



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Σχολή Θετικών Επιστημών

Τμήμα Φαρμακευτικής

Τομέας Φαρμακογνώσιας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

« *In vivo* μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων από τα είδη *Pinus nigra* και *Pinus heldreichii* ως προς την αντιγηραντική και αντιοξειδωτική τους δράση »



Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Ειδίκευσης

« Απομόνωση – Ανάπτυξη – Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων »

ΤΑΛΛΑΣ Δ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2016

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Φαρμακευτικής
Τομέας Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων
Τμήμα Βιολογίας
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα:
Απομόνωση- Ανάπτυξη- Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία:

« *In vivo* μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων από τα είδη *Pinus nigra* και *Pinus heldreichii* ως προς την αντιγηραντική και αντιοξειδωτική τους δράση »

Μεταπτυχιακός φοιτητής:

Ταλλάς Κωνσταντίνος
Βιολόγος
Α.Μ.: 1419-12

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης
Καθηγητής, Τομέας Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων
Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης
Καθηγητής, Τομέας Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων
Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Ιωάννης Π. Τρουγκάκος
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Νικόλαος Φωκιαλάκης
Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων
Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	6
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	8
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ, ΠΙΝΑΚΩΝ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΩΝ	11
Διαγράμματα.....	11
Εικόνες.....	12
Πίνακες	14
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	15
ABSTRACT.....	16
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
A.1 Γήρανση	18
A.1.1 Βιοδείκτες γήρανσης.....	18
A.2 Θεωρίες γήρανσης	19
A.2.1 Θεωρία των ελεύθερων ριζών οξυγόνου – Οξειδωτικό στρες.....	20
A.2.2 Η μειωμένη λήψη θερμίδων σε σχέση με το οξειδωτικό στρες (Caloric Restriction - CR).....	21
A.2.3 Το μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης Nrf2/Keap1	22
A.2.4 Επισκόπηση της μοριακής βάσης της γήρανσης του πληθυσμού.....	24
A.2.4.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 και τα μεταβολικά μονοπάτια	24
A.2.4.2 Ρυθμιστές μακροζωίας ενεργοποιούν οδούς που ανταποκρίνονται στο στρες.....	25
A.3 Κυτταρικά μονοπάτια πρωτεόλυσης.....	27
A.3.1 Λυσόσωμα – Αυτοφαγία.....	28
A.3.1.1 Αυτοφαγία	29
A.3.1.1.1 Μακροαυτοφαγία	30
A.3.1.1.2 Μικροαυτοφαγία	30
A.3.1.1.3 Αυτοφαγία μέσω μοριακών συνοδών (CMA)	30
A.3.2 Σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (Ubiquitin Proteasome System).....	31
A.3.2.1 Ουβικιτίνη και τα ένζυμα του συστήματος ουβικιτινίωσης.....	32
A.3.2.1.1 Η τύχη των ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών.....	33
A.3.2.1.2 Η ανακύκλωση της ουβικιτίνης	35
A.3.2.2 Πρωτεάσωμα.....	36
A.3.2.2.1 Το 20S πρωτεάσωμα	36
A.3.2.2.2 Το 19S ρυθμιστικό σύμπλοκο	38

A.4 Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και τα άλλα πρωτεολυτικά συστήματα	39
A.4.1 Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και οι κυτταρικές αντιοξειδωτικές αποκρίσεις.....	40
A.5 Γήρανση και σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος.....	40
A.6 «Φυσικά προϊόντα με αντιγηραντικές ή αντιοξειδωτικές δράσεις»	42
A.6.1 Φυσικές ενώσεις που δρουν ως ρυθμιστές αντιγήρανσης	43
A.6.1.1 Φυσικές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από θαλάσσιους οργανισμούς και μικροοργανισμούς.....	43
A.6.1.2 Φυσικές ενώσεις που προέρχονται από φυτά	44
A.6.2 Εκχυλίσματα με αντιγηραντική δράση	46
A.6.2.1 Τα φυτικά εκχυλίσματα.....	46
A.6.2.2 Εκχυλίσματα που προέρχονται από εδώδιμα φυτά	47
A.7 Γένος <i>Pinus</i>	53
A.7.1 <i>Pinus pinaster</i> – Aiton	54
A.7.1.1 Βοτανική ταξινόμηση	54
A.7.1.2 Περιγραφή και Βοτανικά Χαρακτηριστικά	54
A.7.1.3 Γεωγραφική εξάπλωση	55
A.7.1.4 Οικολογία.....	56
A.7.1.5 Χρήσεις	57
A.7.1.6 Απειλές για τη γενετική ποικιλότητα	58
A.7.1.7 Προστασία και διατήρηση του είδους	60
A.7.1.8 Χημική σύνθεση και Παραγωγή	61
A.7.1.9 Βιολογικές Δράσεις.....	63
A.7.1.10 Κλινικές μελέτες	68
A.7.2 <i>Pinus nigra</i> – Arnold.....	73
A.7.2.1 Βοτανική ταξινόμηση	73
A.7.2.2 Περιγραφή και Βοτανικά Χαρακτηριστικά	73
A.7.2.3 Γεωγραφική εξάπλωση	74
A.7.2.4 Οικολογία.....	76
A.7.2.5 Χρήσεις	77
A.7.2.6 Απειλές για τη γενετική ποικιλότητα	78
A.7.2.7 Προστασία και διατήρηση του είδους	79
A.7.2.8 Χημική σύσταση φλοιού.....	80
A.7.2.9 Βιολογικές Δράσεις.....	81
A.7.3 <i>Pinus heldreichii</i> - H. Christ. (1863).....	85
A.7.3.1 Βοτανική ταξινόμηση	85
A.7.3.2 Περιγραφή και Βοτανικά Χαρακτηριστικά	85

A.7.3.3 Γεωγραφική κατανομή.....	86
A.7.3.4 Οικολογία.....	87
A.7.3.5 Χρήσεις	88
A.7.3.6 Προστασία και διατήρηση του είδους	88
A.7.3.7 Χημική σύσταση	89
A.7.3.8 Βιολογικές δράσεις	91
B. ΣΚΟΠΟΣ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ	94
B.1 Σκοπός της παρούσας μελέτης:.....	95
B.2 Το έντομο <i>Drosophila melanogaster</i>	96
B.2.1 Φυσιολογική ανάπτυξη της <i>Drosophila melanogaster</i>	96
B.2.1.1 Ωογένεση.....	97
B.2.1.2 Εμβρυογένεση	98
B.2.1.3 Στάδια της προνύμφης.....	98
B.2.1.4 Το ενήλικο άτομο	99
B.2.1.5 Το πρωτεάσωμα στη <i>Drosophila melanogaster</i>	100
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	101
Γ.1 Υλικά	102
Γ.1.1 Μηχανήματα	102
Γ.1.2 Χημικά αντιδραστήρια	103
Γ.1.3 Αντισώματα	105
Γ.1.4 PCR εκκινητές (PCR primers).....	106
Γ.1.5 Φυτικά εκχυλίσματα	107
Γ.1.6 <i>In vivo</i> πειραματικό μοντέλο: <i>Drosophila melanogaster</i>	107
Γ.1.7 Διαγονιδιακά στελέχη <i>Drosophila melanogaster</i>	107
Γ.2 Μέθοδοι	109
Γ.2.1 Καλλιέργεια εντόμων	109
Γ.2.1.1 Φυσιολογική καλλιέργεια εντόμων	109
Γ.2.1.2 Καλλιέργεια εντόμων παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων	109
Γ.2.2 Γευστική δοκιμασία (Gustatory assay).....	110
Γ.2.3 Έλεγχος βιωσιμότητας.....	111
Γ.2.3.1 <i>In vivo</i> προσδιορισμός της βιωσιμότητας των εντόμων <i>Drosophila melanogaster</i>	111
Γ.2.4 Έλεγχος της κινητικότητας των εντόμων (Climbing assay) παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων	112
Γ.2.5 Ανατομία ωοθηκών και σπερματοθηκών του εντόμου <i>Drosophila melanogaster</i>	112
Γ.2.5.1 Ανατομία ωοθηκών	112
Γ.2.5.2 Ανατομία σπερματοθηκών.....	113

Γ.2.6 Απομόνωση πρωτεϊνών και προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης	114
Γ.2.6.1 Μέθοδος Bradford (Bradford, 1976)	114
Γ.2.7 SDS-PAGE Ηλεκτροφόρηση - Ανοσοστύπωμα Western	114
Γ.2.7.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε ομογενές πήκτωμα ακρυλαμίδης	114
Γ.2.7.2 Μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	116
Γ.2.7.3 Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνικών ζωνών	117
Γ.2.7.4 Αφαίρεση αντισώματος από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Stripping)	119
Γ.2.8 Ανίχνευση οξειδωμένων πρωτεϊνών (OxyBlot)	120
Γ.2.9 Μέτρηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος	120
Γ.2.9.1 Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης	121
Γ.2.9.2 Προετοιμασία για μέτρηση των ενεργειών του πρωτεασώματος	121
Γ.2.10 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των καθεψινών B και L του λυσosώματος	123
Γ.2.11 Μέτρηση των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στο έντομο <i>Drosophila melanogaster</i>	124
Γ.2.12 Μέτρηση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP (Green Fluorescent Protein) με φθορισμομετρία σε διαγονιδιακά έντομα <i>Drosophila melanogaster</i> ..	125
Γ.2.13 Αντίστροφη μεταγραφή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Reverse Transcription PCR, RT-PCR)	126
Γ.2.13.1 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, Q- RT-PCR)	127
Γ.2.13.2 Απομόνωση ολικού RNA	127
Γ.2.13.3 Σύνθεση cDNA	127
Γ.2.13.4 Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μέσω Real Time-Polymerase Chain Reaction	127
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	129
Δ.1 Μελέτη των βιολογικών επιδράσεων των εκχυλισμάτων του γένους <i>Pinus</i> στο δίπτερο έντομο <i>Drosophila melanogaster</i>	130
Δ.1.1 Γευστική δοκιμασία	130
Δ.1.2 <i>In vivo</i> μελέτη της βιωσιμότητας των εντόμων <i>Drosophila melanogaster</i> παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων	132
Δ.1.3 <i>In vivo</i> μελέτη της βιωσιμότητας των εντόμων <i>Drosophila melanogaster</i> παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων σε ένα ήπιο οξειδωτικό περιβάλλον	135
Δ.1.4 Έλεγχος της ικανότητας αναρρίχησης των εντόμων <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i> παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων	136
Δ.1.5 <i>In vivo</i> μελέτη της ενεργότητας του πρωτεασώματος των εντόμων έπειτα από έκθεση στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα	138
Δ.1.6 <i>In vivo</i> μελέτη της επίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων στην ενεργότητα των καθεψινών B και L του λυσosώματος σε ηλικιωμένα έντομα	143

Δ.1.7 Μελέτη των επιπέδων του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS), έπειτα από έκθεση στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα	144
Δ.1.8 Μέτρηση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) σε διαγονιδιακά στελέχη <i>Drosophila melanogaster</i> , έπειτα από έκθεση στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα	145
Δ.1.9 Μέτρηση της έκφρασης υπομονάδων των 20S και 19S συμπλόκων του πρωτεασώματος καθώς και ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών, έπειτα από έκθεση στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα.....	148
Δ.1.10 Ανίχνευση οξειδωμένων πρωτεϊνών, έπειτα από έκθεση των εντόμων στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα.....	151
Δ.1.11 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, έπειτα από έκθεση στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα	153
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	158
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	163

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με θέμα: **«In vivo μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων από τα είδη *Pinus nigra* και *Pinus heldreichii* ως προς την αντιγηραντική και αντιοξειδωτική τους δράση»** πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας σε συνεργασία με τον Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής, στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης «Απομόνωση - Ανάπτυξη - Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων», του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ).

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους, των οποίων η βοήθεια, με διαφορετικούς τρόπους ανά περίπτωση, συνέβαλε ουσιαστικά στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, το Διευθυντή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Καθηγητή κ. Αλέξιο - Λέανδρο Σκαλτσούνη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Φωκιαλάκη τόσο για τη γνώση που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μαθημάτων, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσαν να συμμετάσχω σε αυτό το μεταπτυχιακό πρόγραμμα παρέχοντάς μου τη βοήθειά τους, όποτε τη χρειάστηκα.

Να ευχαριστήσω, ιδιαίτερα, τον Καθηγητή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων κ. Αλέξιο - Λέανδρο Σκαλτσούνη, για την τιμή που μου έκανε να είναι υπεύθυνος της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας κ. Ιωάννη Τρουγκάκο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στη συγκεκριμένη μελέτη, τη γνώση που μου πρόσφερε κατά τη διεκπαιρέωσή της, καθώς και την προθυμία του να επιβλέπει την πορεία μου και να με καθοδηγεί με πολύτιμες συμβουλές, ιδέες και υποδείξεις. Να τον ευχαριστήσω, επίσης, για την εμπιστοσύνη και την απεριόριστη κατανόηση που μου έδειξε σε αυτό το χρονικό διάστημα.

Να ευχαριστήσω θερμά και τον Επίκουρο Καθηγητή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων κ. Νικόλαο Φωκιαλάκη για την εξαιρετική συνεργασία μας και τη συνεχή καθοδήγηση του με συμβουλές και υποδείξεις σε όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μετά-διδάκτορα Ελένη Τσακίρη, η οποία ανέλαβε ολοκληρωτικά την εκπαίδευσή μου στις περισσότερες από τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς επίσης και τη μετά-διδάκτορα Sentiljana Gumeni για την εκπαίδευση που μου παρείχε. Το αμείωτο ενδιαφέρον και η θέληση τους να μου παρέχουν όλα τα εφόδια που χρειάστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη καθώς και η βοήθεια που μου πρόσφεραν σε

οποιοδήποτε θέμα ή προβληματισμό που προέκυπτε ήταν ουσιαστική, όπως και η ηθική τους υποστήριξη.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της ομάδος «Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης και Καρκινογένεσης»: Χριστίνα Χειμωνίδου, Ελένη-Δήμητρα Παπανάγνου, Αιμιλία Σκληρού, Ζωή Ευαγγελάκου και Δέσποινα Γιαννιού, για τη συνεισφορά τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων μου, τις εποικοδομητικές συζητήσεις μας, κατά τη διάρκεια των συναντήσεων της ομάδας, καθώς και για την προθυμία τους να βοηθήσουν σε ότι χρειάστηκα. Να τους ευχαριστήσω, ακόμα, και για την αμέριστη συμπαράσταση που μου έδειξαν κατά τη διάρκεια της διετούς πορείας μου στο εργαστήριο.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα παλαιότερα μέλη της ομάδος «Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης και Καρκινογένεσης»: Νιφόρου Κατερίνα, Ηλιάκη Καλλιόπη, Χατζηγεωργίου Σοφία, Σκορδά Κατερίνα και Λιάκη Βίκυ.

Να ευχαριστήσω, επίσης, την υποψήφια διδάκτωρ Πηνελόπη Βλάχου για την άψογη συνεργασία που είχαμε σε όλο αυτό το διάστημα καθώς και για τη σημαντική βοήθεια της στην προετοιμασία των εκχυλισμάτων, προκειμένου να γίνει η διεξαγωγή των βιολογικών δοκιμών.

Κλείνοντας, ευχαριστώ τη Διευθύντρια του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής Καθηγήτρια κα. Ισιδώρα Παπασιδέρη, καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την υποδοχή τους, τη βοήθειά τους και το ευχάριστο περιβάλλον.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά όλους τους συμφοιτητές από το μεταπτυχιακό πρόγραμμα για το υπέροχο κλίμα συνεργασίας που αναπτύχθηκε κατά τη διάρκεια της διετούς πορείας. Και φυσικά να ευχαριστήσω τους φίλους μου για την απεριόριστη στήριξη τους.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, στους γονείς μου και τον αδερφό μου. Είναι οι άνθρωποι που με στήριξαν σε όλη τη διάρκεια της ζωής μου και πίστεψαν σε μένα, γιατί χωρίς εκείνους δε θα είχα τη δυνατότητα να κάνω τα όνειρα μου πραγματικότητα.

Ταλλάς Κωνσταντίνος,
Οκτώβριος 2016

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AGEs	Advanced Glycation End products Τελικά προϊόντα πρωτεϊνικής γλυκοζυλίωσης
ALS	Autophagy-Lysosome System Σύστημα αυτοφαγίας - λυσοσώματος
AMPK	AMP-activated Kinase
APS	Ammonium persulphate Υπερθεϊτικό αμμώνιο
ATP	Adenosine Triphosphate Τριφωσφορική αδενοσίνη
ARE	Antioxidant Response Element Στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης
BSA	Bovine Serum Albumin Αλβουμίνη ορού βοός
CR	Caloric Restriction Περιορισμός θερμίδων
Cdna	Complementary DNA Συμπληρωματικό DNA
CncC	cap'n'collar isoform C
CO₂	Carbon dioxide Διοξείδιο του άνθρακα
DMSO	Dimethyl Sulfoxid Διμεθυλο-σουλφοξείδιο
DNP	Dinitrophenyl Δινιτροφαίνυλο
DTT	Dithiothreitol Διθειοθρεϊτόλη
dH₂O	Distilled water Απεσταγμένο νερό
EDTA	Ethylenediamine-tetra-acetic acid Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικόξύ
EtOH	Ethanol Αιθανόλη
GC	Gas Chromatography

	Αέρια χρωματογραφία
GFP	Green Fluorescence Protein Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
Hepes	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid N-2-υδροξυαιθυλοπιπεραζινο-N-2-αιθανοσουλφονικό οξύ
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
It is	Integrated Taxonomic Information System Ολοκληρωμένο Ταξινομικό Πληροφοριακό Σύστημα
IUCN	International Union for Conservation of Nature Διεθνής Ένωση για Διατήρηση της Φύσης
KCl	Potassium chloride Χλωριούχο κάλιο
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
Maf	Musculo aponeurotic fibrosarcoma
MeOH	Methanol Μεθανόλη
MgCl₂	Magnesium chloride Χλωριούχο μαγνήσιο
MIC	Minimum Inhibitory Concentrations Ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις
MID	Minimum Inhibitory Dosages Ελάχιστες ανασταλτικές δοσολογίες
mRNA	Messenger RNA Αγγελιοφόρο RNA
NaCl	Sodium chloride Χλωριούχο νάτριο
NaHCO₃	Sodium bicarbonate Όξινο ανθρακικό νάτριο
Nonidet P-40 (NP-40)	Non-ionic detergent 2-[2-[4-(2,4,4-trimethylpentary)phenoxy] ethoxy] ethanol Μη ιονικό απορρυπαντικό 2-[2-[4-(2,4,4-τριμεθυπεντανυλ)φαινοξυ]αιθοξυ] αιθανόλη
Nrf2	NF-E2-related factor -2
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis

	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
PBE	Pinus Bark Extract Εκχύλισμα φλοιού πεύκου
PBS	Phosphate Buffered Saline Διάλυμα φωσφορικών αλάτων
PCR	PolymeraseChainReaction Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
ROS	Reactive Oxygen Species Δραστικές μορφές οξυγόνου
RT-PCR	Real Time PCR Πραγματικού χρόνου PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate Θειικό δωδεκυλικό νάτριο
t-BHP	Tert-Butyl hydroperoxide Τριτ-βουτυλουδροϋπεροξειδίο
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine N, N, N', N'-τετραμεθυλαιθυλενο-διαμίνη
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane Τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθάνιο
TOR	Target Of Rapamycin Στόχος της ραπαμκίνης
UPS	Ubiquitin Proteasome System Σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος
v/v	Volume per volume Όγκος κατ' όγκο
w/v	Weight per volume Βάρος κατ' όγκο

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ, ΠΙΝΑΚΩΝ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΩΝ

Διαγράμματα

α/α	Περιγραφή	Σελίδα
Διάγραμμα 1	Ένταση κοιλιακής ερυθρότητας των εντόμων <i>Drosophila melanogaster</i> παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων	131
Διάγραμμα 2	Έλεγχος της βιωσιμότητας παρουσία των εκχυλισμάτων του γένους <i>Pinus</i>	133
Διάγραμμα 3	Έλεγχος της βιωσιμότητας παρουσία των εκχυλισμάτων του γένους <i>Pinus</i>	134
Διάγραμμα 4 (Α & Β)	Έλεγχος της βιωσιμότητας των εντόμων παρουσία των εκχυλισμάτων του είδους <i>P. heldreichii</i> και του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP	135
Διάγραμμα 4 (Γ & Δ)	Έλεγχος της βιωσιμότητας των εντόμων παρουσία των εκχυλισμάτων των ειδών <i>P. pinaster</i> και <i>P. nigra</i> και του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP	136
Διάγραμμα 5	Έλεγχος της κινητικότητας των εντόμων μετά από έκθεση τους στα φυτικά εκχυλίσματα	137
Διάγραμμα 6	<i>In vivo</i> μελέτη των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων παρουσία των εκχυλισμάτων του γένους <i>Pinus</i> σε νεαρής ηλικίας έντομα	139
Διάγραμμα 7	<i>In vivo</i> μελέτη των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων σε νεαρής ηλικίας έντομα	140
Διάγραμμα 8	<i>In vivo</i> μελέτη των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων παρουσία των τριών εκχυλισμάτων από τα είδη <i>P. nigra</i> και <i>P. heldreichii</i> σε ηλικιωμένα έντομα	141
Διάγραμμα 9	<i>In vivo</i> μελέτη των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων σε ηλικιωμένα έντομα	142
Διάγραμμα 10	Μέτρηση της ενεργότητας των καθεψινών B και L σε ηλικιωμένα έντομα	143
Διάγραμμα 11	Μέτρηση των επιπέδων ROS σε νεαρά έντομα	144
Διάγραμμα 12	Μέτρηση των επιπέδων ROS σε ηλικιωμένα έντομα	145
Διάγραμμα 13	Μέτρηση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) σε διαγονιδιακά στελέχη <i>Drosophila melanogaster</i> παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων για 4 ημέρες	146
Διάγραμμα 14	Μέτρηση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) σε διαγονιδιακά στελέχη <i>Drosophila melanogaster</i> παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων για 2 ημέρες	147
Διάγραμμα 15	Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, έπειτα από διατροφική παρέμβαση με υδατικό εκχύλισμα από φλοιό του είδους <i>P. pinaster</i>	154
Διάγραμμα 16	Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, έπειτα από διατροφική παρέμβαση με υδατικό εκχύλισμα από φλοιό του είδους <i>P. nigra</i>	155
Διάγραμμα 17	Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, έπειτα από διατροφική παρέμβαση με υδροαλκοολικό εκχύλισμα από ξύλο του είδους <i>P. heldreichii</i>	156
Διάγραμμα 18	Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, έπειτα από διατροφική παρέμβαση με αλκοολικό εκχύλισμα από ξύλο του είδους <i>P. heldreichii</i>	157

Εικόνες

α/α	Περιγραφή	Σελίδα
Εικόνα 1	Δημιουργία Reactive Oxygen Species	21
Εικόνα 2	Το σύμπλοκο Nrf2/Keap1 απουσία και παρουσία οξειδωτικού στρες	23
Εικόνα 3	Σηματοδοτικά μονοπάτια θρεπτικής αντίχρευσσης	24
Εικόνα 4	Ενεργοποίηση οδών που ανταποκρίνονται στο στρες	26
Εικόνα 5	Τα κύρια πρωτεολυτικά μονοπάτια του κυττάρου	28
Εικόνα 6	Λυσόσωμα	29
Εικόνα 7	Τύποι αυτοφαγίας	31
Εικόνα 8	Τα ένζυμα του συστήματος ουβικιτινίωσης	32
Εικόνα 9	Σχηματισμός αλυσίδας πολυουβικιτίνης	34
Εικόνα 10	Πρωτεϊνική αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα μέσω ουβικιτίνης	35
Εικόνα 11	Το πρωτεάσωμα	38
Εικόνα 12	Το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος	39
Εικόνα 13	Χημική δομή ραπαμυκίνης	43
Εικόνα 14	Χημική δομή κουρκουμίνης	44
Εικόνα 15	Χημική δομή τετραϋδροκουρκουμίνης	44
Εικόνα 16	Χημική δομή ρεσβερατρόλης	45
Εικόνα 17	Χημική δομή ακτεοσίδης	45
Εικόνα 18	Χημική δομή νορδιυδρογουαϊαρετικού οξέος	45
Εικόνα 19	Χημική δομή σπερμιδίνης	45
Εικόνα 20	<i>Rosa damascene</i>	46
Εικόνα 21	<i>Rhodiola rosea</i>	46
Εικόνα 22	<i>Cynomorium songaricum</i>	47
Εικόνα 23	Ayurvedic rasayanas	47
Εικόνα 24	<i>Malus domestica</i>	48
Εικόνα 25	<i>Origanum vulgare</i>	49
Εικόνα 26	<i>Eruca vesicaria subsp. sativa</i>	49
Εικόνα 27	<i>Brassica oleracea var. italica</i>	49
Εικόνα 28	<i>Prunus persica var. nectarine</i>	50
Εικόνα 29	<i>Vaccinium corymbosum</i>	50
Εικόνα 30	<i>Euterpe oleracea</i> (Acai Palm)	51
Εικόνα 31	<i>Theobroma cacao</i>	51
Εικόνα 32	<i>Stachys lavandulifolia</i>	52
Εικόνα 33	<i>Camelia sinensis</i>	52
Εικόνα 34	Γεωγραφική κατανομή του γένους <i>Pinus</i>	53
Εικόνα 35	<i>Pinus pinaster</i> (Aiton) – Συστηματική κατάταξη κατά το ITIS	54
Εικόνα 36	Φλοιός του <i>Pinus pinaster</i>	54
Εικόνα 37	Κώνος και φύλλωμα του <i>Pinus pinaster</i>	55
Εικόνα 38	Γεωγραφική κατανομή <i>Pinus pinaster</i>	55
Εικόνα 39	Κλαδί του <i>Pinus pinaster</i>	56
Εικόνα 40	Ξυλεία από <i>P. pinaster</i>	57
Εικόνα 41	Συλλογή ρητίνης από <i>P. pinaster</i>	58
Εικόνα 42	Pycnogenol [®]	58
Εικόνα 43	Φλαβαν-3-όλες (επικατεχίνη και κατεχίνη)	61
Εικόνα 44	Καφεϊκό και φερουλικό οξύ	63
Εικόνα 45	<i>Pinus nigra</i> (Arnold) – Συστηματική κατάταξη κατά το IT IS	73
Εικόνα 46	Φλοιός <i>P. nigra</i>	73
Εικόνα 47	Κώνος και φύλλωμα <i>P. nigra</i>	74
Εικόνα 48	Γεωγραφική κατανομή <i>Pinus nigra</i>	75

Εικόνα 49	<i>Pinus nigra subsp. nigra</i>	76
Εικόνα 50	<i>Pinus nigra subsp. laricio</i>	77
Εικόνα 51	Αναστολή της ανάπτυξης <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	81
Εικόνα 52	<i>Pinus heldreichii</i> (Christ) – Συστηματική κατάταξη κατά το ITIS	85
Εικόνα 53	Φλοιός του <i>Pinus heldreichii</i>	85
Εικόνα 54	Κώνοι και φύλλωμα του <i>P. heldreichii</i>	86
Εικόνα 55	Γεωγραφική κατανομή του <i>Pinus heldreichii</i>	87
Εικόνα 56	Κύκλος ζωής του δίπτερου εντόμου <i>Drosophila melanogaster</i>	97
Εικόνα 57	Ενήλικα άτομα <i>Drosophila melanogaster</i> διαφορετικού φύλου	99
Εικόνα 58	Διαγονιδιακά έντομα <i>Drosophila melanogaster</i>	109
Εικόνα 59	Πείραμα γευστικής δοκιμασίας	111
Εικόνα 60	Ανατομία γονάδων στο έντομο <i>Drosophila melanogaster</i>	113
Εικόνα 61	Θηλυκό και αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα του δίπτερου εντόμου <i>Drosophila melanogaster</i>	113
Εικόνα 62	Έλεγχος μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη	117
Εικόνα 63	Ανοσοστύπωση Western	118
Εικόνα 64	Μέτρηση των ενζυμικών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων	122
Εικόνα 65	Μέτρηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)	125
Εικόνα 66	Έλεγχος γευστικής δοκιμασίας στο δίπτερο έντομο <i>Drosophila melanogaster</i>	131
Εικόνα 67	Έκφραση των υπομονάδων των 20s και 19s συμπλόκων του πρωτεασώματος σε νεαρά και ηλικιωμένα έντομα <i>Drosophila melanogaster</i> – (Ανοσοστύπωμα Western)	149
Εικόνα 68	Έκφραση των ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών σε νεαρά και ηλικιωμένα έντομα <i>Drosophila melanogaster</i> παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων - (Ανοσοστύπωμα Western)	150
Εικόνα 69	Συσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών σε νεαρά και ηλικιωμένα έντομα <i>Drosophila melanogaster</i> – Ανοσοστύπωμα Oxyblot	151

Πίνακες

α/α	Περιγραφή	Σελίδα
Πίνακας 1	Φάρμακα που βασίζονται σε φυσικά προϊόντα σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης [Πηγή: Harvey 2008, Pharmaprojects database (March 2008)]	42
Πίνακας 2	Κύρια συστατικά του φλοιού της μαύρης πεύκης	80
Πίνακας 3	Σύνθεση των διαφορετικών τάξεων των τερπενίων σε αιθέριο έλαιο από ξύλο του <i>P. heldreichii</i> (Graïkou et al., 2012)	89
Πίνακας 4	Κύρια συστατικά (% σε αιθέριο έλαιο) από διαφορετικά μέρη του <i>P. heldreichii</i> (Graïkou et al., 2012)	91
Πίνακας 5	Παράγοντας προστασίας διαφόρων συγκεντρώσεων του αιθέριου ελαίου από ξύλο του <i>P. heldreichii</i> σε καθαρισμένο ηλιέλαιο (Graïkou et al., 2012)	93
Πίνακας 6	Συστηματική κατάταξη του εντόμου <i>Drosophila melanogaster</i>	96
Πίνακας 7	Συσκευές	102
Πίνακας 8	Χημικά αντιδραστήρια	103
Πίνακας 9	Αντισώματα	105
Πίνακας 10	Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην πραγματικού χρόνου Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Real-Time PCR)	106
Πίνακας 11	Εξεταζόμενα φυτικά εκχυλίσματα	107

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γήρανση αποτελεί μια φυσιολογική, αναπόφευκτη διαδικασία, που καθοδηγείται από διαφορετικά μοριακά μονοπάτια και βιοχημικά γεγονότα που προωθούνται τόσο από γενετικούς όσο και στοχαστικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αρκετά μονοπάτια έχουν εμπλακεί στην εξέλιξη της γήρανσης όπως τα μεταβολικά μονοπάτια, το μονοπάτι των σιρτουϊνών (sirtuins), η μείωση του μήκους των τελομερών καθώς και μονοπάτια απόκρισης στο στρες που διατηρούν την ομοιόσταση και ρυθμίζουν το ποσοστό επιβίωσης των οργανισμών σε ένα μάλλον εχθρικό οξειδωτικό περιβάλλον.

Η εμφάνιση της γήρανσης μπορεί να επιβραδυνθεί είτε με γενετικές παρεμβάσεις ή με τη διατροφή (π.χ. μειωμένη λήψη θερμίδων - **CR: Caloric Restriction**). Οι διατροφικές παρεμβάσεις, όπως η περιορισμένη λήψη θερμίδων (CR) ή ισορροπημένη υγιεινή διατροφή είναι από τις πιο αποτελεσματικές προσεγγίσεις για την επέκταση της ποιότητας ζωής ή / και της μακροζωίας, που οφείλονται είτε σε παρατεταμένη ήπια ενεργοποίηση των οδών που ανταποκρίνονται στο στρες ή / και στα χαμηλά επίπεδα βλαβών στα βιομόρια. Βασικό ρόλο στη λειτουργικότητα του δικτύου πρωτεόστασης διαδραματίζουν το κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης **Nrf2** (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) / **Keap1** (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), καθώς και τα κύρια πρωτεολυτικά και επιδιορθωτικά συστήματα (**σύστημα ουβικιτίνης – πρωτεασώματος** και **μονοπάτι αυτοφαγίας - λυσοσώματος**).

Στην παρούσα μελέτη, αναλύθηκε για πρώτη φορά η *in vivo* επίδραση των εκχυλισμάτων από τα είδη *Pinus nigra* (υδατικό εκχύλισμα φλοιού) και *Pinus heldreichii* (υδροαλκοολικό και αλκοολικό εκχύλισμα ξύλου) ως πρόσθετα διατροφής στην οργανισμική ομοιοστασία του πειραματικού μοντέλου *Drosophila melanogaster*. Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιείται ως *in vivo* πλατφόρμα ελέγχου της βιοδραστικότητας φυσικών ουσιών. Παράλληλα, η δράση των παραπάνω εκχυλισμάτων συγκρίθηκε με το υδατικό εκχύλισμα από το φλοιό του είδους *Pinus pinaster* (Pycnogenol®), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, καθώς είναι ευρέως διαδεδομένη η αντιοξειδωτική του δράση.

Τα προκαταρκτικά μας ευρήματα έδειξαν ότι από την έκθεση των εντόμων στα υπό μελέτη εκχυλίσματα, κυρίως η διατροφική παρέμβαση με το υδροαλκοολικό εκχύλισμα από το ξύλο του είδους *P. heldreichii* παρείχε συνολικά ευεργετικά αποτελέσματα στη φυσιολογία και τη βιωσιμότητα των εντόμων σε σύγκριση με την Pycnogenol®. Παρόμοια εικόνα αλλά σε μικρότερη κλίμακα εντοπίστηκε και στο υδατικό εκχύλισμα από φλοιό του είδους *P. nigra*. Επιπλέον, διαπιστώθηκε συσχέτιση των ωφέλιμων αποτελεσμάτων μακροβιότητας, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε υπό στρες συνθήκες, με κυτταρικές αντιοξειδωτικές αποκρίσεις, δεδομένου ότι σημειώθηκε αυξημένη επαγωγή της αντιοξειδωτικής απόκρισης μέσω των AREs (Antioxidant Response Elements) που σχετίζεται με ταυτόχρονη μείωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών καθώς και του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου.

ABSTRACT

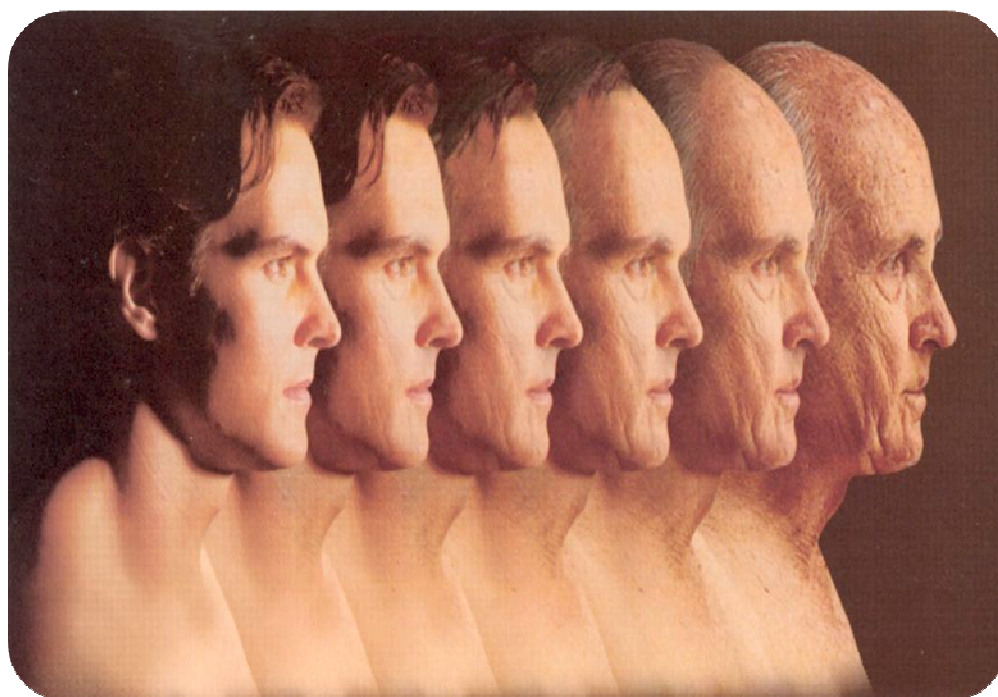
Organismal ageing is a natural, inevitable process driven by diverse molecular pathways and biochemical events that are promoted by both environmental and genetic factors. Several pathways have been implicated in the development of aging such as nutrients sensing pathways, the pathway of sirtuins, the reduction of telomere length and stress responsive pathways that maintain homeostasis and regulate the survival of organisms in a rather hostile environment.

The appearance of ageing can be postponed by either genetic interventions or diet (e.g. CR: Caloric Restriction). Diet-interventions such as CR or balanced healthy diet are the most effective approaches for extending healthspan and/or lifespan, due to either prolonged mild activation of stress responsive pathways and/or low levels of damage to biomolecules. Central to proteostasis network functionality are the Ubiquitin-Proteasome System (UPS) and the Autophagy-Lysosome System (ALS), along with the main antioxidant signalling pathway of Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)/Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*).

In the present study, we analyzed for first time the effects of natural extracts of *Pinus nigra* (aqueous bark extract) and *Pinus heldreichii* (hydroalcoholic and alcoholic wood extracts) on the *Drosophila melanogaster* organismal homeostasis. This experimental model is used as an *in vivo* screening platform of natural extracts bioactivity. Findings were compared to the results obtained from aqueous extract of the bark of *Pinus pinaster* (Pycnogenol®), which was used as a positive control. The antioxidant action of Pycnogenol® is well established.

Our preliminary findings indicated that from all the extracts used, the addition of the hydroalcoholic extract from the wood of *P. heldreichii* in flies' culture medium provided overall beneficial effects on the physiology and viability of insects as compared to the commercial formulation of Pycnogenol®. Similar findings were found in relation to the aqueous extract from the bark of *P. nigra*. Furthermore, beyond the effects on longevity, under both normal and stress conditions, we noted increased antioxidant responses with a simultaneous reduction of oxidized proteins and cellular oxidative stress.

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



A.1 Γήρανση

Η εμφάνιση του γήρατος αποτελεί μια φυσιολογική, αναπόφευκτη διαδικασία, που χαρακτηρίζεται από μια προοδευτική συσσώρευση βλαβών σε μακρομόρια και οργανίδια των κυττάρων και σταδιακά οδηγεί σε μειωμένη κυτταρική και μοριακή αποτελεσματικότητα των βιολογικών διαδικασιών, οι οποίες απαιτούνται για τη διατήρηση της ομοιόστασης-ομοιοδυναμικής και της επιβίωσης. Οι βλάβες αφορούν τη συσσώρευση στα κύτταρα τροποποιημένων δυσλειτουργικών πρωτεϊνών, λιπιδίων, υδατανθράκων καθώς και νουκλεϊκών οξέων, τα οποία απομακρύνονται φυσιολογικά από τα πρωτεολυτικά και επιδιορθωτικά συστήματα του κυττάρου, τα οποία ωστόσο καθίστανται αναποτελεσματικά να επιδιορθώσουν τις βλάβες, οι οποίες και συσσωρεύονται (Kirkwood, 1977; Rattan, 2006).

Στις βλάβες συμβάλλουν τόσο ενδογενείς, όσο και εξωγενείς παράγοντες (López-Otín et al., 2013; Trougakos et al., 2013). Οι ενδογενείς παράγοντες αφορούν κυρίως στη γενωμική αστάθεια, δηλαδή ανακατατάξεις της χρωματίνης, βλάβη του DNA, καθώς και στη σμίκρυνση του μήκους των τελομερών, ενώ όσον αφορά στους εξωγενείς παράγοντες, που σχετίζονται με το γήρας, περιλαμβάνονται το περιβαλλοντικό στρες, καθώς και ο τρόπος ζωής, όπως η διατροφή και το κάπνισμα (Trougakos et al., 2013).

Για μεγάλο χρονικό διάστημα, οι μηχανισμοί συντήρησης της ομοιοδυναμικής του κυττάρου διατηρούν σε χαμηλά επίπεδα τις βλάβες στα βιομόρια απομακρύνοντας ή επιδιορθώνοντας αυτές. Ωστόσο, σταδιακά και καθώς ο οργανισμός γηράσκει, τα μονοπάτια διατήρησης της ομοιοδυναμικής δυσλειτουργούν. Τελικά, προκύπτει απορρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών με αποτέλεσμα την περαιτέρω συσσώρευση βλάβης, η οποία οδηγεί στην εμφάνιση του γερασμένου ιστού, καθώς και σε ασθένειες που σχετίζονται με το γήρας, όπως οι νευροεκφυλιστικές νόσοι και ο καρκίνος (Campisi, 2005; Niccoli & Partridge, 2012).

Υπάρχουν αρκετά κοινά και ευρέως αποδεκτά χαρακτηριστικά, τα οποία φανερώνουν την εμφάνιση της γήρανσης, όπως η αυξημένη θνησιμότητα με την πάροδο της ηλικίας, η μειωμένη αναπαραγωγική δραστηριότητα και αντιδραστικότητα, η μειωμένη ικανότητα ανάκαμψης-ανάρρωσης (Gompertz, 1825; Hitt et al., 1999), οι μεταβολές στη βιοχημική σύνθεση των ιστών, στο ρυθμό μεταγραφής και μετάφρασης ορισμένων γονιδίων (Strehler, 1977; Florini et al., 1981), η προοδευτική μείωση της φυσιολογικής ικανότητας του οργανισμού (Lindeman et al., 1985; Shock 1985; Lakatta, 1990). Κατά καιρούς έχουν περιγραφεί και χρησιμοποιηθεί διάφοροι βιοδείκτες της γήρανσης (Florini, 1981), με πιο κύριους τη συσσώρευση λιποφουσκίνης, προϊόν της οξείδωσης των λιπαρών οξέων (Strehler, 1977) και την αυξημένη συγκέντρωση εξωκυττάρων ουσιών, όπως το κολλαγόνο (Bjorksten, 1974).

A.1.1 Βιοδείκτες γήρανσης

Δύο από τους πιο αξιοσημείωτους βιοδείκτες γήρανσης είναι η αυξημένη συγκέντρωση της λιποφουσκίνης (lipofuscin) και των ώριμων τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης [advanced glycation end-product(s) (AGE(s))], καθώς μεταξύ των πρωτεϊνικών τροποποιήσεων που σχετίζονται με τη γήρανση περιλαμβάνονται οι

τροποποιήσεις που δημιουργούνται από οξειδωμένους και γλυκοζυλιωμένους παράγοντες, με αποτέλεσμα τη δημιουργία έντονα οξειδωμένων και/ή αδιάλυτων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων.

Όσον αφορά στις πρωτεϊνικές τροποποιήσεις πρόκειται για μεταβολές του ρυθμού μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων και της πρωτεϊνοσύνθεσης. Μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών, όπως η γλυκοζυλίωση και η οξείδωση σχετίζονται με τη γήρανση και περιλαμβάνουν τη δημιουργία έντονα οξειδωμένων, αδιάλυτων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων γνωστών ως λιποφουσκίνη (Jung et al., 2007; Höhn et al., 2011), καθώς και την τροποποίηση των πρωτεϊνών από τα ώριμα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης (AGEs). Τα AGEs δημιουργούνται μέσω μη-ενζυμικής αντίδρασης αναγωγικών σακχάρων με πρωτεϊνικές αμινο-ομάδες (Oudes et al., 1998).

Έχειδειχθεί ότι η συσσώρευση τόσο της λιποφουσκίνης, όσο και των AGEs αυξάνονται με την ηλικία και εξαρτώνται από το ρυθμό της οξειδωτικής βλάβης των πρωτεϊνών, καθώς και από τη λειτουργία των μιτοχονδρίων και των πρωτεολυτικών συστημάτων (Terman et al., 2006; Jung et al., 2007). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η λιποφουσκίνη και τα AGEs προκαλούν μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος, ενός πρωτεολυτικού και επιδιορθωτικού συστήματος του κυττάρου (Höhn et al., 2011). Επίσης, μειώνουν την ποιότητα ζωής (healthspan), καθώς και το προσδόκιμο ζωής (lifespan) των εντόμων *Drosophila melanogaster* (Tsakiri et al., 2013).

A.2 Θεωρίες γήρανσης

Αρκετές θεωρίες έχουν προταθεί για να εξηγήσουν το φαινόμενο της γήρανσης, οι οποίες θα μπορούσαν να χωριστούν σε δυο γενικές κατηγορίες: τις αναπτυξιακές-γενετικές και τις στοχαστικές (Troen, 2003).

Οι γενετικές θεωρίες υποστηρίζουν ότι η γήρανση είναι μέρος του γενετικά προγραμματισμένου και ελεγχόμενου χρόνου ζωής, που περιλαμβάνει την ανάπτυξη, την ωρίμανση, τη γήρανση και το θάνατο. Με άλλα λόγια, η γήρανση εξαρτάται από τη ρύθμιση των «βιολογικών ρολογιών» του οργανισμού. Η ρύθμιση αυτή θα μπορούσε να σχετίζεται με την επαγωγή ή την καταστολή γονιδίων του νευρικού, ενδοκρινικού και του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της ομοιόστασης και τις αντιδράσεις άμυνας. Αν και η κληρονομικότητα της διάρκειας ζωής είναι σχετικά μικρή, ορισμένες γενετικές διαφοροποιήσεις τροποποιούν σημαντικά τη γήρανση των θηλαστικών και των ασπόνδυλων, με τόσο θετικές όσο και αρνητικές επιπτώσεις όσο αφορά στη διάρκεια ζωής (Finch & Tanzi, 1997).

Αντίθετα, οι στοχαστικές θεωρίες υποστηρίζουν ότι οι τυχαίοι περιβαλλοντικοί παράγοντες προκαλούν αθροιστικές βλάβες σε πολλαπλά επίπεδα του οργανισμού και οδηγούν στη γήρανση. Πιο συγκεκριμένα, μεταλλάξεις που συμβαίνουν μετά την αναπαραγωγική περίοδο, οι οποίες δεν είναι ισχυρά επιλεγμένες επειδή δεν θα περάσουν στους απογόνους, συσσωρεύονται με την ηλικία και δημιουργούν βλάβες στο DNA ή στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου και αλλαγές στο ρυθμό σύνθεσης των πρωτεϊνών. Η θεωρία της τροποποίησης των πρωτεϊνών συμπεριλαμβάνει αλλαγές στη φυσιολογική και βιοχημική ενεργότητα των πρωτεϊνών. Οι αλλαγές συμβαίνουν μέσω οξείδωσης, διασυνδέσεων μεταξύ

πρωτεϊνών, DNA και άλλων δομικών μορίων και της γλυκοζυλίωσης, που είναι ο κύριος τρόπος δημιουργίας των διασυνδέσεων. Η θεωρία των ελεύθερων ριζών, οι δείκτες γήρανσης και το μονοπάτι της πρωτεασωμικής αποικοδόμησης των πρωτεϊνών μέσω ουβικιτίνης συμπεριλαμβάνονται στις στοχαστικές θεωρίες της γήρανσης (Harman, 1981; Medvedev, 1990) και περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

A.2.1 Θεωρία των ελεύθερων ριζών οξυγόνου – Οξειδωτικό στρες

Το 1956, ο D.Harman ανέπτυξε τη θεωρία των ελεύθερων ριζών σύμφωνα με την οποία οι δραστικές μορφές οξυγόνου (**Reactive Oxygen Species - ROS**) αθροίζονται με το χρόνο προκαλώντας τη δυσλειτουργία των κυττάρων, των ιστών και του οργανισμού και τελικά οδηγώντας στο θάνατο. Είκοσι χρόνια αργότερα, ο Harman έδειξε ότι η κύρια πηγή των ROS είναι το μιτοχόνδριο (**Εικόνα 1**), το οποίο συμβάλλει στη συσσώρευση οξειδωτικού στρες με την εκροή της ρίζας του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) (Harman, 1981).

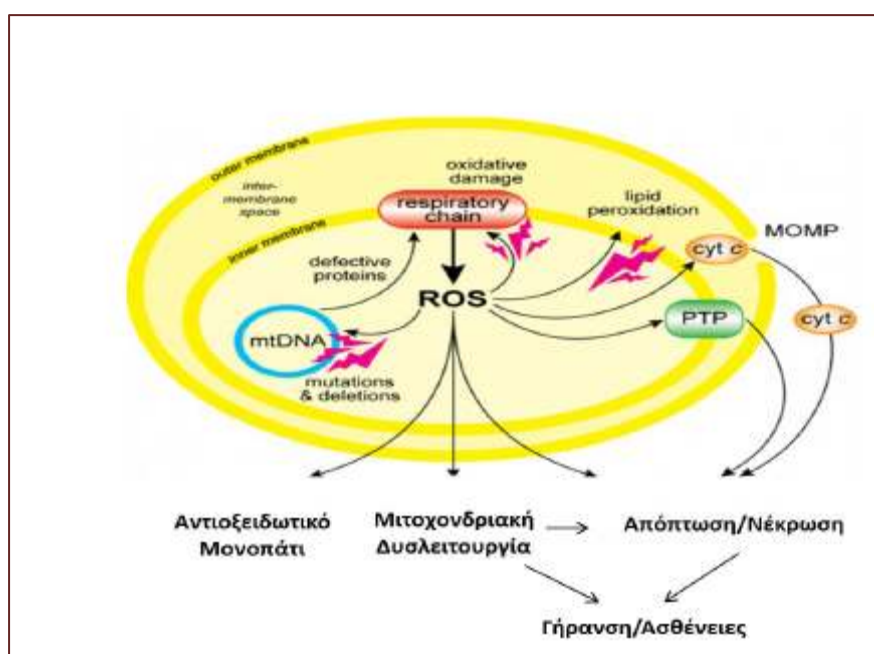
Στους αερόβιους οργανισμούς, η ενέργεια, που απαιτείται για να τροφοδοτήσει τις βιολογικές λειτουργίες, παράγεται στα μιτοχόνδρια μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ωστόσο, εκτός από την ενέργεια, παράγονται και ROS, που έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν κυτταρικές βλάβες. Τα ROS είναι αναπόφευκτα, φυσικά υποπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και αποτελούν μόρια σε πολύ ασταθή μορφή διότι περιέχουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στοιβάδα κι έτσι έχουν την τάση να προσλαμβάνουν ένα ηλεκτρόνιο από γειτονικά τους μόρια αφήνοντας έτσι αυτά σε ασταθή μορφή. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος ο οποίος επηρεάζει και την αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου. Ωστόσο, η οξειδωτική βλάβη «χτίζεται» με την πάροδο του χρόνου. Συγκεκριμένα, προκαλούνται τροποποιήσεις στις βάσεις του DNA, ενίσχυση της λιπιδικής υπεροξειδωσίας καθώς και απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας των πρωτεϊνών και τελικά υφίσταται σταδιακή απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου με αποτέλεσμα την εμφάνιση της γήρανσης.

Οι δυο πιο σημαντικές πηγές ROS είναι η ρίζα του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και του υδροξυλίου ($OH^{\cdot}$), οι οποίες παράγονται από ενζυμικές αντιδράσεις και από τις αντιδράσεις Fenton, αντιστοίχως. Όταν διαταραχθεί η ισορροπία ανάμεσα στο ρυθμό δημιουργίας και αποβολής των ROS, τότε οδηγούμαστε στο οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες αποτελεί μια ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής και εκδήλωσης των ROS και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αποτοξινώνει εύκολα τα ενεργά ενδιάμεσα ή να επιδιορθώνει τη βλάβη που αυτά προκαλούν. Οι συνέπειες του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από το μέγεθος των αλλαγών, καθιστώντας το κύτταρο ικανό να ξεπεράσει μικρές διαταραχές και να ανακτήσει την αρχική του κατάσταση. Ωστόσο, πιο σοβαρή οξειδωτική βλάβη μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο, ακόμα και μέτρια οξείδωση μπορεί να προκαλέσει απόπτωση, ενώ πιο έντονες βλάβες μπορούν να επιφέρουν ακόμα και νέκρωση (Barja, 2004; Devasagayam et al., 2004).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι οξειδωμένες πρωτεΐνες τείνουν να αυξάνουν με την ηλικία και ιδιαίτερα σε μετά-μιτωτικά και σε κύτταρα με μακρά διάρκεια ζωής. Αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η υπερέκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων επιβραδύνει τη σχετιζόμενη με την ηλικία οξειδωτική βλάβη και αυξάνει το χρόνο ζωής σε διαγονιδιακά μοντέλα *Drosophila melanogaster*,

ενώ ακόμα διαφοροποιήσεις στη μακροζωία μεταξύ διαφόρων ειδών σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με τα ποσοστά της μιτοχονδριακής παραγωγής της ελεύθερης ρίζας του σουπεροξειδίου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Sohal & Weindruch, 1996). Επιπλέον, η χορήγηση οξειδωτικών παραγόντων σε πειραματόζωα έδειξε να επιταχύνει το ρυθμό συσσώρευσης της λιποφουσκίνης, ενός από τους βιοδείκτες γήρανσης (Sohal & Brunk, 1989; Tsakiri et al., 2013).

Ωστόσο, η μειωμένη λήψη θερμίδων αποδεικνύεται ότι αυξάνει το χρόνο ζωής λόγω μείωσης του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης (Tavernarakis & Driscoll, 2002), ενώ μειώνει και την παραγωγή των ROS από τα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα τη μείωση του οξειδωτικού στρες (Sohal & Weindruch, 1996; Barja, 2004).



Εικόνα 1: Δημιουργία Reactive Oxygen Species

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) από τη μιτοχονδριακή αλυσίδα είναι κεντρικής σημασίας στο οξειδωτικό στρες και σε όποιο ρόλο διαδραματίζει στο αντιοξειδωτικό μονοπάτι, ενώ σταδιακά οδηγεί σε δημιουργία ασθενειών και γήρανση (MRC, Medical Research Council).

A.2.2 Η μειωμένη λήψη θερμίδων σε σχέση με το οξειδωτικό στρες (Caloric Restriction - CR)

Σύμφωνα με πληροφορίες, η πιο αποτελεσματική παρέμβαση για την επέκταση της μακροζωίας στο μοντέλο οργανισμών είναι ο περιορισμός των θερμίδων (Caloric Restriction - CR), ο οποίος αναφέρεται σε μια μείωση (χωρίς υποσιτισμό) στην πρόσληψη τροφής κατά 10-50 % κάτω από το επίπεδο στα θηλαστικά που τρέφονται κατά βούληση. CR όχι μόνο αυξάνει τη μακροζωία, αλλά μειώνει επίσης τον κίνδυνο για τις περισσότερες (αν όχι όλες) ηλικιακές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων του διαβήτη, της καρδιαγγειακής νόσου, του νευροεκφυλισμού και του καρκίνου (Colman et al., 2009; Kenyon et al., 2010; Mattison et al., 2013). Σε γενετικό επίπεδο, παρατηρήθηκε ότι οι μεταλλάξεις σε

θρεπτικούς μεμβρανικούς υποδοχείς αίσθησης στο πλάσμα θα μπορούσε να αυξήσει τη διάρκεια ζωής των ενηλίκων *C. elegans* (Kenyon et al., 1993). Από τότε, διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η διάρκεια ζωής μπορεί να αυξηθεί από μεταλλάξεις σε γονίδια που ανιχνεύουν και μεταδίδουν την παρουσία θρεπτικών ουσιών (Alic & Partridge, 2011).

Φαίνεται πως η περιορισμένη λήψη τροφής, έχει αντίκτυπο στον οργανισμό μακροπρόθεσμα, αφού κατ' αυτόν τον τρόπο υπάρχει παράλληλη μείωση του ρυθμού της πρωτεϊνοσύνθεσης (Tavernarakis & Driscoll, 2002; Syntichaki et al., 2007). Έτσι, ελαττώνεται ο ρυθμός παραγωγής των ROS από τα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα την τελική αύξηση του προσδόκιμου ζωής (Sohal & Weindruch, 1996; Barja, 2004), ενώ όσο ο περιορισμός εφαρμόζεται για μεγάλο διάστημα φαίνεται πως ο ρυθμός σχηματισμού H_2O_2 από τα μιτοχόνδρια περιορίζεται και αυτός (ομοίως και η οξειδωτική βλάβη του μιτοχονδριακού DNA) (Gredilla et al., 2001; Drew et al., 2002; López-Torez et al., 2002; Sanz et al., 2005). Συγκεκριμένα, παρατηρείται πως η προστατευτική δράση που ασκεί η μειωμένη λήψη θερμίδων είναι ιστοειδική, αλλά εξαρτάται και από τη διάρκεια που αυτή εφαρμόζεται.

A.2.3 Το μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης Nrf2/Keap1

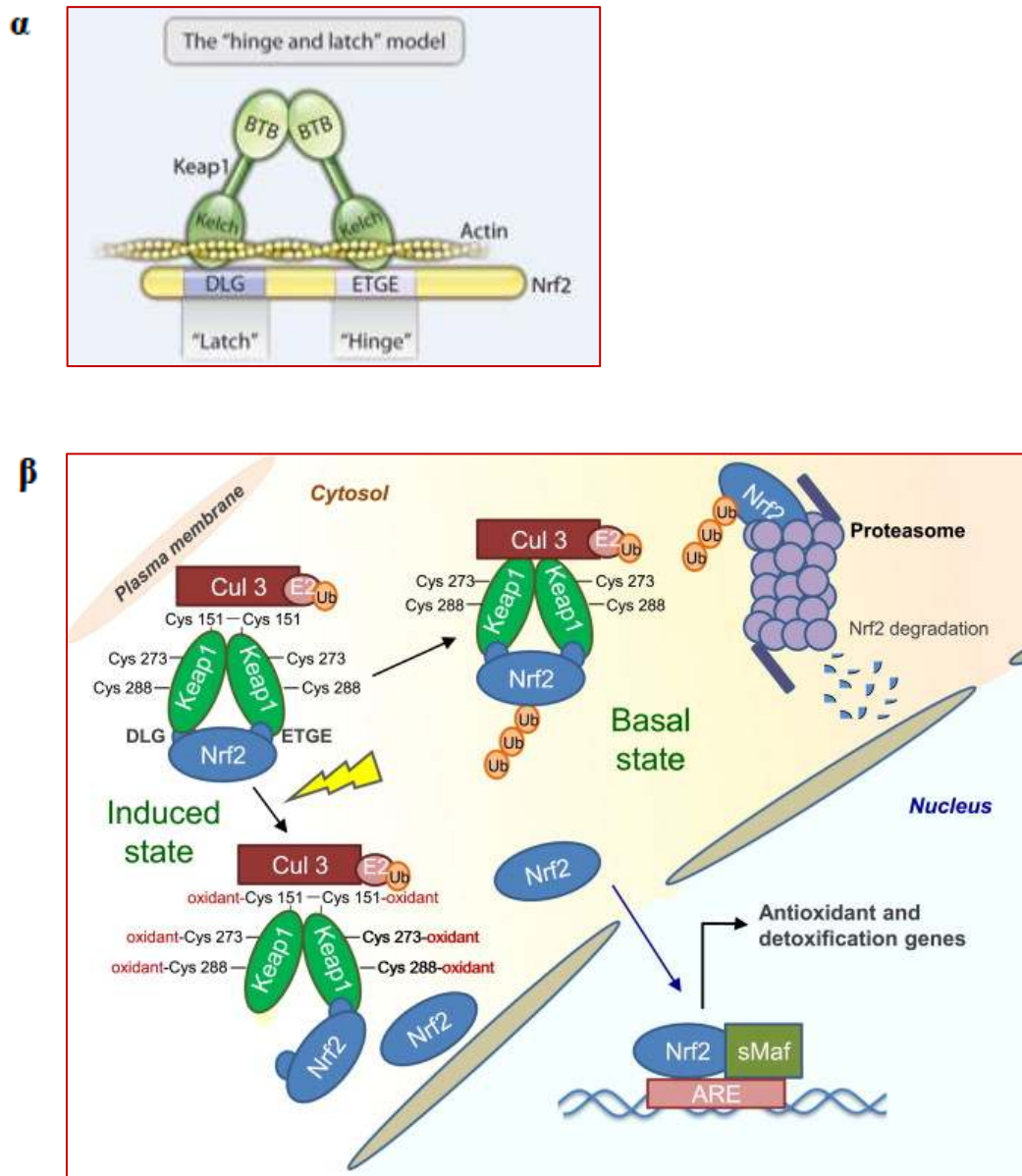
Η απόκριση του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της πρωτεόστασης. Το κύριο αντιοξειδωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι είναι αυτό του NF-E2-related factor-2 / Kelch-like ECH-associated protein 1 (Nrf2/Keap1) (Sykiotis & Bohmann, 2008).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, (απουσία οξειδωτικού στρες), ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 εντοπίζεται προσδεμένος στην πρωτεΐνη Keap1, η οποία οδηγεί τον Nrf2 προς αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα, μέσω της E3 λιγάσης cullin 3. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Keap1 έχει δομή πρόσδεσης στην ακτίνη και διαθέτει ένα αμινο-τελικό μοτίβο BTB/POZ και ένα καρβοξυ-τελικό μοτίβο Kelch για την πρόσδεση της E3 λιγάσης cullin 3 (cullin 3-dependent E3 ligase-Cul3) και του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, αντίστοιχα (**Εικόνα 2a**) (Furukawa & Xiong, 2005).

Απουσία οξειδωτικού στρες, η πρωτεΐνη Keap1 είναι προσδεμένη τόσο με τη λιγάση cul3, όσο και με τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2. Έτσι, η λιγάση cul3 ουβικιτινώνει τον Nrf2, ο οποίος οδηγείται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα (Villeneuve et al., 2010). Τα ένζυμα αντιοξειδωτικής απόκρισης της φάσης II, σε αυτή την περίπτωση, είναι ανενεργά και στα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (Antioxidant Response Elements - AREs) βρίσκονται ισχυρά συνδεδεμένα διμερή της πρωτεΐνης Maf ή κατασταλτικοί παράγοντες, όπως η πρωτεΐνη Bach1.

Το σύμπλοκο Keap1/cul3 εντοπίζεται στο κυτοσόλιο και στον πυρήνα, καθώς η πρωτεΐνη Keap1 διαθέτει σήμα εξόδου από τον πυρήνα (Nuclear Export Signal-NES) (Kaspar et al., 2012). Η πρωτεΐνη Keap1 είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στο οξειδωτικό στρες, καθώς διαθέτει μια σειρά από κατάλοιπα κυστεΐνης που δρουν ως αισθητήρες σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Holland & Fishbein, 2010). Παρουσία οξειδωτικού στρες, ο Nrf2 ενεργοποιείται, σταματά η αποικοδόμησή του από το πρωτεάσωμα και διευκολύνεται η είσοδος και κατ' επέκταση η συσσώρευσή του στον πυρήνα. Η ενεργοποίηση του Nrf2 προωθείται περαιτέρω από μονοπάτια θετικής ρύθμισης, όπως το DJ-1 και η p62/Ref2. Μετά την είσοδό του στον πυρήνα, ο Nrf2 διμερίζεται με την πρωτεΐνη Maf. Στη συνέχεια, το διμερές προσδένεται στα AREs και επάγει τη συντονισμένη έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, καθώς και

των ενζύμων αντιοξειδωτικής απόκρισης της φάσης II (**Εικόνα 2β**) (Sykiotis & Bohmann, 2010). Ο Nrf2 μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί από φωσφορυλίωση, καθώς έχει δειχθεί ότι η κινάση **PKR-like Endoplasmic Reticular (PERK)** φωσφορυλιώνει τον Nrf2 παρουσία στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Cullinan et al., 2003), ενώ η κινάση **Protein Kinase C (PKC)** φωσφορυλιώνει τον Nrf2 στη σερίνη 40 προωθώντας έτσι την ενεργοποίησή του (Niture et al., 2009). Με αυτόν τον τρόπο αποκαθίσταται η οξειδοαναγωγική ισορροπία και η βλάβη ελαχιστοποιείται.



Εικόνα 2: Το σύμπλοκο Nrf2/Keap1 απουσία και παρουσία οξειδωτικού στρες

Α. Απουσία οξειδωτικού στρες, ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 εντοπίζεται προσδεμένος στην πρωτεΐνη Keap1, η οποία οδηγεί τον Nrf2 προς αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα, μέσω της E3 λιγάσης Cullin 3. Η πρωτεΐνη Keap1 έχει δομή πρόσδεσης στην ακτίνη και διαθέτει ένα αμινο-τελικό μοτίβο BTB/POZ και ένα καρβοξυ-τελικό μοτίβο Kelch για την πρόσδεση της E3 λιγάσης cullin 3 (cullin 3-dependent E3 ligase-Cul3) και του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, αντίστοιχα. Απουσία

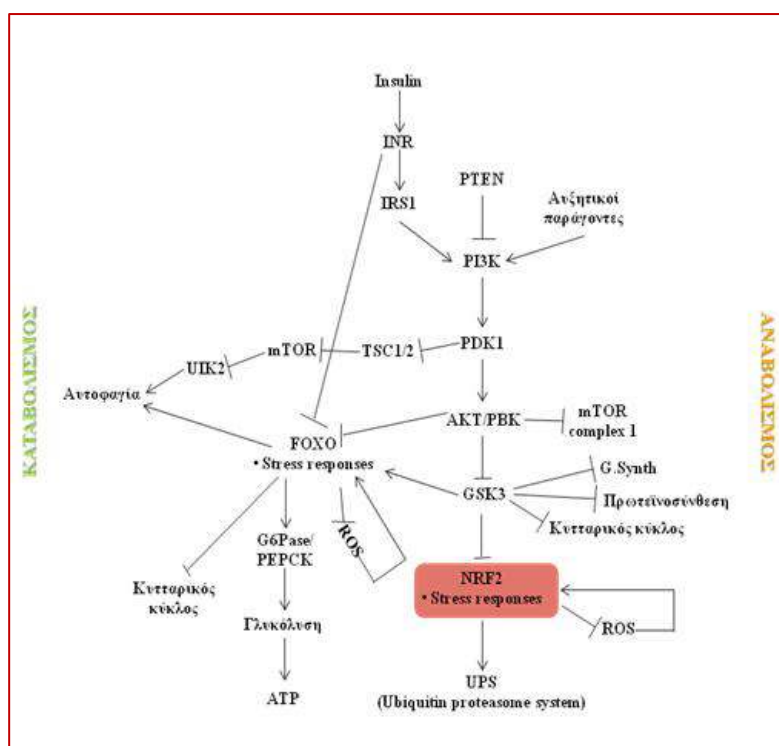
οξειδωτικού στρες, η πρωτεΐνη Keap1 είναι προσδεμένη τόσο με τη λιγάση cul3, όσο και με τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 (Sykiotis & Bohmann, 2010). **B.** Παρουσία οξειδωτικού στρες, ο Nrf2 ενεργοποιείται, σταματά η αποικοδόμησή του από το πρωτεάσωμα και διευκολύνεται η είσοδος και κατ' επέκταση η συσσώρευσή του στον πυρήνα. Ο Nrf2 διμερίζεται με την πρωτεΐνη Maf. Στη συνέχεια, το διμερές προσδένεται στα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (AREs) και επάγει τη συντονισμένη έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, καθώς και των ενζύμων αντιοξειδωτικής απόκρισης της φάσης II (Espinosa-Diez et al., 2015).

Χρόνιο οξειδωτικό στρες, που σχετίζεται με τη γήρανση ή εκφυλιστικές ασθένειες, αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την έκφραση ή/και λειτουργία των θετικών ρυθμιστών του Nrf2, ενώ αντίθετα σχετίζεται με αύξηση της αφθονίας αρνητικών ρυθμιστών, όπως οι πρωτεΐνες Keap1 και Bach1. Σε αυτή την περίπτωση, αυξάνεται η πρωτεόλυση του Nrf2, με αποτέλεσμα να διακυβεύεται η δραστηριότητά του, παρά την παρουσία οξειδωτικού στρες (Sykiotis & Bohmann, 2010).

A.2.4 Επισκόπηση της μοριακής βάσης της γήρανσης του πληθυσμού

A.2.4.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 και τα μεταβολικά μονοπάτια

Τα κυριότερα μεταβολικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη γήρανση είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης (Εικόνα 3), το σηματοδοτικό μονοπάτι **TOR** (Target Of Rapamycin) και το σηματοδοτικό μονοπάτι **AMPK** (AMP-Activated Kinase) (Kenyon, 2010).



Εικόνα 3: Σηματοδοτικά μονοπάτια θρεπτικής αντίληψης

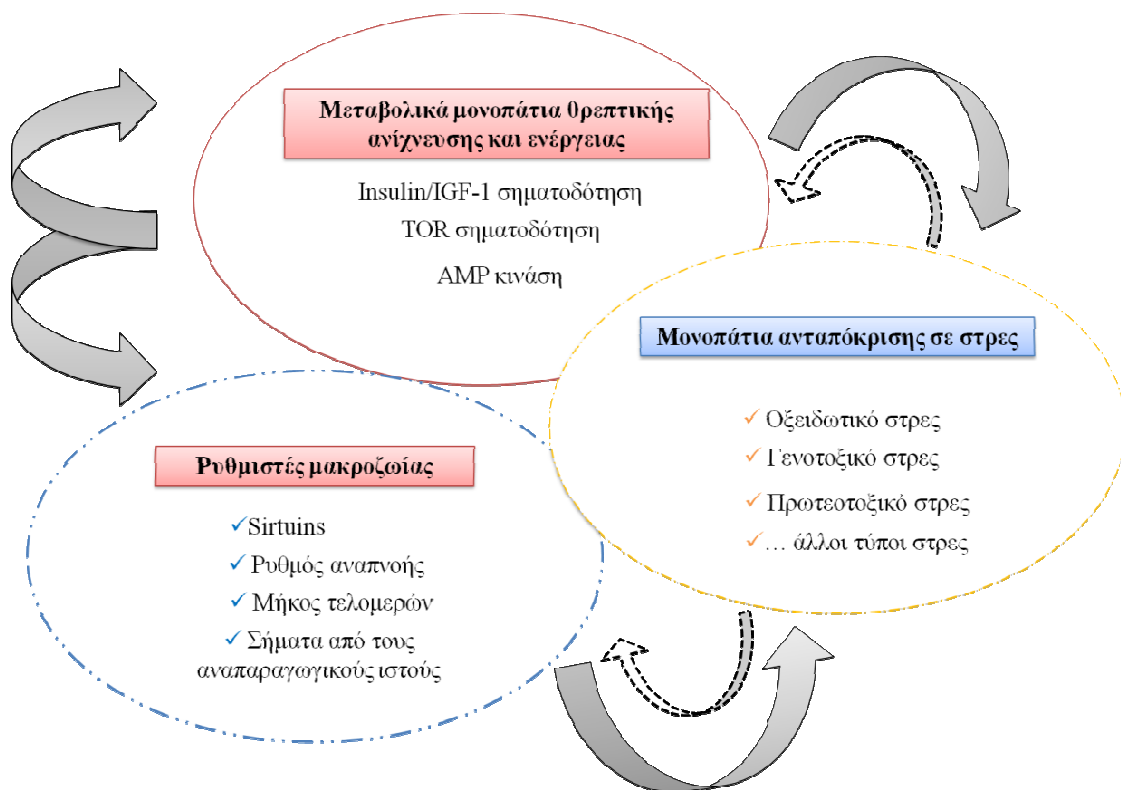
Καταστολή της σηματοδότησης των παραπάνω μονοπατιών και ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Foxo, οδηγεί σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής (από Trougakos, unpublished).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η καταστολή των παραπάνω μονοπατιών, τόσο με γενετικό όσο και με φαρμακολογικό τρόπο, οδήγησε σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής στο ζυμομύκητα, στη *D. melanogaster*, καθώς και στον ποντικό (Fontana et al., 2010; Partridge, 2010; Selman & Withers, 2011). Συγκεκριμένα, στον άνθρωπο βρέθηκαν πολυμορφισμοί που προκαλούν μείωση της έκφρασης της ορμόνης ανάπτυξης (Growth hormone), καθώς και της σηματοδότησης του μονοπατιού της ινσουλίνης (Insulin-like Growth Factor-1, **IGF-1**), οι οποίοι συσχετίστηκαν με αυξημένο προσδόκιμο ζωής (Bonafe et al., 2003). Σε αρκετά επίσης, *in vivo* μοντέλα, έχειδειχθεί ότι η λήψη τροφής με περιορισμένο θερμιδικό περιεχόμενο (Caloric Restriction) φαίνεται να επάγει τη μακροζωία καταστέλλοντας τη σηματοδότηση των παραπάνω μονοπατιών και ενεργοποιώντας τον μεταγραφικό παράγοντα Foxo (Forkhead box O). Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας συμμετέχει στη μείωση των ROS και την ενεργοποίηση του μονοπατιού της αυτοφαγίας (Fontana et al., 2010).

Μηχανιστικά, φαίνεται ότι η μείωση στη δραστικότητα μονοπατιών σηματοδότησης θρεπτικής ανίχνευσης γίνεται αντιληπτή από τον οργανισμό ως ένα ήπιο είδος στρες, παρέχοντας ευεργετικά αποτελέσματα (hormesis), (Haigis & Yankner, 2010). Ο όρος hormesis αναφέρεται στο φαινόμενο κατά το οποίο η έκθεση χαμηλού επιπέδου σε στρες προκαλεί μια μακροπρόθεσμη προστατευτική αντίδραση στο στρες (Rattan, 2008).

A.2.4.2 Ρυθμιστές μακροζωίας ενεργοποιούν οδούς που ανταποκρίνονται στο στρες

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η εμφάνιση της γήρανση μπορεί να επιβραδυνθεί είτε με τη διατροφή (π.χ. CR) ή με γενετικές παρεμβάσεις. Σε μοριακό επίπεδο, οι αποκρίσεις μακροζωίας σε CR ρυθμίζονται ενεργά από μεταβολικά μονοπάτια θρεπτικής ανίχνευσης, (Alic & Partridge, 2011). Επιπλέον, στους ρυθμιστές της μακροζωίας περιλαμβάνονται το **μονοπάτι των σιρτουϊνών (sirtuins)**, **ο ρυθμός της αναπνοής**, **το μήκος των τελομερών** και **σήματα από τη γαμετική σειρά**, (Kenyon, 2010). Είναι ενδιαφέρον ότι οι περισσότερες (αν όχι όλες) πορείες που ρυθμίζουν τη μακροζωία συγκλίνουν στη διαμόρφωση των οδών που ανταποκρίνονται στο στρες (**Εικόνα 4**) και, συνεπώς, επηρεάζουν, άμεσα ή έμμεσα, το ποσοστό των στρεσογόνων παραγόντων και τη συσσώρευση βλάβης στα βιομόρια, που σχετίζονται με τη διάρκεια της ζωής. Ως εκ τούτου, αυτή η τελευταία παράμετρος έχει αναδειχθεί ως ο βασικός παράγοντας που τροφοδοτεί την εμφάνιση της γήρανσης και των ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία (Rattan, 2008; Haigis & Yankner, 2010; Trougakos et al., 2013).



Εικόνα 4: Ενεργοποίηση οδών που ανταποκρίνονται στο στρες

Η ποιότητα ζωής ή / και η διάρκεια ζωής επηρεάζονται από διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των θρεπτικών οδών ανίχνευσης αλλά και από διάφορους ρυθμιστές όπως μονοπάτι των σιρτουϊνών (sirtuins), ο ρυθμός της αναπνοής, το μήκος των τελομερών και σήματα από τη γαμετική σειρά. Στις περισσότερες (αν όχι όλες) περιπτώσεις τα ερεθίσματα από αυτά τα μονοπάτια μεταδίδονται σε μονοπάτια που ανταποκρίνονται σε στρες, που διατηρούν την ομοιότητα και ρυθμίζουν το ποσοστό επιβίωσης των οργανισμών σε ένα μάλλον εχθρικό οξειδωτικό περιβάλλον. Και στις τρεις κατηγορίες υπάρχουν druggable στόχοι (π.χ. ένζυμα ή παράγοντες μεταγραφής που αποκρίνονται στο στρες) για διαλογή φυσικών ενώσεων (**Πηγή:** Tsakiri & Trougakos, 2015).

Πιο αναλυτικά:

➤ **Sirtuins** είναι μια ομάδα πρωτεϊνών που παίζουν διακριτούς ρόλους στη ρύθμιση του μεταβολισμού, στην αντίσταση στην καταπόνηση και στην επιβίωση και η υπερέκφραση τους έχει αναφερθεί να επεκτείνει τη διάρκεια ζωής στα περισσότερα μοντέλα ασπόνδυλων οργανισμών (Tissenbaum & Guarente, 2001; Rogina & Helfand, 2004; Li et al., 2008).

➤ Σύμφωνα με πληροφορίες, η διάρκεια ζωής επηρεάζεται επίσης από το **ρυθμό της αναπνοής** καθώς μια μέτρια αναστολή της αναπνοής αυξάνει τη μακροζωία σε μια ευρεία ποικιλία ειδών (Lapointe & Hekimi, 2008; Copeland et al., 2009). Τα ευρήματα αυτά εξηγούν τη γενική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ μεταβολικού ρυθμού (η οποία μειώνεται με το μέγεθος) και της διάρκειας ζωής (η οποία τείνει να αυξάνεται με το μέγεθος),

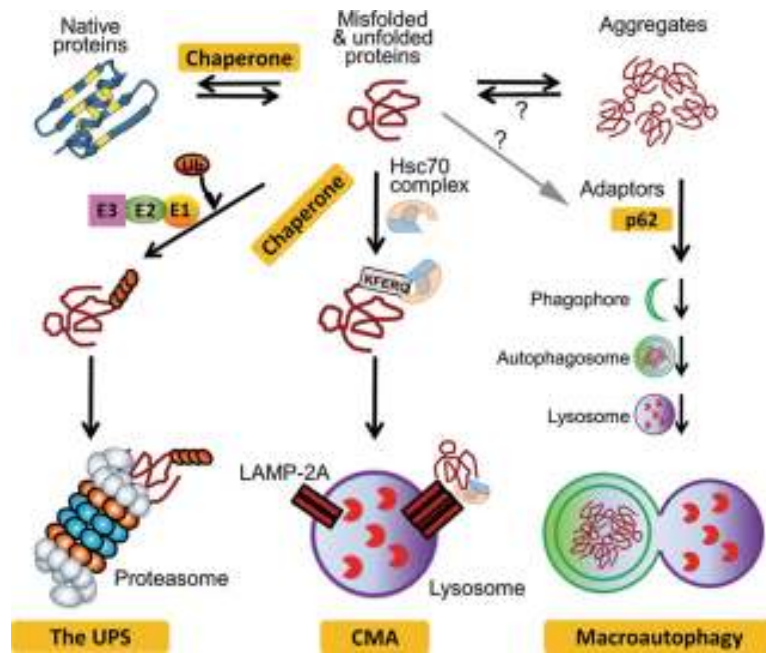
που σημαίνει ότι ίσως μεγαλύτερα θηλαστικά ζουν περισσότερο επειδή ο ρυθμός μεταβολισμού τους είναι χαμηλότερος. Επιπλέον, σε διάφορους οργανισμούς, καθώς και σε κύτταρα θηλαστικών, μείωση της αναπνοής ενεργοποιεί εναλλακτικούς δρόμους παραγωγής ενέργειας και μονοπάτια κυτταρικής προστασίας (Lee et al., 2010).

➤ Επειδή τα τελομερή μειώνονται με την ηλικία σε ανθρώπινα μιτωτικά κύτταρα, έχουν θεωρηθεί ως καθοριστικοί παράγοντες γήρανσης (Shay & Wright, 2007). Ευρήματα από μια πρόσφατη μελέτη έδειξαν ότι η δυσλειτουργία των τελομερών σχετίζεται με διαταραχή της μιτοχονδριακής λειτουργίας, της μειωμένης γλυκονεογένεσης και του αυξημένου οξειδωτικού στρες (Sahin et al., 2011).

➤ Τέλος, είναι προφανές ότι τα σήματα από το αναπαραγωγικό σύστημα μπορούν να ρυθμίζουν σημαντικά τη μακροζωία (Hsin & Kenyon, 1999; Flatt et al., 2008). Συγκεκριμένα, η απώλεια γεννητικών κυττάρων (με την παρουσία των σωματικών αναπαραγωγικών ιστών) στο *C. elegans* αύξησε τη διάρκεια ζωής από (μεταξύ άλλων) την ενεργοποίηση του DAF-16 / FOXO (Yamawaki et al., 2008). Προς στήριξη, έχει διαπιστωθεί ότι οι ηλικιωμένοι αναπαραγωγικοί ιστοί *D. melanogaster* βρίσκονται σε πολύ χαμηλότερες τιμές, δεδομένου ότι εμφανίζουν υψηλή ικανότητα για πρόληψη της συσσώρευσης των κατεστραμμένων πρωτεϊνών και διατηρούν υψηλές δραστηριότητες πρωτεασώματος (Fredriksson et al., 2012; Tsakiri et al., 2013). Ακόμη,δείχθηκε πως η γαμετική σειρά εμφανίζεται πιο ανθεκτική παρουσία οξειδωτικού στρες, ανεξαρτήτου ηλικίας, σε αντίθεση με το σώμα. Η ανθεκτικότητα που εμφανίζουν οι γονάδες τόσο κατά τη γήρανση όσο και παρουσία οξειδωτικού στρες φαίνεται να οφείλεται στο μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης Nrf2/Keap1, το οποίο παραμένει λειτουργικό στις γονάδες κατά τη γήρανση, σε αντίθεση με το σώμα. Επίσης, όταν υπερέκφραστηκε ο μεταγραφικός παράγοντας CncC, το ομόλογο του Nrf2 στη *D. melanogaster*, τα επίπεδα έκφρασης του πρωτεασώματος διατηρήθηκαν σταθερά στους σωματικούς ιστούς κατά τη γήρανση (Tsakiri et al., 2013).

A.3 Κυτταρικά μονοπάτια πρωτεόλυσης

Τα οξειδωμένα και μη λειτουργικά κυτταρικά μόρια και οργανίδια, τα οποία δεν μπορούν να επιδιορθωθούν, απομακρύνονται από τα κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης του κυττάρου για να διατηρηθεί η ομοιοδυναμική του. Τα κύρια πρωτεολυτικά μονοπάτια του κυττάρου είναι το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος (ALS - Autophagy-Lysosome System) και το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (UPS - Ubiquitin-Proteasome System), (Kirkin et al., 2009; Knecht et al., 2009) (Εικόνα 5). Μελέτες δείχνουν αλλαγές στην ενεργότητα των μηχανισμών απομάκρυνσης των οξειδωμένων/μη λειτουργικών πρωτεϊνών και οργανιδίων και την εμπλοκή τους στη διαδικασία της γήρανσης και στη ρύθμιση της μακροβιότητας (Chondrogianni & Gonos, 2005; Hara et al., 2006; Tsakiri et al., 2013). Παρακάτω αναλύονται τα πρωτεολυτικά μονοπάτια καθώς αποτελούν μια ξεχωριστή θεωρία για τη γήρανση.



Εικόνα 5: Τα κύρια πρωτεολυτικά μονοπάτια του κυττάρου (Su & Wang, 2010)

A.3.1 Λυσόσωμα – Αυτοφαγία

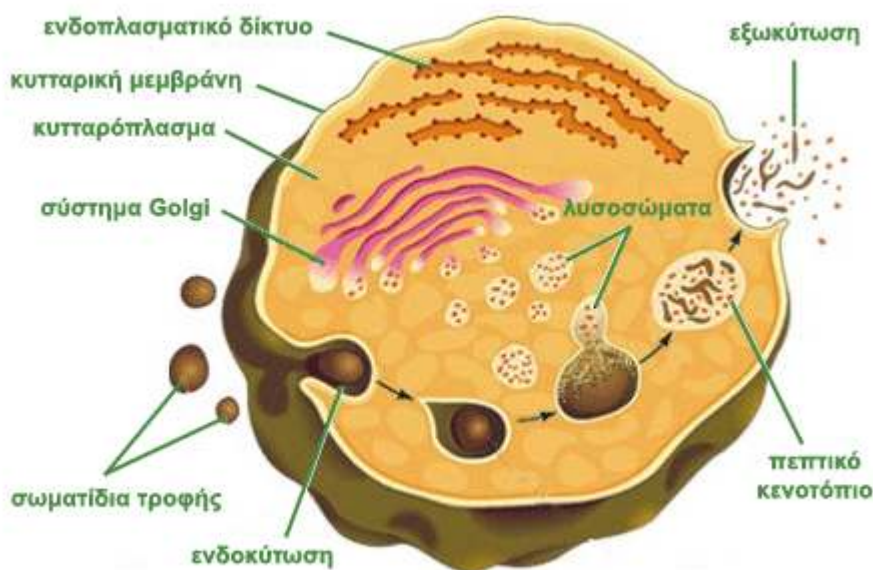
Τα λυσοσώματα είναι οργανίδια με μονή μεμβράνη και περιέχουν ποικιλία πρωτεολυτικών ενζύμων για την αποικοδόμηση οξειδωμένων, λειτουργικών και μη πρωτεϊνών, αλλά και ενδοκυτταρικών συστατικών, όπως ολόκληρα οργανίδια, λιπίδια και πρωτεϊνικά συσσωματώματα (aggregates). Η λυσοσωμική κοιλότητα αποτελείται από πενήντα διαφορετικά πεπτιδικά ένζυμα, τις υδρολάσες, που είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση του φορτίου που παραλαμβάνουν, ενώ υπάρχουν και τα μεμβρανικά ένζυμα, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση του χαμηλού pH στο εσωτερικό του οργανιδίου και την απομάκρυνση των προϊόντων αποικοδόμησης προς το κυτοσόλιο (Εικόνα 6) (de Duve, 1983).

Υπάρχουν αρκετά μονοπάτια μέσω των οποίων το λυσόσωμα λαμβάνει τα εξωκυτταρικά κι εσωτερικά υλικά που προορίζονται για αποικοδόμηση.

❖ **Ενδοκύτωση:** οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες ενδοκυτταρώνονται ολοκληρωτικά από τη μεμβράνη του κυττάρου και παραμένουν στα ενδοσώματα μέχρι να συγχωνευτούν με τα λυσοσώματα (Luzio et al., 2007).

❖ **Κρινοφαγία:** οι εκκριτικές πρωτεΐνες περικλείονται σε εκκριτικά κυστίδια, που προέρχονται από το Golgi και συγχωνεύονται με τα λυσοσώματα (Glaumann, 1989).

❖ **Αυτοφαγία:** κυτταροπλασματικά συστατικά περιβάλλονται από κυστίδια με διπλή μεμβράνη και αποικοδομούνται μέσω του λυσοσωμικού μονοπατιού (Majeski & Dice, 2004; Cuervo & MacLan, 2012).



Εικόνα 6: Λυσόσωμα

Τα λυσοσώματα είναι οργανίδια του κυττάρου, με απλή ή διπλή μεμβράνη, τα οποία περιέχουν πεπτικά ένζυμα, τις υδρολάσες που διασπούν τα υπερεπαρκή οργανίδια, τμήματα τροφής, ενδοκυτωμένους ιούς και βακτήρια. Η βιολογική μεμβράνη, που περικλείει τα λυσοσώματα, εμποδίζει την έξοδο των πεπτικών ενζύμων από αυτά και την καταστροφή του κυττάρου (Encyclopædia Britannica Inc, 2003).

A.3.1.1 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι μια εξελικτικά συντηρημένη διαδικασία, η οποία χαρακτηρίζει όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αποτελεί μια αυστηρά ελεγχόμενη διεργασία που συμμετέχει στην ανάπτυξη του κυττάρου, καθώς και στην ομοιοδυναμική του, βοηθώντας να διατηρηθεί μια ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης και της αποικοδόμησης των κυτταρικών συστατικών. Επιπλέον, η αυτοφαγία είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση ολόκληρων οργανισμών και δομών (βακτήρια, ιοί), μη λειτουργικών οργανιδίων, όπως επίσης και πρωτεϊνών με μεγάλο χρόνο ζωής. Όσο αφορά στα μετά-μιτωτικά κύτταρα, το σύστημα αυτοφαγίας-λυσοσώματος διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο, ενώ δυσλειτουργία των μηχανισμών αυτοφαγίας συνεπάγεται ιδιαίτερα δραματικές επιπτώσεις για αυτά (Cuervo, 2004).

Η αυτοφαγία διακρίνεται σε τρεις τύπους:

- ❖ Μακροαυτοφαγία
- ❖ Μικροαυτοφαγία
- ❖ Αυτοφαγία μέσω μοριακών συνοδών (Chaperone-Mediated Autophagy- CMA)

Ωστόσο, κοινό χαρακτηριστικό όλων αποτελεί η τελική αποικοδόμηση των ενδοκυτταρικών συστατικών μέσω του λυσοσώματος.

A.3.1.1.1 Μακροαυτοφαγία

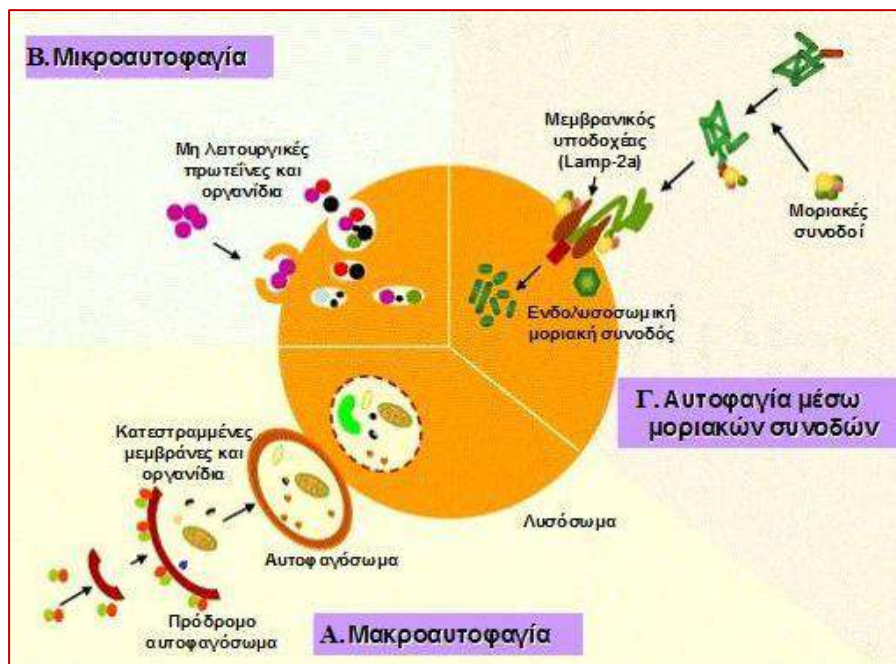
Η μακροαυτοφαγία αποτελεί μια μορφή αυτοφαγίας που επάγεται κάτω από καταστάσεις στρες και είναι ο μόνος πρωτεολυτικός μηχανισμός που αποικοδομεί κατεστραμμένες μεμβράνες, κυτταρικά οργάνδια, όπως μιτοχόνδρια, λιποσώματα, συσσωματώματα πρωτεϊνών, καθώς και ξένους οργανισμούς (ιούς). Κατά τη μακροαυτοφαγία, ολόκληρες περιοχές του κυτοσολίου απομονώνονται από μια συντιθέμενη διπλή μεμβράνη, η οποία κλείνει και δημιουργεί το αυτοφαγόσωμα. Στη δημιουργία του αυτοφαγώσματος συμμετέχουν και πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αυτοφαγία, γνωστές ως **Atgs** (Autophagy related proteins). Στη συνέχεια, το αυτοφαγόσωμα συγχωνεύεται με το λυσόσωμα, ώστε οι πρωτεάσες του λυσοσώματος να αποικοδομήσουν το φορτίο που μεταφέρει, (**Εικόνα 7α**), (Yorimitsu & Klionsky, 2005).

A.3.1.1.2 Μικροαυτοφαγία

Η μικροαυτοφαγία αποτελεί μια επόμενη μορφή αυτοφαγίας, η οποία αποικοδομεί μικρότερα οργάνδια και κάποιες πρωτεΐνες με τη βοήθεια της ενδολυσοσωμικής μοριακής συνοδού (Hsc70). Η λυσοσωμική μεμβράνη εγκολλώνεται εξω- ή ενδο-λυσοσωμικά για να περικλείσει ένα οργάνδιο που προορίζεται για αποικοδόμηση, (**Εικόνα 7β**).

A.3.1.1.3 Αυτοφαγία μέσω μοριακών συνοδών (CMA)

Η αυτοφαγία μέσω μοριακών συνοδών (CMA) είναι υπεύθυνη για την πρωτεόλυση κυτοσολικών πρωτεϊνών, οι οποίες φέρουν ένα συγκεκριμένο μοτίβο αναγνώρισης, συγκεκριμένα το πενταπεπτίδιο KFERQ. Οι μοριακές συνοδοί (Hsc70, Hsp40, Hsp90, κ.α.) αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη που προορίζεται για πρωτεόλυση μέσω του μοτίβου που φέρει και δημιουργούν μαζί της ένα σύμπλοκο. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο αυτό προσδένεται στον υποδοχέα Lamp-2a της λυσοσωμικής μεμβράνης, μέσα από τον οποίο θα περάσει η πρωτεΐνη αφού πρώτα ξεδιπλωθεί. Κοντά στην ενδοκυτταρική πλευρά του υποδοχέα Lamp-2a, υπάρχει η Hsc70, που θα παραλάβει τη ξεδιπλωμένη πρωτεΐνη και θα την εισάγει στη λυσοσωμική κοιλότητα όπου και θα πρωτεολυθεί. Τέλος, το σύμπλοκο των μοριακών συνοδών απελευθερώνεται από τη λυσοσωμική μεμβράνη και είναι έτοιμο να παραλάβει το επόμενο υπόστρωμα, (**Εικόνα 7γ**), (Majeski & Dice, 2004).



Εικόνα 7: Τύποι αυτοφαγίας

A. Μακροαυτοφαγία: ολόκληρες περιοχές του κυτοσολίου απομονώνονται από μια συντιθέμενη μεμβράνη, η οποία κλείνει και δημιουργεί το αυτοφαγόσωμα. Στη συνέχεια, το αυτοφαγόσωμα συγχωνεύεται με το λυσόσωμα, ώστε οι πρωτεάσες του λυσοσώματος να αποικοδομήσουν το φορτίο που μεταφέρει. **B. Μικροαυτοφαγία:** η λυσοσωμική μεμβράνη εγκολπώνεται εξω- ή ενδο-λυσosomal για να περικλείσει ένα οργανίδιο που προορίζεται για αποικοδόμηση. **Γ. Οι μοριακές συνοδοί** αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη που προορίζεται για πρωτεόλυση μέσω του μοτίβου που φέρει και δημιουργούν μαζί της ένα σύμπλοκο. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο αυτό προσδένεται στον υποδοχέα Lamp-2a της λυσοσωμικής μεμβράνης μέσα από τον οποίο θα περάσει η πρωτεΐνη αφού πρώτα ξεδιπλωθεί. Τέλος, μια ενδολυσosomal μοριακή συνοδός που θα παραλάβει τη ξεδιπλωμένη πρωτεΐνη, θα την εισάγει στη λυσοσωμική κοιλότητα όπου και θα πρωτεολυθεί (Bandhyopadhyay & Cuervo, 2007).

A.3.2 Σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (Ubiquitin Proteasome System)

Οξειδωμένες, μη λειτουργικές πρωτεΐνες, καθώς και πρωτεΐνες με μικρό χρόνο ζωής αποικοδομούνται από το πρωτεάσωμα. Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος συμμετέχει σε μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών, που συμπεριλαμβάνουν την κυτταρική σηματοδότηση, τον κυτταρικό θάνατο, τις αποκρίσεις του ανοσοποιητικού συστήματος, το μεταβολισμό, τον κυτταρικό κύκλο και την ανάπτυξη (Chondrogianni & Gonos, 2012; Trougakos et al., 2013). Αποτελείται από τη σηματοδοτική πρωτεΐνη ουβικιτίνη, τα ένζυμα που συμμετέχουν για να προσδέσουν την ουβικιτίνη στις πρωτεΐνες στόχους και το πρωτεάσωμα. Ο μηχανισμός πρωτεόλυσης των πρωτεϊνών περιλαμβάνει δυο στάδια: αρχικά η πρωτεΐνη γίνεται αντικείμενο στόχευσης μέσω της ουβικιτίνης και στη συνέχεια πρωτεολύεται από ένα μεγάλο σύμπλοκο, το πρωτεάσωμα.

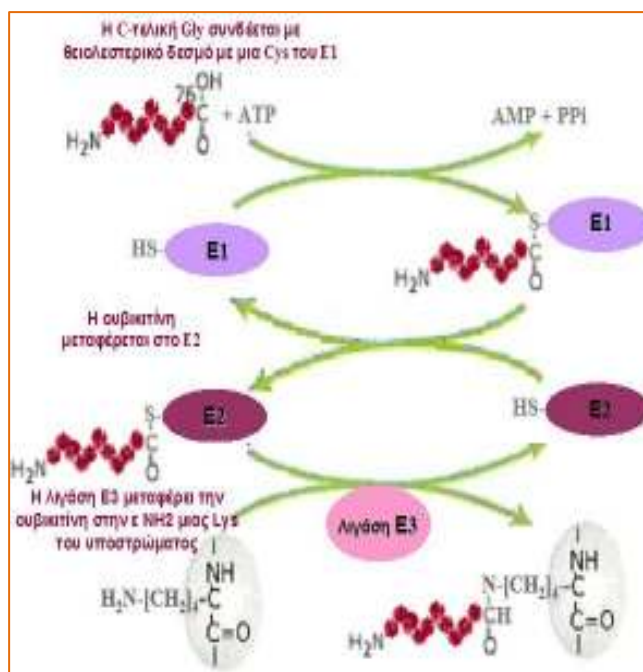
A.3.2.1 Ουβικιτίνη και τα ένζυμα του συστήματος ουβικιτινίωσης

Η ουβικιτίνη (Ubiquitin-Ub), ένα υψηλά συντηρημένο μικρό πολυπεπτίδιο 76 αμινοξέων, συνδέεται ομοιοπολικά σε μια πρωτεΐνη, είτε ως μονομερές, είτε με τη μορφή μιας αλυσίδας πολύ-ουβικιτίνης και την καθιστά υπόστρωμα για αποικοδόμηση από ένα μηχανισμό που αποτελείται από τρία ένζυμα, τα συστατικά του συστήματος ουβικιτινίωσης (Ubiquitination system), (**Εικόνα 8**). Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζεται η τύχη των πρωτεϊνών που σημαίνονται με αυτή τη μεταφραστική τροποποίηση τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και στον πυρήνα (Von Mikecz, 2006).

Το ένζυμο ενεργοποίησης της ουβικιτίνης E1 (ubiquitin-activating enzyme) υδρολύει ATP προκειμένου να συνδεθεί με την ουβικιτίνη μέσω ενός θειολεστερικού δεσμού υψηλής ενέργειας που σχηματίζεται ανάμεσα σε ένα κατάλοιπο κυστεΐνης (Cys) και στο καρβοξυτελικό κατάλοιπο γλυκίνης (Gly) της ουβικιτίνης.

Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη ουβικιτίνη μεταφέρεται στο ενεργό κέντρο της οικογένειας ενζύμων σύζευξης της ουβικιτίνης E2 (ubiquitin-conjugating enzyme).

Τελικά, οι λιγάσες της ουβικιτίνης, E3 (ubiquitin-ligase), συνδέουν την καρβοξυλική ομάδα του καρβοξυτελικού άκρου του καταλοίπου γλυκίνης της ουβικιτίνης με την ε-αμινομάδα μιας λυσίνης του υποστρώματος-πρωτεΐνης στόχου, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο ένα ισοπεπτιδικό δεσμό μεταξύ ουβικιτίνης και υποστρώματος.



Εικόνα 8: Τα ένζυμα του συστήματος ουβικιτινίωσης

Η ουβικιτίνη είναι ένα υψηλά συντηρημένο μικρό πολυπεπτίδιο 76 αμινοξέων, το οποίο συνδέεται ομοιοπολικά σε μια πρωτεΐνη και την καθιστά υπόστρωμα για αποικοδόμηση, από ένα μηχανισμό, που αποτελείται από τρία ένζυμα, τα συστατικά του συστήματος ουβικιτινίωσης. Το

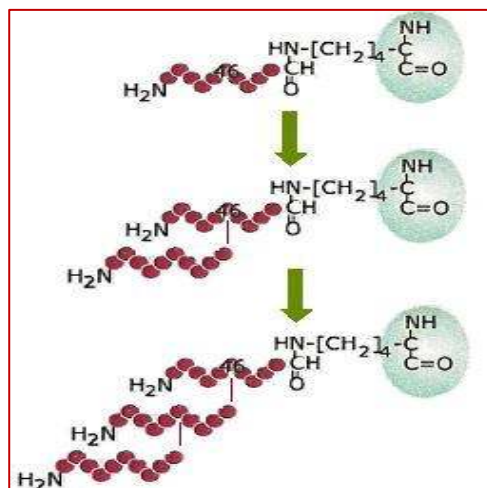
ένζυμο E1 συνδέεται με την ουβικιτίνη. Το ένζυμο E2 μεταφέρει την ουβικιτίνη από το E1 στο υπόστρωμα, ενώ το ένζυμο E3 προσδένεται στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα, (Lewin, 2004).

A.3.2.1.1 Η τύχη των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών

Η επιλογή του πρωτεϊνικού υποστρώματος που θα ουβικιτινωθεί γίνεται από τα ένζυμα E2 και E3. Σε πολλές περιπτώσεις, το E3 επιλέγει το πρωτεϊνικό υπόστρωμα, καθώς συνδέεται με αυτό πριν αρχίσει η μεταφορά της ουβικιτίνης, ενώ ένα κύτταρο μπορεί να περιέχει πολλά διαφορετικά ένζυμα E3 (Metzger et al., 2012), τα οποία χρησιμοποιούν διαφορετικά κριτήρια επιλογής υποστρώματος. Επιπλέον, υπάρχουν πολλαπλές μορφές του ενζύμου E2, οι οποίες μπορούν, επίσης, να παίζουν ρόλο στη στόχευση πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, μερικές φορές ανεξάρτητα από το ένζυμο E3 (Lewin, 2004). Ο συνδυασμός των E2 και E3 ενζύμων, τα οποία καταλύουν το σχηματισμό της αλυσίδας ουβικιτίνης και αφορά είτε σε μονοουβικιτινίωση (προσθήκη ενός μορίου ουβικιτίνης στο υπόστρωμα), είτε σε πολυουβικιτινίωση (προσθήκη αλυσίδας ουβικιτίνης στο υπόστρωμα), μαζί με την επικράτεια πρόσδεσης της ουβικιτίνης (**Ubiquitin Binding Domain – UBHD**), που διαθέτουν οι πρωτεΐνες, ρυθμίζουν την τύχη των πρωτεϊνών στόχων (Ikeda et al., 2010).

Η μονοουβικιτινίωση παίρνει μέρος σε τρεις κυτταρικές λειτουργίες: στη ρύθμιση των ιστονών (Pham & Sauer, 2000; Robzyk et al., 2000), στην ενδοκύτωση και την εκβλάστηση των ρετροϊών από την πλασματική μεμβράνη (Strack et al., 2000). Αντιθέτως, τα υποστρώματα του πρωτεασώματος είναι «σημαδεμένα» με πολυουβικιτίνη, αν και υπάρχουν εξαιρέσεις (Murakami et al., 1992). Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι το ελάχιστο σήμα για αποτελεσματική στόχευση του πρωτεασώματος αποτελείται από τέσσερα μόρια ουβικιτίνης (Thrower et al., 2000).

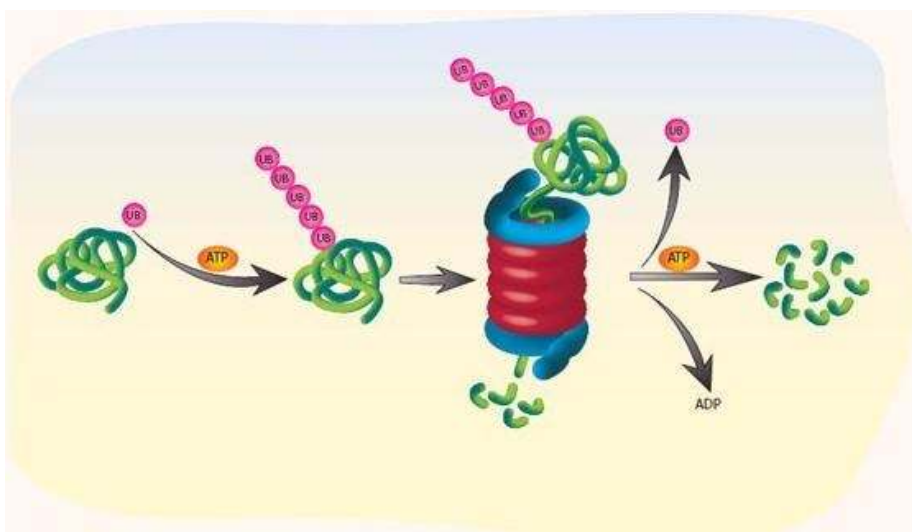
Ωστόσο, η προσθήκη λοιπόν ενός μορίου ουβικιτίνης σε ένα πρωτεϊνικό υπόστρωμα δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει την αποικοδόμησή του από το πρωτεάσωμα, καθώς το μήκος της αλυσίδας ουβικιτίνης καθορίζει το μονοπάτι που θα ακολουθήσει η πρωτεΐνη στόχος μετά τη σήμανσή της. Για την αποικοδόμηση υποστρωμάτων μέσω πρωτεασώματος φαίνεται ότι προστίθενται περισσότερα μόρια ουβικιτίνης (συνήθως τέσσερα) στην προς αποικοδόμηση πρωτεΐνη, ενώ κάθε υπομονάδα ουβικιτίνης συνδέεται στο κατάλοιπο της λυσίνης 46 (Lys-46) της προηγούμενης υπομονάδας, σχηματίζοντας έτσι μια αλυσίδα πολυουβικιτίνης. Ειδικότερα λοιπόν, η λειτουργία και το μονοπάτι που θα ακολουθήσει η ουβικιτινωμένη πρωτεΐνη έχει να κάνει με τον αριθμό των υπομονάδων ουβικιτίνης που θα προσδεθούν (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9: Σχηματισμός αλυσίδας πολυουβικιτίνης

Η λειτουργία στην οποία πρόκειται να συμμετέχει η ουβικιτινωμένη πρωτεΐνη έχει να κάνει με τον αριθμό των πεπτιδίων ουβικιτίνης που θα προσδεθούν σε αυτή. Η προσθήκη ενός μορίου ουβικιτίνης σε ένα πρωτεϊνικό υπόστρωμα δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει την αποικοδόμησή του από το πρωτεάσωμα. Φαίνεται ότι προστίθενται περισσότερα μόρια ουβικιτίνης στην προς αποικοδόμηση πρωτεΐνη, ενώ κάθε πεπτίδιο ουβικιτίνης συνδέεται στο κατάλοιπο της λυσίνης 46 (Lys-46) της προηγούμενης ουβικιτίνης, σχηματίζοντας έτσι μια αλυσίδα πολυουβικιτίνης (Lewin, 2004).

Παρόλο που μια αλυσίδα πολλών μορίων ουβικιτίνης (πολυουβικιτίνης) αφορά κύρια σε πρωτεΐνες που προορίζονται για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα (Εικόνα 10), η πολυουβικιτινίωση εμπλέκεται και σε πολλές άλλες κυτταρικές διεργασίες. Η ουβικιτίνη στοχεύει, επίσης, πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης για αποικοδόμηση στα λυσοσώματα. Επιπλέον, εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι λόγω των πολλαπλών πρωτεϊνικών υποστρωμάτων που στοχεύει, εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών βασικών κυτταρικών διαδικασιών όπως: τη μεταγραφή γονιδίων, καθώς και την επιδιόρθωση του DNA, τον κυτταρικό κύκλο, τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη, την απόκριση στο στρες και σε εξωκυτταρικούς ρυθμιστές, τη διαμόρφωση επιφανειακών υποδοχέων του κυττάρου και ιοντικών καναλιών, τα εκκριτικά μονοπάτια, τις αποκρίσεις και τη ρύθμιση των ανοσοποιητικών και αντιφλεγμονωδών μονοπατιών, τη βιογένεση οργανιδίων και την απόπτωση, την ενδοκύτωση των πρωτεϊνών και την ενδοκυτταρική μεταφορά (Hochstrasser, 2009). Πρόσφατες έρευνες αποκαλύπτουν ότι παρεκκλίσεις σε ένα τόσο πολύπλοκο σύστημα σχετίζονται με την παθογένεια πολλών ασθενειών, τόσο κληρονομήσιμων, όσο και επίκτητων (Glickman & Ciechanover, 2002).



Εικόνα 10: Πρωτεϊνική αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα μέσω ουβικιτίνης

Η στόχευση για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα στο κυτταρόπλασμα είναι η κύρια λειτουργία του συστήματος ουβικιτινίωσης. Μετά τη «σήμανση» του πρωτεϊνικού υποστρώματος προς αποικοδόμηση με την αλυσίδα πολυουβικιτίνης, μπορεί πλέον να αναγνωριστεί από το πρωτεάσωμα και να ξεκινήσει η διαδικασία της πρωτεόλυσής του. Στο τέλος της διαδικασίας, τόσο τα πεπτίδια που προέρχονται από την αποικοδόμηση του αρχικού υποστρώματος, όσο και τα μόρια της ουβικιτίνης απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα, έτσι ώστε τα συγκεκριμένα να χρησιμοποιηθούν σε νέο κύκλο αποικοδόμησης (Courtesy of Alfred Goldberg, Harvard Medical School).

A.3.2.1.2 Η ανακύκλωση της ουβικιτίνης

Η απελευθέρωση της ουβικιτίνης είναι επίσης πολύ σημαντική τόσο για την πρωτεϊνική αποικοδόμηση όσο και για τη σύνθεση της ουβικιτίνης. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ειδικά ένζυμα από-ουβικιτινίωσης (DeUBiquitinating enzymes-DUBs), τα οποία συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία. Τα ένζυμα DUBs χωρίζονται σε πέντε μεγάλες οικογένειες, οι οποίες ανάλογα με τη λειτουργία τους είναι οι εξής: οι πρωτεάσες USP (Ub-specific protease), οι υδρολάσες UCH (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases), οι πρωτεάσες OUT (Ovarian tumour-like proteases), οι μεταλλοπρωτεάσες JAMM/MPN και οι πρωτεάσες Machado-Jakob-disease (Chung & Baek, 1999; Nijman et al., 2005). Οι UCH είναι σχετικά μικρές πρωτεΐνες και υδρολύουν κυρίως μικρά αμύδια και εστέρες στο καρβοξυτελικό άκρο της ουβικιτίνης. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες UBP είναι μεγαλύτερες και σχετίζονται με αρκετές βιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων του ελέγχου της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και της ακεραιότητας του γονιδιώματος.

Στην εξαρτώμενη από το πρωτεάσωμα πρωτεόλυση, ο ρόλος των DUBs είναι πολλαπλός: διατηρούν τα επίπεδα της ελεύθερης ουβικιτίνης όσο και της συζευγμένης της μορφής σταθερά, μέσω επεξεργασίας πρόδρομων ουσιών ουβικιτίνης και μετατρέποντας μόρια πολυουβικιτίνης σε ελεύθερα μονομερή, ενώ μερικές φορές απελευθερώνουν την ουβικιτίνη πριν την αναγνώριση από το πρωτεάσωμα με αποτέλεσμα την αναστολή της αποικοδόμησης, ιδιαίτερα, σε

περιπτώσεις λανθασμένης ουβικιτινίωσης και διατηρούν το 26S πρωτεάσωμα ελεύθερο από αλυσίδες πολυουβικιτίνης, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν τη δέσμευση επόμενων υποστρωμάτων (Nijman et al., 2005; Shabek et al., 2007).

A.3.2.2 Πρωτεάσωμα

Το πρωτεάσωμα είναι ένα μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλοκο με μέγεθος περίπου 2.5 MDa, το οποίο παίζει κύριο ρόλο στην κυτταρική ομοιόσταση και την πρωτεϊνική αποικοδόμηση από τα αρχαιοβακτήρια μέχρι τα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα. Εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα, ενώ έχει αναφερθεί ότι μπορεί να βρεθεί και εξωκυτάρια σε κάποιες παθολογικές καταστάσεις (όπως π.χ. στον καρκίνο), (Lavabre-Bertrand et al., 2001; de Martino et al., 2012). Όσο αφορά στα πυρηνικά πρωτεασώματα, τα πρώτα στάδια της συγκρότησής τους φαίνεται να συμβαίνουν στο κυτοσόλιο (Huh et al., 2003). Αντίθετα, τα τελικά στάδια της αυτοσυγκρότησης πιθανόν να συμβαίνουν στον πυρήνα (Lehmann et al., 2002).

Το πρωτεάσωμα συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της μεταγραφής, η μεταγωγή σήματος και ο πρωτεϊνικός μεταβολισμός. Επίσης, απαλλάσσει τα κύτταρα από τα μη φυσιολογικά ή λανθασμένα διπλωμένα πολυπεπτίδια, τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν επιβλαβείς ρίζες (aggregates) μέσα στο κύτταρο, ενώ στα θηλαστικά έχει έναν επιπλέον ρόλο όσο αφορά στην αντική ανοσολογική απόκριση, δημιουργώντας αντιγονικά πεπτίδια, τα οποία παρουσιάζονται στην επιφάνεια των κυττάρων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I, λειτουργώντας έτσι ως αντιγονοπαρουσιαστικό (Belote & Zhong, 2009). Το πρωτεάσωμα καταλαμβάνει περίπου 1 % του συνόλου των κυτταρικών πρωτεϊνών (Coux et al., 1996).

A.3.2.2.1 Το 20S πρωτεάσωμα

Στο σύστημα του πρωτεασώματος συμπεριλαμβάνονται δυο είδη πρωτεολυτικών μηχανισμών, ο ATP-ανεξάρτητος (που πιθανότατα πραγματοποιείται από το 20S πρωτεάσωμα) και ο ATP-εξαρτώμενος (που πραγματοποιείται από το 26S πρωτεάσωμα). Πιο αναλυτικά, η συνολική δομή του πρωτεασώματος μπορεί να χωριστεί σε δυο υποσύμπλοκα: το 20S καταλυτικό κέντρο (Core Particle - CP, ~700 kDa) και τα δυο 19S/PA700 ρυθμιστικά μόρια (Regulatory Particle - RP, ~900 kDa), η συνένωση των οποίων στα άκρα του 20S καταλυτικού κέντρου απαιτεί την κατανάλωση ATP (Saeki & Tanaka, 2012). Το σύμπλοκο 20S έχει ενεργότητα πρωτεάσης. Η σύνδεση επιπλέον πρωτεϊνών μετατρέπει το σύμπλοκο αυτό στη μορφή 26S (Saeki & Tanaka, 2012). Η υδρόλυση ATP είναι απαραίτητη για τη μετατροπή της μορφής 20S σε 26S, ενώ χρειάζεται και αργότερα, στην αντίδραση διάσπασης των πεπτιδικών δεσμών και την αποδέσμευση των προϊόντων (Coux et al., 1996).

Συγκεκριμένα, το 26S πρωτεάσωμα αποτελώντας μια εξαιρετική «μοριακή μηχανή» του κυττάρου, αποτελείται από περίπου 30 διαφορετικές υπομονάδες, υψηλά συντηρημένες ανάμεσα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το 20S καταλυτικό κέντρο συγκεντρώνει τη συνολική ενεργότητα του πρωτεασώματος. Αν

και μπορεί να εντοπιστεί ελεύθερο και μπορεί να υδρολύει μικρά πεπτίδια και ορισμένες λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες, ο ATP-ανεξάρτητος πρωτεολυτικός μηχανισμός δεν έχει την ικανότητα να αποικοδομεί πολυουβικτινιωμένες πρωτεΐνες, έτσι χρησιμοποιείται κυρίως για την αποικοδόμηση οξειδωμένων πρωτεϊνών (Grune et al., 2003).

Το 20S καταλυτικό σύμπλοκο των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών έχει μορφή «βαρελιού» και συγκροτείται από τέσσερις πρωτεϊνικούς δακτύλιους, καθένας από τους οποίους έχει επτά υπομονάδες. Οι δυο εξωτερικοί δακτύλιοι περιέχουν επτά διαφορετικές α ρυθμιστικές υπομονάδες ($\alpha 1$ - $\alpha 7$), ενώ οι δυο εσωτερικοί δακτύλιοι επτά διαφορετικές β καταλυτικές υπομονάδες ($\beta 1$ - $\beta 7$) (**Εικόνα 11**) (Jung et al, 2009). Στις β υπομονάδες και συγκεκριμένα στα αμινο-τελικά άκρα, που προβάλλουν στο εσωτερικό, βρίσκονται τα ενεργά κέντρα των τριών βασικών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων: της κασπάσης ή LLE, της θρυψίνης ή LRR και της χυμοθρυψίνης ή LLVY (Groll et al., 1997). Η $\beta 1$ υπομονάδα αποτελεί το ενεργό κέντρο της ενεργότητας LLE (η οποία πρωτεολύει ύστερα από όξινα αμινοξέα), η $\beta 2$ της ενεργότητας LRR (η οποία πρωτεολύει ύστερα από βασικά αμινοξέα) και η $\beta 5$ της ενεργότητας LLVY (η οποία πρωτεολύει ύστερα από μεγάλα υδροφοβικά αμινοξέα) (Arendt & Hochstrasser, 1997). Οι α -τύπου υπομονάδες δε διαθέτουν ενζυμική ενεργότητα και θεωρείται ότι έχουν ρυθμιστικό ρόλο, καθώς τα αμινο-τελικά άκρα τους σχηματίζουν την πύλη του 20S πρωτεασώματος, η οποία ρυθμίζει την είσοδο των υποστρωμάτων στους β -δακτύλιους (Groll & Clausen, 2003; Kunjappu & Hochstrasser, 2014).

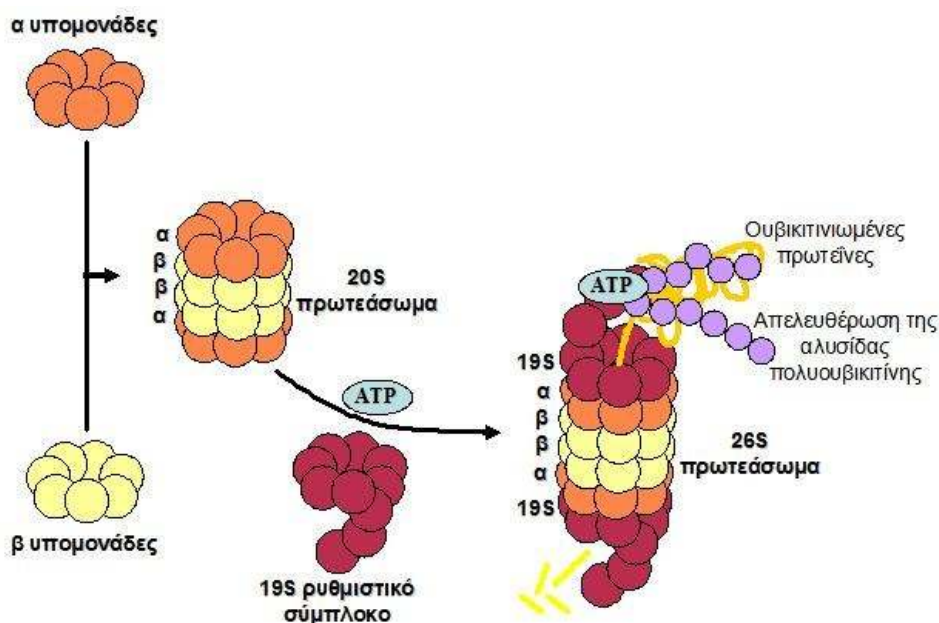
Η αυτό-συγκρότηση του 20S καταλυτικού κέντρου πραγματοποιείται με τη βοήθεια μοριακών συνοδών, καθώς και με τη σταδιακή ωρίμανση των β υπομονάδων (Kunjappu & Hochstrasser, 2014). Το πρώτο στάδιο για τη συγκρότηση του πρωτεασώματος είναι ο σχηματισμός των α δακτυλίων. Αν και θα πρέπει να σημειωθεί, ότι σε πολλά αρχαιοβακτήρια και κάποια ευκαρυωτικά κύτταρα, ο σχηματισμός του α -δακτυλίου γίνεται αυθόρμητα, στους περισσότερους οργανισμούς το στάδιο αυτό προαπαιτεί τη συμμετοχή μοριακών συνοδών (Hirano et al., 2006).

Ο σχηματισμός του β δακτυλίου ξεκινά με την προσθήκη πρώτα της $\beta 2$ υπομονάδας στα θηλαστικά. Τα αμινο-τελικά προπεπτίδια, καθώς και τα καρβοξυτελικά άκρα των β υπομονάδων (εκτός από τη $\beta 1$ και τη $\beta 7$) προωθούν τη σωστή είσοδό τους στο δακτύλιο (Hirano et al., 2008). Το προπεπτίδιο της $\beta 5$ υπομονάδας πέρα από το ρόλο του στη συγκρότηση του δακτυλίου φαίνεται επίσης να έχει ενεργότητα μοριακής συνοδού. Επιπλέον, κάθε β υπομονάδα έχει μια μοναδική αλληλουχία που επιτρέπει την αλληλεπίδρασή της με τη γειτονική της υπομονάδα δημιουργώντας ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις (Groll et al., 1997). Οι $\beta 1$ και $\beta 7$ υπομονάδες είναι οι τελευταίες που ενσωματώνονται στον ημιτελή β δακτύλιο (Hirano et al., 2008). Το καρβοξυτελικό άκρο της $\beta 7$ υπομονάδας, καθώς και οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις του β δακτυλίου διαμεσολαβούν τη σωστή σύνδεση των δυο μισών πρωτεασωμάτων, δηλαδή τη σύνδεση α - β με β - α , για να δημιουργηθεί η τελική δομή του α - β - β - α (20S) πρωτεασώματος (Gallastegui & Groll, 2010). Τελικά, η συγκρότηση του 20S καταλυτικού κέντρου ολοκληρώνεται με την αυτόλυση των προπεπτιδίων των β -υπομονάδων και η πύλη παραμένει κλειστή από τα αμινο-τελικά άκρα των α -υπομονάδων και ανοίγει με την πρόσδεση του 19S ρυθμιστικού πρωτεασώματος (Groll et al., 2000; Hirano et al., 2005).

A.3.2.2.2 Το 19S ρυθμιστικό σύμπλοκο

Τα 19S ρυθμιστικά σύμπλοκα εξυπηρετούν πολλαπλούς ρόλους στη λειτουργία του πρωτεασώματος: αναγνωρίζουν και προετοιμάζουν τις ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες προς αποικοδόμηση, τις μεταφέρουν στο εσωτερικό του 20S καταλυτικού κέντρου και πιθανώς να επηρεάζουν τη φύση των προϊόντων που παράγονται από αυτό. Όσο αφορά στη δομή του 19S/PA700 ρυθμιστικού συμπλόκου, αποτελείται από είκοσι υπομονάδες, οι οποίες είναι εξελικτικά συντηρημένες και οργανωμένες σε δύο υποσύμπλοκα, τη βάση και το κάλυμμα (ή καπάκι), (Glickman et al., 1998). Η βάση αποτελείται από έξι υπομονάδες με δράση ATPάσης τύπου AAA (Rpt1-6) και από δυο μεγάλα ρυθμιστικά μόρια, το Rpn1 και Rpn2. Κάθε ATPάση εμπλέκεται σε ξεχωριστή λειτουργία κατά την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών (Glickman et al., 1998).

Το καπάκι αποτελείται από εννιά υπομονάδες, μη ATPάσες (Rpn3, Rpn5-13 και Rpn15), με μοναδική αλληλουχία, δομή και λειτουργία. Είναι ένα ασύμμετρο συγκρότημα που βρίσκεται στην κορυφή της βάσης προσανατολιζόμενο προς αντίθετες κατευθύνσεις στα δύο άκρα του 26S πρωτεασώματος, (**Εικόνα 11**). Συγκεκριμένα, έχει δείχθει ότι η Rpn13 υπομονάδα και πιθανόν η Rpn1 υπομονάδα λειτουργούν ως υποδοχείς της ουβικιτίνης, ενώ η βάση και το κάλυμμα φαίνεται να συνδέονται μέσω της Rpn10 υπομονάδας σχηματίζοντας έτσι το 19S ρυθμιστικό σύμπλοκο. Επίσης, η Rpn11 και πιθανά η Rpn8 υπομονάδα έχουν ενεργότητα από-ουβικιτινώσης (Glickman et al., 1998; Maytal-Kivity et al., 2002).



Εικόνα 11: Το πρωτεάσωμα

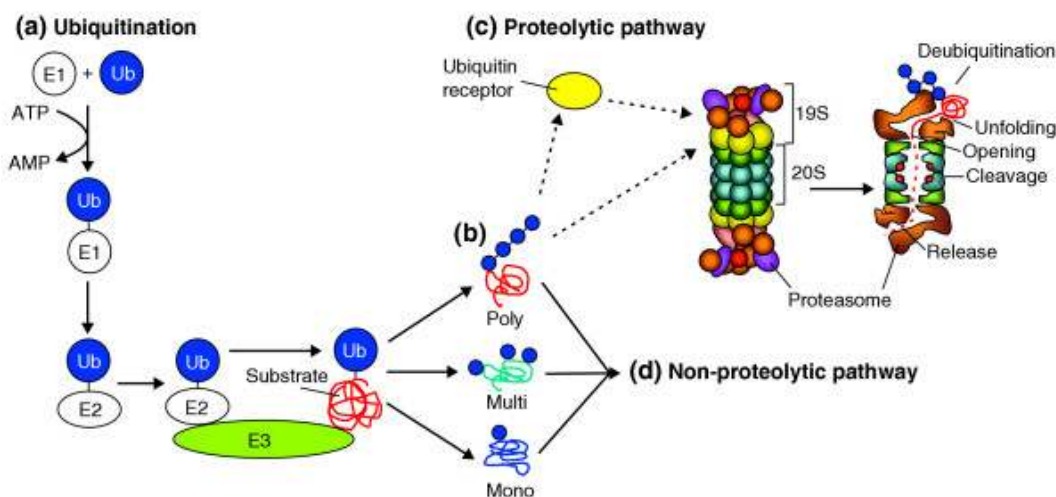
Το πρωτεάσωμα έχει μορφή βαρελιού και συγκροτείται από τέσσερις πρωτεϊνικούς δακτύλιους, καθένας από τους οποίους έχει επτά υπομονάδες. Οι δυο εξωτερικοί δακτύλιοι περιέχουν επτά διαφορετικές α ρυθμιστικές υπομονάδες (α1-α7) (πορτοκαλί), ενώ οι δυο εσωτερικοί δακτύλιοι επτά διαφορετικές β καταλυτικές υπομονάδες (β1-β7) (κίτρινες). Δύο 19S σύμπλοκα (βυσσινί) ενώνονται στα άκρα του 20S πρωτεασώματος (ένα σε κάθε άκρο) με υδρόλυση ATP, δημιουργώντας

έτσι το 26S πρωτεάσωμα που είναι υπεύθυνο για την ATP-εξαρτώμενη αποικοδόμηση των πρωτεϊνών που έχουν σημειωθεί με ουβικιτίνη, (McNaught et al., 2001).

Η ίδια η δομή του πρωτεασώματος, δηλαδή η απομόνωση των ενεργών κέντρων στο εσωτερικό της πρωτεασωματικής κοιλότητας και το κλείσιμο της κοιλότητας από τους α δακτυλίους, αποτελούν το πρώτο επίπεδο ρύθμισης της πρωτεόλυσης, καθώς έτσι μειώνονται κατά πολύ οι πιθανότητες μη ειδικής εισαγωγής υποστρωμάτων στο εσωτερικό του συμπλόκου.

A.4 Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και τα άλλα πρωτεολυτικά συστήματα

Πέρα από το μονοπάτι ουβικιτίνης – πρωτεασώματος (Εικόνα 12), ενεργό ρόλο στη διατήρηση της πρωτεόστασης έχει και το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος. Το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος εμπλέκεται στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών με μεγάλο χρόνο ζωής, πρωτεϊνών-συσσωματωμάτων και μη λειτουργικών κυτταρικών οργανιδίων, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Έχειδειχθεί ότι οι ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες μπορούν να αποικοδομηθούν από την αυτοφαγία, κυρίως όταν το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος δυσλειτουργεί (Kirkin et al., 2009; Korolchuk et al., 2010).



Εικόνα 12: Το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος

Το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος: (α) Η ουβικιτίνη ενεργοποιείται από ένα ένζυμο ενεργοποίησης (E1) της ουβικιτίνης και μεταφέρεται σε υπόστρωμα πρωτεϊνών από ένζυμο συζευγμένα με ουβικιτίνη (E2) και λιγάσες ουβικιτίνης (E3), αποτέλεσμα (β) είτε προσάρτηση ενός ενιαίου μορίου ουβικιτίνης (μόνο-ουβικιτίνης), προσκόλλησης των πολλαπλών μονάδων ουβικιτίνης σε διάφορα υπολείμματα υποστρώματος λυσίνης για την ίδια πρωτεΐνη (πολύ-ουβικιτινίωση) ή τη σύνθεση αλυσίδων της ουβικιτίνης (πολύ-ουβικιτινίωση). (γ) Πολλές πολύ-ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες, στη συνέχεια, αποδομούνται από το 26S πρωτεάσωμα, που αποτελείται από το καταλυτικό σύμπλοκο 20S και τα 19S ρυθμιστικά σύμπλοκα. Τα υποστρώματα αποικοδόμησης παραδίδονται είτε στο

πρωτεάσωμα από διαλυτούς υποδοχείς ουβικιτίνης ή αναγνωρίζονται από την εγγενή δραστικότητα-δέσμευση ουβικιτίνης - του 19S συμπλόκου. Στο 19S σύμπλοκο του πρωτεασώματος, η αλυσίδα ουβικιτίνης αποσυναρμολογείται, και το υπόστρωμα ξετυλίγεται πριν μπορέσει να εισέλθει στην κοιλότητα της υπομονάδας του 20S συμπλόκου, όπου λαμβάνει χώρα η πρωτεόλυση. Τέλος, τα πρωτεολυτικά θραύσματα εξέρχονται από το πρωτεάσωμα με ένα απλό κατανοητό τρόπο. (δ) Ουβικιτινώση μπορεί, επίσης, να ρυθμίζει άμεσα τη λειτουργία της πρωτεΐνης σε πρωτεόλυση με ανεξάρτητο τρόπο, μέσω μόνο- ή πολύ-ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών (Kaiser & Huang, 2005).

A.4.1 Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και οι κυτταρικές αντιοξειδωτικές αποκρίσεις

Η απόκριση του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της πρωτεόστασης. Το κύριο αντιοξειδωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι είναι αυτό του Nrf2/Kear1 (Sykiotis&Bohmann, 2008), όπως αναφέρθηκε νωρίτερα. Παρουσία οξειδωτικού στρες, ο Nrf2 ενεργοποιείται και συσσωρεύεται στον πυρήνα, όπου διμερίζεται με την πρωτεΐνη Maf. Το διμερές, στη συνέχεια, προσδένεται σε στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (AREs) και ενεργοποιεί την έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, καθώς και των ενζύμων αντιοξειδωτικής απόκρισης της φάσης II (Sykiotis & Bohmann, 2010).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, προηγούμενες *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι ο Nrf2 επάγει την ενεργοποίηση της έκφρασης του πρωτεασώματος παρουσία οξειδωτικού στρες και έτσι, θεωρείται υποψήφιος μεταγραφικός παράγοντας ρύθμισης της έκφρασης των πρωτεασωματικών γονιδίων (Grimberg et al., 2011). Επίσης, *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι ο Nrf2 πιθανά εμπλέκεται και στη ρύθμιση των ενδογενών επιπέδων των πρωτεασωματικών γονιδίων (Tsakiri et al., 2013). Επιπλέον, βρέθηκε ότι, σε σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων, δυσλειτουργία του πρωτεασώματος προκαλεί την επαγωγή της έκφρασης του πρωτεασώματος, μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, ο οποίος ενεργοποιείται από την αύξηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, οι οποίες προέρχονται από το μιτοχόνδριο. Αντίθετα, σε γηρασμένους σωματικούς ιστούς δεν παρατηρήθηκε η ενεργοποίηση του Nrf2 ύστερα από πρωτεασωματική δυσλειτουργία. Σε αντίθεση με τους σωματικούς ιστούς των εντόμων, στις γονάδες νεαρών και γηρασμένων εντόμων το μονοπάτι του Nrf2 ενεργοποιήθηκε, μετά από επίδραση όμοιου πρωτεοτοξικού στρες που προκλήθηκε στους σωματικούς ιστούς (Tsakiri et al., 2013).

A.5 Γήρανση και σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, το πρωτεάσωμα είναι το κύριο πρωτεολυτικό μονοπάτι αποικοδόμησης πρωτεϊνών με μικρό χρόνο ζωής, που έχουν σημανθεί με ουβικιτίνη καθώς και οξειδωμένων ή/και μη λειτουργικών πρωτεϊνών (Kästle & Grune, 2011). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση και η ενεργότητα του πρωτεασώματος μειώνεται κατά την κυτταρική και την *in vivo* γήρανση (Chondrogianni et al., 2003; Grune et al., 2005; Vernace et al., 2007; Tsakiri et al., 2013). Συγκεκριμένα, *in vitro* μελέτη σε ανθρώπινα γερασμένα κύτταρα έδειξε μείωση της έκφρασης των καταλυτικών υπομονάδων του 20S πρωτεασώματος και των υπομονάδων του 19S ρυθμιστικού μορίου, κάτι που συμφωνεί με την παρατηρηθείσα χαμηλή ενεργότητα του πρωτεασώματος και τη συσσώρευση

ουβικιτινιωμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών (Chondrogianni et al., 2003). Ακόμη, έρευνα σε αιωνόβιους ανθρώπους έδειξε την απρόσμενη παραμονή της ενεργότητας του πρωτεασώματος σε επίπεδα όμοια με αυτά των νεαρών ατόμων (Chondrogianni et al., 2000). Τέλος, έρευνες στο δίπτερο έντομο *Drosophila melanogaster* δείχνουν τη μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας και τη συσσώρευση των ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Έτσι, η μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας φαίνεται πως συνδυάζεται με μείωση της έκφρασης του πρωτεασώματος κατά τη γήρανση (Vernace et al., 2007), χωρίς να είναι γνωστός ο μηχανισμός αυτής της μειορρύθμισης της έκφρασης του πρωτεασώματος. Επίσης, πειράματα στο ίδιο μοντέλο γήρανσης έδειξαν ότι ο φαινότυπος της γήρανσης, αλλά και διάφορες ηλικιο-εξαρτώμενες ασθένειες συνοδεύονται από αυξημένα επίπεδα μη ενζυματικά τροποποιημένων πρωτεϊνών και λιποφουσκίνης. Οι πρωτεΐνες αυτές συσσωρεύονται στους σωματικούς ιστούς και στην αιμολέμφο των εντόμων, με αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας των πρωτεασωμικών πεπτιδασών και κατ' επέκταση την ελάττωση της βιωσιμότητας (Tsakiri et al., 2013).

Επιπρόσθετα, προηγούμενες μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα έχουν δείξει ότι πιθανώς τα ROS αναστέλλουν το πρωτεάσωμα (Reinheckel et al., 1998), και καθώς συσσωρεύονται με τη γήρανση, συμβάλλουν όλο και περισσότερο στη δυσλειτουργία του με άμεσο και έμμεσο τρόπο. Με άμεσο τρόπο τροποποιώντας τις υπομονάδες του ίδιου του πρωτεασώματος και έμμεσα τροποποιώντας πρωτεΐνες και λιπίδια, τα οποία δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται στα κύτταρα (Grune et al., 1997). Αυτές οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, που δεν μπορούν να αποικοδομηθούν, συναντώνται κυρίως σε μεταμιτωτικά κύτταρα όπως οι νευρώνες, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στη συσσώρευση αυτών των συναθροισμάτων (aggregates), τα οποία επηρεάζουν πολυάριθμα κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως και το πρωτεολυτικό μονοπάτι. Τα μεταμιτωτικά κύτταρα λόγω της ανικανότητάς τους να διαιρεθούν, δεν μπορούν να μεταβιβάσουν μέρος της ποσότητας στρες στα θυγατρικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία τοξικού στρες.

Η μείωση της λειτουργικότητας του πρωτεασώματος έχει συσχετιστεί επίσης με ασθένειες του γήρατος, όπως η νόσος Alzheimer (Alzheimer's disease) και το Parkinson (Parkinson's disease), στις οποίες η ενεργότητα του πρωτεασώματος εμφανίστηκε μειωμένη (Takalo et al., 2013). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ενεργότητα και η έκφραση του πρωτεασώματος φαίνεται να αυξάνονται κατά την καρκινογένεση. Σε αρκετούς τύπους καρκίνου, η αύξηση της ενεργότητας του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, κατά την καρκινογένεση, ενδεχομένως συνδέεται με την προσπάθεια προσαρμογής των καρκινικών κυττάρων σε καταστάσεις υψηλού πρωτεοτοξικού στρες (Touglakos et al., 2013). Επομένως, το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος θεωρείται τα τελευταία χρόνια στόχος για την ανάπτυξη αντικαρκινικών θεραπειών.

Α.6 «Φυσικά προϊόντα με αντιγηραντικές ή αντιοξειδωτικές δράσεις»

Τα φυσικά προϊόντα είναι γνωστό ότι αποτελούν τη βάση πολλών φαρμακευτικών σκευασμάτων που κυκλοφορούν σήμερα και ειδικότερα της κατηγορίας των αντικαρκινικών (Harvey, 2008; Newman et al., 2008; Newman & Cragg, 2016). Πάνω από 100 μόρια φυσικής προέλευσης, υποβάλλονται σε ετήσια βάση σε κλινικές δοκιμές και τουλάχιστον 100 παρόμοια μόρια βρίσκονται σε προκλινική ανάπτυξη. Τα περισσότερα από αυτά τα προϊόντα προέρχονται από φυτά και μικροβιακές πηγές, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 1** (Harvey, 2008; Li et al., 2009).

Πίνακας 1: Φάρμακα που βασίζονται σε φυσικά προϊόντα σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης

Στάδιο ανάπτυξης	Φυτά	Βακτήρια	Μύκητες	Ζώα	Ημισυνθετικά	Συνολικά
Προκλινικό	46	12	7	7	27	99
Φάση I	14	5	0	3	8	30
Φάση II	41	4	0	10	11	66
Φάση III	5	4	0	4	13	26
Προ-καταχώρηση	2	0	0	0	2	4
Συνολικά	108	25	7	24	61	225

Πηγή: Harvey 2008, Pharmaprojects database (March 2008).

Φυσικές ενώσεις, που έχει δείχθει ότι καθυστερούν τη γήρανση σε επίπεδο οργανισμού (δηλαδή εμφανίζουν *in vivo* αποτελέσματα αντιγήρανσης σε μοντέλα οργανισμών), μπορούν να ομαδοποιηθούν σύμφωνα με την πηγή της απομόνωσης (θαλάσσιοι οργανισμοί, μικροοργανισμοί και φυτά).

Από τη μία πλευρά, ο περιορισμός θερμίδων (**CR: Caloric Restriction**) έχει αποδειχθεί ότι παρατείνει τη διάρκεια ζωής σε διάφορα ζωικά μοντέλα (McCay et al., 1935; Lin et al., 2002; Partridge et al., 2005; Lee et al., 2006). Από την άλλη πλευρά, η συμπλήρωση των διαφορετικών φαρμακοτροφίμων στην καθημερινή διαίτα έχει, επίσης, αναγνωριστεί ως ένας δυναμικός τρόπος για να επιβραδυνθεί η διαδικασία της γήρανσης (Piper & Bartke, 2008). Η διαιτητική τροποποίηση πιστεύεται ότι είναι σε θέση να παρατείνει τη διάρκεια ζωής και να επιβραδύνει τις ασθένειες του γήρατος. Η *Drosophila melanogaster* είναι ένας οργανισμός – μοντέλο, που χρησιμοποιείται για την εκπόνηση μελετών για τη διατροφή και τη φαρμακολογία, καθώς και για τη γήρανση, εφόσον μοιράζεται πολλά κοινά βιολογικά μονοπάτια, και πάνω από το 70 % των γνωστών γονιδίων με τα θηλαστικά (Minois, 2006).

Παρακάτω αναφέρονται, ως παραδείγματα, μελέτες που ερεύνησαν φυσικές ενώσεις και εκχυλίσματα με πιθανή αντιγηραντική ή/ και αντιοξειδωτική δράση σε *in vivo* μοντέλα και κυρίως χρησιμοποιώντας ως μοντέλο το έντομο *D. melanogaster*. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε σε μελέτες, όπου εκτός από την επίδραση στην παράταση της διάρκειας ζωής και στη βελτίωση της ποιότητας της ζωής των εντόμων, η

δραστηριότητα μιας ένωσης σχετίζεται με ένα συγκεκριμένο μονοπάτι σηματοδότησης.

A.6.1 Φυσικές ενώσεις που δρουν ως ρυθμιστές αντιγήρανσης

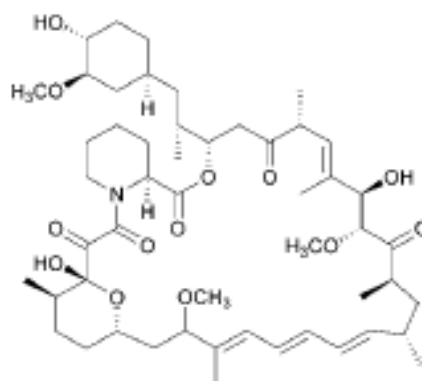
Στην ενότητα αυτή, αναφέρονται ενώσεις που έχουν το δυναμικό να αναπτυχθούν δεδομένου ότι δρουν ως *in vivo* ρυθμιστές αντιγήρανσης στο δίπτερο έντομο *Drosophila melanogaster*.

A.6.1.1 Φυσικές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από μικροοργανισμούς

Η τεράστια βιοποικιλότητα των θαλάσσιων οικοσυστημάτων προσφέρουν πολλαπλές ευκαιρίες για βιο-αναζήτηση, εκμετάλλευση και χρήση φυσικών ενώσεων. Οι θαλάσσιοι οργανισμοί έχουν την ικανότητα να παράγουν μια τεράστια ποικιλία των μορίων με μοναδικά δομικά χαρακτηριστικά και βιολογική δραστηριότητα, που οφείλεται στις φυσικοχημικές ιδιότητες του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Έτσι, το θαλάσσιο περιβάλλον είναι σίγουρα μια ενδιαφέρουσα πηγή φυσικών ενώσεων με ελπιδοφόρους νέους σκελετούς μορίων με ισχυρές αντιγηραντικές ιδιότητες. Αρκετές φυσικές ενώσεις, που απομονώθηκαν από θαλάσσιους οργανισμούς, βρέθηκαν να αποτρέπουν την κυτταρική γήρανση και να ασκούν αντιφωτογήρανση και φωτοπροστατευτική δράση (Gröniger et al., 2000; Ramjee et al., 2010).

Ραπαμυκίνη

Απομονώθηκε για πρώτη φορά από το βακτήριο *Streptomyces hygroscopicus* στέλεχος AY B994, (Εικόνα 13). Ο αντιμυκητιασικός αυτός παράγοντας αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο φυσικό προϊόν με βάση τις αντιγηραντικές του ιδιότητες και χρησιμοποιείται σήμερα ως ένα ανοσοκατασταλτικό. Έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας ισχυρός αναστολέας του μονοπατιού TOR, ενώ σίτιση ενήλικων εντόμων *D. melanogaster* με 200 mM ραπαμυκίνης είχε ως αποτέλεσμα την επέκταση ζωής, που συσχετίστηκε με αυξημένη αντοχή τόσο σε αστία όσο και σε οξειδωτικό στρες. Η ανάλυση των σχετικών μηχανισμών αποκάλυψε ότι η ραπαμυκίνη αυξάνει τη μακροβιότητα μέσω (μεταξύ άλλων) αναστολής του μονοπατιού TOR και προκάλεσε μεταβολές και στην αυτοφαγία και στο ποσοστό της πρωτεϊνικής σύνθεσης (Bjedov et al., 2010).

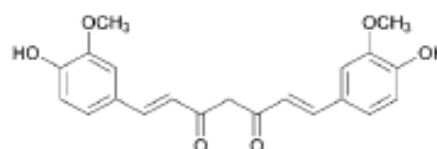


Εικόνα 13: Χημική δομή ραπαμυκίνης

A.6.1.2 Φυσικές ενώσεις που προέρχονται από φυτά

Κουρκουμίνη

Αποτελεί μια πολυφαινολική βιοδραστική ένωση και προέρχεται από το ρίζωμα του φυτού *Curcuma longa* (Zingiberaceae) (**Εικόνα 14**). Χορήγηση 0.5-1.0 mg g⁻¹ της κουρκουμίνης στο μέσο καλλιέργειας παρατείνει κατά περισσότερο από 10 % τη μέση διάρκεια ζωής των εντόμων *D. melanogaster*, καταστέλλοντας το οξειδωτικό στρες και την υπεροξειδωση των λιπιδίων, μειώνοντας τη συσσώρευση της μηλονοδιαλδεύδης και βελτιώνοντας την κινητική απόδοση. Αυτές οι επιδράσεις έχουν αποδοθεί στην διαμόρφωση ενός αριθμού στρεσογόνων γονιδίων απόκρισης, συμπεριλαμβανομένου του αντιοξειδωτικού ενζύμου υπεροξειδικής δισμουτάσης (Lee et al., 2010; Shen et al., 2013).

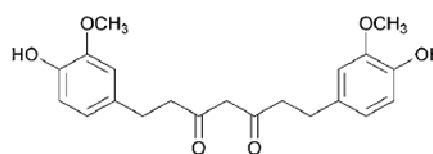


Εικόνα 14: Χημική δομή κουρκουμίνης

Είναι ενδιαφέρον, ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις της κουρκουμίνης δεν παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των CR εντόμων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η κουρκουμίνη και η CR λειτουργούν μέσω των ίδιων οδών θρεπτικής σηματοδότησης (Soh et al., 2013). Προς στήριξη των ευεργετικών *in vivo* επιδράσεων της κουρκουμίνης (Alavez et al., 2011), αυτή η ένωση βρέθηκε να αυξάνει σημαντικά τόσο την ποιότητα ζωής όσο και τη διάρκεια ζωής (έως 75 %) σε συγκέντρωση 0,01 % (w/w), όταν δοκιμάστηκε σε πέντε διαφορετικά μοντέλα *D. melanogaster* της νόσου του Alzheimer. Η επίδραση αυτή εξηγείται από το εύρημα ότι η κουρκουμίνη προώθησε τη μετατροπή αμυλοειδούς ινιδίου με τη μείωση των προ-ινιδικών / ολιγομερικών ειδών βήτα-αμυλοειδούς, με αποτέλεσμα τη μειωμένη νευροτοξικότητα (Caesar et al., 2012).

Τετραϋδροκουρκουμίνη

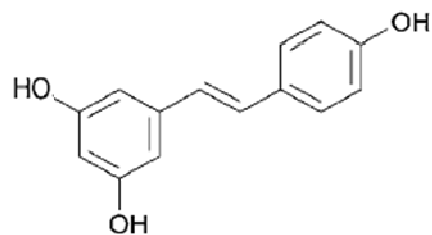
Είναι ένας μεταβολίτης της κουρκουμίνης, (**Εικόνα 15**) και έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει το μέσο προσδόκιμο ζωής, όταν χορηγείται σε έντομα *D. melanogaster* σε μια συγκέντρωση 50 mM και κατέστειλε το οξειδωτικό στρες μέσω ρύθμισης του μονοπατιού των σιρτουϊνών και του μεταγραφικού παράγοντα FOXO (Shen et al., 2013).



Εικόνα 15: Χημική δομή τετραϋδροκουρκουμίνης

Ρεσβερατρόλη

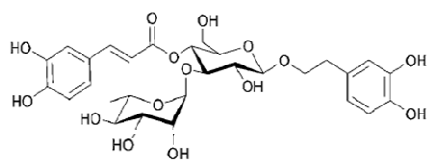
Είναι μία φυσική ένωση της κατηγορίας των φυτοαλεξινών με βασική δομή των στιλβενίων (Στιλβένιο: 1,2-διφαινυλο-αιθυλένιο), (Εικόνα 16). Εντοπίζεται σε διάφορα μούρα, καρύδια και άλλες φυτικές πηγές. Ανήκει στην κατηγορία των ενεργοποιητών σιρτουϊνών. Η δραστηριότητα των σιρτουϊνών έχει θετική συσχέτιση με τα αποτελέσματα επέκτασης της διάρκειας ζωής και για το λόγο αυτό έχουν γίνει αρκετές μελέτες απομόνωσης τους. Η ρεσβερατρόλη ασκεί ευεργετικές επιδράσεις κατά τη φυσιολογική γήρανση και σε αυτό το αποτέλεσμα, ίσως να εμπλέκονται οι σιρτουΐνες και, πιθανότατα, μονοπάτια που σχετίζονται με το στρες. Αντίθετα με τα παραπάνω, έχειδειχθεί ότι χορήγηση 200 mM ρεσβερατρόλης αύξησε τη μακροζωία στα έντομα κατά 20 % χωρίς τη μεσολάβηση της σιρτουΐνης sir-2 (Bauer et al., 2004; Wood et al., 2004).



Εικόνα 16: Χημική δομή ρεσβερατρόλης

Ακτεοσίδη

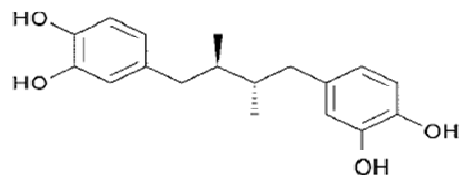
Συμπλήρωμα 0,64 σε 2,56 mg mL⁻¹ του φυτικού φαινυλεθανοειδούς γλυκοζίτη, (Εικόνα 17), σε μέσο καλλιέργειας εντόμων *D. melanogaster* αύξησε τη διάρκεια ζωής κατά 9 έως 15 % (Pan et al., 2008).



Εικόνα 17: Χημική δομή ακτεοσίδης

Νορδιδρογουαϊαρετικό οξύ

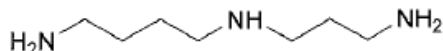
Είναι μία φυτική λιγνάνη (Εικόνα 18). Παλαιότερες μελέτες έδειξαν αυξανόμενες θετικές επιπτώσεις στο μέσο προσδόκιμο ζωής εντόμων των φρούτων, κουνουπιών και αρουραίων (Miquel et al., 1982).



Εικόνα 18: Χημική δομή νορδιδρογουαϊαρετικού οξέος

Σπερμιδίνη

Είναι μία πολυκατιονική πολυαμίνη (Εικόνα 19), που εμπλέκεται σε πολλαπλές βιολογικές διαδικασίες, και αναφέρεται λόγω της εξαιρετικής αντιγηραντικής της δραστηριότητας. Συγκεκριμένα, η σπερμιδίνη έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, λόγω της δράσης της ως επαγωγέας της αυτοφαγίας, και σε καλλιεργημένα κύτταρα και *in vivo*, (Eisenberg et al., 2009). Επίσης, έχειδειχθεί ότι ένα εξωγενές συμπλήρωμα των millimolar συγκεντρώσεων σπερμιδίνης αύξησε το χρόνο ζωής σε έντομα *D. melanogaster* (Morselli et al., 2009).



Εικόνα 19: Χημική δομή σπερμιδίνης

A.6.2 Εκχυλίσματα με αντιγηραντική δράση

Τα εκχυλίσματα αντιπροσωπεύουν πολύτιμες πηγές βιοδραστικών φυτικών ενώσεων και ως εκ τούτου σε αυτή την ενότητα θα αναφερθούν αυτά τα εκχυλίσματα, που έχουν τη δυνατότητα να καθυστερήσουν την κυτταρική γήρανση ή τη *in vivo* γήρανση στο δίπτερο έντομο *Drosophila melanogaster*.

A.6.2.1 Τα φυτικά εκχυλίσματα

Rosa damascena

Είναι ένας πολυετής θάμνος και ανήκει στην οικογένεια Rosaceae (**Εικόνα 20**). Καλλιεργείται κυρίως για το ροδέλαιο, που χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία, καθώς επίσης και για το ροδόνηρο που χρησιμοποιείται για τη γεύση και το άρωμα των τροφίμων. Ροδοπέταλα είναι μια πλούσια πηγή φαινολικών ενώσεων, όπως οι γλυκοζίτες φλαβονοειδών και οι ανθοκυανίνες και τα εκχυλίσματα τους ασκούν αντιοξειδωτικές και δέρματο-προστατευτικές δράσεις (Tabrizi et al., 2003; Schiber et al., 2005; Boskabady et al., 2006). Επιπλέον, έντομα *D. melanogaster*, που καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό μέσο, που περιέχει 2 mg mL⁻¹ υδατικό εκχύλισμα ροδοπετάλων, παρουσίασαν αυξημένη διάρκεια ζωής κατά 27 %, χωρίς μείωση της γονιμότητας, (Jafari et al., 2008). Το αποτέλεσμα αυτό αποδόθηκε στο εκχύλισμα *R. damascena* με την αντιοξειδωτική δράση (Schriner et al., 2012).



Εικόνα 20: *Rosa damascena*

Rhodiola rosea

Ανήκει στην οικογένεια Crassulaceae (**Εικόνα 21**) και το υδατοαλκοολικό εκχύλισμα, που λαμβάνεται από το φυτό, συμβάλλει σημαντικά στην προώθηση της υγείας λόγω των αντιοξειδωτικών του ιδιοτήτων. Οι ιδιότητες αυτές έχουν αποδοθεί σε μια σειρά δευτερογενών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων των μονοτερπενικών αλκοολών και γλυκοζιτών τους, κυανογενικών γλυκοσίδων, φλαβονοειδών, αρυλγλυκοσίδων, προανθοκυανιδινών, και άλλων παραγώγων φαινολικών οξέων. Αποδείχθηκε ότι αυτά τα εκχυλίσματα αύξησαν τη μακροζωία των εντόμων, χωρίς αρνητικές επιπτώσεις στην αναπαραγωγή ή στο ρυθμό μεταβολισμού (Jafari et al., 2007).



Εικόνα 21: *Rhodiola rosea*

Cynomorium songaricum

Είναι ένα παρασιτικό φυτό, που ανήκει στην οικογένεια Chenopodiaceae, (**Εικόνα 22**). Έχει χρησιμοποιηθεί, ευρέως, στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική ως τονωτικό, και επίσης, καταναλώνεται λόγω της υψηλής θρεπτικής του αξίας (Cui et al., 2013). Η σίτιση εντόμων με εκχυλίσματα *C. songaricum* (20 mg mL⁻¹) ενίσχυσαν τη γνωστική συμπεριφορά, αύξησαν την αντοχή στο στρες και επέκτειναν τη μέση διάρκεια των θηλυκών εντόμων (Liu et al., 2012).



Εικόνα 22: *Cynomorium songaricum*

Ayurvedic rasayanas

Ένα σύμπλεγμα φυτικού αγιουβερδικού σκευάσματος που βρέθηκε να παρατείνει τη διάρκεια ζωής σε έντομα κατά 55 % (**Εικόνα 23**) (Priyadarshini et al., 2010).



Εικόνα 23: *Ayurvedic rasayanas*

A.6.2.2 Εκχυλίσματα που προέρχονται από εδώδιμα φυτά

Όπως προαναφέρθηκε, οι παρεμβάσεις διατροφής, όπως η περιορισμένη λήψη θερμίδων (CR) ή ισορροπημένη υγιεινή διατροφή είναι από τις πιο αποτελεσματικές προσεγγίσεις για την επέκταση της ποιότητας ζωής ή / και της διάρκειας ζωής, που οφείλονται είτε σε παρατεταμένη ήπια ενεργοποίηση των οδών που ανταποκρίνονται στο στρες ή / και στα χαμηλά επίπεδα βλαβών στα βιομόρια. Επομένως, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα (μεταξύ άλλων) από τα βρώσιμα μπαχαρικά, όσπρια, λαχανικά ή φρούτα, έχουν επιδείξει σημαντική δραστηριότητα αντιγήρανσης, όταν δοκιμάζονται σε μοντέλα οργανισμούς.

Είναι ενδιαφέρον ότι η λεγόμενη μεσογειακή διατροφή, η οποία έχει καθιερωθεί από πολλές επιδημιολογικές μελέτες (Martinez-Gonzalez et al., 2009) ως διατροφικό πρότυπο, συνίσταται για την αύξηση του μέσου προσδόκιμου ζωής και της μακροζωίας και χαρακτηρίζεται από υψηλή πρόσληψη ελαιολάδου, φρέσκων φρούτων, όσπριων και λαχανικών και αντίστροφα από χαμηλή πρόσληψη ζωικού λίπους, κρέατος, μεταποιημένων προϊόντων με βάση το κρέας και τα αλμυρά τρόφιμα (Pérez-López et al., 2010; Bach-Faig et al., 2011), τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε πρόωρη κατάρρευση (ή απορρύθμιση) των αμυντικών μηχανισμών των κυττάρων ή / και να επιταχύνουν τα ποσοστά της αποικοδόμησης των βιομορίων.

Πολυφαινόλες του μήλου (applepolyphenol -AP-)

Το μήλο είναι καρπός του δέντρου *Malus domestica* και ανήκει στην οικογένεια Rosaceae, (Εικόνα 24). Είναι μια εξαιρετική πηγή διαιτητικών αντιοξειδωτικών πολυφαινολών (Lamperi et al., 2008; Wojdylo et al., 2008; Bellion et al., 2010; Yang et al., 2010). Η επίδραση των πολυφαινολών του μήλου (AP) έχει διερευνηθεί τόσο στη διάρκεια ζωής των εντόμων όσο και στην αλληλεπίδρασή τους με τις εκφράσεις των γονιδίων των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων, και συγκεκριμένα, της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD), της καταλάσης (CAT), της μεθουσέλας (MTH), της ρυθμιστικής υπομονάδας του πρωτεασώματος (Rpn11), και του κυτοχρώματος c οξειδάσης (CCO) στις υπομονάδες III και VIb και χρησιμεύουν ως πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια των ROS. Πειραματικά δεδομένα επιβεβαίωσαν ότι η μέση διάρκεια ζωής επεκτάθηκε σημαντικά κατά 10 % σε έντομα που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία AP, ενώ η αντιγηραντική δραστηριότητά τους, τουλάχιστον εν μέρει, σχετίζεται με τα παραπάνω γονίδια (Peng et al., 2011). Τα γονίδια αυτά είναι:



Εικόνα 24: *Malus domestica*

❖ **Γονίδιο κυτοχρωμικής οξειδάσης (CcO):** είναι το τελευταίο συστατικό της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC), και έχει αναφερθεί ότι οι υπομονάδες III και VIb μειώνονται σημαντικά σε έντομα μεγάλης ηλικίας (Ren et al., 2010). Επίσης, ανεπάρκεια της CcO θα οδηγούσε σε μείωση της δραστηριότητας της ETC ως σύνολο, λόγω της αυξημένης παραγωγής είτε ριζών ανιόντος υπεροξειδίου ή υπεροξειδίου του υδρογόνου στα μιτοχόνδρια (Sohal et al., 2008). Συνεπώς, είναι ευρέως αποδεκτό, ότι η μιτοχονδριακή αναπνευστική ικανότητα μειώνεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της γήρανσης.

❖ **Γονίδιο Rpn11:** έχει αναγνωριστεί σαν ένας καταστολέας του προοδευτικού νευροεκφυλισμού. Καταστολή του γονιδίου *Rpn11* μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση των ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών, να συντομεύσει τη διάρκεια ζωής και να μειώσει τη δραστηριότητα του 26S πρωτεασώματος (Tonoki et al., 2009).

❖ **Γονίδιο μεθουσέλα (MTH):** έχει δειχθεί ότι είναι ένα από τα γονίδια προσδιορισμού της μακροζωίας. Έχει αναφερθεί ότι τα έντομα, τα οποία εμφανίζουν μετάλλαξη στο γονίδιο *MTH*, μπορούν να ζήσουν 35 % περισσότερο από ό,τι φυσικού τύπου και τα έντομα αυτά παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή στην οξειδωτική καταπόνηση (Lin et al., 1998).

Origanum vulgare

Γνωστό και με την κοινή ονομασία ως ρίγανη, ανήκει στην οικογένεια Labiatae και είναι ένα αρωματικό πολυετές βότανο που χρησιμοποιείται ευρέως ως καρύκευμα, (Εικόνα 25). Θυμόλη και καρβακρόλη είναι τα κύρια συστατικά του ελαίου ρίγανης, το οποίο διαθέτει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, ενώ υδροαλκοολικά εκχυλίσματα του έχουν υψηλή περιεκτικότητα φαινολικών και είναι γνωστά για τις αντιυπερλιπιδαιμικές και αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (Zou et al., 2010; Dong et al., 2012; Licina et al., 2013). Ένα μείγμα από εκχυλίσματα ρίγανης και μούρου (σε μια συγκέντρωση 2 %) αύξησε τη διάρκεια ζωής σε έντομα, ακόμη και όταν η επέμβαση ξεκίνησε σε μέσης ηλικίας έντομα (Zou et al., 2012).



Εικόνα 25: *Origanum vulgare*

Eruca vesicaria subsp. sativa

Το βρώσιμο φυτό, κοινώς γνωστό ως ρόκα, ανήκει στην οικογένεια Cruciferae, (Εικόνα 26), και είναι μια εξαιρετική πηγή αντιοξειδωτικών, όπως φαινολικών ενώσεων, καροτενοειδών, γλυκοζινολικών και των προϊόντων αποδόμησής τους, όπως ισοθειοκυανικά. Σύμφωνα με πληροφορίες, εκχυλίσματα *E. vesicaria* (χορήγηση συγκέντρωσης 625 mg L⁻¹) μπορούν να αναστείλουν τη γονοτοξική δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και να αυξήσουν το μέσο προσδόκιμο ζωής των εντόμων *D. melanogaster* (Villatoro-Pulido et al., 2012).



Εικόνα 26: *Eruca vesicaria subsp. sativa*

Brassica oleracea var. italica

Το λαχανικό, γνωστό και ως μπρόκολο, ανήκει στην οικογένεια Brassicaceae, (Εικόνα 27), και είναι δημοφιλές όχι μόνο για τη γεύση του, αλλά και για τις δράσεις του, που προάγουν την υγεία, και έχουν αποδοθεί κυρίως σε γλυκοζινολικά και στα προϊόντα διάσπασής τους. Παράλληλη συμπλήρωση των κατεχινών πράσινου τσαγιού μαζί με εκχυλίσματα μπρόκολου σε έντομα αντιστρέφει μερικώς το λίπος, που προωθεί τη θνησιμότητα μέσω θετικής ρύθμισης των αντιοξειδωτικών ενζύμων καταλάσης και υπεροξειδικής δισμουτάσης (Grünwald et al., 2013).



Εικόνα 27: *Brassica oleracea var.italica*

Prunus persica var. *nectarine*

Ανήκει στην οικογένεια Rosaceae. Είναι ένα υποείδος του ροδάκινου και καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο, (Εικόνα 28). Οι καρποί του, που είναι γνωστοί ως "νεκταρίνια", καταναλώνονται ευρέως λόγω της ευχάριστης γεύσης τους και της υψηλής θρεπτικής αξίας, η οποία σχετίζεται κυρίως με την παρουσία σημαντικών συστατικών, που προάγουν την υγεία, δηλαδή της βιταμίνης C, ανθοκυανίνων και φλαβονοειδών (Cantin et al., 2009). Σε ένα μοντέλο *D. melanogaster*, συμπλήρωμα διατροφής με 0-4 % εκχύλισμα νεκταρινιού παρέτεινε τη διάρκεια ζωής (κατά 22 % στα θηλυκά), αύξησε τη γονιμότητα και μείωσε την έκφραση ορισμένων μεταβολικών και οξειδωτικών γονιδίων που αποκρίνονται στο στρες. Κυρίως, επέκταση της διάρκειας ζωής παρατηρήθηκε στα έντομα που τρέφονται είτε με πρότυπες, είτε με CR ή με υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά δίαιτες. Προτάθηκε από τους συγγραφείς ότι το νεκταρίνι προώθησε τη μακροζωία και την ποιότητα ζωής εν μέρει από τη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης και τη μείωση της οξειδωτικής βλάβης, (Boyd et al., 2011).



Εικόνα 28: *Prunus persica* var. *nectarine*

Vaccinium sp.

Το είδος *Vaccinium corymbosum*, κοινώς γνωστό και ως μύρτιλο, ανήκει στην οικογένεια Ericaceae (Εικόνα 29) και περιέχει ένα ευρύ φάσμα πολυφαινόλων, οι οποίες έχουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις. Αν και οι ανθοκυανίνες παρόμοιων καρπών, εμφανίζουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, ασκούν ευεργετικές επιδράσεις κυρίως στην υγεία λόγω της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας (Bornsek et al., 2012). Αποδείχθηκε πρόσφατα, ότι εκχυλίσματα από *Vaccinium cyanococcus* θα μπορούσαν να επεκτείνουν σημαντικά τη μέση διάρκεια ζωής [μέσω θετικής ρύθμισης των αντιοξειδωτικών ενζύμων (π.χ. υπεροξειδικής δισμουτάσης και καταλάσης)] και να ενισχύσουν, επίσης, την κινητική απόδοση των εντόμων *D. melanogaster* (Peng et al., 2012).



Εικόνα 29: *Vaccinium corymbosum*

Euterpe oleracea

Οι καρποί των αυτοφυών τροπικών φοινίκων Αζαί (Arecaceae) έχουν λάβει σημαντική προσοχή ως ένα νέο «σούπερ φρούτο», λόγω των πιθανών οφελών για την υγεία, (Εικόνα 30). Η υψηλή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη ικανότητα τόσο των φρούτων όσο και του χυμού Αζαί συνδέονται κυρίως με την παρουσία των πολυφαινόλων, όπως ανθοκυανινών, προανθοκυανιδίων, άλλων φλαβονοειδών και λιγνανίων (Chin et al., 2008; Kang et al., 2010; Kang et al., 2011). Σε μια πρόσφατη μελέτη σε έντομα, διαπιστώθηκε ότι αυτές οι αντιοξειδωτικές ενώσεις παρατείνουν τη διάρκεια ζωής μέσω της ενεργοποίησης των οδών που αποκρίνονται στο στρες (Sun et al., 2010).



Εικόνα 30: *Euterpe oleracea*
(Açai Palm)

Theobroma cacao

Ανήκει στην οικογένεια Sterculiaceae, (Εικόνα 31). Το κακάο και τα προϊόντα του, όπως η μαύρη σοκολάτα χρησιμοποιούνται όχι μόνο ως ένα ρόφημα, λόγω της ευχάριστης γεύσης τους αλλά και ως τροφή, καθώς αποτελούν εξαιρετικές πηγές πολυφαινόλων και φλαβονοειδών, που συμβάλλουν σημαντικά στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα της διατροφής, (Vinson et al., 1999; Lee et al., 2003; Vinson et al., 2006). Υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες σχετικά με τις ευεργετικές επιδράσεις του *T.*



Εικόνα 30: *Theobroma cacao*

cacao, οι περισσότερες των οποίων σχετίζονται με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φαινολικών συστατικών του. Συγκεκριμένα, οι πολυφαινόλες των φασολιών κακάου ανήκουν στις ομάδες των κατεχινών [(-) - επικατεχίνη, (+) - κατεχίνη, (+) - γαλλοκατεχίνη και (-) - επιγαλλοκατεχίνη], ανθοκυανινών (κυανιδίνη-3-αλ-αραβινοσίδη και κυανιδίνη-3-D-γαλακτοσίδη) και προανθοκυανιδίων (B1, B2, B3, B4, B5, C1, και D) (Andujar et al., 2012).

Ωστόσο, είναι εδραιωμένη η αντιοξειδωτική δράση του κακάο στην άμυνα έναντι των ROS και έχει την ικανότητά να παρατείνει τη διάρκεια ζωής σε έντομα *Drosophila melanogaster* υπό συνθήκες μέτριου οξειδωτικού στρες ή σε μια διατροφή που περιέχει βαρέα μέταλλα. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι ενεργεί ως χηλικός παράγοντας βαρέων μετάλλων ανεξάρτητα από τις αντιοξειδωτικές του δραστηριότητες, με πείραμα όπου τα συμπληρώματα κακάο αύξησαν φανερά την επιβίωση των λαρβών προς το ενήλικο στάδιο, ενώ βρίσκονταν μέσα σε υπόστρωμα με μέταλλο. Επομένως, είναι ολοφάνερη η επίδραση του κακάο στη μακροβιότητα των εντόμων, η οποία προκύπτει από το συνδυασμό των μεταλο-χηλικών, αντιοξειδωτικών και προ-οξειδωτικών ιδιοτήτων του, (Bahadorani & Hilliker, 2008).

Stachys lavandulifolia subsp. *lavandulifolia*

Ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae (**Εικόνα 32**). Η έγχυση των εναέριων μερών ανθοφορίας του χρησιμοποιούνται ευρέως στη νότια Ανατολία (Μικρά Ασία ή ανατολική χερσόνησος Τουρκίας) ως τσάι βοτάνων και έχουν επιδείξει αξιοσημείωτη δράση έναντι δραστικών μορφών οξυγόνου (Isxcan et al., 2012). Η αξιολόγηση των υδατικών και αιθανολικών εκχυλίσμάτων, που λαμβάνονται από φρεσκοκομμένα λουλούδια και φύλλα *S. lavandulifolia* όσο αφορά τη μακροζωία των εντόμων *D. melanogaster*, έδειξε σημαντική θετική επίδραση στην αύξηση της μακροζωίας κατά 38 % (Altun et al., 2010).



Εικόνα 31: *Stachys lavandulifolia*

Camelia sinensis

Ανήκει στην οικογένεια Theaceae και είναι γνωστό και με την κοινή ονομασία πράσινο τσάι (**Εικόνα 33**). Προέρχεται από την Κίνα και έχει γίνει σχετικά πρόσφατα δημοφιλές στους δυτικούς πολιτισμούς, γιατί τα εκχυλίσματα του, τα οποία είναι πλούσια σε πολυφαινολικές κατεχίνες, διαθέτουν (μεταξύ άλλων) αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, φωτοπροστατευτική και χημειοπροστατευτική δράση (White et al., 2012). Εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού (10 mg mL^{-1}) ασκούν αντιοξειδωτική δράση σε έντομα και παρατείνουν τη μέση διάρκεια ζωής τους κατά 16 % (Li et al., 2007). Ομοίως, το μαύρο τσάι (10 mg mL^{-1}) το οποίο είναι ισχυρότερο σε γεύση και περιέχει μεγάλη ποσότητα αντιοξειδωτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των κατεχινών και θειοφλαβινών φέρεται να παρατείνει τη διάρκεια ζωής σε έντομα κατά 10 %, πιθανόν λόγω θετικής ρύθμισης των αντιοξειδωτικών ενζύμων δισμουτάσης και καταλάσης (Peng et al., 2009).



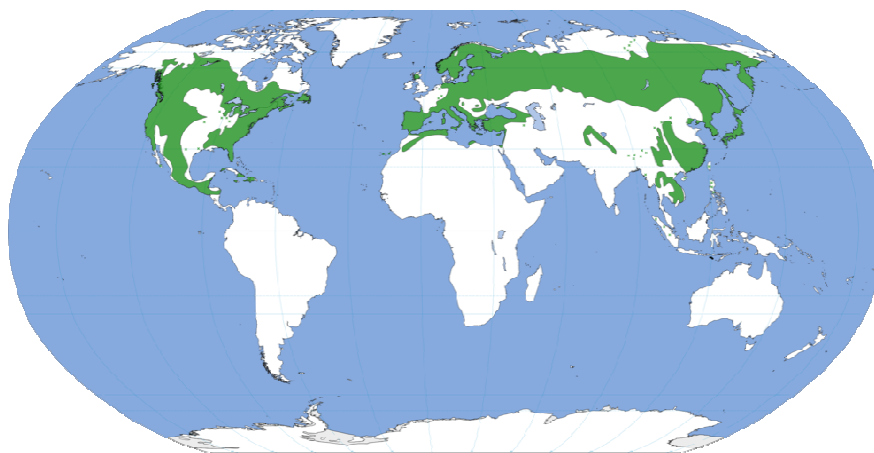
Εικόνα 32: *Camelia sinensis*

A.7 Γένος *Pinus*

Το γένος *Pinus* έχει 13 είδη στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο, αρκετά από τα οποία υποδιαιρούνται σε υποείδη και/ ή ποικιλίες, και κάποια από αυτά έχουν προαχθεί ξανά σε είδη. Η περιοχή των Βαλκανίων και η Μεσόγειος έχουν το μεγαλύτερο μέρος αυτής της οριοθετημένης ποικιλότητας, αντιστακώνοντας μερικώς την καταφυγή των δενδρικών ειδών που υπήρχαν νότια των Άλπεων και των Πυρηναίων κατά τη διάρκεια της παγετωνοποίησης κατά την Πλειστόκαινο (Farjon, 2013). Στην Ελλάδα βρίσκονται 8 είδη πεύκου που είναι αυτοφυή :

- ✓ ***P. halepensis***. Το κοινό πεύκο, γνωστό με την ονομασία Χαλέπιος Πεύκη.
- ✓ ***P. brutia***. Το Θασίτικο πεύκο ή Τραχεία πεύκη.
- ✓ ***P. nigra***. Το μαυρόπευκο, κοινή ονομασία: Μαύρη πεύκη.
- ✓ ***P. sylvestris***. Το δασόπευκο, λιάχα ή Δασική πεύκη, κοινή ονομασία: Πεύκη η αγρία.
- ✓ ***P. mugo***. Το βουνόπευκο, κοινή ονομασία: Πεύκο μούγκο.
- ✓ ***P. peuce***. Το Μακεδονίτικο ή Βαλκανικό πεύκο.
- ✓ ***P. pinea***. Η Κουκουναριά ή ήμερο πεύκο κοινή ονομασία: Πεύκη η πίτυς.
- ✓ ***P. heldreichii***. Το ρόμπολο ή λευκόδερμο, κοινή ονομασία: Λευκόδερμη πεύκη.

Αν και η χρήση των φλοιών των πεύκων χρονολογείται από τους αρχαίους χρόνους, πρόσφατα έχει βρει ευρεία εφαρμογή στους τομείς της διατροφής, της υγείας, της ιατρικής και της κοσμετολογίας. Τα εκχυλίσματα των φλοιών των πεύκων περιέχουν πολυάριθμες φαινολικές ενώσεις όπως την κατεχίνη, την επικατεχίνη, την ταξιφολίνη, καθώς και τα φαινολικά οξέα που χαίρουν ιδιαίτερης προσοχής λόγω της αντιμεταλλαξιαγόνας και αντικαρκινικής δράσης τους και της υψηλής αντιοξειδωτικής τους δραστηριότητας (Yesil-Celiktas, 2009).



Εικόνα 33: Γεωγραφική κατανομή του γένους *Pinus*

Οι περισσότερες περιοχές του Βορείου Ημισφαιρίου (βλέπε κατάλογο των πεύκων από την περιοχή) φιλοξενούν κάποια ενδημικά είδη πεύκων. Ένα είδος (πεύκο Σουμάτρας) διασχίζει τον ισημερινό στη Σουμάτρα σε 2 ° S. Στη Βόρεια Αμερική, διάφορα είδη εμφανίζονται σε περιοχές με γεωγραφικά πλάτη από το μακρινό Βορρά (66 ° N) ως το μακρινό Νότο (12 ° N).

A.7.1 *Pinus pinaster* – Aiton

A.7.1.1 Βοτανική ταξινόμηση



Επιστημονική ονομασία

Βασίλειο:	Plantae
Υποβασίλειο	Viridiplantae
Υπο-υπαβασίλειο	Streptophyta
Υπεράθροισμα	Embryophyta
Αθροισμα	Tracheophyta
Υποάθροισμα	Spermatophytina
Υπο-υποάθροισμα	Gymnospermae
Κλάση	Pinopsida
Τάξη:	Pinales
Οικογένεια:	Pinaceae
Γένος:	<i>Pinus</i>
Είδος:	<i>Pinus pinaster</i> (Aiton)

Εικόνα 34: *Pinus pinaster* (Aiton)

(Συστηματική κατάταξη του είδους *Pinus pinaster* κατά το ITIS)

A.7.1.2 Περιγραφή και Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Η **θαλάσσια πεύκη** (*Pinus pinaster* Ait.) είναι ένα δέντρο μεσαίου μεγέθους με ύψος από 20 έως 35 μέτρα και με διάμετρο κορμού έως 1.2 μέτρα, κατ'εξάιρεση 1.8 μέτρα (**Εικόνα 35**). Η κόμη είναι κανονική, ωοειδής ή κωνική σε νεαρά πεύκα και ακανόνιστη και ανοικτή σε ενήλικα πεύκα, με κλαδιά πυκνά καλυμμένα στα άκρα. Ο φλοιός είναι με πορτοκαλί-κόκκινο χρώμα, αρκετά παχύς και με βαθιές σχισμές στη βάση του κορμού και κάπως λεπτότερες στην άνω στεφάνη (**Εικόνα 36**), (Eckenwalder, 2009). Διαθέτει ριζικό σύστημα, που συνίσταται σε μια βαθιά κύρια ρίζα με καλά ανεπτυγμένες δευτερεύουσες ρίζες. Τα φύλλα του είναι βελόνες, που εμφανίζονται κυρίως σε ζεύγη, αλλά περιστασιακά σε ομάδες των 3 (Correia et al., 2007), έχουν μήκος 10-25 εκατοστά και πάχος 2 χιλιοστά, με γυαλιστερό πράσινο χρώμα και άρτια σηματοδοτημένες στοματικές γραμμές και στις δύο όψεις. Αντέχουν 2 έως 3 χρόνια. Κατέχει τις μεγαλύτερες και πιο ισχυρές βελόνες όλων των ευρωπαϊκών ειδών πεύκης (**Εικόνα 37**).



Εικόνα 35: Φλοιός του *Pinus pinaster*

Σε σύγκριση με άλλα μεσογειακά πεύκα, η θαλάσσια πεύκη διαθέτει μεγάλους και ανθεκτικούς κώνους. Είναι ελαφρώς ασύμμετροι, με ωοειδές-κωνικό σχήμα και ομαδοποιούνται σε συστάδες. Οι ώριμοι κώνοι έχουν μήκος περίπου 15 εκατοστά (σε μια κλίμακα από 8 έως 22 εκατοστά) και πλάτος από 4 έως 6 εκατοστά ευρεία στη βάση. Όταν είναι κλειστοί, αρχικά είναι πράσινοι και κατά την ωρίμανση αποκτούν γυαλιστερό ανοικτό καφέ χρώμα (**Εικόνα 37**). Η ωρίμασή τους συμβαίνει δύο χρόνια μετά την επικονίαση και ανοίγουν το ίδιο καλοκαίρι, ή έως και 10 χρόνια αργότερα, ή μετά από θέρμανση από μια δασική πυρκαγιά, απελευθερώνοντας τους σπόρους. Σε περιοχές με υψηλή ένταση και συχνότητα πυρκαγιών, συνήθως παρουσιάζονται βραδύχωροι κώνοι. Οι σπόροι είναι μικροί γυαλιστεροί με χρώμα μαύρο-καφέ ή ματ γκρι, με μήκος 8-10 χιλιοστά, με ένα μεγάλο φτερό μήκους 20-25 χιλιοστών, το οποίο αφαιρείται εύκολα και διασπείρονται με τον άνεμο (AbadViñas et al., 2016).



Εικόνα 36: Κώνος και φύλλωμα του *Pinus pinaster*

A.7.1.3 Γεωγραφική εξάπλωση

Το *Pinus pinaster* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο, θερμόφιλο και ιθαγενές κωνοφόρο στη λεκάνη της δυτικής Μεσογείου. Εμφανίζεται στην Ιβηρική Χερσόνησο, στη νότια Ευρώπη (Νότια Γαλλία και Δυτική Ιταλία) και την Αφρική (Αλγερία και Τυνησία) και στις ακτές του Ατλαντικού (Πορτογαλία, Ισπανία και Βόρειο Μαρόκο). Έχει αυξήσει την παρουσία της, λόγω των τεχνητών φυτειών, όπως στην ακτή της νοτιοδυτικής Γαλλίας, την Ελλάδα και τις χώρες της Αδριατικής, αλλά και στη Βόρεια Ευρώπη, όπως τη Μεγάλη Βρετανία και το Βέλγιο (Critchfield & Little, 1966; Jalas & Suominen, 1973; Pereira, 2002; Farjon & Filer, 2013). Η θαλάσσια πεύκη είναι στενά συνδεδεμένη με τούρκικα πεύκα, με πεύκα των Καναρίων Νήσων και με τη Χαλέπιο πεύκη, τα οποία όλα έχουν πολλά κοινά στοιχεία με αυτό (**Εικόνα 38**).



Εικόνα 37: Γεωγραφική κατανομή *Pinus pinaster*

Η νησιώτικη κατανομή των ειδών περιορίζεται στην Κορσική, και σε πολύ περιορισμένη έκταση, βόρεια της Σαρδηνίας. Υπάρχει μια οριακή στάση στο νησί Παντελερία, κοντά στην ακτή της Τυνησίας. Δύο βασικοί παράγοντες επηρέασαν την παρούσα φυσική κατανομή των ειδών, με αποτέλεσμα έναν υψηλό βαθμό κατακερματισμού: η ασυνέχεια και το υψόμετρο των οροσειρών, που προκαλεί απομόνωση ακόμη και κοντινών πληθυσμών, και η ανθρώπινη επίδραση. Προς το παρόν, τα είδη ευρέως διανέμονται από αναδάσωση σε διάφορες χώρες (εντός και εκτός του φυσικού χώρου). Η διαφοροποίηση των αυτόχθονων και μη αυτόχθονων συστάδων είναι, σε πολλές περιπτώσεις, αμφιλεγόμενη (Alía & Martín, 2002). Είναι ένα σχετικά μη μεταβλητό είδος, με σταθερή μορφολογία σε όλο το εύρος. Υπάρχουν σαφείς μορφολογικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών, με αποτέλεσμα την υποδιαίρεση των ειδών σε δύο υποείδη (*atlantica* και *pinaster*), και σε διάφορες γεωγραφικές φυλές (*atlantica*, *mesogeensis*, *corteensis*, *maghrebiana*, *genoui*, κλπ), αλλά η πλήρης αναθεώρηση των ειδών δεν υπάρχει. Τα είδη μπορούν να βρεθούν σε αρκετά διαφορετικά περιβάλλοντα: από το επίπεδο της θάλασσας έως 2.100 μέτρα υψόμετρο στο High Atlas (Μαρόκο), από περιοχές με περισσότερα από 1.400 χιλιοστά ετήσιας βροχόπτωσης και χωρίς ξηρή περίοδο, σε άλλες με 350 χιλιοστά και περισσότερο από 4 ξηρούς μήνες. Οι συνθήκες του εδάφους είναι μεταβλητές, κυρίως σε όξινα εδάφη, αλλά και σε αλκαλικά εδάφη, ακόμη και σε αμμώδη και φτωχά εδάφη (Alía & Martín, 2002).

A.7.1.4 Οικολογία

Η θαλάσσια πεύκη είναι ένα ελαφρύ-απαιτητικό και ταχείας ανάπτυξης είδος, που καταλαμβάνει ένα φυσικό και τεχνητό ευρύ φάσμα γεωγραφικών θέσεων και συγκεκριμένα υψομέτρων, κλιμάτων και εδαφών, που παρουσιάζονται ως αποτέλεσμα αξιοσημείωτης γενετικής παραλλαγής (Alía et al., 1996; Praciak et al., 2013). Υπάρχει συζήτηση για τον αριθμό των υποειδών, με ορισμένους συγγραφείς να αναγνωρίζουν μέχρι και πέντε διαφορετικά υποείδη, που αντιστοιχούν σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές, ενώ άλλοι θεωρούν έως και 18 υποείδη που θα μπορούσαν να ομαδοποιηθούν σε 3 κύριες ομάδες: Ατλαντικού, Περί-μεσογειακού και Μαγκρέμπ (Salvador et al., 2000; Gonzalez-Martinez et al., 2002; Wahid et al., 2006). Το *P. pinaster* είναι οικολογικά ευέλικτο, που δείχνει ένα ευρύ φάσμα εκφραστικών γνωρισμάτων, που αφορούν τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης, της αντοχής στον παγετό και της προσαρμογής στην καλοκαιρινή ξηρασία και στα ασβεστολιθικά υποστρώματα. Τα είδη εμφανίζουν αρκετές προσαρμογές για τις δασικές πυρκαγιές: πρώιμη ανθοφορία (σε ορισμένους πληθυσμούς μπορεί να παρατηρηθούν κώνοι σε τετράχρονα σπορόφυτα), παρουσία βραδύχωρων κώνων και παχύ φλοιού. Εκ φύσεως, αναπτύσσεται σε θερμές εύκρατες περιοχές, με μια ωκεάνια επιρροή στο κλίμα, κυρίως σε υγρές και ύφυγρες περιοχές, όπου η ετήσια βροχόπτωση είναι μεγαλύτερη από 600 χιλιοστά. Παρ' όλα αυτά, είναι δυνατό τα δέντρα να επιβιώσουν σε περιοχές με μόνο 400 χιλιοστά ετήσιας βροχόπτωσης, εφόσον υπάρχει παροχή αρκετής ατμοσφαιρικής υγρασίας. Ευνοείται, ανεπιφύλακτα, σε ένα μεσογειακό κλίμα, το οποίο χαρακτηρίζεται από δροσερούς,



Εικόνα 38: Κλαδί του *Pinus pinaster*

βροχερούς χειμώνες και ζεστά ξηρά καλοκαίρια (**Εικόνα 39**). Η θαλάσσια πεύκη δεν μπορεί να ανεχθεί τη σκιά και προτιμά πυριτικά εδάφη με τραχιά υφή, κυρίως αμμώδη εδάφη, θίνες και άλλα φτωχά υποστρώματα. Ωστόσο, ορισμένα υποείδη μπορεί να βρεθούν, επίσης, να κατοικούν σε ασβεστούχα εδάφη (Pereira, 2002).

Ενδημεί από το επίπεδο της θάλασσας στις παράκτιες πεδινές περιοχές έως μέτριες ανυψωμένες περιοχές στην Ιβηρική Χερσόνησο (1.600 μέτρα) και εσωτερικώς της Κορσικής, μέχρι περίπου 2.000 μ. στο Μαρόκο (Wahid et al., 2006; Farjon, 2010). Εύκολα βρέθηκαν εγκατεστημένες αμιγείς και ανοικτές συστάδες ή αναμειγνυμένες με άλλα είδη, όπως με τη Χαλέπιο πεύκη (*Pinus halepensis*) και την Κουκουναριά (*Pinus pinea*) σε αμμώδεις ακτές ή μερικές φορές σε υψηλότερους βραχώδεις λόφους. Στο Μαρόκο αποτελεί ένα συστατικό του μίγματος κωνοφόρων δασών με Μαύρη πεύκη (*Pinus nigra*), με έλατο Μαρόκου (*Abies pinsapo* var. *marocana*), με κέδρο Άτλαντος (*Cedrus atlantica*) και με *Taxus baccata* (Farjon et al., 2013).

A.7.1.5 Χρήσεις

Η θαλάσσια πεύκη θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά και διαδεδομένα δασικά είδη στη Γαλλία, την Πορτογαλία και την Ισπανία. Οι κύριες χρήσεις των ειδών σχετίζονται με την παραγωγή ξύλου και ρητίνης, την αναψυχή και την προστασία του εδάφους (Alía & Martín, 2002).

Συγκεκριμένα, η ξυλεία της έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη σταθεροποίηση αμμόλοφων, για να καταστεί δυνατή η γεωργική χρήση μεγάλων εκτάσεων κατά μήκος της δυτικής ακτής της Ιβηρικής Χερσονήσου, και ως ανεμοφράκτης για την προστασία των γεωργικών καλλιεργειών από αλατονέφωση (Pereira, 2002), (**Εικόνα 40**).

Στη νοτιοδυτική Γαλλία έχει, επίσης, χρησιμοποιηθεί για την εξυγίανση φυτειών και για οικονομική ανάπτυξη στην περιοχή Landes (Farjon, 2010), τη μεγαλύτερη συνεχή δασική φυτεία στην Ευρώπη, όπου η θαλάσσια πεύκη αποτελεί το κυριότερο είδος (Brockerhoff et al., 2008). Επιπλέον, λόγω της ταχείας χαρακτηριστικής ανάπτυξης και της ανοχής σε φτωχά εδάφη, άλλες χρήσεις περιλαμβάνουν τη διατήρηση του εδάφους, και την προστασία των πλαγιών από τη διάβρωση, καθώς και την ανάπτυξη σκιάφυτων δέντρων σε περιοχές για πικ-νικ, κάμπινγκ και πάρκα αναψυχής.

Το ξύλο είναι το κύριο προϊόν, που λαμβάνεται από τα θαλάσσια πεύκα, το οποίο έχει ένα ευρύ φάσμα τελικών προϊόντων όπως είναι η κατασκευή επίπλων, στύλων και κολώνων (**Εικόνα 40**). Μπορεί να θεωρηθεί ένα ταχέως αναπτυσσόμενο είδος (ειδικά στην περιοχή του Ατλαντικού, όπου ηλικίες εναλλαγής 40-50 ετών είναι συνήθεις). Οι κύριες χρήσεις σε αυτές τις περιοχές είναι η παραγωγή χαρτοπολτού και χαρτιού, η κατασκευή μοριοσανίδων, σανίδων δαπέδου και παλετών (Praciak et al., 2013). Στις άλλες περιοχές, οι ηλικίες εναλλαγής ποικίλουν από 80 έως 120 χρόνια, και τα δέντρα παράγουν είτε υψηλής ποιότητας (Κορσική, μερικά βουνά σε περιοχές στην Κεντρική Ισπανία), ή χαμηλής ποιότητας ξυλείας, κυρίως λόγω της



Εικόνα 39: Ξυλεία από *P. pinaster*

ύπαρξης πολύ κυρτών δέντρων (πεδιάδες Καστίλλης και αρκετοί νότιοι πληθυσμοί στη νότια Ισπανία), (Alía & Martín, 2002).

Μία από τις πιο παραδοσιακές χρήσεις του *Pinus pinaster* είναι η παραγωγή ρητίνης. Θαλάσσια πεύκα παράγουν ρητίνη υψηλής ποιότητας (**Εικόνα 41**). Η ρητίνη είναι το πιο σημαντικό, από τα προϊόντα εκτός της ξυλείας, και χρησιμοποιείται, άμεσα ή έμμεσα μετά από απόσταξη, για την παρασκευή τερεβινθίνης και κολοφώνιου, όπου και τα δύο χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα προϊόντων όπως για έλαια, βερνίκια, κόλλες, κηρούς, σαπουνία και φάρμακα (Alía & Martín, 2002; Farjon, 2010). Η σημασία αυτού του προϊόντος έχει μειωθεί με την πάροδο του χρόνου, αλλά πρόσφατα η παραγωγή έχει αυξηθεί ελαφρώς σε ορισμένες περιοχές (πεδιάδες της Καστίλλης στην Ισπανία, Πορτογαλία). Η ανάπτυξη νέων εργαλείων και μεθόδων εκχύλισης, σε συνδυασμό με τα προγράμματα αναπαραγωγής, θα μπορούσε να έχει σημασία για το προϊόν αυτό. Η ικανότητα των ειδών να αυξάνονται σε πολύ φτωχά εδάφη, και κάτω από παρατεταμένη ξηρασία, είναι ένας από τους λόγους για τη χρήση του *P. pinaster* σε προγράμματα αναδάσωσης, για την παραγωγή ξύλου ή την προστασία του εδάφους. Παράλληλα, ο φλοιός του αποστάζεται για την παραγωγή πίσσας και λιπάσματος προκειμένου να παραχθεί ένα υπόστρωμα χαμηλού βάρους για δεξαμενές φυτωρίων (Farjon, 2010; Praciak et al., 2013).



Εικόνα 40: Συλλογή ρητίνης από *P. pinaster*

Αποτελεί πηγή φλαβονοειδών, κατεχινών, προανθοκυανιδινών, και φαινολικών οξέων. Ένα συμπλήρωμα διατροφής, που προέρχεται από εκχυλίσματα φλοιού της γαλλικής θαλάσσιας πεύκης (*P. pinaster*), ονομάζεται Pycnogenol® και διατίθεται στην αγορά με αξιώσεις στη θεραπεία πολλών ασθενειών και διαταραχών του οργανισμού (**Εικόνα 42**).



Εικόνα 41: Pycnogenol®

Τέλος, οι συστάδες του *P. pinaster* αποτελούν ένα ιδανικό οικοσύστημα για την ανάπτυξη των εδώδιμων μανιταριών, όπως τα μανιτάρια του γένους *Boletus* (πορτσίνι) και *Lactarius* (γάλα-caps) (Pereira, 2002). Στο νότιο ημισφαίριο, όπου η θαλάσσια πεύκη έχει εισαχθεί για περιβαλλοντικούς (αναδάσωση των υποβαθμισμένων περιοχών) και οικονομικούς σκοπούς, έχει θεωρηθεί ως ένα ιδιαίτερα χωροκατακτητικό είδος. Εκτός από τις βιομηχανικές χρήσεις, το παραθαλάσσιο πεύκο είναι ένα δημοφιλές διακοσμητικό δέντρο, και συχνά φυτεύεται σε πάρκα και κήπους, σε περιοχές με θερμά εύκρατα κλίματα.

A.7.1.6 Απειλές για τη γενετική ποικιλότητα

Οι κύριες απειλές για τη γενετική ποικιλομορφία της θαλάσσιας πεύκης είναι παρόμοιες με εκείνες των άλλων μεσογειακών ειδών.

❖ **Δασικές πυρκαγιές:** Κυρίως απομονωμένες συστάδες ή μικροί πληθυσμοί έχουν επηρεαστεί. Πυρκαγιές έχουν παραδοσιακά διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της γενετικής αρχιτεκτονικής του είδους.

❖ **Χρήσεις γης και αλλαγές στη φυτοκάλυψη:** Ο μετασχηματισμός της δασικής γης σε γεωργική ή σε βοσκοτόπια έχει μια γενική τάση στην περιοχή της Μεσογείου. Οι συστάδες των δασών έχουν

οργωθεί για να εισαγάγουν το πιο παραγωγικό είδος, ή απαιτητικές καλλιέργειες σε νερό έχουν εισαχθεί κοντά σε πευκοδάση. Ωστόσο, σήμερα, η κύρια απειλή προέρχεται από τη μετατροπή των δασών σε κατοικημένες περιοχές.

❖ **Εισαγωγή εξωτικών ειδών:** Υβριδοποίηση της θαλάσσιας πεύκης με άλλα είδη είναι αρκετά περιορισμένη. Η κύρια απειλή είναι η εισαγωγή υλικού από εξωτικές προελεύσεις κοντά σε φυσικούς πληθυσμούς. Λόγω των προηγμένων προγραμμαμάτων αναπαραγωγής, επιλεγμένο φυτικό υλικό έχει ευρέως φυτευτεί σε ορισμένες χώρες (π.χ. Γαλλία). Εκροή γύρης σε αυτά τα είδη είναι αρκετά εκτεταμένη και θα μπορούσαν να επηρεάσουν τους τοπικούς πόρους, με αποτέλεσμα την απώλεια της τοπικής προσαρμοστικότητας, για παράδειγμα, σε περιοχές αμμόλοφων όπου *P. pinaster* έχει έναν πολύ σημαντικό οικολογικό ρόλο έναντι της καταστροφής των ενδιαιτημάτων από τον άνεμο και τα κύματα.

❖ **Υπερεκμετάλλευση:** Δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες σχετικά με την επίδραση των δασοκομικών πρακτικών σχετικά με τους γενετικούς πόρους των δασικών ειδών. Σε κωνοφόρα, το αποτέλεσμα φαίνεται να είναι μικρής σημασίας υπό κανονικές δασοκομικές πρακτικές.

❖ **Παγκόσμια κλιματική αλλαγή:** Τα περισσότερα από τα μοντέλα προβλέπουν μια μείωση των αλλαγών στον τρόπο διεξαγωγής των βροχοπτώσεων στην περιοχή της Μεσογείου, όπου το *P. pinaster* κυρίως βρίσκεται. Αναμένεται μια μετατόπιση προς βορρά μέσα στο εύρος της, οδηγώντας σε αλλαγές στην εκροή γύρης, στη διασπορά σπόρων, στο δυναμικό επαναποικισμού και σε νέες δυνατότητες για την ανταλλαγή γονιδίων με πόρους από προγράμματα αναπαραγωγής.

❖ **Παράσιτα και ασθένειες:** Όσον αφορά βιοτικές απειλές, οι σοβαροί τραυματισμοί σε ξύλο πεύκου οφείλονται στο εξωτικό νηματώδες (*Bursaphelenchus xylophilus*), το οποίο είναι υπεύθυνο για τη νόσο μαρασμού του πεύκου. Αυτό το νηματώδες θεωρείται μία από τις πιο σοβαρές βιολογικές εισβολές και καταστροφικές ασθένειες, που έπληξαν τα δάση κωνοφόρων σε όλο τον κόσμο (Vincent et al., 2008).

Περαιτέρω, άλλες ζημιές που μπορούν να αποδυναμώσουν τα δέντρα, προκαλώντας την απώλεια της ανάπτυξης των φυτών και τη μείωση της ποιότητας ξύλου στις φυτείες, με σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο, προκαλείται από πολλά παράσιτα. Οι κῶνοι και οι σπόροι πλήττονται από τον κάνθαρο κουκουναριού (*Pissodes validirostris*) και το σκουλήκι (*Dioryctria mendacella*). Μπουμπούκια, βλαστοί και κλαδιά τρέφονται από το σκώρο βλαστών πεύκου (*Rhyacionia buoliana*). Τα κύρια παράσιτα βελόνες είναι οι προνύμφες της λιτανευτικής πεταλούδας πεύκου (*Thaumetopoea pityocampa*), που τρέφονται από το φύλλο, και ο γεωμέτρης πεύκου (*Neodiprion sertifer*). Το έντομο *Matsucoccus feytaudy* προσβάλλει τη βελόνα και προκάλεσε την καταστροφή κατά προσέγγιση 200.000 εκταρίων των δασών *P. pinaster* στη δεκαετία του 1960. Τέλος, οι μύκητες *Lophodermium spp.* και *Cyclaneus maniveum* προκαλούν την πτώση της βελόνας (Pereira et al., 2002; Praciak et al., 2003). Ο φλοιός μπορεί να προσβληθεί από σκαθάρια της οικογένειας Scolytidae, όπως *Ips sexdentatus*, *Tomicus spp.*, *Orthotomicus erosus*, *Pityogenes bidentatus* και *Hylaster spp.* Οι ρίζες δέχονται επίθεση από μύκητες σήψης της ρίζας *Armillaria* και *Heterobasidion*. Το μεγάλο σκαθάρι πεύκου (*Hylobius abietis*) είναι από τους πιο σοβαρούς επιβλαβείς οργανισμούς που προσβάλλουν νεαρά κωνοφόρα δάση στην Ευρώπη (Barredo

et al., 2015; C.A.B.I, 2015). Εκτός Ευρώπης, η θαλάσσια πεύκη έχει βαθμολογηθεί ως ένα από τα πέντε πιο επεμβατικά πεύκα, ιδιαίτερα στη Νότια Αφρική, με επιπτώσεις για τον πλούτο των ειδών, επιταχύνοντας τη διάβρωση του εδάφους και την τροποποίηση των επιπέδων του νερού (Abad Viñas, 2016).

A.7.1.7 Προστασία και διατήρηση του είδους

❖ **Επιλογή προέλευσης σπόρων:** Με βάση τις σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη, τη βλαστική μορφή και την προσαρμογή των διαφορετικών πληθυσμών, η επιλογή προέλευσης σπόρων πρέπει να αναλυθεί προσεκτικά με βάση τα αποτελέσματα των δοκιμών προέλευσης. Η επιλογή εξαρτάται από τον κύριο στόχο της φυτείας (προστασία, παραγωγή ξύλου, κλπ), και στις περισσότερες χώρες περιγραφές του βασικού υλικού είναι διαθέσιμες για να βοηθήσουν στην επιλογή των πλέον κατάλληλων σπόρων για την αναδάσωση.

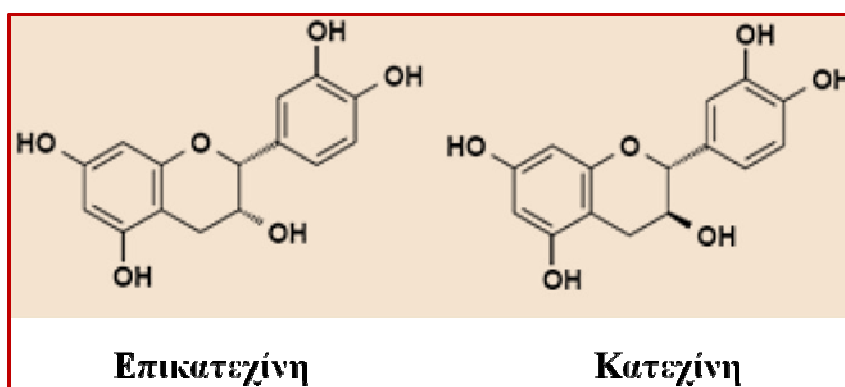
❖ ***In situ* περιοχές διατήρησης:** Αυτά είναι τα καλύτερα μέσα για τη διατήρηση του προσαρμοστικού δυναμικού των ειδών σε μακροπρόθεσμη βάση. Λαμβάνοντας υπόψη το σύστημα αναπαραγωγής του είδους, ειδική μέριμνα πρέπει να ληφθεί για τη δημιουργία συστάδων διατήρησης επαρκούς μεγέθους για να μειωθεί η επίδραση της ενδογαμίας και η εξωτερική μόλυνση.

❖ ***Ex situ* διατήρηση:** Αυτή η μορφή της διατήρησης βασίζεται σε διάφορες δραστηριότητες, όπως τράπεζες κλώνων, τράπεζες σπόρων και φυτείες χρησιμοποιώντας σπόρους από τους απειλούμενους πληθυσμούς. Οι τράπεζες κλώνων χρησιμοποιούνται κυρίως σε πληθυσμούς με μεγάλη οικονομική (ή οικολογική) αξία. Τράπεζες σπόρων είναι μια πολύ αποτελεσματική μέθοδος για τη διατήρηση της προσαρμοστικότητας των πληθυσμών-στόχων, λόγω της βαριάς παραγωγής σπόρων σε θαλάσσια πεύκη, καθώς και της δυνατότητας διατήρησης του σπόρου (ή γύρης) για μια παρατεταμένη χρονική περίοδο (Alía & Martín, 2002).

A.7.1.8 Χημική σύνθεση και Παραγωγή

A.7.1.8.1 Χημική σύσταση φλοιού

Οι προδιαγραφές του **PBE** (**Pine Bark Extract**) περιγράφονται εκτενώς σε μονογραφία USP 30 συμπληρωμάτων διατροφής (The United States Pharmacopeia, 2007). Το PBE περιέχει πολυάριθμες **φαινολικές ενώσεις**, όπως μονομερή πολυφαινολικών, προκυανιδίνες, και **φαινολικά οξέα** (παράγωγα βενζοϊκού και κινναμωμικού οξέος), που έχουν λάβει σημαντική προσοχή λόγω των αντιφλεγμονώδων, αντιμεταλλαξιογόνων, αντιμεταστατικών, αντικαρκινικών και υψηλών αντιοξειδωτικών δραστηριοτήτων τους (Packer et al., 1999; Rohdewald et al, 2002). Οι προανθοκυανιδίνες είναι γνωστές ως ολιγομερή προανθοκυανιδινών ή συμπυκνωμένων ταννινών, που αντιπροσωπεύουν μια ομάδα από συμπυκνωμένες φλαβαν-3-όλες, όπως προκυανιδίνες, προδελφινιδίνες και προπελαργονιδίνες. Αποτελούν μίγματα ολιγομερών και πολυμερών, που αποτελούνται από μονάδες φλαβαν-3-όλης, που συνδέονται κυρίως με C4-C8 δεσμό, αλλά ο δεσμός C4-C6 υπάρχει επίσης. Οι πιο ευρέως μελετημένες προανθοκυανιδίνες με βάση φλαβαν-3-όλη: (-) - επικατεχίνη και (+) - κατεχίνη (**Εικόνα 43**).



Εικόνα 42: Φλαβαν-3-όλες (επικατεχίνη και κατεχίνη)

Προκυανιδίνες είναι φαρμακολογικά δραστικά βιοπολυμερή υπομονάδων κατεχίνης και επικατεχίνης με μήκος αλυσίδας έως δωδεκαμερές και αναγνωρίζονται ως σημαντικά συστατικά στη διατροφή του ανθρώπου. Επιπλέον, (επί) αφζελεχίνη ή (επί) γαλλοκατεχίνη είναι οι υπομονάδες προπελαργονιδινών ή προδελφινιδινών, αντίστοιχα (Gu et al., 2003). Τα οξέα και η ταξιφολίνη απορροφώνται ταχέως και απεκκρίνονται ως γλυκουρονίδια ή θειικά στους άνδρες, ενώ οι προκυανιδίνες απορροφώνται αργά και μεταβολίζονται σε βαλερολακτόνες, που απεκκρίνονται ως γλυκουρονίδια.

A.7.1.8.2 Παραγωγή

Το εκχύλισμα Pycnogenol[®] παρασκευάζεται από φρέσκο, καθαρισμένο και θρυμματισμένο φλοιό. Η πατενταρισμένη διαδικασία εκχύλισης (Rohdewald, 2005) χρησιμοποιεί νερό και αιθανόλη ως διαλύτες σε μια μέθοδο πολλαπλών σταδίων. Το καθαρισμένο υδατικό εκχύλισμα ξηραίνεται με ψεκασμό και παράγεται μια πολύ λεπτή καφέ χρώματος σκόνη με μια αρωματική οσμή και στυφή γεύση. Είναι διαλυτή σε νερό, μεθανόλη και αιθανόλη και αδιάλυτη ή ελάχιστα διαλυτή σε έλαια. Χίλια κιλά φλοιού χρειάζονται για την παραγωγή 1 κιλού Pycnogenol[®].

A.7.1.8.3 Ανάλυση

Κλασματωμένη εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (**FSFE: Fractionated Supercritical Fluid Extraction**) έγινε σε δύο διαδοχικά στάδια σε διαφορετικές πιέσεις και θερμοκρασίες που χρησιμοποιούν CO₂ και CO₂ + EtOH (10 %), (Braga et al. 2008).

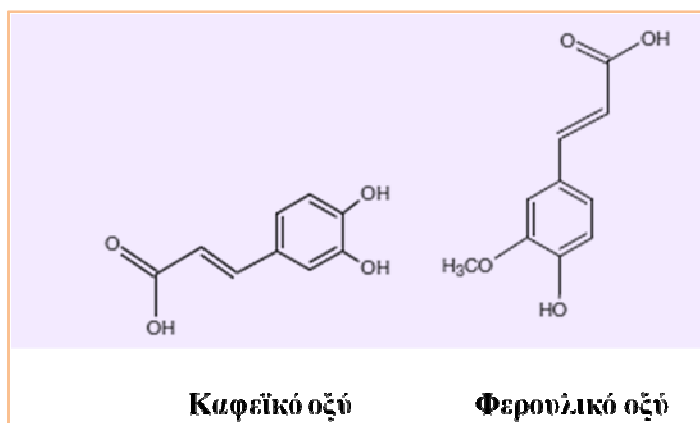
Ποσοτικοποίηση των φλαβονοειδών έγινε με **HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)**, και αέρια χρωματογραφία - **GC - (Gas Chromatography)** χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό των ελαίων. Με την εφαρμογή υψηλής πίεσης κλασματικής εκχύλισης, δύο κλάσματα, που διαφέρουν ευρέως σε % βάρος και αντιοξειδωτική δράση, ελήφθησαν. Ογδόντα τέσσερα τοις εκατό (84 %) του συνολικού εκχυλίσματος με αντιοξειδωτική δραστηριότητα 29-62 % λήφθηκαν στο πρώτο στάδιο (CO₂), ενώ το δεύτερο βήμα εκχύλισης (CO₂ + EtOH) έδειξε 60-84 % δραστηριότητα, που περιέχουν υψηλότερες τιμές κατεχίνης + επικατεχίνης (0.051 έως 0.346 g / mg db) από αυτά που ελήφθησαν στην πρώτη αντίδραση (0.039 g / mg db) επηρεάζοντας την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

Οι Chen et al. (2009) ανέλυσαν το εκχύλισμα του φλοιού του *P. pinaster* (PBE συμπληρώματα διατροφής) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο HPLC με βάση τη μονογραφία USP, η οποία απαιτεί τη μέτρηση των εμβადών και την ταυτοποίηση των τεσσάρων συστατικών του εκχυλίσματος, δηλαδή **καφεϊκό οξύ, κατεχίνη, φερουλικό οξύ, και ταξιφολίνη**. Πρόσθετες ποιοτικές πληροφορίες για την ανάλυση των συμπληρωμάτων διατροφής Pycnogenol[®] (**PDSs - Pycnogenol[®] Dietary Supplements**) μπορούν να ληφθούν με την ανάλυση του μεταβολικού προφίλ.

A.7.1.8.4 Φαρμακοκινητική του εκχυλίσματος

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως (βλ. **A.7.1.8.2**), το PBE, όταν στεγνώσει, είναι μια καφέ σκόνη η οποία παραμένει σταθερή, αν φυλάσσεται σε σκοτεινό και ξηρό μέρος. Είναι πλούσιο σε προανθοκυανιδίνες, και είναι εξαιρετικά υδατοδιαλυτό. Απορροφάται γρήγορα μετά από στοματική κατάποση και η κατανομή του στους ιστούς του σώματος είναι γρήγορη. Σε μια μελέτη των Grimm et al. (2006a, 2006b), έντεκα εθελοντές, οι οποίοι βρίσκονταν επί ελεύθερη διαίτα φλαβονοειδών για 24 ώρες, τους χορηγήθηκε μια μονή δόση 300 mg PBE. Δείγματα αίματος τους ελήφθησαν μετά από 14 ώρες και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας HPLC σε συνδυασμό με αντιδραστήρια ζεύγους ιόντων, UV και ηλεκτροχημικών μέσων. Ανάλυση πλάσματος, αποκάλυψε μέγιστες συγκεντρώσεις (C_{max}) **κατεχίνης** 107 ng / ml, **καφεϊκού οξέος** 17 ng / ml, **φερουλικού οξέος** 15 ng / ml (**Εικόνα 44**),

ταξιφολίνη 33 ng / ml και του μεταβολίτη M1 [δέλτα (3,4-διϋδροξυ-φαινυλ) -γ-βαλερολακτόνη] 4 ng / ml. Επιπλέον, δέκα άγνωστες ενώσεις εντοπίστηκαν, και ορίστηκαν τα επίπεδα τους στο πλάσμα σε σταθερή κατάσταση. Πείραμα επαναλήφθηκε στη συνέχεια, δίνοντας μια δόση των 200 mg σε πέντε εθελοντές και δείγματα του πλάσματος τους, ελήφθησαν μετά από 4 ώρες. Η ανάλυση των δειγμάτων σταθερής κατάστασης στο πλάσμα αποκάλυψε ενώσεις ως συζεύγματα θεικού και / ή γλυκουρονικού οξέος υποδεικνύοντας μεταβολισμό φάσης II στο ήπαρ.



Εικόνα 43: Καφεϊκό και φερουλικό οξύ

A.7.1.9 Βιολογικές Δράσεις

Οι συνιστώμενες δόσεις της Pycnogenol[®] κυμαίνονται ευρέως και εξαρτώνται από το στόχο της θεραπείας. Για παράδειγμα, για την καταπολέμηση της χρόνιας φλεβικής ανεπάρκειας, οι συνιστώμενες δόσεις κυμαίνονται από 150 έως 360 mg • ημέρα⁻¹, ενώ άλλοι έχουν προτείνει περίπου 75-90 mg • ημέρα⁻¹ για να εμποδίσουν την οξειδωτική βλάβη του ιστού. Στην πλειοψηφία των κλινικών δοκιμών, η διάρκεια του συμπληρώματος είναι γενικά 2-3 μήνες. Οι παρενέργειες των συμπληρωμάτων Pycnogenol[®] είναι ελάχιστες (Gleeson et al., 2012). Οι μελέτες δείχνουν ότι τα συστατικά της Pycnogenol[®] είναι ιδιαίτερα βιοδιαθέσιμα. Είναι ενδιαφέρον ότι η Pycnogenol[®] εμφανίζει μεγαλύτερη βιολογική δράση ως μίγμα, παρά από ότι τα καθαρισμένα συστατικά της κάνουν μεμονωμένα, υποδεικνύοντας ότι υπάρχει συνέργεια μεταξύ των συστατικών της (Packer et al., 1999).

Συμπλήρωμα Pycnogenol[®] έχει αναφερθεί ότι έχει ένα ευρύ φάσμα οφελών για την υγεία, όπως η βελτίωση της γνωστικής λειτουργίας, της ενδοθηλιακής λειτουργίας, η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και της φλεβικής ανεπάρκειας (Maimoona et al., 2011; Gleeson et al., 2012). Η Pycnogenol[®] ενεργεί, επίσης, ως αντιφλεγμονώδες και αντιοξειδωτικός παράγοντας (Packer et al., 1999; Devaraj et al., 2002; Williamson & Manach, 2005). Η αντιοξειδωτική δράση της Pycnogenol[®] αποδίδεται στην υψηλή περιεκτικότητα σε προκυανιδίνες (Grimm et al., 2004). Η Pycnogenol[®] έχει επίσης αναφερθεί ότι έχει καρδιαγγειακά οφέλη, όπως μία αγγειοχαλαρωτική δραστηριότητα, δραστηριότητα αναστολής του ενζύμου μετατροπής

της αγγειοτενσίνης και την ικανότητα να ενισχύει τη μικροκυκλοφορία αυξάνοντας την τριχοειδή διαπερατότητα (Packer et al., 1999).

Υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός μελετών στην τρέχουσα βιβλιογραφία σχετικά με τις συνέπειες της Pycnogenol[®] στην απόδοση της άσκησης, που σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονώδη αντίδραση. Σε μια προηγούμενη μελέτη (Pavlovic, 1999), εξετάζοντας την επίδραση της Pycnogenol[®] στην απόδοση της άσκησης έδειξε μια σημαντική αύξηση στην απόδοση αντοχής σε εκπαιδευμένους αθλητές για ψυχαγωγικούς σκοπούς. Οι Mach et al. (2010) απέδειξαν ότι η Pycnogenol[®] πλούσια σε αντιοξειδωτικά κοκτέιλ βελτίωσε το χρόνο στην κόπωση με την αύξηση των επιπέδων NAD⁺ στον ορό. Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι Bentley et al. (2012) έδειξαν ότι μια έντονη δόση του συμπληρώματος Pycnogenol[®] είναι σε θέση να βελτιώσει τις επιδόσεις αντοχής σε εκπαιδευμένους αθλητές. Επιπλέον, οι Vinciguerra et al. (2006) απέδειξαν ότι η κατάποση της Pycnogenol[®] μειώνει τον αριθμό των γεγονότων σε ασθενείς με κράμπες και μυϊκούς πόνους, χωρίς να προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις. Ωστόσο, πρόσθετα πειράματα απαιτούνται για να επιβεβαιώσουν αυτά τα αποτελέσματα, να εξετάσουν το βέλτιστο χρόνο και τη δόση του ποσού αυτού του συμπληρώματος, καθώς και για τον καθορισμό των φυσιολογικών μηχανισμών, που εξηγούν την αύξηση του χρόνου μέχρι την εξάντληση της αντοχής κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης.

A.7.1.9.1 Αντιοξειδωτικές δράσεις

Η αδρανοποίηση του υπεροξειδίου και της ρίζας υδροξυλίου, και η αναστολή σχηματισμού μονήρους οξυγόνου είναι δύο σημαντικά ευεργετικά αποτελέσματα του PBE (Gouchang et al., 1993; Blazso et al., 1994; Noda et al., 1997; Packer et al., 1999). Το PBE αναφέρθηκε ότι ασκεί προστατευτική δράση κατά της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, των δραστικών προϊόντων θειοβαρβιτουρικού οξέος, και κατά της οξειδωτικής αιμόλυσης, που προκαλείται από υπεροξείδιο του υδρογόνου (Sivooóná et al., 2004). Επιπλέον, αποτρέπει τη συσσώρευση των οξειδωτικώς κατεστραμμένων πρωτεϊνών και μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο πολλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως Πάρκινσον, Αλτσχάιμερ, και ασθένειες του Huntington (Voss et al., 2006). Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι το PBE ανέστειλε την υπεροξειδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL), την υπεροξειδωση λιπιδίων σε φωσφολιπιδικά λιποσώματα, την υπεροξειδωση λιπιδίων που προκαλείται από t-βουτυλυδροϋπεροξείδιο, και UVB επαγόμενη υπεροξειδωση λιπιδίων στα κύτταρα (Gouchang et al., 1993; Rong et al., 1995; Wei et al., 1997).

Η Pycnogenol[®] εμφάνισε μια εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση αναστολή της οξειδωτικής έκρηξης που προκλήθηκε από ζυμοζάνη σε J774 μακροφάγα ποντικού και οξειδωση της LDL. J774 είναι μια κυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού, που δημιουργήθηκε από έναν όγκο, που προέκυψε σε ένα θηλυκό BALB / c ποντίκι. Η ανάπτυξη της αναστέλλεται από θειική δεξτράνη, καθαρισμένο πρωτεϊνικό παράγωγο, και βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες. Τα κύτταρα J774 έχουν χρησιμοποιηθεί για πολλές βιολογικές και βιοχημικές έρευνες που αποσκοπούν στην κατανόηση της φυσιολογίας των μονοκυττάρων-μακροφάγων. Η Pycnogenol[®] ελαχιστοποίησε επίσης τη διάσπαση βάσης (μετρήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης) σε pBR322 πλασμιδίο DNA, που προκαλείται από ρίζες υδροξυλίου, που παράγονται από σίδηρο / ασκορβικό οξύ (Nelson et al., 1998). Το πλασμιδίο φορέας pBR322, ένας καθιερωμένος φορέας κλωνοποίησης πολλαπλών

χρήσεων σε εργαστήρια σε όλο τον κόσμο, έχει σχεδιαστεί και έχει κατασκευαστεί για την αποτελεσματική κλωνοποίηση και την επιλογή των μορίων ανασυνδυασμένου DNA σε *Escherichia coli* (Balbás et al., 1986; Balbás & Bolívar, 2004).

Η Pycnogenol® έδειξε αντιοξειδωτική δράση σε συνέργεια με βιταμίνη C και E, και με λουτεΐνη για την πρόληψη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων στο λιπόσωμα και του ομογενοποιημένου αμφιβληστροειδούς χοίρου, αντίστοιχα (Nakanishi-Ueda et al., 2006; Sivonová et al., 2006). Οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις του PBE έχουν αποδειχθεί με *in vitro* και *in vivo* μελέτες, (Blazso et al., 1994; Virgili et al., 1998; Chida et al., 1999; Packer et al., 1999; Virgili et al., 1999; Peng et al., 2002; Maritim et al., 2003; Sharma et al., 2003; Gulati, 2005).

Οι Ahn et al. (2007) έχουν διερευνήσει την υποθετική αντιοξειδωτική δράση του PBE έναντι CCl₄ επαγόμενης ηπατικής οξειδωτικής βλάβης σε αρουραίους Sprague-Dawley. Μία απλή στοματική δόση του CCl₄ (1.25 ml / kg) παρήγαγε σημαντικά αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφεράσης ορού και δραστηριότητες αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης, αύξησε τη συγκέντρωση της μηλονοδιαλδεΐδης, μείωσε την περιεκτικότητα σε γλουταθειόνη, και μείωσε τις δραστηριότητες της καταλάσης, της δισμουτάσης του υπεροξειδίου και της γλουταθειόνης -S-τρανσφεράσης στους ηπατικούς ιστούς. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η χορήγηση της Pycnogenol® (10 ή 20 mg / kg) βελτίωσε την CCl₄ επαγόμενη ηπατική βλάβη, όπως αποδεικνύεται από τη μείωση της δραστηριότητας της αμινοτρανσφεράσης ορού και της αμινοτρανσφεράσης αλανίνης με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, τη μείωση της συγκέντρωσης μηλονοδιαλδεΐδης, και την ενίσχυση των δραστηριοτήτων των επιπέδων της γλουταθειόνης και της καταλάσης, της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της γλουταθειόνης-δ-τρανσφεράσης σε ηπατικούς ιστούς, υποδεικνύοντας ότι η χορήγηση της Pycnogenol® αποτρέπει αποτελεσματικά από την CCl₄ επαγόμενη οξειδωτική βλάβη σε αρουραίους (Ahn et al., 2007). Σε μία άλλη μελέτη, μετά τη χορήγηση της Pycnogenol®, η γλουταθειόνη (GSH) και ο δείκτης GSH-δισουλφίδιο αναγωγάσης (GSSG-R), οι δράσεις των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, CAT, GSH-Px, GSSG-R), και η δραστηριότητα της γ-γλουταμυλ τρανσπεπτιδάσης (γ-GT) και το ένζυμο στο μονοπάτι της σύνθεσης γλουταθειόνης αυξήθηκαν σε διαβητικούς αρουραίους με στρεπτοζοτοκίνη (Maritim et al., 2003).

Επιπλέον, αναφέρθηκε ότι η κατανάλωση της Pycnogenol® μόνη της ή σε συνδυασμό με βήτα-καροτένιο μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της δραστηριότητας της GSSG-R. Η μειωμένη δραστηριότητα της γ-GT αμφιβληστροειδούς σε διαβητικούς αρουραίους και η αυξημένη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης σε αμφιβληστροειδή διαβητικών, λόγω του οξειδωτικού στρες, ομαλοποιήθηκαν με τη Pycnogenol® και με το συνδυασμό με β-καροτένιο (Berryman et al., 2004; Dene et al., 2005).

Οι πολυφαινόλες, που περιέχονται σε PBE, βρέθηκαν να έχουν δραστηριότητα έναντι ROS και ριζών αζώτου. Επίσης, παρατηρήθηκε μειωμένη παραγωγή μονοξειδίου αζώτου (NO), αναστολή της δραστηριότητας της inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), και αναστολή της έκφρασης του iNOS-mRNA (Packer et al., 1999). Το PBE δείχθηκε να έχει δραστηριότητα έναντι των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) σε μακροφάγα και εμποδίζει την ενεργοποίηση του NF-kappaB και του ενεργοποιητή πρωτεΐνης-1, και αναστέλλει την έκφραση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών IL-1, των αγγειακών κυττάρων προσφύσεως μορίου-1 και της ενδοκυτταρικής προσκόλλησης μορίου-1 (Cho et al., 2000). Έχει επίσης, αναφερθεί ότι το PBE ανέστειλε την έκκριση του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (Tumor Necrosis Factor-α: TNF-α), την εξαρτώμενη γονιδιακή έκφραση του πυρηνικού

παράγοντα (NF) - κ B, και την απελευθέρωση της MMP-9 από διεγερμένα μονοκύτταρα με λιποπολυσακχαρίτη (κυτταρική σειρά μακροφάγων λευχαιμικών ποντικών, RAW 264.7), (Saliou et al., 2001; Grimm et al., 2004; Park et al., 2004).

A.7.1.9.2 Αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις

Αρκετές *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι το PBE έχει αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις και αναστέλλει την έναρξη της φλεγμονής, παρεμποδίζοντας την απελευθέρωση των προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών, που ρυθμίζονται από το οξειδωτικό στρες. Επίσης, το PBE αναστέλλει τους προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές σε κερατινοκύτταρα (επιδερμικά κύτταρα), λευκοκύτταρα, και ενδοθηλιακά κύτταρα (Peng et al., 2000; Bayeta & Lau, 2001; Saliou et al., 2001). Επιπλέον, μια *in vitro* μελέτη έχει δείξει ότι το PBE και οι μεταβολίτες του αναστέλλουν την απελευθέρωση ενζύμων καταστροφής του ιστού (μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας), κολλαγενάσης, ελαστάσης, και ζελατινάσης από τα φλεγμονώδη κύτταρα (Grimm et al., 2004). Έχει επίσης αναφερθεί ότι μετά την πρόσληψη του PBE από το στόμα, αναστάλθηκε η ενζυμική δραστηριότητα της κυκλοοξυγενάσης (COX-1 και COX-2) σε δείγματα ορού από ανθρώπους εθελοντές. Η κυκλοοξυγενάση είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των βιολογικών μεσολαβητών, όπως των προσταγλανδινών, προστακυκλίνης, και θρομβοξανής. Η φαρμακολογική αναστολή αυτού του ενζύμου μπορεί να προσφέρει ανακούφιση από τα συμπτώματα της φλεγμονής και του πόνου (Schäfer et al., 2006).

Μια από τις σημαντικότερες προ-οξειδωτικές προκλήσεις, η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση πολλών προ-φλεγμονωδών γονιδίων, που περιλαμβάνουν τον TNF- α και τις IL-1 α , IL-1 β , IL-8, και IL-6 (όλες αυτές οι κυτοκίνες περιέχουν θέσεις δέσμευσης του πυρηνικού παράγοντα- κ B στην 5 πλευρική περιοχή του γονιδίου που τις κωδικοποιεί), (Gulati, 2005). Εφαρμογή της Pycnogenol® τοπικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για σημαντική και δοσο-εξαρτώμενη προστασία από την ηλιακή-προσομοιωμένη UV ακτινοβολία, [(SSUV) προκαλεί οξεία φλεγμονή, φωτο-καρκινογένεση, και ανοσοκαταστολή], όταν εφαρμόζεται μετά από ηλιακό έγκαυμα και καθημερινή ακτινοβολία (Sime & Reeve, 2004). Σε μια άλλη μελέτη, σε 21 Καυκάσιους εθελοντές χορηγήθηκε η Pycnogenol® (1.1 mg / kg σωματικού βάρους) από το στόμα. Ως αποτέλεσμα, έχει αποδειχθεί η προστατευτική επίδραση της Pycnogenol® έναντι βλαβών του δέρματος, που επάγονται από το υπεριώδες φως (Saliou et al., 2001). Αποδείχθηκε ότι το PBE κατέστειλε την έκφραση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και μείωσε την έκφραση της συγγενής τρυπτάσης μαστοκυττάρων και του παράγοντα βλαστοκυττάρων (Matsumori et al., 2007). Η αναστολή της ενεργοποίησης του NF- κ B σε διεγερμένα μονοκύτταρα λιποπολυσακχαρίτη είναι ένας από τους λόγους για τις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις της Pycnogenol® (Grimm et al., 2006). Το PBE ανέστειλε την έκφραση των iNOS και iNOS-mRNA σε μακροφάγα ποντικού, που ενεργοποιούνται από τα συστατικά του βακτηριακού τοιχώματος: λιποπολυσακχαρίτη και ιντερφερόνη (INF- γ), (Virgili et al., 1998).

Το σκεύασμα Pycnogenol® έχει ευεργετικά αποτελέσματα στα συμπτώματα της οστεοαρθρίτιδας (Belcaro et al., 2007; Farid et al., 2007; Cisar et al., 2008). Μια διπλά-τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη ανέφερε ότι η Pycnogenol® μείωσε τον πόνο και τη δυσκαμψία και βελτίωσε τα συμπτώματα της οστεοαρθρίτιδας του γόνατος (ευκαμψία των οστεοαρθρικών αρθρώσεων), (Belcaro et al., 2007).

A.7.1.9.3 Αντιμικροβιακή και αντική δράση

Το PBE πλούσιο σε προκυανιδίνες ανέστειλε όχι μόνο τη σύνδεση του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1) σε κύτταρα ξενιστές, αλλά ανέστειλε, επίσης, την αντιγραφή του ιού HIV και την αλληλεπίδραση των T-κυττάρων σε πειράματα καλλιέργειας κυττάρων (Feng et al., 2008). Βρέθηκε ακόμη ότι το PBE επάγει την έκφραση μιας ενδοκυτταρικής αντιοξειδωτικής πρωτεΐνης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης μαγγανίου, καθώς επάγει και την αναστολή της φωσφορυλίωσης της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6. Φαίνεται ότι αυτές οι βιοχημικές μεταβολές, που προκαλούνται από την Pycnogenol[®], διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα αντικά αποτελέσματα της. Το PBE είναι ένα πολλά υποσχόμενο μέσο για την αναστολή της αντιγραφής του ιού της εγκεφαλομυοκαρδίτιδας, την πρόληψη της ανάπτυξης του ιού της μυοκαρδίτιδας, και τη βελτίωση της φλεγμονής και τη νέκρωση του μυοκαρδίου. Έχει αναφερθεί ότι η Pycnogenol[®] (100 mg / kg) είχε ευεργετικά αποτελέσματα για την ιογενή μυοκαρδίτιδα από την αναστολή της αντιγραφής του ιού και με την καταστολή των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, γονίδια που σχετίζονται με την καρδιακή αναδιαμόρφωση, και με τα γονίδια των μαστοκυττάρων, που σχετίζονται με τον καρδιακό μυ των ποντικών (γονιδιακές εκφράσεις του παράγοντα νέκρωσης όγκου, τύπου-1 προκολλαγόνου, του παράγοντα αρχέγονων κυττάρων, και την τρυπτάση μαστοκυττάρων), (Matsumori et al., 2007; Feng et al., 2008).

Το PBE αποδείχθηκε ότι έχει αντιμικροβιακή δράση έναντι διαφόρων παθογόνων προκαρυωτικών (gram αρνητικά και θετικά βακτήρια), και ευκαρυωτικών οργανισμών (μύκητες και ζύμες), (Torras et al., 2005; Rohdewald & Beil, 2008). Για παράδειγμα, η ανάπτυξη και η προσκόλληση του *Helicobacter pylori* (αρνητικό κατά Gram, μικροαεροφιλικό βακτήριο) προς κύτταρα του βλεννογόνου του στομάχου αναστελλόταν από την Pycnogenol[®], *in vitro*. Σε μια άλλη μελέτη, οι αντιμικροβιακές επιδράσεις της Pycnogenol[®] έναντι 23 παθογόνων μικροοργανισμών (π.χ. *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Aspergillus oryzae*, και *Salmonella sp.*) έχουν διερευνηθεί. Κατά συνέπεια, η Pycnogenol[®] ανέστειλε την ανάπτυξη όλων των ελεγχθέντων μικροοργανισμών σε ελάχιστες ανασταλτικές δοσολογίες (**MID: Minimum Inhibitory Dosages**) που κυμαίνονται από 20 έως 250 μg / mL (Torras et al., 2005).

A.7.1.10 Κλινικές μελέτες

A.7.1.10.1 Καρδιαγγειακές διαταραχές

Αν και έχουν πραγματοποιηθεί πολλές και διαφορετικές κλινικές μελέτες του PBE έως σήμερα, ωστόσο η πιο καλά μελετημένη δοκιμή που έχει αξιοποιηθεί είναι σε καρδιαγγειακές διαταραχές. Πολλές ελεγχόμενες ανθρώπινες κλινικές δοκιμές σε αγγειακές ασθένειες έχουν λειτουργήσει.

A.7.1.10.1.1 Μυοκαρδιακή ανάπτυξη

Οι Zibadi et al. (2008) ανέφεραν ότι το PBE οδήγησε στη βελτίωση των ελέγχων του διαβήτη τύπου 2 και στη μείωση του παράγοντα κινδύνου της καρδιαγγειακής νόσου και στη χρήση των αντιυπερτασικών φαρμάκων σε άτομα με διαβήτη τύπου 2. Κατανάλωση της Pycnogenol® (100 mg σε διάστημα 12 εβδομάδων) μείωσε τις συγκεντρώσεις ενδοθηλίνης-1 και αύξησε τις συγκεντρώσεις της 6-κετο προσταγλανδίνης F1α στο πλάσμα. Ως εκ τούτου, η χρήση του PBE, πλούσιο σε πολυφαινόλες, θα μπορούσε να βοηθήσει να μειωθεί η δόση του ανταγωνιστή ασβεστίου δηλ. της νιφεδιπίνης και να βελτιώσει τη λειτουργία του ενδοθηλίου των υπερτασικών ασθενών (Liu et al., 2004). Μια τυχαία, ελεγχόμενη, με εικονικό φάρμακο, διασταυρωμένη μελέτη διεξήχθη για να προσδιοριστεί ο ρόλος της Pycnogenol® (200 mg / ημέρα) στην τροποποίηση της πίεσης του αίματος σε ήπια υπερτασικούς ασθενείς. Σημαντική μείωση στη συγκέντρωση της θρομβοξάνης στον ορό και στη συστολική πίεση του αίματος, παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια συμπληρώματος Pycnogenol® (Hosseini et al., 2001).

A.7.1.10.1.2 Αγγειοδιαστολή εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο

Το PBE βρέθηκε να προκαλεί εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοχαλάρωση και να προστατεύει από συσταλτές αποκρίσεις σε επινεφρίνη και νορεπινεφρίνη σε άθικτους απομονωμένους αορτικούς δακτυλίους αρουραίων, λόγω της αύξησης της παραγωγής του NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μονοξείδιο του αζώτου έχει ευεργετική αγγειοπροστατευτική δράση, όπως η αναστολή τόσο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων όσο και της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων, η μείωση της οξειδωσης των λιπιδίων, καθώς επίσης και η μείωση του πολλαπλασιασμού των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων (Fitzpatrick et al. 1998; Iwasaki et al., 1999; EPOCH Study Group, 2002). Οι Araghi-niknam et al. (1999) ανέφεραν ότι η Pycnogenol® (100-150 mg) μείωσε τόσο το σχηματισμό της θρομβοξάνης B, που ενισχύεται από τον καπνό, όσο και τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων ως απόκριση σε *in vivo* κάπνισμα.

A.7.1.10.1.3 Φλεβικές διαταραχές – Χρόνια φλεβική ανεπάρκεια

Το PBE μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη και τη θεραπεία της χρόνιας φλεβικής ανεπάρκειας (CVI: Chronic Venous Insufficiency) και τις σχετικές διαταραχές φλεβικών τριχοειδών. Η χρόνια φλεβική ανεπάρκεια προκαλεί φλεβική υπερτασική μικροαγγειοπάθεια και οδηγεί σε φλεβικές εξελκώσεις (Belcaro et al., 2005). Το PBE ήταν αποτελεσματικό στη βελτίωση της βαρυαλγίας των ποδιών και του υποδόριου οιδήματος και στη μείωση της φλεβικής πίεσης σε ασθενείς με CVI. Αυτές οι κλινικές επιδράσεις του PBE μπορεί να οφείλονται στην σταθεροποίηση της κολλαγονώδους υπό-ενδοθηλιακής βασικής μεμβράνης ή στη δέσμευση των ελεύθερων ριζών ή και από το συνδυασμό των δραστηριοτήτων αυτών (Petrassi et al., 2000). Μια ελεγχόμενη συγκριτική μελέτη σε 40 ασθενείς με διάγνωση CVI αποκάλυψε ότι η Pycnogenol® (360 mg / ημέρα για μια περίοδο 4 εβδομάδων) μείωσε την περιφέρεια των κάτω άκρων και βελτίωσε τα συμπτώματα της CVI (Koch, 2002).

Η στοματική χορήγηση της Pycnogenol® (150 mg / ημέρα) για 8 εβδομάδες, σε ασθενείς με σοβαρή φλεβική υπέρταση (χρόνια φλεβική ανεπάρκεια, οίδημα αστραγάλου) και ιστορικό φλεβικών εξελκώσεων, έδειξε μία μείωση στη δερματική ροή και στη διήθηση των τριχοειδών, βελτίωση στο επίπεδο της μικροαγγειοπάθειας και μείωση του οιδήματος (Cesarone et al., 2006). Επιπλέον, τα αποτελέσματα της μελέτης σχετικά με 16 ασθενείς με φλεβικές εξελκώσεις (κατά την περίοδο των 6 εβδομάδων) έδειξε ότι και η στοματική και η τοπική θεραπεία με Pycnogenol® θα μπορούσε να έχει σημαντικό ρόλο στη βελτίωση των φλεβικών ελκών (Belcaro et al., 2005). Αναφέρθηκε, επίσης, ότι η συνδυασμένη συστηματική και τοπική εφαρμογή της Pycnogenol® θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία των διαβητικών ελκών (Belcaro et al., 2006a).

Το οίδημα είναι πολύ συχνό σε υπερτασικούς ασθενείς υπό θεραπεία. Διερευνήθηκαν οι επιδράσεις της στοματικής κατανάλωσης της Pycnogenol® για τις ανεπιθύμητες επιπτώσεις των αντιυπερτασικών φαρμάκων. Ως αποτέλεσμα, η Pycnogenol® βοήθησε στην πρόληψη και τη μείωση μακροπρόθεσμων βλαβών στη μικροκυκλοφορία, στον έλεγχο του οιδήματος, και στη μείωση της δόσης των αντιυπερτασικών φαρμάκων (π.χ. νιφεδιπίνη) σε υπερτασικούς ασθενείς (Belcaro et al., 2006b).

A.7.1.10.1.4 Αθηροσκλήρωση

Η αθηροσκλήρωση είναι μια σημαντική αγγειακή διαταραχή υπεύθυνη για τις περισσότερες καρδιαγγειακές ασθένειες, π.χ. έμφραγμα του μυοκαρδίου ή κοινώς καρδιακές προσβολές (MI: Myocardial Infarction) και αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (CVA: Cerebrovascular Accident). Η επίδραση του PBE έναντι των δραστικών μορφών οξυγόνου ενισχύει το αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας του οργανισμού σε κυτταρικό επίπεδο. Συνδυασμένο με εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή μέσω της NO συνθάσης οδηγεί σε καλύτερη υγεία και λειτουργία του ενδοθηλίου (Maimoona et al., 2011).

A.7.1.10.1.5 Χοληστερόλη

Συμπλήρωμα με PBE, πλούσιο σε πολυφαινόλες, έχει θετικές επιδράσεις σε δύο παράγοντες κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο, δηλαδή, τη μείωση των συνολικών επιπέδων της χοληστερόλης και της LDL-χοληστερόλης και την αύξηση των επιπέδων της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL) - χοληστερόλης, γεγονός που βελτιώνει τον αθηροσκληρωτικό δείκτη (Durackova et al., 2003). Έχει αναφερθεί ότι το PBE αύξησε την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (που προσδιορίζεται με ικανότητα απορρόφησης των ριζών οξυγόνου) και αλλοίωσε το προφίλ της λιποπρωτεΐνης του πλάσματος (ειδικά μείωσε την κακή χοληστερόλη LDL σε ανθρώπους εθελοντές) (Devaraj et al., 2002). Το αποτέλεσμα μίας τυχαίας, διπλά τυφλής, ελεγχόμενης με εικονικό φάρμακο μελέτης, έδειξε ότι η Pycnogenol® μείωσε σημαντικά την LDL και αύξησε την HDL έως 155, σε γυναίκες με εμμηνόπαυση κατά τη διάρκεια μιας περιόδου θεραπείας 6 μηνών (Yang et al., 2007). Σε μια άλλη ανεξάρτητη μελέτη με εικονικό φάρμακο, σημαντική αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών στο πλάσμα παρατηρήθηκε μετά τη χορήγηση της Pycnogenol®. Η ολική χοληστερόλη μειώθηκε από 5.41 σε 4.98 mmol / L, που συνδέθηκε με μια μείωση των επιπέδων της LDL-χοληστερόλης από 3.33 σε 2.78 mmol / L (Durackova et al., 2003).

A.7.1.10.2 Μεταβολικό σύνδρομο (Διαβήτης)

Η Pycnogenol® που χορηγήθηκε σε ασθενείς με διαβητικό σύνδρομο, μπορεί να βελτιώσει το σάκχαρο του αίματος και τους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου, ενώ επιτρέπει στους ασθενείς να μειώσουν τα αντιυπερτασικά φάρμακα (Zibadi et al., 2008). Ο Nocun και οι συνεργάτες του (2008) διερεύνησαν την αντιθρομβωτική επίδραση της μακροχρόνιας πρόσληψης της Pycnogenol® στο διαβήτη, που σχετίζεται με αυξημένη σύνθεση θρομβοξάνης οδηγώντας σε σοβαρές αγγειακές επιπλοκές. Τα επίπεδα θρομβοξάνης B2 (ο κύριος μεταβολίτης θρομβοξάνης A2 του πλάσματος) αξιολογήθηκαν σε ζωικό μοντέλο ινσουλινο-εξαρτώμενου διαβήτη με ανοσορροφητική δοκιμασία συνδεδεμένη με ένζυμο. Το αποτέλεσμα αυτής της μελέτης υπέδειξε ότι η Pycnogenol® μείωσε την υπερδραστηριότητα των αιμοπεταλίων και είχε αντιθρομβωτική δράση, όταν χορηγείται μόνη ή ως συμπλήρωμα της θεραπείας κατά των αιμοπεταλίων σε φαρμακολογικό μοντέλο διαβήτη τύπου 1. Ολιγομερείς προκυανιδίνες του PBE ανέστειλαν τη διατροφική απορρόφηση των υδατανθράκων από την αναστολή της α-γλυκοσιδάσης (IC₅₀ περίπου 5 μg / mL), που θα μπορούσαν να συμβάλλουν σε μειωμένα αποτελέσματα γλυκόζης, που παρατηρήθηκαν σε κλινικές δοκιμές με ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη (Nocun et al., 2008; Schäfer & Högger, 2007).

Τα αποτελέσματα μιας προσδοκώμενης, ελεγχόμενης μελέτης σε ασθενείς με διαβητική μικροαγγειοπάθεια, που έλαβαν Pycnogenol® από το στόμα (150 / ημέρα για 4 εβδομάδες) απέδειξαν ότι η Pycnogenol® συνέβαλε στην πρόληψη των διαβητικών ελκών με τον έλεγχο των επιπέδων της μικροαγγειοπάθειας (Cesarone et al., 2006). Επιπλέον, ο συνδυασμός τοπικής και συστηματικής εφαρμογής της Pycnogenol® μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση των κάτω άκρων ελκών σε ασθενείς με διαβητική μικροαγγειοπάθεια (Belcaro et al., 2006).

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια ενδοκρινική διαταραχή, και οι επιπλοκές του, όπως η δυσλιπιδαιμία (αυξημένα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, της LDL και

των τριγλυκεριδίων και χαμηλή συγκέντρωση της HDL) και η υπεργλυκαιμία, αποτελούν κύριες αιτίες αναπηρίας και νοσοκομειακής περίθαλψης, που εγκυμονούν σημαντική οικονομική επιβάρυνση (Movahedian et al., 2010). Η χρόνια υπεργλυκαιμία του ανεξέλεγκτου σακχαρώδη διαβήτη αυξάνει τα επίπεδα των ROS (οξειδωτικό στρες) και μειώνει την ενζυμική αντιοξειδωτική άμυνα και είναι υπεύθυνη για αμφιβληστροειδοπάθεια και το σχηματισμό καταρράκτη. Αυτή η χρόνια νόσος μπορεί να οδηγήσει σε μικροαγγειακές παθολογίες, ειδικά στο μάτι, το νεφρό, και τα περιφερικά νεύρα (Schönlau & Rohdewald, 2001). Η Pycnogenol[®] είτε μόνη ή σε συνδυασμό με άλλα αντιοξειδωτικά (π.χ. β-καροτένιο και α-λιποϊκό οξύ) έχουν αυξήσει τις δραστηριότητες της αναγωγάσης γλουταθειόνης και της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης του αμφιβληστροειδούς σε διαβητικά ζώα, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια αποτελεσματική αντιοξειδωτική και αντιυπεργλυκαιμική θεραπεία για τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες (Berryman et al., 2004; Kamuren et al., 2006).

Τα ευρήματα μιας *in vitro* μελέτης αποκάλυψε ότι η Pycnogenol[®] αύξησε τα αποτελέσματα άλλων αντιοξειδωτικών, όπως το συνένζυμο Q10, και θα μπορούσε να είναι χρήσιμη για την προστασία του αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού από τη βλάβη που προκαλείται από την αύξηση των ROS και τελικά του οξειδωτικού στρες (Ueda et al., 1996; Chida et al., 1999).

A.7.1.10.3 Αλλεργία και Άσθμα

Διενεργήθηκε μια τυχαία, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, διπλά τυφλή μελέτη σε 60 άτομα (6-18 χρόνια, σε μια περίοδο 3 εβδομάδων) και αναφέρθηκε η σημαντική αποτελεσματικότητα της Pycnogenol[®] στη βελτίωση των πνευμονικών λειτουργιών και τη μείωση των συμπτωμάτων του άσθματος σε παιδιά (Lau et al., 2004). Μια ελεγχόμενη, με εικονικό φάρμακο, διασταυρωμένη μελέτη ανέφερε, επίσης, ότι η Pycnogenol[®] μείωσε τα συμπτώματα του άσθματος και θα μπορούσε να είναι ένα πολύτιμο διατροφικό πρόσθετο στη διαχείριση του χρόνιου άσθματος (χρόνια ηωσινοφιλική βρογχίτιδα και φλεγμονώδης διεργασία στον πνεύμονα), (Hosseini et al., 2001). Οι Sharma et al. (2003) ανέφεραν ότι η Pycnogenol[®] ανέστειλε την απελευθέρωση της ισταμίνης από περιτοναϊκά μαστοκύτταρα αρουραίου και οι ανασταλτικές επιδράσεις της ήταν ευνοϊκά συγκρίσιμες με χρωμογλυκικό νάτριο.

A.7.1.10.4 Διαταραχές της εμμήνου ρύσεως, εγκυμοσύνη που σχετίζεται με πόνο και ενδομητρίωση

Μια πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη, διπλά-τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, μελέτη σε τέσσερα νοσοκομεία στην Ιαπωνία έδειξε ότι η Pycnogenol[®] μείωσε σημαντικά τους πόνους της περιόδου και την ποσότητα των απαιτούμενων αναλγητικών φαρμάκων στη δυσμηνόρροια (γυναικολογική ιατρική κατάσταση με έντονο πόνο της μήτρας κατά την έμμηνο ρύση), (Suzuki et al., 2008). Αναφέρθηκε, επίσης, ότι το PBE μείωσε τις κράμπες εμμηνόρροιας, το κοιλιακό άλγος και την ευαισθησία σε γυναικολογικές παθήσεις όπως η ενδομητρίωση και η δυσμηνόρροια, και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μια εναλλακτική θεραπεία για την απελευθέρωση της γοναδοτροπίνης, ορμόνης αγωνιστή (Gn-rHA), στη θεραπεία της ενδομητρίωσης (Kohama et al., 2004; Kohama et al., 2007). Επίσης, μια

τυχαιοποιημένη, διπλά-τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη έδειξε ότι η Pycnogenol[®] μείωσε τα συμπτώματα της κλιμακτηρίου, χωρίς ανεπιθύμητα αποτελέσματα σε περι-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Yang et al., 2007). Το PBE, πλούσιο σε πολυφαινολικές ενώσεις, έχει ευεργετικά αποτελέσματα σε μια σειρά από επώδυνες καταστάσεις, όπως η δυσκαμψία των ώμων, η κήλη δίσκου, και η εγκυμοσύνη που συνδέεται με πόνο (χαμηλότερος πόνος στην πλάτη, πόνος στο ισχίο και στις αρθρώσεις, πόνος στη βουβωνική περιοχή, και πόνος που οφείλεται σε κίρσους ή κράμπες γάμπας), (Kohama & Inoue, 2006). Οι αναλγητικές και αντισπασμωδικές επιδράσεις των φαρμακευτικών βοτάνων μπορεί να έχει κατάλληλες συνέπειες για κράμπες εμμηνορροίας και για το προεμμηνορροϊκό σύνδρομο (Zolfaghari et al., 2006). Δύο πολυφαινολικά συστατικά του PBE (καφεϊκό οξύ και πρωτοκατεχουϊκά οξέα) έχουν μη ειδική αντισπασμωδική δράση επί των λείων μυών σε διάφορα όργανα του αρουραίου. Φαίνεται ότι αυτή η αντισπασμωδική δράση μπορεί να συνεισφέρει σε ευεργετικά αποτελέσματα του PBE σε προεμμηνορροϊκό σύνδρομο (Ortiz de Urbina et al., 1990).

A.7.1.10.5 Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής – Υπερκινητικότητας (Attention Deficit Hyperactivity Disorder - ADHD)

Εκχύλισμα πλούσιο σε πολυφαινόλες, όπως το PBE, μειώνει την υπερκινητικότητα των παιδιών, την απέκκριση των κατεχολαμινών, και το οξειδωτικό στρες (Trebatická et al., 2006; Dvoráková et al., 2007). Μία τυχαιοποιημένη, διπλά-τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, μελέτη σχετικά με τα παιδιά με ADHD έδειξε ότι η θεραπεία με Pycnogenol[®] προκάλεσε μείωση της ντοπαμίνης και μείωση της τάσης αδρεναλίνης και νοραδρεναλίνης, και αύξησε την αναλογία GSH / GSSG (Dvoráková et al., 2007). Σε μια άλλη τυχαία, διπλά-τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη, ερευνήθηκε η επίδραση της χορηγηθείσας Pycnogenol[®] ή εικονικού φαρμάκου για το επίπεδο της μειωμένης GSH και της οξειδωμένης γλουταθειόνης GSSG σε παιδιά που πάσχουν από ADHD (νευροαναπτυξιακή διαταραχή με παρορμητικότητα, αφηρημάδα και υπερκινητικότητα) και για την ολική αντιοξειδωτική κατάσταση. Ως αποτέλεσμα, αναφέρθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων GSSG και αύξηση των επιπέδων GSH, καθώς και βελτίωση της αναλογίας GSH / GSSG σε σύγκριση με ομάδα εικονικού φαρμάκου. Επιπλέον, η Pycnogenol[®] βελτίωσε την αντιοξειδωτική κατάσταση των παιδιών με ADHD (Dvoráková et al., 2006). Οι Chovanova et al., (2006) διερεύνησαν την επίδραση των πολυφαινολικών ενώσεων του εκχυλίσματος από φλοιό πεύκου στο επίπεδο των οξειδωμένων πουρινών, που αντιπροσωπεύονται από 8-οξο-7, 8-διυδρογουανίνη (8-oxoG) και για την ολική αντιοξειδωτική κατάσταση σε παιδιά με διαταραχή ελλειμματικής προσοχής / υπερκινητικότητας. Βρήκαν ότι το PBE, με προέλευση από τη Γαλλία, προστάτευσε το DNA από την οξείδωση, ομαλοποίησε την ολική αντιοξειδωτική κατάσταση και βελτίωσε την προσοχή των παιδιών με ADHD.

A.7.2 *Pinus nigra* – Arnold

A.7.2.1 Βοτανική ταξινόμηση



Εικόνα 44: *Pinus nigra* (Arnold)

Επιστημονική ονομασία

Βασίλειο:	Plantae
Υποβασίλειο	Viridiplantae
Υπο-υπαβασίλειο	Streptophyta
Υπεράθροισμα	Embryophyta
Αθροισμα	Tracheophyta
Υποάθροισμα	Spermatophytina
Υπο-υποάθροισμα	Gymnospermae
Κλάση	Pinopsida
Τάξη:	Pinales
Οικογένεια:	Pinaceae
Γένος:	<i>Pinus</i>
Είδος:	<i>Pinus nigra</i> (Arnold)

(Συστηματική κατάταξη του είδους *Pinus nigra* κατά το ITIS)

A.7.2.2 Περιγραφή και Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Η Μαύρη Πεύκη ή Αυστριακή πεύκη (*Pinus nigra* J.F. Arnold) είναι ένα μεγάλο αιθαλές δένδρο με ύψος από 20 έως 45 μέτρα κατά την ωριμότητα, με κόμη από ευρέως κωνική σε νεαρά δέντρα μέχρι ομπρελοειδή σε γηραιότερα δέντρα, ενώ διαθέτει κορμό ευθυτενή (Εικόνα 45). Ο φλοιός είναι αρχικά ανοικτός γκρι έως σκούρο γκρι-καφέ και χωρίζεται με λωρίδες σε φολιδωτές πλάκες σε παλαιότερα δέντρα, δημιουργώντας ένα ξηρόφλοιο, που σχίζεται βαθιά (Εικόνα 46). Η κλάδωση της είναι κατά κανόνα σπονδυλωτή με τις άκρες των κλαδιών να είναι ελαφρώς ανοδικές σε νεαρά δέντρα, ενώ σε μεγαλύτερα δέντρα μόνο τα κλαδιά στο πάνω μέρος της κόμης έχουν αναστραμμένες άκρες. Το είδος αυτό διαθέτει ένα βαθύ και έντονο ριζικό σύστημα. Τα φύλλα του είναι βελόνες σκληρές, ευθείς ή κυρτές, λεπτά οδοντωτές με μήκος από 8-16 εκατοστά και διάμετρο 1-2 χιλιοστά (Εικόνα 47). Είναι μονήρεις τον πρώτο χρόνο, αλλά στη συνέχεια ανά δύο σε σπειροειδή διάταξη και ζουν 4-6 χρόνια. Ο κολεός είναι ανθεκτικός, μακρύς 10 έως 12 χιλιοστά, ενώ οι αγωγοί ρητίνης είναι διάμεσοι.



Εικόνα 45: Φλοιός *P. nigra*

Η μαύρη πεύκη είναι ένα μόνικο κωνοφόρο με αιολική γονιμοποίηση, και οι σπόροι της διασκορπίζονται με τον άνεμο. Τα άνθη της είναι μονογενή και

εμφανίζονται τον Απρίλιο με Ιούνιο. Τα αρσενικά είναι κίτρινοι ίουλοι και τα θηλυκά κοκκινωποί όρθιοι κωνίσκοι.

Ο καρπός είναι κώνος. Οι κώνοι είναι οξυκόρυφοι συμμετρικοί, φέρονται κατά σπονδύλους, σπανιότερα 4, κάθετοι στα κλαδιά χωρίς ποδίσκο. Οι ώριμοι κώνοι έχουν μήκος 5-10 εκατοστά και πλάτος 2-4 εκατοστά. Είναι κιτρινωποί, και τα καρπικά λέπια φέρουν αποφύσεις ρομβικές με οξεία και εγκάρδια τρόπιδα και ομφαλό αγκαθωτό. Οι κώνοι γύρης και σπερμάτων εμφανίζονται από το Μάιο έως τον Ιούνιο. Καθώς ωριμάζουν, το χρώμα τους μεταβάλλεται από πράσινο σε γκρι ή απαλό κίτρινο από το Σεπτέμβριο μέχρι το Νοέμβριο, περίπου 18 μήνες μετά από τη γονιμοποίηση. Οι κώνοι περιέχουν 30-40 σπόρους, των οποίων τα μισά μπορούν να βλαστήσουν. Οι σπόροι έχουν χρώμα σκούρο γκρι, με μήκος 6-8 χιλιοστά, με ένα κίτρινο φτερό μήκους 20-25 χιλιοστών, που βοηθά την εναέρια εξάπλωσή τους, όταν οι κώνοι ανοίγουν, από τον Δεκέμβριο ως τον Απρίλιο. Η σεξουαλική ωριμότητα επιτυγχάνεται στα 15 με 40 χρόνια, με τα δέντρα να εμφανίζουν ένα μέγιστο στην παραγωγή σπόρων κάθε 2 με 5 χρόνια. Οι σπόροι δεν μπαίνουν σε λήθαργο και η βλάστησή τους αρχίζει την ίδια άνοιξη που απελευθερώθηκαν από τον κώνο (**Εικόνα 47**).

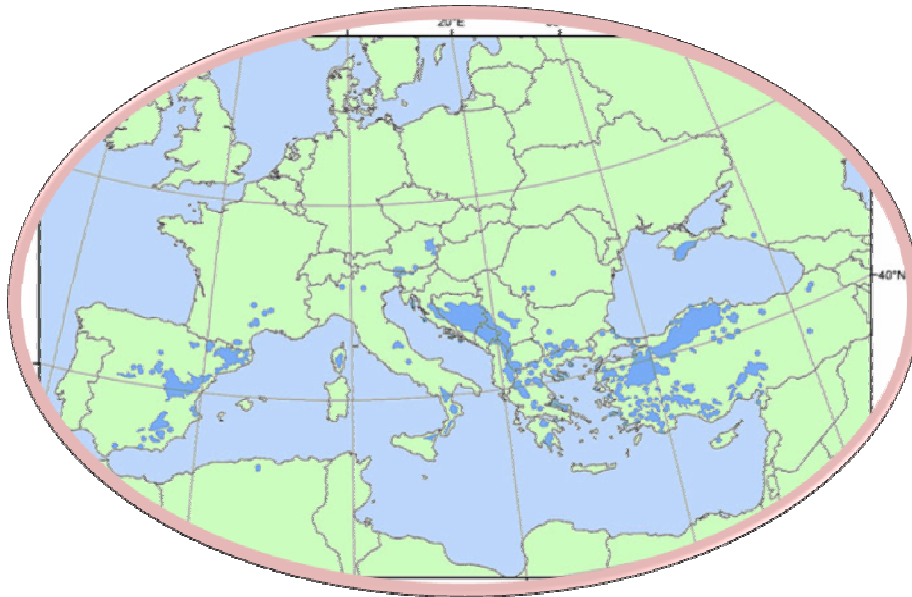


Εικόνα 46: Κώνος και φύλλωμα *P. nigra*

A.7.2.3 Γεωγραφική εξάπλωση

Τα πρώτα απολιθώματα μαύρης πεύκης χρονολογούνται στο Μειόκαινο, περίπου 20 εκατομμύρια χρόνια πριν. Οι κύκλοι πάγου, που διαμόρφωσαν την τεταρτογενή περίοδο στην Ευρώπη, ήταν υπεύθυνοι για τον επί του παρόντος πολύ ασυνεχούς φάσματος της μαύρης πεύκης. Θεωρείται ως ομαδικό είδος λόγω του μεγάλου και ασυνεχούς εύρους και της μεγάλης φαινοτυπικής ποικιλομορφίας.

Συγκεκριμένα, το *Pinus nigra* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο και ευμετάβλητο είδος, που εκτείνεται από την Ισπανία μέχρι τις χώρες γύρω από τη Μαύρη Θάλασσα με μεγάλη ενδοειδική ποικιλότητα. Είναι κυρίως νότιο ευρωπαϊκό είδος, που επεκτείνεται στην Τουρκία, ενώ κάποιοι απομακρυσμένοι πληθυσμοί απαντώνται παράκτια της Βόρειας Αφρικής (Αλγερία, Μαρόκο), στην Κριμέα (Ουκρανία) και στην ακτή της Ανατολικής Μαύρης Θάλασσας. Η ανατολική Αυστρία, όπου και περιγράφηκε για πρώτη φορά (Wiener Wald) αποτελεί το βορειότερο άκρο, που παρατηρείται το είδος (**Εικόνα 48**), (Farjon, 2013).



Εικόνα 47: Γεωγραφική κατανομή *Pinus nigra*

Επειδή η διακύμανση φαίνεται να σχετίζεται με την κατανομή έχουν αναγνωριστεί πέντε υποείδη (στην Flora Europaea), τα οποία χαρτογραφούνται εδώ. Το υποείδος που απαντάται στην Ελλάδα είναι το *Pinus nigra subsp. nigra*, ένα υψίπεδο υποείδος ευρέως διαδεδομένο στη Βαλκανική χερσόνησο, νότια της Πελοποννήσου, στην ανατολική Αυστρία και στη βόρεια Ιταλία, όπου εντοπίζεται στους πρόποδες των Άλπεων και στην ανατολική Ρουμανία.

Είναι το κυρίως πεύκο των δασών της χώρας μας. Βρίσκεται σε δάση στην οροσειρά της Πίνδου, στα βουνά της Ηπειρωτικής Ελλάδας, της Πελοποννήσου, ενώ λίγα υπάρχουν στα βουνά της Κρήτης και στα νησιά του βορειοανατολικού Αιγαίου Εύβοιας, Λέσβου, Θάσου, Μυτιλήνης και Σάμου. Αναπτύσσεται σε ορεινά και ημιορεινά εδάφη, σε ασβεστολιθικά και οφιολιθικά πετρώματα με αυξημένη υγρασία, με υψόμετρο να κυμαίνεται από 400 μ. έως 2.000 μ. με τις περισσότερες περιπτώσεις να εντοπίζεται πάνω από τα 1.200 μ. στην Ελλάδα. Μπορεί να σχηματίσει μεγάλης έκτασης πευκοδάση, συχνά σε συνδυασμό με *P. sylvestris* (Farjon, 2013). Μια ιδιαίτερη εξαίρεση είναι το παράκτιο δάσος μαύρης πεύκης στα Πετρωτά Αλεξανδρούπολης, το οποίο αποτελείται από δέντρα νάνους.

Πέντε κύρια υποείδη έχουν αναγνωριστεί από τη Βόρεια Αφρική έως την Κριμαία:

- ✓ *Pinus nigra subsp. salzmannii* (Dunal): Franco (syn: *P. nigra subsp. clusiana*, *P. nigra subsp. pyrenaica*) καλύπτει εκτεταμένες περιοχές της Ισπανίας (πάνω από 350.000 εκτάρια από την Ανδαλουσία στην Καταλονία και στις νότιες πλαγιές των Πυρηναίων) και βρίσκεται σε λίγους απομονωμένους

πληθυσμούς στα Πυρηναία και στις Cévennes στη Γαλλία. Μερικές φορές αναφέρεται ως πεύκα Πυρηναίων.

- ✓ *Pinus nigra subsp. laricio* (Poiret): βρίσκεται στην Κορσική (πέυκο Κορσικής) πάνω από 22.000 εκτάρια, στην Καλαβρία (όπου αναγνωρίζεται επίσης ως *P. nigra subsp. laricio* var. *calabrica*, το πέυκο Καλαβρίας) και στη Σικελία.
- ✓ *Pinus nigra subsp. nigra* (syn: *P. nigra subsp. austriaca* Höss, *P. nigra subsp. nigricans* Host, το Αυστριακό πέυκο): βρίσκεται από την Ιταλία στα Απέννινα Όρη, στη βόρεια Ελλάδα μέσω των Ιουλιανών Άλπεων και των βαλκανικών βουνών, που καλύπτουν πάνω από 800.000 εκτάρια.
- ✓ *Pinus nigra subsp. dalmatica* (Vis.): Franco, το πέυκο Δαλματίας, βρίσκεται σε μερικά νησιά στα ανοικτά των ακτών της Κροατίας και στις νότιες πλαγιές του Δαλματικών Άλπεων.
- ✓ *Pinus nigra subsp. pallasiana* (Lamb.): Holmboe καλύπτει εκτεταμένες περιοχές, κυρίως στην Ελλάδα και την Τουρκία (2.5 εκατομμύρια εκτάρια, 8 % της συνολικής δασικής έκτασης) και, ενδεχομένως, ως τη Βουλγαρία. Μπορεί, επίσης, να βρεθεί στην Κύπρο και την Κριμαία. Μερικές φορές αναφέρεται ως πέυκο της Κριμαίας.

A.7.2.4 Οικολογία

Η μαύρη πεύκη αναπτύσσεται με μέτρια ταχύτητα, περίπου 30 με 70 εκατοστά κάθε χρόνο. Συνήθως έχει μια στρογγυλή, κωνική κόμη, που γίνεται ακανόνιστη καθώς αναπτύσσεται. Το δέντρο μπορεί να ζήσει αρκετά χρόνια, με κάποια δέντρα να έχουν ηλικία μεγαλύτερη των 500 ετών.

Χρειάζεται άφθονο φως για να αναπτυχθεί σωστά και δεν ανέχεται τη σκιά (φωτόφυτο), ενώ είναι ανθεκτική στο κρύο και τον παγετό, στον άνεμο και την ξηρασία, με σχετική προσαρμοστικότητα στο περιβάλλον. Φύεται σε αμιγείς συστάδες και σπανιότερα σε σχέση με άλλα πεύκα, όπως *P. sylvestris* ή *P. uncinata*. Σε αντίθεση με τη Χαλέπιο πεύκη, με την οποία μερικές φορές συνυπάρχει, η μαύρη πεύκη δεν έχει μηχανισμούς αναγέννησης μετά από πυρκαγιά, γεγονός που δυσκολεύει τη φυσική αναγέννηση των δασών μαύρης πεύκης που έχουν καεί (Isajev et al., 2003).

Λόγω της μεγάλης ποικιλίας χαρακτηριστικών που παρουσιάζει, διακρίνονται διάφορες ποικιλίες ή φυλές. Τα περισσότερα υποείδη μαύρης πεύκης μεγαλώνουν σε ένα μεσογειακού τύπου κλίμα, εκτός από το είδος *Pinus nigra subsp. nigra* (Εικόνα 49), το οποίο αναπτύσσεται σε πιο τυπικά εύκρατο κλίμα. Βιοκλιματικές συνθήκες κυμαίνονται από υγρή (ετήσια βροχόπτωση 800-1.000 χιλιοστά) όπως *P. nigra subsp. mauretanica* ή *P. nigra subsp. laricio*, έως ύφυγρη (600-800 χιλιοστά) όπως *P. nigra subsp. pallasiana* στην Κύπρο, έως ημι-άνυδρη (400-600 χιλιοστά) όπως *P. nigra subsp. pallasiana* στην Ανατολία.



Εικόνα 48: *Pinus nigra subsp. nigra*

Η βέλτιστη υψομετρική περιοχή της μαύρης πεύκης είναι μεταξύ 800 έως 1.500 μέτρα. Ωστόσο, μια σημαντική υψομετρική διακύμανση μπορεί να παρατηρηθεί:

- 350-1.000 μ. στην Ιταλία (*P. nigra subsp. nigra*) και στην κροατική ακτή (*P. nigra subsp. dalmatica*),
- 500-900 μ. στα γαλλικά Πυρηναία και 1.600-2.000 μ. στην Ισπανία (*P. nigra subsp. salzmannii*),
- 1.000-1.600 μ. στην Κορσική (*P. nigra subsp. laricio*),
- 1.000-2.200 μ. στα βουνά του Τάυρου και 1.400-1.800 μ. στην Κύπρο (*P. nigra subsp. pallasiana*) και
- 1600-1800 μ. στη Βόρεια Αφρική (*P. nigra subsp. mauretanica*) (Isajev et al., 2003)

Επιπλέον, η μαύρη πεύκη μπορεί να αναπτυχθεί σε μια ποικιλία υποστρωμάτων:

- ❖ Ασβεστόλιθοι (π.χ. *P. nigra subsp. mauretanica*, *P. nigra subsp. dalmatica*, *P. nigra subsp. pallasiana* στην Κεντρική Ελλάδα),
- ❖ Δολομίτες (π.χ. *P. nigra subsp. nigra* στη βόρεια Ιταλία και την Αυστρία, *P. nigra subsp. salzmannii* στις Cévennes, Γαλλία),
- ❖ Όξινα εδάφη (*P. nigra subsp. laricio*, *P. nigra subsp. pallasiana* στην Ανατολία, *P. nigra subsp. salzmannii* σε ανατολικά Πυρηναία προς τη Γαλλία) ή
- ❖ Ηφαιστειακά εδάφη (*P. nigra subsp. laricio* στη Σικελία).

Α.7.2.5 Χρήσεις

Η Ευρωπαϊκή μαύρη πεύκη είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα και οικονομικά αυτόχθονα κωνοφόρα στην Κεντρική και Νότια Ευρώπη, ιδιαίτερα στην Κορσική. Αποτελεί σημαντικό δέντρο ξυλείας. Είναι εκμεταλλεύσιμη, κυρίως, για το ξύλο της, που είναι μέτρια σκληρό και μέτρια βαρύ, ανθεκτικό, εύκολο σε επεξεργασία, με λιγότερο ρετσίνι, σε σχέση με το ξύλο των άλλων ειδών και καλής ποιότητας. Χρησιμοποιείται εκτενώς σε όλη την περιοχή της Μεσογείου για οικοδομικές κατασκευές, καθώς και στην επιλοποιία, στη ναυπηγική, για ινοπλάκες, μοριοπλάκες, καπλαμάδες, κόντρα πλακέ, ξυλοπολτό κ.ά. Σε ορεινές περιοχές μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε χώρους αναψυχής. Στις ΗΠΑ και τον Καναδά, η Ευρωπαϊκή μαύρη πεύκη φυτεύεται ως δέντρο σε δρόμο, και ως καλλωπιστικό δέντρο σε κήπους και πάρκα. Η αξία του ως δέντρο δρόμου οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην αντοχή του σε αλάτι ψεκασμού (από αλάτι οδικής αποπλύγωσης), σε διάφορους βιομηχανικούς ρύπους (συμπεριλαμβανομένου και του όζοντος), καθώς και στην ανοχή του στην ξηρασία.



Εικόνα 49: *Pinus nigra subsp. laricio*

Λόγω της ικανότητάς της να αναπτύσσεται και σε ανοικτά εδάφη και σε οικολογικές απαιτητικές καταστάσεις, το Αυστριακό πεύκο (*Pinus nigra subsp. nigra*) χρησιμοποιήθηκε εντατικά κατά τη διάρκεια του 19ου και στις αρχές του 20ου αιώνα για προγράμματα αναδάσωσης, π.χ. νότια στις γαλλικές Άλπεις για τον έλεγχο των κατολισθήσεων και την αποκατάσταση της γης, και σε Αγγλία και ΗΠΑ για τη στερέωση αμμόλοφων και ως ανεμοφράκτης. Επί του παρόντος, *Pinus nigra subsp. laricio* (**Εικόνα 50**) είναι από τα πιο σημαντικά είδη αναδάσωσης στη νότια Αγγλία, καθώς και σε ορισμένες γαλλικές περιφέρειες (π.χ. κοιλάδα του Λίγηρα) (Isajev et al., 2003).

Άλλες χρήσεις περιλαμβάνουν χριστουγεννιάτικα δέντρα, καυσόξυλα, ως στύλος στήριξης καλωδίων μεταφοράς ηλεκτρικού ρεύματος καθώς και την κατασκευή κιβωτίων.

A.7.2.6 Απειλές για τη γενετική ποικιλότητα

Η μαύρη πεύκη περιλαμβάνεται στην Κόκκινη Λίστα Απειλούμενων Ειδών της IUCN (IUCN - Red List of Threatened Species), αν και εντάσσεται στα είδη χαμηλού κινδύνου. Μερικοί από τους υπομεσογειακούς ενδημικούς πληθυσμούς της, αποτελούν οικότοποι προτεραιότητας βάσει της οδηγίας Natura 2000 της ΕΕ (οδηγία για τους οικοτόπους n ° 92/43 / ΕΟΚ, 21 Μάιος 1992). Εκτεταμένες φυτείες πραγματοποιήθηκαν συχνά σε όλη την Ευρώπη τους τελευταίους δύο αιώνες με υλικό από άγνωστες ή / και πολύ απομακρυσμένες πηγές, για τις οποίες δεν υπάρχουν αυτή τη στιγμή ιστορικά ίχνη. Αυτό έχει πιθανώς ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη ανάμιξη των τοπικών και εισαγόμενων γονιδιακών δεξαμενών σε όλη την περιοχή κατανομής της μαύρης πεύκης (Isajev et al., 2003).

Βλαβερά έντομα περιλαμβάνουν τον Ευρωπαϊκό σκώρο βλαστού μαύρης πεύκης (*Rhyacionia buoliana*), τις λιτανευτικές κάμπιες πεύκου (*Thaumetopoea pityocampa*), ιδιαίτερα, σε θερμά και ξηρά κλίματα. Η εμφάνιση μιας «παραμορφωτικής ασθένειας», που προσβάλλει τα πεύκα, που αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες στρες και είναι γνωστή ως *Diplodiatip blight* και προκαλείται από το μήκητα *Sphaeropsis sapinea*, υπήρξε ιδιαίτερα σημαντικά στη Γαλλία και την Τουρκία στη δεκαετία του 1990. Άλλα παράσιτα, όπως *Acantholyda hieroglyphica*, *Diprion Pini*, *Pissodes validirostis* και *Monophlebus hellenicus* έχουν καταγραφεί στην Τουρκία. Πιο πρόσφατα έχει αναφερθεί, η αύξηση του αντίκτυπου της σήψης της βελόνας, γνωστής ως η «νόσος της κόκκινης ζώνης», που προκαλείται από το μύκητα *Dothistroma septospora* με αποτέλεσμα τη μείωση της δασικής φύτευσης (Isajev et al., 2003).

Σε περιοχές όπου η μαύρη πεύκη είναι ευρέως διαδεδομένη και πολύ σημαντική για τη δασοκομία, παράγοντες όπως οι δασικές πυρκαγιές και η παράνομη κοπή μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή ζημιά. Σε περιοχές, όπου εμφανίζεται σε μικρούς απομονωμένους πληθυσμούς, μεγάλοι κίνδυνοι προέρχονται από κάθε παράγοντα που μπορεί να προκαλέσει τοπική εξαφάνιση, είτε μέσω της παράνομης κοπής και πυρκαγιών ή μέσω υβριδισμού («γενετική ρύπανση») από φυτεμένα μαυρόπευκα που ανήκουν σε άλλα υποείδη. Μοναδικές και σπάνιες ποικιλίες, όπως η *P. nigra var. pyramidalis* ή *P. nigra var. sheneriana* στην Τουρκία είναι υπό τις ίδιες απειλές (Isajev et al., 2003).

A.7.2.7 Προστασία και διατήρηση του είδους

Σύμφωνα με τον Isajen και τους συνεργάτες του (2003), επειδή η μαύρη πεύκη διαφορετικών προελεύσεων έχει εκτενώς φυτευτεί, τώρα συνίσταται απαραίτητος ο προσδιορισμός των αυτόχθονων πληθυσμών. Η δέσμευση αυτή θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε διεθνές επίπεδο. Σε κάθε χώρα, θα πρέπει να γίνει μια απογραφή για να καθοριστεί η γεωγραφική κατανομή των ειδών, η κατάσταση διατήρησης, οι απειλές και οι πιθανές χρήσεις. Δραστηριότητες εκτροφής ζώων παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες με τον καθορισμό πιθανών ζωνών φυτείας, συλλογής σπόρων και μεταφοράς. *In situ* δραστηριότητες διατήρησης θα πρέπει να ενθαρρύνονται χωριστά ως συστάδες σπόρων και ως δάση διατήρησης γονιδίων. Ένα διεθνές *in situ* δίκτυο 100-120 συστάδων θα ήταν σκόπιμο να εκπροσωπήσει τη φυσική οικολογική και γενετική ποικιλότητα των μαυρόπευκων.

Καθώς, ο ενδοειδικός υβριδισμός είναι εύκολος, μεταξύ μαυρόπευκων, εξωτικών ή βελτιωμένων μαυρόπευκων, δεν θα πρέπει να φυτεύονται στην περιοχή αυτόχθονες και εγκλιματισμένες συστάδες. Αυτό ισχύει, ιδιαίτερα, για τα εντοπισμένα και κατακερματισμένα υποείδη όπως *P. nigra subsp. laricio*, και είναι εξαιρετικής σημασίας για υποείδη που απειλούνται, όπως *P. nigra subsp. salzmanii* στη Γαλλία και *P. nigra subsp. mauretanica* στη Βόρεια Αφρική. Για τα υποείδη αυτά καθώς και για άλλες ποικιλίες σπάνιας εμφάνισης, η *ex situ* διατήρηση είναι κατάλληλη και επείγουσα. Ως ένα βήμα προς αυτή την κατεύθυνση, το 1999 επιλέχθηκε ένα δάσος διατήρησης γονιδίων στην Τουρκία για το σπάνιο *P. nigra var. pyramidalis*.

Πληροφορίες, σχετικά με τις δοκιμές προέλευσης και απογόνων, καθορίστηκαν σε όλη την Ευρώπη και θα πρέπει να καταχωρούνται σε βάση δεδομένων. Αυτό το δίκτυο πειραματικών περιοχών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την *ex situ* διατήρηση της μαύρης πεύκης. Σε περιθωριακές περιοχές είναι απαραίτητη η δειγματοληψία για περαιτέρω ενίσχυση του δικτύου αυτού και, ενδεχομένως, η *ex situ* φύτευση σπόρων οπωρώνων έως να εγκατασταθούν εκ νέου οι εξαντλημένοι πόροι.

A.7.2.8 Χημική σύσταση φλοιού

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε εκχυλίσματα εξανίου, αιθυλικής αλκοόλης και ζεστού νερού από φλοιό *Pinus nigra* έδειξε ότι τα κύρια συστατικά του ήταν τα λιπαρά οξέα και οι αλειφατικές αλκοόλες, καθώς επίσης και τα ρητινικά οξέα και οι στερόλες. Το αιθερικό κλάσμα από διαλύματα μεθανόλης-νερού σε αναλογία 4:1 v/v περιείχε απλές φαινόλες όπως 4-υδροξυβενζαλδεΰδη, βανιλίνη, 3,4-διυδροξυβενζαλδεΰδη, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ. Επίσης, βρέθηκε φερουλικό οξύ (Hafizoğlu et al., 2002).

Πίνακας 2: Κύρια συστατικά του φλοιού της μαύρης πεύκης

Λιπαρά οξέα	Αλειφατικές αλκοόλες	Ρητινικά οξέα	Στερόλες
14:0	Τετραδεκανόλη	Πιμαρικό	Καμπεστερόλη
16:1	Πενταδεκανόλη	Σανταρακοπιμαρικό	Καμπεστανόλη
16:0 (παλμιτικό)	Εξαδεκανόλη	Ισοπιμαρικό	Σιτοστερόλη
17:0ai	Επταδεκανόλη	Παλουστρικό	Σιτοστανόλη
9,12-18:2 (λινολεϊκό)	Οκταδεκανόλη	Διυδροαβιετικό	
9-18:1 (ελαϊκό)	Δοκοσανόλη	Αβιετικό	
11-18:1	Τετρακοσανόλη		
18:0 (στεαρικό)	Εξακοσανόλη		
5,9,12-20:3			
20:0			
18-υδροξυοκταδεκ-9-ενοϊκό			
Οκταδεκ-9-ενε-1,18-διοϊκό			
22:0			
24:0			

A.7.2.9 Βιολογικές Δράσεις

Κουκουνάρια, φύλλα, φλοιός και ρητίνη από το γένος *Pinus* έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική για τη θεραπεία των ρευματισμών και αναπνευστικών παθήσεων και ως γενικά αντισηπτικά (Leung & Foster, 1996).

A.7.2.9.1 Αντιμικροβιακή δράση μαύρης πεύκης

Έρευνες, που πραγματοποιήθηκαν σε εκχυλίσματα πυραμιδικής μαύρης πεύκης (*Pinus nigra subsp. pallasiana var. pyramidata*) από τα διάφορα μέρη του ενδημικού φυτού της Τουρκίας, έδειξαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι αντιβακτηριακές και οι αντιμυκητιακές δραστηριότητες των εκχυλισμάτων αιθυλικής αλκοόλης, μεθανόλης, οξικού αιθυλεστέρα και ακετόνης από τα φύλλα, τους κώνους και τους φλοιούς της συγκεκριμένης μαύρης πεύκης σε διάφορα βακτήρια και μύκητες (Unaldi & Toroglu, 2009).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα εκχυλίσματα του δένδρου είχαν αντιμυκητιασικά αποτελέσματα έναντι της *Candida albicans*. Όμως, τα εκχυλίσματα των τμημάτων του δέντρου δεν είχαν αντιμυκητιακή δράση κατά του *Kluyveromyces fragilis*, εκτός από εκχυλίσματα αιθυλικής αλκοόλης και μεθανόλης του κώνου. Όλα τα εκχυλίσματα από όλα τα μέρη του δέντρου ανέστειλαν την ανάπτυξη όλων των βακτηρίων που δοκιμάστηκαν με ζώνες αναστολής μεταξύ 7-20 χιλιοστών. Ωστόσο, ο κώνος του οξικού αιθυλεστέρα του είδους αυτού δεν ανέστειλε την ανάπτυξη του *Bacillus megaterium*. Η αναστολή της ανάπτυξης *Pseudomonas aeruginosa* από εκχυλίσματα αιθυλικής αλκοόλης, μεθανόλης, οξικού αιθυλεστέρα και ακετόνης των κώνων απεικονίζεται παρακάτω, (Εικόνα 51), (Unaldi & Toroglu, 2009).



Εικόνα 50: Αναστολή της ανάπτυξης *Pseudomonas aeruginosa*

A.7.2.9.2 Αντιοξειδωτικές και αναλγητικές δράσεις τερεβενθίνης

Η τερεβενθίνη, που λαμβάνεται από το *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe (TPN - Turpentine of *P. nigra*), αποδείχθηκε ότι διαθέτει αντιοξειδωτικές και αναλγητικές δραστηριότητες. Η συνολική αντιοξειδωτική δραστηριότητα αυξήθηκε με την αύξηση του ποσού των εκχυλισμάτων (100, 300, και 500 g), που προστέθηκαν σε γαλάκτωμα λινελαϊκού οξέος. Όλες οι δόσεις της TPN έδειξαν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από την πρότυπη α-τοκοφερόλη. Τα δείγματα έδειξαν 49, 70, και 91% αναστολή στην υπεροξειδωση του γαλακτώματος λινολεϊκού οξέος, αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, 300 g α-τοκοφερόλης έδειξαν 40 % αναστολή της υπεροξειδωσης του γαλακτώματος λινελαϊκού οξέος (Gülçin et al., 2003).

Παράλληλα, αποδείχθηκε ότι με αύξηση της συγκέντρωσης της TPN, παρατηρείται μείωση της ισχύος, απομάκρυνση των ριζών ανιόντος υπεροξειδίου, απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών, χηλίωση μετάλλου, απομάκρυνση υπεροξειδίου του υδρογόνου και αναλγητικές δραστηριότητες σε σύγκριση με διαφορετικά πρότυπα, όπως κερκετίνη, BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene), και μεταμιζόλης (πρότυπη αναλγητική ένωση), (Gülçin et al., 2003).

Αυτές οι ιδιότητες μπορεί να είναι οι κυριότεροι λόγοι για την αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, καθώς και η φαινολική περιεκτικότητα (φαινολικές ενώσεις) της TPN φαίνεται να είναι υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική της δράση (Gülçin et al., 2003). Είναι γνωστό ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση της οξειδωσης των λιπιδίων και συνδέονται με αντιοξειδωτική δραστηριότητα, ενώ προτείνεται ότι έχουν ανασταλτικές επιδράσεις στη μεταλλαξιγένεση και στην καρκινογένεση στους ανθρώπους, όταν γίνεται κατάποση μέχρι 1.0 g ημερησίως από μια διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά (Yen et al., 1993; Tanaka et al., 1998; Duh et al., 1999). Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι η TPN αποτελεί μια πιθανή προσβάσιμη πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών και αναλγητικών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως ένα πιθανό συμπλήρωμα διατροφής ή στη φαρμακευτική και ιατρική βιομηχανία (Gülçin et al., 2003). Τέλος, η TPN χρησιμοποιείται ως αντισηπτικό για την οσφυαλγία (Baytop, 2001).

A.7.2.9.3 Αντιβακτηριακή δράση ανώριμων κώνων

Το ισοπιμαρικό οξύ (διτερπένιο) απομονώθηκε από ανώριμους κώνους του *Pinus nigra* (Arnold) χρησιμοποιώντας βιοδοκιμασία καθοδηγούμενης κλασματοποίησης ενός ακατέργαστου εκχυλίσματος εξανίου. Αναλύθηκε κατά του ανθεκτικού σε πολυφαρμακευτική αγωγή (MDR: multidrug-resistant) και ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*). Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MIC: Minimum Inhibitory Concentrations) ήταν 32-64 $\mu\text{g} / \text{mL}$ και συγκρίθηκαν με ένα εμπορικά λαμβανόμενο οξύ ρητίνης, το αβιετικό οξύ, με MICs 64 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Τα ρητινικά οξέα είναι γνωστό ότι έχουν αντιβακτηριακή δράση και αποτιμώνται στην παραδοσιακή ιατρική για τις αντισηπτικές τους ιδιότητες. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι το ισοπιμαρικό οξύ ανώριμων κώνων του *P. nigra* εμφανίζει δραστηριότητα έναντι MDR και MRSA στελεχών του *S. aureus*, που γίνονται όλο και πιο ανθεκτικά στα αντιβιοτικά. Το ισοπιμαρικό οξύ και το αβιετικό οξύ εκτιμήθηκαν ως προς

διαφοροποίηση της δράσης σε συνδυασμό με αντιβιοτικά, αλλά δεν ενίσχυσαν τη δραστηριότητα των αντιβιοτικών που δοκιμάστηκαν (Smith et al., 2005).

Άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ένα αλκαλικό-διαλυτό, που απομονώθηκε από σπόρους κώνων του *P. nigra* Arnold, αποκάλυψε ένα σημαντικό φαινυλοπροπανοειδές (i.e. λιγνίνη) πολυμερές, το οποίο έδειξε αντί-HIV δραστηριότητα (Eberhardt & Young, 1996).

A.7.2.9.4 Αντικαρκινικές και βιολογικές επιδράσεις της νουκλεάσης γύρης

Νουκλεάση γύρης (PN) -Pollen Nuclease - από μαύρη πεύκη εμφανίζει *in vivo* υψηλότερη αντικαρκινική δράση έναντι ανθρώπινων όγκων μελανώματος, που αναπτύσσονται σε αθυμικούς ποντικούς σε σύγκριση με σπερματική ριβονουκλεάση βοοειδούς (BS-RNase) - Bovine Seminal Ribonuclease -και DNase I.

Η αντικαρκινική δράση της νουκλεάσης γύρης (PN) από μαύρη πεύκη (*Pinus nigra*) που εξετάστηκε *in vitro* ήταν αμελητέα σε σύγκριση με τη βόειο σπερματική ριβονουκλεάση (BS-RNase). Ωστόσο, στα πειράματα σε βιολογικό περιβάλλον παρατηρήθηκε μία σημαντική μείωση του μεγέθους του ανθρώπινου όγκου μελανώματος σε ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με την παρούσα φυτική νουκλεάση και επίσης με ζωικές RNases και DNase I. Σε γυμνούς ποντικούς, που έχει εγχυθεί ενδοκαρκινικά PN (10 μg / δόση), το μέγεθος του όγκου μειώθηκε από 100 % σε ποντίκια μάρτυρες έως 46 % σε ποντικούς υπό αγωγή, ενώ σε ομολόγα ποντίκια κατεργασμένα με BS-RNase και DNase I, η ανάπτυξη του όγκου μειώθηκε λίγο περισσότερο, όμως μετά από δέκα φορές υψηλότερες δόσεις (100 και 80 μg ανά δόση) (Liponova et al., 2008).

Εμφανίστηκε, επίσης, ορισμένη ασπερματογενική και εμβρυοτοξική δραστηριότητα, ως έκφραση των παρενεργειών της PN και των συγκριτικών ενζύμων, αλλά ήταν μικρότερη σε σύγκριση με την επίδραση της βόειας σπερματικής ριβονουκλεάσης. Η ανοσογονικότητα της PN ήταν σημαντικά ασθενέστερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη της BS-RNase. Τα αντισώματα έναντι νουκλεάσης της μαύρης πεύκης, που παράγονται στα ποντίκια δεν απενεργοποιούν τα βιολογικά αποτελέσματα αυτής της φυτικής νουκλεάσης *in vivo* (Liponova et al., 2008).

A.7.2.9.5 Βιολογικές δράσεις αιθέριων ελαίων από πευκοβελόνες

❖ Απωθητική και προνυμφοκτόνος δράση έναντι *Aedesal bopictus*

Τα αιθέρια έλαια διαδραματίζουν στη φύση ένα σημαντικό ρόλο στην προστασία των φυτών ως αντιβακτηριακοί, αντιυικοί, αντιμυκητιασικοί και εντομοκτόνοι παράγοντες και επίσης ενάντια φυτοφάγων. Σύμφωνα με εθνοβοτανικά δεδομένα, παρασκευάσματα ειδών πεύκης έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τη θεραπεία διαφόρων παθήσεων (Berendes, 1902). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι τα αιθέρια έλαια από είδη *Pinus* επιδεικνύουν μία ποικιλία φαρμακολογικών και βιολογικών αποτελεσμάτων (Macchioni et al. 2002; Tognolini et al. 2006; Kolayli et al. 2009). Ελληνικά αιθέρια έλαια, που λαμβάνονται από τις βελόνες του *Pinus nigra*, εμφανίζουν κυρίως απωθητική δράση για την προστασία του ανθρώπινου δέρματος κατά του *Aedesal bopictus* (Diptera: Culicidae), ενός κουνουπιού μεγάλης οικολογικής και ιατρικής σημασίας, και κατά δεύτερον προνυμφοκτόνο δραστηριότητα (Koutsaviti et al., 2015).

❖ Ανασταλτική δράση αντιχολινεστεράσης στη θεραπεία της νόσου Alzheimer

Μια ενδιαφέρουσα δραστηριότητα έναντι της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) παρατηρήθηκε, επίσης, με αιθέρια έλαια από βελόνες του ***P. nigra subsp. nigra*** και ***P. nigra var. calabrica***, με τιμές IC₅₀ 94,4 και 101.5 µg / mL, αντίστοιχα. Αυτή η δραστηριότητα είναι σχετική με τη θεραπεία της νόσου του Alzheimer (AD), δεδομένου ότι τα φάρμακα της χολινεστεράσης είναι τα μόνα φάρμακα που διατίθενται για τη θεραπεία της AD. Ταυτόχρονα, τα αιθέρια έλαια του *Pinus nigra* και ορισμένα συστατικά τους παρέχουν περαιτέρω στοιχεία που υποστηρίζουν την αξία της διεξαγωγής κλινικών μελετών με χρήση αυτών των ειδών (Bonesi et al., 2010).

A.7.2.9.6 Αντιοξειδωτική δράση φύλλων και καρπών των καλλιεργούμενων Κωνοφόρων στο Ιράν

Μεθανολικά εκχυλίσματα των φύλλων και καρπών των καλλιεργούμενων κωνοφόρων στο Ιράν και συγκεκριμένα του είδους ***Pinus nigra* J. F. Arnold**, κατείχαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση, η οποία συγκρίθηκε με τις αντιοξειδωτικές δραστηριότητες του βουτυλιωμένου υδροξυτολουολίου (BHT) ως συνθετικό αντιοξειδωτικό και της α-τοκοφερόλης ως φυσικό αντιοξειδωτικό, (Emami et al., 2013). Χρήση των αντιοξειδωτικών είναι ένα μέσο για τη μείωση ταγγίσματος των λιπών και ελαίων στα τρόφιμα δηλαδή αλλοίωσης του χρώματος, της οσμής και της υφής. Τα εμπορικά συνθετικά αντιοξειδωτικά στη βιομηχανία τροφίμων [βουτυλιωμένο υδροξυ-τολουόλιο (BHT), βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), προπύλιο γαλλικού εστέρα(PG) και τριτογενή βουτυλδωροκινόνη (TBHQ)] δημιουργούν υποψίες ότι προκαλούν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία (Mojarab et al., 2009). Ως εκ τούτου, ως εναλλακτικές λύσεις, υπάρχει μια έντονη ανάγκη για την εξεύρεση νέων αποτελεσματικών και ασφαλών αντιοξειδωτικών από φυσικές πηγές για την πρόληψη της υποβάθμισης των τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Σε αυτό το στάδιο μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα μεθανόλης μπορούν να θεωρηθούν ως ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες (Emami et al., 2013).

A.7.2.9.7 Παραδοσιακή Παραγωγή Tar από την Ανατολική Μαύρη Πεύκη

Το Tar ή ρετσίνι είναι ένα παράδειγμα ενός φυτικού προϊόντος που χρησιμοποιείται στη λαϊκή ιατρική και λαμβάνεται από την Ανατολική Μαύρη Πεύκη [***Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe**], η οποία είναι πολύ συχνή στην περιοχή της Κεντρικής και Δυτικής Τουρκίας. Τα παλιά δέντρα, που είναι καλό για προσάναμμα και έχουν πολύ μεγάλο πάχος, προτιμώνται για την απόκτηση ρετσινιού.

Το παραδοσιακό αυτό προϊόν, που λαμβάνεται από το *Pinus nigra subsp. pallasiana*, χρησιμοποιείται στην πόλη Αφιόνκαραχισάρ, Κεντρική και Δυτική Τουρκία στη λαϊκή ιατρική για τη θεραπεία του πόνου στο αυτί σε παιδιά, οστεομυελίτιδα, πληγές, έλκη, έκζεμα, ακμή, αλωπεκία, μυκητιασικά. Επίσης, χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση αφθώδη πυρετού στα ζώα, πληγών στο στόμα σε πρόβατα και κατσίκες, και προστασία από ενδο - και εξωπαράσιτα. Τέλος,

χρησιμοποιείται και ως αποθητικό για φίδια, ποντίκια, μύγες (*Tabanus bovinus*) και τσιμπούρια (Ari et al., 2014).

A.7.3 *Pinus heldreichii* - H. Christ. (1863)

A.7.3.1 Βοτανική ταξινόμηση



Επιστημονική ονομασία

Βασίλειο:	Plantae
Υποβασίλειο	Viridiplantae
Υπο-υπαβασίλειο	Streptophyta
Υπεράθροισμα	Embryophyta
Αθροισμα	Tracheophyta
Υποάθροισμα	Spermatophytina
Υπο-υποάθροισμα	Gymnospermae
Κλάση	Pinopsida
Τάξη:	Pinales
Οικογένεια:	Pinaceae
Γένος:	<i>Pinus</i>
Είδος:	<i>Pinus heldreichii</i> (Christ)

Εικόνα 51: *Pinus heldreichii* (Christ) (Συστηματική κατάταξη του είδους *Pinus heldreichii* κατά το ITIS)

A.7.3.2 Περιγραφή και Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Το ρόμπολο ή λευκόδερμη πεύκη [*Pinus herldreichii* H. Christ (1863) συν. *Pinus leukodermis* Antoin. (1864)] είναι ένα είδος πεύκου που απαντάται σε μεγάλο υψόμετρο (Εικόνα 52). Αειθαλές δέντρο με κόμη αραιά πυραμιδοειδή και με ύψος από 25 έως 35 μέτρα, ενώ διαθέτει ευθύ και μεγάλο κορμό με διάμετρο που μπορεί να ξεπεράσει και τα 2 μέτρα. Χαρακτηρίζεται από το χρώμα και την υφή του πολύ παχύ φλοιού του: σταχτίλευκος και γυαλιστερός φλοιός σε νεαρά δέντρα, ενώ τα ωριμότερα δημιουργούν το χαρακτηριστικό ξηρόφλοιο σταχτοκαστανό θωρακόμορφο φλοιό, (το οποίο αποτελεί και το χαρακτηριστικό διαχωρισμού του από άλλα πεύκα), λόγω του ότι σχίζεται κατακόρυφα και οριζόντια. Ο φλοιός είναι λευκός στα κλαδιά (Εικόνα 53). Χειμερινοί οφθαλμοί είναι μη ρητινώδεις και έχουν ωοειδές ή επίμηκες σχήμα.



Εικόνα 52: Φλοιός του *Pinus heldreichii*

Τα δευτερεύοντα φύλλα είναι βελόνες σκληρές και δύσκαμπτες. Σχηματίζουν τούφες στις άκρες των

κλαδιών, τοποθετημένες ανά δύο σε δέσμες και διαρκούν για 5-6 χρόνια, ενώ τα βραχυκλάδια σχηματίζουν το χαρακτηριστικό πριονωτό ανάγλυφο από την πτώση των βελονών. Οι βελόνες είναι αραιά οδοντωτές, σχετικά κοντές μήκους από 6 έως 9 εκατοστά με οξεία κορυφή παρυφές και στοματικές γραμμές και στις δύο άνω και κάτω πλευρές (**Εικόνα 54**).

Το ρόμπολο είναι μόνικο: αφανή θηλυκά και αρσενικά άνθη φέρονται σε κώνους πάνω στο ίδιο δέντρο. Τα άνθη του, που είναι μονογενή, ανθίζουν τον Απρίλιο με Μάιο. Τα αρσενικά είναι κίτρινοι ίουλοι, μακρείς από 5-9 εκ. και πλάτους 2.5 εκ., ενώ τα θηλυκά είναι μεμονωμένοι όρθιοι κωνίσκοι χρώματος κοκκινωπού αλλά μερικές φορές απομονώνονται και σε ομάδες των δύο ή των τριών (**Εικόνα 54**). Ο καρπός είναι κώνος. Οι κώνοι ωριμάζουν περίπου ενάμιση χρόνο μετά τη γονιμοποίηση. Κατά την ωρίμανση είναι καστανωποί, με δερματώδη καρπικά λέπια και αποφύσεις επίπεδες ή πυραμιδοειδείς που εξέχουν. Ωριμάζουν το φθινόπωρο του δευτέρου, από την άνθηση, χρόνου. Τα σπέρματα του είναι μικρότερα των σπερμάτων της μαύρης πεύκης και πέφτουν αμέσως μετά την ωρίμανση του καρπού, η δε φυτρωτικότητα τους είναι περίπου 60-70 % και φυτρώνουν σε 3-5 εβδομάδες.



Εικόνα 53: Κώνοι και φύλλωμα του *P. heldreichii*

Με βάση τις αποφύσεις των καρπόφυλλων του *P. heldreichii* διακρίνονται δύο ποικιλίες, οι οποίες εντοπίζονται στην Ελλάδα (Vendramin et al., 2008):

- ❖ *P. heldreichii* var. *typica*: με επίπεδες αποφύσεις καρπόφυλλων
- ❖ *P. heldreichii* var. *leucodremis*: με πυραμιδοειδείς αποφύσεις που εξέχουν

A.7.3.3 Γεωγραφική κατανομή

Εντοπίζεται κυρίως στα Βαλκάνια, αλλά διατηρεί και ένα πολύ μικρό απομακρυσμένο πληθυσμό στη νότια ιταλική περιοχή Καλάμπρια, στα νότια Απέννινα Όρη, όπου κατέχει ξηρές ηλιόλουστες περιοχές σε υψόμετρο από 900 έως 2.300 μέτρα, που σχηματίζουν μικτές συστάδες με λευκή ελάτη (*Abies alba* Mill.) και Ευρωπαϊκή οξιά (*Fagus sylvatica* L.) ή αμιγείς συστάδες σε απότομες και βραχώδεις ξηρές νότιες πλαγιές.

Παράλληλα, εμφανίζεται στο κεντρικό δυτικό τμήμα της Βαλκανικής χερσονήσου συμπεριλαμβανομένων της νότιας Κροατίας, της Βοσνίας-Ερζεγοβίνης, της νότιας Σερβίας, Αλβανίας, της νοτιοανατολικής Γιουγκοσλαβίας, του Μαυροβούνιου, της νοτιοδυτικής Βουλγαρίας, της βόρειας Ελλάδας και της Θεσσαλίας (**Εικόνα 55**) (Farjon, 2013).

Το *Pinus heldreichii* σύμφωνα με τα μοριακά δεδομένα δε σχετίζεται στενά με το *P. nigra* αλλά με μία ομάδα μεσογειακών ειδών πεύκου, που συμπεριλαμβάνουν τα είδη *P. brutia* και *P. pinea* (Parks et al., 2012).



Εικόνα 54: Γεωγραφική κατανομή του *Pinus heldreichii*

A.7.3.4 Οικολογία

Το *P. heldreichii* είναι από τα σπάνια κωνοφόρα της Βαλκανικής χερσονήσου και της Ευρώπης. Το ρόμπολο είναι είδος πεύκου που απαντάται στις ορεινές και υποαλπικές ζώνες, σε υψόμετρο από 1.300 ως 2.200 μέτρα. Βρίσκεται διασκορπισμένο, με μικρούς πληθυσμούς να αναπτύσσονται συχνά σε υψηλά υψόμετρα (2.200-2640 μέτρα), σε βραχώδεις ασβεστολιθικούς γκρεμούς ή απόκρημνες πλαγιές. Στην Ελλάδα απαντάται στην Πίνδο, στον Όλυμπο, στο Βέρμιο, Όρβηλο και Γκορίλα. Αναπτύσσεται αργά και μερικά δέντρα στην Καλάμπρια πιστεύεται ότι είναι μεγαλύτερα από 1.000 ετών. Στα Βαλκάνια, τα είδη που φυτεύονται στη δασοκομία, σε καλύτερα εδάφη και σε χαμηλότερα υψόμετρα, αναπτύσσονται ταχύτερα απ' ό,τι στο φυσικό τους περιβάλλον (Farjon, 2013).

Σχηματίζει δάση αμιγή ή μικτά με οξιά και ψυχρόβια κωνοφόρα. Είναι είδος της ψυχρότερης περιοχής της φυτοδιάπλασης των φυλλοβόλων πλατύφυλλων, αλλά και της φυτοδιάπλασης των ψυχροβίων κωνοφόρων. Ευδοκίμει σε εδάφη βαθιά, ανεξάρτητα από την προέλευσή τους, αλλά και σε εδάφη λιγότερο βαθιά και γόνιμα, πάνω σε διάφορα πετρώματα.

Η λευκόδερμη πεύκη έδειξε χαμηλή ευαισθησία σε επιθέσεις εντόμων. Ωστόσο, αυτό μπορεί να καταστραφεί σοβαρά από sawflies (υμενόπτερα). Άλλα παραδείγματα περιλαμβάνουν το σκαθάρι του φλοιού πεύκου (*Pityogenes bidentatus* Herbst.), τον Ευρωπαϊκό σκώρο βλαστού πεύκου (*Rhyacionia buoliana* Denis & Schiffermüller) και την κάμπια πεύκου (*Thaumetopoea pityocampa* Schiff.). Μυκητολογικές προσβολές από *Heterobasidion annosum* έχουν, επίσης, παρατηρηθεί να προκαλούν ζημιά.

A.7.3.5 Χρήσεις

Η κύρια χρήση της λευκόδερμης πεύκης είναι ως διακοσμητικό δέντρο παρά ως είδος ξυλείας. Εντούτοις, το ξύλο του *P. heldreichii* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για γενικότερες κατασκευές.

Το είδος παρουσιάζει μεγάλη προσαρμοστικότητα στις ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (άνεμος, παγετός) και μεγάλη δυνατότητα αποικισμού, που το καθιστά κατάλληλο για την αναδάσωση των εκτεταμένων ξηρών περιοχών.

Επιπλέον, είναι ανθεκτικό στο διοξείδιο του θείου, στο φθορίδιο του υδρογόνου, στο διοξείδιο αζώτου και στη ρύπανση του όζοντος. Λόγω της δυνατότητάς του ν' αντιστέκεται στον αέρα, τον πάγο και την ισχυρή χιονόπτωση, το είδος χρησιμοποιείται, επίσης, για αναδασώσεις μεγάλου υψομέτρου. Η φύτευση πραγματοποιείται συνήθως χρησιμοποιώντας τα 3χρονα σπορόφυτα. Το ρόμπολο φυτεύεται στο νότο της Ιταλίας όχι μόνο λόγω της υψηλής προσαρμοστικότητάς του στα μεγάλα υψόμετρα, αλλά και επειδή είναι λιγότερο ευαίσθητο σε παράσιτα από άλλα είδη πεύκων (π.χ. είναι ανθεκτικό στη σήψη από το *Diplodia* που έχει σοβαρές επιπτώσεις στη μαύρη πεύκη) (Vendramin et al., 2008).

Καθώς έχει πολύ ισχυρή αντοχή και στην υγρασία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο νερό και κυρίως χωρίς εμποτισμό τοξικό ή μη. Είναι ιδανικό για τη ναυπηγική, κυρίως στο πέτσωμα πλοίων, για τη στέγαση και συγκεκριμένα για τεγίδες σε παραδοσιακά πέτρινα σπίτια, σε στέγες, εξωτερικές πόρτες και πατώματα. Από τον 16ο αιώνα, ένα μεγάλο ενδιαφέρον έχει προκύψει από το ξύλο *P. heldreichii*, που χρησιμοποιείται ως κύρια πηγή για την παραγωγή γάλακτος και την αποθήκευση εμπορευμάτων (Todaro et al., 2007). Παράλληλα, έχει θεωρηθεί, ευρέως στην Ελλάδα, ως πολύτιμο υλικό για την κατασκευή βαρελιών κρασιού (Tsoumis, 1991), καθώς είναι γνωστή η αξιοσημείωτη φυσική αντοχή, που διαθέτει και το καθιστά, παρόλο τη σπανιότητά του, ένα εξαιρετικό είδος για τη βιομηχανία ξυλείας (Petrovic & Miric, 1981).

A.7.3.6 Προστασία και διατήρηση του είδους

Το ρόμπολο περιλαμβάνεται στην Κόκκινη Λίστα Απειλούμενων Ειδών της IUCN (IUCN - Red List of Threatened Species), αν και εντάσσεται στα είδη χαμηλού κινδύνου. Ωστόσο, η φυσική κατανομή του είδους περιορίζεται συνεχώς και κατακερματίζεται, κυρίως λόγω των δασικών πυρκαγιών, υπερβόσκησης (ανθρωπογενείς διαταραχές) αλλά και λόγω υβριδισμού. Συγκεκριμένα, οι πυρκαγιές μπορεί να προκαλέσουν ταχεία και δραστική μείωση του μεγέθους του πληθυσμού καταστρέφοντας ενήλικα δέντρα, με συνέπεια απώλειες γενετικής ποικιλομορφίας και προσαρμοστικού δυναμικού δενδρυλλίων. Εντατική βόσκηση εμποδίζει τη φυσική αναγέννηση και μπορεί, επίσης, να οδηγήσει σε τοπική εξαφάνιση όταν τα ενήλικα δέντρα πεθαίνουν.

Η κύρια στρατηγική η οποία έχει υιοθετηθεί για τη διατήρηση του είδους συνδέεται με εθνικά πάρκα και προστατευόμενες περιοχές. Παράλληλα, η σχεδίαση in situ διατήρησης γονιδίων, όπου κατάλληλες στρατηγικές διαχείρισης των δασών, που χρησιμοποιούνται, είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για τη διατήρηση των

γενετικών πόρων του στοχευόμενου είδους, κάνοντας δυνατές εξελικτικές αλλαγές στην πάροδο του χρόνου. Η γενετική ποικιλότητα και η προσαρμοστικότητα μπορεί να διατηρηθούν από τη μία γενιά στην άλλη μέσω της διατήρησης αρκετά μεγάλων πληθυσμών τοπικά προσαρμοσμένων δέντρων και επιτρέποντας τη φυσική αναγέννηση από ένα μεγάλο αρκετά αριθμό γονέων.

Τέλος, η *ex situ* διατήρηση θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί εάν τα δάση είναι υπό πίεση ή αν οι γενετικοί πόροι τους παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον (για παράδειγμα, οριακοί ιταλικοί πληθυσμοί). Οι *ex situ* συστάδες πρέπει να καθοριστούν με προσοχή ώστε να αντιπροσωπεύουν την αρχική γενετική ποικιλομορφία ενός πληθυσμού. Δεδομένης της υψηλής ενδογαμίας και τα χαμηλά ποσοστά διασταύρωσης αυτού του είδους, ιδανικά οι σπόροι πρέπει να συλλέγονται από ένα μεγάλο αριθμό δέντρων (100 περ.) και από δέντρα που φύονται τουλάχιστον 100 μέτρα μακριά (Vendramin et al., 2008).

A.7.3.7 Χημική σύσταση

A.7.3.7.1 Χημική σύσταση ξύλου

Έρευνα, που πραγματοποιήθηκε από GC και GC / MS αναλύσεις του αιθέριου ελαίου από ξύλο του *P. heldreichii*, που συλλέχθηκε από ένα μεγάλο υψόμετρο της δασικής περιοχής της Πίνδου στη βορειοδυτική Ελλάδα, οδήγησε στην ταυτοποίηση 40 συστατικών (που αντιστοιχεί σε 96.30 % του συνολικού βάρους). Τα κύρια συστατικά είναι: λιμονένιο 28.70 %, κεμπρένιο 23.82 %, λονγκιφολένιο 6.89 %, α-πινένιο 6.43%, μεθυλο-καβικόλη 5.94 %, καουρένιο 5.88 % και κεμπρένιο Α 5.58 %. Μεταξύ των οποίων **λιμονένιο, κεμπρένιο, λονγκιφολένιο και α-πινένιο** έχουν βρεθεί ως τα πιο άφθονα (Πίνακας 4), (Graïkou et al., 2012).

Πίνακας 3: Σύνθεση των διαφορετικών τάξεων των τερπενίων σε αιθέριο από ξύλο του *P. heldreichii*

Ενώσεις	% σε αιθέριο έλαιο
Μονοτερπένια	37.18
Σεσκιτερπένια	10.47
Διτερπένια	36.07
Υδρογονάνθρακες	83.72
Οξυγονωμένα Μονοτερπένια	10.92
Οξυγονωμένα Σεσκιτερπένια	0.51
Οξυγονωμένα Διτερπένια	0.90
Οξυγονωμένες ενώσεις	12.33
Άλλα	0.22
Σύνολο	96.27

Πρέπει να σημειωθεί, η παρουσία στο έλαιο ενός συνολικού 37.18 % υδρογονανθράκων μονοτερπενίου και 36.07 % διτερπενίων, που ακολουθείται από

οξυγονωμένα μονοτερπένια 10.92 % και 10.47 % σεσκιτερπένια (Πίνακας 3), (Graikou et al., 2012).

A.7.3.7.2 Χημική σύσταση ξύλωματος ελαιορητίνης και κόμης τερεβινθέλαιου

Από έρευνες, που έγιναν σε ξύλωμα ελαιορητίνης, που παρακεντήθηκε από διάφορα δέντρα *P. heldreichii* στο Κόσοβο, ως κύρια συστατικά ταυτοποιήθηκαν η θενμπεργόλη και η κεμβρόλη (84.8 %). Επιπλέον, η έρευνα αυτή αποκάλυψε ότι λιμονένιο (79.4 %), α-πινένιο (11.2 %) και λονγκιφολένιο (5.6 %) ήταν τα κύρια συστατικά κόμης τερεβινθέλαιου (Lange et al., 1994). Αναφέρεται, επίσης, ότι το 83 % του τερεβενθινθέλαιου του βοσνιακού πεύκου αποτελείται από λιμονένιο (Πίνακας 4), (Obst, 1998).

A.7.3.7.3 Χημική σύσταση πευκοβελόνων

Επιπλέον, διάφορες μελέτες έχουν διεξαχθεί σχετικά με τις χημικές αναλύσεις του αιθέριου ελαίου, που προέρχεται από βελόνες *P. heldreichii* διαφορετικής γεωγραφικής εξάπλωσης (Πίνακας 4):

- ❖ Bonesi et al. (2010): Οι βελόνες του *P. heldreichii* Christ. subsp. *leucodermis* συλλέχθηκαν κατά τη φάση πλήρους άνθησης από φυτά που αναπτύσσονται στην Καλαβρία, στην Ιταλία. Τα αιθέρια έλαια από τις βελόνες ελήφθησαν δια υδροαπόσταξης για 3 ώρες, χρησιμοποιώντας μια συσκευή τύπου Clevenger (Clevenger, 1928). Η απόδοση των ελαίων ήταν 0.2 % (v / v). Ένα σύνολο 50 ενώσεων (91,3 % του συνόλου του ελαίου) ταυτοποιήθηκαν στο αιθέριο έλαιο. Τα κύρια συστατικά ήταν: α-πινένιο (24.2 %) και β-πινένιο (8.4 %), λιμονένιο (7.8 %), α-κουμπεμπένιο (7.6 %), τερπινολένιο (5.9 %), και *trans*-καρνοφυλλένιο (4.5 %).
- ❖ Οι Maric et al. (2007) διαπίστωσαν ότι το υλικό από βοσνιακές πευκοβελόνες από την Ερζεγοβίνη είναι πλούσιο σε λιμονένιο (52.8 %), γερμακρένιο D (15.8 %), α-πινένιο (10.2 %) και καρνοφυλλένιο (7.7 %).
- ❖ Αρκετά παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν από τους Nikolic et al. (2007) σε μια ερευνητική μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τα πτητικά πευκοβελόνων από διαφορετικούς πληθυσμούς: ένα στη Σερβία και τρεις στο Μαυροβούνιο. Στο προφίλ των τερπενίων, κυρίαρχα συστατικά ήταν: λιμονένιο (26.3 %), α-πινένιο (17.5 %), γερμακρένιο D (13.5 %), και β-καρνοφυλλένιο (10.4 %), αποτελώντας ~ 67.7 % του αιθέριου ελαίου. Το *P. heldreichii* έδειξε την υψηλότερη αφθονία υδρογονανθράκων σεσκιτερπενίων και μονοτερπενίων και τη χαμηλότερη για οξυγονούχα μονοτερπένια
- ❖ Παρομοίως, υψηλό επίπεδο μονοτερπενίων (~ 60 %) ανιχνεύθηκε από τους Petrakis et al. (2001) σε μια μελέτη σχετικά με τα έλαια των βελόνων από δέντρα, που φύονται στην Ελλάδα, και κατέληξαν στο

ακόλουθο χημικό προφίλ: λιμονένιο » α-πινένιο > γερμακρένιο D > β-καρυοφυλλένιο > β-πινένιο.

Πίνακας 4: Κύρια συστατικά (% σε αιθέριο έλαιο) από διαφορετικά μέρη του *P. heldreichii*

Compounds	Xylem oleoresin (Lange et al., 1994)	Gum turpentine oil (Lange et al., 1994)	Needles (Petrakis et al., 2001)	Needles (Maric et al., 2007)	Needles (Nikolic et al., 2007)	Needles (Bonesi et al., 2010)	Wood (Graikou et al., 2012)
α-πινένιο	-	11.16	13.8	10.2	17.51	24.2	6.43
β-πινένιο	-	0.47	4.2	3.0	5.66	8.4	0.25
Λιμονένιο	-	79.44	34.3	52.8	26.30	7.8	28.70
Μέθυλ καβικόλη	-	0.18	-	-	-	-	5.94
Λονγκιφολένιο	1.11	5.62	-	-	-	-	6.89
β-καρυοφυλλένιο	-	0.09	8.4	7.7	10.41	4.5	-
Γερμακρένιο D	-	-	12.8	15.8	13.53	-	-
Κεμπρένιο	5.6 ή 4.1	-	0.2	0.1	-	-	23.82
Κεμπρένιο A	-	-	-	-	-	-	5.58
Καουρένιο	-	-	0.3	-	-	-	5.88
Θενμπεργόλη/κεμπρόλη (1:2)	84.8	-	-	-	-	-	-
Τερπινολένιο	-	-	-	-	-	5.9	-
α-κουμπεμπένιο	-	-	-	-	-	7.6	-

A.7.3.8 Βιολογικές δράσεις

A.7.3.8.1 Ανασταλτική δράση αντιχολινεστεράσης στη θεραπεία της νόσου Alzheimer

Τα αιθέρια έλαια και τα συστατικά τους από το *Pinus heldreichii* εμφανίζουν σημαντική ανασταλτική δράση αντιχολινεστεράσης στη θεραπεία της νόσου Alzheimer (AD) (Bonesi et al., 2010), μίας νευροεκφυλιστικής πάθησης, που προκύπτει από μια χρόνια βλάβη και φθορά των νευρώνων του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ).

Η αναστολή της χολινεστεράσης είναι η κύρια θεραπεία για τα συμπτώματα της AD, και η αποκατάσταση των επιπέδων της ACh μέσω αναστολής και των δύο κύριων μορφών της χολινεστεράσης, AChE και BChE, αποτελεί μια χρήσιμη θεραπευτική προσέγγιση για τη βελτίωση του χολινεργικού ελλείμματος όχι μόνο για τη θεραπεία της AD, αλλά και άλλων μορφών άνοιας. Η δυνητική χρήση των φυσικών προϊόντων έχει αποδειχθεί με επιτυχία στον τομέα της AD (Francotte et al., 2004; Houghton et al., 2006).

Με βάση τα παραπάνω, αναλύθηκε το προφίλ σύνθεσης των αιθέριων ελαίων από βελόνες του *P. heldreichii* subsp. *leucodermis* με αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (GC-MS), και διερευνήθηκαν οι σχέσεις μεταξύ των χημικών συστατικών και της ανασταλτικής δράσης των AChE και BChE. Όλα τα αιθέρια έλαια που μελετήθηκαν ήταν σε θέση να αναστέλλουν *in vitro* τα ένζυμα με ένα

δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Το *P. heldreichii* εμφάνισε την πλέον υποσχόμενη δραστηριότητα, με τιμές IC_{50} 51.1 και 80.6 $\mu\text{g} / \text{mL}$ έναντι AChE και BChE, αντίστοιχα (Bonesi et al., 2010). Διάφορα βασικά συστατικά του ελαίου έχουν ερευνηθεί για τις επιπτώσεις τους στην AChE. Έχει αναφερθεί και στο παρελθόν ότι τα αιθέρια έλαια, που είναι πλούσια σε τερπένια εμφανίζουν μια ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι δύο ενζύμων (Mukherjee et al., 2007; Murray et al., 2009; Souza et al., 2009). Έτσι λοιπόν, έχει βρεθεί ότι η πλειονότητα των αναστολέων AChE, που προσδιορίζονται στα αιθέρια έλαια, είναι τα τερπενοειδή (Miyazawa et al., 1997; Savelev et al., 2003; Miyazawa & Yamafuji, 2005; Miyazawa & Yamafuji, 2006; Menichini et al., 2009). Λόγω του μικρού μοριακού μεγέθους και της λιποφιλικότητας τους, τα πτητικά συστατικά των αιθέριων ελαίων είναι πιθανό να διασχίζουν εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Savelev et al., 2004).

Μεταξύ των ταυτοποιημένων συστατικών του *P. heldreichii* ελέγχθηκαν τα εξής: τερπινολένιο, β-φυλλανδρένιο, ακέτυλο λιναλοόλη, *trans*-καρνοφυλλένιο, και τερπιν-4-όλη. Το *trans*-καρνοφυλλένιο και η τερπιν-4-όλη ανέστειλαν τη BChE με τιμές IC_{50} 78.6 και 107.6 $\mu\text{g} / \text{mL}$, αντίστοιχα. Το β-φυλλανδρένιο ήταν επιλεκτικό ενάντια AChE (τιμή IC_{50} των 120.2 $\mu\text{g} / \text{mL}$), (Bonesi et al., 2010). Η συνεργική δράση των διαφορετικών μειγμάτων τερπενίων έχει, επίσης, αξιολογηθεί (Savelev et al., 2003; Miyazawa & Yamafuji, 2006;). Γενικά, τα ευρήματα δείχνουν ότι η ανασταλτική δράση του αιθέριου ελαίου του *P. heldreichii* είναι το αποτέλεσμα μιας σύνθετης αλληλεπίδρασης μεταξύ των συστατικών, τα οποία παράγουν και συνεργιστικές και ανταγωνιστικές αντιδράσεις μεταξύ των συστατικών - τερπενίων (Bonesi et al., 2010).

Ευρήματα

- ❖ Τα αιθέρια έλαια και τα συστατικά τους από το *Pinus heldreichii* εμφανίζουν σημαντική ανασταλτική δράση αντιχολινεστεράσης στη θεραπεία της νόσου Alzheimer.
- ❖ Η αποκατάσταση των επιπέδων της ACh μέσω αναστολής και των δύο κύριων μορφών της χολινεστεράσης, AChE και BChE, αποτελεί μια χρήσιμη θεραπευτική προσέγγιση όχι μόνο για τη θεραπεία της AD, αλλά και άλλων μορφών άνοιας.
- ❖ Η πλειονότητα των αναστολέων της AChE που προσδιορίζονται στα αιθέρια έλαια είναι τερπενοειδή.

A.7.3.8.2 Αντιοξειδωτική δράση

Το αιθέριο έλαιο, που λαμβάνεται από το ξύλο του *P. heldreichii*, αποδείχθηκε ότι προστατεύει το ηλιέλαιο από οξείδωση. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν μια τροποποίηση της μεθόδου Rancimat η οποία αναφέρθηκε από τους Lalas και Tsaknis (2002). Πιο αναλυτικά, πραγματοποιήθηκε προετοιμασία του αιθέριου ελαίου για τη μέθοδο Rancimat: Ηλιέλαιο (Sol, Ηλίας Α.Ε., Αθήνα, Ελλάδα) καθαρίστηκε από ιχνοστοιχεία και άλλα προοξειδωτικά μέσω χρωματογραφίας προσρόφησης για να αποδώσει καθαρισμένα κλάσματα τριακυλογλυκερόλης ηλιέλαιου σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους

Fuster et al. (1998). Σε όλες τις αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν, το αιθέριο έλαιο του ξύλου βελτίωσε σημαντικά την αντίσταση του ηλιέλαιου σε οξείδωση (**Πίνακας 5**) (Graïkou et al., 2012). Ο παράγοντας προστασίας (Protection factor-P.f.) υπολογίζεται ως $P.f. = (\text{Περίοδος επαγωγής με αντιοξειδωτικό}) / (\text{περίοδος επαγωγής χωρίς αντιοξειδωτικό})$. Ένας παράγοντας προστασίας μεγαλύτερος από 1 δείχνει αναστολή της οξείδωσης των λιπιδίων. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή, τόσο καλύτερη είναι η αντιοξειδωτική δράση (Lalas & Dourtoglou, 2003).

Επιπλέον, το λάδι έδειξε μια πολλά υποσχόμενη αντιοξειδωτική δράση μέσω της μεθόδου Rancimat.

Πίνακας 5: Παράγοντας προστασίας διαφόρων συγκεντρώσεων του αιθέριου ελαίου από ξύλο του *P. heldreichii* σε καθαρισμένο ηλιέλαιο

Δείγμα	Αιθέριο έλαιο σε ηλιέλαιο (%)	Παράγοντας προστασίας
<i>P. heldreichii</i> αιθέριο έλαιο	1	2.17 (+/- 0.06)
<i>P. heldreichii</i> αιθέριο έλαιο	2	2.08 (+/- 0.02)

Τα αποτελέσματα, που ελήφθησαν, έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο του ξύλου του *P. heldreichii* μπορεί να θεωρηθεί ως μια καλή φυσική πηγή με σημαντική αντιοξειδωτική δράση (Lalas & Tsaknis, 2002). Αυτή η δραστηριότητα μπορεί να αποδοθεί στα κύρια συστατικά ή / και σε συνέργεια μεταξύ των διαφόρων συνιστωσών του αιθέριου ελαίου. Σύμφωνα με πρόσφατη βιβλιογραφία, ενώσεις όπως λιμονένιο, α-πινένιο, β-πινένιο και διτερπενοειδή τύπου καουρένιου, τα οποία είναι από τα πιο άφθονα στο μελετημένο αιθέριο έλαιο από το ξύλο, έχουν δείξει ισχυρή έως μέτρια αντιοξειδωτική δράση (Ruberto & Baratta 2000; Thirugnanasampandan et al. 2008), έτσι ώστε η εμφανιζόμενη αντιοξειδωτική δράση θα μπορούσε να αποδοθεί κυρίως σε αυτά.

A.7.3.8.3 Αντιμικροβιακή δράση

Το αιθέριο έλαιο από ξύλο του *P. heldreichii* εμφάνισε ευρύ φάσμα ισχυρών αντιμικροβιακών δραστηριοτήτων ειδικά ενάντια σε Gram θετικά βακτήρια: *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis* (MIC τιμές 2.20-2.45 mg / ml) και ανθρώπινους παθογόνους μύκητες *Candida albicans*, *C. tropicalis* και *C. glabrata* (MIC τιμές 2.0-2.5 mg / ml). Η δραστηριότητα αυτή αποδίδεται κυρίως λόγω της υψηλής περιεκτικότητας κεμπρενίου, που προσδιορίστηκε σε σημαντικές ποσότητες (~ 24 %) μόνο στο αιθέριο έλαιο του ξύλου του *P. heldreichii*. Το κεμπρένιο, που αποτελεί το κύριο συστατικό του ελαίου από ξύλο του δέντρου, έχει αναγνωριστεί ως η πιο πολύτιμη ένωση για την αντιμικροβιακή δράση του (Graïkou et al., 2012).

Β. ΣΚΟΠΟΣ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ



B.1 Σκοπός της παρούσας μελέτης:

Οι παρεμβάσεις διατροφής, όπως η περιορισμένη λήψη θερμίδων (Caloric Restriction - CR) ή η ισορροπημένη υγιεινή διατροφή είναι από τις πιο αποτελεσματικές προσεγγίσεις για την επέκταση της ποιότητας ζωής ή / και της μακροζωίας, που οφείλονται είτε σε παρατεταμένη ήπια ενεργοποίηση των οδών που ανταποκρίνονται στο στρες ή / και στα χαμηλά επίπεδα βλαβών στα βιομόρια.

Το κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης **Nrf2** (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) / **Keap1** (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), καθώς και τα κύρια πρωτεολυτικά και επιδιορθωτικά συστήματα (**σύστημα ουβικιτίνης – πρωτεασώματος και μονοπάτι αυτοφαγίας - λυσοσώματος**) διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη λειτουργικότητα του δικτύου πρωτεόστασης.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας ήταν η

«In vivo μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων από τα είδη *Pinus nigra* και *Pinus heldreichii* ως προς την αντιγηραντική και αντιοξειδωτική τους δράση»

Ειδικότερα μελετήθηκαν οι διατροφικές επιπτώσεις όσον αφορά:

- ✓ στη **βιωσιμότητα / φυσιολογία** και το προσδόκιμο ζωής των εντόμων,
- ✓ στην **έκφραση και ενεργότητα του πρωτεασώματος**, καθώς και την **ενεργότητα των λυσοσωμικών καθεψινών**, και
- ✓ στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το **σηματοδοτικό μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης Nrf2 / Keap1**

Τα υπό μελέτη εκχυλίσματα συγκρίθηκαν με το υδατικό εκχύλισμα από το φλοιό του είδους *P. pinaster* (Pycnogenol®), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, καθώς είναι γνωστή η αντιοξειδωτική του δράση (βλέπε A.1.7.9).

B.2 Το έντομο *Drosophila melanogaster*

Ταξινόμηση	
Βασίλειο	Animalia
Φύλο	Αρθρόποδα
Κατηγορία	Έντομα
Τάξη	Δίπτερα
Οικογένεια	Drosophilidae
Γένος	<i>Drosophila</i>
Υπογένος	<i>Sophophora</i>
Είδος	<i>Melanogaster</i>

Πίνακας 6: Συστηματική κατάταξη του εντόμου *Drosophila melanogaster*

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ο οργανισμός μοντέλο *Drosophila melanogaster* (φυσιολογικού τύπου Oregon R). Το δίπτερο έντομο αυτό αποτελεί το πρώτο οργανισμό του οποίου οι διάφορες φάσεις της ανάπτυξης κατανοήθηκαν σε μοριακό επίπεδο και τα τελευταία χρόνια αποτελεί ένα από τα πιο χρησιμοποιούμενα πειραματικά μοντέλα μελέτης της *in vivo* γήρανσης (Helfand & Rogina, 2003). Η *D. melanogaster* συγκεντρώνει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως: η μικρή διάρκεια ζωής της, το μικρό της μέγεθος, το μεγάλο εύρος των γενετικών χειρισμών που είναι διαθέσιμοι, ο σύντομος βιολογικός κύκλος της, ο οποίος διαρκεί περίπου 10 ημέρες σε θερμοκρασία 25 °C καθώς και το γεγονός ότι καλλιεργείται εύκολα στο εργαστήριο.

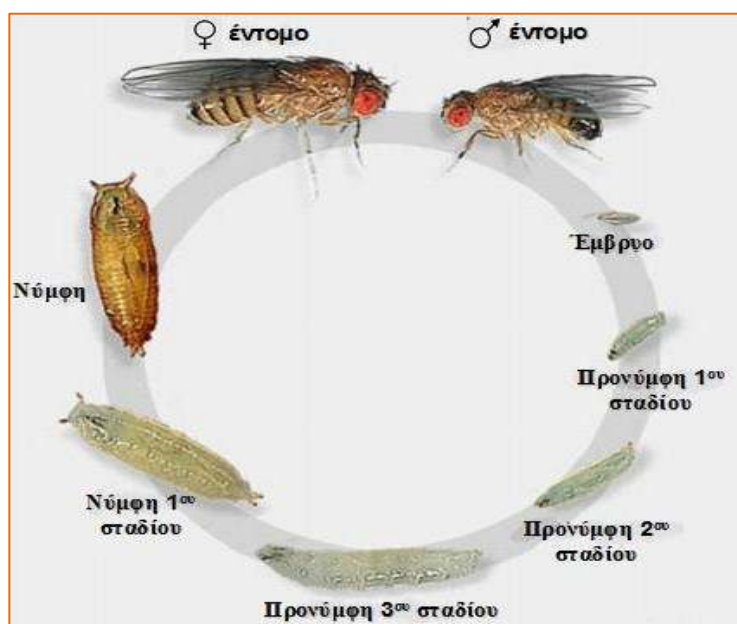
Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί πως μεγάλος αριθμός γονιδίων στη *D. melanogaster* παρουσιάζει ομολογία με γονίδια των θηλαστικών, κατά συνέπεια και πολλά μεταβολικά και αντιοξειδωτικά μονοπάτια, όπως το μονοπάτι Nrf2/Keap1, είναι όμοια με αυτά του ανθρώπου (Kim, 2007). Τέλος, το γεγονός πως η *D. melanogaster* διαθέτει τόσο μεταμιτωτικά όσο και μιτωτικά (Ito & Hotta, 1992) την καθιστά ακόμα πιο ελκυστική ως μοντέλο μελέτης της γήρανσης αλλά και των νευροεκφυλιστικών νόσων.

B.2.1 Φυσιολογική ανάπτυξη της *Drosophila melanogaster*

Η *Drosophila melanogaster* ανήκει σε μια από τις οικογένειες εντόμων (Δίπτερα) που υφίσταται πλήρη μεταμόρφωση. Έτσι, το αυγό εκκολάπτεται και προκύπτει μια προνύμφη (larvae), η οποία διαφέρει δομικά από το ενήλικο άτομο. Η προνύμφη αναπτύσσεται και υφίσταται δυο εκδύσεις πριν φτάσει σε ένα στάδιο ηρεμίας, το οποίο ονομάζεται νύμφη (pupa). Στο στάδιο αυτό, το σώμα αναπλάθεται, για να σχηματιστεί το ενήλικο άτομο. Μια από τις, κομβικής σημασίας, διεργασίες

που γίνονται κατά την προνυμφική ανάπτυξη είναι η αύξηση των «δίσκων ενηλικίωσης», οι οποίοι προέρχονται από εγκολπώσεις της επιδερμίδας. Για κάθε ομάδα εξαρτημάτων υπάρχει και ένα ζεύγος δίσκων ενηλικίωσης, οι οποίοι διαφοροποιούνται στις ενήλικες δομές τους κατά τη μεταμόρφωση (Εικόνα 56) (Watson, 2004).

Η διάρκεια ζωής της *D. melanogaster* ποικίλει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Σε ιδανικές συνθήκες καλλιέργειας φτάνει έως και 70 ημέρες, ενώ σε δυσμενείς συνθήκες περιορίζεται σημαντικά (Slack, 2006; Λάμνησου, 2006).



Εικόνα 55: Κύκλος ζωής του δίπτερου εντόμου *Drosophila melanogaster*

Μετά την εκκόλαψη του αυγού, η προνύμφη περνά από τρία στάδια, μεταξύ των οποίων μεσολαβούν τρεις εκδύσεις. Κατά την περίοδο αυτή, η προνύμφη τρέφεται αδιάκοπα και αυξάνεται σημαντικά σε μέγεθος, χωρίς όμως να αλλάζει ιδιαίτερα η μορφολογία της. Η προνύμφη του τρίτου σταδίου γίνεται νύμφη, μια διαδικασία κατά την οποία το μεγαλύτερο μέρος του σώματος της αφομοιώνεται και αντικαθίσταται από τις δομές του ενήλικου ατόμου, που αναπτύσσονται μετά τη διαφοροποίηση των «δίσκων ενηλικίωσης».

B.2.1.1 Ωογένεση

Κατά την αρχή της ωογένεσης, το γαμετικό κύτταρο διαιρείται τέσσερις φορές, με αποτέλεσμα το σχηματισμό 16 κυττάρων, από τα οποία το ένα γίνεται ωοκύτταρο και τα υπόλοιπα 15 τροφοκύτταρα. Ολόκληρο το σύμπλεγμα ωοκυττάρου – τροφοκυττάρων (γαμετικής προέλευσης) περιβάλλεται από τα θυλακοκύτταρα των ωοθηκών (σωματικής προέλευσης) σχηματίζοντας μια δομή, που καλείται ωοθυλάκιο (Trougakos & Margaritis, 2002). Τα θυλακοκύτταρα προέρχονται από τις γονάδες και κατά συνέπεια, από τη σωματική και όχι από τη γαμετική σειρά (Slack, 2006; Λάμνησου, 2006).

B.2.1.2 Εμβρυογένεση

Η γονιμοποίηση λαμβάνει χώρα στη μήτρα και το σπερματοζώαριο εισέρχεται από το εμπρόσθιο άκρο, από μια οπή του κελύφους του ωοθυλακίου, που ονομάζεται μικροπύλη. Σε άριστες συνθήκες, τα αυγά αποτίθενται αμέσως μετά τη γονιμοποίηση. Αν για κάποια αιτία, όπως χαμηλή θερμοκρασία ή έλλειψη κατάλληλης θέσης για την απόθεση των αυγών, το θηλυκό άτομο δε γεννήσει το γονιμοποιημένο ωάριο, τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, η οποία αρχίζει αμέσως μετά τη γονιμοποίηση, γίνονται στο εσωτερικό του εντόμου. Η εκκόλαψη των νυμφών, οι οποίες μοιάζουν με σκουλήκι, πραγματοποιείται μέσα σε 24 ώρες στους 25 °C. Η αρχική περίοδος αποτελείται από γρήγορες πυρηνικές διαιρέσεις και ονομάζεται αυλάκωση. Κατά το πρώιμο αυτό στάδιο ολόκληρο το έμβρυο συγκροτεί ένα συγκύτιο, στο οποίο όλοι οι πυρήνες μοιράζονται το κοινό κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, σχηματίζονται τα πολικά κύτταρα από τα οποία προκύπτουν τα γαμετικά κύτταρα, έπεται το συγκυτιακό βλαστόδερμα, που μετά το διαχωρισμό των πυρήνων θα δώσει το κυτταρικό βλαστόδερμα. Έπειτα, ξεκινά η γαστριδίωση, που οδηγεί στο σχηματισμό των τριών βλαστικών στιβάδων, από τις οποίες θα προκύψουν τα όργανα του εντόμου (Slack, 2006; Λάμνησου, 2006).

B.2.1.3 Στάδια της προνύμφης

Η προνύμφη της *Drosophila melanogaster* δεν έχει πόδια, το κεφάλι της είναι αναδιπλωμένο στο εσωτερικό και φέρει τρία θωρακικά και οκτώ ορατά κοιλιακά μεταμερή. Στην κοιλιακή πλευρά της προνύμφης, σε καθένα από τα θωρακικά και κοιλιακά μεταμερή υπάρχουν ζώνες οδοντιδίων, των οποίων το σχήμα και το μέγεθος είναι διαφορετικό για τα θωρακικά και τα κοιλιακά μεταμερή, αντίστοιχα. Το οπίσθιο άκρο της προνύμφης δεν παρουσιάζει μεταμερισμό και ονομάζεται τέλσο, ενώ η δομή της κεφαλής είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη, καθώς παρουσιάζει ένα κεράτινο κεφαλοφαρυγγικό σκελετό, που εκκρίνεται από το στοματίδιο της πεπτικής οδού.

Κατά τη διάρκεια του σταδίου αυτού γίνονται δύο εκδύσεις που χωρίζουν το προνυμφικό στάδιο σε τρία επιμέρους στάδια. Οι προνύμφες τρέφονται από την ίδια τροφή που τρέφονται και οι γονείς, ωστόσο έχουν την ιδιότητα να σκάβουν στοές μέσα σε αυτή. Έτσι, η ύπαρξη στοών στην τροφή δείχνει επιτυχία μιας καλλιέργειας.

Το στάδιο αυτό διαρκεί τέσσερις ημέρες. Στη συνέχεια, η προνύμφη ακινητοποιείται, μικραίνει σε μέγεθος και μεταμορφώνεται σε νύμφη. Το μεταβατικό αυτό στάδιο διαρκεί περίπου μισή ημέρα, ενώ το στάδιο της νύμφης διαρκεί τέσσερις ημέρες (Slack, 2006; Λάμνησου, 2006).

B.2.1.4 Το ενήλικο άτομο

Όταν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη του τέλειου εντόμου, τότε εκκολάπτεται από το βομβύκιο το έντομο ανοίγοντας μια οπή στο πρόσθιο τμήμα του. Στην αρχή, το τέλειο έντομο έχει σώμα επιμηκυμένο, με χρώμα ανοικτότερο του κανονικού και αναδιπλωμένα φτερά, γρήγορα όμως παίρνει την τελική του μορφή. Η εκδίπλωση των φτερών γίνεται μια ώρα περίπου μετά την εκκόλαψη, ενώ η απόκτηση του κανονικού χρώματος μερικές ώρες αργότερα. Τα αγρίου τύπου έντομα (wild type) έχουν κόκκινα μάτια, κίτρινο-καφετί σώμα, εγκάρσια μαύρα δακτυλίδια σε όλη την κοιλιά τους και παρουσιάζουν φυλετικές διαφορές (**Εικόνα 57**).



Εικόνα 56: Ενήλικα άτομα *Drosophila melanogaster* διαφορετικού φύλου

Το αρσενικό άτομο (δεξιά) εμφανίζεται μικρότερο από το θηλυκό άτομο (αριστερά). Επίσης, εμφανίζει σκούρο χρώμα στο τελείωμα της κοιλιάς του, ενώ φέρει στο πρώτο ζευγάρι των ποδιών του το φυλετικό χτένι, το οποίο είναι απαραίτητο κατά την ερωτική επαφή.

Τα θηλυκά άτομα είναι περίπου 2.5 χιλιοστά μακρύτερα από τα αρσενικά άτομα και μπορούν να γεννήσουν έως και 800 αυγά. Τα αρσενικά εμφανίζουν σκούρο χρώμα στο τελείωμα της κοιλιάς τους, το οποίο είναι στρογγυλό, σε αντίθεση, με το άκρο της κοιλιάς των θηλυκών ατόμων, που είναι οξύληκτο. Επίσης, τα αρσενικά άτομα φέρουν στο πρώτο ζευγάρι των ποδιών τους ένα σύνολο σμηρίγγων, το οποίο σχηματίζει το φυλετικό χτένι (sex combs), το οποίο είναι απαραίτητο κατά την ερωτική επαφή, (**Εικόνα 57**). Τέλος, τα αρσενικά έχουν στην κοιλιακή τους χώρα πέντε μεταμερή τμήματα, ενώ τα θηλυκά επτά (Slack, 2006; Λάμνησου, 2006).

B.2.1.5 Το πρωτεάσωμα στη *Drosophila melanogaster*

Το πρωτεάσωμα της *D. melanogaster* εμφανίζει την ίδια δομή με αυτή των θηλαστικών. Συγκεκριμένα, συνίσταται από τις εξής υπομονάδες: α1-7, β1-7, Rpn1-6, Rpt1-13 και από τα ένζυμα από-ουβικιτινίωσης όπως είναι η υδρολάση UCH37. Οι υπομονάδες α1-7 καθώς και οι β1-7 εντοπίζονται στον πυρήνα του πρωτεασώματος, το 20S καταλυτικό κέντρο. Οι υπομονάδες Rpn1-6 και Rpt1-13 βρίσκονται στο 19S ρυθμιστικό κέντρο. Συγκεκριμένα, το 19S ρυθμιστικό σύμπλοκο αποτελείται από τη βάση και το καπάκι. Στη βάση εντοπίζονται οι έξι μονάδες ΑΤΡάσης (Rpn) και τέσσερις υπομονάδες μη ΑΤΡάσης, ενώ το καπάκι είναι ένα μη συμμετρικό σύμπλοκο που τοποθετείται στο πάνω μέρος της βάσης, αντιδιαμετρικά των δύο πλευρών του 26S πρωτεασώματος.

Στη *D. melanogaster* 12 από τα 33 γονίδια που κωδικοποιούν για το 26S πρωτεάσωμα έχουν από δύο, ή σπάνια από τρεις ισομορφές, που κωδικοποιούνται από παράλογα γονίδια (*a3T*, *a4T1-a4T2*, *a6T*, *β2R1-β2R2*, *b4R1-b4R2*, *β5R1-β5R2*, *Rpt3R*, *Rpt4R*, *Rpt6R*, *Rpn12*, *Rpn13*, *Uch37R*), (Yuan et al., 1996; Ma et al., 2002; Yu et al., 2007). Σε κάθε περίπτωση, μία από κάθε υπομονάδα εκφράζεται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και σε όλους τους ιστούς, αν και όλες οι επιπλέον ισομορφές είναι ειδικές για τους όρχεις, με άγνωστη μέχρι στιγμής λειτουργία (Belote & Zhong, 2009).

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



Γ.1 Υλικά

Γ.1.1 Μηχανήματα

Συσκευή	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
Επωαστήρας	ProBlot Labnet	
Σπεκτόμετρο spekol uv vis	Zeiss	
Συσκευή ηλεκτροφόρησης	Biorad	
Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη	Biorad	
Συσκευή PikoReal 96 Real-Time PCR System	Thermo	TCR0096
Συσκευή σύνθεσης cDNA (Minicycler PTC-150)	MJ Research	
Φασματοφωτόμετρο	Biorad	170-2501
Φθορόμετρο	Biorad	170-2402
Φυγόκεντρος	Biofuge stratus	170-2501

Γ.1.2 Χημικά αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
2-mercaptoethanol	Merck	15433
Acetic acid	Merck	K39105963
Acrylamide	ResearchOrganics	9502A
Agar	Fluka	05040
Ammonium persulfate (APS)	Research Organics	9530A
Biorad protein assay	Biorad	500-0006
Bovine Serum Albumin	Sigma	A9418
Bromophenol blue	Sigma	B-6896
Calcium chloride	Sigma	429759
cDNA synthesis kit for RT-Qpcr	Thermo	K1641
CH ₃ COOH	Merck	K39105963
ClCH ₂ COONa	Fluka	24610
Coomassie brilliant blue R-250	Fluka	27816
Developer D-19	Kodak	146 4593
DMSO	Sigma	270431
DTT	Sigma	248531
ECL	Santa CruzBiotechnology	Sc-2048
EDTAMolecular biology grade	Research Organics	9572E
EGTA	Sigma	03777
Ethanol	Merck	1.00983.2511
Fixer Fix-100	Agfa	G382B
Glycerol	Sds	6023516
Glycine	Serva	23390

HCl 37 %	Merck	K37471017
Hepes	Sigma	H-0891
Methanol	Merck	1.06009.2511
NaHCO ₃	Fluka	24610-250G
NP-40	Sigma	74385
OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit	Chemicon	S7150
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma	P4417
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)	Sigma	P-1379
Potassium Chloride	Sigma	P-9333
Prestained protein ladder	Fermentas	SM0671
Propionic acid	Merck	8.00605.1000
Proteasome Substrate I (Fluorogenic)	Enzo	BML-BW8515-0005
Proteasome Substrate II (Fluorogenic)	Enzo	BML-ZW9345-0005
Proteasome Substrate III (Fluorogenic)	Enzo	260-070-M005
RNAzol	Molecular Research Center, Inc. (MRC)	MRC-RN190-100
ROS reagent/ probe	Life technologies	C6827
SDS	Serva	20765
Sodium chloride	Merck	1.06404.1000
Maxima [®] SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	Thermo scientific	FER-K0222
Sulforhodamine Bsodium salt (Acid Red)	Sigma	230162
t-BHP	Sigma	B2633
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine)	Merck	1107320100
Tris	Research Organics	9680T
Tween-20	Research Organics	

Μάρτυρας πρωτεΐνης (έτοιμος για χρήση)	Fermentas	SM0671
Μάρτυρας πρωτεΐνης (έτοιμος για χρήση)	Fermentas	SM1841
Μεμβράνη νιτροκυταρίνης	Santa Cruz Biotechnology	Sc-3724
Φιλμ αυτοραδιογραφίας	Santa Cruz Biotechnology	Sc-201697
Χαρτιά Whatman	Sigma Aldrich	Z241768

Γ.1.3 Αντισώματα

Αντισώματα	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
Πρωτογενή αντισώματα ειδικά για τη <i>Drosophila melanogaster</i>		
26Sproteasomeα7 subunit	Santa Cruz	Sc-65755
26S proteasome b5 subunit	Ευγενική προσφορά της Dr. Mavia Figueiredo-Pereira	
26S proteasome p42A	Santa Cruz	Sc-65750
anti-GAPDH	Santa Cruz	Sc-25778
Anti-Ubiquitin	Santa Cruz	Sc-1633
Δευτερογενή αντισώματα		
Anti-Mo-IgG/HRP	Santa Cruz	Sc-2005
Anti-Rb-IgG/HRP	Santa Cruz	Sc-2004

Γ.1.4 PCR εκκινητές (PCR primers)

<i>Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην <u>πραγματικού χρόνου</u> <u>Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Real-Time PCR)</u></i>	
<i>Όνομα εκκινητή</i>	<i>Αλληλουχία</i>
cncC-F	CAC-TAC-CCG-GGA-GTA-TTC-CAA-A
cncC-R	TAA-GCT-TCG-CCC-AGA-TTG-TG
gstD1-F	TGA-TCA-ATC-AGC-GCC-TGT-ACT
gstD1-R	GCA-ATG-TCG-GCT-ACG-GTA-AG
Hsp70-F	AAG-AAC-CTC-AAG-GGT-GAG-CG
Hsp70-R	CGT-CGA-TGG-TCA-GGA-TGG-AG
Keap1-F	GCG-CTC-GTC-AGC-CCA-TTT-T
Keap1-R	GGA-TGC-GCA-TAA-TTC-CTC-TTC-TT
prosalpha7-F	ACC-GAC-GAA-TTG-GTG-GAG-AG
prosalpha7-R	ACC-CAT-TTC-GAA-GCG-GAA-GT
prosbeta5 –F	GCC-ATC-TAC-CAT-GCC-ACC-TT
prosbeta5-R	TTA-CCC-AGC-CGT-CCT-CCT-TA
Trx1-F	GAC-ACC-AGT-GGA-ACT-ACC-CG
Trx1-R	ATT-TTG-AGT-GCA-TGT-CGG-CG
Rpn11-F	ACA-ACA-AGT-CAC-TGG-AGG-ACG
Rpn11-R	TGC-TTG-CCC-ACG-TTC-TTG-AT
Rp49-F	AGC-ACT-TCA-TCC-GCC-ACC
Rp49-R	ATC-TCG-CCG-CAG-TAA-ACG

Γ.1.5 Φυτικά εκχύλίσματα

Δείγμα / Εκχύλισμα	Είδος	Προέλευση	Αρχική συγκέντρωση (C _{αρχ.})	Διαλυτότητα
Pycnogenol®	<i>P. pinaster</i>	Εκχύλισμα φλοιού H ₂ O (100 %)	40 mg / ml	DMSO (100 %)
Agro 03	<i>P. nigra</i>	Εκχύλισμα φλοιού H ₂ O (100 %)	40 mg / ml	DMSO (100 %)
Agro 04	<i>P. heldreichii</i>	Εκχύλισμα ξύλου H ₂ O:EtOH (90:10)	40 mg / ml	DMSO (100 %)
Agro 05	<i>P. heldreichii</i>	Εκχύλισμα ξύλου EtOH 100 %	40 mg / ml	DMSO (100 %)

Γ.1.6 *In vivo* πειραματικό μοντέλο: *Drosophila melanogaster*

Ως πειραματόζωο, για τη διεκπεραίωση της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκε το δίπτερο έντομο *D. melanogaster* είτε φυσιολογικού τύπου Oregon R ή διαγονιδιακά στελέχη για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής απόκρισης. Τα έντομα καλλιεργήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες καλλιέργειας (Bioline, 17101). Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (23-25) °C, με υγρασία 60 % και με δωδεκάωρη εναλλαγή φωτισμού.

Γ.1.7 Διαγονιδιακά στελέχη *Drosophila melanogaster*

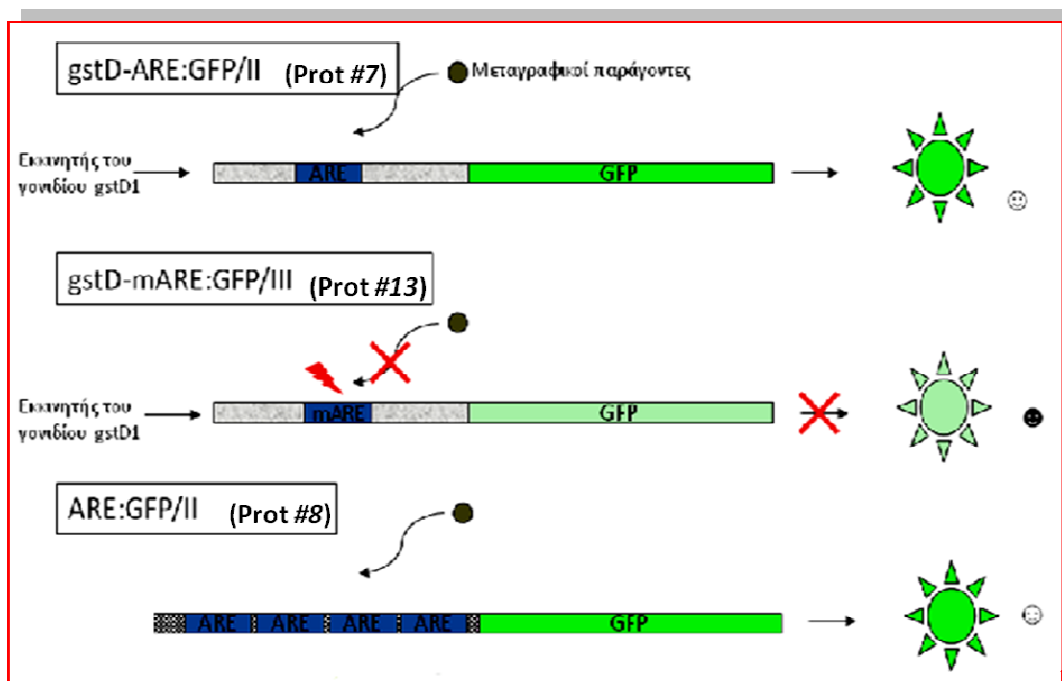
Επίσης, ως πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν και διαγονιδιακά στελέχη έλεγχου αντιοξειδωτικής απόκρισης του δίπτερου εντόμου *D. melanogaster*:

- ❖ Διαγονιδιακά έντομα (στέλεχος #7) που φέρουν το γονίδιο *GFP* (Green Fluorescent Protein) υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *gstDI*, ο οποίος φέρει ένα στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (ARE: Antioxidant Response Element).
Γονότυπος: **gstD-ARE: GFP/II**

- ❖ Διαγονιδιακά έντομα (**στέλεχος #13**) όμοια με στέλεχος #7, αλλά φέρουν και μια μετάλλαξη στο στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (ARE).
Γονότυπος: **gstD-mARE:GFP/III**
- ❖ Διαγονιδιακά έντομα (**στέλεχος #8**) που φέρουν το γονίδιο *GFP* υπό τον έλεγχο τεσσάρων συνθετικών στοιχείων αντιοξειδωτικής απόκρισης.
Γονότυπος: **sARE:GFP/II**

(Προσφορά του Καθηγητή κ. Bohmann, University of Rochester, NY)

Τα παραπάνω διαγονιδιακά έντομα χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της ενεργοποίησης της αντιοξειδωτικής κυτταρικής απόκρισης, καθώς τα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης ενεργοποιούνται από μεταγραφικούς παράγοντες παρουσία οξειδωτικού στρες και επάγουν την ενεργοποίηση της έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων, στη συγκεκριμένη περίπτωση της πρωτεΐνης GFP (**Εικόνα 58**).



Εικόνα 58: Διαγονιδιακά έντομα *Drosophila melanogaster*

Τα έντομα αυτά φέρουν το γονίδιο *GFP* υπό τον έλεγχο α) του υποκινητή του γονιδίου *gstD1*, ο οποίος περιέχει ένα στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (Antioxidant Response Element - ARE) (prot #7), β) ίδια διαγονιδιακή κατασκευή με το α) μόνο που το ARE φέρει μία μετάλλαξη (prot #13), γ) τεσσάρων συνθετικών AREs (prot #8). Παρουσία οξειδωτικού στρες οι μεταγραφικοί παράγοντες επάγουν την έκφραση της πρωτεΐνης GFP προσδεδεμένοι στα AREs.

Γ.2 Μέθοδοι

Γ.2.1 Καλλιέργεια εντόμων

Γ.2.1.1 Φυσιολογική καλλιέργεια εντόμων

Η καλλιέργεια των εντόμων, που πραγματοποιήθηκε σε κανονική τροφή, αποτελείται από τα εξής υλικά :

	4 g άγαρ
	13 g μαγιά
	16 g ζάχαρη
	25 g τοματοπολτό
	32 g ριζάλευρο
	2 ml αιθανόλη (100 %)
	2ml προπιονικό οξύ
	450 mlH ₂ O βρύσης



Διαδικασία παρασκευής τροφής

Αρχικά, ογκομετρούνται 450 ml νερό. Λαμβάνεται λίγη ποσότητα νερού (~150 ml) από τα 450 ml και χρησιμοποιείται για τη διάλυση της μαγιάς και του τοματοπολτού. Έπειτα, στο υπόλοιπο νερό που εξακολουθεί να βράζει, προστίθεται το άγαρ, η διαλυμένη μαγιά και η ζάχαρη, ανακατεύοντας συνεχώς. Αφού η τροφή αφήνεται να πάρει ακόμη μια βράση, προστίθεται ο τοματοπολτός ενώ παράλληλα απομακρύνεται το μίγμα από τη φωτιά και προστίθεται η αιθανόλη (EtOH), το προπιονικό οξύ και τέλος τοποθετείται σιγά-σιγά το ριζάλευρο, ανακατεύοντας διαρκώς. Μετά τη στερεοποίηση της τροφής σε πλαστικά σωληνάκια καλλιέργειας μιας χρήσης σε θερμοκρασία δωματίου, σε κάθε σωλήνα καλλιέργειας προστίθεται επιπλέον μια σταγόνα αιθανόλης για περαιτέρω προστασία και αντιμετώπιση πιθανής μόλυνσης. Οι σωλήνες καλλιέργειας πωματίζονται με βαμβάκι και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου περίπου ένα εικοσιτετράωρο, έως ότου φύγει όλη η υγρασία. Στη συνέχεια, και μέχρι τη χρήση τους, φυλάσσονται στο ψυγείο (4°C).

Γ.2.1.2 Καλλιέργεια εντόμων παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων

Η προσθήκη των φυτικών εκχυλισμάτων [*Pinus pinaster* (υδατικό εκχύλισμα φλοιού), *Pinus nigra* (υδατικό εκχύλισμα φλοιού), *Pinus heldreichii* (υδροαλκοολικό και αλκοολικό εκχύλισμα ξύλου)] πραγματοποιείται κατά την παρασκευή τροφής και συγκεκριμένα στο στάδιο πριν την προσθήκη του ριζάλευρου. Μετά την προσθήκη του τοματοπολτού και την απομάκρυνση της τροφής από τη φωτιά και εφόσον η θερμοκρασία της τροφής είναι σχετικά χαμηλή (~50 °C, για να αποφευχθούν τυχόν αλλοιώσεις των εκχυλισμάτων, λόγω υψηλής θερμοκρασίας) προστίθενται τα εκχυλίσματα. Στη συνέχεια, τοποθετείται κανονικά το ριζάλευρο και ακολουθεί η γνωστή διαδικασία παρασκευής της τροφής.

Οι συγκεντρώσεις που ελέχθησαν για όλα τα εκχυλίσματα ήταν:

	1 µg / ml
	10 µg / ml
	100 µg / ml

Ως μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκαν έντομα, τα οποία αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο παρουσία DMSO (100 %) σε συγκέντρωση 0.25 %, εφόσον τα παραπάνω εκχυλίσματα διαλύονται στο συγκεκριμένο διαλύτη.

Γ.2.2 Γευστική δοκιμασία (Gustatory assay)

Με σκοπό να βεβαιωθούμε ότι η οποιαδήποτε παρατήρηση οφείλεται στα φυτικά εκχυλίσματα, που λαμβάνουν τα έντομα *D. melanogaster* από την τροφή τους και όχι στη μη λήψη τροφής πραγματοποιήθηκε το πείραμα της γευστικής δοκιμασίας. Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ότι τα έντομα καταναλώνουν την τροφή, ακόμα και όταν σε αυτή εμπεριέχονται τα εκχυλίσματα από *P. pinaster*, *P. nigra* και *P. heldreichii*, διότι η μειωμένη λήψη θερμίδων φαίνεται ότι αυξάνει το χρόνο ζωής, ενώ επιπλέον, μειώνει το οξειδωτικό στρες (McCay et al., 1935; Lin et al., 2002; Tavernarakis & Driscoll, 2002; Partridge et al., 2005; Lee et al., 2006). Έτσι, αν συνέβαινε κάτι παρόμοιο, τα αποτελέσματα ίσως οφείλονταν στη μειωμένη λήψη θερμίδων παρά στη δράση των εκχυλισμάτων.

Νεαρά έντομα (1-3 ημερών) έμειναν χωρίς τροφή - συνθήκες πείνας - (σε σωλήνα καλλιέργειας που περιέχει διηθητικό χαρτί ποτισμένο μόνο με νερό βρύσης) για 20 ώρες και στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε τα προς μελέτη εκχυλίσματα και τη χρωστική sulforhodamine Bsodium salt (Acid red), ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό που περιείχε το διαλύτη των εκχυλισμάτων μαζί με τη χρωστική. Η χρωστική (Acid-red) χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0.2 %. Ακολούθησε επώαση των εντόμων για δύο ώρες στο σκοτάδι και παρατήρηση αυτών σε στερεοσκόπιο. Η ερυθρότητα στην κοιλιά των εντόμων δηλώνει την πρόσληψη του θρεπτικού μέσου είτε αυτό είναι η φυσιολογική τροφή, είτε η τροφή με την προσθήκη των φυτικών εκχυλισμάτων (**Εικόνα 59**). Βαθμολογείται, στη συνέχεια, η κοιλιακή ερυθρότητα από 0 (άχρωμη κοιλιά, μη λήψη τροφής) μέχρι 5 (έντονη κόκκινη κοιλιά, κανονική λήψη τροφής). Σημειώνεται ότι τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα εξετάστηκαν στη μέγιστη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκαν και για τα υπόλοιπα πειράματα (δηλαδή σε συγκέντρωση των 100 µg / ml), εφόσον θετικό αποτέλεσμα (ερυθρότητα της κοιλιάς) στη συγκεκριμένη συγκέντρωση συνεπάγεται και θετικό αποτέλεσμα και στις μικρότερες συγκεντρώσεις.



Εικόνα 59: Πείραμα γευστικής δοκιμασίας

Παρατήρηση εντόμων *D. melanogaster* ύστερα από το πείραμα της γευστικής δοκιμασίας. Νεαρά έντομα μένουν χωρίς τροφή για 20 ώρες και στη συνέχεια, μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο παρουσία ή μη της χρωστικής Acid-red. Ακολουθεί επώαση των εντόμων για 2 ώρες στο σκοτάδι και παρατήρηση αυτών σε στερεοσκόπιο. Η ερυθρότητα στην κοιλιά των εντόμων δηλώνει την πρόσληψη του θρεπτικού μέσου που περιέχει τη χρωστική. Στην ενδεικτική εικόνα απεικονίζονται έντομα που καλλιιεργήθηκαν με τροφή που περιείχε τη χρωστική Acid-red. Συγκεκριμένα, αριστερά απεικονίζεται ένα έντομο το οποίο εμφανίζει ερυθρότητα της κοιλιάς του άρα προηγήθηκε λήψη της τροφής, ενώ στο έντομο που βρίσκεται δεξιά, δεν παρατηρήθηκε ερυθρότητα που σημαίνει ότι δεν πραγματοποιήθηκε λήψη τροφής (Bahadorani & Hilliker, 2008).

Γ.2.3 Έλεγχος βιωσιμότητας

Γ.2.3.1 *In vivo* προσδιορισμός της βιωσιμότητας των εντόμων *Drosophila melanogaster*

Φυσιολογικού τύπου έντομα *D. melanogaster* αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων [*P. pinaster* (υδατικό εκχύλισμα φλοιού), *P. nigra* (υδατικό εκχύλισμα φλοιού), *P. heldreichii* (υδροαλκοολικό και αλκοολικό εκχύλισμα ξύλου)] στις αναφερθείσες συγκεντρώσεις, σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (23-25 °C), υγρασίας (~60 %) και φωτοπεριόδου (εναλλαγή φως/σκοτάδι κάθε 12ώρες). Αρχικά, για τον έλεγχο του προσδόκιμου ζωής των εντόμων συλλέχθηκαν ίσος αριθμός θηλυκών και αρσενικών εντόμων (τουλάχιστον 40 ♀ & 40 ♂) ηλικίας 1-4 ημερών, ύστερα από ελαφριά αναισθητοποίηση με αιθέρα ή με CO₂, τα οποία στη συνέχεια, χωρίστηκαν σε δύο σωλήνες καλλιέργειας ως εξής: 20 ♀ και 20 ♂ έντομα σε κάθε σωλήνα, ενώ το πείραμα πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. Οι καλλιέργειες ανανεώνονταν με φρέσκια τροφή κάθε 3-4 μέρες, ενώ καθημερινά καταγραφόταν η θνησιμότητα των εντόμων προκειμένου να δημιουργηθούν οι καμπύλες μακροβιότητας σύμφωνα με το πρόγραμμα Kaplan-meier και ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη στατιστική ανάλυση log-Rank (Martel-Cox).

Γ.2.4 Έλεγχος της κινητικότητας των εντόμων (Climbing assay) παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων

Το συγκεκριμένο πείραμα αφορά στην κινητικότητα των εντόμων και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος σύμφωνα με την αναφορά των Vernace et al., 2007. Ειδικότερα, ίσος αριθμός θηλυκών και αρσενικών εντόμων (περίπου 20 από κάθε φύλο) αναισθητοποιούνται με CO₂ και τοποθετούνται σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml, κλεισμένο ελαφρώς με βαμβάκι. Τα έντομα αφήνονται έως ότου αποκτήσουν πλήρως τις αισθήσεις τους (περίπου 20 λεπτά) και στη συνέχεια καταγράφεται ο αριθμός των εντόμων που περνούν το όριο των 40 ml σε χρόνο 20 δευτερολέπτων, αφού προηγουμένως τα έντομα έχουν βρεθεί στον πάτο του κυλίνδρου μετά από ένα ελαφρύ χτύπημα αυτού. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι τρεις φορές ανά πειραματικό δείγμα, διότι είναι πιθανό να προκληθεί στρες στα έντομα μετά από επαναλαμβανόμενα χτυπήματα και τα αποτελέσματα να είναι λανθασμένα.

Η ικανότητα αναρρίχησης μελετήθηκε σε ηλικιωμένα έντομα, παρουσία των παραπάνω εκχυλισμάτων.

Γ.2.5 Ανατομία ωοθηκών και σπερματοθηκών του εντόμου *Drosophila melanogaster*

Για όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας (μέτρηση της πρωτεασωμικής, καθεψινικής ενεργότητας κ.α.) πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του αναπαραγωγικού συστήματος [ωοθήκες (ovaries-O) και σπερματοθήκες (spermatheca-S)], καθώς παρατηρήθηκε η διαφορετική ρύθμιση του πρωτεασώματος και της αντιοξειδωτικής απόκρισης μεταξύ σωματικού και αναπαραγωγικού ιστού τόσο κατά τη γήρανση όσο και σε έντομα ίδιας ηλικίας. Για αυτό το λόγο, μελετήθηκε ο σωματικός ιστός, επομένως οι αναλύσεις μας αφορούν μόνο σωματικούς ιστούς.

Γ.2.5.1 Ανατομία ωοθηκών

Συλλέχθηκαν θηλυκά έντομα από κάθε ομάδα καλλιέργειας και αναισθητοποιήθηκαν με CO₂. Με τη βοήθεια ειδικών λαβίδων ανατομίας πιέζεται το έντομο ακριβώς κάτω από το θώρακα και το τοποθετούμε σε τρυβλίο, το οποίο περιέχει διάλυμα Ringer's.

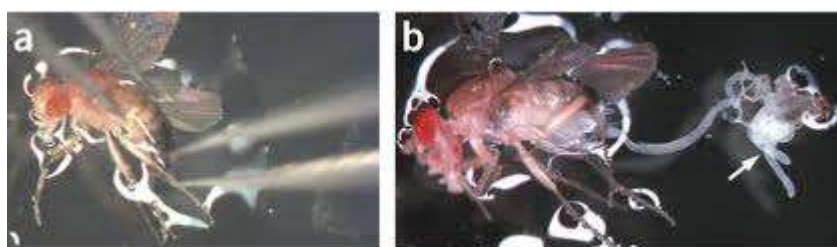
Διάλυμα Ringer's

- 0.75 % NaCl
- 0.02 % CaCl
- 0.01 % KCl
- 0.02 % NaHCO₃
- dH₂O

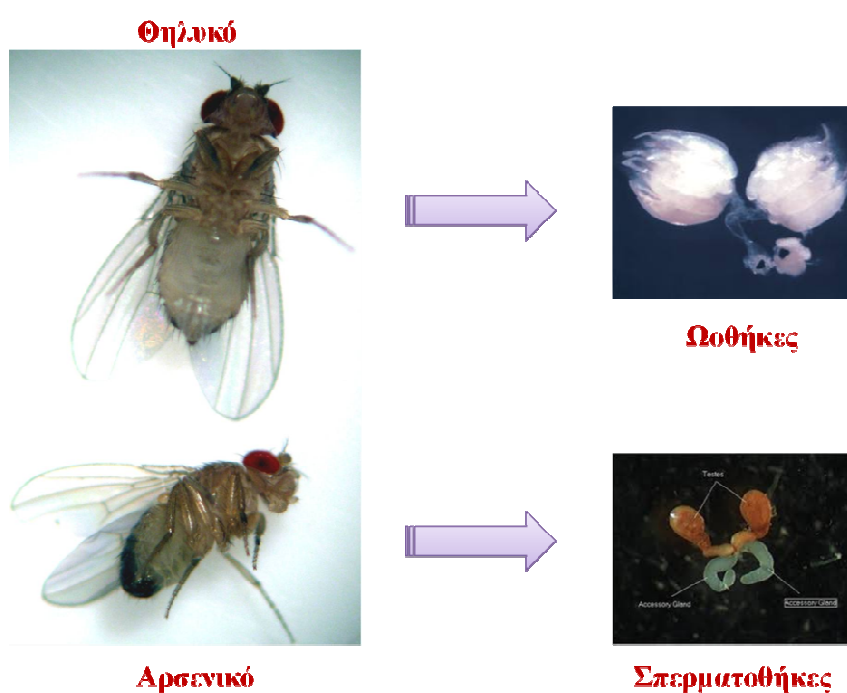
Είναι ένα ισότονο διάλυμα για την αποφυγή ωσμωτικών φαινομένων και φυλάσσεται στους 4 °C. Με μια άλλη λαβίδα πιάνεται η άκρη της κοιλιάς του εντόμου και με λεπτές κινήσεις ωθούνται οι ωθήκες προς τα έξω (Εικόνες 61 και 62).

Γ.2.5.2 Ανατομία σπερματοθηκών

Για την αφαίρεση των σπερματοθηκών των αρσενικών εντόμων, ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία με την ανατομία των ωθηκών των θηλυκών εντόμων (βλέπε Γ.2.5.1), (Εικόνες 60 και 61).



Εικόνα 57: Ανατομία γονάδων στο έντομο *Drosophila melanogaster*



Εικόνα 58: Θηλυκό και αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα του δίπτερου εντόμου *Drosophila melanogaster*

Ωοθήκες και σπερματοθήκες του εντόμου *Drosophila melanogaster*

Γ.2.6 Απομόνωση πρωτεϊνών και προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε πάγο:

Για την απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από το σωματικό ιστό αρσενικών ή θηλυκών ατόμων ακολουθείται η εξής διαδικασία:

➤ Ομοιογενοποίηση σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης NP-40 (φυλάσσεται στους 4° C) που αποτελείται από:

- ✓ 150 mM
- ✓ 1% NP-40
- ✓ 50 mM Tris pH 8.0

➤ Φυγοκέντρωση σε 13.300 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C.

Στη συνέχεια, συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες, εφαρμόζεται η μέθοδος Bradford για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης (βλ. *Γ.2.6.1*) και τέλος, τα δείγματα αναλύονται με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (*Γ.2.7*).

Γ.2.6.1 Μέθοδος Bradford (Bradford, 1976)

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην παρατήρηση ότι η μέγιστη απορρόφηση της χρωστικής Coomassie brilliant blue R-250, μετατοπίζεται από τα 465 nm στα 595 nm κατά το σχηματισμό του αντιδραστηρίου Bradford με τις πρωτεΐνες σταθερού συμπλόκου κυανού χρώματος (για περίπου 1 ώρα).

Αρχικά, δημιουργείται η πρότυπη ευθεία αναφοράς, η οποία κατασκευάζεται από γνωστές κλιμακούμενες συγκεντρώσεις αλβουμίνης ορού βοός (**Bovine Serum Albumin, BSA**). Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις BSA που χρησιμοποιήθηκαν είναι 0 µg/ml (τυφλό), 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 12 µg/ml, 16 µg/ml.

Κάθε δείγμα περιέχει τελικό όγκο 1 ml, όπου αποτελείται από 2 µl άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης [εκτός από ένα δείγμα μάρτυρα (τυφλό) που αντί για πρωτεΐνη περιέχει διάλυμα λύσης], το αντιδραστήριο Bradford και dH₂O. Τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φωτομέτρηση.

Γ.2.7 SDS-PAGE Ηλεκτροφόρηση - Ανοσοστύπωμα Western

Γ.2.7.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε ομογενές πήκτωμα ακρυλαμίδης

Για την ηλεκτροφορητική ανάλυση, προστίθεται σε κάθε πρωτεϊνικό δείγμα 2x Laemmli διάλυμα (2x LSB) (Laemmli, 1970) και DTT διάλυμα με αναλογία:

-  5 μέρη 2x LSB
-  4 μέρη πρωτεϊνικό διάλυμα
-  1 μέρος 1M DTT

και ακολουθεί βράσιμο των δειγμάτων για 2-3 λεπτά. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται πήκτωμα ακρυλαμίδης με ομοιογενή συγκέντρωση 12 % .

Το πήκτωμα αποτελείται από τη φάση πακεταρίσματος (stacking gel) και τη φάση διαχωρισμού (separating gel).

Πήκτωμα πακεταρίσματος

 1.35 ml ακρυλαμίδη (30 %) [περιέχει και bis-ακρυλαμίδη, σε συγκέντρωση του stock διαλύματος 0.8 (w/v) bis-ακρυλαμίδη, 29.2 (w/v) ακρυλαμίδη σε dH₂O και φυλάσσεται στους 4 °C]

 1.26 ml Tris (1 M) pH 6.8

 0.5 ml SDS (10 %)

 100 µl Ammonium persulfate (APS) (10 %)

 10 µl TEMED (100 %)

 6.8 ml dH₂O

Πήκτωμα διαχωρισμού

 8 ml ακρυλαμίδη (30 %)

 5 ml Tris (1.5 M) pH 8.8

 1 ml SDS (10 %)

 200 µl APS (10 %)

 8 µl TEMED (100 %)

 5.8 ml dH₂O

Μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος, ακολουθεί το φόρτωμα των δειγμάτων στα πηγαδάκια του πηκτώματος. Χρησιμοποιείται πάντα ένας μάρτυρας γνωστών έγχρωμων μοριακών βαρών, τόσο για να γίνεται έλεγχος της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης, αλλά πολύ περισσότερο για να πραγματοποιείται, στη συνέχεια, ανίχνευση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει, σύμφωνα με το μοριακό της βάρος.

Το **stock 10x Ρυθμιστικό διάλυμα Ηλεκτροφόρησης** (10x LRB) αποτελείται από:

 0.25 M Tris

 1.92 M γλυκίνη

 1 % (w/v) SDS

 pH 8.3

(Φυλάσσεται στους 4 °C)

Το pH του διαλύματος μετά την προσθήκη των συστατικών κυμαίνεται συνήθως από 8.30-8.63. Γενικά, αποφεύγεται η ρύθμιση του pH με HCl, διότι τα ιόντα Cl⁻ μειώνουν την αναλυτική ικανότητα της μεθόδου.

Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1x LRB. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι 55 mA για 1 ώρα και 30 λεπτά με τις πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν αρνητικό φορτίο λόγω του SDS, να μετακινούνται προς το θετικό πόλο με καθοριστικό παράγοντα το μοριακό τους βάρος, μέχρι η χρωστική των δειγμάτων να φτάσει στο τέλος του πηκτώματος διαχωρισμού, χωρίς όμως να φύγει από το πήκτωμα.

Γ.2.7.2 Μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

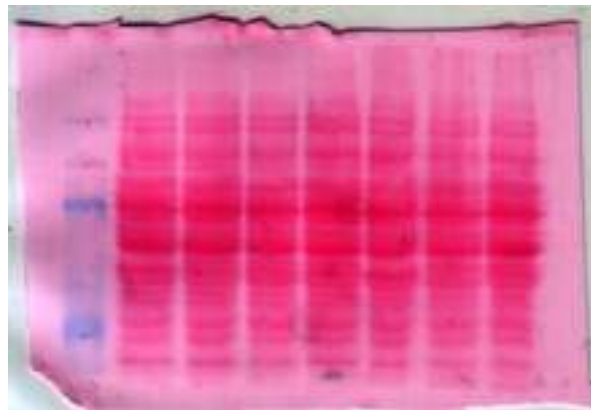
Η τεχνική της μεταφοράς των ηλεκτροφορημένων πρωτεϊνικών μορίων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η ανίχνευση της υπό μελέτη πρωτεΐνης, στη συνέχεια με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων, παρέχει πληροφορίες για το μέγεθος των πρωτεϊνών και το ποσοστό έκφρασης της προς μελέτη πρωτεΐνης στο δείγμα, αν όλα τα δείγματα είναι ισοφορτωμένα, δηλαδή περιέχουν ίδια ποσότητα ολικής πρωτεΐνης (Towbin et al., 1979). Έτσι, μπορεί να γίνει εξαγωγή συμπερασμάτων για τη συγκριτική μελέτη της έκφρασης ίδιων πρωτεϊνών σε διαφορετικά δείγματα τα οποία έχουν αναπτυχθεί παρουσία ή μη των φυτικών εκχυλισμάτων, και τις πιθανές επιπτώσεις που αυτά προκαλούν.

Η μέθοδος, που εφαρμόστηκε για τη μεταφορά των πρωτεϊνών, είναι η υγρή μεταφορά των πρωτεϊνών. Στην υγρή μέθοδο τα χαρτιά Whatman (3 mm), με μέγεθος 6.5 x 9.8 cm λίγο μεγαλύτερα από τις διαστάσεις του πηκτώματος, αρχικά τοποθετούνται μαζί με τα ειδικά σφουγγάρια, στο διάλυμα μεταφοράς για περίπου 20-25 λεπτά ώστε να ενυδατωθούν και να δημιουργηθεί μια ροή διαλύματος και με την εφαρμογή του ρεύματος, οι πρωτεΐνες να μεταφερθούν στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (με κίνηση από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο). Τοποθετείται το πήκτωμα με τη νιτροκυτταρίνη, ανάμεσα σε στρώσεις από χαρτιά Whatman και τα ειδικά σφουγγάρια, προσπαθώντας να διωχθούν τυχόν φυσαλίδες που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν τη μεταφορά των πρωτεϊνών.

Το διάλυμα μεταφοράς αποτελείται από:

- 40 mM γλυκίνη
- 50 mM Tris
- 20 % μεθανόλη

Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε στα 300 mA για δύο ώρες και 30 λεπτά στους 4 °C. Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς (πριν προχωρήσει η διαδικασία ανίχνευσης με αντισώματα) μπορεί να ελεγχθεί με χρώση της μεμβράνης με διάφορες χρωστικές, που βάφουν πρωτεΐνες μη επιλεκτικά και συγκεκριμένα τα αμινοξέα τους. Η χρωστική, που χρησιμοποιείται περισσότερο, είναι η Ponceau S, λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της διαλυτότητάς της στο νερό (**Εικόνα 62**).



Εικόνα 62: Έλεγχος μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη

Έλεγχος μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη: Το δείγμα πρωτεϊνών έχει αναλυθεί με ηλεκτροφόρηση σε κατάλληλο πήκτωμα (διαδρομές 2-8) και ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και χρώση της με Ponceau S. Στη διαδρομή 1 οι ζώνες με κυανό χρώμα δηλώνουν τη θέση πρωτεϊνών γνωστής μοριακής μάζας και χρησιμεύουν για τον προσδιορισμό των μαζών στις υπόλοιπες διαδρομές.

Γ.2.7.3 Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνικών ζωνών

Με τη μέθοδο του ανοσοστυπώματος πρωτεϊνών επιτυγχάνεται η ανίχνευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, χάρη στη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων-ελέγχου.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Επώαση της μεμβράνης με διάλυμα Blocking για 50 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση. Το διάλυμα Blocking είναι ένα πρωτεϊνικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων. Περιέχει 5 % σκόνη γάλακτος με χαμηλά λιπαρά σε διάλυμα πλύσης TBS-T (Tris Base Saline-Tween 20). Το TBS-T παρασκευάστηκε ως εξής:

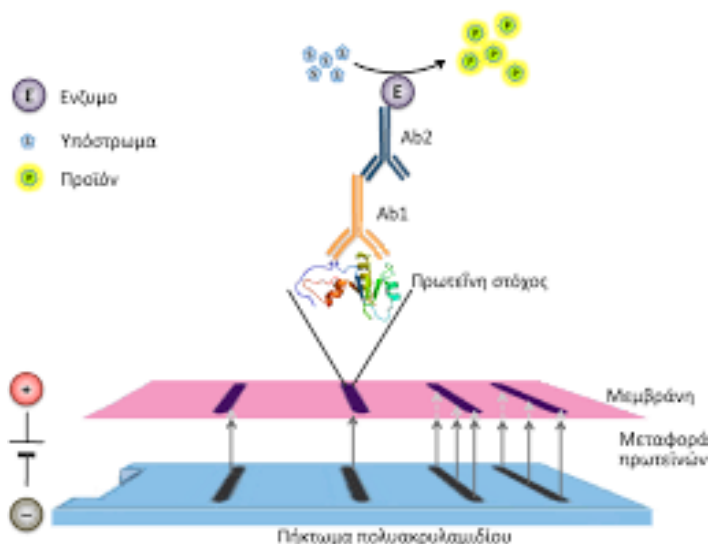
- ✓ **Διάλυμα πλύσης 20x TBS**
 - 20 mM Tris
 - 137 mM NaCl
 - pH 7.6 (ρυθμίζεται με προσθήκη HCl)

(Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου-RT)

- ✓ **Διάλυμα πλύσης 1x TBS-T**
 - Αραίωση του 20x TBS σε 1x TBS σε dH₂O
 - 0.1 % Tween-20

(Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου-RT)

- Επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα διαλυμένο σε διάλυμα Blocking (1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση).
- Πλύσιμο της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBS-T (3 γρήγορες και 3 δεκάλεπτες πλύσεις), υπό ανάδευση.
- Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα διαλυμένο σε διάλυμα Blocking (1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση).
- Πλύσιμο της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBS-T (3 γρήγορες και 3 δεκάλεπτες πλύσεις), υπό ανάδευση.
- Η ανίχνευση του συμπλόκου: αντιγόνου (υπό μελέτη πρωτεΐνης)-αντισώματος έγινε με τη χρήση του διαλύματος ECL, το οποίο περιέχει δύο αντιδραστήρια, το A και το B. Το A περιέχει υπεροξείδιο (υπόστρωμα για το ένζυμο υπεροξειδάση του ραπανακιού) και το B περιέχει λουμινόλη και ενισχυτή χημειοφωταύγειας. 125 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ μεμβράνης από κάθε αντιδραστήριο (περίπου 1+1 ml αντίστοιχα, για μια μεμβράνη που περιέχει 10 δείγματα) αναμιγνύονται σε ένα σωληνάριο universal και προστίθενται στην επιφάνεια της μεμβράνης για 1 λεπτό αυστηρά.
- Στεγνώνεται ελαφρώς η μεμβράνη από το ECL και τοποθετείται σε ειδική κασέτα καλυμμένη με μια λεπτή διαφανή μεμβράνη και άμεση έκθεση σε φιλμ ακτίνων X. Η έκθεση πραγματοποιείται σε σκοτεινό θάλαμο για χρόνο (δευτερόλεπτα έως και 1 ώρα) ανάλογο με την ένταση της ζώνης του συμπλόκου και η οποία σχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτη πρωτεΐνης καθώς και με τα επίπεδα συγγένειας αυτής με το πρωτογενές αντίσωμα. Η εμφάνιση του φιλμ γίνεται με μεταφορά του σε διάλυμα εμφάνισης (developer) για περίπου 1 έως 3 λεπτά, ξέπλυμα σε H_2O βρύσης και μονιμοποίηση σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) για 5 έως 10 λεπτά. Τέλος, ξεπλένεται πολύ καλά με νερό βρύσης (**Εικόνα 63**).



Εικόνα 63: Ανοσοστυπωση Western

Με τη μέθοδο του ανοσοστυπώματος Western, επιτυγχάνεται η ανίχνευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης χάρη στη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων-ελέγχου. Το πρωτογενές αντίσωμα προσδένεται στην πρωτεΐνη που αναγνωρίζει και είναι ειδικό για αυτή με τη

μεταβλητή του περιοχής, ενώ το δευτερογενές αντίσωμα ανιχνεύει και αναγνωρίζει τη σταθερή περιοχή του πρωτογενούς αντισώματος, στην οποία και συνδέεται με τη δική του μεταβλητή περιοχή. Στη σταθερή περιοχή του δευτερογενούς αντισώματος βρίσκεται προσκολλημένο το ένζυμο HRP, το οποίο με το κατάλληλο υπόστρωμα, στη συγκεκριμένη περίπτωση το H_2O_2 και τη λουμινόλη, αντιδρά και φθορίζει μέσω της αντίδρασης χημειοφωταύγειας (www.leinco.com).

Οι μεμβράνες επαναχρησιμοποιούνται, αφού αφαιρεθούν τα αντισώματα από αυτές με τη μέθοδο Stripping, που περιγράφεται αμέσως μετά (βλέπε **Γ.2.8.4**), και υπόκεινται σε όλα τα επίπεδα ενός νέου ανοσοστυπώματος Western, όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων, ανιχνεύονται τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης GAPDH.

Γ.2.7.4 Αφαίρεση αντισώματος από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Stripping)

Η διαδικασία της αφαίρεσης του αντισώματος είναι χρήσιμη όταν τα υπό μελέτη δείγματα είναι σπάνια και δεν μπορούν να δημιουργηθούν πολλές πανομοιότυπες μεμβράνες, λόγω περιορισμένης ποσότητας δειγμάτων. Επίσης, χρησιμοποιείται για οικονομία και εξοικονόμηση χρόνου, διότι είναι αρκετά χρονοβόρο κάθε διαφορετικό πρωτογενές αντίσωμα να χρειάζεται « φρέσκια » μεμβράνη για να μελετηθεί.

Αρχικά, πραγματοποιείται ένα γρήγορο ξέπλυμα της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα πλύσης TBS-T, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η μεγαλύτερη ποσότητα του ECL. Στη συνέχεια, επωάζεται η μεμβράνη σε διάλυμα Stripping στους 60 °C για 45 λεπτά αυστηρά, υπό ανάδευση.

- ✓ **Διάλυμα Stripping**
 - 50 mM Tris
 - 2 % SDS
 - pH 7.0 (ρυθμίζεται με προσθήκη HCl)

(Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου-RT)

Πριν από κάθε χρήση, προστίθεται στον όγκο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί 0.7 % μερκαπτοαιθανόλη, ώστε να επιτευχθεί η αποκόλληση των αντισωμάτων. Η μερκαπτοαιθανόλη είναι ισχυρά ηπατοτοξική ουσία οπότε η χρήση της πραγματοποιείται μόνο στον απαγωγό. Τέλος, ξεπλένεται η μεμβράνη (3 γρήγορες και 3 δεκάλεπτες πλύσεις) με διάλυμα πλύσης TBS-T, στεγνώνεται καλά και είτε φυλάσσεται στους 4 °C έως ότου ξαναχρησιμοποιηθεί ή πραγματοποιείται άμεση έναρξη ενός νέου ανοσοστυπώματος Western.

Γ.2.8 Ανίχνευση οξειδωμένων πρωτεϊνών (OxyBlot)

Η ανίχνευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών πραγματοποιείται με το OxyBlot Kit (Chemicon International). Το kit αυτό ανιχνεύει καρβονυλικές ομάδες, τις οποίες απέκτησαν οι πρωτεΐνες μετά την οξείδωσή τους. Πιο αναλυτικά, οι καρβονυλομάδες στις πλευρικές αλυσίδες των οξειδωμένων πρωτεϊνών αντιδρούν με 2,4-δινιτροφαινυλοϋδραζίνη (DNPH) δίνοντας 2,4-δινιτροφαινυλοϋδραζόνη (DNP). Οι τροποποιημένες αυτές πρωτεΐνες ανιχνεύονται με ειδικά αντισώματα (anti-DNP) με τη μέθοδο ανοσοστυπώματος Western.

Συγκεκριμένα:

- ❖ Απομονώθηκε ολική πρωτεΐνη από ♀ και ♂ έντομα *Drosophila melanogaster* ύστερα από την αφαίρεση του αναπαραγωγικού συστήματος, όπως περιγράφηκε παραπάνω.
- ❖ Χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένη ποσότητα πρωτεΐνης, έστω X (ml) και προστέθηκε ίσος όγκο (X) SDS 12 %, για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών.
- ❖ Έπειτα, προστέθηκε 2X όγκος 10x 2,4-δινιτροφαινυλοϋδραζίνη (DNPH)
- ❖ Πραγματοποιήθηκε επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου-RT. Κατά την επώαση, προκύπτουν τα παράγωγα των πρωτεϊνών, τα οποία θα ανιχνευθούν αργότερα από το ειδικό αντίσωμα.
- ❖ Ακολουθεί η προσθήκη 1.5 X (ml) διαλύματος εξουδετέρωσης για να διακοπεί η αντίδραση.
- ❖ Τέλος, προστέθηκε 5 % β-μερκαπτοαιθανόλης για την εκτεταμένη αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

Τα δείγματα αναλύονται, στη συνέχεια, όπως ακριβώς αναφέρθηκε στο παράρτημα *Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοστυπώμα Western*. Το πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα περιλαμβάνονται μέσα στο kit και είναι ειδικά για τη συγκεκριμένη μέθοδο.

Γ.2.9 Μέτρηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος

Για τη μέτρηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος πραγματοποιήθηκαν *in vivo* πειράματα τόσο σε νεαρά όσο και σε ηλικιωμένα έντομα *D. melanogaster*, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσία των υπό μελέτη φυτικών εκχυλισμάτων, σε διάφορες συγκεντρώσεις, ενώ έντομα μάρτυρες αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με την προσθήκη DMSO (100 %) σε συγκέντρωση 0.25 %. Για την πραγματοποίηση, λοιπόν, του πειράματος, έντομα από κάθε μέσο καλλιέργειας υπόκεινται σε απομόνωση ολικής πρωτεΐνης, έτσι ώστε να συνεχιστεί το πρωτόκολλο για τη μέτρηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος, όπως αναφέρεται στη συνέχεια.

Γ.2.9.1 Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης

Για την πραγματοποίηση του πειράματος μέτρησης της ενεργότητας του πρωτεασώματος, αρχικά, απομονώθηκε η ολική πρωτεΐνη των εντόμων. Συλλέγονται σωματικοί ιστοί από ίσο αριθμό ♀ και ♂ εντόμων από κάθε δείγμα (μετά την αφαίρεση των ωοθηκών και των σπερματοθηκών, αντίστοιχα) σε διάλυμα λύσης 26S lysis buffer (απομόνωση 26S πρωτεασώματος), στο οποίο προστίθεται ATP συγκέντρωσης 5 mM. Το ATP διατηρεί ενεργό το 26S πρωτεάσωμα και είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του.

✓ Διάλυμα λύσης 26S lysis buffer

- 20 mM Tris pH 7.6
- 5 mM ATP
- 10 % γλυκερόλη
- 20 mM KCl
- 1 mM EDTA
- 1 mM DTT
- 0.2 % NP-40

(Φυλάσσεται στους 4°C)

Ακολουθεί ομογενοποίηση των δειγμάτων και επώαση αυτών στους 4°C, με αργή περιστροφή στη ρόδα για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνται (19000 g, 10 λεπτά, 4 °C) και το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέα σωληνάκια. Με τη μέθοδο Bradford πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα (βλέπε Γ.2.6.1).

Γ.2.9.2 Προετοιμασία για μέτρηση των ενεργοτήτων του πρωτεασώματος

Εν συνεχεία, μετά την ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο Bradford των πρωτεϊνών προστίθενται 195 µl από το διάλυμα ενεργοτήτων σε νέα σωληνάκια. Πρόκειται για ένα ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο διατηρεί σταθερή την ενεργότητα του πρωτεασώματος, διότι παρομοιάζει το περιβάλλον του κυττάρου.

✓ Διάλυμα ενεργοτήτων για το 26S πρωτεάσωμα (Hepes)

- ❖ 100 mM Hepes pH 7.3

(Φυλάσσεται στους 4 °C)

Έπειτα, προστίθεται η υπολογισθείσα ποσότητα πρωτεΐνης (10 µg) για κάθε αντίδραση, εκτός από τα «τυφλά» δείγματα, τα οποία χρησιμοποιούνται για να αφαιρεθεί ο αυτοφθορισμός του φθοροπεπτιδίου ή τυχόν φθορισμός που δεν προέρχεται από την ειδική αποικοδομηση των φθοροπεπτιδίων. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η προσθήκη των τριών φθοροπεπτιδίων (5 µl από το stock των 2 mM) σε τελική συγκέντρωση 50 µM:

- LLVY (ενεργότητα χυμοθρυψίνης – υπομονάδα β5)

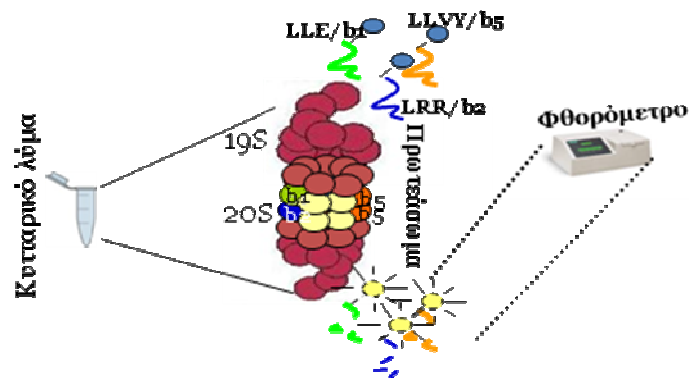
- LLE (ενεργότητα κασπάσης – υπομονάδα β1)
- LRR (ενεργότητα θρυψίνης – υπομονάδα β2)

Τα φθοροπεπτίδια είναι πεπτίδια ειδικά για τις τρεις ενζυμικές ενεργότητες των πρωτεασωμικών υπομονάδων β1, β2, β5 και σημασμένα με ένα φθορίζον μόριο, το οποίο όταν βρίσκεται συνδεδεμένο με το πεπτίδιο δεν φθορίζει. Το φθορίζον μόριο θα ενεργοποιηθεί και θα φθορίζει, όταν το φθοροπεπτίδιο αναγνωριστεί από την θέση που εντοπίζεται η ενεργότητα του πρωτεασώματος και θα αρχίσει η αποικοδόμησή του (**Εικόνα 64**).

Τα δείγματα, μετά την προσθήκη των φθοροπεπτιδίων, επωάζονται στους 37°C για 30 λεπτά. Μετά το τέλος της επώασης, προστίθενται 300 μl από το διάλυμα τερματισμού (stop solution), το οποίο σταματά την αντίδραση αποικοδόμησης των φθοροπεπτιδίων από το πρωτεάσωμα.

- ✓ **Διάλυματερματισμού (Stop solution)**
 - ❖ 30 mM CH₃COONa
 - ❖ 70 mM CH₃COOH
 - ❖ 100 mM ClCH₂COONa pH 4.3
- (Φυλάσσεται στους 4 °C)

Τέλος, προστίθεται 1 ml dH₂O σε κάθε δείγμα και ανιχνεύεται ο φθορισμός στο φθορισμόμετρο (VersaFluor™ Fluorometer System, Biorad). Για τα συγκεκριμένα φθοροπεπτίδια χρησιμοποιήθηκαν ειδικά κατασκευασμένα φίλτρα με μήκος κύματος διέγερσης (Excitation) 350 nm και μήκος κύματος εκπομπής (Emission) 440 nm.



Εικόνα 64: Μέτρηση των ενζυμικών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων

Για τη μέτρηση των ενεργοτήτων του πρωτεασώματος, χρησιμοποιήθηκαν φθοροπεπτίδια ειδικά για τις τρεις πρωτεασωμικές ενεργότητες [χυμοθρυψίνης (LLVY), κασπάσης (LLE) και θρυψίνης (LRR)]. Τα φθοροπεπτίδια ενεργοποιούνται και φθορίζουν μετά την αποικοδόμηση τους από το πρωτεάσωμα.

Γ.2.10 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των καθεψινών B και L του λυσοσώματος

Και εδώ βασική προϋπόθεση για την μέτρηση της ενεργότητας των καθεψινών B και L, αποτελεί η απομόνωση επαρκής ποσότητας πρωτεΐνης από κάθε δείγμα.

Αρχικά, οι σωματικοί ιστοί που απομονώνονται από την ανατομία, τοποθετούνται σε σωληνάκια που περιέχουν 200 μl διάλυμα λύσης για την απομόνωση των λυσοσωμάτων. Ακολουθεί ομοιογενοποίηση, φυγοκέντρωση (20.000 g, 20 λεπτά, 4 °C) και τέλος συλλογή υπερκειμένου.

- ✓ **Διάλυμα λύσης για το λυσόσωμα pH 4.0**
 - 50 mM Tris, pH 4.0
 - 1 mM DTT(Φυλάσσεται στους 4 °C)

Στη συνέχεια πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Έπειτα, τα δείγματα τοποθετούνται σε νέα σωληνάκια και προστίθενται 196 μl από το διάλυμα ενεργοτήτων, το οποίο είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα και διατηρεί την ενεργότητα των λυσοσωμικών ενζύμων, διότι παρομοιάζει τις συνθήκες που επικρατούν στο οργανίδιο (χαμηλό pH).

- ✓ **Διάλυμα ενεργοτήτων για λυσόσωμα**
 - 50 mM CH₃COONa
 - 8 mM L-Cysteine Hydrochloride
 - 1 mM EDTApH 4.0
(Φυλάσσεται στους 4 °C)

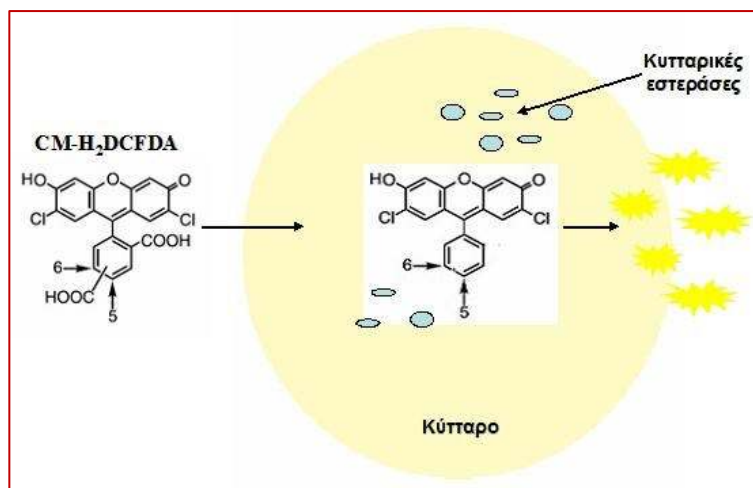
Ακολούθως, η καθορισμένη ποσότητα πρωτεΐνης (20 μg) μεταφέρεται στα σωληνάκια που αντιστοιχούν στο κάθε πρωτεϊνικό δείγμα και όχι στο «τυφλό» δείγμα (με το οποίο μηδενίζεται το φθορισμόμετρο). Έπειτα, προστίθεται το φθοροπεπτιδίο καθεψίνης B και L, σε τελική συγκέντρωση 10 μM. Η λειτουργία του φθοροπεπτιδίου περιγράφηκε αναλυτικά στην προηγούμενη παράγραφο (πρωτεασωμικά φθοροπεπτιδία) και λειτουργεί αντίστοιχα και εδώ. Τα δείγματα, μετά την προσθήκη του φλουροπεπτιδίου z-FR-AMC (EnzoLifeSciences) επωάζονται στους 37 °C για 30 λεπτά. Μετά το τέλος της επώασης, προστίθεται dH₂O και καταγράφεται ο παραγόμενος φθορισμός (φθορισμόμετρο – VersaFluor™ Fluorometer System, Biorad). Συγκεκριμένα, για το φθοροπεπτιδίο αυτό, χρησιμοποιούνται φίλτρα με μήκος κύματος διέγερσης (Excitation) 350 nm και μήκος κύματος εκπομπής (Emission) 440 nm (όμοια όπως και στο πρωτεάσωμα).

Γ.2.11 Μέτρηση των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στο έντομο *Drosophila melanogaster*

Η αρχή μεθόδου της μέτρησης των ROS του κυττάρου βασίζεται στο γεγονός ότι ύστερα από κυτταρική οξείδωση, οι κυτταρικές εστεράσες απομακρύνουν τις οξικές ομάδες διαφόρων εστέρων, όπως η χρωστική CM-H₂DCFDA με αποτέλεσμα αυτή να φθορίζει. Συγκεκριμένα, η χρωστική CM-H₂DCFDA [5-(and-6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetylated ester] είναι ένα χλωρομέθυλο παράγωγο του H₂DCFDA, χρήσιμο ως δείκτης των ROS μέσα στα κύτταρα, αφού μέσω της πρόσθετης χλωρομεθυλομάδας που αντιδρά με θειόλες, ενισχύεται η ικανότητά της να προσκολλάται σε ενδοκυτταρικά στοιχεία. Η CM-H₂DCFDA διαχέεται παθητικά στα κύτταρα, όπου οι οξικές ομάδες της διασπώνται από τις ενδοκυτταρικές εστεράσες ύστερα από οξείδωση του κυττάρου. Μετά την οξείδωση, η χρωστική δίνει ένα φθορίζον σύμπλοκο, το οποίο παγιδεύεται στο εσωτερικό του κυττάρου και μπορεί να μετρηθεί το σήμα του (**Εικόνα 65**).

Αρχικά, ίσος αριθμός θηλυκών και αρσενικών εντόμων αναισθητοποιούνται με CO₂ και αφαιρούνται με ανατομία οι ωοθήκες και οι σπερματοθήκες, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, οι σωματικοί αυτοί ιστοί τοποθετούνται σε σωληνάκια που περιέχουν 200 μl 1X PBS (duplicate) ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολουθεί αφαίρεση του PBS, προσθήκη φρέσκου PBS (200 μl) με 1 μl ειδικής χρωστικής για τη μέτρηση των ROS (CM-H₂DCF σε τελική συγκέντρωση 10 μM, φυλάσσεται στους -20 °C), καλή ανάδευση και επώαση για 30 λεπτά σε σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της επώασης, ακολουθεί αφαίρεση του διαλύματος PBS-χρωστικής, προσθήκη άλλων 200 μl PBS, καλή ανάδευση και επαναφορά του ιστού με 15 λεπτά επώαση στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται δυο πλυσίματα με φρέσκο PBS, ενώ πάντα ακολουθεί καλή ανάδευση μετά από κάθε στάδιο. Έπειτα, προστίθενται 200 μl διάλυμα λύσης NP-40 lysis buffer και τα δείγματα ομογενοποιούνται στον πάγο.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση (19.000 g, 10 λεπτά, 4 °C), συλλογή υπερκλειμένου (170 μl) και ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τέλος σε κάθε σωληνάκι προστίθεται 830 μl dH₂O και πραγματοποιείται ανίχνευση φθορισμού. Για το συγκεκριμένο ανιχνευτή, χρησιμοποιούνται ειδικά κατασκευασμένα φίλτρα με μήκος κύματος διέγερσης (Excitation) 490 nm και μήκος κύματος εκπομπής (Emission) 520 nm. Για το μηδενισμό του φθορισμόμετρου, χρησιμοποιείται δείγμα χωρίς την προσθήκη πρωτεΐνης. Κατόπιν, πραγματοποιείται κανονικοποίηση και ανάλυση των αποτελεσμάτων ως προς την αρχική ποσότητα πρωτεΐνης.



Εικόνα 65: Μέτρηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)

Η αρχή μεθόδου της μέτρησης των δραστικών μορφών οξυγόνου του κυττάρου βασίζεται στο γεγονός, ότι ύστερα από κυτταρική οξείδωση, οι κυτταρικές εστεράσες απομακρύνουν τις οξικές ομάδες διαφόρων εστέρων, όπως η χρωστική CM-H₂DCFDA με αποτέλεσμα αυτή να φθορίζει. Συγκεκριμένα, η χρωστική CM-H₂DCFDA [5-(and-6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluoresceindiacetate, acetylester] είναι ένα χλωρομέθυλο παράγωγο του H₂DCFDA, χρήσιμο ως δείκτης των ROS μέσα στα κύτταρα, αφού μέσω της πρόσθετης χλωρομεθυλομάδας που αντιδρά μεθειόλες, ενισχύεται η ικανότητά της να προσκολλάται σε ενδοκυτταρικά στοιχεία. Η CM-H₂DCFDA διαχέεται παθητικά στα κύτταρα, όπου οι οξικές ομάδες της διασπώνται από τις ενδοκυτταρικές εστεράσες ύστερα από οξείδωση του κυττάρου. Μετά την οξείδωση, η χρωστική δίνει ένα σύμπλοκο φθορισμού, το οποίο παγιδεύεται στο εσωτερικό του κυττάρου όπου πραγματοποιείται η μέτρηση της έντασης του σήματος.

Γ.2.12 Μέτρηση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP (Green Fluorescent Protein) με φθορισμομετρία σε διαγονιδιακά έντομα *Drosophila melanogaster*

Κατά την εκτέλεση του συγκεκριμένου πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά έντομα, που φέρουν το γονίδιο GFP υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή που φέρει είτε ένα ARE, είτε ένα μεταλλαγμένο ARE ή 4 συνθετικά AREs. Τα συγκεκριμένα διαγονιδιακά έντομα εκτέθηκαν σε θρεπτικό μέσο παρουσία ή μη των φυτικών εκχυλισμάτων σε χρονικό διάστημα 2 ημερών.

Το πρωτόκολλο για τη μέτρηση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης με φθορισμομετρία πραγματοποιείται απουσία φωτός (in dark). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Συλλέγονται σωματικοί ιστοί από ίσο αριθμό ♀ και ♂ εντόμων από κάθε δείγμα (μετά την αφαίρεση των ωοθηκών και των σπερματοθηκών, αντίστοιχα) σε διάλυμα λύσης NP-40 (200 μl).
- Πραγματοποιείται ομογενοποίηση των δειγμάτων στο σκοτεινό θάλαμο, ενώ αμέσως μετά την ομογενοποίησή τους, τοποθετούνται σε πάγο και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο.

- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων (19.000 g, 10 λεπτά, 4 °C), συλλογή του υπερκλειμένου σε νέα σωληνάκια (170 µl) και ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου με τη μέθοδο Bradford.
- Στη συνέχεια, στα συγκεκριμένα σωληνάκια προστίθεται όγκος 830 µl διάλυμα λύσης NP-40.
- Η μέτρηση του φθορισμού στο φθορισμόμετρο (VersaFluor TM Fluorometer System, Biorad) γίνεται με ειδικά κατασκευασμένα φίλτρα με μήκος διέγερσης (Excitation) 490 nm και μήκος εκπομπής (Emission) 510 nm. Το φθορισμόμετρο μηδενίζεται με το δείγμα που περιέχει φυσιολογικού τύπου έντομα (wt), καθώς οι ιστοί των εντόμων εμφανίζουν αυτοφθορισμό. Η κανονικοποίηση έγινε ως προς την ποσότητα της πρωτεΐνης.

Γ.2.13 Αντίστροφη μεταγραφή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Reverse Transcription PCR, RT-PCR)

Πραγματοποιείται RT-PCR προκειμένου να ελεγχθούν τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης των εξής γονιδίων:

- ✓ *rpn11* (γονίδιο που κωδικοποιεί για τη ρυθμιστική υπομονάδα Rpn11 του 19S πρωτεασώματος),
- ✓ *α7* (γονίδιο που κωδικοποιεί για την α7 ρυθμιστική υπομονάδα του 20S πρωτεασώματος),
- ✓ *β5* (γονίδιο που κωδικοποιεί για την καταλυτική υπομονάδα β5 του 20S πρωτεασώματος),
- ✓ *cncC* (γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταγραφικό παράγοντα αντιοξειδωτικής απόκρισης CncC, το ομόλογο του Nrf2 στη *Drosophila*),
- ✓ *keap1* (γονίδιο που κωδικοποιεί για τον παράγοντα Keap1, που αναστέλλει τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα CncC),
- ✓ *gstD1* (γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη GstD1, που εμπλέκεται στο μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης) και τέλος
- ✓ το γονίδιο αναφοράς *rp49* (housekeeping gene).

Γ.2.13.1 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, Q-RT-PCR)

Γ.2.13.2 Απομόνωση ολικού RNA

Ολικό RNA από σωματικούς ιστούς (~6-10) ίσου αριθμού θηλυκών και αρσενικών εντόμων απομονώνεται χρησιμοποιώντας 300 μ l RNAzol (Molecular Research Center, Inc). Ακολουθεί ομοιογενοποίηση με ξεχωριστό ομοιογενοποιητή για κάθε δείγμα, προσθήκη επιπλέον 200 μ l RNAzol, 200 μ l ddH₂O και ήπια ανάδευση. Τα δείγματα επωάζονται για περίπου 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και φυγοκεντρώνονται (12.000 g, 15 λεπτά, 4 °C). Στη συνέχεια, συλλέγεται το υπερκείμενο (~660 μ l) σε νέα αποστειρωμένα σωληνάκια και προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα 100 % ισοπροπανόλης, ακολουθώντας ήπια ανάδευση. Τα δείγματα επωάζονται για ακόμα μια φορά σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και φυγοκεντρώνονται (12.000 g, 10 λεπτά, 4 °C). Η ισοπροπανόλη βοηθά το RNA να κατακρημνιστεί, οπότε στη φάση αυτή απομακρύνεται το υπερκείμενο (το ίζημα είναι το RNA). Αμέσως μετά τη φυγοκέντρωση και από τη στιγμή που υπάρχει ίζημα RNA, τα δείγματα τοποθετούνται απευθείας στον πάγο. Τέλος, τα δείγματα πλένονται δύο φορές με 400 μ l 75 % αιθανόλης (4000 g, 3 λεπτά, 4 °C/πλύση).

Κατόπιν, η αιθανόλη αφαιρείται εντελώς (δεν αφήνει το RNA να διαλυθεί) από κάθε δείγμα και το ίζημα RNA επαναδιαλυτοποιείται σε 20-60 μ l ddH₂O ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του RNA και έλεγχος της καθαρότητάς του. Το RNA φυλάσσεται στους -80 °C ή ακολουθεί κατευθείαν σύνθεση cDNA.

Γ.2.13.3 Σύνθεση cDNA

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιείται 1 μ g ολικού RNA από κάθε δείγμα. Για μία αντίδραση με τελικό όγκο 20 μ l ισχύει:

- ❖ ddH₂O από cDNA synthesis kit (Thermo Scientific K1642) for RT-qPCR, μέχρι τελικό όγκο 20 μ l
- ❖ 5X μίγμα αντίδρασης, 4 μ l
- ❖ Αντίστροφη μεταγραφάση, 1 μ l
- ❖ RNA, ο όγκος που αντιστοιχεί σε ποσότητα 1 μ g

Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι εξής:

- ❖ 5 λεπτά στους 25°C
- ❖ 30 λεπτά στους 42°C
- ❖ 5 λεπτά στους 85°C
- ❖ Συντήρηση στους 4°C

Γ.2.13.4 Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μέσω Real Time-Polymerase Chain Reaction

Από την απομόνωση του συνολικού RNA και τη σύνθεση του cDNA που έχει προηγηθεί, προκύπτει 1 μ g / μ l τελική συγκέντρωση cDNA. Επειδή όμως, η μέγιστη

ποσότητα DNA που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για RT-PCR είναι 500 ng, αραιώνεται το cDNA προκειμένου η συγκέντρωση να είναι 500 ng/μλ DNA.

Η αντίδραση Q-RT-PCR πραγματοποιείται στο θερμοκυκλοποιητή PikoReal Real-Time (Thermo Scientific), σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix της Thermo Scientific.

Για μία αντίδραση με τελικό όγκο 10 μl ισχύει:

- ❖ ddH₂O του kit μέχρι τελικό όγκο 10 μl
- ❖ Μίγμα αντίδρασης, 5 μl
- ❖ Forward εκκινητής, 0.6 μl (τελική συγκέντρωση 0.3 μM)
- ❖ Reverse εκκινητής, 0.6 μl (τελική συγκέντρωση 0.3 μM)
- ❖ DNA, 1 μl

Το πρόγραμμα που ακολουθείται είναι το εξής:

- ✓ Θερμοκρασία προθέρμανσης: 95°C για 10'
- ✓ Θερμοκρασία ξεδιπλώματος των δύο κλώνων: 95°C για 15''
- ✓ Θερμοκρασία σύνδεσης εναρκτήριων τμημάτων σε κάθε αλυσίδα των δύο κλώνων: 60°C για 30''
- ✓ Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 30''
- ✓ Καμπύλες τήξης δημιουργήθηκαν στους 58-95°C
- ✓ Λήξη αντίδρασης, ψύξη: 20°C για 10''

40 κύκλοι

Η θερμοκρασία στην οποία το 50 % του DNA αποδιατάσσεται είναι γνωστή ως σημείο τήξεως (**T_m**). Η καμπύλη τήξεως δίνει μια εκτίμηση των διαστάσεων και των χαρακτηριστικών της διπλής έλικας. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, η διπλή έλικα αρχίζει να διαχωρίζεται, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της απορρόφησης του DNA (φαινόμενο υπερχρωμικότητας). Το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο για τον έλεγχο τόσο των εκκινητών, όσο και του προϊόντος. Συγκεκριμένα, η χρωστική SYBR Green είναι ικανή να ανιχνεύσει οποιοδήποτε δίκλωνο DNA υπάρξει (ακόμα και διμερή εκκινητών), μαζί με το PCR προϊόν. Τα διμερή των εκκινητών ή οποιοδήποτε άλλο παραπροϊόν της αντίδρασης θα εμφανιστεί στην καμπύλη ως μια πρόσθετη κορυφή.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Δ.1 Μελέτη των βιολογικών επιδράσεων των εκχυλισμάτων του γένους *Pinus* στο δίπτερο έντομο *Drosophila melanogaster*

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων [*Pinus pinaster* (υδατικό εκχύλισμα φλοιού), *Pinus nigra* (υδατικό εκχύλισμα φλοιού), *Pinus heldreichii* (υδροαλκοολικό και αλκοολικό εκχύλισμα ξύλου)] στη βιωσιμότητα των εντόμων με την προσθήκη των εκχυλισμάτων στο θρεπτικό τους μέσο, (βλέπε **Υλικά και Μέθοδοι**).

Προκειμένου να ελεγχθεί ότι δεν επηρεάζονται τα επίπεδα λήψης της τροφής με την προσθήκη των παραπάνω εκχυλισμάτων, διότι μειωμένη λήψη θερμίδων, από τη μία πλευρά φαίνεται να αυξάνει τη διάρκεια ζωής και να μειώνει το οξειδωτικό στρες και από την άλλη πλευρά μπορεί να οδηγήσει σε παθοφυσιολογικές μεταβολές, που δε σχετίζονται με τη φυσιολογική διαδικασία (McCay et al., 1935; Lin et al., 2002; Tavernarakis & Driscoll, 2002; Partridge et al., 2005; Lee et al., 2006), πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος λήψης της τροφής με τη μέθοδο της γευστικής δοκιμασίας.

Δ.1.1 Γευστική δοκιμασία

Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο σύμφωνα με την αναφορά των Bahadorani & Hilliker, 2008. Αναλυτικότερα, νεαρά έντομα (1-3 ημερών) έμειναν χωρίς τροφή - συνθήκες πείνας - (σε σωλήνα καλλιέργειας που περιέχει διηθητικό χαρτί ποτισμένο μόνο με νερό βρύσης) για 20 ώρες και στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε θρεπτικά μέσα, που περιείχαν τα προς μελέτη εκχυλίσματα και τη χρωστική sulforhodamine B sodium salt (Acid red), ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό που περιείχε το διαλύτη DMSO (100 %) των εκχυλισμάτων μαζί με τη χρωστική. Η χρωστική (Acid-red) χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0.2 %. Ακολούθησε επώαση των εντόμων για δύο ώρες στο σκοτάδι και παρατήρηση αυτών σε στερεοσκόπιο.

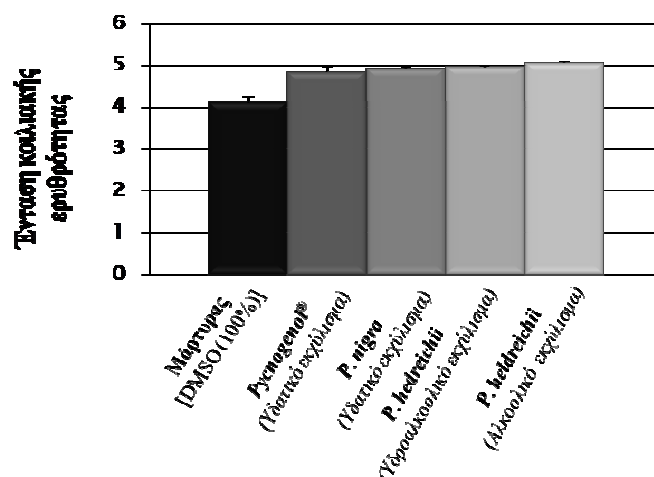
Η ερυθρότητα στην κοιλιά των εντόμων δηλώνει την πρόσληψη του θρεπτικού μέσου και όπως παρατηρήθηκε ήταν παρόμοια τόσο στο θρεπτικό μέσο του μάρτυρα όσο και στα θρεπτικά υλικά παρουσία των εκχυλισμάτων (**Εικόνα 66**).



Εικόνα 59: Έλεγχος γευστικής δοκιμασίας στο δίπτερο έντομο *Drosophila melanogaster*

Η ερυθρότητα στην κοιλιά των εντόμων δηλώνει την πρόσληψη του θρεπτικού μέσου και όπως παρατηρήθηκε ήταν παρόμοια τόσο στο θρεπτικό μέσο του διαλύτη DMSO (100 %) όσο και στα θρεπτικά υλικά παρουσία των εκάστοτε εκχυλισμάτων.

Στη συνέχεια, βαθμολογείται η κοιλιακή ερυθρότητα από 0 (άχρωμη κοιλιά, μη λήψη τροφής) μέχρι 5 (έντονη κόκκινη κοιλιά, κανονική λήψη τροφής). Πρέπει να σημειωθεί ότι τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα εξετάστηκαν στη μέγιστη συγκέντρωση, που χρησιμοποιήθηκαν και για τα υπόλοιπα πειράματα (δηλαδή σε συγκέντρωση των **100 $\mu\text{g} / \text{ml}$**), εφόσον θετικό αποτέλεσμα (ερυθρότητα της κοιλιάς) στη συγκεκριμένη συγκέντρωση συνεπάγεται και θετικό αποτέλεσμα και στις μικρότερες συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: Ένταση κοιλιακής ερυθρότητας των εντόμων *Drosophila melanogaster* παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων

Παρατηρήθηκε ότι τα έντομα, τα οποία αναπτύσσονται παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων, εμφάνισαν παρόμοια ένταση κοιλιακής ερυθρότητας, σε σχέση με αυτά που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο παρουσία DMSO (100 %). Επομένως, τα έντομα καταναλώνουν την τροφή παρουσία των εκχυλισμάτων.

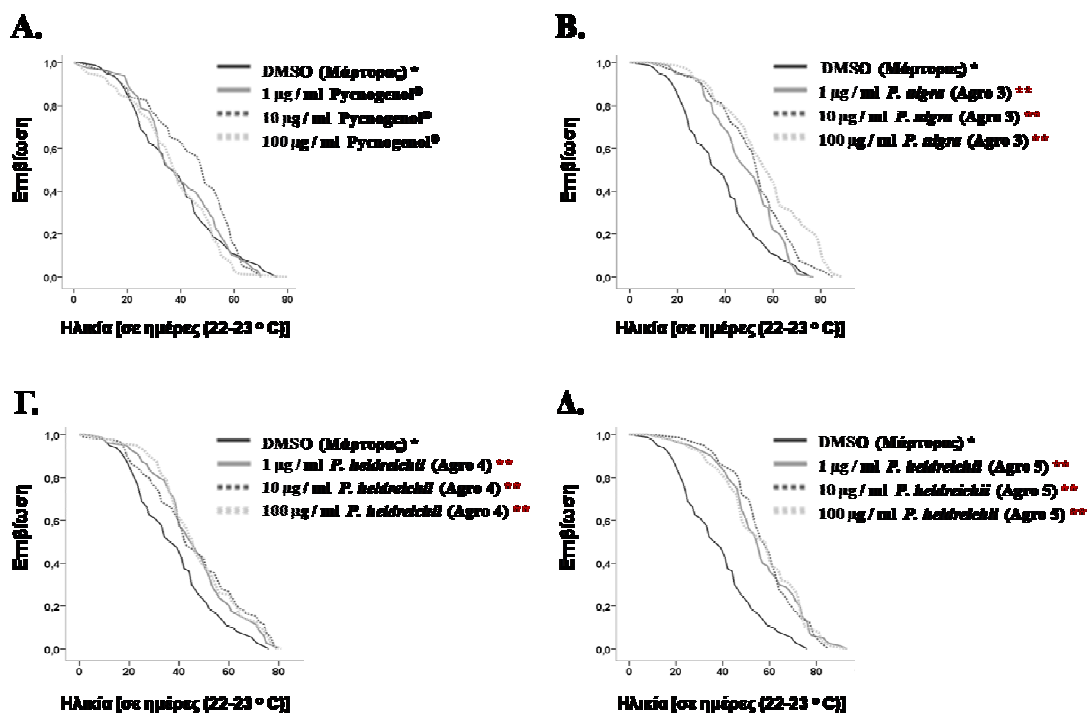
Με βάση τα παραπάνω ευρήματα προκύπτει το συμπέρασμα, ότι τα έντομα είναι δεκτικά ακόμα και σε θρεπτικά μέσα παρουσία των εκχυλισμάτων. Επομένως, μέσω της γευστικής δοκιμασίας, επιβεβαιώνεται ότι η οποιαδήποτε παρατήρηση οφείλεται στη δράση των φυτικών εκχυλισμάτων, που λαμβάνουν τα έντομα *Drosophila melanogaster* από την τροφή τους και όχι στη μη λήψη. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η *in vivo* μελέτη του προσδόκιμου ζωής των εντόμων παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων.

Δ.1.2 *In vivo* μελέτη της βιωσιμότητας των εντόμων *Drosophila melanogaster* παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων

Προκειμένου να μελετηθεί η βιωσιμότητα των εντόμων υπό την επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων [*P. pinaster* (υδατικό εκχύλισμα φλοιού), *P. nigra* (υδατικό εκχύλισμα φλοιού), *P. heldreichii* (υδροαλκοολικό και αλκοολικό εκχύλισμα ξύλου)], πραγματοποιήθηκαν πειράματα μακροβιότητας [ίσος αριθμός νεαρών ατόμων (wild type) από κάθε φύλο, τουλάχιστον 40 ♀ & 40 ♂] σε συγκεντρώσεις των 1 μg / ml, 10 μg / ml και 100 μg / ml.

Να σημειωθεί ότι οι καμπύλες βιωσιμότητας και στα τέσσερα διαγράμματα βιωσιμότητας (βλέπε παρακάτω **Διάγραμμα 2**) συγκρίνονται με την ίδια ομάδα μαρτύρων. Ως μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκαν έντομα, τα οποία αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο παρουσία DMSO (100 %) σε συγκέντρωση 0.25 %, εφόσον τα παραπάνω εκχυλίσματα διαλύονται στο συγκεκριμένο διαλύτη. Όλα τα πειράματα ελέγχου βιωσιμότητας πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν (duplicates).

Από τις καμπύλες βιωσιμότητας βρέθηκε ότι η παρατεταμένη χορήγηση τροφής πλούσια σε εκχυλίσματα από τα είδη *P. pinaster*, *P. nigra* και *P. heldreichii* οδήγησε σε σημαντική αύξηση του προσδόκιμου ζωής (lifespan) καθώς και σε βελτίωση της ποιότητας ζωής (healthspan) (**Διάγραμμα 2**). Πρέπει να σημειωθεί ότι η σημαντικότερη αύξηση του προσδόκιμου ζωής παρουσιάστηκε στα έντομα που καλλιεργήθηκαν παρουσία του αλκοολικού εκχυλίσματος του *P. heldreichii* (Agro 5), (**Διάγραμμα 2.Α**) και εν συνεχεία παρουσία του υδατικού εκχυλίσματος του *P. nigra* (Agro 3), (**Διάγραμμα 2.Β**), όπου παρατηρήθηκε δοσο-εξαρτώμενη αύξηση της μακροβιότητας. Τέλος, διαπιστώθηκε ότι τα εκχυλίσματα από τα είδη *P. nigra* (Agro 3) και *P. heldreichii* (Agro 4 & Agro 5) εμφάνισαν συνολικά καλύτερη εικόνα όσο αφορά τη μακροβιότητα σε σύγκριση με το υδατικό εκχύλισμα του *P. pinaster* (Pycnogenol®).



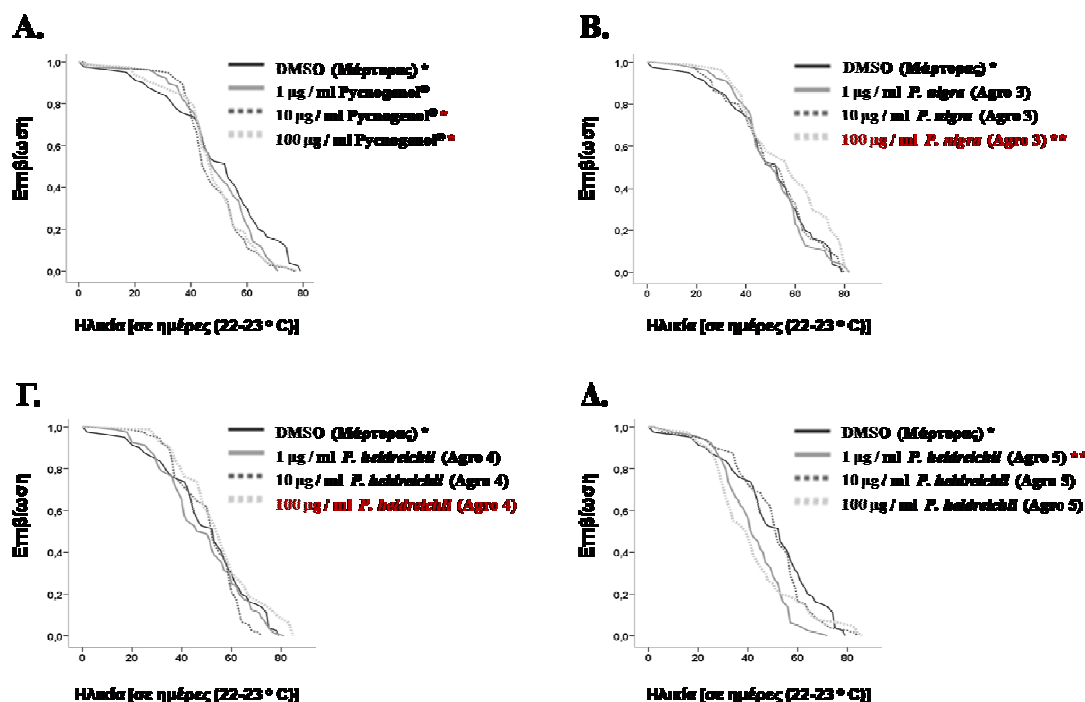
Διάγραμμα 2: Έλεγχος της βιωσιμότητας παρουσία των εκχυλισμάτων του γένους *Pinus*

Καμπύλες μακροβιότητας των εντόμων που καλλιεργήθηκαν για όλη τη διάρκεια της ζωής τους στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις των φυτικών εκχυλισμάτων. Από τις καμπύλες Β, Γ, Δ παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση τόσο του προσδόκιμου ζωής (lifespan) όσο και της ποιότητας ζωής (healthspan) των εντόμων, όταν καλλιεργούνται παρουσία των εκχυλισμάτων, που προέρχονται από τα είδη *P. nigra* (υδατικό εκχύλισμα – Agro 3) και *P. heldreichii* (Υδροαλκοολικό εκχύλισμα - Agro 4 & Αλκοολικό εκχύλισμα - Agro 5), σε σύγκριση με το υδατικό εκχύλισμα του *P. pinaster* (Pycnogonol®) όπου δε σημειώθηκε αξιοσημείωτη μεταβολή στη μακροβιότητα, (Καμπύλη Α).* Οι καμπύλες βιωσιμότητας και στα τέσσερα διαγράμματα βιωσιμότητας συγκρίνονται με τη ίδια ομάδα μαρτύρων [DMSO (100 %)]. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση SD, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές από τα δείγματα μάρτυρες [νεαρά έντομα που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO (100 %)], όπου $\pm$ SD *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Στη συνέχεια, προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα πρώτα πειράματα βιωσιμότητας, επαναλήφθηκε το συγκεκριμένο πείραμα μακροβιότητας κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Ωστόσο από τις δοκιμές βιωσιμότητας που πραγματοποιήθηκαν αυτή τη φορά υπήρχαν σημαντικές διαφορές όσο αφορά κυρίως το προσδόκιμο ζωής των εντόμων μεταξύ των εκχυλισμάτων.

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ήπια βελτίωση της ποιότητας ζωής των εντόμων (healthspan), όταν το θρεπτικό μέσο περιείχε **100 μg / ml από υδατικό εκχύλισμα φλοιού του είδους *P. nigra* (Agro 3)** σε σχέση με τα έντομα – μάρτυρες, που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO (100 %), ενώ παράλληλα σημειώθηκε μια πολύ μικρή αύξηση στο προσδόκιμο ζωής (lifespan) (Διάγραμμα 3.Β). Ομοίως, το **υδροαλκοολικό εκχύλισμα που προέρχεται από ξύλο του είδους *P. heldreichii* (Agro 4)** εμφάνισε ήπια βελτίωση της ποιότητας ζωής των εντόμων (healthspan) και ταυτόχρονα μικρή αύξηση στο προσδόκιμο ζωής (lifespan) στη μέγιστη συγκέντρωση (100 μg / ml) σε σχέση με τα έντομα – μάρτυρες (Διάγραμμα 3.Γ).

Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στη ζωή των εντόμων σε καμιά από τις συγκεντρώσεις του υδατικού εκχυλίσματος από το φλοιό του είδους *P. pinaster* (Pycnogenol®) (Διάγραμμα 3.Α). Παρόμοια εικόνα εμφάνισαν και τα έντομα που εκτέθηκαν παρουσία των συγκεντρώσεων του αλκοολικού εκχυλίσματος από το ξύλο του είδους *P. heldreichii* (Agro 5), τόσο στην ποιότητα ζωής (healthspan) όσο και στη μακροβιότητα (lifespan), σε σχέση με τα έντομα - μάρτυρες (Διάγραμμα 3.Δ).



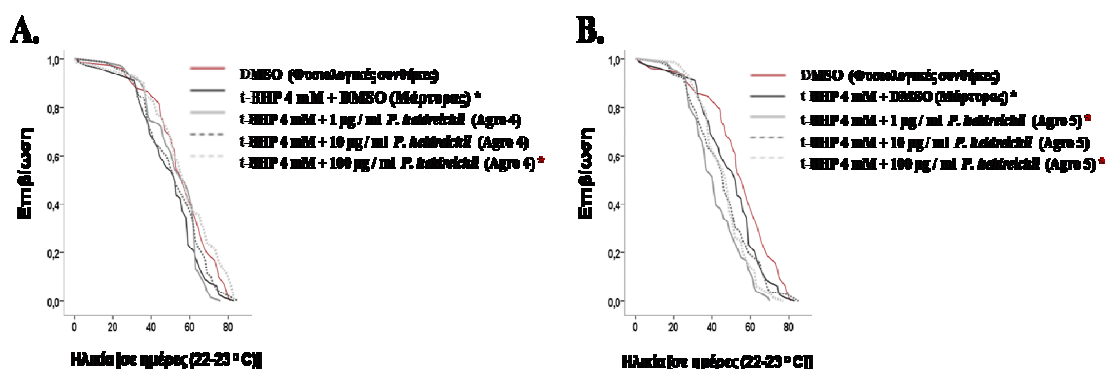
Διάγραμμα 3: Έλεγχος της βιωσιμότητας παρουσία των εκχυλισμάτων του γένους *Pinus*

Καμπύλες μακροβιότητας των εντόμων που καλλιεργήθηκαν για όλη τη διάρκεια της ζωής τους στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις των φυτικών εκχυλισμάτων. Παρατηρήθηκε ήπια βελτίωση της ποιότητας ζωής (healthspan), όταν το θρεπτικό μέσο περιείχε 100 µg / ml από υδατικό εκχύλισμα φλοιού του είδους *P. nigra* σε σχέση με τα έντομα – μάρτυρες που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO (100 %), ενώ παράλληλα σημειώθηκε μια ήπια αύξηση στο προσδόκιμο ζωής (lifespan), (Καμπύλη Β). Ομοίως, το υδροαλκοολικό εκχύλισμα που προέρχεται από ξύλο του είδους *P. heldreichii* εμφάνισε ήπια βελτίωση της ποιότητας ζωής των εντόμων (healthspan) στη μέγιστη συγκέντρωση (100 µg / ml), ταυτόχρονα με μικρή αύξηση στο προσδόκιμο ζωής σε σχέση με τα έντομα – μάρτυρες, (Καμπύλη Γ).* Οι καμπύλες βιωσιμότητας των φυτικών εκχυλισμάτων συγκρίνονται με τον ίδιο μάρτυρα [DMSO (100 %)]. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση SD, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές από τα δείγματα μάρτυρες [νεαρά έντομα που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO (100 %)], όπου $\pm$ SD *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Δ.1.3 *In vivo* μελέτη της βιωσιμότητας των εντόμων *Drosophila melanogaster* παρουσία των φυτικών εκχυλίσμάτων σε ένα ήπιο οξειδωτικό περιβάλλον

Δεδομένου της ήπιας βελτίωσης της ποιότητας και του προσδόκιμου ζωής από τα φυτικά εκχυλίσματα (κυρίως από τα εκχυλίσματα *P. nigra* και *P. heldreichii*), στη συνέχεια, ρωτήθηκε αν τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα του γένους *Pinus* μπορούν να παρέχουν προστασία στα έντομα *D. melanogaster* σε ένα οξειδωτικό περιβάλλον, το οποίο προκαλεί τη μείωση της βιωσιμότητας. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στο **Διάγραμμα 4**, ο οξειδωτικός παράγοντας t-BHP (Tert-Butyl hydroperoxide), σε συγκέντρωση 4 mM προκάλεσε μείωση του προσδόκιμου ζωής των εντόμων σε σύγκριση με έντομα που αναπτύσσονται σε φυσιολογικές συνθήκες [DMSO (100 %)]. Προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανή προστατευτική δράση των φυτικών εκχυλίσμάτων παρουσία εξωγενούς οξειδωτικού στρες, νεαρά έντομα (1-3 ημερών) εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις των εκχυλίσμάτων, όπως αναφέρθηκαν και παραπάνω, παρουσία και του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP. Όλα τα πειράματα ελέγχου βιωσιμότητας πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν (duplicates) (**Διάγραμμα 4**).

Όπως φαίνεται και στο **Διάγραμμα 4**, το υδροαλκοολικό εκχύλισμα που προέρχεται από το ξύλο του *P. heldreichii* (Agro 4) προσέφερε προστασία στα έντομα που καλλιεργήθηκαν παρουσία οξειδωτικού στρες, (**Διάγραμμα 4.A**). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μια δοσο-εξαρτώμενη αύξηση στο προσδόκιμο ζωής (lifespan) αλλά και ήπια βελτίωση της ποιότητας ζωής των εντόμων (healthspan), όταν στο θρεπτικό μέσο περιέχεται η μέγιστη συγκέντρωση των 100 μg / ml, σε σύγκριση τόσο με τα έντομα – μάρτυρες που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO + t-BHP (**μαύρη γραμμή**) όσο και με τα έντομα που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό μέσο παρουσία, δηλαδή, μόνο DMSO (100 %) (**κόκκινη γραμμή**). Αντίθετα, παρατηρήθηκε ότι το αλκοολικό εκχύλισμα από το ξύλο του είδους *P. heldreichii* (Agro 5) αδυνατεί να παρέχει προστασία παρουσία οξειδωτικού στρες και επιπλέον φάνηκε να μειώνει περισσότερο το προσδόκιμο ζωής των εντόμων σε σύγκριση με τα έντομα που καλλιεργήθηκαν μόνο παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (**Διάγραμμα 4.B**).

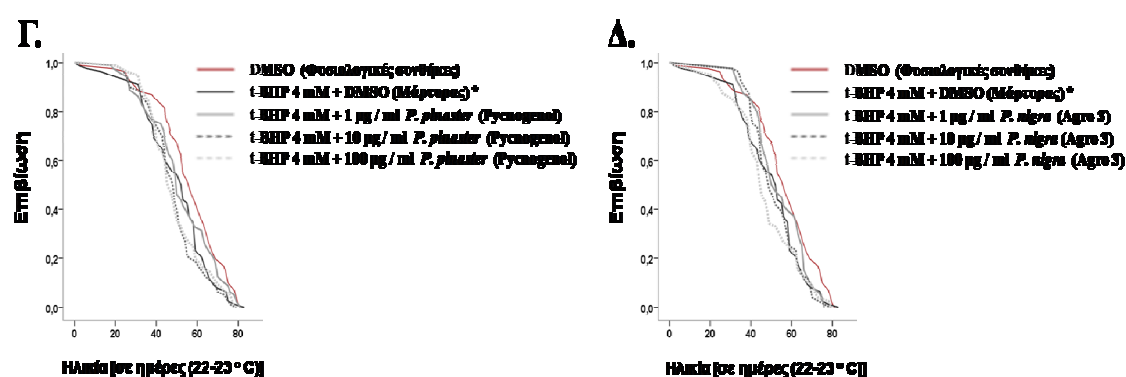


Διάγραμμα 4 (A & B): Έλεγχος της βιωσιμότητας των εντόμων παρουσία των εκχυλίσμάτων του είδους *P. heldreichii* και του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP

Καμπύλες μακροβιότητας των εντόμων που καλλιεργήθηκαν για όλη τη διάρκεια της ζωής τους στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις των εκχυλίσμάτων του *P. heldreichii* παρουσία του

οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (4 mM). Παρατηρήθηκε ότι το υδροαλκοολικό εκχύλισμα που προέρχεται από το ξύλο του είδους *P. heldreichii* προστατεύει τα έντομα, που εκτίθενται σε ένα οξειδωτικό περιβάλλον, καθώς σημειώνεται δοσο-εξαρτώμενη αύξηση της ποιότητας ζωής (Καμπύλη Α). Σε αντίθεση, το αλκοολικό εκχύλισμα από το ξύλο του *P. heldreichii* αδυνατεί να παρέχει προστασία σε ένα οξειδωτικό περιβάλλον (Καμπύλη Β). Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση SD, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές από τα δείγματα μάρτυρες [νεαρά έντομα που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO (100 %)], όπου $\pm$ SD *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Τέλος, με βάση τα Διαγράμματα 4.Γ και 4.Δ, τόσο στο υδατικό εκχύλισμα από το φλοιό του *P. pinaster* (Pycnogenol®) όσο και στο υδατικό εκχύλισμα από το φλοιό του *P. nigra* προκάλεσαν ήπια βελτίωση της ποιότητας ζωής στη μικρότερη συγκέντρωση 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα, χωρίς ωστόσο οι μεταβολές στη μακροβιότητα (lifespan) αλλά και στην ποιότητα ζωής (healthspan) των εντόμων σε σχέση με τα έντομα – μάρτυρες να είναι στατιστικά σημαντικές.



Διάγραμμα 4 (Γ & Δ): Έλεγχος της βιωσιμότητας των εντόμων παρουσία των εκχυλισμάτων *P. pinaster* και *P. nigra* και του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP

Καμπύλες μακροβιότητας των εντόμων που καλλιεργήθηκαν για όλη τη διάρκεια της ζωής τους στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων των ειδών *P. pinaster* και *P. nigra* και στον οξειδωτικό παράγοντα t-BHP (4 mM). Και στις δύο περιπτώσεις, σημειώθηκε ήπια βελτίωση στην ποιότητα ζωής σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα, χωρίς ωστόσο οι μεταβολές στη μακροβιότητα (lifespan) αλλά και στην ποιότητα ζωής (healthspan) των εντόμων σε σχέση με τα έντομα – μάρτυρες να είναι στατιστικά σημαντικές.

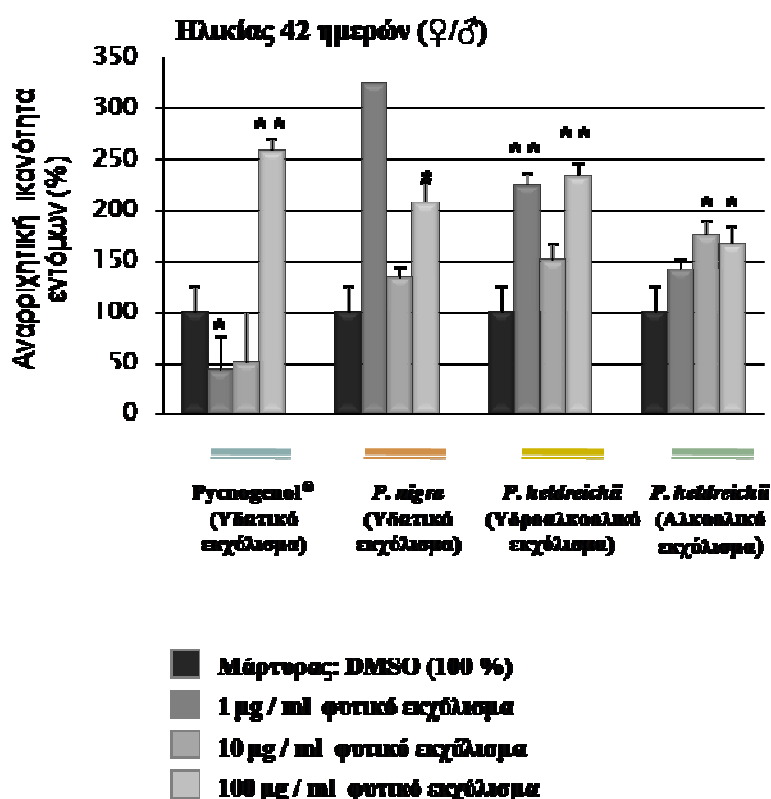
* Οι καμπύλες βιωσιμότητας των φυτικών εκχυλισμάτων συγκρίνονται με την ίδια ομάδα μαρτύρων [DMSO (100 %) + 4 mM t-BHP]. Ως μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκαν έντομα, τα οποία αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο παρουσία t-BHP (4 mM) + DMSO (100 %) (οξειδωτικό περιβάλλον). Ενώ με τη χαρακτηριστική κόκκινη γραμμή απεικονίζονται έντομα που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο παρουσία μόνο DMSO (100 %) χωρίς τον οξειδωτικό παράγοντα t-BHP (φυσιολογικές συνθήκες).

Δ.1.4 Έλεγχος της ικανότητας αναρρίχησης των εντόμων *Drosophila melanogaster* παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων

Η γήρανση χαρακτηρίζεται από απώλεια της μυϊκής δύναμης με αποτέλεσμα την περιορισμένη (μειωμένη) κινητική ικανότητα. Δεδομένου αυτού, στη συνέχεια εξετάστηκε αν στις παραπάνω συγκεντρώσεις των υπό μελέτη εκχυλισμάτων,

παρατηρείται πιθανή διατήρηση της μυϊκής δύναμης και άρα μειωμένη απώλεια του ρυθμού εκφυλισμού του μυϊκού ιστού. Για το λόγο αυτό, μετρήθηκε η ικανότητα αναρρίχηση των εντόμων που καλλιεργήθηκαν παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων για 42 ημέρες.

Τα ευρήματα μας έδειξαν αύξηση της κινητικότητας (δείκτης της μυϊκής δύναμης) των εντόμων παρουσία των εκχυλισμάτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, το υδατικό εκχύλισμα του *P. pinaster* (Pycnogenol®) στη μέγιστη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ και το υδατικό εκχύλισμα του *P. nigra* σε συγκεντρώσεις 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ και 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ παρουσίασαν αύξηση της κινητικής ικανότητας των εντόμων. Όσον αφορά τα δυο εκχυλίσματα του *P. heldreichii*, το υδροαλκοολικό εκχύλισμα εμφάνισε αυξημένη μυϊκή δύναμη στη μέγιστη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, εύρημα που συμφωνεί με την παρατηρηθείσα αύξηση του προσδόκιμου ζωής αλλά και βελτίωση της ποιότητας ζωής παρουσία ήπιου οξειδωτικού στρες στην ίδια συγκέντρωση. Τέλος, στο αλκοολικό εκχύλισμα του *P. heldreichii* παρατηρήθηκε αυξημένη κινητικότητα κυρίως στη συγκέντρωση των 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$, (Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5: Έλεγχος της κινητικότητας των εντόμων μετά από έκθεση τους στα φυτικά εκχυλίσματα

Η αναρριχητική ικανότητα των εντόμων μετά από παραμονή τους στο θρεπτικό μέσο παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων για 42 ημέρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε αυξημένη κινητικότητα (μυϊκή δύναμη) των εντόμων παρουσία των εκχυλισμάτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τα έντομα – μάρτυρες. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση SD, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές από τα δείγματα μάρτυρες [νεαρά έντομα που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO (100 %)], όπου $\pm \text{SD}$ *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Δεδομένων των μεταβολών που προκαλούν τα παραπάνω εκχυλίσματα στην ποιότητα και στο προσδόκιμο ζωής, καθώς και στην κινητικότητα των εντόμων, στη συνέχεια διερευνήθηκε αν αυτές οι παρατηρήσεις σχετίζονται με τυχόν επίδραση των εκχυλισμάτων στη λειτουργικότητα του πρωτεασώματος, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της γήρανσης (βλέπε **εισαγωγή**).

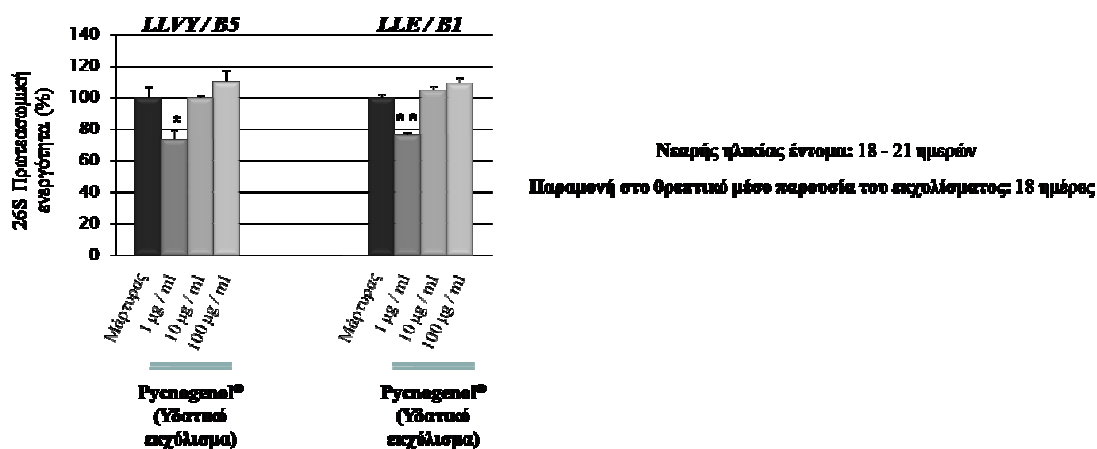
Δ.1.5 *In vivo* μελέτη της ενεργότητας του πρωτεασώματος των εντόμων έπειτα από έκθεση στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, το σύστημα ουβικιτίνης - πρωτεασώματος είναι ένα από τα κύρια πρωτεολυτικά και επιδιορθωτικά συστήματα του κυττάρου και σχετίζεται με την εμφάνιση της γήρανσης, καθώς παρατηρείται απώλεια της έκφρασης και της ενεργότητας του με τη πάροδο των χρόνων (Chondrogianni & Gonos, 2005; Hara et al., 2006; Tsakiri et al., 2013). Σταδιακά και καθώς οργανισμός γηράσκει, τα μονοπάτια διατήρησης της ομοιόστασης δυσλειτουργούν, με αποτέλεσμα την απορρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών και την περαιτέρω συσσώρευση βλάβης, που οδηγεί τελικά σε εμφάνιση του γερασμένου ιστού, καθώς και σε ασθένειες που σχετίζονται με το γήρας (νευροεκφυλιστικές νόσοι, καρκίνος) (Campisi, 2005; Niccoli & Partridge, 2012).

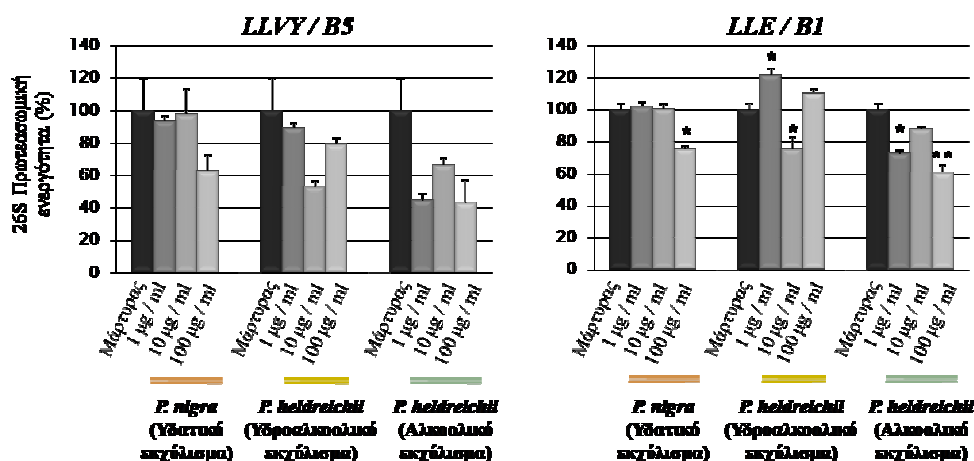
Παράλληλα, έχει αναφερθεί πως στο αναπαραγωγικό σύστημα το πρωτεάσωμα ρυθμίζεται διαφορετικά κατά τη γήρανση, σε σχέση με τον υπόλοιπο σωματικό ιστό (Fredriksson et al., 2012; Tsakiri et al., 2013). Για το λόγο αυτό, η μελέτη μας εστιάστηκε στη μελέτη των επιδράσεων των φυτικών εκχυλισμάτων στους σωματικούς ιστούς των εντόμων και έτσι στα πειράματά μας αφαιρέθηκε το αναπαραγωγικό σύστημα από τα έντομα. Στη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων, μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων των φυτικών εκχυλισμάτων (1 µg / ml, 10 µg / ml και 100 µg / ml) όσο αφορά στην ενεργότητα του πρωτεασώματος σε *in vivo* συνθήκες σε σωματικούς ιστούς τόσο από νεαρά όσο και από ηλικιωμένα έντομα, (**Διάγραμμα 6 & Διάγραμμα 7**). Να σημειωθεί ότι μετρήθηκαν οι δύο κύριες ενεργότητες του πρωτεασώματος, χυμοθρυψίνης (LLVY) και κασπάσης (LLE).

Παρατηρήθηκε μια ελαφριά αύξηση των δυο πρωτεασωμικών ενεργοτήτων χυμοθρυψίνης (LLVY) και κασπάσης (LLE) στα δείγματα νεαρών εντόμων ηλικίας 18-21 ημερών, που αναπτύχθηκαν παρουσία της μεγαλύτερης συγκέντρωσης του υδατικού εκχυλίσματος του είδους *P. pinaster* (100 µg / ml) σε σύγκριση με τα έντομα – μάρτυρες, που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο παρουσία DMSO (100 %), (**Διάγραμμα 6.A**). Αντίθετα, στο υδατικό εκχύλισμα του *P. nigra* αλλά και στο αλκοολικό εκχύλισμα του *P. heldreichii* εμφανίζονται μειωμένες και οι δυο πρωτεασωμικές ενεργότητες στα έντομα ηλικίας 14-16 ημερών παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων σε σχέση με τα έντομα - μάρτυρες. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το υδροαλκοολικό εκχύλισμα του *P. heldreichii* προκαλεί αύξηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας κασπάσης (LLE) στις συγκεντρώσεις 1 µg / ml και 100 µg / ml, ενώ μειώνει την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (LLVY) (**Διάγραμμα 6.B**).

A.



B.



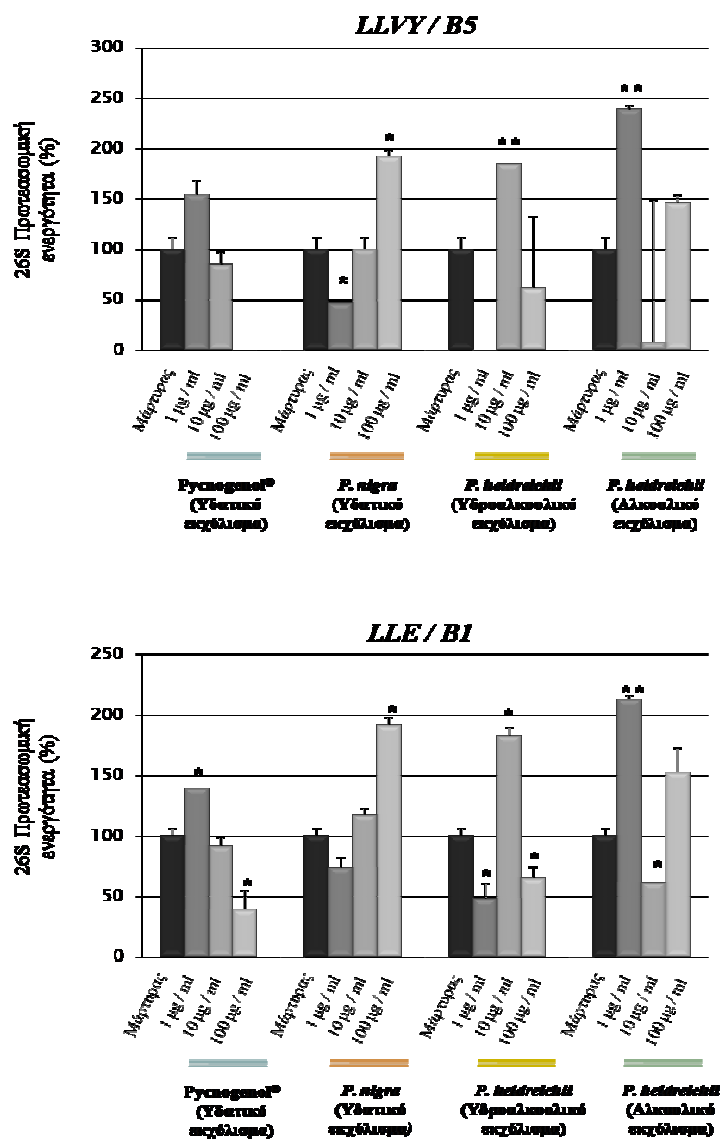
Νεαρές ηλικίας έντομα: 14 - 16 ημερών

Παραμονή στο θρεπτικό μέσο παρουσία των εκχυλισμάτων: 12 ημέρες

Διάγραμμα 6: In vivo μελέτη των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων παρουσία των εκχυλισμάτων του γένους *Pinus* σε νεαρές ηλικίας έντομα

(A) Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε ήπια αύξηση των δυο πρωτεασωμικών ενεργοτήτων χυμοθρυψίνης (LLVY) και κασπάσης (LLE) στα δείγματα νεαρών εντόμων ηλικίας 18-21 ημερών, που αναπτύχθηκαν παρουσία της μεγαλύτερης συγκέντρωσης του υδατικού εκχυλίσματος του είδους *P. pinaster* (100 µg / ml), σε σύγκριση με τα έντομα - μάρτυρες. (B) Αντίθετα, στο υδατικό εκχύλισμα του *P. nigra* αλλά και στο αλκοολικό εκχύλισμα του *P. heldreichii* εμφανίζονται μειωμένες και οι δυο πρωτεασωμικές ενεργότητες στα έντομα ηλικίας 14-16 ημερών παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων σε σχέση με τα έντομα - μάρτυρες. Ωστόσο, στο υδροαλκοολικό εκχύλισμα του *P. heldreichii* παρατηρήθηκε αυξημένη η πρωτεασωμική ενεργότητα κασπάσης (LLE) στις συγκεντρώσεις 1 µg / ml και 100 µg / ml, σε αντίθεση με την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (LLVY). Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση SD, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές από τα δείγματα μάρτυρες [νεαρά έντομα που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO (100 %)], όπου ± SD *, P < 0.05, **, P < 0.01.

Στη συνέχεια, επαναλήφθηκε η μελέτη της ενεργότητας πρωτεασώματος, κατά την οποία νεαρά έντομα εκτέθηκαν σε θρεπτικό μέσο παρουσία αυτή τη φορά και των τεσσάρων εκχυλισμάτων για το ίδιο χρονικό διάστημα των 16 ημερών, (Διάγραμμα 7). Ταυτόχρονα, από αυτή τη μέτρηση πραγματοποιήθηκε σύγκριση της δράση των εκχυλισμάτων που προέρχονται από τα είδη *P. nigra* και *P.heldreichii* με τη δράση του υδατικού εκχυλίσματος του *P. pinaster* (Pycnogenol®).



Νεαρής ηλικίας έντομα: 16-20 ημερών

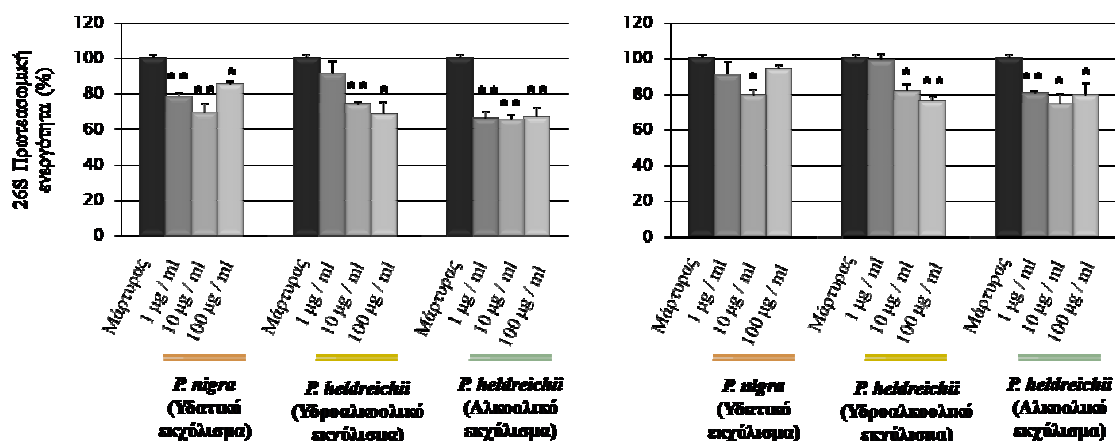
Παραμονή στο θρεπτικό μέσο παρουσία των εκχυλισμάτων: 16 ημέρες

Διάγραμμα 7: *In vivo* μελέτη των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων σε νεαρής ηλικίας έντομα

Η παρατεταμένη έκθεση νεαρών εντόμων σε τροφή πλούσια στα υπό μελέτη φυτικά εκχυλίσματα προκαλεί σημαντική *in vivo* αύξηση των δυο κύριων πρωτεασωμικών ενεργοτήτων. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση SD, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές από τα δείγματα μάρτυρες [νεαρά έντομα που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO (100 %)], όπου $\pm$ SD *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Με βάση τα δεδομένα από την παραπάνω μέτρηση, προέκυψε ότι η παρατεταμένη έκθεση νεαρών εντόμων σε τροφή παρουσία των εκχυλισμάτων από τα είδη *P. nigra* και *P. heldreichii* προκαλεί σημαντική *in vivo* αύξηση των πρωτεασωμικών ενεργιοτήτων σε σχέση με το υδατικό εκχύλισμα του *P. pinaster* (Pycnogenol®).

Στη συνέχεια, εξετάστηκε κατά πόσο τα εκχυλίσματα αυτά επιδρούν στη λειτουργικότητα του πρωτεασώματος και σε ηλικιωμένα έντομα (Διαγράμματα 8 & 9).



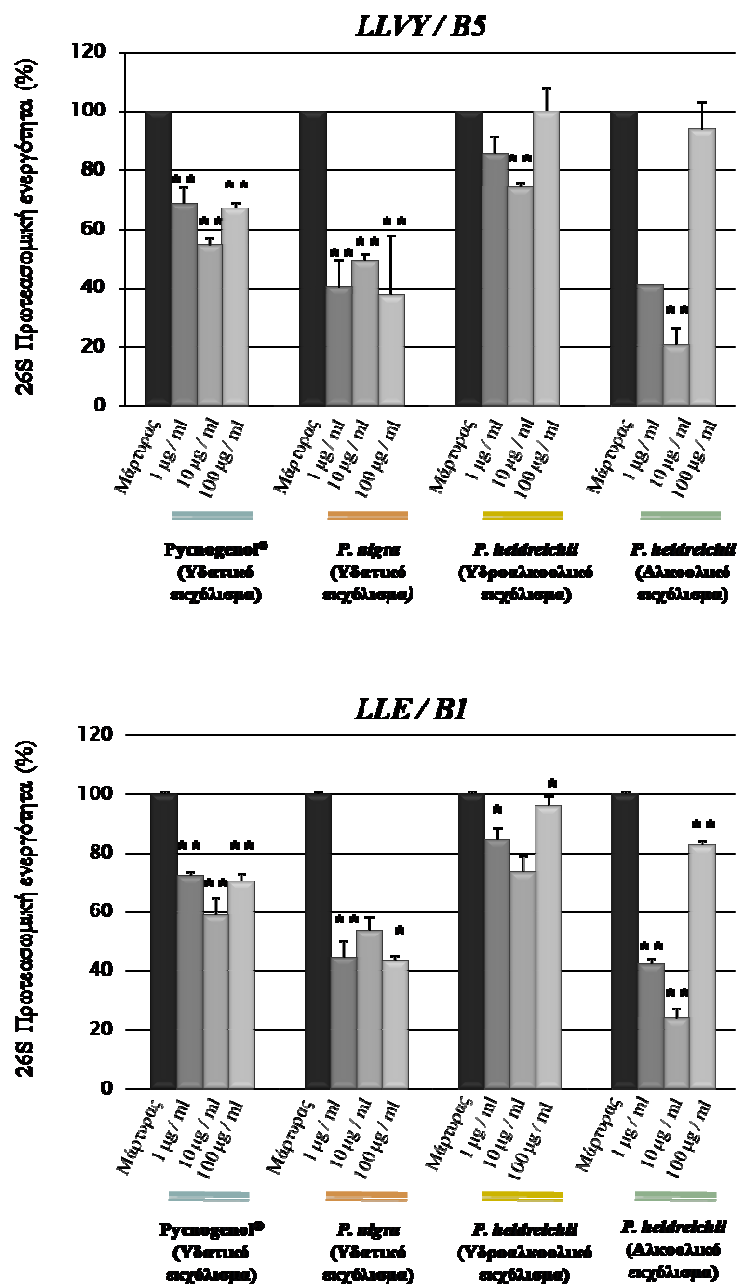
Ηλικιωμένα έντομα: 48-52 ημερών

Παραμονή στο θρεπτικό μέσο παρουσία των εκχυλισμάτων: 48 ημέρες

Διάγραμμα 8: *In vivo* μελέτη των πρωτεασωμικών ενεργιοτήτων παρουσία των τριών εκχυλισμάτων από τα είδη *P. nigra* και *P. heldreichii* σε ηλικιωμένα έντομα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παραπάνω μέτρησης, παρατηρήθηκε μια γενική μείωση και των δυο ενεργιοτήτων του πρωτεασώματος στα δείγματα των ηλικιωμένων εντόμων (48-52 ημερών), που καλλιεργήθηκαν παρουσία του υδατικού εκχυλίσματος του *P. nigra*, του υδροαλκοολικού αλλά και του αλκοολικού εκχυλίσματος του *P. heldreichii* σε σχέση με τα δείγματα-μάρτυρες. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση SD, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές από τα δείγματα μάρτυρες [νεαρά έντομα που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO (100 %)], όπου $\pm$ SD *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Στη συνέχεια, επαναλήφθηκε η παραπάνω μελέτη αυτή τη φορά παρουσία και του υδατικού εκχυλίσματος του *P. pinaster* (Pycnogenol®) σε ηλικιωμένα έντομα, προκειμένου όχι μόνο να ελεγχθεί η επίδραση του στη ρύθμιση του πρωτεασώματος αλλά και για να συγκριθεί με τα υπό μελέτη εκχυλίσματα ως προς τη δράση αυτή (Διάγραμμα 9).



Πηλικοωμένα έντομα: 46-48 ημερών

Παραμονή στο θεραπευτικό μέσο παρουσία των εκχυλισμάτων: 46 ημέρες

Διάγραμμα 9: *In vivo* μελέτη των πρωτεασομικών ενεργοτήτων παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων σε ηλικιωμένα έντομα

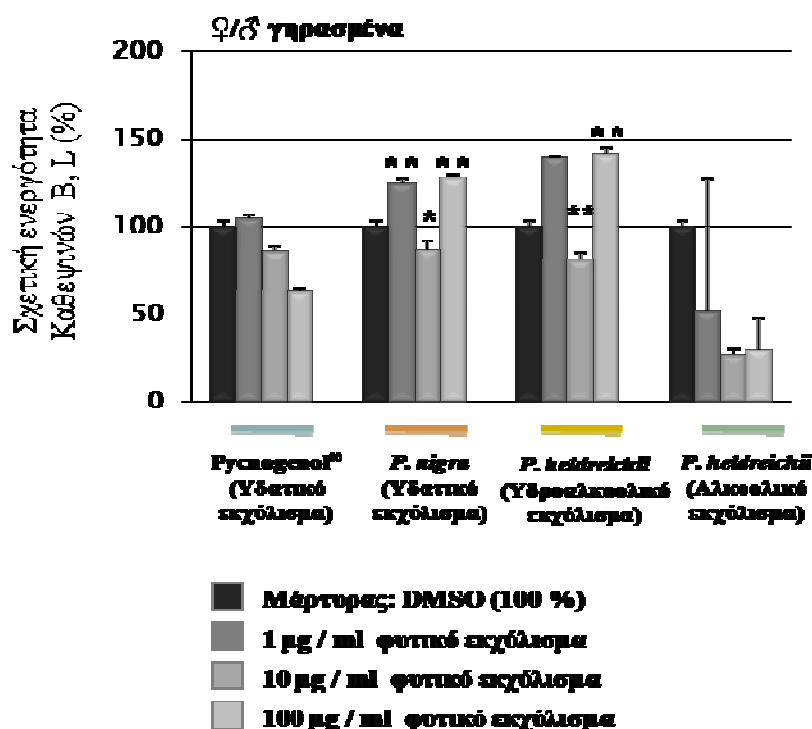
Η παρατεταμένη έκθεση ηλικιωμένων εντόμων σε τροφή πλούσια στα υπό μελέτη φυτικά εκχυλίσματα προκαλεί σημαντική *in vivo* μείωση των δυο κύριων πρωτεασομικών ενεργοτήτων. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση SD, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές από τα δείγματα μάρτυρες [νεαρά έντομα που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO (100 %)], όπου $\pm$ SD *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος, παρατηρήθηκε μείωση και των δυο ενεργιοτήτων του πρωτεασώματος στους σωματικούς ιστούς εντόμων ηλικίας 46-48 ημερών, που καλλιεργήθηκαν παρουσία των ενυδατικών εκχυλισμάτων των *P. pinaster* και *P. nigra*, του υδροαλκοολικού αλλά και του αλκοολικού εκχυλίσματος του *P. heldreichii* σε σχέση με τα δείγματα-μάρτυρες.

Δ.1.6 *In vivo* μελέτη της επίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων στην ενεργότητα των καθεψινών B και L του λυσοσώματος σε ηλικιωμένα έντομα

Έπειτα από τα αποτελέσματα της μειωμένης ενεργότητας του πρωτεασώματος κυρίως σε ηλικιωμένα έντομα παρουσία των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων, εξετάστηκε η ενεργότητα των καθεψινών B και L του λυσοσώματος σε σωματικούς ιστούς ηλικιωμένων εντόμων (ηλικίας 49 ημερών), μετά από έκθεση τους στα συγκεκριμένα εκχυλίσματα.

Παρατηρήθηκε ότι η λήψη τροφής, πλούσια σε υδροαλκοολικό εκχύλισμα του *P. heldreichii* καθώς και σε υδατικό εκχύλισμα του *P. nigra* σε συγκεντρώσεις 1 μg / ml και 100 μg / ml, αυξάνει την ενεργότητα των καθεψινών B και L σε σχέση με τα έντομα – μάρτυρες, (Διάγραμμα 10.B). Αντίθετα, τα έντομα που καλλιεργήθηκαν παρουσία του αλκοολικού εκχυλίσματος του *P. heldreichii* εμφάνισαν σημαντική μείωση της ενεργότητας των καθεψινών B και L.



Διάγραμμα 10: Μέτρηση της ενεργότητας των καθεψινών B και L σε ηλικιωμένα έντομα

Η παρατεταμένη έκθεση ηλικιωμένων εντόμων σε τροφή πλούσια σε υδροαλκοολικό εκχύλισμα του *P. heldreichii* καθώς και σε υδατικό εκχύλισμα του *P. nigra* προκαλεί σημαντική *in vivo* αύξηση της ενεργότητας των καθεψινών B και L σε σχέση με τα έντομα – μάρτυρες. Στα

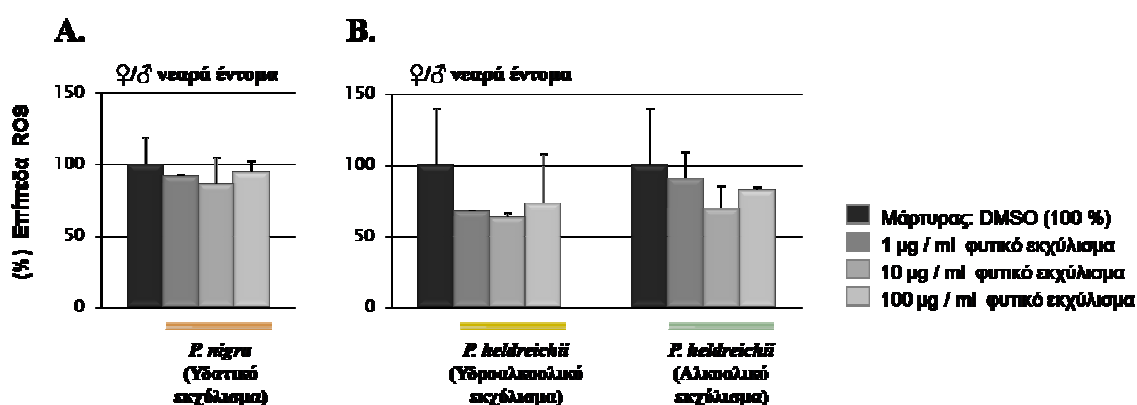
διαγράμματα η τυπική απόκλιση SD, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές από τα δείγματα μάρτυρες [νεαρά έντομα που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO (100 %)], όπου $\pm$ SD *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Δ.1.7 Μελέτη των επιπέδων του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS), έπειτα από έκθεση στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα

Η μελέτη των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) πραγματοποιήθηκε, αρχικά, σε έντομα νεαρής ηλικίας 14 - 16 ημερών, που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο για τα χρονικά διαστήματα 14 και 15 ημερών παρουσία των εξής εκχυλισμάτων:

- του υδατικού εκχυλίσματος του είδους *P. nigra*
- του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *P. heldreichii*
- του αλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *P. heldreichii*

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις, ενώ ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν έντομα που αναπτύχθηκαν παρουσία DMSO (100 %) για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα των 14 και 15 ημερών, (Διάγραμμα 11).

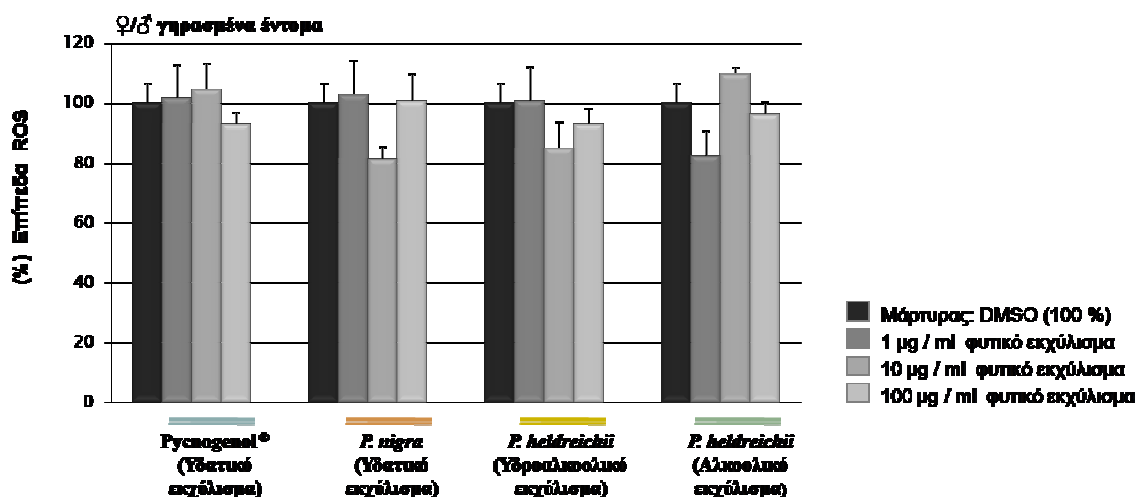


Διάγραμμα 11: Μέτρηση των επιπέδων ROS σε νεαρά έντομα

Έκθεση νεαρών εντόμων, στα παραπάνω εκχυλίσματα σε όλες τις συγκεντρώσεις, προκαλεί ήπια μείωση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου σε όλους τους σωματικούς ιστούς σε σχέση με τα έντομα – μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας. Σχετικά επίπεδα (%) ROS σε σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων μετά από παραμονή τους σε όλες τις συγκεντρώσεις του υδατικού εκχυλίσματος του *P. nigra* για 14 ημέρες (Α) καθώς και σε όλες τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων του *P. heldreichii* (υδροαλκοολικό και αλκοολικό) για 15 ημέρες (Β) σε σχέση με έντομα-μάρτυρες των αντίστοιχων ημερών παραμονής.

Με βάση τα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος, όσο αφορά τη μέτρηση των επιπέδων των ROS παρουσία των τριών εξεταζόμενων εκχυλισμάτων, παρατηρήθηκε τάση για μείωση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου στους σωματικούς ιστούς των νεαρών εντόμων σε σχέση με τα έντομα – μάρτυρες.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η παρατεταμένη έκθεση των εκχυλισμάτων στα επίπεδα ROS ηλικιωμένων εντόμων (47 – 50 ημερών). Πρέπει να σημειωθεί πως στο παρόν πείραμα ελέγχθηκε και το υδατικό εκχύλισμα του *P. pinaster* (Pycnogenol®), το οποίο χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας καθώς είναι γνωστή η αντιοξειδωτική του δράση (βλέπε A.7.1.9.1) (Διάγραμμα 12).



Διάγραμμα 12: Μέτρηση των επιπέδων ROS σε ηλικιωμένα έντομα

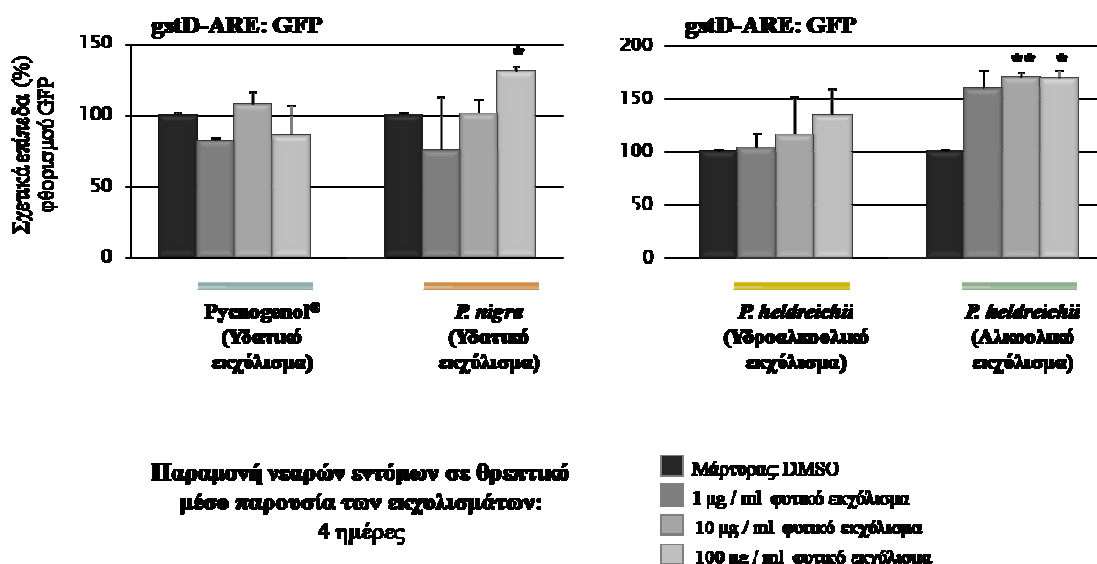
Η παρατεταμένη έκθεση των φυτικών εκχυλισμάτων δεν προκαλεί σημαντική μεταβολή του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου στους σωματικούς ιστούς των εντόμων που καλλιεργήθηκαν παρουσία των εκχυλισμάτων (για 47 ημέρες) σε σχέση με τα έντομα – μάρτυρες. Σχετικά επίπεδα (%) ROS σε σωματικούς ιστούς ηλικιωμένων εντόμων μετά από παραμονή τους σε όλες τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις των φυτικών εκχυλισμάτων για 47 ημέρες.

Ομοίως, και στα ηλικιωμένα έντομα, που καλλιεργήθηκαν παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων για 47 ημέρες, παρατηρήθηκαν σχετικά σταθερά τα επίπεδα του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου στους σωματικούς ιστούς των εντόμων που καλλιεργήθηκαν παρουσία των εκχυλισμάτων (για 47 ημέρες) σε σχέση με τα έντομα – μάρτυρες, όπως φαίνεται και από το παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 12).

Δ.1.8 Μέτρηση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) σε διαγονιδιακά στελέχη *Drosophila melanogaster*, έπειτα από έκθεση στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα

Στη συνέχεια ελέγχθηκε αν τα ωφέλιμα αποτελέσματα της μακροβιότητας (τόσο υπό φυσιολογικές όσο και υπό στρες συνθήκες) των φυτικών εκχυλισμάτων σχετίζονται με την επίδραση τους στις κυτταρικές αντιοξειδωτικές αποκρίσεις. Προκειμένου να εξεταστεί το παραπάνω ερώτημα, νεαρά διαγονιδιακά έντομα τα οποία φέρουν το γονίδιο της πρωτεΐνης GFP υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή (συγκεκριμένα του υποκινητή του γονιδίου *gstDI*) που φέρει λειτουργικό στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (Antioxidant Response Element; ARE) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε διάφορες συγκεντρώσεις των φυτικών εκχυλισμάτων.

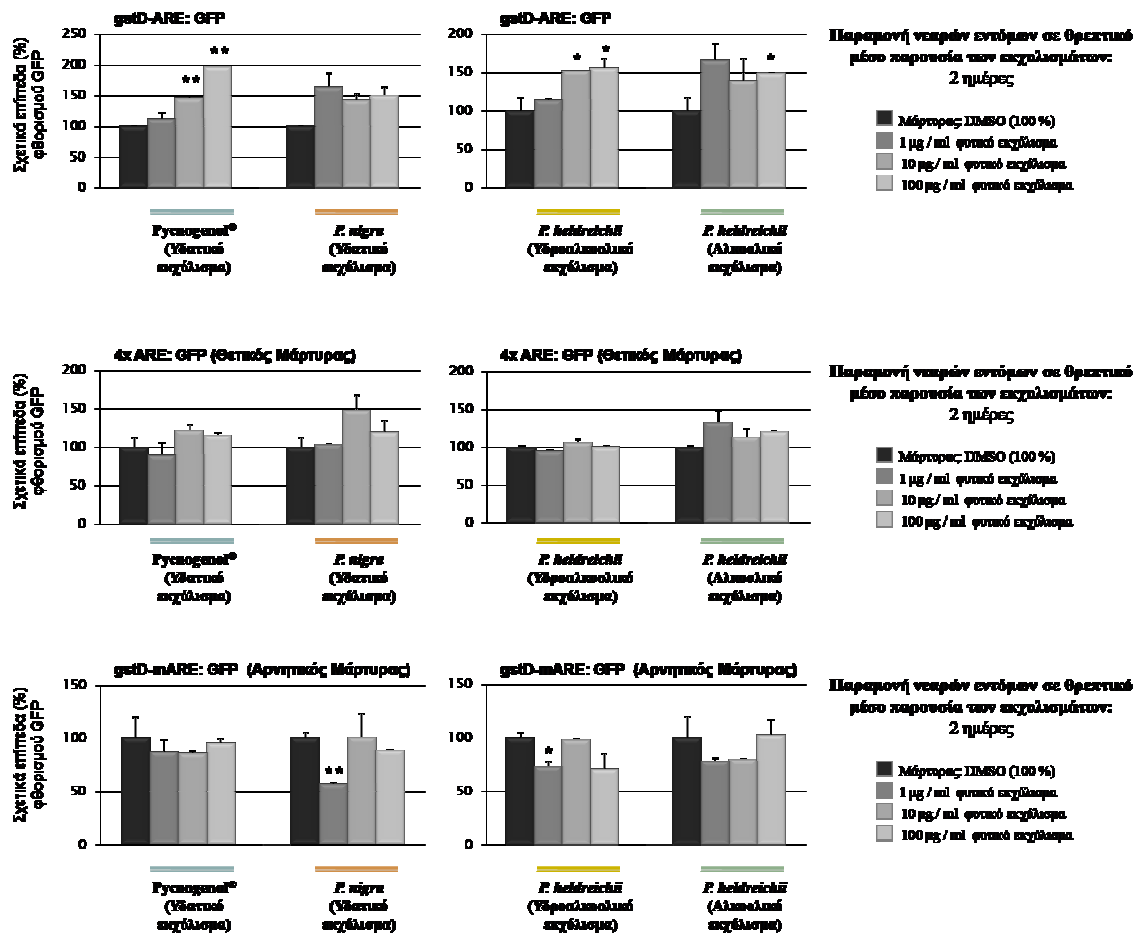
Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και διαγονιδιακά έντομα που φέρουν τέσσερα συνθετικά λειτουργικά AREs ή ένα μεταλλαγμένο ARE ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, αντίστοιχα (Sykiotis & Bohmann, 2008). Να σημειωθεί ότι τα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης ενεργοποιούνται από μεταγραφικούς παράγοντες (όπως ο Nrf2 – το ομόλογο στη *Drosophila* είναι ο CncC, μέσω του μονοπατιού αντιοξειδωτικής απόκρισης Nrf2/Keap1) παρουσία κυρίως οξειδωτικού στρες και επάγουν την ενεργοποίηση της έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων (στη συγκεκριμένη περίπτωση και της πρωτεΐνης GFP).



Διάγραμμα 13: Μέτρηση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) σε διαγονιδιακά στελέχη *Drosophila melanogaster* παρουσία των φυτικών εκχυλίσμάτων για 4 ημέρες

Έκθεση νεαρών διαγονιδιακών εντόμων, στα φυτικά εκχυλίσματα προκαλεί ήπια ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης του κυττάρου. Σχετικά επίπεδα φθορισμού (%) της πρωτεΐνης GFP σε σωματικούς ιστούς, που υποδηλώνει την ενεργοποίηση των AREs σε νεαρά διαγονιδιακά έντομα *gstD-ARE:GFP*, μετά από παραμονή τους σε όλες τις συγκεντρώσεις των φυτικών εκχυλίσμάτων για χρονικό διάστημα 4 ημερών. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση SD, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές από τα δείγματα μάρτυρες [νεαρά έντομα που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO (100 %)], όπου $\pm$ SD *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Οι μελέτες έδειξαν ότι τα νεαρά διαγονιδιακά έντομα *gstD-ARE:GFP* εμφάνισαν ήπια δόσοεξαρτώμενη επαγωγή της αντιοξειδωτικής απόκρισης (έκφραση GFP), όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο παρουσία των εκχυλίσμάτων (με εξαίρεση την Pycnogenol®) για χρονικό διάστημα 4 ημερών, (Διάγραμμα 13). Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η επίδραση των φυτικών εκχυλίσμάτων στην αντιοξειδωτική απόκριση σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα χρησιμοποιώντας και τα τρία διαγονιδιακά στελέχη αναφοράς (*gstD-ARE:GFP*, *4XARE:GFP* και *gstD-mARE:GFP*) (Διάγραμμα 14).



Διάγραμμα 14: Μέτρηση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) σε διαγονιδιακά στελέχη *Drosophila melanogaster* παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων για 2 ημέρες

Σύντομη έκθεση νεαρών διαγονιδιακών εντόμων, στα φυτικά εκχυλίσματα σε όλες τις συγκεντρώσεις, προκαλεί ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης του κυττάρου. Σχετικά επίπεδα φθορισμού (%) της πρωτεΐνης GFP σε σωματικούς ιστούς από νεαρά διαγονιδιακά έντομα *gstD-ARE:GFP* (A), *4XARE:GFP* (B) και *gstD-mARE:GFP* (Γ), μετά από παραμονή τους σε όλες τις συγκεντρώσεις των φυτικών εκχυλισμάτων για χρονικό διάστημα 2 ημερών. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση SD, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές από τα δείγματα μάρτυρες [νεαρά έντομα που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO (100 %)], όπου $\pm$ SD *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Τα αποτελέσματα από τις παραπάνω μετρήσεις έδειξαν σημαντικά εντονότερη ενεργοποίηση του γονιδίου GFP (καθώς παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης GFP στα νεαρά διαγονιδιακά έντομα) στις δύο μέρες έκθεσης των φυτικών εκχυλισμάτων σε σύγκριση με τις τέσσερις μέρες έκθεσης, γεγονός που υποδεικνύει και αυξημένη επαγωγή της αντιοξειδωτικής απόκρισης μέσω AREs (Διάγραμμα 14).

Δ.1.9 Μέτρηση της έκφρασης υπομονάδων των 20S και 19S συμπλόκων του πρωτεασώματος καθώς και ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών, έπειτα από έκθεση στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα

Μετά τη διεκπεραίωση των πειραμάτων μέτρησης της πρωτεασωμικής ενζυμικής ενεργότητας και του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου, μελετήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων καθώς και των κυτταρικών επιπέδων ουβικιτινωμένων και καρβονυλιωμένων (οξειδωμένων) πρωτεϊνών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το πρωτεάσωμα αποικοδομεί μη λειτουργικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες με μικρό χρόνο ζωής, οι οποίες έχουν σημανθεί με μόρια ουβικιτίνης αλλά αποικοδομεί και οξειδωμένες πρωτεΐνες. Ωστόσο, πιθανή δυσλειτουργία του πρωτεασώματος προκαλεί σοβαρές επιπτώσεις στα κύτταρα λόγω της συσσώρευσης των ουβικιτινωμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών.

Τα αποτελέσματα, που παρατίθενται, αφορούν σε σωματικούς ιστούς νεαρών και ηλικιωμένων εντόμων, που καλλιιεργήθηκαν στις ίδιες συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων, που μελετήθηκαν και για τα προηγούμενα πειράματα. Η έκφραση των υπομονάδων του πρωτεασώματος μελετήθηκε στα νεαρά και ηλικιωμένα έντομα για τα χρονικά διαστήματα 7 ημερών και 44 ημερών, αντίστοιχα.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση:

- ❖ των **B5** και **20S-α** υπομονάδων του 20S καταλυτικού κέντρου,
- ❖ των **p42A**, **Rpn10** και **Rpn6** υπομονάδων, που εντοπίζονται στο «καπάκι» του 19S ρυθμιστικού συμπλόκου και
- ❖ της πρωτεΐνης αναφοράς **GAPDH** προκειμένου να επιβεβαιωθεί το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων.

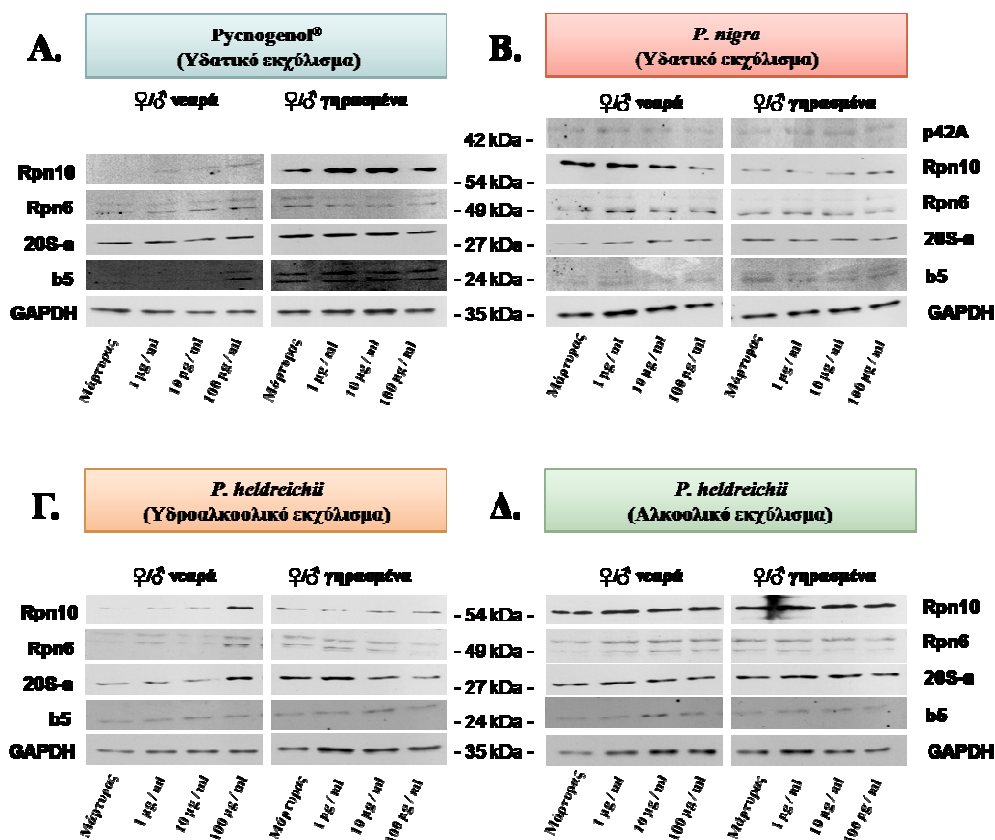
Τα ευρήματα μας έδειξαν ότι οι σωματικοί ιστοί ηλικιωμένων εντόμων παρουσία του υδατικού εκχυλίσματος του *P. pinaster* εμφάνισαν εντονότερη επαγωγή της έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων Rpn10, 20S-α και b5 σε σύγκριση με τους σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν στις ίδιες συγκεντρώσεις (**Εικόνα 67.A**).

Από την άλλη πλευρά, σημειώθηκε ότι όταν ηλικιωμένα έντομα εκτέθηκαν σε υδατικό εκχύλισμα του *P. nigra* δεν παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων Rpn10 και Rpn6. Αντίθετα, νεαρά έντομα που εκτέθηκαν στις ίδιες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος εμφάνισαν σχετική αύξηση των αντίστοιχων πρωτεασωμικών υπομονάδων. Σχετικά σταθερά παρέμειναν τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων p42A, 20S-α και b5 στους σωματικούς ιστούς τόσο των νεαρών όσο και των ηλικιωμένων εντόμων (**Εικόνα 67.B**).

Η παρατεταμένη λήψη του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *P. heldreichii* στη μέγιστη συγκέντρωση των 100 μg / ml εμφάνισε ήπια αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων Rpn10, Rpn6, 20S-α σε σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων, σε σύγκριση με την έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων των εντόμων – μαρτύρων (**Εικόνα 67.Γ**). Όσο αφορά τους σωματικούς ιστούς ηλικιωμένων εντόμων, παρατηρήθηκαν σχετικά σταθερά τα επίπεδα έκφρασης των εξεταζόμενων πρωτεασωμικών υπομονάδων.

Με βάση τα δεδομένα από τη μελέτη σε μοριακό επίπεδο των επιπτώσεων του αλκοολικού εκχυλίσματος του *P. heldreichii* στις διάφορες συγκεντρώσεις, όσο αφορά στην έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων, νεαρών και ηλικιωμένων εντόμων, παρατηρήθηκαν σχετικά σταθερά τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων: Rpn10, Rpn6, 20S-α και b5 σε σύγκριση με την

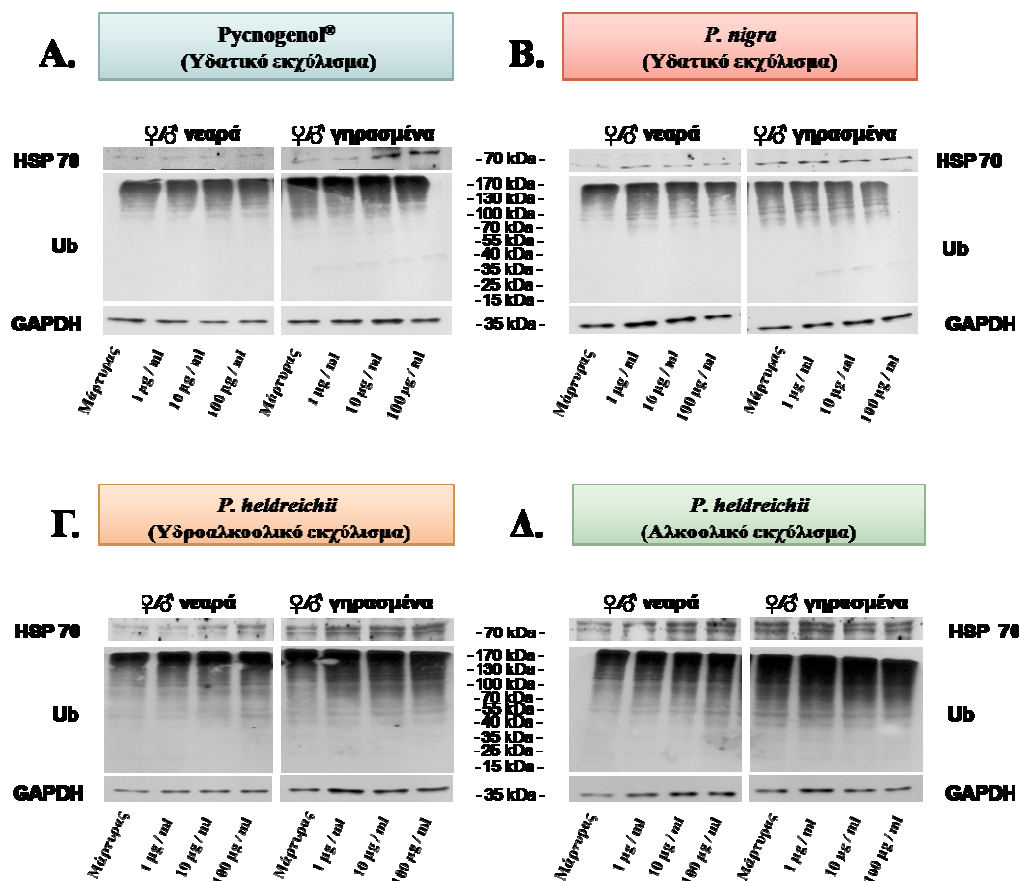
έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων των εντόμων – μαρτύρων, που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO (100 %) (Εικόνα 67.Α).



Εικόνα 60: Έκφραση των υπομονάδων των 20s και 19s συμπλόκων του πρωτεασώματος σε νεαρά και ηλικιωμένα έντομα *Drosophila melanogaster* – (Ανοσοστύπωμα Western)

Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα για συγκριτική ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης σε σωματικούς ιστούς νεαρών (4 ♀ & 4 ♂) και ηλικιωμένων εντόμων (4 ♀ & 4 ♂) που εκτέθηκαν για 7 ημέρες και 44 ημέρες, αντίστοιχα, στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων, έναντι των πρωτεϊνών Rpn10, Rpn6, 20S-α και b5. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για τον έλεγχο του ισοφορτώματος.

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν τα ενδογενή επίπεδα των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών καθώς και η πρωτεϊνική έκφραση της μοριακής συνοδού HSP70 (Heat shock protein 70) (η οποία σχετίζεται κυρίως με πρωτεοτοξικό στρες), σε σωματικούς ιστούς εντόμων που καλλιεργήθηκαν παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων για 7 και 44 ημέρες. Τα επίπεδα των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών βρέθηκαν σχετικά σταθερά σε σύγκριση με τα έντομα μάρτυρες σε όλα τα εξεταζόμενα φυτικά εκχυλίσματα (Εικόνα 68. Α-Δ). Παρόμοια πρωτεϊνική έκφραση με το πρότυπο των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών εμφάνισε και η HSP70, με εξαίρεση το φυτικό υδατικό εκχύλισμα *P. pinaster* (Εικόνα 68. Α) στα γηρασμένα έντομα, όπου στις μεγάλες συγκεντρώσεις διαπιστώθηκε η αύξηση της έκφρασης της μοριακής συνοδού αυτής.



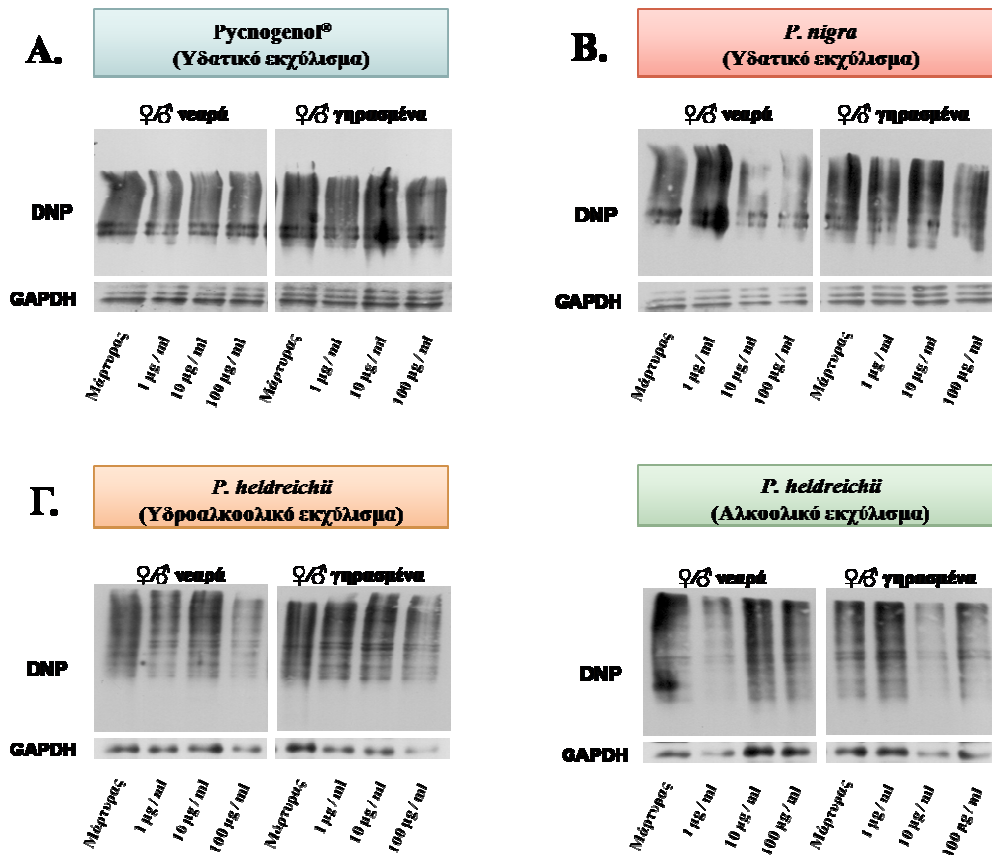
Εικόνα 61: Έκφραση των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών σε νεαρά και ηλικιωμένα έντομα *Drosophila melanogaster* παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων - (Ανοσοστύπωμα Western)

Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών και της μοριακής συνοδού HSP70 σε σωματικούς ιστούς νεαρών και ηλικιωμένων εντόμων, που εκτέθηκαν στα εξεταζόμενα φυτικά εκχυλίσματα για 7 ημέρες και 44 ημέρες, αντίστοιχα. (Α-Δ) Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών τόσο στα νεαρά όσο και στα γηρασμένα έντομα παρουσία των εκχυλισμάτων. Παρόμοιο πρότυπο έκφρασης ακολούθησε και η HSP70, με εξαίρεση το υδατικό εκχύλισμα *P. pinaster* (Pycnogenol®) στα γηρασμένα έντομα, όπου στις μεγάλες συγκεντρώσεις διαπιστώθηκε η αύξηση της έκφρασης της μοριακής συνοδού. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για τον έλεγχο του ισοφορτώματος.

Δ.1.10 Ανίχνευση οξειδωμένων πρωτεϊνών, έπειτα από έκθεση των εντόμων στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα

Για να ανιχνευθούν τα επίπεδα των οξειδωμένων πρωτεϊνών σε έντομα που εκτέθηκαν παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων σε σύγκριση με τα έντομα – μάρτυρες, που καλλιεργήθηκαν παρουσία DMSO (100 %), πραγματοποιήθηκε ανοσοστύπωμα Oxyblot. Μελετήθηκαν νεαρά έντομα που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο παρουσία των εκχυλισμάτων για 7 ημέρες αλλά και ηλικιωμένα έντομα που εκτέθηκαν στα αντίστοιχα εκχυλίσματα για 44 ημέρες.

Σύμφωνα με τα ευρήματα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των οξειδωμένων πρωτεϊνών στα ηλικιωμένα έντομα τα οποία εκτέθηκαν στα εκχυλίσματα (**Εικόνα 69**). Όμως, με ενδιαφέρον παρατηρήσαμε την ήπια μείωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών στους σωματικούς ιστούς των νεαρών εντόμων που καλλιεργήθηκαν παρουσία του υδροαλκοολικού και του αλκοολικού εκχυλίσματος που προέρχεται από ξύλο του είδους *P. heldreichii* στη συγκέντρωση 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (**Εικόνα 69. Γ, Δ**), καθώς και παρουσία του υδατικού εκχυλίσματος του *P. nigra* σε συγκεντρώσεις των 10 και 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Το εύρημα των εκχυλισμάτων του είδους *P. heldreichii* (υδροαλκοολικό) και του *P. nigra* (υδατικό) συμφωνεί και με τη παρατηρηθείσα βελτίωση του προσδόκιμου ζωής των εντόμων που καλλιεργήθηκαν παρουσία οξειδωτικού στρες και των εκχυλισμάτων αυτών στην ίδια συγκέντρωση που παρατηρούμε τη μείωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών (**Διάγραμμα 4. Α, Β**).



Εικόνα 62: Μελέτη των οξειδωμένων πρωτεϊνών σε νεαρά και ηλικιωμένα έντομα *Drosophila melanogaster* – Ανοσοστύπωμα Oxyblot

Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα των οξειδωμένων πρωτεϊνών από σωματικούς ιστούς νεαρών και ηλικιωμένων εντόμων, που εκτέθηκαν στα εξεταζόμενα φυτικά εκχυλίσματα για 7 ημέρες και 44 ημέρες, αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των οξειδωμένων πρωτεϊνών στα ηλικιωμένα έντομα τα οποία εκτέθηκαν στα εκχυλίσματα (Α-Γ). Όμως, με ενδιαφέρον παρατηρήσαμε την ήπια μείωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών στους σωματικούς ιστούς των νεαρών εντόμων που καλλιεργήθηκαν παρουσία του υδατικού εκχυλίσματος του *P. nigra* (Β) σε συγκεντρώσεις των 10 και 100 μg/ml καθώς και παρουσία του υδροαλκοολικού και του αλκοολικού εκχυλίσματος που προέρχεται από το ξύλο του είδους *P. heldreichii* στη συγκέντρωση 1 μg/ml (Γ, Δ). Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για τον έλεγχο του ισοφορτώματος.

Δ.1.11 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, έπειτα από έκθεση στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα

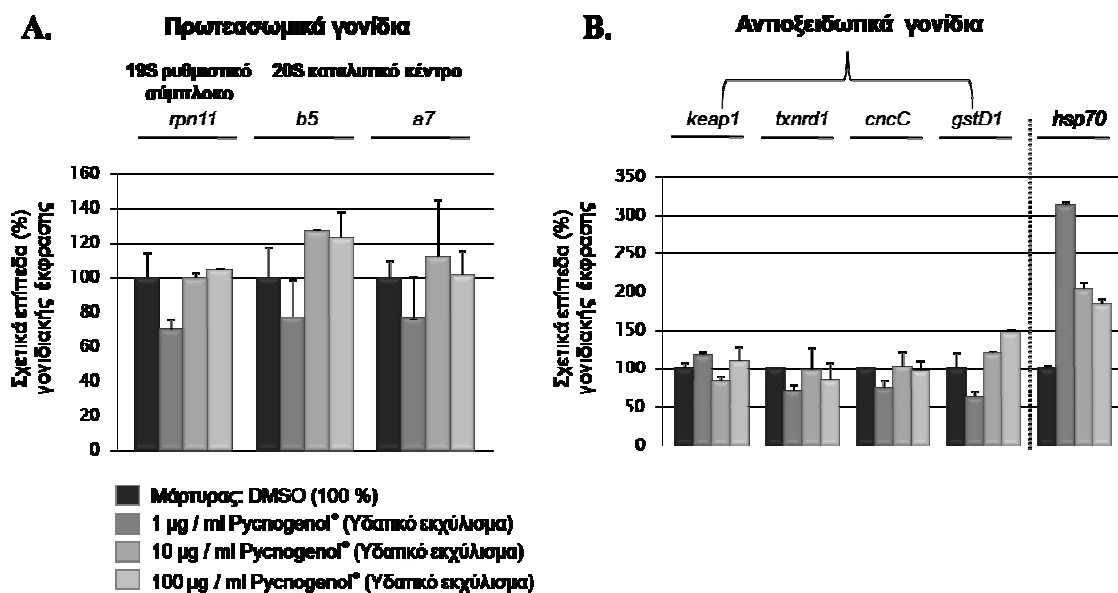
Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι σηματοδότησης Nrf2-CncC/Keap1, της μοριακής συνοδού HSP70 και των πρωτεασωμικών γονιδίων σε σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων που καλλιεργήθηκαν για δύο ημέρες σε θρεπτικό μέσο που περιείχε διάφορες συγκεντρώσεις των φυτικών εκχυλισμάτων.

Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *cap'n'collar isoform C* (CncC), που είναι ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας για την ενεργοποίηση της κυτταρικής αντιοξειδωτικής απόκρισης και που προσδένεται στα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (AREs) και ενεργοποιεί την έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Επίσης, εξετάστηκε η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Keap1 που συμμετέχει στο μονοπάτι Nrf2-CncC/Keap1 καθώς αναστέλλει τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα CncC, αλλά και η έκφραση των γονιδίων στόχων του CncC (γονίδια αντιοξειδωτικής απόκρισης), και συγκεκριμένα τα γονίδια *txnrd1* και *gstD1*. Παράλληλα, μελετήθηκε και η έκφραση του γονιδίου *hsp70* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HSP70, η οποία κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό του κυττάρου για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών και βοηθά στην προστασία των κυττάρων από το στρες, (Tavaria et al., 1996; Morano, 2007). Επομένως, αποτελεί ένα καλό δείκτη πρωτεοτοξικού στρες του κυττάρου. Τέλος, ελέγχθηκε η έκφραση των πρωτεασωμικών γονιδίων, τόσο αυτών που αφορούν στο 20S καταλυτικό κέντρο όπως τα γονίδια *b5* και *α7*, όσο και του γονιδίου *rpn11* του 19S ρυθμιστικού συμπλόκου.

Δ.1.11.1 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, έπειτα από έκθεση των εντόμων σε υδατικό εκχύλισμα από φλοιό του είδους *P. pinaster*

Όσον αφορά στην έκφραση των πρωτεασωμικών γονιδίων, τόσο του γονιδίου *α7* που αφορά στο 20S καταλυτικό κέντρο, όσο και του γονιδίου *rpn11* του 19S ρυθμιστικού συμπλόκου, παρατηρήθηκαν σχετικά σταθερά τα επίπεδα έκφρασης τους. Όμως, σημειώθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *b5* στις συγκεντρώσεις των 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ και των 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ του υδατικού εκχυλίσματος του *P. pinaster* (Διάγραμμα 15.A).

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 15.B, δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων του μονοπατιού αντιοξειδωτικής απόκρισης Nrf2-CncC/Keap1. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2-CncC στο σωματικό ιστό των νεαρών εντόμων με ταυτόχρονη ελαφριά αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *keap1* (που αναστέλλει τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα CncC). Όσο αφορά το γονίδιο *txnrd1*, που αποτελεί μεταγραφικό στόχο του Nrf2-CncC, καταγράφηκαν μειωμένα τα επίπεδα έκφρασης του, σε αντίθεση με το άλλο γονίδιο στόχο *gstD1*, όπου σημειώθηκε αύξηση στις συγκεντρώσεις των 10 και 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Τέλος, παρατηρήθηκε έντονη αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *hsp70* (δείκτης στρες) σε όλες τις συγκεντρώσεις, με ενδεικτική τη μικρότερη συγκέντρωση (1 $\mu\text{g} / \text{ml}$).



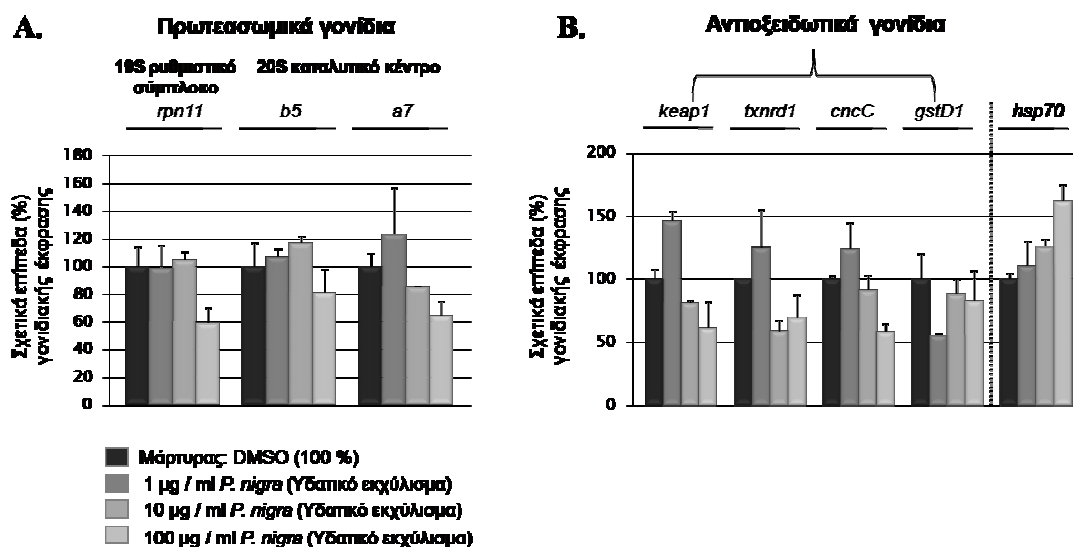
Διάγραμμα 15: Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, έπειτα από διατροφική παρέμβαση με υδατικό εκχύλισμα από φλοιό του είδους *P. pinaster* (Pycnogenol®)

Έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης, ύστερα από έκθεση των εντόμων σε υδατικό εκχύλισμα από φλοιό του είδους *P. pinaster* (Pycnogenol®). (A). Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεασωματικών γονιδίων παραμένουν σχετικά σταθερά, ενώ αύξηση παρουσίασε το γονίδιο της *β5* πρωτεασωματικής υπομονάδας στη συγκέντρωση των 10 µg / ml. (B). Δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων του μονοπατιού αντιοξειδωτικής απόκρισης Nrf2-CncC/Keap1, τόσο του μεταγραφικού παράγοντα CncC όσο και της πρωτεΐνης Keap1. Ωστόσο, εντοπίστηκε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *gstD1* σε συγκέντρωση των 100 µg / ml. Τέλος, σημειώθηκε έντονη ισχυρή έκφραση του γονιδίου *hsp70* (δείκτης στρες) σε όλες τις συγκεντρώσεις, με ενδεικτική τη μικρότερη συγκέντρωση.

Δ.1.11.2 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, έπειτα από έκθεση των εντόμων σε υδατικό εκχύλισμα από φλοιό του είδους *P. nigra*

Η έκφραση των πρωτεασωματικών γονιδίων βρέθηκε να είναι σταθερή ακόμα και μειωμένη καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του υδατικού εκχυλίσματος *P. nigra* (Διάγραμμα 16.A).

Σχετικά με το μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης Nrf2/Keap1, σημειώθηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης τόσο του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2-CncC όσο και του γονιδίου της πρωτεΐνης Keap1 στους σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων, που καλλιεργήθηκαν σε συγκέντρωση 1 µg / ml του συγκεκριμένου εκχυλίσματος. Παράλληλα, και τα δυο γονίδια, στις συγκεντρώσεις των 10 µg / ml και 100 µg / ml, ακολούθησαν παρόμοια πρότυπα μειωμένης έκφρασης. Όσο αφορά τα γονίδια αντιοξειδωτικής απόκρισης *txnrd1* και *gstD1* παρατηρήθηκε μειορρύθμιση της έκφρασης τους, με εξαίρεση στη συγκέντρωση 1 µg / ml, όπου εμφανίστηκαν αυξημένα τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *txnrd1*. Τέλος, παρατηρήθηκε δοσο-εξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *hsp70* (δείκτης στρες) (Διάγραμμα 16.B).



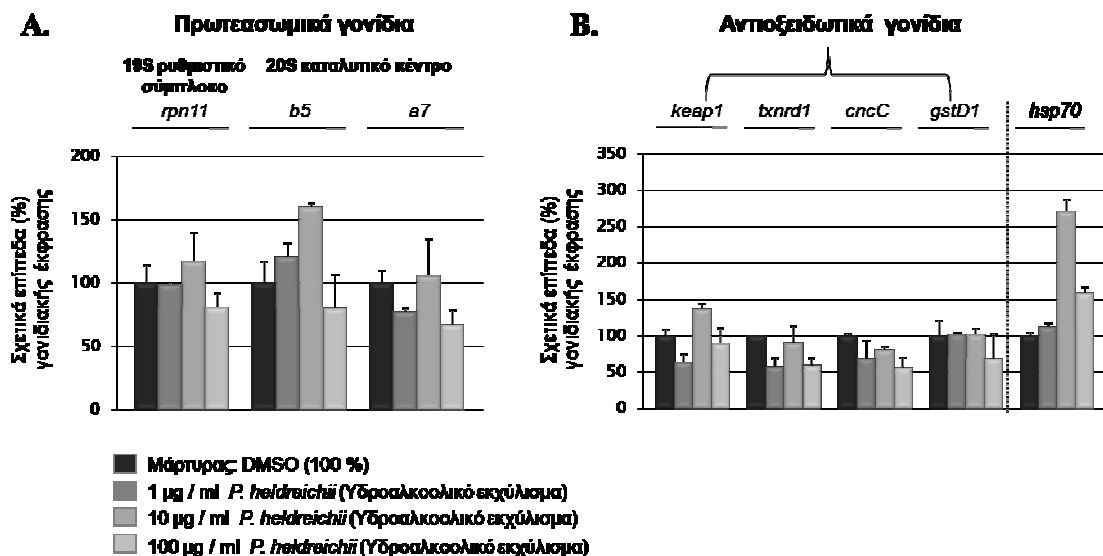
Διάγραμμα 16: Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, έπειτα από διατροφική παρέμβαση με υδατικό εκχύλισμα από φλοιό του είδους *P. nigra*

Έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης, ύστερα από έκθεση των εντόμων σε υδατικό εκχύλισμα από φλοιό του είδους *P. nigra*. (A). Τα επίπεδα έκφρασης των κύριων πρωτεασωμικών γονιδίων παραμένουν σχετικά σταθερά έως και μειωμένα. (B). Στη μικρότερη συγκέντρωση 1 µg / ml του υδατικού εκχυλίσματος σημειώθηκε έντονη αύξηση της έκφρασης των γονιδίων τόσο του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2-CncC, όσο και της πρωτεΐνης Keap1. Όσο αφορά τα γονίδια αντιοξειδωτικής απόκρισης *txnrd1* και *gstD1*, παρατηρήθηκαν μειωμένα τα επίπεδα έκφρασης τους, με μια μικρή όμως εξαίρεση στη συγκέντρωση 1 µg / ml, όπου εμφανίστηκαν αυξημένα τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *txnrd1*. Τέλος, σημειώθηκε δοσο-εξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *Hsp70* (δείκτης στρες).

Δ.1.11.3 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, έπειτα από έκθεση των εντόμων σε υδροαλκοολικό εκχύλισμα από ξύλο του είδους *P. heldreichii*

Μετά από ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης παρουσία του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος του *P. heldreichii*, παρατηρήθηκαν έντονα αυξημένα τα επίπεδα έκφρασης του πρωτεασωμικού γονιδίου *b5* στη συγκέντρωση των 10 µg / ml στους σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων, ενώ σε σταθερά επίπεδα έκφρασης παρέμειναν τα πρωτεασωμικά γονίδια *rpn11* και *a7* (Διάγραμμα 17.A).

Επίσης, σημειώθηκε μείωση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2-CncC, που συνοδεύτηκε με παράλληλη μείωση και των γονιδίων στόχων του, *txnrd1* και *gstD1* σε όλες τις συγκεντρώσεις, (Διάγραμμα 17.B). Επιπλέον, παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση των 10 µg / ml ήπια αύξηση της έκφρασης του αναστολέα του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2-CncC, δηλαδή της πρωτεΐνης Keap1. Τέλος, στην ίδια συγκέντρωση παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *hsp70* (δείκτης στρες).



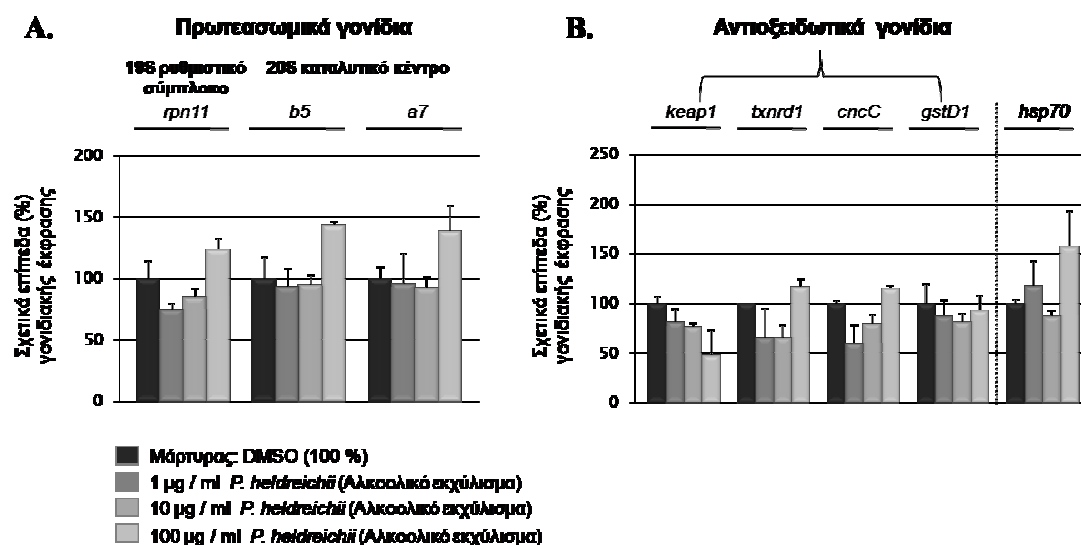
Διάγραμμα 17: Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, έπειτα από διατροφική παρέμβαση με υδροαλκοολικό εκχύλισμα από ξύλο του είδους *P. heldreichii*

Έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης, ύστερα από έκθεση των εντόμων σε υδροαλκοολικό εκχύλισμα από ξύλο του είδους *P. heldreichii*. (Α). Παρατηρήθηκαν αυξημένα τα επίπεδα έκφρασης του πρωτεασωματικού γονιδίου *b5* στη συγκέντρωση των 10 μg / ml. (Β). Σε όλες τις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος σημειώθηκε μείωση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα CncC, με ταυτόχρονη μείωση των γονιδίων της αντιοξειδωτικής απόκρισης *txnr1* και *gstD1*. Ενώ παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *keap1* σε συγκέντρωση των 10 μg / ml, καθώς και αυξημένα τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *hsp70* (δείκτης στρες).

Δ.1.11.4 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, έπειτα από έκθεση των εντόμων σε αλκοολικό εκχύλισμα από ξύλο του είδους *P. heldreichii*

Μετά από ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης παρουσία του αλκοολικού εκχυλίσματος του *P. heldreichii*, διαπιστώθηκε η αύξηση της έκφρασης των κύριων πρωτεασωματικών γονιδίων, και συγκεκριμένα των γονιδίων *b5* και *a7* που αφορούν το 20S καταλυτικό κέντρο αλλά και του γονιδίου *rpn11* του 19S ρυθμιστικού συμπλόκου, στους σωματικούς ιστούς των εντόμων που εκτέθηκαν παρουσία της μέγιστης συγκέντρωσης των 100 μg / ml του αλκοολικού εκχυλίσματος του *P. heldreichii* (Διάγραμμα 18.Α).

Σχετικά με το μονοπάτι σηματοδότησης Nrf2-CncC/Keap1, παρατηρήθηκαν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης κατά τη διατροφική παρέμβαση με το συγκεκριμένο εκχύλισμα. Όσο αφορά το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2-CncC, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του στη συγκέντρωση των 100 μg / ml, καθώς και αύξηση σημειώθηκε και στο γονίδιο αντιοξειδωτικής απόκρισης *txnr1*. Αντίθετα, οι εκφράσεις των γονιδίων *gstD1* και *keap1* παρατηρήθηκαν σε μειωμένα επίπεδα. Τέλος, το γονίδιο *hsp70* εμφάνισε αυξημένη έκφραση στη μέγιστη συγκέντρωση των 100 μg / ml (Διάγραμμα 18.Β).



Διάγραμμα 18: Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, έπειτα από διατροφική παρέμβαση με αλκοολικό εκχύλισμα από ξύλο του είδους *P. heldreichii*

Έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης, ύστερα από έκθεση των εντόμων σε αλκοολικό εκχύλισμα από ξύλο του είδους *P. heldreichii*. (A). Η έκφραση των πρωτεασωματικών γονιδίων, τόσο αυτών που αφορούν στο 20S καταλυτικό κέντρο, όσο και του γονιδίου *rpn11* του 19S ρυθμιστικού συμπλόκου παρουσίασε ήπια αύξηση. (B). Στη μέγιστη συγκέντρωση των 100 µg / ml του εκχυλίσματος σημειώθηκε ήπια αύξηση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα CncC, με ταυτόχρονη αύξηση και του γονιδίου της αντιοξειδωτικής απόκρισης *txnr1*, σε αντίθεση με τα γονίδια *gstD1* και *keap1* όπου καταγράφηκε μείωση. Τέλος, βρέθηκαν αυξημένα τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *hsp70* (δείκτης στρες).

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



Η γήρανση αποτελεί μια φυσιολογική, αναπόφευκτη διαδικασία σχεδόν για όλους τους οργανισμούς. Σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τη σταδιακή συσσώρευση βλαβών κατά τη διάρκεια της ζωής και συνοδεύεται μεταξύ των άλλων, από τη συγκέντρωση στα κύτταρα τροποποιημένων και δυσλειτουργικών πρωτεϊνών, που τελικά διαταράσσουν την ομοιοστασία του κυττάρου και οδηγούν στο θάνατο (Kirkwood, 2000; Rattan, 2005). Αρκετά μονοπάτια έχουν εμπλακεί στην εξέλιξη της γήρανσης όπως τα μεταβολικά μονοπάτια, το μονοπάτι των σιρτουϊνών (sirtuins), η μείωση του μήκους των τελομερών, τα σήματα από τη γαμετική σειρά, καθώς και μονοπάτια απόκρισης στο στρες που διατηρούν την ομοιόσταση και ρυθμίζουν το ποσοστό επιβίωσης των οργανισμών σε ένα μάλλον εχθρικό οξειδωτικό περιβάλλον (Kenyon, 2010; Alic & Partridge, 2011; Argyropoulou et al., 2013; Lopez-Otin et al., 2013).

Η εμφάνιση της γήρανσης μπορεί να επιβραδυνθεί με γενετικές είτε με φαρμακολογικές (συμπεριλαμβανομένων και των διατροφικών παρεμβάσεων) παρεμβάσεις. Οι διατροφικές παρεμβάσεις, όπως η περιορισμένη λήψη θερμίδων (CR) ή η ισορροπημένη υγιεινή διατροφή θεωρείται από τις πιο αποτελεσματικές προσεγγίσεις για την επέκταση της ποιότητας ζωής ή/και της μακροζωίας, που οφείλονται είτε σε παρατεταμένη ήπια ενεργοποίηση των οδών που ανταποκρίνονται στο στρες είτε στη μειωμένη σηματοδότηση των μονοπατιών ανίχνευσης των θρεπτικών συστατικών (όπως το μονοπάτι του υποδοχέα της ινσουλίνης) ή/και στα χαμηλά επίπεδα βλαβών στα βιομόρια. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι καταστολή της σηματοδότησης, τόσο με γενετικό όσο και με φαρμακολογικό τρόπο, των κύριων μεταβολικών μονοπατιών, που εμπλέκονται στη διαδικασία της γήρανσης και η ταυτόχρονη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα FOXO, οδήγησαν σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής σε μοντέλα οργανισμών όπως στο ζυμομύκητα, στη *D. melanogaster*, καθώς και στον μυ (Fontana et al., 2010; Partridge, 2010; Selman & Withers, 2011).

Η διατροφή είναι κεντρικής σημασίας στη διαμόρφωση της ποιότητας ζωής και της μακροζωίας και στην πραγματικότητα είναι η μόνη εφικτή εφαρμόσιμη "παρέμβαση" σε ανθρώπους. Επομένως, βρώσιμα φρούτα, μπαχαρικά, λαχανικά ή άλλα μέρη του φυτού (π.χ. ρίζες) αποτελούν την πρώτη επιλογή για την απομόνωση νέων φυσικών προϊόντων με αντιγηραντική ή/και αντιοξειδωτική δράση. Βακτήρια και θαλάσσιοι οργανισμοί, αν και δεν εμπλέκονται άμεσα στη διατροφή του ανθρώπου, αποτελούν, επίσης, σημαντικές πηγές στο επίπεδο των μεμονωμένων μορίων. Επομένως, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα από τα βρώσιμα μπαχαρικά, όσπρια, λαχανικά ή φρούτα, έχουν επιδείξει σημαντική δραστηριότητα αντιγήρανσης, όταν δοκιμάζονται σε μοντέλα οργανισμούς. Είναι ενδιαφέρον ότι η λεγόμενη μεσογειακή διατροφή, η οποία έχει καθιερωθεί από πολλές επιδημιολογικές μελέτες (Martinez-Gonzalez et al., 2009) ως διατροφικό πρότυπο, συνίσταται για την αύξηση του μέσου προσδόκιμου ζωής και της μακροζωίας και χαρακτηρίζεται από την υψηλή πρόσληψη ελαιόλαδου, φρέσκων φρούτων, όσπριων και λαχανικών και αντίστροφα από τη χαμηλή πρόσληψη ζωικού λίπους, κρέατος, μεταποιημένων προϊόντων με βάση το κρέας και τα αλμυρά τρόφιμα (Pérez-López et al., 2010; Bach-Faig et al., 2011), τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε πρόωρη κατάρρευση (ή απορρύθμιση) των αμυντικών μηχανισμών των κυττάρων ή/και να επιταχύνουν τα ποσοστά της βλάβης των βιομορίων.

Δεδομένων των παραπάνω, καθώς και ότι υπάρχει περιορισμένος αριθμός μελετών στην τρέχουσα βιβλιογραφία σχετικά με την αντιοξειδωτική (ή την αντιγηραντική) δράση των εκχυλισμάτων από το ξύλο και το φλοιό των ειδών *P.*

heldreichii και *P. nigra*, αντίστοιχα (Gülçin et al., 2003; Yen et al., 1993; Tanaka et al., 1998; Duh et al., 1999), στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκαν για πρώτη φορά οι *in vivo* επιπτώσεις των φυτικών εκχυλισμάτων από τα είδη *P. nigra* (υδατικό εκχύλισμα φλοιού) και *P. heldreichii* (υδροαλκοολικό και αλκοολικό εκχύλισμα ξύλου) στην ομοιοστασία του οργανισμού μοντέλο *D. melanogaster*. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι επιδράσεις της διατροφικής παρέμβασης των παραπάνω εκχυλισμάτων στη φυσιολογία και τη μακροβιότητα των εντόμων, στην ενεργότητα του πρωτεασώματος, στο μονοπάτι αυτοφαγίας – λυσοσώματος, καθώς και στο σηματοδοτικό μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης Nrf2/Keap1. Οι αναλύσεις μας πραγματοποιήθηκαν σε σύγκριση με το υδατικό εκχύλισμα από το φλοιό του είδους *P. pinaster* (Pycnogenol®), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, καθώς είναι ευρέως διαδεδομένη η αντιοξειδωτική του δράση (Gouchang et al., 1993; Blazso et al., 1994; Noda et al., 1997; Packer et al., 1999). Η αντιοξειδωτική δράση της Pycnogenol® αποδίδεται στην υψηλή περιεκτικότητα σε προκυανιδίνες (Grimm et al., 2004). Επιπλέον, οι πολυφαινόλες, που περιέχονται στην Pycnogenol®, βρέθηκαν να έχουν δραστηριότητα έναντι ROS και ριζών αζώτου. Οι Packer et al. (1999) αναφέρουν ότι η Pycnogenol® εμφανίζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική βιολογική δράση ως μίγμα, σε σχέση με καθαρά μόρια, υποδεικνύοντας ότι υπάρχει συνέργεια μεταξύ των συστατικών της.

Αρχικά, φάνηκε ότι τα έντομα είναι δεκτικά στα θρεπτικά μέσα που περιέχουν τα υπό μελέτη εκχυλίσματα καθώς δεν επηρεάζονται τα επίπεδα λήψης της τροφής τους. Επομένως, επιβεβαιώνεται ότι οι επιπτώσεις, που παρατηρήθηκαν παρακάτω στη βιωσιμότητα και στην κινητικότητα των εντόμων, στη ρύθμιση τόσο των κύριων πρωτεολυτικών επιδιορθωτικών συστημάτων (UPS, ALS), όσο και του μονοπατιού αντιοξειδωτικής απόκρισης Nrf2/Keap1, όπως επίσης και στην ανίχνευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών, οφείλονται στη δράση των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων και όχι στη μειωμένη λήψη θερμίδων, που όπως έχει ήδη αναφερθεί, φαίνεται να αυξάνει τη διάρκεια ζωής και να μειώνει το οξειδωτικό στρες (McCay et al., 1935; Lin et al., 2002; Tavernarakis & Driscoll, 2002; Partridge et al., 2005; Lee et al., 2006).

Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας, η δια βίου έκθεση των εντόμων σε **υδροαλκοολικό εκχύλισμα από ξύλο του είδους *P. heldreichii* (Agro 4)** στη μέγιστη συγκέντρωση των 100 µg / ml εμφάνισε **ήπια βελτίωση της ποιότητας ζωής (healthspan) και του προσδόκιμου ζωής (lifespan)** των εντόμων. Παρόμοια εικόνα εμφάνισαν και τα έντομα, έπειτα από διατροφική παρέμβαση με υδατικό εκχύλισμα από φλοιό του είδους *P. nigra* (Agro 3) στη μέγιστη συγκέντρωση. Επιπλέον, το υδροαλκοολικό εκχύλισμα από ξύλο του είδους *P. heldreichii* εμφάνισε προστασία παρουσία οξειδωτικού στρες. Η δράση αυτή του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος πιθανόν οφείλεται στην ήπια αύξηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης με αποτέλεσμα τη μείωση του οξειδωτικού φορτίου (μειωμένα επίπεδα ROS και οξειδωμένων πρωτεϊνών). Αξίζει να σημειωθεί ότι και το άλλο εκχύλισμα από το είδος *P. nigra*, που εμφάνισε ήπια αύξηση του προσδόκιμου ζωής των εντόμων, παρουσίασε ήπια ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης, που συνοδεύτηκε με τη δόσοεξαρτώμενη μείωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών στους σωματικούς ιστούς των νεαρών εντόμων, που καλλιιεργήθηκαν παρουσία του υδατικού αυτού εκχυλίσματος. Δεδομένων των παραπάνω ευρημάτων, καθώς και ότι έχει δειχθεί από άλλες μελέτες ότι οι οξειδωμένες πρωτεΐνες συσσωρεύονται κατά τη γήρανση (Beckman & Ames, 1998; Chondrogianni et al., 2003) και ενδεχομένως αναστέλλουν το πρωτεάσωμα προκαλώντας έτσι τη δυσλειτουργία του κυττάρου και την εμφάνιση χαρακτηριστικών που σχετίζονται με τη γήρανση (Reinheckel et al.,

1998; Nunomura et al., 2009; Butterfield et al., 2010; Xiao et al., 2010), είναι φανερό ότι η μείωση του οξειδωτικού στρες συνδέεται άμεσα με την επέκταση του προσδόκιμου ζωής.

Μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα παρατήρηση μας αφορά στην αυξημένη αναρριχητική ικανότητα (δείκτης της μυϊκής δύναμης) των ηλικιωμένων εντόμων παρουσία των υπό μελέτη εκχυλισμάτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, χορήγηση και των τριών φυτικών εκχυλισμάτων από τα είδη *P. nigra* (Agro 3) και *P. heldreichii* (Agro 4 και Agro 5), είχε ως αποτέλεσμα τα έντομα να εμφανίσουν αυξημένη κινητικότητα και άρα μειωμένη απώλεια του ρυθμού εκφυλισμού του μυϊκού ιστού σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα, δηλαδή το υδατικό εκχύλισμα από το φλοιό του *P. pinaster* (Pycnogenol®). Το εύρημα αυτό χρήζει ιδιαίτερης σημασίας σε συνδυασμό με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, που υποστηρίζουν, ότι η χορήγηση της Pycnogenol® σε αθλητές αύξησε την απόδοση της αντοχής και μείωσε τον αριθμό των γεγονότων σε ασθενείς με κράμπες και μυϊκούς πόνους, χωρίς να προκαλεί αρνητικές συνέπειες (Pavlovic, 1999; Vinciguerra et al., 2006; Bentley et al. 2012). Άλλη μελέτη, επίσης, έδειξε ότι η Pycnogenol® βελτίωσε το χρόνο στην κόπωση με την αύξηση των επιπέδων NAD⁺ στον ορό (Mach et al., 2010). Επομένως, τα ευρήματά μας από τον έλεγχο κινητικότητας των εντόμων σε συνδυασμό με την τρέχουσα βιβλιογραφία υποδηλώνουν πως τα τρία εξεταζόμενα εκχυλίσματα εμφανίζουν μειωμένη εμφάνιση των χαρακτηριστικών (όπως η απώλεια της μυϊκής δύναμης) που σχετίζονται με τη γήρανση σε έντομα *D. melanogaster* και πιο έντονη δράση σε σχέση με την Pycnogenol®.

Δεδομένων των ευρημάτων της παρούσας εργασίας σχετικά με τη ρύθμιση του πρωτεασώματος, διαπιστώθηκε ότι η δια βίου έκθεση τόσο νεαρών όσο και ηλικιωμένων εντόμων σε τροφή παρουσία των υπό μελέτη εκχυλισμάτων προκάλεσε ήπια *in vivo* αύξηση των πρωτεασωματικών ενεργοτήτων. Όμως, σημειώθηκε ήπια αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωματικών υπομονάδων Rpn10, Rpn6 και 20S-α σε σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων παρουσία του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος του *P. heldreichii* (Agro 4), ενώ από τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης προέκυψαν αυξημένα τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης της πρωτεασωματικής υπομονάδας b5. Η αύξηση της έκφρασης του πρωτεασώματος παρουσία του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος του *P. heldreichii*, όμως δεν οδήγησε σε αύξηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος. Ενδιαφέρον, επίσης, παρουσιάζει η αυξημένη *in vivo* ενεργότητα των καθεψινών του λυσοσώματος, που παρατηρήθηκε σε ηλικιωμένα έντομα που καλλιεργήθηκαν σε τροφή πλούσια σε υδροαλκοολικό εκχύλισμα του *P. heldreichii* (Agro 4) σε συνδυασμό με τη σημαντικώς μειωμένη πρωτεασωματική ενεργότητα που σημειώθηκε σε έντομα αντίστοιχης ηλικίας. Η μοριακή βάση της επίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων στο πρωτεάσωμα και στο σύστημα αυτοφαγίας-λυσοσώματος χρίζει περαιτέρω μελέτης.

Συνολικά, τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν την πιθανή αντιοξειδωτική και αντιγηραντική δράση του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος του *P. heldreichii* και του υδατικού εκχυλίσματος του *P. nigra*. Οι μελλοντικές αναλύσεις μας στοχεύουν στην περαιτέρω διερεύνηση και κατανόηση της μοριακής βάσης των παρατηρήσεων αυτών. Επίσης, θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί αν οι παρατηρούμενες βιολογικές επιδράσεις μπορεί να αποδοθούν στη συνέργεια διαφορετικών φυτοχημικών συστατικών ή επιτελούνται από ένα μόνο δραστικό συστατικό των φυτικών εκχυλισμάτων. Έτσι, αξίζει να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν τα συστατικά των συγκεκριμένων φυτικών εκχυλισμάτων και να εντοπιστεί το (ή τα) βιοδραστικό(ά) συστατικό(ά) με την πιθανή αντιοξειδωτική ή αντιγηραντική δράση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ:

Το υδροαλκοολικό εκχύλισμα από ξύλο του είδους *P. heldreichii* (Agro 4) και το υδατικό εκχύλισμα από φλοιό του είδους *P. nigra* (Agro 3) πιθανότατα διαθέτουν αντιοξειδωτικές ή/και αντιγηραντικές δράσεις.

Συνοπτικά τα ευρήματα της παρούσας ΜΔΕ:

❖ Τα προκαταρκτικά μας ευρήματα υποδεικνύουν ότι η παρατεταμένη έκθεση των εντόμων σε υδροαλκοολικό εκχύλισμα από το ξύλο του είδους *P. heldreichii* (Agro 4) και σε υδατικό εκχύλισμα από το φλοιό του *P. nigra* (Agro 3) προκαλεί ήπια βελτίωση της ποιότητας (healthspan) και του προσδόκιμου ζωής (lifespan) των εντόμων. Στην ίδια συγκέντρωση σημειώθηκε μειωμένη απώλεια του ηλικιο-εξαρτώμενου ρυθμού εκφυλισμού του μυϊκού ιστού και άρα διατήρηση της μυϊκής δύναμης.

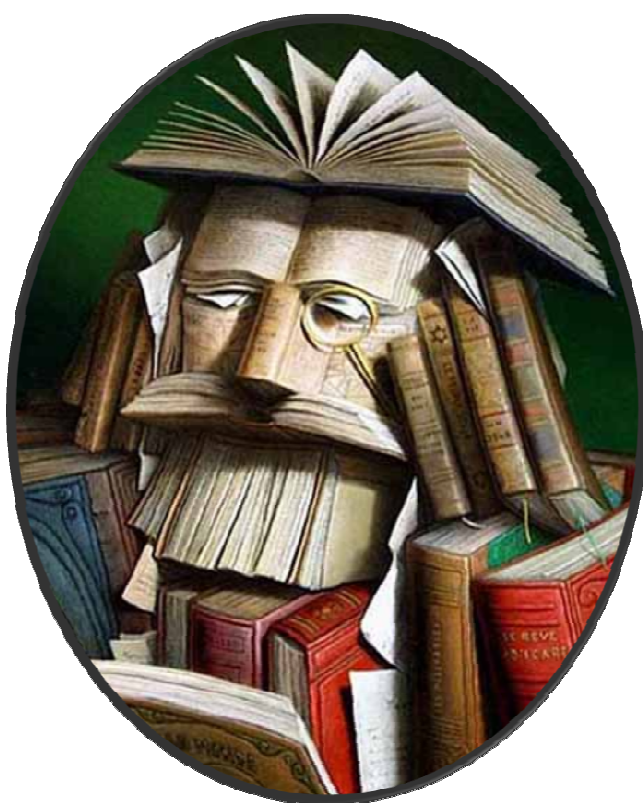
❖ Διαπιστώθηκε, επίσης, ότι το υδροαλκοολικό εκχύλισμα του είδους *P. heldreichii* (Agro 4) προστατεύει τα έντομα από το οξειδωτικό στρες.

❖ Επίσης, παρατηρήθηκε ήπια μείωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών στους σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων παρουσία του υδατικού εκχυλίσματος του *P. nigra* (Agro 3) αλλά και του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος του *P. heldreichii* (Agro 4).

❖ Τα αποτελέσματα, πιθανώς, σχετίζονται με κυτταρικές αντιοξειδωτικές αποκρίσεις, εφόσον σημειώθηκε αυξημένη επαγωγή της αντιοξειδωτικής απόκρισης μέσω των AREs με ταυτόχρονη μείωση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS).

❖ Τέλος, παρατηρήθηκε ήπια αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων Rpn10, Rpn6 και 20S-α σε σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν σε υδροαλκοολικό εκχύλισμα του *P. heldreichii* (Agro 4).

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



Abad Viñas R, Caudullo G, Oliveira S, de Rigo D. *Pinus pinaster* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg 2016; pp. e012d59+.

Ahn TH, Yang YS, Lee JC, et al. Ameliorative effects of Pycnogenol® on carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative damage in rats. *Phytother Res* 2007;21:1015–1019.

Alavez S, Vantipalli MC, Zucker DJ, Klang IM, Lithgow GJ. Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing and extend lifespan. *Nature* 2011 Apr 14;472(7342):226-9.

Alía R, Martín S, de Miguel J, et al. Las regiones de procedencia de *Pinus pinaster* Aiton. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid 1996.

Alía R, Martín S. EUFORGEN Technical guidelines for genetic conservation and use for maritime pine *Pinus pinaster*, 2002.

Alic N, Partridge L. Death and dessert: nutrient signalling pathways and ageing. *Curr Opin Cell Biol* 2011 Dec;23(6):738-43.

Altun D, Ayar A, Uysal H, Kara AA, Unal EL. Extended longevity of *Drosophila melanogaster* by water and ethanol extracts of *Stachys lavandulifolia*. *Pharm Biol* 2010 Nov;48(11):1291-6.

Andújar I, Recio MC, Giner RM, Ríos JL. Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:906252.

Araghi-niknam M, Hosseini S, Larson D, Rohdewald P, Watson RR. Pine bark extract reduces platelet aggregation. *Integrative Medicine* 1999;2:73–77.

Arendt CS, Hochstrasser M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94(14):7156–7161.

Argyropoulou A, Aligiannis N, Trougakos IP, Skaltsounis AL. Natural compounds with anti-ageing activity. *Nat Prod Rep* 2013 Oct 11;30(11):1412-37.

Ari S, Kargioğlu M, Temel M, Konuk M. Traditional Tar Production from the Anatolian Black Pine [*Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe var. *pallasiana*] and its usages in Afyonkarahisar, Central Western Turkey. *J Ethnobiol Ethnomed* 2014;27:10:29.

Bach-Faig A, Berry EM, Lairon D, et al. Mediterranean Diet Foundation Expert Group. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr* 2011 Dec;14(12A):2274-84.

Bahadorani S, Hilliker AJ. Cocoa confers life span extension in *Drosophila melanogaster*. *Nutr Res* 2008 Jun;28(6):377-82.

Balbás P, Bolívar F. Back to basics: pBR322 and protein expression systems in *E.coli*. *Methods Mol Biol* 2004;267:77–90.

Balbás P, Soberón X, Merino E, Zurita M, Lomeli H, Valle F, et al. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives--a review. *Gene* 1986;50:3–40.

Bandhyopadhyay U, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in aging and neurodegeneration: Lessons from α -synuclein. *Experimental Gerontology* 2007;42(1-2):120–128.

Barja G. Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol Rev Camb Philos Soc* 2004 May;79(2):235-51.

Barredo JI, Strona G, de Rigo D, Caudullo G, Stancanelli G, San-Miguel-Ayanz J. Assessing the potential distribution of insect pests: case studies on large pine weevil (*Hylobius abietis* L) and horse-chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella*) under present and future climate conditions in European forests. *EPPO Bulletin* 2015;45:273.

Bauer JH, Goupil S, Garber GB, Helfand SL. An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Aug 31;101(35):12980-5.

Bayeta E, Lau BHS. Pycnogenol[®] inhibits generation of inflammatory mediators in macrophages. *Nutr Res* 2001;20:249–259.

Baytop T. *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present)*, 1st ed. Istanbul University, Istanbul 2001;pp. 178–249.

Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998 Apr;78(2):547-81.

Belcaro G, Cesarone MR, Errichi BM, et al. Diabetic ulcers: microcirculatory improvement and faster healing with Pycnogenol[®]. *Clin Appl Thromb Hemost* 2006 Jul;12(3):318-23.

Belcaro G, Cesarone MR, Errichi BM, Ledda A, Di Renzo A, Stuard S, et al. Venous Ulcers: microcirculatory improvement and faster healing with local use of Pycnogenol[®] *Angiology* 2005;56:1–7.

Belcaro G, Cesarone MR, Errichi BM, Ledda A, Di Renzo A, Stuard S, et al. Diabetic Ulcers: Microcirculatory Improvement and Faster Healing with Pycnogenol[®]. *Clin Appl Thrombosis/ Hemostasis* 2006;12:1–6.

Belcaro G, Cesarone MR, Errichi S, Zulli C, Errichi BM, Vinciguerra G, et al. Treatment of osteoarthritis with Pycnogenol[®]. The SVOS (San Valentino Osteo-Arthrosis Study). Evaluation of Signs, Symptoms, Physical Performance and Vascular Aspects. *Phytother Res* 2007;22:518–523.

Belcaro G, Cesarone MR, Ricci A, Cornelli U, Rodhewald P, Ledda A, et al. Control of edema in hypertensive subjects treated with calcium antagonist (Nifedipine) or angiotensin-converting enzyme inhibitors with Pycnogenol[®]. *Clin and Appl Thrombosis/Hemostasis* 2006;12:440–444.

Bellion P, Digles K, Wil F, et al. Polyphenolic apple extracts: effects of raw material and production method on antioxidant effectiveness and reduction of DNA damage in Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 2010;58:6636–6642.

Belote JM, Zhong L. Duplicated proteasome subunit genes in *Drosophila* and their roles in spermatogenesis. *Heredity* 2009; Jul;103(1):23-31.

Bentley DJ, Dank S, Coupland R, Midgley A, Spence I. Acute antioxidant supplementation improves endurance performance in trained athletes. *Research in Sports Medicine* 2012;20:1–12.

Berendes J (1902). *Des Pedanios Dioskurides aus Anazarbos Arzneimittellehre*, Stuttgart, reprint Dr. Martin Sandig, Wiesbaden (1970).

Berryman AM, Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Influence of treatment of diabetic rats with combinations of Pycnogenol[®], beta-carotene, and alpha-lipoic acid on parameters of oxidative stress. *J Biochem Mol Toxicol* 2004;18(6):345-52.

Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, et al. Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab* 2010 Jan;11(1):35-46.

Björkstén B. The influence of technical factors on the NBT test. *Scand J Haematol* 1974;12(1):46-50.

Blazso G, Gabor M, Sibbel R, Rohdewald P. An anti-inflammatory and superoxide radical scavenging activities of a procyanidins containing extract from the bark of *Pinus pinaster* sol. and its fractions. *Pharm Parmacol Lett* 1994;3:217–220.

Bonesi M, Menichini F, Tundis R, et al. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of Pinus species essential oils and their constituents. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2010 Oct;25(5):622-8.

Bornsek SM, Zibera L, Polak T, et al. Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chem* 2012 Oct 15;134(4):1878-84.

Boskabady MH, Kiani S, Rakhshandah H. Relaxant effects of *Rosa damascena* on guinea pig tracheal chains and its possible mechanism(s). *J Ethnopharmacol* 2006 Jul 19;106(3):377-82.

Boyd O, Weng P, Sun X, et al. Nectarine promotes longevity in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Biol Med* 2011 Jun 1;50(11):1669-78.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 May 7;72:248-54.

Braga MEM, Rosa MSS, Seabra IJ, Facanali R, Marques MOM, de Sousa HC. Fractioned SFE of antioxidants from maritime pine bark. *The Journal of Supercritical Fluids* 2008;47:37–48.

Brockerhoff E, Jactel H, Parrotta J, Quine C, Sayer J, Biodiversity and Conservation 2008;17:925.

Butler MS, Newman DJ. Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholesteremics and anticancer drug discovery. Prog Drug Res 2008;65:1;3-44.

CABI, *Hylobius abietis* (large pine weevil) (2015). Invasive Species Compendium. <http://www.cabi.org>.

Caesar I, Jonson M, Nilsson KP, Thor S, Hammarström P. Curcumin promotes A-beta fibrillation and reduces neurotoxicity in transgenic *Drosophila*. PLoS One 2012;7(2):e31424.

Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: Good citizens, bad neighbors. Cell 2005.

Cantín CM, Moreno MA, Gogorcena Y. Evaluation of the antioxidant capacity, phenolic compounds, and vitamin C content of different peach and nectarine [*Prunus persica* (L.) Batsch] breeding progenies. J Agric Food Chem 2009 Jun 10;57(11):4586-92.

Cesarone MR, Belcaro G, Rohdewald P, et al. Improvement of diabetic microangiopathy with Pycnogenol®: A prospective, controlled study. Angiology 2006 Aug-Sep; 57(4):431-6.

Cesarone MR, Belcaro G, Rohdewald P, Pellegrini L, Ledda A, Vinciguerra G, et al. Rapid relief of signs/symptoms in chronic venous microangiopathy with Pycnogenol®: a prospective, controlled study. Angiology 2006;57:569–576.

Chen P, Song F, Lin LZ. Chromatographic fingerprint analysis of Pycnogenol® dietary supplements. Journal of AOAC International 2009;92:624–632.

Chida M, Suzuki K, Nakanishi-Ueda T, Ueda T, Yasuhara H, Koide R, et al. *In vitro* testing of antioxidants and biochemical end-points in bovine retinal tissue. Ophthalmol Res 1999;31:407–415.

Chin YW, Chai HB, Keller WJ, Kinghorn AD. Lignans and other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (Acai) with antioxidant and cytoprotective activities. J Agric Food Chem 2008 Sep 10;56(17):7759-64.

Cho KJ, Yun CH, Yoon DY, Cho YS, Rimbach G, Packer L, et al. Effect of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritime* on proinflammatory cytokine interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. Toxicol Appl Pharmacol 2000;168:64–71.

Chondrogianni N, Gonos ES. Structure and function of the ubiquitin-proteasome system: Modulation of components. Progress in Molecular Biology and Translational Science 2012;109:41–74.

Chondrogianni N, Petropoulos I, Franceschi C, Friguet B, Gonos ES. Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. In Experimental Gerontology 2000;(Vol. 35: pp. 721–728).

Chondrogianni N, Stratford FLL, Trougakos IP, Friguet B, Rivett AJ, Gonos ES. Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts. Induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278(30):28026–28037.

Chovanova Z, Muchova J, Sivonova M, Dvorakova M, Zitnanova I, Waczulikova I, et al. Effect of polyphenolic extract, Pycnogenol[®], on the level of 8-oxoguanine in children suffering from attention deficit/hyperactivity disorder. *Free Radic Res* 2006;40:1003–1010.

Chung CH, Baek SH. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999;266(3):633–640.

Cisar P, Jany R, Waczulikova I, Sumegova K, Muchova J, Vojtassak J, et al. Effect of pine bark extract (Pycnogenol[®]) on symptoms of knee osteoarthritis. *Phytother Res* 2008;22:1087–1092.

Clevenger JF. Apparatus for the determination of volatile oils. *J Am Pharm Assoc* 1928;17:341–6.

Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 2009 Jul 10;325(5937):201-4.

Copeland JM, Cho J, Lo TJr, et al. Extension of *Drosophila* life span by RNAi of the mitochondrial respiratory chain. *Curr Biol* 2009 Oct 13;19(19):1591-8.

Correia AV, Oliveira AC, Fabião A. Pinhais e eucaliptais: a floresta cultivada. JS.\ Silva, ed. (Edições Público, Lisboa, 2007), vol. 4 of Árvores e florestas de Portugal 2007;pp. 17–34.

Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual Review of Biochemistry* 1996; 65:801–847.

Critchfield WB, Little EL. Geographic distribution of the pines of the world, no. 991 (U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, Washington, DC, 1966).

Cuervo AM, MacIán F. Autophagy, nutrition and immunology. In *Molecular Aspects of Medicine* 2012;(Vol. 33:pp. 2–13).

Cuervo AM. Autophagy: Many paths to the same end. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004.

Cui Z, Guo Z, Miao J, et al. The genus *Cynomorium* in China: an ethnopharmacological and phytochemical review. *J Ethnopharmacol* 2013 May 2;147(1):1-15.

De Duve C. Lysosomes revisited. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 1983;137(3):391–397.

De Martino M, Hoetzenecker, K, Ankersmit HJ, et al. Serum 20S proteasome is elevated in patients with renal cell carcinoma and associated with poor prognosis. *Br J Cancer* 2012;106(5):904–908.

Dene BA, Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Effects of antioxidant treatment on normal and diabetic rat retinal enzyme activities. *J Ocul Pharmacol Ther* 2005;21:28–35.

Devaraj S, Vega-López S, Kaul N, Schönlaue F, Rohdewald P, Jialal I. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters plasma lipoprotein profile. *Lipids* 2002;37:931–934.

Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 2004 Oct;52:794-804.

Dong Y, Guha S, Sun X, Cao M, Wang X, Zou S. Nutraceutical interventions for promoting healthy aging in invertebrate models. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:718491.

Drew B, Phaneuf S, Dirks A, et al. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002 Feb;284(2):R474-80.

Duh PD, Tu YY, Yen GC. Antioxidant activity of water extract of harn jyr (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie* 1999; 32:269–277.

Durackova Z, Trebaticka B, Novotny V, Zitnanova I, Breza J. Lipid metabolism and erectile function improvement by Pycnogenol[®], extract from the bark of *Pinus pinaster* in patients suffering from erectile Dysfunction - a pilot study. *Nutr Res* 2003;23:1189–1198.

Dvoráková M, Jezová D, Blazíček P, et al. Urinary catecholamines in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): modulation by a polyphenolic extract from pine bark (Pycnogenol[®]). *Nutr Neurosci* 2007 Jun-Aug;10(3-4):151-7.

Dvorakova M, Sivonova M, Trebaticka J, Skodacek I, Waczulikova I, Muchova J, et al. The effect of polyphenolic extract from pine bark, Pycnogenol[®], on the level of glutathione in children suffering from attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Redox Rep* 2006;11:163–172.

Eberhardt TL, Young RA. Assessment of the anti-HIV activity of a pine cone isolate. *Planta Med* 1996;62: 63–65.

Eckenwalder J. E. Conifers of the World: The Complete Reference. Timber Press, 2009.

Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, et al. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* 2009 Nov;11(11):1305-14.

Emami SA, Shahani A, Hassanzadeh Khayyat M. Antioxidant activity of leaves and fruits of cultivated conifers in Iran. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2013 Aug;8(3):113-7.

Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol* 2015 Dec;6:183-97.

Farid R, Mifteizi Z, Mirheidari M, Yasdi S, Torghabeh H, Esmaelli H, et al. Pycnogenol[®] supplementation reduces pain and stiffness and improves physical function in adults with knee osteoarthritis. *Nutr Res* 2007;27:692–697.

Farjon A, Filer D. *An Atlas of the World's Conifers: An Analysis of their Distribution, Biogeography, Diversity and Conservation Status* (Brill, 2013).

Farjon A. *A handbook of the world's conifers* (Brill, 2010).

Farjon A: “An Atlas of the World's Conifers”, Royal Botanic Gardens, ISBN 9-789004211803.

Farjon, A. (2005). *Pines. Drawings and descriptions of the genus Pinus* (2nd ed.). Leiden: E. J. Brill and W. Backhuys.

Feng WY, Tanaka R, Inagaki Y, Saitoh Y, Chang MO, Amet T, et al. Pycnogenol[®], a procyanidin-rich extract from French maritime pine, inhibits intracellular replication of HIV-1 as well as its binding to host cells. *Jpn J Infect Dis* 2008;61:279–285.

Finch CE, Tanzi RE. Genetics of aging [see comments]. *Science* 1997;278:407–411.

Fitzpatrick DF, Bing B, Rohdewald PJ. Endothelium-dependent vascular effects of Pycnogenol[®]. *J card pharm* 1998;32:509–515.

Flatt T, Min KJ, D'Alterio C, et al. *Drosophila* germ-line modulation of insulin signaling and lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Apr 29;105(17):6368–73.

Florini JR, Harned JA, Richman RA, Weiss JP. Effect of rat age on serum levels of growth hormone and somatomedins. *Mech Ageing Dev* 1981;Feb;15(2):165–76.

Francotte P, Graindorge E, Boverie S, de Tullio P, Pirotte B. New trends in the design of drugs against Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* 2004;11:1757–78.

Fredriksson Å, Johansson Krogh E, Hernebring M, et al. Effects of aging and reproduction on protein quality control in soma and gametes of *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 2012 Aug;11(4):634–43.

Furukawa M, Xiong Y. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Molecular and Cellular Biology* 2005;25(1):162–171.

Fuster MD, Lampi AM, Hopia A, Kamal-Eldin A. Effects of α - and γ -tocopherols on the autoxidation of purified sunflower triacylglycerols. *Lipids* 1998;33:715–722.

Gallastegui N, Groll M. The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends in Biochemical Sciences* 2010.

Glaumann H. Crinophagy as a means for degrading excess secretory proteins in rat liver. *Revisiões Sobre Biologia Celular : RBC* 1989;20:97–110.

Gleeson M, Siegler JC, Burke LM, Stear SJ, Castell LM. A to Z of nutritional supplements: Dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance - Part 31. *British Journal of Sports Medicine* 2012;46:377–8.

Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews* 2002;82(2):373–428.

Glickman MH, Rubin DM, Coux O, et al. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 1998;94(5):615–623.

Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, Finley D. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Molecular and Cellular Biology* 1998;18(6):3149–3162.

Gompertz B. "On the Nature of the Function Expressive of the Law of Human Mortality, and on a New Mode of Determining the Value of Life Contingencies". *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 1825;115: 513–585.

Gonzalez-Martinez SC, Alia R, Gil L. Population genetic structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.): a comparison of allozyme markers and quantitative traits *Heredity* 2002; 89:199-206.

Gouchang Z. Ultraviolet radiation-induced oxidative stress in cultured human skin fibroblasts and antioxidant protection. *Biol Res Rep Univ* 1993;33:1–86.

Graikou K, Gortzi O, Mantanis G, Chinou I. Chemical composition and biological activity of the essential oil from the wood of *Pinus heldreichii* Christ. var. *leucodermis*. *Eur. J. Wood Prod* 2012;70:615-620.

Gredilla R, Barja G, López-Torres M. Effect of short-term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J Bioenerg Biomembr* 2001Aug;33(4):279-87.

Grimberg KB, Beskow A, Lundin D, Davis MM, Young P. Basic leucine zipper protein CncC is a substrate and transcriptional regulator of the *Drosophila* 26S proteasome. *Molecular and Cellular Biology* 2011;31(4):897–909.

Grimm T, Chovanova Z, Muchova J, Sumegova K, Liptava A, Durackova Z, et al. Inhibition of NF-kappaB activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol®) *J Inflamm* 2006;3:1.

Grimm T, Schafer A, Hogger P. Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (Pycnogenol®) *Free Rad Biol Med* 2004;36:811–822.

Groll M, Bajorek M, Köhler A, et al. A gated channel into the proteasome core particle. *Nature Structural Biology* 2000;7(11):1062–1067.

Groll M, Clausen T. Molecular shredders: How proteasomes fulfill their role. *Current Opinion in Structural Biology* 2003.

Groll M, Ditzel L, Löwe J, et al. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 1997; 386(6624):463–471.

Gröniger A, Sinha RP, Klisch M, Häder DP. Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae--a database. *J Photochem Photobiol B* 2000 Nov;58(2-3):115-22.

Grune T, Merker K, Jung T, Sitte N, Davies KJA. Protein oxidation and degradation during postmitotic senescence. *Free Radical Biology and Medicine* 2005;39(9):1208–1215.

Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1997;11(7):526–534.

Grünwald S, Stellzig J, Adam IV, et al. Longevity in the red flour beetle *Tribolium castaneum* is enhanced by broccoli and depends on nrf-2, jnk-1 and foxo-1 homologous genes. *Genes Nutr* 2013 Sep;8(5):439-48.

Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, et al. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and Thiolytic degradation. *J Agric Food Chem* 2003;51:7513–7521.

Gulati OP. The nutraceutical Pycnogenol®: its role in cardiovascular health and blood glucose control. *Biom Rev* 2005;16:49–57.

Gülçin I, Büyükokuroglu ME, Oktay M, Küfrevioglu OI. Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. *subsp. pallsiana* (Lamb.) Holmboe. *J Ethnopharmacol* 2003 May;86(1):51-8.

Hafizoğlu H, Bjarne Holmbom and Markku Reunanen: “Chemical composition of lipophilic and phenolic constituents of barks from *Pinus nigra*, *Abies bornmülleriana* and *Castanea sativa*”, *Holzforschung* 2002;56:3: 257-260.

Haigis MC, Yankner BA. The aging stress response. *Mol Cell* 2010 Oct 22;40(2):333-44.

Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981Nov;78(11):7124-8.

Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today* 2008;13(19-20):894-901.

Helfand SL, Rogina B. Genetics of aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Genetics* 2003;37:329–348.

Hirano Y, Hayashi H, Iemura S, Ichiro, et al. Cooperation of Multiple Chaperones Required for the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes. *Molecular Cell* 2006;24(6):977–984.

Hirano Y, Hendil KB, Yashiroda H, et al. A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* 2005; 437(7063):1381–1385.

Hirano Y, Kaneko T, Okamoto K, et al. Dissecting beta-ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *The EMBO Journal* 2008;27(16):2204–2213.

Hitt R, Young-Xu Y, Silver M, Perls T. Centenarians: the older you get, the healthier you have been. *Lancet* 1999 Aug 21;354(9179):652.

Hochstrasser M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 2009; 458(7237):422–429.

Höhn A, Jung T, Grimm S, Catalgol B, Weber D, Grune T. Lipofuscin inhibits the proteasome by binding to surface motifs. *Free Radical Biology and Medicine* 2011;50(5):585–591.

Holland R, Fishbein JC. Chemistry of the cysteine sensors in Kelch-like ECH-associated protein 1. *Antioxidants & Redox Signaling* 2010;13(11):1749–1761.

Hosseini S, Lee J, Sepulveda RT, Rohdewald P, Watson RR. A randomized, double-blind, placebo-controlled, prospective, 16 week crossover study to determine the role of Pycnogenol® in modifying blood pressure in mildly hypertensive patients. *Nutr Res* 2001;21:1251–1260.

Hosseini S, Pishnamazi S, Sadrzadeh SM, Farid F, Farid R, Watson RR. Pycnogenol® in the Management of Asthma. *J Med Food* 2001 Winter; 4(4):201-209.

Houghton PJ, Ren Y, Howes MJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat Prod Rep* 2006;23:181–99.

Hsin H, Kenyon C. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature* 1999 May 27;399(6734):362-6.

Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, et al. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 2003.

Ikeda F, Crosetto N, Dikic I. What determines the specificity and outcomes of Ubiquitin signaling? *Cell* 2010;143(5):677–681.

Iravani S, Zolfaghari B. Pharmaceutical and nutraceutical effects of *Pinus pinaster* bark extract. *Res Pharm Sci* 2011 Jan-Jun;6(1): 1–11.

Isajev V, Fady B, Semerci H, Andonovski V. EUFORGEN Technical guidelines for genetic conservation and use: European black pine, *Pinus nigra*, 2003.

Işcan G, Demirci B, Demirci F, Göger F, Kirimer N, Köse YB, Can Başer KH. Antimicrobial and antioxidant activities of *Stachys lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia* essential oil and its infusion. *Nat Prod Commun* 2012 Sep;7(9):1241-4.

Ito K, Hotta Y. Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 1992;149(1):134–148.

Iwasaki A, Matsumori A, Yamada T, et al. Pimobendan inhibits the production of proinflammatory cytokines and gene expression of inducible nitric oxide synthase in a murine model of viral myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1999 Apr;33(5):1400-7.

Jafari M, Felgner JS, Bussel II, Hutchili T, Khodayari B, Rose MR, Vince-Cruz C, Mueller LD. Rhodiola: a promising anti-aging Chinese herb. *Rejuvenation Res* 2007 Dec;10(4):587-602.

Jafari M, Zarban A, Pham S, Wang T. *Rosa damascena* decreased mortality in adult *Drosophila*. *J Med Food* 2008 Mar;11(1):9-13.

Jalas J, Suominen J, Atlas Florae Europaeae: distribution of vascular plants in Europe Vol. 2 Gymnospermae (Pinaceae to Ephedraceae) (Committee for Mapping the Flora of Europe and Societas Biologica Fennica Vanamo, Helsinki, 1973).

Jung T, Bader N, Grune T. Lipofuscin: Formation, distribution, and metabolic consequences. In *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007;(Vol. 1119, pp. 97–111).

Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Molecular Aspects of Medicine* 2009.

Kaiser P, Huang L. Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biol* 2005;6(10):233.

Kamuren ZT, McPeck CG, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Effects of low-carbohydrate diet and Pycnogenol[®] treatment on retinal antioxidant enzymes in normal and diabetic rats. *J Ocul Pharmacol Ther* 2006 Feb;22(1):10-8.

Kang J, Li Z, Wu T, Jensen GS, Schauss AG, Wu X. Antioxidant capacities of flavonoids compounds isolated from Açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chem* 2010;122:610–617.

Kang J, Xie C, Li Z, et al. Flavonoids from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chem* 2011;128:152–157.

Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Antioxidant-induced INrf2 (Keap1) tyrosine 85 phosphorylation controls the nuclear export and degradation of the INrf2-Cul3-Rbx1 complex to allow normal Nrf2 activation and repression. *Journal of Cell Science* 2012.

Kästle M, Grune T. Protein oxidative modification in the aging organism and the role of the ubiquitin proteasomal system. *Current Pharmaceutical Design* 2011;17(36): 4007–4022.

Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 1993 Dec 2;366(6454):461-4.

Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature* 2010 Mar 25;464(7288):504-12.

Kim SK. Common aging pathways in worms, flies, mice and humans. *The Journal of Experimental Biology* 2007;210(Pt 9):1607–1612.

Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Molecular Cell* 2009.

Kirkin, V, Lamark T, Johansen T, Dikic I. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy* 2009.

Kirkwood TBL. Evolution of aging. *Nature* 1977;270(November):301–304.

Koch R. Comparative study of Venostasin and Pycnogenol® in chronic venous insufficiency. *Phytother Res* 2002;16:1–5.

Kohama T, Herai K, Inoue M. Effect of French maritime pine bark extract on endometriosis as compared with leuporelin acetate. *J Reprod Med* 2007 Aug;52(8):703-8.

Kohama T, Inoue M. Pycnogenol® alleviates pain associated with pregnancy. *Phytother Res* 2006 Mar;20(3):232-4.

Kohama T, Suzuki N, Ohno S, Inoue M. Analgesic efficacy of French maritime pine bark extract in dysmenorrhea: an open clinical trial. *J Reprod Med* 2004 Oct; 49(10):828-32.

Kolayli S, Ocak M, Aliyazicioglu R, Karaoglu S. Chemical analysis and biological activities of essential oils from trunk-barks of 8 trees. *Asian J Chem* 2009;21:2684–2694.

Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Letters* 2010.

Koutsaviti K, Giatropoulos A, Pitarokili D, Papachristos D, Michaelakis A, Tzakou O. Greek Pinus essential oils: larvicidal activity and repellency against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 2015 Feb;114(2):583-92.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lakatta EG. Changes in cardiovascular function with aging. *Eur Heart J* 1990;May;11 Suppl C:22-9.

Lalas S, Dourtoglou V. Use of rosemary extract in preventing oxidation during deep fat frying of potato chips. *J Am Oil Chem Soc* 2003;80:579–583.

Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Merry BJ. Effect of ageing and caloric restriction on specific markers of protein oxidative damage and membrane peroxidizability in rat liver mitochondria. *Mech Ageing Dev* 2004 Aug;125(8):529-38.

Lamperi L, Chiuminatto U, Cincinelli A, et al. Polyphenol levels and free radical scavenging activities of four apple cultivars from integrated and organic farming in different Italian areas. *J Agric Food Chem* 2008;56:6536–46.

Lapointe J, Hekimi S. Early mitochondrial dysfunction in long-lived *Mclk1*^{+/-} mice. *J Biol Chem* 2008 Sep 19;283(38):26217–27.

Lau BH, Riesen SK, Truong KP, Lau EW, Rohdewald P, Barreta RA. Pycnogenol[®] as an adjunct in the management of childhood asthma. *J Asthma* 2004;41(8):825–32.

Lavabre-Bertrand T, Henry L, Carillo S, et al. Plasma proteasome level is a potential marker in patients with solid tumors and hemopoietic malignancies. *Cancer* 2001;92(10):2493–2500.

Lee GD, Wilson MA, Zhu M, et al. Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 2006;5:515–524.

Lee KS, Lee BS, Semnani S, et al. Curcumin extends life span, improves healthspan, and modulates the expression of age-associated aging genes in *Drosophila melanogaster*. *Rejuvenation Res* 2010 Oct;13(5):561–70.

Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agric Food Chem* 2003;51(25):7292–7295.

Lee SJ, Hwang AB, Kenyon C. Inhibition of respiration extends *C. elegans* lifespan via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Curr Biol* 2010 Dec 7;20(23):2131–6.

Lehmann A, Janek K, Braun B, Kloetzel P-M, Enenkel C. 20 S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. *Journal of Molecular Biology* 2002;317(3):401–413.

Leung AY, Foster S. *Encyclopaedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics*, 2nd edn. John Wiley: New York 1996;502–503.

Lewin B (2004). Genes VIII. Chemistry & Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Genes+VIII#2>.

Li JW, Vederas JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 2009;325(5937):161–5.

Li Y, Xu W, McBurney MW, Longo VD. SirT1 inhibition reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. *Cell Metab* 2008 Jul;8(1):38–48.

Li YM, Chan HY, Huang Y, Chen ZY. Green tea catechins upregulate superoxide dismutase and catalase in fruit flies. *Mol Nutr Food Res* 2007 May;51(5):546–54.

Ličina BZ, Stefanović OD, Vasić SM, Radojević ID, Dekić MS, Čomić LR. Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. *Food Control* 2013;33(2):498–504

Lin SJ, Kaeberlein, M, Andalis AA, et al. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 2002;418:344–348.

Lin YJ, Seroude L, Benzer S. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah. *Science* 1998;282:943–946.

Lindeman RD, Tobin J, Shock NW. Longitudinal studies on the rate of decline in renal function with age. *J Am Geriatr Soc* 1985 Apr;33(4):278-85.

Lipovova P, Podzimek T, Orctova L, et al. Antitumor and biological effects of black pine (*Pinus nigra*) pollen nuclease. *Neoplasma* 2008;55(2):158-64.

Liu HP, Chang RF, Wu YS, Lin WY, Tsai FJ. The Yang-Tonifying Herbal Medicine *Cynomorium songaricum* Extends Lifespan and Delays Aging in *Drosophila*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012;2012:735481.

Liu X, Wei J, Tan F, Zhou S, Würthwein G, Rohdewald P. Pycnogenol[®], French maritime pine bark extract, improves endothelial function of hypertensive patients. *Life Sci* 2004 Jan 2;74(7):855-62.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013.

López-Torres M, Gredilla R, Sanz A, Barja G. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2002 May 1;32(9):882-9.

Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2007;8(8):622–632.

Ma J, Katz E, Belote JM. Expression of proteasome subunit isoforms during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol* 2002 Dec;11(6):627-39.

Macchioni F, Cioni PL, Flamini G, et al. Acaricidal activity of pine essential oils and their main components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored food mite. *J Agric Food Chem* 2002;50:4586–4588.

Mach J, Midgley AW, Dank S, Grant RS, Bentley DJ. The effect of antioxidant supplementation on fatigue during exercise: Potential role for NAD⁺ (H) *Nutrients* 2010;2:319–29.

Maimoona A, Naeem I, Saddiqe Z, Jameel K. A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *Journal of Ethnopharmacology* 2011;133:261–77.

Majeski AE, Fred Dice J. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2004.

Maritim A, Dene BA, Sanders RA, Watkins J. Effect of Pycnogenol[®] treatment on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:193–199.

Martinez-Gonzalez MA, Bes-Rastrollo M, Serra-Majem L, Lairon D, Estruch R, Trichopoulou A. Mediterranean food pattern and the primary prevention of chronic disease: recent developments. *Nutr Rev* 2009 May;67 Suppl 1:S111-6.

Matsumori A, Higuchi H, Shimada M. French maritime pine bark extract inhibits viral replication and prevents development of viral myocarditis. *J Card Fail* 2007;13:785–791.

Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 2012 Sep 13;489(7415):318-21.

Maytal-Kivity V, Reis N, Hofmann K, Glickman MH. MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC Biochemistry* 2002;3:28.

McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life and upon the ultimate body size. *J Nutr* 1935;10:63–79.

McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isacson O, Jenner P. Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nature Reviews. Neuroscience* 2001;2(8):589–594.

Menichini F, Tundis R, Loizzo MR, Bonesi M, Marrelli M, Statti GA, et al. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition of ethanolic extract and monoterpenes from *Pimpinella anisoides* V Brig. (Apiaceae). *Fitoterapia* 2009;80:297–300.

Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of Cell Science* 2012.

Minois N, Kroemer G, Madeo F. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* 2009 Nov;11(11):1305-14.

Minois N. How would we assess the impact of genetic changes on ageing in model species? *Ageing Res Rev* 2006;5:52–59.

Miquel J, Fleming J, Economos AC. Antioxidants, metabolic rate and aging in *Drosophila*. *Arch Gerontol Geriatr* 1982 Sep;1(2):159-65.

Miyazawa M, Watanabe H, Kameoka H. Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a p-menthane skeleton. *J Agric Food Chem* 1997;45:677.

Miyazawa M, Yamafuji C. Inhibition of acetylcholinesterase activity by tea tree oil and constituent terpenoids. *Flavour Fragr J* 2006;21:198–201.

Miyazawa M, Yamafuji C. Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *J Agric Food Chem* 2005;53:1765–8.

Mojarab M, Emami SA, Hassanzadeh-Khayyat M. Antioxidant activity of methanol extracts of different species of *Artemisia* from Iran. *Pharmacologyonline* 2009;2:797-807.

Morano KA. New tricks for an old dog: the evolving world of Hsp70. *Ann N Y Acad Sci* 2007 Oct;1113:1-14. Epub 2007 May 18.

Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, et al. Autophagy mediates pharmacological lifespan extension by spermidine and resveratrol. *Aging (Albany NY)* 2009 Dec 23;1(12):961-70.

Movahedian A, Zolfaghari B, Sajjadi SE, Moknatjou R. Antihyperlipidemic effect of *Peucedanum pastinacifolium* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinics (Sao Paulo)* 2010 Jun;65(6):629-33.

Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. *In vitro* acetylcholinesterase inhibitory activity of the essential oil from *Acorus calamus* and its main constituents. *Planta Med* 2007;73:283–5.

Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, et al. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 1992;360(6404):597–599.

Murray AP, Gurovic MS, Rodriguez SA, Murray MG, Ferrero AA. Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of essential oils from *Schinus areira* L. and *Schinus longifolia* (Lindl.) Speg. *Nat Prod Commun* 2009;4:873–6.

Nakanishi-Ueda T, Kamegawa M, Ishigaki S, Tsukahara M, Yano S, Wada K, et al. Inhibitory effect of lutein and Pycnogenol® on lipid peroxidation in porcine retinal homogenate. *J Clin Biochem Nutr* 2006;38:204–210.

Nelson AB, Lau BHS, Ide N, Rong Y. Pycnogenol® inhibits macrophage oxidative burst, lipoprotein oxidation, and hydroxyl radical-induced DNA damage. *Drug Dev Ind Pharm* 1998;24:139–144.

Newman DJ. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? *J Med Chem* 2008;51(9):2589-99.

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* 2016 Mar 25;79(3):629-61.

Newman DJ, Cragg GM. Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current "State of Play". *Planta Med* 2016 Jun;82(9-10):775-89.

Niccoli T, Prtridge L. Ageing as a risk factor for disease. *Current Biology* 2012.

Nijman SMB, Luna-Vargas MPA, Velds A, et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 2005.

Nikolić B, Ristić M, Bojović S, Marin PD. Variability of the needle essential oils of *Pinus heldreichii* from different populations in Montenegro and Serbia. *Chem Biodivers* 2007;4:905–16.

Niture SK, Jain AK, Jaiswal AK. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both

required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *Journal of Cell Science* 2009;122(Pt 24):4452–4464.

Nocun M, Ulicna O, Muchova J, Durackova Z, Watala C. French maritime pine bark extract Pycnogenol® reduces thromboxane generation in blood from diabetic male rats. *Biomed Pharmacother* 2008 Mar;62(3):168-72.

Noda Y, Anzai K, Mori A, Kohno M, Shinmie M, Packer L. Hydroxyl and superoxide radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES FR30 ESR spectrometer system. *Biochem Mol Biol Int* 1997;42:35–44.

Nunomura A, Tamaoki T, Tanaka K, et al. Intraneuronal amyloid beta accumulation and oxidative damage to nucleic acids in Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 2010 Mar;37(3):731-7.

Obst JR. Special (secondary) metabolites from wood. In: *Forest products biotechnology*. Taylor & Francis, New York 1998; p 153.

Ortiz de Urbina JJ, Martin ML, Sevilla MA, Montero MJ, Carron R, Roman LS. Antispasmodic activity on rat smooth muscle of polyphenol compounds caffeic and protocatechic acids. *Phytother Res* 1990;4:71–76.

Oudes AJ, Herr, CM, Olsen Y, Fleming JE. Age-dependent accumulation of advanced glycation end-products in adult *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Ageing and Development* 1998;100(3):221–229.

Oyetakin White P, Tribout H, Baron E. Protective mechanisms of green tea polyphenols in skin. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:560682.

Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from the pine (*Pinus maritima*) bark, Pycnogenol®. *Free Rad Biol Med* 1999;27:704–724.

Pallela R, Na-Young Y, Kim SK. Anti-photoaging and photoprotective compounds derived from marine organisms. *Mar Drugs* 2010 Apr 8;8(4):1189-202.

Pan W, Jiang S, Luo P, Wu J, Gao P. Isolation, purification and structure identification of antioxidant compound from the roots of *Incarvillea younghusbandii* Sprague and its lifespan prolonging effect in *Drosophila melanogaster*. *Nat Prod Res* 2008 May 20;22(8):719-25.

Park YC, Rimbach G, Saliou C, Valacchi G, Packer L. Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNFalpha secretion, and NF-kappaB-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. *FEBS Lett* 2004;465:93–97.

Partridge L, Piper MD, Mair W. Dietary restriction in *Drosophila*. *Mech. Ageing Dev* 2005;126:938–950.

Pavlovic P. Improved endurance by use of antioxidants. *European Bulletin of Drug Research* 1999;7:26–9.

Peng C, Chan HY, Li YM, Huang Y, Chen ZY. Black tea theaflavins extend the lifespan of fruit flies. *Exp Gerontol* 2009 Dec;44(12):773-83.

Peng C, Zuo Y, Kwan KM, Liang et al. Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* 2012 Feb;47(2):170-8.

Peng Cheng, Yin Ho, Chan Edwin, Huang Yu, Yu Hongjian, Chen Zhen-Yu. Apple Polyphenols Extend the Mean Lifespan of *Drosophila melanogaster*. *J Agric Food Chem* 2011;59:2097–2106.

Peng Q, Wei Z, Lau BHS. Pycnogenol[®] inhibits tumor necrosis factor- α -induced nuclear factor kappa B activation and adhesion molecule expression in human vascular endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:834–841.

Peng QL, Buz'Zard AR, Lau B. Research report: Pycnogenol[®] protects neurones from amyloid β peptide-induced apoptosis. *Mol Brain Res* 2002;104:55–65.

Pereira JS. In *Pines of Silvicultural Importance*. CABI, ed. (CABI, Wallingford, UK, 2002):pp. 316–328.

Pérez-López FR, Chedraui P, Haya J, Cuadros JL. Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas* 2009 Oct 20;64(2):67-79.

Petrakis PV, Tsitsimpikou C, Tzakou O, Couladis M, Vagias C, Roussis V. Needle volatiles from five *Pinus* species growing in Greece. *Flavour Frag J* 2001;16:249–252.

Petrassi C, Mastromarino A, Spartera C. Pycnogenol in chronic venous insufficiency. *Phytomedicine* 2000;7:383–388.

Petrovic M, Miric M. Resistance to decay fungi of the wood of munica (*Pinus heldreichii*), silver fir and Norway spruce in comparison with Scots pine. *J Sumarstvo* 1981;34:27–34 (in Serbo-Croat).

Pham AD, Sauer F. Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)* 2000;289(5488):2357–2360.

Piper MD, Bartke A. Diet and aging. *Cell Metab* 2008;8:99–104.

Praciak A, CAB. International et al., *The CABI encyclopedia of forest trees* (CABI, Oxfordshire, UK, 2013).

Priyadarshini S, Ashadevi JS, Nagarjun V, Prasanna KS. Increase in *Drosophila melanogaster* longevity due to rasayana diet: Preliminary results. *J Ayurveda Integr Med*. 2010 Apr;1(2):114-9.

Rattan SI. Hormesis in aging. *Ageing Res Rev* 2008 Jan;7(1):63-78.

Rattan SI. Hormetic modulation of aging and longevity by mild heat stress. *Dose Response* May 2006;22;3(4):533-46.

Rattan SI. Increased molecular damage and heterogeneity as the basis of aging. *Biol Chem* 2008 Mar;389(3):267-72.

Reinheckel T, Sitte N, Ullrich O, Kuckelkorn U, Davies KJ, Grune T. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *The Biochemical Journal* 1998;335(Pt 3):637–642.

Ren JC, Rebrin I, Klichko V, Orr WC, Sohal RS. Cytochrome c oxidase loses catalytic activity and structural integrity during the aging process in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;401:64–68.

Robzyk K, Recht J, Osley MA. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science (New York, N.Y.)* 2000;287(5452):501–504.

Rogina B, Helfand SL. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Nov 9;101(45):15998-6003.

Rohdewald P, Beil W. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* growth and adherence to gastric mucosal cells by Pycnogenol®. *Phytother Res* 2007;22:685–688.

Rohdewald P. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol®), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002;40:158–168.

Rohdewald PJ. Pycnogenol®, French maritime pine bark extract. In: Coates P, Blackman MR, Cragg G, Levine M, Moss J, White J, editors. *Encyclopedia of dietary supplements*. New York: Marcel Dekker, 2005 .p. 545-33.

Rong Y, Li L, Shah V, Lau BHS. Pycnogenol® protects vascular endothelial cells from t-butyl hydroperoxide induced oxidant injury. *Biotech Ther* 1995;5:117–126.

Ruberto G, Baratta MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem* 2000;69:167–174

Saeki Y, Tanaka K. Assembly and function of the proteasome. *Methods in Molecular Biology* 2012;832:315–337.

Sahin E, Colla S, Liesa M, et al. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 2011 Feb 17;470(7334):359-65.

Saliou C, Rimbach G, Moini H, McLaughlin L, Hosseini S, Lee J, et al. Solar ultraviolet-induced erythema in human skin and nuclear factor-kappa-B-dependent gene expression in keratiocytes are modulated by a French maritime pine bark extract. *Free Radic Biol Med* 2001;30:154–160.

Salvador L, Alía R, Agúndez D, Gil L. Theoretical and Applied Genetics 2000;100:89.

Sanz A, Caro P, Barja G. Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J Bioenerg Biomembr* 2004 Dec;36(6):545-52.

Savelev S, Okello E, Perry NSL, Wilkins RM, Perry EK. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;75:661–8.

Savelev SU, Okello E, Perry EK. Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytother Res* 2004;18:315–24.

Schäfer A, Chovanová Z, Muchová J, Sumegová K, Liptáková A, Duracková Z, et al. Inhibition of COX-1 and COX-2 activity by plasma of human volunteers after ingestion of French maritime pine bark extract (Pycnogenol®) *Biomed Pharmacother* 2006;60:5–9.

Schäfer A, Högger P. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit alpha-glucosidase. *Diabetes Res Clin Pract* 2007 Jul; 77(1):41-6.

Schiber A, Mihalev K, Berardini N, Mollov P, Carle R. Flavonol glycosides from distilled petals of *Rosa damascena* Mill. *Z Naturforsch C* 2005 May-Jun;60(5-6):379-84.

Schönlau F, Rohdewald P. Pycnogenol® for diabetic retinopathy. A review. *Int Ophthalmol* 2001;24(3):161-71.

Schriner SE, Katoozi NS, Pham KQ, Gazarian M, Zarban A, Jafari M. Extension of *Drosophila* lifespan by *Rosa damascena* associated with an increased sensitivity to heat. *Biogerontology* 2012 Apr;13(2):105-17.

Shabek N, Iwai K, Ciechanover A. Ubiquitin is degraded by the ubiquitin system as a monomer and as part of its conjugated target. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007;363(2):425–431.

Sharma SC, Sharma S, Gulati O. Pycnogenol® prevents haemolytic injury in G6PD deficient human erythrocytes. *Phytother Res* 2003;17:671–674.

Sharma SC, Sharma S, Gulati OP. Pycnogenol® inhibits the release of histamine from mast cells. *Phytother Res* 2003 Jan;17(1):66-9.

Shay JW, Wright WE. Hallmarks of telomeres in ageing research. *J Pathol* 2007 Jan;211(2):114-23.

Shen LR, Parnell LD, Ordovas JM, Lai CQ. Curcumin and aging. *Biofactors* 2013 Jan-Feb;39(1):133-40.

Shen LR, Xiao F, Yuan P, et al. Curcumin-supplemented diets increase superoxide dismutase activity and mean lifespan in *Drosophila*. *Age (Dordr)* 2013 Aug;35(4):1133-42.

Shock JP, Adams D. Long-term visual acuity results after penetrating and perforating ocular injuries. *Am J Ophthalmol* 1985;Nov 15:100(5):714-8.

Sime S, Reeve V. Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical Pycnogenol® *Photochem Photobiol* 2004;79:193–198.

Sivonová M, Zitnanová I, Horáková L, Strosová M, Muchová J, Balgavý P, et al. The combined effect of Pycnogenol® with ascorbic acid and trolox on the oxidation of lipids and proteins. *Gen Physiol Biophys* 2006;25:379–396.

Sivonová M, Waczulíková I, Kilanczyk E, Hrnčiarová M, Bryszewska M, Klajnert B, et al. The effect of Pycnogenol® on the erythrocyte membrane fluidity. *Gen Physiol Biophys* 2004;23:39–51.

Slack JMW, 2006. Βασικές αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης. Δεύτερη έκδοση.

Smith Eileen, Williamson Elizabeth, Zloh Mire and Gibbons Simon. Isopimaric Acid from *Pinus nigra* shows Activity against Multidrug-resistant and EMRSA Strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytother Res* 2005;19:538–542.

Soh JW, Marowsky N, Nichols TJ, et al. Curcumin is an early-acting stage-specific inducer of extended functional longevity in *Drosophila*. *Exp Gerontol* 2013 Feb;48(2):229–39.

Sohal RS, Brunk UT. Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging. *Adv Exp Med Biol* 1989;266:17–26.

Sohal RS, Toroser D, Bregere C, Mockett RJ, Orr WC. Age-related decrease in expression of mitochondrial DNA encoded subunits of cytochrome c oxidase in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev* 2008;129:558–561.

Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996 Jul 5;273(5271):59–63.

Souza A, Silva MC, Cardoso-Lopes EM, Cordeiro I, Sobral ME, Young MC, et al. Differential acetyl cholinesterase inhibition by volatile oils from two specimens of *Marlierea racemosa* (Myrtaceae) collected from different areas of the Atlantic Rain Forest. *Nat Prod Commun* 2009;4:1143–6.

Strack B, Calistri A, Accola MA, Palu G, Gottlinger HG. A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(24):13063–13068.

Strehler EE, Eppenberger HM, Heizmann CW. Isolation and characterization of parvalbumin from chicken leg-muscle. *FEBS Lett* 1977;78(1):127–33.

Su H, Wang X. The ubiquitin-proteasome system in cardiac proteinopathy: a quality control perspective. *Cardiovasc Res* 2010;85(2):253–262.

Sun X, Seeberger J, Alberico T, et al. Açai palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. *Exp Gerontol* 2010 Mar;45(3):243–51.

Suzuki N, Uebaba K, Kohama T, Moniwa N, Kanayama N, Koike K. French maritime pine bark extract significantly lowers the requirement for analgesic medication in dysmenorrhea: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Reprod Med* 2008 May;53(5):338–46.

Sykiotis GP, Bohmann D. Keap1/Nrf2 Signaling Regulates Oxidative Stress Tolerance and Lifespan in *Drosophila*. *Developmental Cell* 2008;14(1):76–85.

Sykiotis GP, Bohmann D. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Science Signaling* 2010;3(112):re3.

Syntichaki P, Troulinaki K, Tavernarakis N. eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2007 Feb 22;445(7130):922-6.

Tabrizi H, Mortazavi SA, Kamalinejad M. An in vitro evaluation of various *Rosa damascena* flower extracts as a natural antisolar agent. *Int J Cosmet Sci* 2003 Dec;25(6):259-65.

Takalo M, Salminen A, Soininen H, Hiltune M, Haapasalo A. Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *American Journal of Neurodegenerative Disease* 2013;2(1):1–14.

Tanaka M, Kuei CW, Nagashima Y, Taguchi T. Application of antioxidativ maillrad reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakkaishil* 1998;54:1409–1414.

Tavaria M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* 1996 Apr;1(1):23-8.

Tavernarakis N, Driscoll M. Caloric restriction and lifespan: a role for protein turnover? *Mech Ageing Dev* 2002Jan;123(2-3):215-29.

Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Mitochondrial damage and intralysosomal degradation in cellular aging. *Molecular Aspects of Medicine* 2006.

The EPOCH Study Group. Effects of pimobendan on adverse cardiac events and physical activities in patients with mild to moderate chronic heart failure-the effects of pimobendan on chronic heart failure study (EPOCH study) *Circ J* 2002;66:149–157.

The United States Pharmacopeia, United States Pharmacopeial Convention, Inc. official from. Maritime Pine Bark Extract – USP 2007;30:965–966.

Thirugnanasampandan R, Jayakumar R, Narmatha Bai V, Martin E, Rajendra Prasad KJ. Antiacetylcholinesterase and antioxidant ent-Kaurene diterpenoid, melissoidesin from *Isodon wightii* (Bentham) H. Hara. *Nat Prod Res* 2008;22:681–688.

Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal* 2000;19(1):94–102.

Tissenbaum HA, Guarente L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2001 Mar 8;410(6825):227-30.

Todaro L, Andreu L, D'Alessandro CM, Gutierrez E, Cherubini P, Saracino A. Response of *Pinus leucodermis* to climate and anthropogenic activity in the National Park of Pollino (Basilicata, Southern Italy). *Biol Conserv* 2007;137:507–519.

Tognolini M, Barocelli E, Ballabeni V, et al. Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sci* 2006;78:1419–1432.

Tonoki A, Kuranaga E, Tomioka T, Hamazaki J, Murata S., Tanaka K, Miura M. Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process. *Mol. Cell. Biol* 2009;29:1095–1106.

Torras MAC, Faura CA, Schönlaui F, Rohdewald P. Short Communication: Anti-microbial activity of Pycnogenol®. *Phytother Res* 2005;19:647–648.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979 Sep;76(9):4350-4.

Trebaticka J, Kopasova S, Hradecna Z, Cinovsky K, Skodacek I, Suba J, et al. Treatment of ADHD with French maritime pine bark extract, Pycnogenol®. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2006;15:329–335.

Troen BR. The biology of aging. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, New York 2003;70(1):3–22.

Trougakos IP, Margaritis LH. Novel Morphological and Physiological Aspects of Insect Eggs. In: Hilker, M. and Meiners, T. (eds.): *Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition*. Blackwell Verlag GmbH, Berlin, Vienna 2002;Pp. 3-36.

Trougakos IP, Sesti F, Tsakiri E, Gorgoulis VG. Non-enzymatic post-translational protein modifications and proteostasis network deregulation in carcinogenesis. *J Proteomics* 2013 Oct 30;92:274-98.

Tsakiri EN, Iliaki KK, Höhn A, Grimm S, Papassideri IS, Grune T, Trougakos IP. Diet-derived advanced glycation end products or lipofuscin disrupts proteostasis and reduces lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Biol Med* 2013 Dec;65:1155-63.

Tsakiri EN, Sykiotis GP, Papassideri IS, Gorgoulis VG, Bohmann D, Trougakos IP. Differential regulation of proteasome functionality in reproductive vs. somatic tissues of *Drosophila* during aging or oxidative stress. *FASEB J* 2013 Jun;27(6):2407-20.

Tsakiri EN, Sykiotis GP, Papassideri IS, Terpos E, Dimopoulos MA, Gorgoulis VG, Trougakos IP. Proteasome dysfunction in *Drosophila* signals to an Nrf2-dependent regulatory circuit aiming to restore proteostasis and prevent premature aging. *Aging Cell* 2013;12(5):802–813.

Tsoumis G. Science and technology of wood: Structure, properties, utilization. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.

Ueda T, Armstrong D. Preventive effect of natural and synthetic antioxidants on lipid peroxidation in the mammalian eye. *Ophthalmic Res* 1996;28(3):184-92.

Unaldi UE, Toroglu S. Studies on antimicrobial activity of pyramidal black pine (*Pinus nigra ssp. pallasiana var. pyramidata*): An endemic plant close to become extinct. J Environ Biol 2009;30(2):197-204.

Vendramin GG, Fineschi S, Fady B: “EUFORGEN Technical guidelines for genetic conservation and use: Bosnian pine, *Pinus heldreichii* syn. *Pinus leucodermis*, 2008.

Vernace VA, Arnaud L, Schmidt-Glenewinkel T, Figueiredo-Pereira ME. Ageing perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*. FASEB J 2007; 21(11):2672-82.

Villatoro-Pulido M, Font R, Saha S, et al. *In vivo* biological activity of rocket extracts (*Eruca vesicaria subsp. sativa* (Miller) Thell) and sulforaphane. Food Chem Toxicol 2012 May;50(5):1384-92.

Villeneuve NF, Lau A, Zhang DD. Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. Antioxidants & Redox Signaling 2010;13(11):1699–1712.

Vincent Bruno, Koutroumpa Fotini, Altemayer Valérie, Roux-Morabito Géraldine, Gevar Jeremy, Martin Carine, Lieutier François. Occurrence of *Bursaphelenchus mucronatus* (Nematoda; Aphelenchoididae) in France and association with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae). Ann For Sci 2008;65:1- 111.

Vinciguerra G, Belcaro G, Cesarone MR et al. Cramps and muscular pain: Prevention with pycnogenol in normal subjects, venous patients, athletes, claudicants and in diabetic microangiopathy. Angiology 2006;57:331–9.

Vinson JA, Proch J, Bose P, Muchler S, Taffera P, Shuta D, et al. Chocolate is a powerful *ex vivo* and *in vivo* antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American Diets. J Agric Food Chem 2006;54(21):8071–8076.

Vinson JA, Proch J, Zubik L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. J Agric Food Chem 1999;47(12):4821–4824.

Virgili F, Kim D, Packer L. Procyanidins extracted from pine bark protect alpha-tocopherol in ECV 304 endothelial cells challenged by activated RAW 264.7 macrophages: role of nitric oxide and peroxynitrite. FEBS Lett 1998 Jul 24; 431(3):315-8.

Virgili F, Kobuchi H, Noda Y, Cossins E, Packer L. Procyanidins from *Pinus maritima* bark: Antioxidant activity, effects on the immune system and modulation of nitrogen monoxide metabolism. In: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T, editors. Antioxidant Food Supplements in Human Health. Vol. 21. USA: Academic Press; 1999; pp. 323–342.

Von Mikecz A. The nuclear ubiquitin-proteasome system. Journal of Cell Science 2006;119(Pt 10):1977–1984.

Voss P, Horakova L, Jakstadt M, Kiekebusch D, Grune T. Ferritin oxidation and proteasomal degradation: Protection by antioxidants. *Free Radic Res* 2006;40:673–683.

Wahid N, González-Martínez SC, et al. *Annals of Forest Science* 2006;63:83.

Watson J, Watson JD, et al. *Molecular Biology of the Gene* (5th edition, 2004)b.pdf. BioScience.

Wei Z, Peng Q, Lau BHS. Pycnogenol[®] enhances endothelial cell antioxidant defenses. *Redox Rep* 1997;3:219–224.

Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans II. Review of 93 intervention studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005;81:243–55.

Wojdylo A, Oszmianski J, Laskowski P. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *J Agric Food Chem* 2008;56:6520–6530.

Wood JG, Rogina B, Lavu S, et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 2004 Aug 5;430(7000):686-9.

Xiao Y, Chen D, Zhang X, et al. Molecular study on copper-mediated tumor proteasome inhibition and cell death. *Int J Oncol* 2010 Jul;37(1):81-7.

Yamawaki TM, Arantes-Oliveira N, Berman JR, Zhang P, Kenyon C. Distinct activities of the germline and somatic reproductive tissues in the regulation of *Caenorhabditis elegans*' longevity. *Genetics* 2008 Jan;178(1):513-26.

Yang H-M, Liao M-F, Zhu SY, Liao MN, Rohdewald P. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial on the effect of Pycnogenol[®] on the climacteric syndrome in peri-menopausal women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007;86:978–985.

Yang J, Li Y, Wu C. Hepatoprotective effects of apple polyphenols on CCl₄-induced acute liver damage in mice. *J Agric Food Chem* 2010;58:6625–6631.

Yen GC, Duh PD, Tsai CL. Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1993;41:67–70.

Yesil-Celiktas, Ozlem, et al. “Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different *Pinus* species”, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2009;89.8:1339-1345.

Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death and Differentiation* 2005;12 Suppl 2:1542–1552.

Yu L, McPhee CK, Zheng L, et al. The testis-specific proteasome subunit Prosalph_{6T} of *D. melanogaster* is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis. *Development* 2007 Oct;134(19):3517-25.

Yuan X, Miller M, Belote JM. Duplicated proteasome subunit genes in *Drosophila melanogaster* encoding testes-specific isoforms. *Genetics* 1996 Sep;144(1):147-57.

Zibadi S, Rohdewald PJ, Park D, Watson RR. Reduction of cardiovascular risk factors in subjects with type 2 diabetes by Pycnogenol[®] supplementation. *Nutr Res* 2008 May;28(5):315-20.

Zolfaghari B, Barile E, Capasso R, Izzo AA, Sajjadi SE, Lanzotti V. The sapogenin atroviolacegenin and its diglycoside atroviolaceoside from *Allium atroviolaceum*. *J Nat Prod* 2006 Feb;69(2):191-5.

Zou S, Carey JR, Liedo P, Ingram DK, Yu B, Ghaedian R. Prolongevity effects of an oregano and cranberry extract are diet dependent in the Mexican fruit fly (*Anastrepha ludens*). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010 Jan;65(1):41-50.

Zou S, Carey JR, Liedo P, Ingram DK, Yu B. Prolongevity effects of a botanical with oregano and cranberry extracts in Mexican fruit flies: examining interactions of diet restriction and age. *Age (Dordr)* 2012 Apr;34(2):269-79.