσης-9 να αυξάνονται (άρα αποφυγή απόπτωσης).

Επόμενο βήμα ήταν η εκτίμηση της πιθανής αντι-αποπτωτικής δράσης των συγκεκριμένων κλασμάτων και με επιπλέον συνθήκες με τελικές συγκεντρώσεις 10μg/ml για τα κλάσματα A και C και 10μg/ml και 5μg/ml για το κλάσμα B. Η εκτίμηση της συγκεκριμένης υπόθεσης πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Οι συγκεντρώσεις για τα A και C ήταν ίδιες (20μg/ml και 10μg/ml) και του B μικρότερες (10μg/ml και 5μg/ml), και φάνηκε πως μπορούσαν και τα 3 κλάσματα να προστατεύσουν από την απόπτωση ως ένα βαθμό, με τις καλύτερες επιδόσεις να σημειώνονται από τα κλάσματα A και C, τα οποία αυξάνουν τις προκασπάσες-9 και -3. Συγκεκριμένα συμπεράναμε πως το ημι-πολικό κλάσμα B της Μαστίχας Χίου ήταν περισσότερο κυτταροτοξικό, σε σχέση με το μη πολικό A και πολικό C κλάσμα, και προκαλούσαν επαγωγή της απόπτωσης, με τρόπο ανεξάρτητο από τα μιτοχόνδρια, εφόσον μειωνόταν κυρίως τα επίπεδα του Bcl-2, αλλά όχι τόσο της προκασπάσης-9 και της προκασπάσης-3. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία των τριτερπενίων στο κλάσμα B, συγκεκριμένα της λουπεόλης, η οποία έχει δειχθεί ότι μειώνει την έκφραση των κυκλινών και κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs), γεγονός το οποίο ακινητοποιεί τον κυτταρικό κύκλο και καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ φαίνεται να προωθεί τη μιτοχονδριακά-εξαρτώμενη απόπτωση, μέσω αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της προ-αποπτωτικής Bax και μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της αντι-αποπτωτικής Bcl-2 (Liu et al, 2021).

Για αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση Western Blot, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα κλάσματα A (μη-πολικό) και C (πολικό), σε συγκεντρώσεις 20μg/ml, ενώ παράλληλα προστέθηκαν στο σχεδιασμό η ορμόνη οιστραδιόλη E2 και το υπεροξειδίο του υδρογόνου H₂O₂, προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή δράση των οιστρογόνων και των υποδοχέων των οιστρογόνων στην επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση των ανθρώπινων κυττάρων νευροβλαστώματος. Το συμπέρασμα ήταν πως τα κλάσματα, είτε παρουσία είτε απουσία του H₂O₂, και πάλι, παρουσιάζουν επαρκείς προστατευτικές δράσεις, και αποτρέπουν την απόπτωση των SH-SY5Y λόγω του υπεροξειδίου του υδρογόνου H₂O₂, μια δράση που ενισχύεται εμφανώς από την παρουσία της E2 στα δείγματα των A και C, καθώς αυξάνουν τα επίπεδα των αντι-αποπτωτικών μορίων που μελετήσαμε. Με βάση αυτά τα δεδομένα, προσδιορίστηκε και η ικανότητα των κλασμάτων να προστατεύουν τα κύτταρα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μικροσκοπίας φθορισμού, και τη μέθοδο του DCF-DA, με προσθήκη των χρωστικών CMX, DCF, και Hoechst. Η μελέτη έγινε σε ζωντανά κύτταρα. Από αυτή την τελευταία σειρά πειραμάτων επιβεβαιώθηκε πως όντως τα κλάσματα από τα

εκχυλίσματα Μαστίχας Χίου, και ειδικότερα τα κλάσματα Α (μη-πολικό) και C (πολικό), μπορούν να επάγουν σημαντική κυτταροπροστατευτική δράση στα ανθρώπινα νευρικά κύτταρα SH-SY5Y. Οι προστατευτικές τους δράσεις φάνηκαν τόσο στις συνθήκες με επώαση μόνο με κλάσματα, αλλά και με τη συνδυαστική επώαση, μέσω της κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων, αλλά και από την παρατήρηση της μορφολογίας και δομής των κυττάρων. Συνεπώς γίνεται να αποτρέψουν την εκτεταμένη εμφάνιση ελεύθερων ριζών, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου H_2O_2 , που δυνητικά μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, ακόμα και σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις.

Μέσα στους μελλοντικούς μας στόχους, είναι η επιπρόσθετη διερεύνηση των βιολογικών δράσεων και ο καλύτερος δυνατός προσδιορισμός των βέλτιστων συγκεντρώσεων των κλασμάτων, αλλά και ο χαρακτηρισμός των υπεύθυνων βιοενεργών συστατικών αυτών των κλασμάτων, που προωθούν τη νευροπροστατευτική προστασία στα κύτταρα SH-SY5Y. Σημαντική είναι και η διερεύνηση της ύπαρξης αντι-αποπτωτικής δράσης της Μαστίχας Χίου και σε άλλες ανθρώπινες σειρές νευρικών κυττάρων, ώστε να επαναληφθεί η διαδικασία και να επιβεβαιωθεί η καθολική νευροπροστατευτική της δράση. Αυτό θα βοηθήσει στην περεταίρω παραγωγή, και διεύρυνση των μεθόδων επεξεργασίας της, ώστε να καθίσταται ικανή η χορήγησή τους εποικουρικά με τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή για αύξηση της αποτελεσματικότητας των GCs και μείωση των παρενεργειών τους, αλλά ακόμα και η εισαγωγή της σε πληθώρα φαρμακευτικών σκευασμάτων και θεραπευτικών προγραμμάτων, επιτακτικών στην καταπολέμηση νοσημάτων και νευροεκφυλιστικών, αυτοάνοσων ασθενειών, ή και πολύπλοκων παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular & molecular immunology*, *18*(5), 1106–1121.
2. Boudreau, M. W., Peh, J., & Hergenrother, P. J. (2019). Procaspase-3 Overexpression in Cancer: A Paradoxical Observation with Therapeutic Potential. *ACS chemical biology*, *14*(11), 2335–2348
3. Chen, P., Li, B., & Ou-Yang, L. (2022). Role of estrogen receptors in health and disease. *Frontiers in endocrinology*, *13*, 839005.
4. Choli-Papadopoulou, T., Kottakis, F., Papadopoulos, G., & Pendas, S. (2011). Helicobacter pylori neutrophil activating protein as target for new drugs against H. pylori inflammation. *World journal of gastroenterology*, *17*(21), 2585–2591.
5. D'Arcy M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, *43*(6), 582–592.
6. Dimas, K. S., Pantazis, P., & Ramanujam, R. (2012). Review: Chios mastic gum: a plant-produced resin exhibiting numerous diverse pharmaceutical and biomedical properties. *In vivo (Athens, Greece)*, *26*(5), 777–785.
7. Edlich F. (2018). BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. *Biochemical and biophysical research communications*, *500*(1), 26–34
8. Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, *35*(4), 495–516.
9. Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *594*, 57–72.
10. Fleischer, A., Ghadiri, A., Dessauge, F., Duhamel, M., Rebollo, M. P., Alvarez-Franco, F., & Rebollo, A. (2006). Modulating apoptosis as a target for effective therapy. *Molecular Immunology*, *43*(8), 1065–1079.
11. Gangras, P., Gelfanova, V., Williams, G. D., Handelman, S. K., Smith, R. M., & Debets, M. F. (2022). Investigating SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Surfaceome as a Model for Neuronal-Targeted Novel Therapeutic Modalities. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(23), 15062.
12. Georgantopoulos, A., Vougioukas, A., Kalousi, F. D., Tsialtas, I., & Psarra, A.-M. G. (2023). Comparative Studies on the Anti-Inflammatory and Apoptotic Activities of Four Greek Essential Oils: Involvement in the Regulation of NF-κB and Steroid Receptor Signaling. *Life*, *13*(7), 1534.
13. Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(23), 12827.
14. He, M. L., Chen, W. W., Zhang, P. J., Jiang, A. L., Fan, W., Yuan, H. Q., Liu, W. W., & Zhang, J. Y. (2007). Gum mastic increases maspin expression in prostate cancer cells. *Acta pharmacologica Sinica*, *28*(4), 567–572.
15. Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y. Y., Mak, T. W., Zúñiga-Pflücker, J. C., Kroemer, G., & Penninger, J. M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, *410*(6828), 549–554.

16. Kaliora, A. C., Stathopoulou, M. G., Triantafyllidis, J. K., Dedoussis, G. V., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. *World journal of gastroenterology*, *13*(5), 748–753.
17. Kalousi, F. D., Pollastro, F., Karra, A. G., Tsialtas, I., Georgantopoulos, A., Salamone, S., & Psarra, A.-M. G. (2023). Regulation of Energy Metabolism and Anti-Inflammatory Activities of Mastiha Fractions from Pistacia lentiscus L. var. chia. *Foods*, *12*(7), 1390.
18. Kalousi, F. D., Pollastro, F., Christodoulou, E. C., Karra, A. G., Tsialtas, I., Georgantopoulos, A., Salamone, S., & Psarra, A.-M. G. (2022). Apoptotic, Anti-Inflammatory Activities and Interference with the Glucocorticoid Receptor Signaling of Fractions from Pistacia lentiscus L. var. chia Leaves. *Plants*, *11*(7), 934.
19. Kokkinopoulou, I., & Moutsatsou, P. (2021). Mitochondrial Glucocorticoid Receptors and Their Actions. *International journal of molecular sciences*, *22*(11), 6054.
20. Li, P., Dong, X. R., Zhang, B., Zhang, X. T., Liu, J. Z., Ma, D. S., & Ma, L. (2021). Molecular mechanism and therapeutic targeting of necrosis, apoptosis, pyroptosis, and autophagy in cardiovascular disease. *Chinese medical journal*, *134*(22), 2647–2655.
21. Liu, K., Zhang, X., Xie, L., Deng, M., Chen, H., Song, J., Long, J., Li, X., & Luo, J. (2021). Lupeol and its derivatives as anticancer and anti-inflammatory agents: Molecular mechanisms and therapeutic efficacy. *Pharmacological research*, *164*, 105373.
22. Moulos, P., Papadodima, O., Chatziioannou, A., Loutrari, H., Roussos, C., & Kolisis, F. N. (2009). A transcriptomic computational analysis of mastic oil-treated Lewis lung carcinomas reveals molecular mechanisms targeting tumor cell growth and survival. *BMC medical genomics*, *2*, 68.
23. Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2011). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *The Journal of biological chemistry*, *286*(5), 3177–3184.
24. Ortega-Camarillo, C., Guzmán-Grenfell, A. M., García-Macedo, R., Rosales-Torres, A. M., Avalos-Rodríguez, A., Durán-Reyes, G., Medina-Navarro, R., Cruz, M., Díaz-Flores, M., & Kumate, J. (2006). Hyperglycemia induces apoptosis and p53 mobilization to mitochondria in RINm5F cells. *Molecular and cellular biochemistry*, *281*(1-2), 163–171.
25. Paraschos, S., Mitakou, S., & Skaltsounis, A. L. (2012). Chios gum mastic: A review of its biological activities. *Current medicinal chemistry*, *19*(14), 2292–2302.
26. Overview of the major scientific publications on the beneficial activity of Chios Mastiha”, (2019), Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, Chios Mastiha published scientific booklet.
27. Psarra, A.-M. G., & Sekeris, C. E. (2008). Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB Life*, *60*(4), 210–223.
28. Ramamoorthy, S., & Cidlowski, J. A. (2016). Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic diseases clinics of North America*, *42*(1), 15–vii.
29. Sakagami, H., Kishino, K., Kobayashi, M., Hashimoto, K., Iida, S., Shimetani, A., Nakamura, Y., Takahashi, K., Ikarashi, T., Fukamachi, H., Satoh, K., Nakashima, H., Shimizu, T., Takeda, K., Watanabe, S., & Nakamura, W. (2009). Selective antibacterial and apoptosis-modulating activities of mastic. *In vivo (Athens, Greece)*, *23*(2), 215–223.
30. Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, *274*(3), 1541–1548.
31. Silva, F. F. V. E., Padín-Iruegas, M. E., Caponio, V. C. A., Lorenzo-Pouso, A. I., Saavedra-Nieves, P., Chamorro-Petronacci, C. M., Suárez-Peñaranda, J., & Pérez-Sayáns,

- M. (2022). Caspase 3 and Cleaved Caspase 3 Expression in Tumorogenesis and Its Correlations with Prognosis in Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International journal of molecular sciences*, 23(19), 11937.
32. Smith, L. K., & Cidlowski, J. A. (2010). Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Progress in brain research*, 182, 1–30.
 33. Solakidi, S., Psarra, A. M., & Sekeris, C. E. (2007). Differential distribution of glucocorticoid and estrogen receptor isoforms: localization of GRbeta and ERalpha in nucleoli and GRalpha and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 7(3), 240–245.
 34. Soni, I. V., & Hardy, J. A. (2021). Caspase-9 Activation of Procaspase-3 but Not Procaspase-6 Is Based on the Local Context of Cleavage Site Motifs and on Sequence. *Biochemistry*, 60(37), 2824–2835.
 35. Spyridopoulou, K., Tiptiri-Kourpeti, A., Lampri, E., Fitsiou, E., Vasileiadis, S., Vamvakias, M., Bardouki, H., Goussia, A., Malamou-Mitsi, V., Panayiotidis, M. I., Galanis, A., Pappa, A., & Chlichlia, K. (2017). Dietary mastic oil extracted from *Pistacia lentiscus* var. *chia* suppresses tumor growth in experimental colon cancer models. *Scientific reports*, 7(1), 3782.
 36. Tóth, K., Sarang, Z., Scholtz, B., Brázda, P., Ghyselinck, N., Chambon, P., Fésüs, L., & Szondy, Z. (2011). Retinoids enhance glucocorticoid-induced apoptosis of T cells by facilitating glucocorticoid receptor-mediated transcription. *Cell death and differentiation*, 18(5), 783–792.
 37. Triantafyllou, A., Bikineyeva, A., Dikalova, A., Nazarewicz, R., Lerakis, S., & Dikalov, S. (2011). Anti-inflammatory activity of Chios mastic gum is associated with inhibition of TNF-alpha induced oxidative stress. *Nutrition journal*, 10, 64.
 38. Wajant H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), 1635–1636.
 39. Warren, C. F. A., Wong-Brown, M. W., & Bowden, N. A. (2019). BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell death & disease*, 10(3), 177.
 40. Yang, Z. M., Yang, M. F., Yu, W., & Tao, H. M. (2019). Molecular mechanisms of estrogen receptor β -induced apoptosis and autophagy in tumors: implication for treating osteosarcoma. *The Journal of international medical research*, 47(10), 4644–4655.
 41. Yuan, S., & Akey, C. W. (2013). Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure (London, England : 1993)*, 21(4), 501–515.
 42. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., & Korsmeyer, S. J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, 87(4), 619–628.
 43. Zhou, L., Satoh, K., Takahashi, K., Watanabe, S., Nakamura, W., Maki, J., Hatano, H., Takekawa, F., Shimada, C., & Sakagami, H. (2009). Re-evaluation of anti-inflammatory activity of mastic using activated macrophages. *In vivo (Athens, Greece)*, 23(4), 583–589.
 44. Zhou, M., Liu, X., Li, Z., Huang, Q., Li, F., & Li, C. Y. (2018). Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *International journal of cancer*, 143(4), 921–930.