

**«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας»**

**«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**



**“Χαρακτηρισμός της βιολογικής δράσης
συστατικών φυτικής προέλευσης”**

Γουσοπούλου Βασιλική

Λάρισα 2022

“ Χαρακτηρισμός της βιολογικής δράσης συστατικών φυτικής προέλευσης”

“Characterization of biological activities of plant- derived compounds”

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

- 1) Επιβλέπουσα: Ψαρρά Άννα-Μαρία, Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**
- 2) Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**
- 3) Σκαμνάκη Βασιλική, Επίκουρη καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Γενικές πληροφορίες για τη Μαστίχα Χίου	8
1.2. Σύσταση της Μαστίχας Χίου.....	9
1.3. Βιολογικές δράσεις.....	10
1.3.1. Αντιφλεγμονώδης δράση.....	10
1.3.2. Αντιοξειδωτική και καρδιοπροστατευτική δράση.....	11
1.3.3. Αντικαρκινική δράση	12
1.4. Δράσεις Μαστίχας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και απόπτωση.....	13
1.5. Τριτερπένια και απόπτωση.....	14
1.6. Γλυκορτικοειδή GCs- Υποδοχέας GR.....	15
1.7. P-53	17
1.8. Σκοπός.....	17
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
2.1. Οργανολογία.....	18
2.2. Υλικά	18
2.2.2. Χημικά.....	18
2.2.3. Κλάσματα Μαστίχας Χίου	19
2.2.4. Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων	19
2.2.5. Αντισώματα.....	22
2.3. Μέθοδοι.....	22
2.3.1. Καλλιέργεια κυττάρων	22
2.3.2. Λύση κυττάρων	22
2.3.3. Μέθοδος Bradford	23
2.3.4. Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες	23
2.3.5. Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	24
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	25
3.2. Διερεύνηση των βιολογικών δράσεων εκχυλίσματος Μαστίχας Χίου.....	25
3.2.1. Διερεύνηση της επίδρασης του ημι-πολικού και πολικού εκχυλίσματος Μαστίχας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της P-53 και προκασπάσης-3.....	25

4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	29
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	33
6.	ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	38

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις μέρες μας, η χρήση φυσικών προϊόντων για τη κάλυψη των βασικών αναγκών υγειονομικής περίθαλψης προτιμάται από το 80% του πληθυσμού. Η επιστημονική κοινότητα προσπαθεί για την ανακάλυψη και τη χρήση τέτοιων προϊόντων για τη καταπολέμηση ασθενειών αλλά και το περιορισμό ανεπιθύμητων ενεργειών που προκύπτουν από τη χρήση φαρμάκων. Οι θεραπευτικές ιδιότητες της μαστίχας είναι γνωστές από την αρχαιότητα όπου χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία γαστρεντερικών διαταραχών. Με τη πάροδο των χρόνων, έγινε πλέον γνωστή για τις αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές της δράσεις καθώς και για τις αντικαρκινικές της ιδιότητες. Αποτελεί επίσημα Προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) από την Ευρωπαϊκή Ένωση και η τεχνογνωσία της μαστιχοκαλλιέργειας έχει καταγραφεί στον Αντιπροσωπευτικό Κατάλογο Άυλης Πολιτιστικής Κληρονομιάς της ανθρωπότητας. Αποτελεί φυσική πηγή τερπενίων υπεύθυνα για τις βιολογικές της δράσεις, που παρουσιάζουν παρόμοια χημική δομή με τα γλυκορτικοειδή, το οποίο πιθανόν να σημαίνει ότι να μπορούν να αποτελέσουν και εν δυνάμει επιλεκτικούς ρυθμιστές του υποδοχέα των γλυκορτικοειδών. Ακόμη, έχει συσχετιστεί με τη καρδιαγγειακή προστασία, την ηπατοπροστασία και μελέτες καταδεικνύουν ότι η Μαστίχα Χίου προκαλεί απόπτωση και κατέχει αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η διερεύνηση των βιολογικών δράσεων των κλασμάτων ρητίνης διαφορετικής πολικότητας της Μαστίχας Χίου σε κύτταρα HEK293. Πιο συγκεκριμένα, στόχος είναι η μελέτη επίδρασης κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας της Μαστίχας Χίου στον κυτταρικό κύκλο και στους αποπτωτικούς μηχανισμούς σε κύτταρα HEK293. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κλάσματα ρητίνης του δέντρου Μαστίχας Χίου, εμφανίζουν αποπτωτικές δράσεις και ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ογκοσταλτικού και μεταγραφικού παράγοντα p53 μειώνονται σημαντικά, επομένως μειώνεται και η άμυνα του κυττάρου στην αντιμετώπιση κυτταρικών βλαβών, αναστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο. Τα αποτελέσματα αυτά μένει να επαληθευτούν και να χαρακτηριστεί περαιτέρω ο βιοχημικός μηχανισμός αυτών των δράσεων. Η έρευνα αυτή συμβάλει στην αναγνώριση και κατανόηση των βιοχημικών μηχανισμών δράσεων της ρητίνης των Μαστιχόδεντρων της Χίου, καθιστώντας τη ως συστατικό ιδιαίτερου φαρμακευτικού ενδιαφέροντος.

Λέξεις κλειδιά: Μαστίχα Χίου, Ρητίνη, Βιολογικές δράσεις, Προκασπάση -3, P53, Τριτερπένια, Απόπτωση, Κυτταρικός κύκλος

ABSTRACT

Nowadays, the use of natural products to meet basic health care needs is considerably preferred by the 80% of the population. The scientific community focus among others, on the discovery and use of such products to treat diseases and to limit adverse effects resulting from the use of drugs. The healing properties of mastic have been known since ancient times where it was used to treat gastrointestinal disorders. Over the years, it has now become known for its anti-inflammatory and antioxidant activities as well as for its anti-cancer properties. It is officially a Product of Protected Designation of Origin (PDO) by the European Union and the know-how of mastic cultivation has been recorded in the Representative List of the Intangible Cultural Heritage of Humanity. It is a natural source of terpenes responsible for its biological actions, which have a similar chemical structure with glucocorticoids, which means that they may be potent and selective modulators of the glucocorticoid receptor. Furthermore, it has been associated with cardiovascular protection, hepatoprotection and studies show that Chios Mastic induces apoptosis and possesses anti-proliferative activities in colon cancer cells. The purpose of this study is to investigate the biological activities of the resin fractions of different polarity of Mastic Chios in HEK293 cells. More specifically, the aim is to study the effect of fractions of different polarity of Chios Mastic on the cell cycle and apoptotic mechanisms in HEK293 cells. The results showed that the resin fractions from the Mastic tree of Chios show apoptotic effects and that the protein levels of the tumor suppressor and transcription factor p53 were significantly reduced, thus reducing the cell's defense against cell damage, inhibiting the cell cycle. Further analysis is required to validate these results and to further characterize the biochemical mechanisms of these actions. This research contributes to the investigation and understanding of the biochemical actions of the resin from the Mastic trees of Chios, making it a product of potential special pharmaceutical interest.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικές πληροφορίες για τη Μαστίχα Χίου

Η Μαστίχα Χίου (Chios Mastic Gum), είναι μία ρητίνη που εξάγεται από τον αιθαλή θάμνο *Pistacia lentiscus* var. *Chia* (οικογένεια *Anacardiaceae*), ο οποίος καλλιεργείται στο ελληνικό νησί της Χίου. Παρόλο που το είδος αυτό είναι ευρέως διαδεδομένο στη Μεσογειακή λεκάνη και στις περιμετρικές περιοχές, η μοναδική αυτή ρητίνη προέρχεται μόνο από τα μαστιχόδεντρα που καλλιεργούνται στο νότιο τμήμα του νησιού της Χίου. Έχει χρησιμοποιηθεί για τουλάχιστον 3.000 χρόνια στη Μεσόγειο και σε χώρες της Μέσης Ανατολής ως αρωματικό πρόσθετο σε τρόφιμα και ποτά, καθώς και ως ιατρική θεραπεία για την ανακούφιση από δυσπεψία και άλλες γαστρεντερικές διαταραχές (Balan K.V. et al., 2005, Assimopoulou A.N. & Papageorgiou V.P., 2005). Το μαστιχόδεντρο *Pistacia lentiscus* var. έχει μέγιστο ύψος τα 5m και η πλήρης ανάπτυξη του ολοκληρώνεται στα 40-50 έτη, ενώ η παραγωγή του ξεκινάει από το 5^ο έτος. Η καλλιέργεια του αποτελεί παράδοση και κληρονομιά της περιοχής και η παραγωγή προέρχεται από 24 χωριά του νησιού που ενδείκνυται η καλλιέργεια τους, καθώς το έδαφος είναι παχύ και ασβεστώδες (Pachi V.K. et al., 2020).

Η Μαστίχα που εκκρίνεται ως ρητίνη λαμβάνεται παραδοσιακά σε μορφή δακρύων ή σταγονιδίων μετά από διαμήκη τομές στον κορμό του δέντρου με τη χρήση ενός ειδικού εργαλείου (Assimopoulou A.N. & Papageorgiou V.P., 2005). Αρχικά, εκκρίνεται ως ένα κολλοειδές διαυγές υγρό που στερεοποιείται σε διάφορα σχήματα μετά από 15-20 ημέρες, έχει κρυσταλλική μορφή και πέφτει στο έδαφος κάτω από το δέντρο. Στη συνέχεια συλλέγεται με το χέρι και υποβάλλεται σε περαιτέρω επεξεργασία για συσκευασία και χρήση. Το πόσο σκληρή είναι αυτή η ρητίνη, εξαρτάται από το μέγεθός της και το πόση ώρα εκτίθεται στη φύση, σε συνδυασμό με την ατμοσφαιρική θερμοκρασία. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι το φυτό *P. Lentiscus* μπορεί να φυτευτεί ή να μεταφυτευτεί σε άλλες περιοχές του κόσμου, συμπεριλαμβανομένου του βόρειου τμήματος της Χίου, αλλά δεν θα παραχθεί ρητίνη (Dimas K.S. et al., 2012).

Από το 3000 π.Χ., οι Έλληνες έχουν χρησιμοποιήσει τη Μαστίχα σε ποικίλες εφαρμογές όπως π.χ. μαγείρεμα, παρασκευή ποτών, καλλυντικών, χρωμάτων και για τη θεραπεία γαστρικών παθήσεων. Το προϊόν αυτό, χαρακτηρίζεται ως Προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) από την Ευρωπαϊκή Ένωση, από το 1997 (Dimas K.S. et al., 2012). Επιπλέον, η τεχνογνωσία της μαστιχοκαλλιέργειας

στη Χίο, καταγράφηκε στον Αντιπροσωπευτικό Κατάλογο Άυλης Πολιτιστικής Κληρονομιάς της ανθρωπότητας στις 27 Νοεμβρίου το 2014, από τη Διακυβερνητική Επιτροπή για τη Προστασία της Άυλης Πολιτιστικής Κληρονομιάς της UNESCO, στην έδρα της στο Παρίσι (Pachi V.K. et al., 2020).

1.2. Σύσταση της Μαστίχας Χίου

Η Μαστίχα είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη φυσική ρητίνη στην οποία έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής 120 χημικές ενώσεις. Τα τριτερπένια αποτελούν την κύρια χημική ομάδα της Μαστίχας με ποσοστό 65–70% του συνολικού βάρους της ρητίνης. Σημαντική ομάδα αποτελούν και οι πτητικές ενώσεις που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο και στο νερό Μαστίχας και πολύ μικρό ποσοστό κατέχουν ενώσεις διαφόρων χημικών κατηγοριών. Αυτές οι χημικές ενώσεις λόγω του πολυμερούς της μαστίχας που αποτελεί το 25-30% του ξηρού της βάρους, μορφοποιούνται σε δομή ρητίνης (Pachi V.K. et al., 2020). Η Μαστίχα δε διαλύεται στο νερό αλλά σε διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες όπως η μεθανόλη, το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), η ακετόνη, το χλωροφόρμιο (Dimas K.S. et al., 2012). Αξίζει να αναφερθεί ότι μέχρι σήμερα οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τη σύσταση της ρητίνης αυτής και τους παράγοντες που την επηρεάζουν, είναι περιορισμένες (Pachi V.K. et al., 2020).

Οι κύριες κατηγορίες χημικών ενώσεων του αιθέριου ελαίου είναι οι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες, τα οξυγονωμένα μονοτερπένια και τα σесκιτερπένια. Από τα συστατικά που περιέχονται στο έλαιο έχουν ταυτοποιηθεί 69-72 εξ αυτών, κυμαινόμενες μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων λόγω διαφορετικών συνθηκών παραλαβής και αποθήκευσης. Ως κύρια συστατικά του αναγνωρίστηκαν τα αρωματικά μονοτερπένια α-πινένιο (38-80%) και μυρσένιο (3-20%), τα οποία αποτελούν περισσότερο από το 90% του ελαίου και στη συνέχεια τα μονοτερπένια β-πινένιο (3%), λιμονένιο (0,9%), λιναλόλη (0,73%), ως τα πιο άφθονα φυτοχημικών μετά το α-πινένιο και μυρσένιο (Spyridopoulou K. et al., 2016, Pachi V.K. et al., 2020).

Σύμφωνα με αναφορά από την Kalousi F. D. et al. 2022, οι πτητικές ενώσεις που βρέθηκαν στην ανάλυση του αιθέριου ελαίου φρέσκων και αποξηραμένων φύλων είναι οι β-μυρσένιο, λιμονένιο, δ-γερμακρένιο, α-καδινόλη, γ-καδινένιο, trans-καρυοφυλλένιο, δ-καδινένιο από φρέσκο φυτικό υλικό και δ-καδινένιο, α-αμορφένιο,

δ-γερμακρένιο, τρανς-καρυοφυλλένιο, α-κυβεμπένιο, νερολιδόλη, α-καδινένιο, β-κυβεμπένιο, α- χουμουλένιο και ναφθαλίνη. Επίσης, πολικές ενώσεις βρέθηκαν στο μαστιχόνερο από φρέσκα φύλλα της Μαστίχας Χίου όπως γαλλοϋλοκινικό οξύ, D-γαλλοκαθενίνη, μυρική-Ο-ραμνοσίδη, γλυκοσίδη κερκετίνης και γλυκοσίδη καμπερόλης.

1.3. Βιολογικές δράσεις

Οι θεραπευτικές ιδιότητες της μαστίχας είναι γνωστές από την Ελληνική αρχαιότητα, καθώς συλλέγεται για παραπάνω από 2500 χρόνια. Ο Ιπποκράτης, θεμελιωτής της ορθολογικής ιατρικής, χρησιμοποιούσε τη Μαστίχα για τη θεραπεία γαστρεντερικών διαταραχών. Πλέον είναι γνωστή για τις αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές της ιδιότητες καθώς αποτελεί μία φυσική πηγή τερπενίων, φαινολικών ενώσεων, φυτοστερόλων, αραβινογαλακτανών πρωτεϊνών και φυσικών πολυμερών που σε συνδυασμό με τα πτητικά και αρωματικά συστατικά παρουσιάζουν βιοδραστικές επιδράσεις. Ωστόσο μέχρι σήμερα δεν είναι απολύτως γνωστή η βιοπροσβασιμότητα και βιοδιαθεσιμότητα τους και επομένως τα οφέλη της Μαστίχας δεν έχουν ανακαλυφθεί πλήρως (Soulaïdopoulos S. et al., 2022).

1.3.1. Αντιφλεγμονώδης δράση

Ως φλεγμονή ορίζεται η απόκριση του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος και περιλαμβάνει μια σειρά μοριακών αντιδράσεων και κυτταρικής δραστηριότητας (φαγοκυττάρωση, χημειοταξία, κυτταρική διαφοροποίηση) ενάντια στη βλάβη ζωτικών κυτταρικών συστατικών (DNA, πρωτεΐνες) από το οξειδωτικό στρες. Η χρόνια φλεγμονή έχει συσχετιστεί με διάφορες χρόνιες ασθένειες όπως διαβήτης, καρκίνος, καρδιαγγειακά νοσήματα κλπ (Markiewski, M. M. & Lambris, J. D., 2007).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), η χρήση φυσικών προϊόντων για τη κάλυψη των βασικών αναγκών υγειονομικής περίθαλψης προτιμάται από το 80% του πληθυσμού (Papada E. & Kaliora A.C., 2019). Οι πρώτες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για τη χρήση της Μαστίχας στόχευαν στις γαστρεντερικές διαταραχές. Τα αποτελέσματα ερευνών έδειξαν το συσχετισμό της επίδρασης της

Μαστίχας στο έλκος, με την δράση της κατά του ελικοβακτηρίδιου του πυλωρού (*H. pylori*) (Paraschos S. et al., 2012).

Αυτή η δράση της φαίνεται να πραγματοποιείται μέσω της αναστολής της παραγωγής προφλεγμονωδών ουσιών. Η χορήγηση στερεής και υγρής Μαστίχας αναστέλλει την έκκριση προσταγλανδινών μαζί με τη σύνθεση της επαγωγίμης συνθάσης νιτρικού οξειδίου (iNOS) και κυκλοοξυγενάσης (COX)-2 από μακροφάγα τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε mRNA σε πειραματόζωα (Soulaïdopoulos S. et al., 2022). Αποτελέσματα ερευνών έχουν δείξει ότι έχει θετική δράση στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (NAFLD) όπου σε πειραματικά μοντέλα η Μαστίχα μειώνει τα ηπατικά ένζυμα και βελτιώνει σημαντικά τη περιεκτικότητα σε κολλαγόνο και την ηπατική στεάτωση (Soulaïdopoulos S. et al., 2022). Επιπλέον, το συμπλήρωμα Μαστίχας λειτουργεί ως φυσικό προβιοτικό, προάγοντας μερική ανάκτηση της μικροβιακής ποικιλότητας. Τέλος, αρκετές ενώσεις Μαστίχας, συμπεριλαμβανομένου του ολεανονικού οξέος, του ολεανολικού και του γαλλικού οξέος δρουν ως ρυθμιστές των υποδοχέων που ενεργοποιούνται από τον πολλαπλασιαστική υπεροξισωμάτων (PPARs), οι οποίοι αναγνωρίζονται ως ρυθμιστές του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπιδίων, της φλεγμονής και της εξέλιξης της ίνωσης στο ήπαρ, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη NAFLD (Soulaïdopoulos S. et al., 2022).

1.3.2. Αντιοξειδωτική και καρδιοπροστατευτική δράση

Τα προϊόντα *P. lentiscus*, στις μέρες μας, έχουν ευρύ φάσμα χρήσεων στη βιομηχανία τροφίμων λόγω των δράσεων που σχετίζονται με τους δευτερογενείς μεταβολίτες τους όπως τα φλαβονοειδή, οι πολυφαινόλες και τα φαινολικά οξέα. Παρουσιάζουν αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση που οφείλεται σε μία ομάδα αρωματικών δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών που έχει ευρέως αναφερθεί, τις φαινολικές ενώσεις (Bampouli A. et al. 2015).

Η Μαστίχα έχει αναφερθεί ότι έχει ιαματικές ιδιότητες (γνωστές από την εποχή του Διοσκουρίδη, 70 μ.Χ.), συμπεριλαμβανομένων των αντιφλεγμονωδών, των αντιμικροβιακών και των αντικαρκινικών ιδιοτήτων (Assimopoulou A.N. & Parageorgiou V.P., 2005). Χάρη στα τριτερπένια, μπορεί να αναστείλει την οξείδωση της LDL in vitro και να δράσει στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος για να προκαλέσει αντιοξειδωτική και αντιαθηρογόνο δράση, για αυτό το λόγο σχετίζεται

με την καρδιαγγειακή προστασία και την ηπατοπροστασία (Triantafyllou A. et al., 2007).

Ένα πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε λεία μυϊκά κύτταρα αρουραίου, έδειξε ότι το εκχύλισμα Μαστίχας Χίου μείωσε την έκφραση του tumor necrosis factor α (TNF- α) και ανέστειλε τη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) όπου και τα δύο φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των οξειδωτικών διεργασιών (Pachi V.K. et al., 2020). Σε μία μελέτη in vitro που χορηγήθηκε πολικό εκχύλισμα Μαστίχας σε καλλιέργεια μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs), τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ανέστειλε την απόπτωση, τα επίπεδα της GSH αποκαταστάθηκαν και μειώθηκε η έκφραση του παράγοντα CD36 (συμβάλει στο σχηματισμό αθηροσκληρωτικών αφρωδών κυττάρων), ενώ τα αντίθετα αποτελέσματα προκαλεί η οξείδωση της LDL (oxLDL) (Dedoussis G.V.Z. et al., 2004).

1.3.3. Αντικαρκινική δράση

Η παραδοσιακή πεποίθηση που υπήρχε ότι το *Pistacia lentiscus* έχει αντικαρκινική δράση ειδικά στους όγκους του μαστού, ήπατος, στόμαχου, σπλήνας και μήτρας συνάδουν με μελέτες που καταδεικνύουν ότι η Μαστίχα Χίου προκαλεί απόπτωση και κατέχει αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (Triantafyllou A. et al., 2007). Έρευνες in vitro και in vivo έδειξαν κατασταλτικές ιδιότητες του λαδιού Μαστίχας στους όγκους ποντικών λόγω της μείωσης της έκφρασης της Ki- 67 και της επιβίωσης που είναι σημαντικοί παράγοντες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση κυττάρων (Pachi V.K. et al., 2020).

Σε μία άλλη μελέτη σε PC-3 καρκινικά κύτταρα του προστάτη, αποδείχθηκε ότι η Μαστίχα αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω της αναστολής της δραστηριότητας NF- κ B και του μονοπατιού κυτταρικής σηματοδότησης NF- κ B. Στην πραγματικότητα, ανέστειλε την ανάπτυξη των κυττάρων PC-3 και εμπόδισε τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1. Επιπλέον, κατέστειλε τη δραστηριότητα του NF- κ B στα κύτταρα PC-3, μείωσε τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 που αποτελεί γονίδιο- στόχο του NF- κ B, μείωσε το p-AKT και αύξησε τα πρωτεϊνικά επίπεδα του I κ B α (Giaginis C. and Theocharis S., 2011).

Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι το μαστιγέλαιο έχει κυτταροτοξική δράση *in vivo* στα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα, αλλά και σε μη ογκογόνα κύτταρα HEK293. Η κυτταροτοξικότητα που παρατηρήθηκε σε υγιή κύτταρα δεν αποτελεί εμπόδιο καθώς σε πολλές ιατρικές εφαρμογές παρουσιάζεται κυτταροτοξικότητα. Για παράδειγμα, η δοξορουβικίνη αποτελεί ένα χημειοθεραπευτικό παράγοντα που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρα, έχει κυτταροτοξική δράση σε υγιή κύτταρα και παρόλα αυτά αποτελεί μία ευρέως χρησιμοποιούμενη θεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο. (Tabanca N. et al. 2020).

1.4. Δράσεις Μαστίχας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και απόπτωση

Η απόπτωση αποτελεί μια φυσιολογική διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που έχει ως αποτέλεσμα την ομαλή και αποτελεσματική απομάκρυνση των καταστραμμένων κυττάρων, όπως τα κατεστραμμένα κύτταρα τα οποία προκύπτουν από τη βλάβη του DNA ή την ανάπτυξη. Μπορεί να προκληθεί με σήματα μέσα από το κύτταρο, γονιδιοτοξικό στρες, ή με εξωτερικά σήματα (δέσμευση συμπλόκων σε υποδοχείς κυτταρικού θανάτου). Ο καρκίνος προκαλεί απορρύθμιση των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου. Η απορρύθμιση αυτή της απόπτωσης δεν ευθύνεται μόνο για την ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου αλλά και για την αντοχή του στις θεραπείες. Τα περισσότερα αντικαρκινικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα, αξιοποιούν τις ενεργές φυσιολογικές αποπτωτικές οδούς σηματοδότησης για να πυροδοτήσουν το θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Έτσι, διατάραξη των αποπτωτικών οδών μπορεί να οδηγήσει σε αντίσταση σε φάρμακα, περιορίζοντας την αποτελεσματικότητα των θεραπειών (Pistritto G. et al. 2016).

Κύριο ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας διαδραματίζουν οι πρωτεάσες μέσω της κατάλυσης σημαντικών βιολογικών διεργασιών στους πολυκύτταρους οργανισμούς όπως η απόπτωση, η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού, η πήξη του αίματος και η αναδιαμόρφωση ιστών. Συγκεκριμένα, η κασπάση- 3 οδηγεί στην απόπτωση μέσω της κατάλυσης της ειδικής διάσπαση περισσότερων των 200 κυτταρικών πρωτεϊνών. Η προκασπάση-3 που ενεργοποιείται μέσω πρωτεολυτικής ωρίμανσης για να σχηματίσει την κασπάση-3, αποτελεί το πρόδρομο μόριο αυτής (Thomsen et al., 2013).

Η Μαστίχα, έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για αιώνες στη Μεσόγειο και τη Μέση Ανατολή, τόσο ως συμπλήρωμα διατροφής όσο και ως φυτικό φάρμακο. Έχει αποδειχθεί η επίδρασή της στο γαστρεντερικό σύστημα καθώς έχει αναφερθεί και η αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή δράση της. Ως φυσικός χημειοθεραπευτικός παράγοντας, το εκχύλισμα της Μαστίχας έχει αναφερθεί ότι έχει ανασταλτική δράση και αποπτωτικά αποτελέσματα γεγονός που σημαίνει ότι μπορεί να χρησιμεύσει ως χημειοθεραπευτικός παράγοντας για τη θεραπεία τύπων καρκίνου. Συγκεκριμένα, επάγει το κυτταρικό θάνατο στα HCT116 καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου που περιλαμβάνει γεγονότα που σχετίζονται με μονοπάτια εξαρτόμενα από τη κασπάση (ShengJin L. et. al, 2011).

Γενικά, τα γενετικά κωδικοποιημένα αποπτωτικά μονοπάτια εκτελούνται από ένα εξαιρετικά ρυθμιζόμενο δίκτυο σηματοδότησης που ενεργοποιείται από τις κασπάσες. Οι κασπάσες εκκίνησης -8, -9 και -10, συνδέουν τα πρώιμα μονοπάτια σηματοδότησης με τα όψιμα αποπτωτικά συμβάντα που εκτελούνται από κασπάσες τελεστές, όπως οι κασπάσες-3, -6 και -7. Στη συνέχεια, οι τελεστές κασπάσες μπορούν να διασπασουν πολλαπλά κυτταρικά υποστρώματα ζωτικής σημασίας, πρωτεΐνες/ένζυμα και DNA και τελικά, έχει ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Η ενεργοποίηση της κασπάσης -9 έχει συσχετιστεί με τον αποπτωτικό μηχανισμό που εκκινείται από ποσοτικές αλλαγές στις προ-αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, που εντοπίζονται στο μιτοχόνδριο και την απελευθέρωση του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος (Balan K.V. et al., 2005). Η κασπάση -3 λειτουργεί ως μόριο- τελεστής της απόπτωσης από όποιο μονοπάτι κι αν αυτή πυροδοτηθεί, προκαλώντας έτσι την εμφάνιση όλων των βιοχημικών και μορφολογικών αλλαγών που παρατηρούνται σε ένα αποπτωτικό κύτταρο (Slee EA, 2001).

1.5. Τριτερπένια και απόπτωση

Τα τερπένια αποτελούν τη κύρια χημική ομάδα της Μαστίχας και μπορούν να διαιρεθούν ανάλογα με τον αριθμό των δομικών μορίων των ισοπρενίων. Σε συνδυασμό με τις στερόλες δημιουργούν ομάδες ισοπρενοειδών με πιο σημαντικές χημικές δομές την ολεανάνη, το ουρσάνιο, το λουπάνιο και το νταμμαράνιο-ευφάνιο. Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί σε περίπου 30.000 ενώσεις (Dzubak P. et al., 2006).

Οι βιολογικές ιδιότητες τη Μαστίχας αποδίδονται στα τριτερπένια και κυρίως στο ισομαστικάδιενονικό οξύ και το μαστικάδιενονικό οξύ. Πιο αναλυτικά τα κύρια συστατικά της Μαστίχας είναι τα ισομερή του τριτερπενικού οξέος, δηλαδή το 24Z-ισομαστιχοδιενονικό οξύ (IMNA), το μαστικάδιενονικό οξύ (MNA) και το ολεανονικό οξύ καθώς και 24Z- ισομαστιχοδιενονικό οξύ (IMLA), μαστικάδιενονικό οξύ (MLA) και μορονικό οξύ (Brieudes V. et al, 2020).

Σύμφωνα με μία φυτοχημική έρευνα της Μαστίχας, 16 τετρακυκλικά τριτερπενοειδή (tirucallane), συμπεριλαμβανομένων 13 μη περιγραφόμενων τριτερπενοειδών, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από τη Μαστίχα. Ο τετρακυκλικός σκελετικός τύπος μίας εξ αυτών επιβεβαιώθηκε ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις διαπιστώθηκε ότι διαθέτουν ασυνήθιστους σκελετούς (abeo-tirucallane). Οι αντιφλεγμονώδεις αναλύσεις αποκάλυψαν ότι ορισμένες ενώσεις εμφάνισαν ισχυρότερες ανασταλτικές δραστηριότητες από τον θετικό μάρτυρα δεξαμεθαζόνης, το οποίο υποδεικνύει ότι τα τετρακυκλικά τριτερπενοειδή μπορούν να λαμβάνονται υπόψιν για τη χρήση της Μαστίχας ως θεραπεία της φλεγμονής. Επιπλέον, μια δοκιμασία κυτταροτοξικότητας έδειξε ότι μία από τις ενώσεις αυτές, η 3-oxo-tirucalla-7,11,24Z-trien-26-oic acid, εμφάνισε συγκρίσιμη κυτταροτοξική δράση έναντι στα κύτταρα HepG2 σε σχέση με τη δοξορουβικίνη, κάτι που αποδεικνύει ότι μπορεί να αποτελεί πιθανό αντικαρκινικό συστατικό (Liu W. et al., 2021).

Ακόμη, παρατηρήθηκε μέσα από πειραματικές διαδικασίες ότι κάποια τριτερπενοειδή όπως η αβιδίνη D, που έχουν δομικές ομοιότητες με τα γλυκορτικοειδή (GCs), προκάλεσαν πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα των γλυκορτιδοειδών (GR) και ενεργοποίηση της ανοσοκατασταλτικής δραστηριότητας του GR χωρίς ή περιορισμένη ενεργοποίηση της trans- μεταγραφικής δραστηριότητας του, το οποίο σημαίνει ότι αποτελούν ισχυρούς και εκλεκτικούς ρυθμιστές των υποδοχέων των γλυκορτικοειδών (Karra, 2020).

1.6. Γλυκορτικοειδή GCs- Υποδοχέας GR

Τα γλυκορτικοειδή (GCs), όπως η δεξαμεθαζόνη και η κορτιζόλη, είναι στεροειδείς ορμόνες που ασκούν τη δράση τους μέσω της δέσμευσης στους συγγενείς υποδοχείς τους, τους υποδοχείς γλυκορτικοειδών (GRs) και ελέγχουν κυτταρικές λειτουργίες

όπως ο μεταβολισμός, η ανάπτυξη, η ανοσοαπόκριση, η απόκριση στο στρες, η απόπτωση και η ομοιόσταση της γλυκόζης. Οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (GR) ανήκουν στη μεγάλη υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων που δρουν κυρίως ως παράγοντες μεταγραφής (Vitellius G. et al., 2018, Karra A.G. et al., 2018).

Η GCs-σηματοδότηση παρουσιάζει μία ακολουθία βημάτων που οδηγούν σε ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου στόχου και οποιοδήποτε βήμα της σηματοδότησης αποκλίνει από το φυσιολογικό, μπορεί να οδηγήσει σε διατάραξη της GCs-σηματοδότησης. Το σύνδρομο μερικής ή γενικευμένης αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένο επίπεδο και δραστικότητα του GR, μειωμένη δέσμευση ορμονών, ελάττωμα στην πυρηνική μετατόπιση GR, μείωση ή έλλειψη δέσμευσης DNA ή μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις GR (Vitellius G. et al., 2018).

Ο GR εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και κατά τη δέσμευση του συνδέτη, ο GR μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου ρυθμίζει θετικά ή αρνητικά τη μεταγραφή μιας πληθώρας γονιδίων-στόχων GR, είτε μέσω άμεσης δέσμευσης σε συγκεκριμένα στοιχεία ορμονικής απόκρισης του πυρηνικού DNA, είτε με αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και ρύθμιση του έκφραση των γονιδίων-στόχων τους. Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να δράσουν με μη γονιδιωματικούς μηχανισμούς δράσης, μέσω ενεργοποίησης κυτταροπλασματικών ή δεσμευμένων στη μεμβράνη GR, όπως ο μεμβρανώδης συζευγμένος με G υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, ή μέσω μη ειδικών φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων με την κυτταρική μεμβράνη (Karra A.G. et al., 2018).

Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή είναι από τα πιο συχνά συνταγογραφούμενα φάρμακα για τη θεραπεία αυτοάνοσων, αλλεργικών και φλεγμονωδών ασθενειών. Τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται κυρίως για τις ισχυρές αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές δραστηριότητές τους που προκαλούνται μέσω μεταγωγής σήματος από τον πυρηνικό τους υποδοχέα, τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR). Ωστόσο η συστηματική χρήση των γλυκοκορτικοειδών σε μεγάλες δόσεις για θεραπευτικούς σκοπούς, μπορεί να συνοδεύεται με ανεπιθύμητα αποτελέσματα όπως μεταβολικές ανωμαλίες, υπέρταση, έλκος, διαβήτη τύπου II, ευαισθησία σε λοιμώξεις κ.α (Sulaiman. R.S et al., 2018).

1.7. P-53

Το p53 αποτελεί έναν ογκοσταλτικό και μεταγραφικό παράγοντα που ενεργοποιείται κατά τη βλάβη του DNA. Σκοπός του είναι η διακοπή ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων ή η απόπτωση μέσω της επαγωγής γονιδίων- στόχων που εμπλέκονται σε αυτές τις διαδικασίες. Η ενεργοποίηση του p53 συμβαίνει ως απόκριση στο γονιδιοτοξικό στρες, μέσω μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων όπως ακετυλίωση και φωσφορυλίωση, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση πρωτεϊνών και πυρηνικό εντοπισμό που οδηγεί σε δέσμευση σε ειδικούς για την αλληλουχία προαγωγείς των γονιδίων- στόχων ως τελικό αποτέλεσμα της λειτουργίας του ως παράγοντα μεταγραφής. Η ενεργοποίηση του P53 είναι σημαντική για τη πρόληψη πιθανού μετασχηματισμού του όγκου αλλά και για την αποτελεσματική απόκριση σε θεραπείες που στοχεύουν στην εκρίζωση του όγκου. Το γονίδιο PUMA είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό στη πρόκληση απόπτωσης. Πειράματα σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου έδειξαν ότι το PUMA απαιτείται για την απόπτωση που προκαλείται από το p53 (Pistritto G. et al. 2016).

Μελέτες έδειξαν ότι οι λειτουργίες του κυτταρικού κύκλου p53 και της απόπτωσης είναι σημαντικές για τη πρόληψη ανάπτυξης όγκου καθώς ρυθμίζει πολλές κυτταρικές διεργασίες όπως το μεταβολισμό, την αντιοξειδωτική απόκριση και την επιδιόρθωση του DNA (Chen J., 2016). Απουσία λειτουργίας της πρωτεΐνης p53 μειώνει σημαντικά την απόπτωση που προκαλείται από ακτινοβολία και φάρμακα σε μια ποικιλία συστημάτων κυττάρων ποντικού και ανθρώπου. Η Bcl 2 είναι αντι- αποπτωτική πρωτεΐνη ικανή να καταστείλει την απόπτωση που εξαρτάται από την p53 στα HCT116 ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και η σίγαση της προκαλεί μαζική απόπτωση που εξαρτάται από την p53, απουσία γονιδιοτοξικών φαρμάκων, απαραίτητη για την ενεργοποίηση της p53 (Balan K.V. et al., 2007).

1.8. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματική εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός των βιολογικών δράσεων της Μαστίχας Χίου και πιο συγκεκριμένα η μελέτη επίδρασης κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας της Μαστίχας Χίου στον κυτταρικό κύκλο και στους αποπτωτικούς μηχανισμούς.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Οργανολογία

Κατά τη διάρκεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα εξής όργανα:

- Συσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminar Flow Hood): Tel Star AV-30/70
- Υδατόλουτρο
- Επωαστήρας: ThermoScientific
- Μικροσκόπιο στα κύτταρα: KRUSS
- Φυγόκεντρος στις κυτταροκαλλιέργειες: Jouan BR4
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης: Biorad
- Συσκευή μεταφοράς (Transfer): Biorad
- Vortex: Kisker
- Heat blocker: KISKER
- Φυγόκεντρος: Eppendorf
- Ζυγός: KERN
- Quick spin: Nippon Genetics
- Sonicator: Hielscher
- Κασετίνα: Fuji
- Μεμβράνες: GE Healthcare Life Sciences

2.2. Υλικά

2.2.1. Θρεπτικά

- DMEM-cis without phenol red: Gibco
- DMEM (ροζ): Gibco
- Θρυψίνη: Gibco
- FBS: Gibco

2.2.2. Χημικά

- Acrylamide/Bis acrylamide 40%: Biorad
- TEMED → AppliChem
- Υπερθεϊκό αμμώνιο (Ammonium persulfate) APS → SERVA
- Tris- HCL: SERVA

- DMSO: AppliChem
- ECL A+ ECL B: Santa Cruz
- Σκόνη γάλακτος: Regilait
- Bio-Αιθανόλη: Honeywell
- Tween: Sigma
- FBS (Gibco)
- Phenyl Methyl Sulfonyl Floride PMSF: SERVA
- Protease inhibitors: Sigma
- Μάρτυρας μοριακού βάρους: Thermo Scientific
- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) → SERVA
- Bradford protein assay: Bio-Rad
- Bromophenol blue: Fluka
- Δεξαμεθαζόνη (DEX): Sigma
- Fixer: Fuji
- Developer: Fuji

2.2.3. Κλάσματα Μαστίγας Χίου

Η ρητίνη από το Μαστιχόδεντρο της Νότιας Χίου παραλήφθηκε από την ένωση Μαστιχοπαραγωγών της Χίου και κλασματώθηκε στο πανεπιστήμιο University of Eastern Piedmont στη Β. Ιταλία από την ερευνητική ομάδα του Giovanni Appendino. Τα κλάσματα που προέκυψαν ήταν αυξανόμενης πολικότητας:

- 1)155a (μη πολικό)- Προέκυψε με εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα
- 2)155b (ημι-πολικό)- Προέκυψε με εκχύλιση με αιθυλοξικό
- 3)155c (πολικό)- Προέκυψε με εκχύλιση με τετραϋδοφουράνιο

2.2.4. Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων

Δεξαμεθαζόνη (Dexamethazone, DEX): Διαλύεται σε 100% αιθανόλη και η αποθήκευση της γίνεται στους -20 °C.

Υπερθεϊκό αμμώνιο (Ammonium persulfate, APS) 10%: Σε 1ml ddH₂O διαλύονται 100mg APS και η αποθήκευση γίνεται στους -20°C.

Φθοριούχο φαινυλομεθυλοσουλφονύλιο (Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)200mM:

Σε 2ml ισοπροπανόλης διαλύονται 0.07gr PMSF και το διάλυμα αποθηκεύεται στους -20°C. Με αραιώση του διαλύματος 10% σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20mM.

Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων (Lysis Buffer):

Αποτελείται 0,5% TritonX-100, 20mM Tris pH 7.5, 0.5%, 250mM NaCl και 3mM EDTA και η αποθήκευση γίνεται στους 4°C. Στη συνέχεια, σε 1ml του παραπάνω διαλύματος προστίθενται επιπλέον 0.5μl PMSF 20mM (-20°C), 10μl μείγματος Protease inhibitors, 2μl DTT 1M (-20°C).

Διάλυμα επιστοίβαξης δείγματος (Sample Buffer 4x):

Αποτελείται από 1M Tris pH 6,8 , 10% γλυκερόλη, 10% SDS, 4% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% κυανού της βρωμοφαινόλης. Η αποθήκευση γίνεται στους -20°C.

Τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθάνιο [Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris] 20mM pH 7.5

Προκύπτει από την ανάμιξη 20μl stock διαλύματος Tris 1M pH 7,5 (4 °C) και 980μl ddH₂O και διατηρείται σε R.T.

Τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθάνιο υδροχλωρίδιο [Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride, Tris-HCl] 1.5 M pH 8.8:

Διαλύονται 36,342gr Tris σε dH₂O για τη Παρασκευή 0.2 L. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με τη προσθήκη HCl 12N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH₂O. Η αποθήκευση γίνεται στους 4°C.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10x:

Σε όγκο 1lt ddH₂O διαλύονται 30.3gr Tris base και 144.00gr γλυκίνης, αποθηκεύεται σε R.T.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1x:

Πραγματοποιείται αραίωση Running Buffer 10x σε dH₂O σε αναλογία 1:9 και προστίθεται στο διάλυμα 10ml SD σε αναλογία 0.1% (10ml). Διατηρείται σε R.T.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10x:

Αποτελείται από 20% MeOH, 10% Running Buffer 10x, και 0.05% SDS. Συμπληρώνεται ο όγκος με προσθήκη dH₂O και η αποθήκευση του διαλύματος γίνεται στους 4 °C.

Ρυθμιστικό διάλυμα Τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθάνιο - Πολυσορβικό (Tris Buffered Saline - Tween, TBS TBS-T) 1x:

Αποτελείται από 10% stock buffer TBS 10x και 0,6% Tween-20. Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με dH₂O και η αποθήκευση γίνεται σε R.T.

Διαλύματα για εμφάνιση σήματος:

Πραγματοποιείται ανάμιξη του διαλύματος developer για εμφάνιση σήματος και fixer για τη σταθεροποίηση του, με dH₂O, ώστε να προκύψει η επιθυμητή συγκέντρωση αυτών.

2.2.5. Αντισώματα

Τα αντισώματα πριν τη χρήση τους στη πειραματική διαδικασία, διαλύονται σε TBST 1×, milk 2% και η αποθήκευσή τους γίνεται στους -20 °C.

Πρωτογενή αντισώματα:

- β-actin
- Procaspase 3
- p53

Δευτερογενή:

- Mouse- HRP
- Rabbit-HRP

2.3. Μέθοδοι

2.3.1. Καλλιέργεια κυττάρων

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές HEK293 (Human embryonic kidney 293 cells, ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα) που καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες στον επωαστήρα. Ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το DMEM θρεπτικό (με phenol red) εμπλουτισμένο με 10% FBS cis (κατεργασία με ενεργό άνθρακα για την αφαίρεση ορμονών), 1% Pen/Strep και 1% L-glut. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση των κυττάρων σε πλακίδιο Neubauer και όταν ο αριθμός των κυττάρων έφτασε στο επιθυμητό πραγματοποιήθηκε στρώσιμο σε 6well plates με τη προσθήκη DMEM-cis (χωρίς δείκτη, κόκκινο της φαινόλης) για 48 ώρες. Μετά πραγματοποιήθηκε η προσθήκη των προς μελέτη κλασμάτων για άλλες 24 ώρες.

2.3.2. Λύση κυττάρων

Προστέθηκε Lysis buffer για τη λύση των κυττάρων που αποτελείται από:

-20mM Tris pH 7.5

- 0.5% Triton X-100

- 250mM NaCl

- 3mM EDTA

Μετά τη προσθήκη του, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον πάγο για 20 λεπτά και στη συνέχεια ακολούθησε η χρήση υπερήχων (sonication) όπου πραγματοποιήθηκαν 5 κύκλοι έκθεσης του ενός δευτερολέπτου, με μεσοδιάστημα μεταξύ των εκθέσεων 30 δευτερόλεπτα και ένταση 40% με σκοπό τη διάσπαση των νουκλεϊκών οξέων.

2.3.3. Μέθοδος Bradford

Αποτελεί μία μέθοδο για το προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα όπου χρησιμοποιείται η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 που έχει αρνητικό φορτίο και στην ελεύθερη μορφή της το χρώμα της είναι κόκκινο με μέγιστη απορρόφηση στα 465nm. Το χρώμα της μετατρέπεται σε μπλε με μέγιστη απορρόφηση στα 595 nm, μόλις αλληλοεπιδράσει με τα θετικά φορτία μιας πρωτεΐνης σε όξινες συνθήκες. Η ένταση της μπλε απόχρωσης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού περιεχομένου του κυτταρικού διαλύματος.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αραίωση του διαλύματος Bradford από 5X (stock) σε 1X και έπειτα προστέθηκε 1μl του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε 1ml του αντιδραστηρίου Bradford 1X. Στη συνέχεια, τα δείγματα παρέμειναν για 20 λεπτά στο σκοτάδι και φωτομετρήθηκαν στα 595 nm. Η συνολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα υπολογίστηκε με τον τύπο $y=0,0345x+0,01$ ο οποίος προκύπτει μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με διαλύματα BSA γνωστών συγκεντρώσεων, που έγινε στο εργαστήριο.

2.3.4. Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Για να προετοιμαστούν για την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε μείγμα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, συγκέντρωσης προσδιορισθείσας με τη μέθοδο Bradford, Tris 20M και Sample buffer 4x. Τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 3-5 λεπτά και ηλεκτροφορούνται στα 80V. Χρησιμοποιήθηκαν πηκτές ακρυλαμιδίου 10% με την εξής σύσταση:

	Separating gel (διαχωρισμού)	Stacking gel (επιστοιβάξης)
ddH ₂ O	2,425 ml	2,025ml
Tris HCl pH=8,8, 1,5M	1,25 ml	-
Tris HCl pH=6,8, 0,5M	-	0,21 ml
SDS 10%	50 μ l	25 μ l
Acr	1,25 ml	0,25 ml
Temed	2,5 μ l	2,5 μ l
Aps	25 μ l	12,5 μ l

2.3.5. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί η μεταφορά των δειγμάτων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, εφαρμόζοντας συνθήκες σταθερής έντασης ρεύματος στα 0.35 A για 70 min σε Transfer buffer 1X. Στη συνέχεια, ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης σε TBST 1x και έπειτα επώαση υπό ανάδευση της μεμβράνης, με διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος 10% σε TBST 1x (blocking) για 1h, σε RT. Μετά, γίνεται επώαση της μεμβράνης για ολόκληρο το βράδυ (16h-20h) με το πρωτογενές αντίσωμα, υπό ανάδευση στους 4 ο C. Με το τέλος της επώασης, πραγματοποιούνται 4 πλύσεις με TBST 1x, που διαρκούν από 5 min. Έπειτα πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθούν 3 πλύσεις διάρκειας 5 min με TBST 1x και προστίθενται στη μεμβράνη τα ECL (A+B) (υπόστρωμα υπεροξειδάσης) για 3 min. Τέλος, τοποθετείται η μεμβράνη σε ειδική κασετίνα και μεταφέρεται σε σκοτεινό θάλαμο για την εμφάνιση σε φιλμ. Για την εμφάνιση και σταθεροποίηση του αποτελέσματος γίνεται εμβάπτιση του φιλμ σε διάλυμα developer, πλύση σε νερό και εμβάπτιση σε fixer για 1 min στο καθένα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

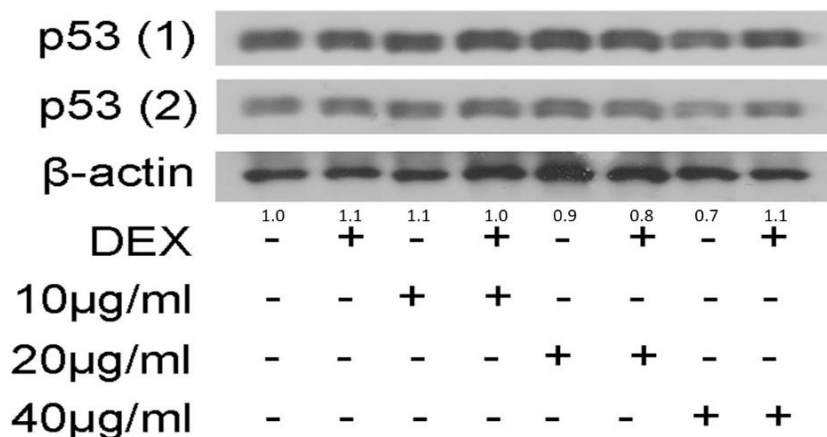
3.2. Διερεύνηση των βιολογικών δράσεων εκχυλίσματος Μαστίχας Χίου

3.2.1. Διερεύνηση της επίδρασης του ημι-πολικού και πολικού εκχυλίσματος Μαστίχας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της P-53 και προκασπάσης-3.

Για τη διερεύνηση της επίδρασης του ημιπολικού και πολικού κλάσματος ρητίνης του μαστιχόδεντρου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3 και του p53, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων HEK 293 σε θρεπτικό μέσο για 48 ώρες. Όπως έχει αναφερθεί, η κασπάση 3 αποτελεί μόριο-τελεστή της απόπτωσης από όποιο μονοπάτι κι αν πυροδοτηθεί και προκαλεί εμφάνιση όλων των βιοχημικών και μορφολογικών αλλαγών που παρατηρούνται σε ένα αποπτωτικό κύτταρο. Το P53 ενεργοποιείται κατά τη βλάβη του DNA για να επάγει συγκεκριμένα γονίδια- στόχους που εμπλέκονται σε οποιοδήποτε αναστολή ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων ή απόπτωση (Slee EA, 2001)

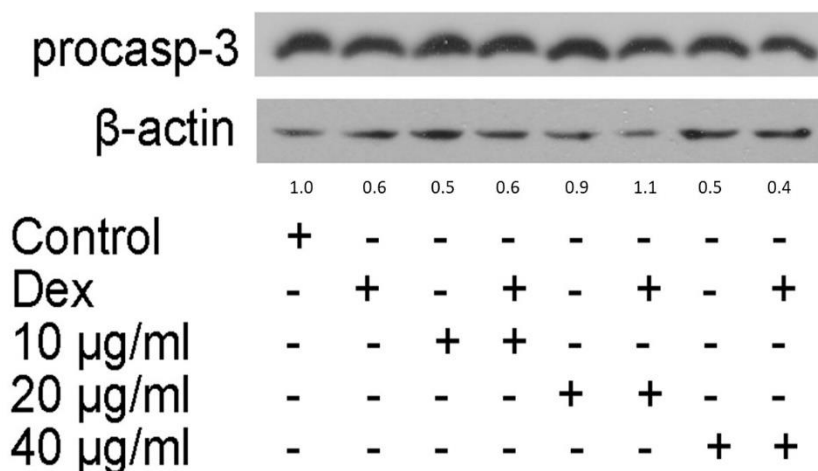
Στη συνέχεια, προστέθηκαν τα υπό μελέτη κλάσματα ρητίνης της Μαστίχας Χίου σε συγκεντρώσεις 10, 20 και 40 $\mu\text{g/ml}$, απουσία και παρουσία δεξαμεθαζόνης 10^{-8}M , η οποία είναι συνθετικό γλυκοκορτικοειδές και ανταγωνιστής του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες. Ακολούθησε η συλλογή των κυττάρων και η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, η μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ανοσοαποτύπωση κατά Western και ο εντοπισμός με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων έναντι του P53 και προκασπάσης-3. Ως μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η β - ακτίνη. Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα αποτελέσματα:

A)



Εικόνα 1: Απεικόνιση της επίδρασης του ημιπολικού κλάσματος ρητίνης του μαστιχόδεντρου, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του p53 που συμμετέχει στον μηχανισμό της απόπτωσης και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

B)



Εικόνα 2: Απεικόνιση της επίδρασης του ημιπολικού κλάσματος ρητίνης του μαστιχόδεντρου, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3, μορίου που συμμετέχει στο μηχανισμό της απόπτωσης.

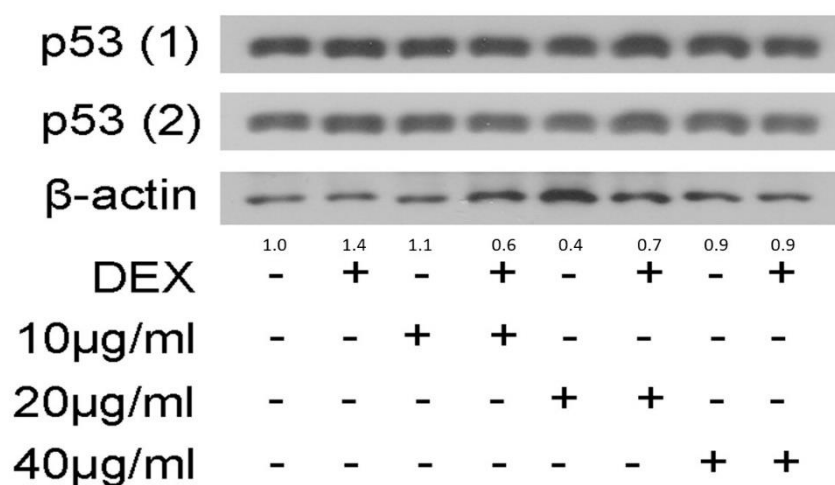
Αναπτύχθηκαν κύτταρα HEK293 σε 6 well plates (200.000 cells/ well), σε DMEM cis θρεπτικό χωρίς phenol red, εμπλουτισμένο με 10% FBS cis, 1% Pen/Strep, 1% L-γλουταμίνη (2 ml θρεπτικό / well) για 48 ώρες. Ακολούθησε η προσθήκη των υπό μελέτη κλασμάτων, απουσία και παρουσία DEX $10^{-8}M$, σε συγκεντρώσεις 10, 20 και 40 μg/ml,

και επώαστηκαν για 24 ώρες. Έγινε χρήση ειδικών αντισωμάτων για τον εντοπισμό του p53, της προκασπάσης-3 και της β- ακτίνης και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος ImageJ. Στην Εικόνα 1 απεικονίζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του p53 και στην Εικόνα 2 απεικονίζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης 3.

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του p-53, παρατηρήθηκε ότι έχουν αύξηση 10% με τη προσθήκη 10 µg/ ml του ημιπολικού κλάσματος ρητίνης και κατά τη συν- επώαση με DEX δεν υπήρξε μεταβολή. Με τη προσθήκη 20 µg/ ml φαίνεται ότι μειώθηκαν 10% και κατά τη συν-επώαση με DEX 20%. Μείωση 30% παρατηρήθηκε με τη προσθήκη 40 µg/ ml του κλάσματος και κατά τη συν- επώαση με DEX παρατηρήθηκε αύξηση 10% σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς.

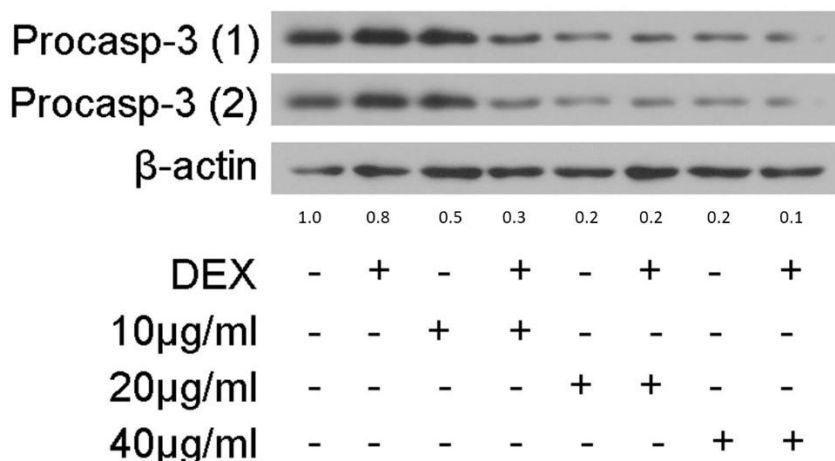
Στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης- 3, υπήρξε μείωση με τη προσθήκη του ημιπολικού κλάσματος. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση 50% σε σχέση με το control με τη προσθήκη 10 µg/ml και 40 µg/ml ημιπολικού κλάσματος, απουσία DEX. Πολύ μικρή αύξηση παρατηρήθηκε τη προσθήκη 20µg/ml του κλάσματος παρουσία DEX, ενώ η μεγαλύτερη μείωση που παρατηρήθηκε ήταν 60% με τη προσθήκη 40µg/ml παρουσία DEX.

Γ)



Εικόνα 3: Απεικόνιση της επίδρασης του πολικού κλάσματος ρητίνης του μαστιχόδεντρου, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του p53 που συμμετέχει στον μηχανισμό της απόπτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Δ)



Εικόνα 4: Απεικόνιση της επίδρασης του πολικού κλάσματος ρητίνης του μαστιχόδεντρου, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3, μορίου που συμμετέχει στο μηχανισμό της απόπτωσης.

Αναπτύχθηκαν κύτταρα HEK293 σε 6 well plates (200.000 cells/ well), σε DMEM cis θρεπτικό χωρίς phenol red, εμπλουτισμένο με 10% FBS cis, 1% Pen/Strep, 1% L-γλουταμίνη (2 ml θρεπτικό / well) για 48 ώρες. Ακολούθησε η προσθήκη των υπό μελέτη κλασμάτων, απουσία και παρουσία DEX $10^{-8}M$, σε συγκεντρώσεις 10, 20 και 40 $\mu g/ml$, και επώαστηκαν για 24 ώρες. Έγινε χρήση ειδικών αντισωμάτων για τον εντοπισμό του p53, της προκασπάσης-3 και της β - ακτίνης και έγινε επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη χρήση του προγράμματος ImageJ. Στην Εικόνα 3 απεικονίζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του P53 και στην Εικόνα 4 απεικονίζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης 3.

Με τη προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων του πολικού κλάσματος ρητίνης του μαστιχόδεντρου Χίου, παρατηρήθηκε μια γενικότερη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του p53 παρουσία DEX. Αύξηση 10 % σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς πραγματοποιήθηκε μόνο με τη προσθήκη 10 $\mu g/ ml$ του κλάσματος, ενώ με τη προσθήκη 20 $\mu g/ ml$ υπήρξε μείωση κατά 60%, ενώ παρουσία και DEX η παρατηρούμενη μείωση ήταν 30%. Με τη προσθήκη 40 $\mu g/ ml$ παρουσία και απουσία DEX παρατηρήθηκε μείωση 10%.

Στα επίπεδα της προκασπάσης-3 υπήρξε μείωση έως και 80% με τη προσθήκη 20 $\mu g/ ml$ παρουσία DEX και τη προσθήκη 40 $\mu g/ ml$ απουσία DEX, ενώ η μεγαλύτερη

μείωση υπήρξε με τη προσθήκη 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ παρουσία DEX σε ποσοστό 90%. Μείωση 50 % παρατηρήθηκε και με τη προσθήκη 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ενώ κατά τη συν-επώαση με DEX παρατηρήθηκε μείωση κατά 70% σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η Μαστίχα Χίου συλλέγεται από την ελληνική αρχαιότητα και είναι πλέον γνωστή για τις θεραπευτικές της ιδιότητες. Μελέτες αποδεικνύουν τις αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές της ιδιότητες με κύριες χημικές ενώσεις των προϊόντων μαστιχόδεντρου τα τερπένια και τις φαινολικές ενώσεις, ενώ έχουν αναφερθεί και οι αντικαρκινικές της ιδιότητες (Soulaïdopoulos S. et al., 2022, Assimopoulou A.N. & Parageorgiou V.P., 2005, Pachi V. et al., 2020). Τα συστατικά της Μαστίχας Χίου όπως τα τριτερπένια, οι φυτοστερόλες και πολλές άλλες χημικές ενώσεις σε μικρότερες συγκεντρώσεις, φαίνεται να είναι υπεύθυνα για τις θεραπευτικές δράσεις του φυτού (Bamprouli A. et al., 2015, Pachi V.K. et al., 2020). Τα τριτερπένια συγκεκριμένα, είναι κυρίως υπεύθυνα για την αντικαρκινική της δράση αφού έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω εξωγενών και ενδογενών οδών σηματοδότησης (Giaginis C. & Theocharis S., 2011). Ακόμα, παρουσιάζουν παρόμοια χημική δομή με τα γλυκορτικοειδή, το οποίο σημαίνει πιθανόν να μπορούν να αποτελέσουν ισχυρούς και επιλεκτικούς ρυθμιστές του υποδοχέα των γλυκορτικοειδών (Karra, 2020).

Τα γλυκορτικοειδή είναι γνωστά για την αντικαρκινική τους δράση ενώ παρουσιάζουν παρόμοια δομή με τις τριτερπενοειδείς ενώσεις. Συγκεκριμένα, η δεξαμεθαζόνη και η κορτιζόλη, είναι στεροειδείς ορμόνες που ελέγχουν κυτταρικές λειτουργίες όπως ο μεταβολισμός, η ανάπτυξη, η ανοσοαπόκριση, η απόκριση στο στρες, η απόπτωση και η ομοιοστάση της γλυκόζης (Karra A.G. et al., 2018). Μέχρι σήμερα, τα συνθετικά γλυκορτικοειδή όπως η δεξαμεθαζόνη και το φυσικό γλυκορτικοειδές κορτιζόνη συνταγογραφούνται ως φάρμακα για τη θεραπεία αυτοάνοσων, αλλεργικών και φλεγμονωδών ασθενειών. Όμως, η συστηματική τους χρήση μερικές φορές έχει ανεπιθύμητα αποτελέσματα όπως μεταβολικές ανωμαλίες, υπέρταση, έλκος, διαβήτης τύπου II, ευαισθησία σε λοιμώξεις κ.α (Sulaiman. R.S et al., 2018).

Είναι γνωστό ότι κύριο ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας διαδραματίζουν οι πρωτεάσες μέσω της κατάλυσης σημαντικών βιολογικών διεργασιών στους πολυκύτταρους οργανισμούς όπως η απόπτωση, η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού, η πήξη του αίματος και η αναδιαμόρφωση των ιστών. Συγκεκριμένα, η κασπάση- 3 καταλύει την ειδική διάσπαση περισσότερων των 200 κυτταρικών πρωτεϊνών, οδηγώντας σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Η προκασπάση-3 αποτελεί το πρόδρομο μόριο αυτής, αφού ενεργοποιείται μέσω πρωτεολυτικής ωρίμανσης για να σχηματίσει την κασπάση-3 (Thomsen et al., 2013).

Όσον αφορά το ρόλο της p53, η πρόληψη του καρκίνου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από αυτή την ογκοσταλτική πρωτεΐνη. Έχει την ικανότητα να εξαλείφει περίσσεια, κατεστραμμένα ή μολυσμένα κύτταρα από απόπτωση και είναι ζωτικής σημασίας για τη σωστή ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε πολυκύτταρους οργανισμούς. Ενεργοποιείται εσωτερικά και εξωτερικά ως απόκριση στο στρες και με τη σειρά της επάγει είτε τη διακοπή της ανάπτυξης βιώσιμων κυττάρων είτε απόπτωση που είναι απαραίτητη για τη καταστολή του όγκου. Η p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων τα οποία περιλαμβάνουν στις ρυθμιστικές τους περιοχές θέσεις πρόσδεσης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Δεν ενεργοποιεί μόνο γονίδια που επάγουν την απόπτωση, αλλά και γονίδια που αναστέλλουν τις οδούς μεταγωγής μηνυμάτων της κυτταρικής επιβίωσης. Η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιεί τον κυτταρικό θάνατο, εντούτοις, η επαγωγή της δεν οδηγεί απαραίτητως στην έναρξη πλήρους αποπτωτικής κυτταρικής απόκρισης, καθώς υπάρχουν αποπτωτικά ερεθίσματα που συνεργάζονται με την οδό που ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη p53. Η απώλεια ενός από τα μέλη αυτών των αποπτωτικών οδών που συνεργάζονται με την πρωτεΐνη p53 είναι δυνατό να αναστέλει την αποπτωτική δράση της p53 (Wu x. et al, 1993, Haupt C. et al., 2003).

Σύμφωνα με μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι τα εκχυλίσματα αιθανόλης και εξανίου της Μαστίχας Χίου, έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες in vitro όπως εκδηλώνεται από την ικανότητά τους να προλαμβάνουν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα HCT116 του παχέος εντέρου στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και να επάγουν απόπτωση ανεξάρτητα από την σύνθεση των πρωτεϊνών p53, p21, Bcl-2 (Dima K. et al, 2009, Giaginis C. and Theocharis S.). Ακόμη, 50% αιθανολικό εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου, περιέχει ενώσεις που αναστέλλουν το πολλαπλασιασμό και επάγουν το θάνατο ανθρώπινων

καρκινικών κυττάρων HCT116 του παχέος εντέρου in vitro. Η θεραπεία με Μαστίχα προκαλεί διακοπή των κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα, ενεργοποίηση των κασπασών -8, -9, -3 και προκαλεί διάφορες μορφολογικές αλλαγές τυπικές της απόπτωσης στα κυτταρικά οργανίδια. Αυτά τα γεγονότα είναι εξαρτώμενα από το χρόνο και τη δόση αλλά ανεξάρτητα από τη p53 και τη p21 (Balan V.K. et al., 2007).

Βασιζόμενοι σε όλα τα παραπάνω, σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση των βιολογικών δράσεων των κλασμάτων ρητίνης διαφορετικής πολικότητας της Μαστίχας Χίου σε κύτταρα HEK293. Πιο συγκεκριμένα, στόχος ήταν η μελέτη επίδρασης κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας της Μαστίχας Χίου στον κυτταρικό κύκλο και στους αποπτωτικούς μηχανισμούς σε κύτταρα HEK293.

Για να αξιολογηθεί η βιολογική δράση του ημιπολικού κλάσματος Μαστίχας Χίου, εξετάστηκαν με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p53 και της προκασπάσης-3 προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση των διαφορετικών κλασμάτων ρητίνης που προέρχονται από το φυτό *Pistacia Lentiscus*, στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση, σε κύτταρα HEK293.

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p53 μειώθηκαν σε μικρό ποσοστό με τη μεγαλύτερη μείωση στο 30%. Η αυξανόμενη χορήγηση της ουσίας προκάλεσε μεγαλύτερη μείωση, ενώ η παρουσία DEX δε φαίνεται να επίδρασε περεταίρω στις μεταβολές. Στη συνέχεια, εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3 ώστε να διερευνηθεί η αποπτωτική δράση του ημιπολικού κλάσματος ρητίνης. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3 μειώθηκαν παρουσία του ημιπολικού κλάσματος στη χορήγηση 10 µg/ml παρουσία ή απουσία DEX, ενώ η μεγαλύτερη μείωση που παρατηρήθηκε ήταν - 60% στη χορήγηση 40 µg/ml παρουσία DEX.

Συμπεραίνοντας από τα παραπάνω, τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν τη μείωση της p53 και κατά συνέπεια την πιθανή αναστολή της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Το ημιπολικό κλάσμα ρητίνης της Μαστίχας Χίου επάγει την απόπτωση καθώς μειώνονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3. Η δράση του πιθανότατα να οφείλεται στα τριτερπένια δεδομένου της μεγάλης περιεκτικότητας της ρητίνης σε αυτά. Τα αποτελέσματα χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης και επαλήθευσης όσον αφορά τον ακριβή τους μηχανισμό.

Ακολούθησε η αξιολόγηση της επίδρασης του πολικού κλάσματος ρητίνης της Μαστίχας Χίου, όμοια με την αξιολόγηση που έγινε στο ημιπολικό κλάσμα της Μαστίχας Χίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της p53 με τη μεγαλύτερη μείωση να είναι 60% με τη χορήγηση 20μg/ml απουσία DEX ενώ με τη προσθήκη 40 μg/ ml παρουσία και απουσία DEX παρατηρήθηκε μείωση 10%. Η παρουσία DEX φαίνεται να μην επιδρά περαιτέρω στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων. Στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3, παρατηρείται μείωση με τη χορήγηση του πολικού κλάσματος ρητίνης. Συγκεκριμένα, η μείωση αυτή είναι αυξανόμενη με τη χορήγηση αυξανόμενης ποσότητας της ουσίας παρουσίας DEX. Η μεγαλύτερη μείωση που προκάλεσε είναι έως 90% με τη χορήγηση 40 μg/ml παρουσία DEX.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του p53 από το πολικό κλάσμα, γεγονός που οδηγεί στη πιθανή αναστολή της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και των αποπτωτικών μηχανισμών. Το πολικό κλάσμα ρητίνης της Μαστίχας Χίου επάγει την απόπτωση καθώς μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης- 3. Τα αποτελέσματα αυτά χρήζουν διερεύνησης καθώς όσον αφορά το p53, παρατηρείται μείωση στη προσθήκη μικρής συγκέντρωσης και όχι στη μεγαλύτερη, επομένως ενδέχεται να οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα. Με βάση αυτό δε κρίνεται στατιστικώς σημαντική η μείωση στο p53. Από την άλλη πλευρά, ενεργοποιούνται μηχανισμοί απόπτωσης οπότε υπάρχουν πιθανές αντικαρκινικές δράσεις, σε συμφωνία με προαναφερθείσες μελέτες. Οι δράσεις αυτές πιθανόν να οφείλονται σε φαινολικές ενώσεις δεδομένου ότι το κλάσμα αυτό είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις.

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, σε αυτή τη μελέτη αποδείχθηκε ότι το ημιπολικό και πολικό κλάσμα ρητίνης του δέντρου Μαστίχας Χίου, εμφανίζουν αποπτωτικές δράσεις, όπως αποδεικνύεται από τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης- 3. Η μείωση της p-53 από το ημιπολικό κλάσμα δείχνει πιθανή καταστολή των μηχανισμών ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και των αποπτωτικών μηχανισμών. Παρατηρήσεις αρκετά σημαντικές, που όμως χρήζουν επαλήθευσης και περαιτέρω μελέτης για τον ακριβή χαρακτηρισμό των βιοχημικών μηχανισμών αυτών των δράσεων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amerikanou, C., Papada, E., Gioxari, A., Smyrnioudis, I., Kleftaki, S.-A., Valsamidou, E., Bruns, V., Banerjee, R., Trivella, M. G., Milic, N., Medić-Stojanoska, M., Gastaldelli, A., Kannt, A., Dedoussis, G. V., & Kaliora, A. C. (2021). Mastiha has efficacy in immune-mediated inflammatory diseases through a microRNA-155 Th17 dependent action. *Pharmacological Research*, 171, 105753. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105753>
- Assimopoulou, A. N., & Papageorgiou, V. P. (2005). GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. *Chia*. *Biomedical Chromatography*, 19(4), Article 4. <https://doi.org/10.1002/bmc.454>
- Balan, K. V., Demetzos, C., Prince, J., Dimas, K., Cladaras, M., Han, Z., Wyche, J. H., & Pantazis, P. (2005). Induction of Apoptosis in Human Colon Cancer HCT116 Cells Treated with an Extract of the Plant Product, Chios Mastic Gum. *In Vivo*.
- Balan, K. V., Prince, J., Han, Z., Dimas, K., Cladaras, M., Wyche, J. H., Sitaras, N. M., & Pantazis, P. (2007). Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. *Chia*. *Phytomedicine*, 14(4), Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.03.009>
- Bampouli, A., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Louli, V., Aligiannis, N., Magoulas, K., & Krokida, M. (2015). Evaluation of total antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* var. *Chia* leaves extracts using UHPLC–HRMS. *Journal of Food Engineering*, 167, 25–31.

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.021>

- Brieldes, V., Mikropoulou, E. V., Kallergis, E., Kaliora, A. C., Papada, E., Gkiouvetidis, P., Angelis, A., & Halabalaki, M. (2021). Development, Validation and Application of a UHPLC-MS Method for the Quantification of Chios Mastic Gum Triterpenoids in Human Plasma. *Planta Medica*, 87(12/13), Article 12/13. <https://doi.org/10.1055/a-1408-9338>
- Chen, J. (2016a). The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(3), Article 3. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026104>
- Chen, J. (2016b). The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(3), Article 3. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026104>
- Dedoussis, G. V. Z., Kaliora, A. C., Psarras, S., Chiou, A., Mylona, A., Papadopoulos, N. G., & Andrikopoulos, N. K. (2004). Antiatherogenic effect of Pistacia lentiscus via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis*, 174(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.02.011>
- Dimas, K. S., Pantazis, P., & Ramanujam, R. (2012). Chios Mastic Gum: A Plant-produced Resin Exhibiting Numerous Diverse Pharmaceutical and Biomedical Properties. *In Vivo*.
- Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M., & Sarek, J. (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports*, 23(3), Article 3. <https://doi.org/10.1039/b515312n>
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., & Haupt, Y. (2003). Apoptosis—The p53

network. *Journal of Cell Science*, 116(20), Article 20.

<https://doi.org/10.1242/jcs.00739>

- Giaginis, C., & Theocharis, S. (2011). Current Evidence on the Anticancer Potential of Chios Mastic Gum. *Nutrition and Cancer*, 63(8), Article 8.
<https://doi.org/10.1080/01635581.2011.607546>
- Kalousi, F. D., Pollastro, F., Christodoulou, E. C., Karra, A. G., Tsialtas, I., Georgantopoulos, A., Salamone, S., & Psarra, A.-M. G. (2022). Apoptotic, Anti-Inflammatory Activities and Interference with the Glucocorticoid Receptor Signaling of Fractions from Pistacia lentiscus L. var. Chia Leaves. *Plants*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/plants11070934>
- Karra, A. G., Tziortziou, M., Kylindri, P., Georgatza, D., Gorgogietas, V. A., Makiou, A., Krokida, A., Tsialtas, I., Kalousi, F. D., Papadopoulos, G. E., Papadopoulou, K. K., & Psarra, A.-M. G. (2020). Boswellic acids and their derivatives as potent regulators of glucocorticoid receptor actions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 695, 108656.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108656>
- Li, S., Cha, I.-H., & Nam, W. *Chios Mastic Gum Extracts as a Potent Antitumor Agent that Inhibits Growth and Induces Apoptosis of Oral Cancer Cells*.
- Liu, W., Gao, J., Li, M., Aisa, H. A., & Yuan, T. (2021). Tirucallane triterpenoids from the mastic (*Pistacia lentiscus*) and their anti-inflammatory and cytotoxic activities. *Phytochemistry*, 182, 112596.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112596>
- Markiewski, M. M., & Lambris, J. D. (2007). The Role of Complement in Inflammatory Diseases From Behind the Scenes into the Spotlight. *The*

American Journal of Pathology, 171(3), 715–727.

<https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070166>

- Pachi, V. K., Mikropoulou, E. V., Gkiouvetidis, P., Siafakas, K., Argyropoulou, A., Angelis, A., Mitakou, S., & Halabalaki, M. (2020). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Chios mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. Chia, Anacardiaceae): A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 254, 112485. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112485>
- Papada & Kaliora. (2019). Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Mastiha: A Review of Preclinical and Clinical Studies. *Antioxidants*, 8(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/antiox8070208>
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, 8(4), Article 4. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>
- Sakr, S., Wang, M., Dédaldéchamp, F., Perez-Garcia, M.-D., Ogé, L., Hamama, L., & Atanassova, R. (2018). The Sugar-Signaling Hub: Overview of Regulators and Interaction with the Hormonal and Metabolic Network. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijms19092506>
- Slee, E., Adrain, C., & Martin, S. (1999). Serial killers: Ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 6(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400601>
- Soulaïdopoulos, S., Tsiogka, A., Chrysohoou, C., Lazarou, E., Aznaouridis, K., Doundoulakis, I., Tyrovola, D., Tousoulis, D., Tsioufis, K., Vlachopoulos, C., & Lazaros, G. (2022). Overview of Chios Mastic Gum (*Pistacia lentiscus*)

Effects on Human Health. *Nutrients*, 14(3), Article 3.

<https://doi.org/10.3390/nu14030590>

- Spyridopoulou, K., Tiptiri-Kourpeti, A., Lampri, E., Fitsiou, E., Vasileiadis, S., Vamvakias, M., Bardouki, H., Goussia, A., Malamou-Mitsi, V., Panayiotidis, M. I., Galanis, A., Pappa, A., & Chlichlia, K. (2017). Dietary mastic oil extracted from *Pistacia lentiscus* var. Chia suppresses tumor growth in experimental colon cancer models. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-03971-8>
- Tabanca, N., Nalbantsoy, A., Kendra, P. E., Demirci, F., & Demirci, B. (2020). Chemical Characterization and Biological Activity of the Mastic Gum Essential Oils of *Pistacia lentiscus* var. Chia from Turkey. *Molecules*, 25(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/molecules25092136>
- Thomsen, N. D., Koerber, J. T., & Wells, J. A. (2013). Structural snapshots reveal distinct mechanisms of procaspase-3 and -7 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(21), Article 21.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1306759110>
- Triantafyllou, A., Chaviaras, N., Sergeantanis, T. N., Protopapa, E., & Tsaknis, J. (2007). Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.031>
- Vitellius, G., Trabado, S., Bouligand, J., Delemer, B., & Lombès, M. (2018). Pathophysiology of Glucocorticoid Signaling. *Annales d'Endocrinologie*, 79(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2018.03.001>
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., & Levine, A. J. (1993). *The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop*.

6. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια Δρ. Άννα Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη βοήθεια, την ενθάρρυνση και την εμπιστοσύνη καθ' όλη της διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, από την οποία προμηθευτήκαμε τη ρητίνη των Μαστιχόδεντρων της Νότιας Χίου, για την άψογη συνεργασία μας, τη διαρκή επικοινωνία και την υλική υποστήριξη της έρευνας μας καθώς επίσης και την ερευνητική ομάδα του Giovanni Appendino για τη κλασμάτωση της ρητίνης στο πανεπιστήμιο University of Eastern Piedmont στη Β. Ιταλία. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, την Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική, Επίκουρη καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και τον Δρ. Μπαλατσό Νικόλαο, Επίκουρο καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτωρ Φωτεινή Καλούση για τη καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο, την υποστήριξη και τη βοήθεια της. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την εξαιρετική και άψογη συνεργασία μας. Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην απονέμω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου και τους φίλους μου, που ήταν για μια ακόμα φορά ήταν στο πλευρό μου και με στήριζαν ώστε να ολοκληρώσω ένα ακόμη σημαντικό βήμα για μένα.