



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ



ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ ΕΥΓΕΝΙΑ
ΛΑΡΙΣΑ, 2020

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ
ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ**

ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ ΕΥΓΕΝΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΔΡ. ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ ΨΑΡΡΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF INGREDIENTS OF
PLANT ORIGIN ON THE EXPRESSION LEVELS OF
MOLECULES INVOLVED IN THE REGULATION OF
METABOLISM**

CHRISTODOULOU EVGENIA

SUPERVISOR: Dr. ANNA-MARIA PSARRA

LABORATORY OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL BIOCHEMISTRY

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας

Λεωνίδα Δημήτριος, Καθηγητής Βιοχημείας

Σκαμνάκη Βασιλική, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, η ερευνητική κοινότητα έχει αποδείξει τις θεραπευτικές ιδιότητες και τους μηχανισμούς δράσεις πολλών και διάφορων φυσικών προϊόντων, ανοίγοντας νέους ορίζοντες για την εύρεση νέων φαρμάκων για την καταπολέμηση πολλών ασθενειών με πιθανόν λιγότερες παρενέργειες. Η Μαστίχα Χίου είναι ένα από αυτά τα φυσικά προϊόντα αυτής της κατηγορίας και οι ευεργετικές επιδράσεις της ρητίνης της είναι γνωστές ακόμη και από την αρχαιότητα, ενώ μέχρι σήμερα διερευνώνται και οι ευμενείς επιδράσεις των φύλλων της. Αυτές οι ευεργετικές επιδράσεις της Μαστίχας Χίου οφείλονται στο πλήθος των ποικίλων συστατικών, που εμπεριέχονται στο εκχύλισμά της. Η κύρια κατηγορία συστατικών του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου είναι τα τριτερπένια. Διάφορα τριτερπένια, όπως η πρωτοπαναξαδιόλη, και η πρωτοπαναξατριόλη, έχει αποδειχθεί ότι δρουν ως εν δυνάμει επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, καθώς αυτά έχουν δομικές ομοιότητες με τα γλυκοκορτικοειδή. Μόλις ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών, επάγεται η πυρηνική του μετατόπιση και η ρύθμιση των γονιδίων στόχων του. Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η αξιολόγηση των αντι-πολλαπλασιαστικών και αντιφλεγμονωδών δράσεων των πολικών κλασμάτων από φύλλα του μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου, καθώς και από τη ρητίνη του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου. Παράλληλα, έγινε διερεύνηση για τη συμμετοχή των παραπάνω εκχυλισμάτων στο σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, καθώς και των πιθανών μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων ασκούν τις δράσεις τους. Για το σκοπό αυτό, αρχικά έγινε σύγκριση της αξιολόγησης των βιολογικών δράσεων του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου μεταξύ της Βόρειας και Νότιας Χίου, καθώς και της επίδρασης του πολικού κλάσματος της ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου σε κύτταρα HEK293, ώστε να διερευνηθεί και να χαρακτηριστεί η πιθανή επίδραση των πολικών κλασμάτων στις γλυκονογενετικές δράσεις του GR, καθώς και οι αντιφλεγμονώδεις και αποπτωτικές τους δράσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα πολικά κλάσματα των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Βόρειας και Νότιας Χίου εμφανίζουν αντι-υπεργλυκαιμικές και αποπτωτικές δράσεις σε κύτταρα HEK293, ενώ το πολικό κλάσμα της ρητίνης της Νότιας Χίου εμφανίζει αποπτωτικές δράσεις. Η κατανόηση του βιοχημικού μηχανισμού αυτών των δράσεων χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Επομένως, η συγκεκριμένη μελέτη συμβάλλει στην έρευνα ανάδειξη νέων δράσεων των κλασμάτων των φύλλων και της ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Χίου, καθιστώντας τα ως συστατικά ιδιαίτερου φαρμακευτικού ενδιαφέροντος.

Λέξεις κλειδιά: Μαστίχα Χίου, Ρητίνη, Φύλλα Μαστιχόδεντρου, Βιολογικές Δράσεις, Γλυκοκορτικοειδή, Υποδοχέας Γλυκοκορτικοειδών.

Abstract

In recent years, the research community has demonstrated the healing abilities and mechanisms of action of many natural products, opening up new horizons for finding novel drugs for the treatment of many diseases with as few side effects as possible. Chios Mastiha (resin of mastiha tree) is one of these natural products in this category and the beneficial effects of Mastiha resin are known even from antiquity, while to date the beneficial effects of components of Mastiha tree leaves are not known and not well investigated. These beneficial effects of Chios Mastiha are due to the number of different substances contained in its extract. The main category of these substances of Chios Mastiha extract is triterpenes. Certain triterpenoids, such as protopanaxadiol and protopanaxatriol, have been shown to act as potentially selective glucocorticoid receptor agonists, as they have structural similarities to glucocorticoids. Once the glucocorticoid receptor is activated, it translocates from the cytosol to the nucleus, where it regulates the expression of its target genes. The aim of this study was to evaluate the anti-proliferative and anti-inflammatory effects of polar fractions from the Mastiha tree leaves of South and North Chios, as well as the Mastiha resin. The interference of the above extracts with the glucocorticoid receptor signaling pathway and the characterization of the biochemical mechanisms underlying these action were also investigated. Thus, comparative studies on the evaluation of the biological actions of the polar fraction of the Mastiha tree leaves from North and South Chios were performed. The effect of the polar fraction of the resin of the Mastiha tree grown in the southern part of Chios island was also assessed in HEK293 cells. Focus was placed on the characterization of the possible polar fractions anti-inflammatory, apoptotic activities and interference with the gluconeogenic effects of GR. Our results showed that the polar fractions of the mastic tree leaves of North and South Chios exhibited anti-hyperglycemic and apoptotic effects on HEK293 cells, while the polar fraction of the Mastiha resin showed apoptotic effects. Further investigation is required for the characterization of polar extracts anti-inflammatory and anti-gluconeogenic effects via interference with GR signaling. Thus, the present study uncover new actions of polar Mastiha resin and leaves extracts with potential pharmaceutical importance

Keywords: Chios Mastiha, Resin, Mastic Tree Leaves, Biological activities, Glucocorticoids, Glucocorticoid receptor

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1) ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ.....	6
1.2) ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ: ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	6
1.2.1) ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	6
1.2.2) ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	7
1.2.3) ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	8
1.3) ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ: ΣΥΣΤΑΣΗ.....	8
1.3.1) ΡΗΤΙΝΗ.....	8
1.3.2) ΦΥΛΛΑ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ.....	10
1.4) ΤΑ ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΑ ΩΣ ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ.....	10
1.5) ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ.....	11
1.5.1) ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΣΗ.....	11
1.5.2) ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ (GR): ΔΟΜΗ.....	12
1.5.3) ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ.....	13
1.6) ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ.....	15
1.6.1) ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	15
1.6.2) ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	15
1.7) ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ.....	16
1.8) ΣΚΟΠΟΣ.....	17
2) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
2.1.1) ΟΡΓΑΝΑ.....	18
2.1.2) ΧΗΜΙΚΑ.....	18
2.1.3) ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ.....	19
2.2) ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ.....	20
2.3) ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	22
2.4) ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	25
3.1) ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΧΙΟΥ.....	25
3.1.1) ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΤΗΣ ΝΟΤΙΑΣ ΚΑΙ ΒΟΡΕΙΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΙ ΣΤΙΣ ΓΛΥΚΟΝΕΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR.....	25
3.1.2) ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΤΗΣ ΝΟΤΙΑΣ ΚΑΙ ΒΟΡΕΙΑΣ ΧΙΟΥ.....	27
3.1.3) ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΤΗΣ ΝΟΤΙΑΣ ΚΑΙ ΒΟΡΕΙΑΣ ΧΙΟΥ.....	29
3.2) ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΡΗΤΙΝΗΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ	

ΝΟΤΙΑΣ ΧΙΟΥ.....	31
3.2.1) ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΡΗΤΙΝΗΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΤΗΣ ΝΟΤΙΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΙ ΣΤΙΣ ΓΛΥΚΟΝΕΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR.....	31
3.2.2) ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΡΗΤΙΝΗΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΤΗΣ ΝΟΤΙΑΣ ΧΙΟΥ.....	33
3.2.3) ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΡΗΤΙΝΗΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΤΗΣ ΝΟΤΙΑΣ ΧΙΟΥ.....	34
4) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	37
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	40
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	44

1) Εισαγωγή

1.1) Μαστίχα Χίου

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί στην ερευνητική κοινότητα ένα μεγάλο ενδιαφέρον για τη διερεύνηση των ευμενών επιδράσεων και των μηχανισμών δράσης των φυσικών προϊόντων, καθώς αυτά έχουν την ικανότητα να συνεισφέρουν στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών παράλληλα με μειωμένες παρενέργειες, οδηγώντας στην αύξηση της ζήτησής τους από τους καταναλωτές. Ένα τέτοιο φυσικό προϊόν είναι και η Μαστίχα Χίου, η οποία είναι γνωστή για τις θεραπευτικές της ιδιότητες από την περίοδο της αρχαίας Ελλάδας. Ακόμη, οι πρώτες αναφορές για τη χρήση της για τη θεραπεία κυρίως στομαχικών και εντερικών ασθενειών έγιναν από τους αρχαίους Έλληνες ιατρούς Γαληνό, Διοσκουρίδη και Ιπποκράτη (Papada E. & Kaliora A.C., 2019). Η Μαστίχα Χίου βρίσκεται σε μορφή αρωματικής, φυσικής ρητίνης και παράγεται από τα μαστιχόδεντρα, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια Anacardiaceae και γένος *Pistacia lentiscus* L. Συγκεκριμένα, εκκρίνεται σε σχήμα δακρύων από τομές στους κορμούς και στα μεγάλα κλαδιά των μαστιχόδεντρων, που προκαλούνται από τους παραγωγούς με ειδικά εργαλεία, και συλλέγεται, αφού σταθεροποιηθεί, από το έδαφος, καθαρίζεται και τέλος παραδίδεται στην Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου. Είναι απαραίτητο να διευκρινισθεί ότι τα μαστιχόδεντρα, που παράγουν αυτήν τη ρητίνη με τις θεραπευτικές ιδιότητες, είναι η ποικιλία *Pistacia Lentiscus* var *Chia*, που ευδοκίμει κυρίως στο νότιο τμήμα της ελληνικής νήσου Χίου, η οποία βρίσκεται ανατολικά της λεκάνης της Μεσογείου, καθώς το κλίμα και το έδαφος της ευνοούν την ανάπτυξή τους (Dimas K.S., 2012). Ακόμη, είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι το 2015 η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία δημοσίευσε μία μονογραφία όσον αφορά τη χρήση της ρητίνης των δέντρων *Pistacia Lentiscus* var *Chia* ως ένα παραδοσιακό και φυτικό φάρμακο για την καταπολέμηση ήπιων δυσπεπτικών διαταραχών, φλεγμονών του δέρματος και επούλωσης μικρών πληγών, εντάσσοντας πλέον με αυτόν τον τρόπο τη Μαστίχα Χίου στην εποχή της μοντέρνας φυτοθεραπείας (Pachi V.K., et al., 2020).

1.2) Μαστίχα Χίου: Βιολογικές δράσεις

Αν και δεν έχει διευκρινισθεί με ακρίβεια η σύσταση της Μαστίχας Χίου, πρόκειται για μια εξαιρετικά περίπλοκη φυσική ρητίνη με αφθονία περίπου 120 χημικών ενώσεων, που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία, ο συνδυασμός των οποίων συνεισφέρουν στις βιολογικές δράσεις της συγκεκριμένης ρητίνης (Pachi V.K., et al., 2020). Συνοπτικά, αποτελείται από τις εξής χημικές ενώσεις: φαινολικές ενώσεις, φυτοστερόλες, πρωτεΐνες αραβινογαλακτανίων, 30% από ένα φυσικό πολυμερές (πολυ-β-μυρσένιο) και σε μεγάλο ποσοστό από μονό- και τριτερπένια, καθώς και άλλες δραστικές ενώσεις (Papada E. & Kaliora A.C., 2019). Όλες αυτές οι χημικές ενώσεις έχουν οδηγήσει στη χρήση της μαστίχας στον τομέα της φυτοθεραπείας, της μαγειρικής και της προσωπικής υγιεινής σε μεγάλη κλίμακα παγκοσμίως. Γι' αυτό το λόγο, διεξάγονται μέχρι και σήμερα πολλές έρευνες, οι οποίες καταδεικνύουν τις ευεργετικές δράσεις αυτών των ενώσεων, όπως αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, επιδράσεις στο μεταβολισμό και καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις.

1.2.1) Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Η εισβολή παθογόνων, οι οποίοι έχουν προσπεράσει τους εξωτερικούς φραγμούς της έμφυτης ανοσίας, δηλαδή το δέρμα και τους βλεννογόνους, έχει ως αποτέλεσμα τη μόλυνση ή ιστική βλάβη. Αυτό το γεγονός μπορεί να οδηγήσει σε μία πολύπλοκη ακολουθία φαινομένων, που

ονομάζεται φλεγμονώδης απόκριση, η οποία διακρίνεται σε οξεία, που οφείλεται σε ιστική βλάβη, ή σε χρόνια, που οδηγεί σε μειωμένη αντοχή του οργανισμού και συσχέτιση της με διαβήτη, IBD, καρκίνο, καρδιαγγειακά και αυτοάνοσα νοσήματα (Immunology-Kuby, Goldsby R.A., 2013). Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται ποικιλία κυτταρικής δραστηριότητας και μοριακών αντιδράσεων, όπως είναι η φαγοκυττάρωση, η χημειοταξία και η κυτταρική διαφοροποίηση. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτιμά ότι το 80% του πληθυσμού του πλανήτη χρησιμοποιεί φυσικά προϊόντα για τις βασικές τους ανάγκες υγειονομικής περίθαλψης, καθώς πολλά φυσικά προϊόντα έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου και της Μαστίχας Χίου (Papada E. & Kaliora A.C., 2019).

Προ-κλινικές μελέτες που έγιναν το 2009 από την ομάδα του Zhou L. έλεγξαν εάν η Μαστίχα Χίου είναι ικανή να περιορίσει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών παραγόντων, όπως του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και της προσταγλανδίνης E2 (PGE2), από ενεργοποιημένα μακροφάγα. Επιπρόσθετα, διερεύνησαν εάν η Μαστίχα Χίου αναστέλλει την επαγωγή της έκφρασης της συνθάσης του NO (iNOS) και της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), που ρυθμίζουν τα NO και PGE2 αντίστοιχα. Μετά από χορήγηση τόσο σε στερεές, όσο και σε υγρές μορφές (η υγρή μορφή περιείχε Μαστίχα και λάδι καρύδας σε αναλογία 3:7), ανεστάλη η παραγωγή προ-φλεγμονωδών NO και PGE2 σε κύτταρα ποντικού RAW264.7, που μοιάζουν με μακροφάγα, ενεργοποιημένα από λιποπολυσακχαρίδιο (LPS). Αναλύσεις με ανοσοαποτύπωση κατά Western και RT-PCR έδειξαν ότι η Μαστίχα περιόρισε την έκφραση της επαγωγίσιμης iNOS και της COX-2 σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Zhou L., et al., 2009).

Ακόμη και σε κλινικές μελέτες, σε άτομα που έπασχαν από τη νόσο Crohn και τους χορηγήθηκαν ποσότητες εκχυλίσματος Μαστίχας Χίου μειώθηκε η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και η αντιδρώσα πρωτεΐνη C (CRP) στο πλάσμα τους, ενώ αυξήθηκε σημαντικά το συνολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό τους. Επίσης, στα μοποπύρηνια κύτταρα της κυκλοφορίας του περιφερικού αίματος των ασθενών παρατηρήθηκε μείωση της έκκρισης κυτοκινών της φλεγμονής, όπως του tumor necrosis factor α (TNF- α) και αύξηση του ανασταλτικού παράγοντα μετανάστευσης (MIF), γεγονός που υποδεικνύει τον περιορισμό της τυχαίας μετανάστευσης και χημειοταξίας των μονοκυττάρων και των μακροφάγων (Kaliora A.C., et al., 2007).

1.2.2) Αντικαρκινικές δράσεις

Τις τελευταίες δεκαετίες, έρευνες έχουν δείξει την αντικαρκινική δραστηριότητα της Μαστίχας Χίου σε διάφορους τύπους ανθρώπινου καρκινώματος. Μία μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση της Μαστίχας Χίου σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές προστάτη PC-3, εστιάζοντας στο μονοπάτι σηματοδότησης του NF- κ B, οδήγησε στη μείωση των επιπέδων έκφρασης της κυκλίνης D1, η οποία αποτελεί γονίδιο στόχο του NF- κ B, καθώς και στην αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του I κ B α , που συνδέεται με τον NF- κ B και τον αναστέλλει. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το μπλοκάρισμα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, αναστέλλοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Dimas K.S., et al., 2012). Στην περίπτωση του αδενοκαρκινώματος Lewis του πνεύμονα, η χορήγηση ελαίου Μαστίχας Χίου σε αυτού του τύπου καρκίνου οδήγησε στη μείωση των ογκοεπαγωγικών παραγόντων, στην επαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης καθώς και σε αντι-μεταστατικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα τελικά τη μείωση σχηματισμού νέων αγγείων, τα οποία θα βοηθούσαν στη μετάσταση του όγκου (Pachi V.K., et al., 2020). Επιπλέον, μία δημοσίευση που αφορά τη χορήγηση Μαστίχας Χίου σε καρκινικά κύτταρα στόματος YD-10B έδειξε ότι αυτή προκαλεί αναστολή της ανάπτυξής τους και οδηγεί σε απόπτωσή τους μέσω μείωσης της προ-κασπάσης 3 και κατακερματισμού του DNA (Li S.J., et al., 2011). Ακόμη μία δημοσίευση που

αφορά την ίδια κυτταρική σειρά YD-10B, η χορήγηση της Μαστίγας Χίου οδήγησε στο θάνατο όλων των καρκινικών κυττάρων, καθώς τους προκάλεσε μορφολογικές αλλαγές και ο σχηματισμός της αποικίας εμποδίστηκε με τρόπο εξαρτώμενο από τη δοσολογία της Μαστίγας (Kim J.H., et al., 2016). Τέλος, μια μελέτη που διεξήχθη σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου HCT116 έδειξε αντι-πολλαπλασιαστική δράση του εκχυλίσματος εξανίου Μαστίγας Χίου, μια δραστηριότητα που πιθανώς αποδίδεται στην ενεργοποίηση των ενζύμων κασπασών 3,8 και 9 (Balan K.V., et al., 2005).

1.2.3) Αντιοξειδωτικές και καρδιοπροστατευτικές δράσεις

Εκτός από τις αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες της Μαστίγας Χίου, υπάρχει ερευνητικό ενδιαφέρον και για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καθώς και για τις δράσεις της, που συνεισφέρουν στην προστασία του καρδιακού μυ και του κυκλοφορικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε λεία μυϊκά κύτταρα αρουραίου, τα οποία επώαστηκαν με εκχύλισμα Μαστίγας Χίου, έδειξαν μείωση της έκφρασης του tumor necrosis factor α (TNF- α) και εμπόδιση της δράσης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), οι οποίοι και οι δύο παίζουν σημαντικό ρόλο στη δραστηριότητα των οξειδωτικών διεργασιών (Triantafyllou A., et al., 2011). Ακόμη, η χορήγηση εκχυλίσματος Μαστίγας Χίου σε μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος PBMCs ανέστειλε τη διαδικασία της απόπτωσης, μείωσε τα επίπεδα έκφρασης της CD36, ακόμη και σε επίπεδα mRNA, και τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) αποκαταστάθηκαν. Η οξείδωση της LDL (oxLDL) προκαλεί το θάνατο των PBMCs και μειώνει τα επίπεδα αντιοξειδωτικής γλουταθειόνης (GSH), ενώ αυξάνει την έκφραση του παράγοντα CD36, ένα σημαντικό στοιχείο στον σχηματισμό αθηροσκληρωτικών αφρωδών κυττάρων (Dedoussis G.V.Z., et al., 2004).

Σύμφωνα και με την παραπάνω αναφορά ότι η Μαστίγα Χίου αναστέλλει την οξείδωση της LDL (low density lipoprotein), η οποία είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία αθηροσκλήρωσης, που μπορεί να οδηγήσει σε καρδιακές προσβολές και εγκεφαλικό επεισόδιο, υπάρχουν πολλές κλινικές μελέτες που υποστηρίζουν αυτήν τη δράση της μαστίγας, ότι πιθανώς μπορεί να συνεισφέρει στη μείωση ρίσκου ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Μία έρευνα, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HAECs (human aortic endothelial cells), έδειξε ότι το εκχύλισμα της Μαστίγας Χίου ανέστειλε σημαντικά την έκφραση μορίων προσκόλλησης, όπως VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) και ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) που παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία αθηροσκλήρυνσης, αποκαλύπτοντας τις καρδιοπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές δράσεις της Μαστίγας Χίου (Dimas K.S. et al. 2012).

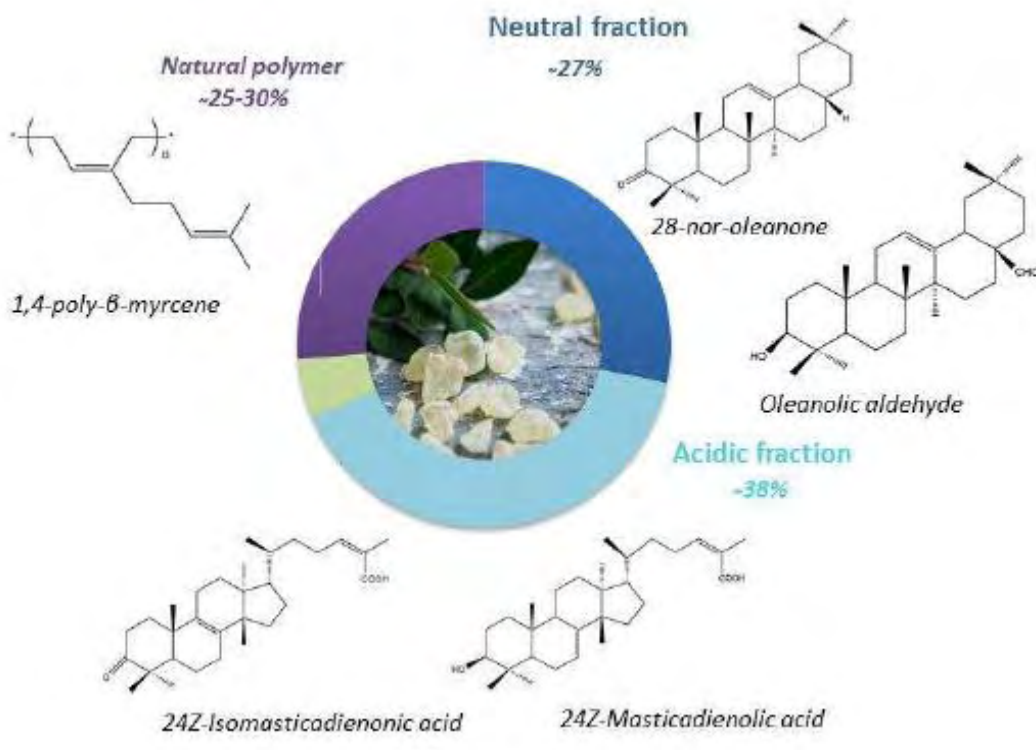
1.3) Μαστίγα Χίου: Σύσταση

1.3.1) Ρητίνη

Πολλές χημικές αναλύσεις τόσο σε εκχυλίσματα Μαστίγας Χίου όσο και σε αιθέρια έλαια αυτής έχουν κάνει γνωστές την πλειοψηφία των χημικών ενώσεων, που απαρτίζουν αυτήν την περίπλοκη φυσική ρητίνη, στις οποίες οφείλονται και οι ευεργετικές της ιδιότητες. Είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι η χημική σύσταση κάθε εκχυλίσματος, που εξετάζεται στις διάφορες ερευνητικές μελέτες, μπορεί να διαφέρει, καθώς η ηλικία των μαστιχόδεντρων από τα οποία συλλέχθηκε η ρητίνη, το αν συλλέχθηκε από άγριο ή από καλλιεργημένο μαστιχόδεντρο, οι περιβαλλοντικές συνθήκες και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους είναι παράγοντες που επηρεάζουν τη

χημική σύσταση της ρητίνης και θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη (Tabanca N., et al., 2020). Πιο συγκεκριμένα, το όξινο κλάσμα της Μαστίχας Χίου, που αποτελεί περίπου το 38% της συνολικής ρητίνης, περιλαμβάνει όλα τα κύρια τριτερπενικά οξέα, όπως το μαστιχαδιενονικό οξύ (masticadienonic acid) (12%), το ισομαστιχαδιενονικό οξύ (isomasticadienonic acid) (12%), το ολεανονικό οξύ (6%) (oleanonic acid), το μορονικό οξύ (6%) (moronic acid), το μαστιχαδιενολικό οξύ (masticadienolic acid), το ισομαστιχαδιενολικό οξύ (isomasticadienolic acid) και το ολεανολικό οξύ (oleanolic acid). Στο ουδέτερο κλάσμα της Μαστίχας Χίου, που αποτελεί περίπου το 27% της συνολικής ρητίνης, περιλαμβάνονται ουδέτερα τριτερπενικά συστατικά όπως, η ολεανολική αλδεϋδη (oleanolic aldehyde), η 28-νορολεαν-17-εν-3-όνη (28-norolean-17-en-3-one), η τρουκαλόλη (tirucallol), η β-αμυρίνη (β-amyrin), η ισομαστιχαδιενολική αλδεϋδη (isomasticadienolic aldehyde) και η δαμαραδιενόνη (damaradienone). Επίσης, άλλες ενώσεις που ανήκουν σε διάφορες χημικές τάξεις είναι επίσης άφθονες, αλλά σε πολύ χαμηλό ποσοστό, περίπου 5%. Όλες οι προαναφερθείσες χημικές ενώσεις μορφοποιούνται σε μία ενιαία δομή λόγω του φυσικού πολυμερούς της μαστίχας, το οποίο αποτελεί περίπου το 25-30% του συνόλου (Εικόνα 1.1).

Επίσης, από το αιθέριο έλαιο Μαστίχας Χίου έχουν απομονωθεί δύο επιπλέον αρωματικά μονοτερπένια, το α-πινένιο (α-pinene) (67%) και το β-μυρσένιο (β-myrcene) (18%), τα οποία καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι τα συστατικά της Μαστίχας Χίου δρουν ευεργετικά είτε μεμονωμένα είτε σε συνεργασία μεταξύ τους (Pachi V.K., et al., 2020, Spyridopoulou et al., 2017).



Εικόνα 1.1: Χημική Σύσταση Μαστίχας Χίου (Pachi V.K., et al., 2020)

1.3.2) Φύλλα Μαστίχας Χίου

Εκτός από τη ρητίνη των μαστιχόδεντρων, υπάρχουν αναφορές ακόμη και για τη χρήση των φύλλων τους ως φυτικό φάρμακο στην παραδοσιακή ιατρική από την αρχαιότητα. Δεν υπάρχει αρκετή βιβλιογραφία όσον αφορά τη χημική σύσταση των φύλλων των *Pistacia Lentiscus* var *Chia*, επομένως είναι απαραίτητη η περαιτέρω ανάλυση τους. Οι χημικές ενώσεις, που απαρτίζουν τα φύλλα και έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία, πρόκειται για αιθέριο έλαιο φύλλων των μαστιχόδεντρων. Πιο συγκεκριμένα, η Βαμπρούλι και οι συνεργάτες της βρήκαν ότι το αιθέριο έλαιο φρέσκων φύλλων αποτελούνταν κυρίως από δ-γερμακρένη (δ-germacrene) (24.78%), β-μυρσένιο (β-myrcene) (19.5%), το οποίο απαντάται κυρίως στο μαϊντανό και στο θυμάρι, α-καδινόλη (α-cadinol) (9.53%), γ-καδενίνη (γ-cadinene) (5.59%), δ-καδενίνη (δ-cadinene) (4.46%), trans-καρυοφυλλίνη (trans-caryophyllene) (5.03%), που απαντάται σε αιθέρια έλαια και άλλων φυτών και έχει πολλές φαρμακευτικές ιδιότητες, όπως αντιφλεγμονώδεις, και τέλος λιμονένιο (limonene) (4.84%), το οποίο είναι το κύριο συστατικό της μυρωδιάς των εσπεριδοειδών και χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο παγωμένων, αποξηραμένων φύλλων βρήκαν ότι είχε ως κύρια συστατικά δ-καδενίνη (δ-cadinene) (17.04%), α-αμορφαίνη (α-amorphene) (10.32%), δ-γερμακρένη (δ-germacrene) (9.01%), trans-καρυοφυλλίνη (trans-caryophyllene) (6.23%), α-cubebene (5.55%) και ναφθαλίνη (naphthalene) (4.13%). Και στα δύο είδη βρέθηκε επίσης η χημική ένωση α-κοπαένιο, που πρόκειται για ένα λιπαρό υγρό υδρογονάνθρακα και βρίσκεται σε μια σειρά από βασικά ελαιοπαραγωγά φυτά. Οι διαφορές στη σύσταση των δύο αυτών αιθέρων ελαίων οφείλονται στη μέθοδο ξήρανσης των φύλλων. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω για τη διαφορετική σύσταση των εκχυλισμάτων ρητίνης, πρέπει και εδώ να ληφθούν υπόψιν οι διαφορετικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες, η ηλικία των δέντρων και η σύσταση του εδάφους που επηρεάζουν τη χημική σύσταση των φύλλων των μαστιχόδεντρων (Bamprouli A., et al., 2014). Ένα χρόνο αργότερα, η ίδια ομάδα ερευνητών, ψάχνοντας για βιοδραστικές και αντιοξειδωτικές ενώσεις σε εκχυλίσματα φύλλων *Pistacia Lentiscus* var *Chia*, βρήκαν ότι αυτά αποτελούνται από το γαλοϋλοκινικό οξύ (galloyl quinic acid) (δύο ισομερή), D-γαλλοκατεχίνη (D-galocatechin), μυρικετίνη-3-ο-ραμνοσίδη (myricetin-O-rhamnoside), γλυκοζίτης κουερσετίνης (quercetin glycoside) (δύο ισομερή), γλυκοζίτης καεφερόλης (kaempferol glucoside) (δύο ισομερή), λουτεολίνη (luteolin) ως κύρια συστατικά, που ανήκουν στην ομάδα των φλαβονοειδών και των φαινολικών ενώσεων (Bamprouli A., et al., 2015).

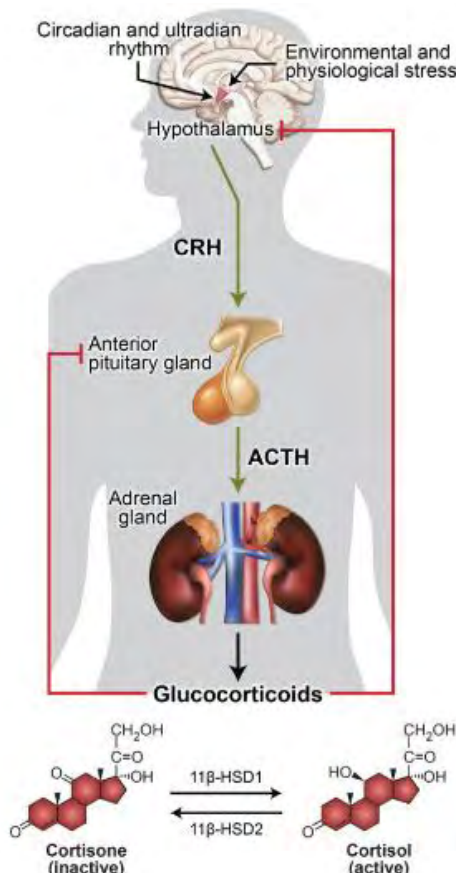
1.4) Τα τριτερπένια ως αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Τα τριτερπένια, η ομάδα χημικών ενώσεων που απαρτίζουν σε μεγάλο ποσοστό το εκχύλισμα Μαστίχας Χίου, έχουν παρόμοια δομή με τα γλυκοκορτικοειδή, τα οποία δρουν μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Επομένως, ορισμένα τριτερπένια έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, όπως και έχει αποδειχθεί ότι δρουν ως εν δυνάμει αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, όπως η πρωτοπαναξαδιόλη, και η πρωτοπαναξατριόλη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του GR στον πυρήνα, ο οποίος επεμβαίνει με αυτόν τον τρόπο στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στόχων του (Georgatza D., et al., 2016, Karra A.G., et al., 2019).

1.5) Γλυκοκορτικοειδή

1.5.1) Σύνθεση και έκκριση

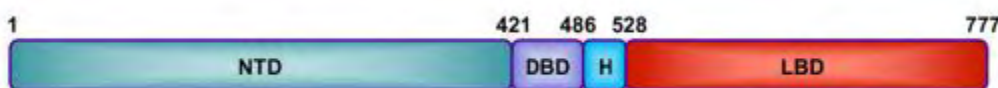
Τα γλυκοκορτικοειδή (GC) είναι ορμόνες της οικογένειας στεροειδών, που συντίθενται και απελευθερώνονται από το φλοιό των επινεφριδίων για να διαδραματίσουν ένα ζωτικό ρόλο στον έλεγχο του στρες. Αυτή η παραγωγή τους από τα επινεφρίδια ρυθμίζεται από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA) με κιρκαδικό τρόπο. Σε απόκριση σε ένα αγχωτικό ερέθισμα, ο υποθάλαμος απελευθερώνει την ορμόνη απελευθέρωσης κορτικοτροφίνης (CRH), η οποία δρα στη συνέχεια στην υπόφυση για να διεγείρει τη σύνθεση της αδρενοκορτικοτροπικής ορμόνης (ACTH). Η ACTH ενεργοποιεί με τη σειρά της το φλοιό των επινεφριδίων για να συνθέσει και να απελευθερώσει γλυκοκορτικοειδή, τα οποία δρουν με κυτταρικό τρόπο σε όλα σχεδόν τα όργανα του σώματος. Η βιολογικά ενεργή μορφή των γλυκοκορτικοειδών στον άνθρωπο είναι η κορτιζόλη. Η ενδογενής δραστηριότητα των γλυκοκορτικοειδών ρυθμίζεται σε κυτταρικό επίπεδο από ένζυμα 11β-υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης, τις 11β-HSD1 και 11β-HSD2, οι οποίες ρυθμίζουν τη μετατροπή μεταξύ της βιοδραστικής κορτιζόλης και της ανενεργής πρόδρομης κορτιζόνης. Ακολούθως, τα απελευθερωμένα γλυκοκορτικοειδή δρουν στον υποθάλαμο και στην υπόφυση για να μειώσουν την περαιτέρω ενεργοποίηση του άξονα HPA, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο ένα κύκλο αρνητικής ανατροφοδότησης (Εικόνα 1.2). Οι διαταραχές στην ομοιόσταση των γλυκοκορτικοειδών οδηγούν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, που οδηγούν σε ανοσολογικά και μεταβολικά νοσήματα (Sulaiman R.S., et al., 2018).



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης των επιπέδων γλυκοκορτικοειδών (GC) από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης επινεφριδίων (HPA) και τη ρύθμιση της μετατροπής μεταξύ της βιολογικά δραστικής μορφής GCs, κορτιζόλης και της ανενεργής μορφής, κορτιζόνης, από 11β-υδροξυστεροειδή αφυδρογονάση τύπου 1 και 2 (Sulaiman R.S., et al., 2018).

1.5.2) Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR): Δομή

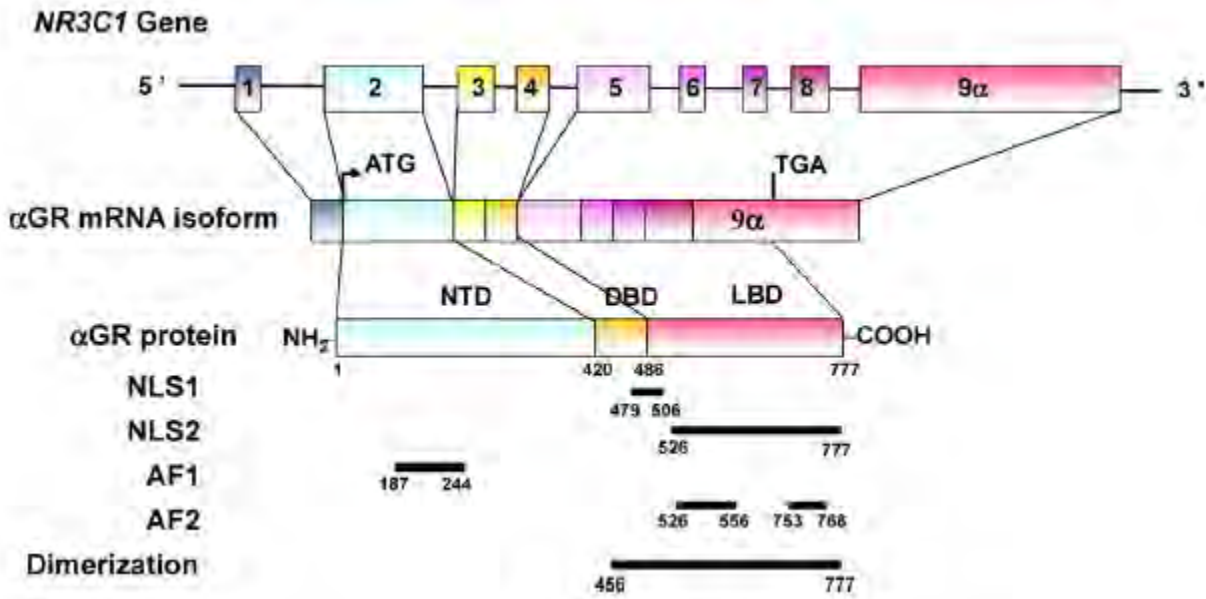
Τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν τις δράσεις τους μέσω της σύνδεσής τους σε έναν προσδετο-εξαρτώμενο υποδοχέα, τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR), ο οποίος δρα κυρίως σαν μεταγραφικός παράγοντας και είναι μέλος της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων. Αυτός κωδικοποιείται από το γονίδιο NR3C1, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 5 του ανθρώπινου γονιδιώματος και περιέχει 9 εξόνια. Όσον αφορά τη δομή, ο ανθρώπινος GR περιέχει τρεις κύριες λειτουργικές περιοχές: μια N-τελική περιοχή trans-ενεργοποίησης της μεταγραφής (NTD), μια κεντρική περιοχή δέσμησης στο DNA (DBD) και μια C-τελική περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (LBD). Οι DBD και το LBD διαχωρίζονται από μια εύκαμπτη περιοχή της πρωτεΐνης που ονομάζεται περιοχή άρθρωσης (H) (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Δομή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Απεικονίζονται οι κύριες λειτουργικές περιοχές: μια N-τελική περιοχή trans-ενεργοποίησης της μεταγραφής (NTD), μια κεντρική περιοχή δέσμησης στο DNA (DBD), μία περιοχή άρθρωσης (H) και μια C-τελική περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (LBD) (Sulaiman R.S., et al., 2018).

Αναλυτικότερα, η περιοχή NTD κωδικοποιείται ολόκληρη από το εξόνιο 2 του γονιδίου και περιέχει την επικράτεια AF-1, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η περιοχή DBD κωδικοποιείται από τα εξόνια 3 και 4 και περιέχει δύο μοτίβα δακτύλου ψευδαργύρου, εκ των οποίων το πρώτο είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση των στοιχείων απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (GREs), ενώ το δεύτερο εμπλέκεται στον ομοδιμερισμό του υποδοχέα. Ακόμη, αυτή η περιοχή είναι η πιο συντηρημένη στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Τέλος, η περιοχή LBD κωδικοποιείται από τα εξόνια 5 και 9, αποτελείται από 11 α-έλικες και 4 μικρά β-πτυχωτά φύλλα και σχηματίζει έναν υδρόφοβο θύλακα για τη δέσμηση των γλυκοκορτικοειδών. Επίσης, περιέχει μια επικράτεια ενεργοποίησης μεταγραφής AF2, της οποίας η λειτουργία ενεργοποιείται μόλις προσδεθεί ο αγωνιστής. Δύο αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Location Sequencing, NLS), εκ των οποίων η NLS1 βρίσκεται μεταξύ της περιοχής της DBD και της περιοχής της άρθρωσης και η NLS2 εντός της περιοχής της LBD, είναι υπεύθυνες για την μεταφορά του υποδοχέα εντός του πυρήνα του κυττάρου (Εικόνα 1.4). Ο GR μπορεί να υπάρξει σε πολλαπλές ισομορφές, οι οποίες δημιουργούνται από εναλλακτικό μάτισμα, λόγω κατανομής τους σε διάφορα όργανα του οργανισμού και της ποικιλίας μονοπατιών σηματοδότησης, με τα οποία σχετίζονται. Ο κλασικός κυτταροπλασματικός υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών είναι ο GR α , ο οποίος μεσολαβεί στα περισσότερα από τα θεραπευτικά και ανεπιθύμητα αποτελέσματα των γλυκοκορτικοειδών και είναι υπεύθυνος για το κλασικό μονοπάτι σηματοδότησης του GR (Εικόνα 4). Με εναλλακτικό μάτισμα στο τέλος του εξονίου 9, προκύπτει η ισομορφή GR β , η οποία δε δεσμεύει τους αγωνιστές γλυκοκορτικοειδών, παραμένοντας ιδιοσυστατικά ανενεργή στον πυρήνα των κυττάρων και

δρώντας ως αρνητικός αναστολέας του GR α σε πολλά γονίδια στόχους που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή (Sulaiman R.S., et al., 2018, Vitellius G., et al., 2018).



Εικόνα 1.4: Η δομή του ανθρώπινου γονιδίου NR3C1, του mRNA και της πρωτεΐνης του GR (Vitellius G., et al., 2018).

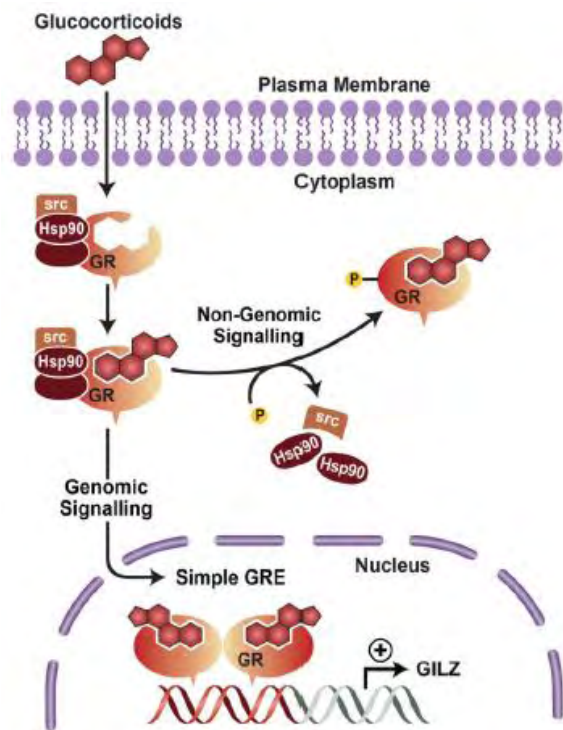
1.5.3) Μονοπάτι σηματοδότησης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Υπό συνθήκες απουσίας αγωνιστή, ο GR βρίσκεται στο κυτοσόλιο των κυττάρων ως μέρος ενός μεγάλου πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου, στο οποίο περιλαμβάνονται πρωτεΐνες θερμικού σοκ, όπως HSP90 (Heat-shock protein 90), HSP70 (Heat-shock protein 70), p23 (Hsp90 co-chaperone p23), ανοσοφιλίνες, όπως FKBP4 και FKBP5 (FK506-binding proteins 52 και 51), και κινάσες, όπως η c-Src. Το γεγονός αυτό καθιστά το GR μεταγραφικά αδρανή χωρίς όμως να χάνει την υψηλή του συγγένεια με τον προσδέτη. Μόλις προσδεθεί ο αγωνιστής είτε αυτός είναι συνθετικό είτε είναι ενδογενές γλυκοκορτικοειδές, ο GR υφίσταται αλλαγές στη διαμόρφωσή του για να αποσυνδεθεί από το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, εκθέτοντας τις αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού και στη συνέχεια να μετατοπιστεί στον πυρήνα μέσω των πυρηνικών πόρων. Μόλις βρεθεί στον πυρήνα, ο GR διμερίζεται και συνδέεται με στοιχεία απόκρισης γλυκοκορτικοειδών (GREs) για τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων στόχων. Ο ενεργοποιημένος GR μπορεί να οδηγήσει σε επαγωγή ή υπερκαταστολή της γονιδιακής μεταγραφής με την απευθείας σύνδεση σε GREs, τα οποία εντοπίζονται σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων στόχων (Εικόνα 1.5) (Sulaiman R.S., et al., 2018).

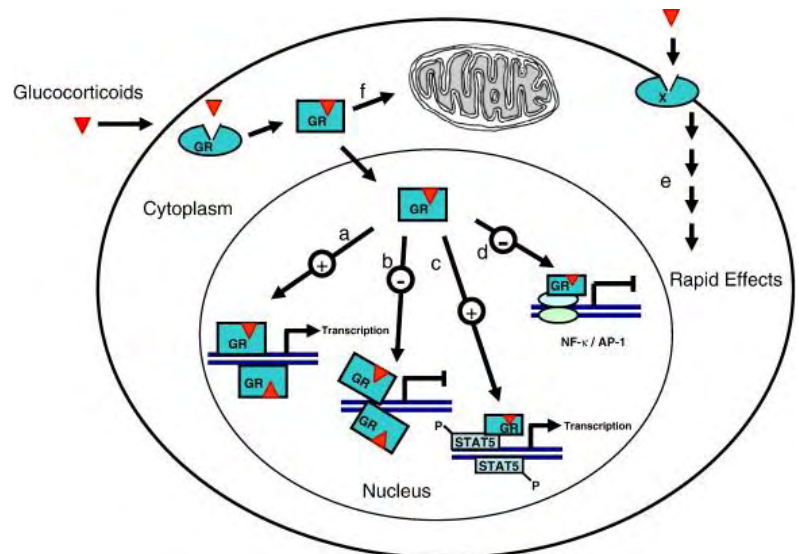
Ένας άλλος μηχανισμός, με τον οποίο ο GR μπορεί να ελέγξει την έκφραση γονιδίων, είναι μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση του GR με μέλη της οικογένειας STAT (signal transducer and activator of transcription) μπορεί να οδηγήσει στην επαγωγή της μεταγραφής, καθώς και η αλληλεπίδραση

του με μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι NF-κB (nuclear factor κB) και AP1 (activator protein 1), είναι ικανή να προκαλέσει καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων τους. Επιπρόσθετα, περαιτέρω μελέτες για τους μηχανισμούς με τους οποίους δρα ο GR έχουν οδηγήσει στην εύρεση ότι μπορεί και μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια, όπου ρυθμίζει μιτοχονδριακά γονίδια και γονίδια της αναπνευστικής αλυσίδας (Εικόνα 1.6) (Psarra A.M., et al., 2005, Psarra A.M. & Sekeris C.E., 2008, 2009, 2011).

Επιπλέον, ο GR έχει προταθεί ότι μπορεί να ασκήσει ταχείες μη-γονιδιωματικές δράσεις, οι οποίες δεν απαιτούν σύνθεση πρωτεϊνών de novo, τροποποιώντας άμεσα τις οδούς μεταγωγής σήματος. Αυτή η διαδικασία συμβαίνει όταν ο κυτταροπλασματικός ή εντοπισμένος στην πλασματική μεμβράνη κυστιδίων GR αλληλεπιδρά φυσικά με διάφορες κινάσες, όπως PI3K, AKT και MAPK (Psarra A.M. & Sekeris C.E., 2008, Sulaiman R.S., et al., 2018).



Εικόνα 1.5: Τα δύο μονοπάτια σηματοδότησης μέσω γονιδιωματικών και μη-γονιδιωματικών δράσεων του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Sulaiman R.S., et al., 2018).



Εικόνα 1.6: Μηχανισμοί δράσεων των γλυκοκορτικοειδών (Psarra A.M. & Sekeris C.E., 2008).

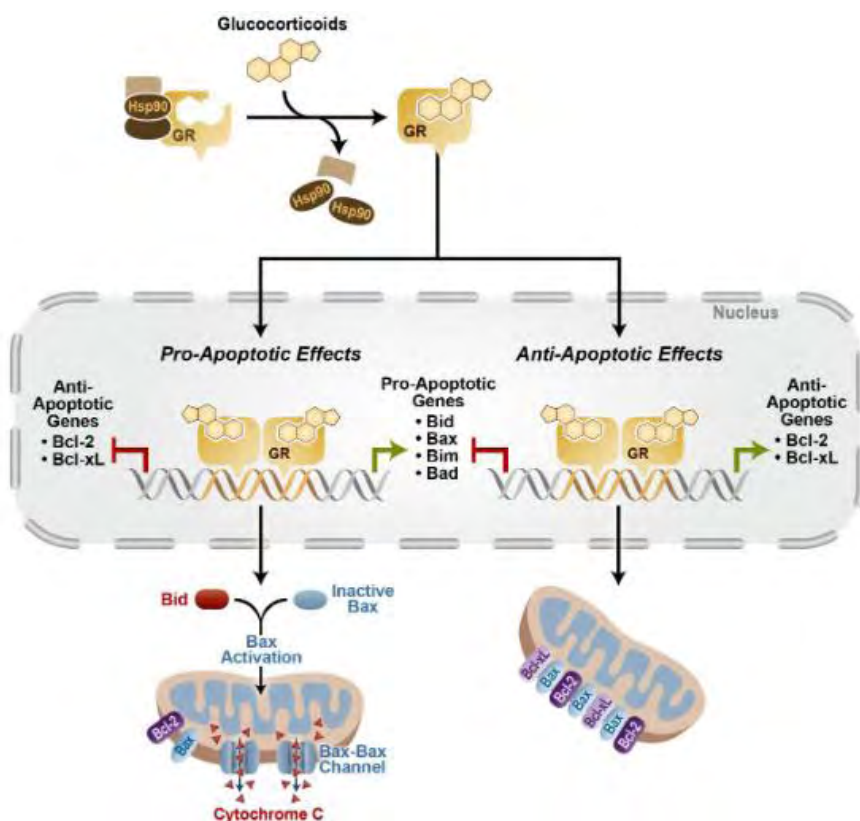
1.6) Δράσεις των γλυκοκορτικοειδών

1.6.1) Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Τα γλυκοκορτικοειδή με τις χαρακτηριστικές τους αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες έχει βρεθεί ότι ενεργοποιούν πολλά αντιφλεγμονώδη γονίδια, καταστέλλουν προφλεγμονώδη γονίδια, όπως κυτοκίνες, χημειοκίνες, μόρια προσκόλλησης φλεγμονωδών ενζύμων και υποδοχείς, που σχετίζονται με τη φλεγμονή, καθώς, επίσης, έχουν και πολλές μετα-μεταγραφικές επιδράσεις. Η επαγωγή των αντιφλεγμονωδών γονιδίων γίνεται κυρίως μέσω του κλασικού μονοπατιού σηματοδότησης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, ο οποίος επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων μέσω αναγνώρισης CREs πάνω στο DNA, αφού μετατοπιστεί από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Η καταστολή των προφλεγμονωδών γονιδίων έχει αποδοθεί στην ικανότητα του GR να καταστέλλει τη δραστηριότητα των μεταγραφικών παραγόντων της ανοσολογικής απόκρισης, όπως είναι οι NF-κB και AP-1. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω trans-ενεργοποίησης από τον GR του αναστολέα του NF-κB, του IκB, ο οποίος βρίσκεται σε σύμπλοκο με τον NF-κB στο κυτταρόπλασμα, είτε ο GR συνδέεται με το διμερές NF-κB (p65/p50) στον πυρήνα και καταστέλλει τα γονίδια φλεγμονής, που θα ενεργοποιούσε ο NF-κB αν ήταν αδέσμευτος, καθώς και μέσω εμπόδισης του μονοπατιού σηματοδότησης MAP κινασών. Τέλος, όσον αφορά τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να αυξάνουν τη γονιδιακή έκφραση πρωτεϊνών, οι οποίες μπορούν και αποσταθεροποιούν τα mRNA των φλεγμονωδών πρωτεϊνών. Ένα παράδειγμα μίας πρωτεΐνης αυτής της κατηγορίας είναι η τριστετραπρόληνη, η οποία πιθανώς προσδένεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή των φλεγμονωδών πρωτεϊνών (Barnes P.J., 2016, Bekhbat M., et al., 2017).

1.6.2) Αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές δράσεις

Τα γλυκοκορτικοειδή μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού του GR μπορούν να επάγουν τόσο προ- όσο και αντι-αποπτωτικά γονίδια, τα οποία οδηγούν σε απόπτωση ή στην επιβίωση των κυττάρων αντίστοιχα, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο ή τον ιστό. Ο κλασικός μηχανισμός της επαγόμενης από γλυκοκορτικοειδή απόπτωσης περιλαμβάνει κυρίως την ενεργοποίηση της ενδογενούς αποπτωτικής οδού. Αυτή περιλαμβάνει τα μιτοχόνδρια και εμφανίζεται σε απόκριση σε διάφορα εγγενή ερεθίσματα, όπως γλυκοκορτικοειδή, έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και υποσιτισμό. Μία περίπτωση είναι η σηματοδότηση από γλυκοκορτικοειδή να μειώνει την έκφραση των αντι-αποπτωτικών Bcl-2 και Bcl-xL και να ενεργοποιεί τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bad και Bax για να διαταράξει το δυναμικό των μιτοχονδριακών μεμβρανών, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων αποπτωτικών πρωτεϊνών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης 9 και ακολούθως της κασπάσης 3 και τελικά απόπτωση. Σε άλλη περίπτωση της αποπτωτικής δράσης, που προκαλείται από τα γλυκοκορτικοειδή, συμβαίνουν τα αντίθετα γεγονότα σε σχέση με την προηγούμενη περίπτωση, καθώς άλλοι παράγοντες μπορούν να επάγουν την έκφραση των Bcl-2 και Bcl-xL και να καταστείλουν την έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bad και Bax. Για το ποια από τις δύο περιπτώσεις θα συμβεί κάθε φορά εξαρτάται από τα γλυκοκορτικοειδή σε ποιο είδος κυττάρου ή/και ιστού θα ασκήσουν τις δράσεις τους (Εικόνα 1.7) (Gruber-Yates A. L., et al., 2013).



Εικόνα 1.7: Επαγωγή της απόπτωσης ή της επιβίωσης από σηματοδοτικό μονοπάτι των γλυκοκορτικοειδών ανάλογα το είδος του κυττάρου ή του ιστού (Gruver-Yates A. L., et al., 2013).

1.7) Παρενέργειες προκαλούμενες από γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή εξακολουθούν να είναι τα πιο συχνά συνταγογραφούμενα φάρμακα παγκοσμίως. Οι ισχυρές αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές τους δυνατότητες τα οδηγούν στο να είναι η προτιμώμενη επιλογή των γιατρών για την καταπολέμηση διαφόρων δερματολογικών και αυτοάνοσων ασθενειών, οφθαλμικών παθήσεων, της οξείας και χρόνιας φλεγμονής, καθώς και για την αντιμετώπιση συγκεκριμένων τύπου καρκίνου. Δυστυχώς, η συστηματική χρήση τους περιορίζεται ορισμένες φορές από τις ανεπιθύμητες παρενέργειές τους, οι οποίες σχετίζονται με υψηλές δόσεις ή/και παρατεταμένη θεραπεία. Παρενέργειες όπως μεταβολικές ανωμαλίες, ευαισθησία σε λοιμώξεις, υπέρταση, πεπτικό έλκος, καταρράκτης, απώλεια μυών, η επαγωγή της γλυκονεογένεσης, η ανακατανομή του λίπους και ο αυξημένος καταβολισμός λίπους και πρωτεϊνών, οδηγούν τελικά στη διακοπή της χρήσης του φαρμάκου παρά την αποτελεσματικότητά του. Επίσης, εκτός από τις αρνητικές επιδράσεις στον μεταβολισμό, η χρόνια χρήση γλυκοκορτικοειδών είναι υπεύθυνη για την καταστολή του κέντρου του υποθαλάμου, καθώς και για ασθένειες, όπως είναι η οστεοπόρωση. Συνεπώς, καθίσταται αναγκαία η εύρεση και σύνθεση νέων γλυκοκορτικοειδών φυτικής προέλευσης, τα οποία να αποτελούν αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, επάγοντας τις θεραπευτικές του

ιδιότητες με όσο το δυνατόν λιγότερο την εκδήλωση των παρενεργειών της σηματοδότησής του (Karra A.G., et al., 2019, Sulaiman R.S., et al., 2018).

1.8) Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η αξιολόγηση των βιολογικών δράσεων εκχυλισμάτων τόσο από τη ρητίνη όσο και από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου Χίου, καθώς και η σύγκριση δράσεων των εκχυλισμάτων φύλλων μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου, που παράγει ρητίνη, με εκείνα του μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου, που δεν παράγει. Πιο συγκεκριμένα, στόχος ήταν η διερεύνηση των αντι-πολλαπλασιαστικών και αντιφλεγμονωδών δράσεων των πολικών κλασμάτων από φύλλα του μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου, καθώς και τη ρητίνη του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου. Παράλληλα, έγινε διερεύνηση για τη συμμετοχή των παραπάνω εκχυλισμάτων στο σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, καθώς και των πιθανών μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων ασκούν τις δράσεις τους. Αυτή η μελέτη θα συνεισφέρει στην πιθανή εύρεση επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, που θα αντικαθιστούν το φυσικό γλυκοκορτικοειδές, κορτιζόλη, ως φάρμακο για την θεραπεία σοβαρών ασθενειών, όπως τα αυτοάνοσα και μεταβολικά νοσήματα, αλλεργίες και καρκίνος, χωρίς όμως ή με μειωμένες τις γνωστές παρενέργειες της κορτιζόλης.

2) Υλικά και Μέθοδοι

2.1.1) Όργανα

Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν:

1. Συσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminar Flow Hood) Tel Star AV-30/70
2. Επωαστήρας: Thermo Electron Corporation
3. Υδατόλουτρο: P SELECTA
4. Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): A. Kruss OrpTronic Germany
5. Φυγόκεντρος στις κυτταροκαλλιέργειες: Entrofriger- BLII/ PS Selecta®
6. Φυγόκεντρος: Eppendorf 5417R
7. Ζυγοί: KERN EW και KERN 440-47 N
8. Dry block heat bath: KISKER
9. Quick spin: Nippon Genetics Europe GmbH
10. Vortex: Bio Vortex V1
11. Συσκευή ηλεκτροφόρησης: Biorad mini-PROTEAN® tetra cell
12. Συσκευή μεταφοράς (transfer): Biorad mini-trans Blot
13. Sonicator: Helscher Ultrasound Technologies, model UP400S
14. Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών από W.B Kodak

2.1.2) Χημικά

- Ακρυλαμίδιο/ Δις Ακρυλαμίδιο (Acrylamide/Bis acrylamide) 40% (Bio-Rad)
- Υπερθειικό Αμμώνιο (Ammonium persulfate, APS) (Sigma)
- Δοκιμασία πρωτεΐνης Bradford (Bradford protein assay) (Bio-Rad)
- Μπλε της Βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) (fluka)
- Δεξαμεθαζόνη (Dexamethazone) (Sigma)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide, DMSO) (Sigma)
- Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol ,DTT) (SERVA)
- Developer (Fuji)
- ECL A, B (Santa Cruz)

- Εμβρυικός ορός βοειδών (Fetal Bovine Serum, FBS) (Gibco®)
- Fixer (Fuji)
- Υδροχλωρίο (HCl) (Merck)
- Γλυκίνη (Glycine) (SERVA)
- L-Γλουταμίνη (L-Glutamine) (Gibco)
- Χλωριούχο νάτριο(NaCl) (SERVA)
- Φθοριούχο φαινυλομεθυλοσουλφονύλιο (Phenyl Methyl Sulfonyl Floride, PMSF) (SERVA)
- Αναστολείς πρωτεασών (Protease inhibitors) (Sigma)
- Δωδεκυλ θειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) (SIGMA)
- Σκόνη άπαχου γάλακτος (Skimmed milk powder) (Regilait)
- Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (Tetramethylethylenediamine, TEMED) (Applichem)
- Τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθάνιο [Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris-base] (SERVA)
- Θρυψίνη- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ [Trypsin-Ethylenediaminetetraacetic (EDTA)] 5% 10× (Gibco)
- Πολυσορβικό 20 (Tween 20 (Sigma)
- Αιθανόλη (Ethanol)100% (Honeywell)
- Βιο-αιθανόλη (Bio-Ethanol) (Kalochem)
- Ισοπροπανόλη (Isopropanol) (Honeywell)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών Pageruler (Pageruler Prestained Protein Ladder) (ThermoScientific Fermentas)
- Μεθανόλη (Methanol) 100% (Honeywell)
- Πενικιλίνη (Penicillin) – Στρεπτομυκίνη (Streptomycin) Gibco)

2.1.3) Θρεπτικά Υλικά

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

Technologies - Invitrogen) [-] L-glutamate, [-] phenol red.

2.2) Παρασκευή Διαλυμάτων

- **Υπερθειικό Αμμώνιο (Ammonium persulfate, APS) 10 %:**

Για την παρασκευή του προστίθενται 100mg APS σε 1ml ddH₂O. Αποθηκεύεται στους -20°C.

- **Δεξαμεθαζόνη (Dexamethazone, DEX):**

Διαλύεται σε 100% αιθανόλη. Αποθηκεύεται στους -20°C.

- **Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol , DTT) 1M:**

Για την δημιουργία 10ml απαιτείται διάλυση 1,54 gr DTT 1M σε ddH₂O. Στην συνέχεια αναδεύεται και μοιράζεται σε aliquots. Αποθηκεύεται στους -20°C.

- **Φθοριούχο φαινυλομεθυλοσουλφονύλιο (Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 200mM:**

Για την δημιουργία 2ml PMSF 200mM χρειάζεται να διαλυθούν 0,07gr PMSF σε 2ml ισοπροπανόλης. Η αποθήκευση του διαλύματος γίνεται στους -20°C. Με αραιώση του διαλύματος 10% σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20mM.

- **Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων (Lysis Buffer):**

Περιέχει 0,5% TritonX-100, 20mM Tris pH 7,5 , 250mM NaCl και 3m MEDTA. Αποθηκεύεται στους 4°C. Σε 1ml από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται επιπλέον 2μl DTT 1M (-20°C), 0,5μl PMSF 20mM (-20°C) και 10μl μείγματος Protease inhibitors.

- **Διάλυμα επιστοίβαξης δείγματος (Sample Buffer 4x):**

Αποτελείται από 1M Tris pH 6,8 , 10% γλυκερόλη, 10% SDS, 4% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% κυανούν της βρωμοφαινόλης και αποθηκεύεται στους -20°C.

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

Για την παρασκευή του αναμειγνύονται 20μl stock διαλύματος Tris 1M pH 7,5 (4 °C) με 980μl ddH₂O και το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

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

Για την δημιουργία 0,2L διαλύματος απαιτούνται 36,342gr Tris, τα οποία διαλύονται σε dH₂O. Η ρύθμιση του pH στο 8,8 πραγματοποιείται με προσθήκη HCl 12N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH₂O. Αποθηκεύεται στους 4°C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10x:**

Για την παρασκευή του απαιτείται η διάλυση 144gr γλυκίνης και 30,3gr Tris base σε 1L ddH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1x:**

Προκύπτει από την αραιώση Running Buffer 10x σε dH₂O με αναλογία 1:9 και την προσθήκη SDS στο διάλυμα, που δημιουργείται σε αναλογία 0,1%. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 1x:**

Περιέχει 20% MeOH, 10% Running Buffer 10x και 0,05% SDS. Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη dH₂O. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα Τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθάνιο (Tris Buffered Saline, TBS) 10x:**

Για την παρασκευή 1L TBS 10x ζυγίζονται και διαλύονται σε dH₂O 88gr NaCl και 24gr Tris-base. Το pH ρυθμίζεται στα 7,4-7,6 με προσθήκη πυκνού HCl 12N και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

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

Περιέχει 10% stock buffer TBS 10x και 0,6% Tween-20, ενώ ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με dH₂O και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Διαλύματα για εμφάνιση σήματος:**

Για τη δημιουργία τους ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του παρασκευαστή (Fuji film).

2.3) Αντισώματα

Τα αντισώματα χρησιμοποιούνται, αφού διαλυθούν σε TBSTx1, milk 2%, και αποθηκεύονται στους -20°C.

Πρωτογενή:

- Anti-β-actin (Sigma), 1:4000
- Anti-GR (Santa cruz), 1:1000
- Anti-PEPCK (Santa cruz), 1:1000, όπου PEPCK η καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού, ενός γλυκονεογενετικού ενζύμου και γονιδίου στόχου του GR (He B., et al., 2016)
- Anti-p65 (Santa cruz), 1:1000
- Anti-Procaspase 3 (Cell signaling), 1:4000
- Anti-Procaspase 9 (Cell signaling), 1:500

Δευτερογενή:

- Mouse-HRP (Pierce), 1:50.000
- Rabbit-HRP (Pierce), 1:50.000

2.4) Μέθοδοι

2.4.1) Κυτταροκαλλιέργειες

Οι κυτταρικές σειρές HEK 293 (human embryonic kidney), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες των 37°C και 5% CO₂ σε T25 φλάσκες στον επωαστήρα. Το DMEM με phenol red χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη των κυττάρων μαζί με 4,5mg/ml γλυκόζη, εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Κατά το πάγωμα, το οποίο πραγματοποιείται σε DMSO και FBS σε αναλογία 1:9 τα κύτταρα μεταφέρονται σε cryovials και αποθηκεύονται στους -80°C ή στο υγρό άζωτο.

Μόλις ο αριθμός των κυττάρων φτάσει στο επιθυμητό για τις προϋποθέσεις του πειράματος, ο οποίος υπολογίζεται προσεγγιστικά με τη βοήθεια πλακίδιο Neubauer, ακολουθεί το στρώσιμο σε six well plates με την χρήση θρεπτικού DMEM χωρίς phenol red εμπλουτισμένο με 10% FBS cis,

από το οποίο έχουν αφαιρεθεί τα στεροειδή, καθώς και με 1% L-γλουταμίνη και 1% Pen-Strep (starvation). Μετά την διαδικασία του starvation, που διαρκεί 48 ώρες, προστίθενται οι ουσίες, δηλαδή το εκχύλισμα από τα φύλλα και τη ρητίνη του μαστιχόδεντρου και η δεξαμεθαζόνη, που αποτελεί το θετικό μας control. Τέλος, μετά το πέρας της επώασης των κυττάρων με τις προς μελέτη ουσίες ακολουθεί η λύση και συλλογή του ολικού κυτταρικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.

2.4.2) Δημιουργία FBS cis (ελεύθερο στεροειδών ορμονών)

Για τη δημιουργία FBS cis ελεύθερο στεροειδών ορμονών αναμειγνύεται το FBS με το 1/5 του όγκου του με charcoal (ενεργό άνθρακα) κι επωάζεται στους 56°C, υπό ανάδευση για 30 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 10.000g, στους 25°C κι έπειτα συλλέγεται το υπερκείμενο, δηλαδή το FBS, κι επωάζεται ξανά με καινούριο charcoal κατά τον ίδιο τρόπο. Τέλος, το FBS φιλτράρεται 2-3 φορές και αποθηκεύεται στους -20°C.

2.4.3) Λύση κυττάρων

Η λύση των κυττάρων επιτυγχάνεται με τη προσθήκη του Lysis Buffer, στη συνέχεια ακολουθεί η επώασή τους στον πάγο για 20-25 λεπτά και τέλος με τη χρήση του Sonicator και επαναλαμβάνοντας 5 κύκλους έκθεσης ενός δευτερολέπτου με 35 δευτερόλεπτα μεσοδιάστημα σε 40% ένταση για κάθε δείγμα.

2.4.4) Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος βασίζεται στη μέγιστη απορρόφηση όξινου διαλύματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία μεταβάλλεται από τα 465nm στα 595nm, όταν παρατηρηθεί αλληλεπίδρασή της με πρωτεΐνες.

Το διάλυμα Bradford αραιώθηκε από το 5x (stock) στο 1x με ddH₂O και προστέθηκε 1μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κάθε δείγμα σε 1ml αντιδραστηρίου 1x, δηλαδή σε τελική αραιώση 1:1000. Τα δείγματα, αφού παρέμειναν στο σκοτάδι για 20 λεπτά, αναδεύτηκαν με vortex και φωτομετρήθηκαν στα 595nm. Η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος υπολογίστηκε από την εξίσωση $y=0,0345x+0,01$, η οποία προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA, που έγινε στο εργαστήριο.

2.4.5) Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Για την προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε μείγμα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος υπολογισμένο μέσω της μεθόδου Bradford, Tris 20mM και Sample buffer 4x σε κατάλληλες ποσότητες, που υπολογίζονται με βάση την περιεκτικότητα του πρωτεϊνικού φορτίου των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. Πριν τοποθετηθούν τα δείγματα στην συσκευή της ηλεκτροφόρησης θερμαίνονται στους 95°C για 3 με 5 λεπτά, κι έπειτα ηλεκτροφορούνται στα

80V. Χρησιμοποιήθηκαν πηκτές ακρυλαμιδίου 10% με την ακριβή σύσταση του gel επιστοιβάξης (stacking gel) και διαχωρισμού (separating gel) να φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

	Separating gel	Stacking gel
ddH ₂ O	2,425ml	2,025ml
Tris HCl pH=8,8	1,25ml	-
Tris HCl pH=6,8	-	0,21ml
SDS	50μl	25μl
Aps 10%	25μl	12,5μl
Bis Acr. 40%	1,25ml	0,25ml
Temed	2,5μl	2,5μl

2.4.6) Ανοσοαποτύπωση Western

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων γίνεται η μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων στα 0,2 ή 0,45μM. Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικής τάσης ύψους 0,35A για χρονικό διάστημα 70 λεπτών σε Transfer Buffer και διατηρώντας σε ψυχρό περιβάλλον. Ακολουθεί ανάδευση της μεμβράνης σε διάλυμα 10% w/v αποβουτυρωμένου γάλακτος σκόνης σε TBST 1x (blocking) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με πρωτογενές αντίσωμα για μια ολόκληρη νύχτα (12-16 ώρες) στους 4°C. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση, ακολουθούν 5 πλύσεις των 5 λεπτών με TBST 1x και επώαση με δευτερογενές αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το δευτερογενές αντίσωμα πραγματοποιούνται πάλι 3 πλύσεις των 5 λεπτών με TBST 1x και ακολουθεί η προσθήκη των ECL A και B σε αναλογία 1:1 για 3 λεπτά. Τέλος, η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδική κασετίνα και εκτίθεται σε φιλμ σε σκοτεινό θάλαμο. Η εμφάνιση του αποτελέσματος και η μονιμοποίηση του φιλμ πραγματοποιείται με την εμβάπτιση του φιλμ στα διαλύματα developer πρώτα και fixer στη συνέχεια, για ένα λεπτό στο καθένα.

2.4.7) Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα φιλμ που προκύπτουν από τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, σκανάρονται σε κλίμακα του γκρι και 300dpi. Έπειτα, με τη χρήση του προγράμματος Photoshop CS4 δημιουργούνται οι τελικές εικόνες, ενώ με τη χρήση του προγράμματος Image J γίνεται ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών. Τέλος, τα αποτελέσματα επεξεργάζονται και αναλύονται με τη χρήση του excel, ενώ μετά από εφαρμογή T-TEST προκύπτει η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων.

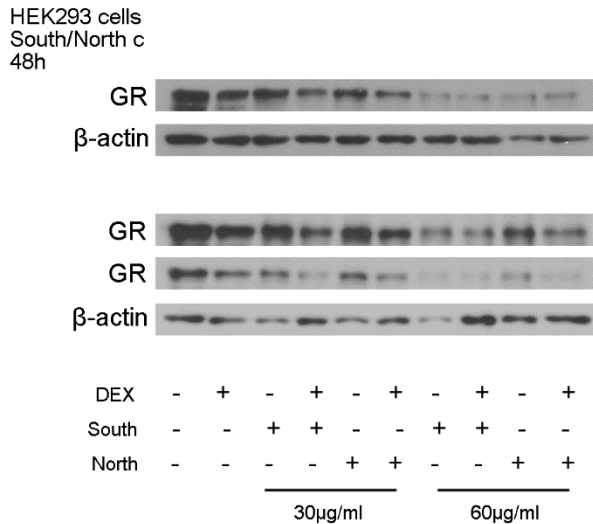
3) Αποτελέσματα

3.1) Διερεύνηση και σύγκριση βιολογικών δράσεων φύλλων του μαστιχόδεντρου Χίου

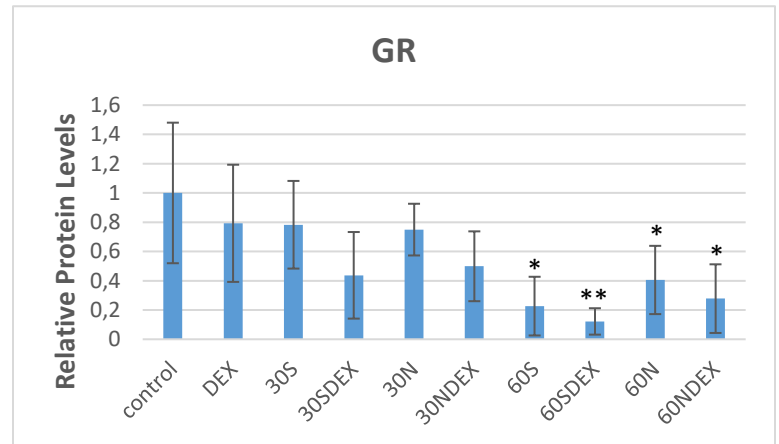
3.1.1) Διερεύνηση της επίδρασης του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα και στις γλυκογονογενετικές δράσεις του GR

Για να επιτευχθεί η αξιολόγηση της επίδρασης του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα και στις γλυκογονογενετικές δράσεις του GR πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων HEK293 σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζαν στεροειδείς ορμόνες. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη των προς μελέτη κλασμάτων φύλλων του μαστιχόδεντρου Νότιας και Βόρειας Χίου σε συγκεντρώσεις 30 και 60μg/ml, καθώς και της δεξαμεθαζόνης (Dex) σε συγκέντρωση 10nM και επώαστηκαν για 48 ώρες. Ακολούθησε συλλογή των κυττάρων και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών από ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ανοσοαποτύπωση κατά Western και εντοπισμός με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων του GR και της PEPCK. Ως μόρια κανονικοποίησης για τα δύο μόρια χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

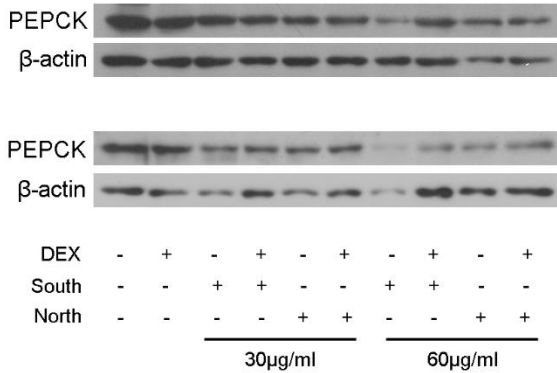
A)



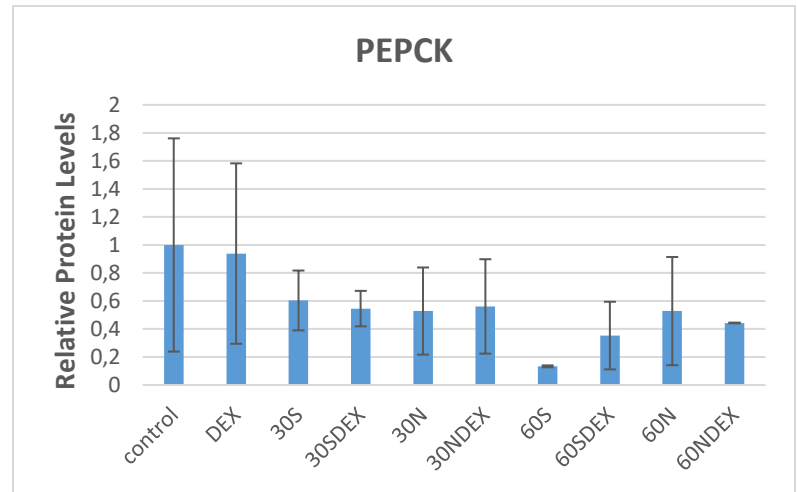
B)



Γ)

HEK293 cells
South/North c
48h

Δ)



Εικόνα 3.1: Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από φύλλα *Pistacia Lentiscus* Βόρειας και Νότιας Χίου στα επίπεδα έκφρασης του GR και της PEPCK σε κύτταρα HEK293.

Κύτταρα HEK293 αναπτύχθηκαν σε six well plates (200.000 cells/well) για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς phenol red εμπλουτισμένο με 10% FBS (από το οποίο αφαιρέθηκαν με κατάλληλη κατεργασία τα στεροειδή), 1% L-γλουταμίνη και 1% Pen/Strep (starvation). Στην συνέχεια, προστέθηκαν τα προς μελέτη κλάσματα, απουσία και παρουσία DEX, σε συγκεντρώσεις 30 και 60 µg/ml, όπως φαίνονται στην παραπάνω εικόνα, και τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες. Με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έγινε εντοπισμός του GR και της PEPCK, καθώς και της β-ακτίνης. Τέλος, έγινε ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών με το πρόγραμμα ImageJ και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Α) Απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες του GR και β-ακτίνης, Β) διάγραμμα με τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα του GR μετά την κανονικοποίησή τους με τα αντίστοιχα επίπεδα της β-ακτίνης. Γ) Απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες της PEPCK και της β-ακτίνης, Δ) διάγραμμα με τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK μετά την κανονικοποίησή τους με τη β-ακτίνη.

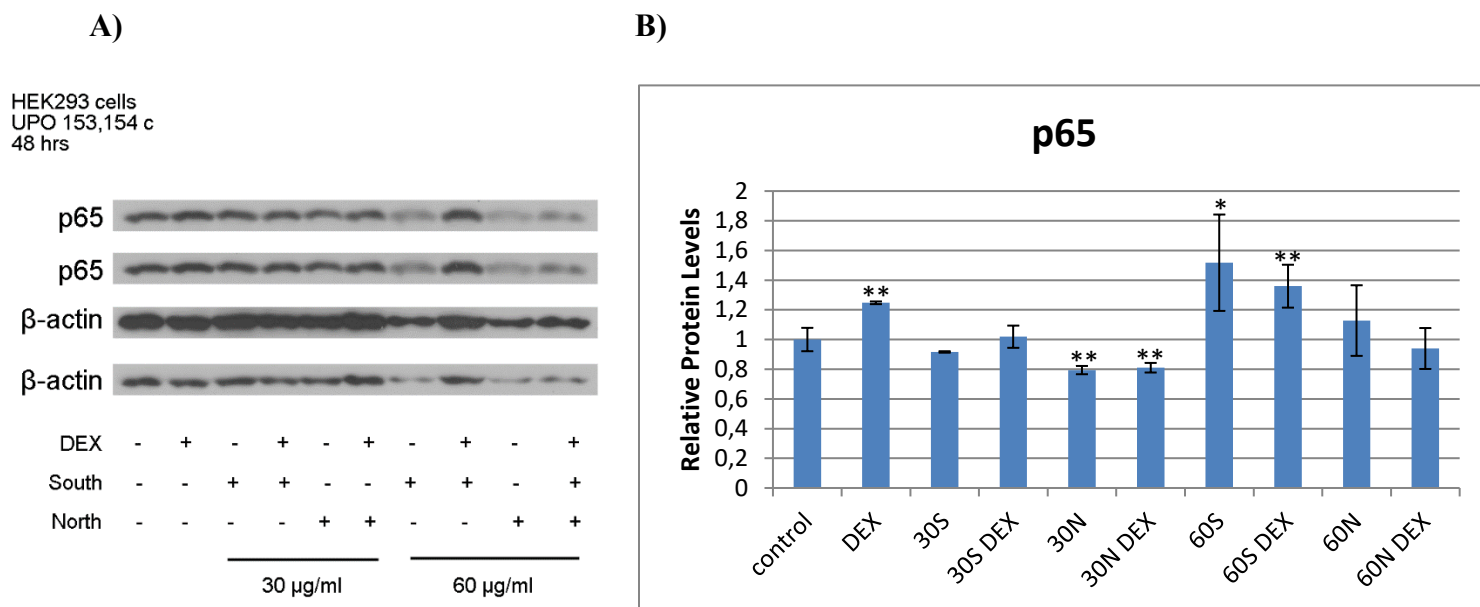
Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) (Εικόνα 3.1.A, 3.1.B), παρατηρείται τάση μείωσης των επιπέδων GR παρουσία του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου σε συγκέντρωση 30 µg/ml. Η μείωση αυτή ενισχύεται κατά τη συγχορήγηση του εκχυλίσματος με DEX. Συγκεκριμένα παρατηρείται τάση μείωσης των επιπέδων του GR σε ποσοστό περίπου 20% και 55%, απουσία και παρουσία DEX, αντίστοιχα σε σύγκριση με τη συνθήκη αναφοράς (control), ωστόσο αυτές οι μεταβολές δεν είναι στατιστικώς σημαντικές. Παρομοίως, η συγκέντρωση 30 µg/ml του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου οδήγησε σε μείωση των επιπέδων του GR σε ποσοστό 25% και 50%, απουσία και παρουσία DEX, αντίστοιχα σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς, χωρίς όμως αυτές οι μειώσεις να είναι στατιστικώς σημαντικές. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η συγκέντρωση των 60 µg/ml του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκάλεσε μείωση των επιπέδων του GR σε ποσοστό 77% (p-value = 0,0166) και 88% (p-value = 0,0086), απουσία και παρουσία DEX, αντίστοιχα σε σχέση

με τη συνθήκη αναφοράς. Τέλος, η συγκέντρωση των 60 $\mu\text{g/ml}$ του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου προκάλεσε επίσης μείωση των επιπέδων του GR σε ποσοστό 59% ($p\text{-value} = 0,041$) και 72% ($p\text{-value} = 0,023$), απουσία και παρουσία DEX, αντίστοιχα σε σύγκριση με τη συνθήκη αναφοράς.

Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK (Εικόνα 3.1.Γ, 3.1.Δ), παρουσία του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου τόσο σε συγκέντρωση 30 $\mu\text{g/ml}$ όσο και σε συγκέντρωση 60 $\mu\text{g/ml}$ παρατηρείται τάση μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK σε ποσοστό περίπου 40% και 85% αντίστοιχα, ενώ η συγχορήγηση των κλασμάτων με DEX δεν τροποποίησε σημαντικά τα προαναφερθέντα ποσοστά μείωσης. Ομοίως, αντίστοιχα πολικά κλάσματα των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου, σε συγκέντρωση 30 $\mu\text{g/ml}$ και 60 $\mu\text{g/ml}$ προκάλεσαν επίσης μείωση των επιπέδων της PEPCK σε ποσοστό περίπου 45%, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και παρουσίας DEX, σε σχέση πάντα με την συνθήκη αναφοράς. Ωστόσο, όλες οι παραπάνω μεταβολές δεν είναι στατιστικώς σημαντικές.

3.1.2) Διερεύνηση της αντιφλεγμονώδους δράσης του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση της επίδρασης του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της p65, μίας πρωτεΐνης που συμμετέχει στο διμερισμό, την πυρηνική μετατόπιση και την ενεργοποίηση του NF- κ B, ενός συμπλέγματος μεταγραφικών παραγόντων, που εμπλέκεται στην ανοσολογική απόκριση (Barnes P.J., 2016). Για το σκοπό αυτό, έγινε καλλιέργεια κυττάρων HEK293 σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζαν στεροειδείς ορμόνες για 48 ώρες. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη των προς μελέτη κλασμάτων φύλλων του μαστιχόδεντρου Νότιας και Βόρειας Χίου σε συγκεντρώσεις 30 και 60 $\mu\text{g/ml}$, καθώς και της δεξαμεθαζόνης (Dex) σε συγκέντρωση 10nM και επώαστηκαν για 48 ώρες. Ακολούθησε συλλογή των κυττάρων και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών από ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ανοσοαποτύπωση κατά Western και εντοπισμός με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων της p65 και του μορίου κανονικοποίησης, τη β -ακτίνη. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 3.2: Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από φύλλα Pistacia Lentiscus Βόρειας και Νότιας Χίου στα επίπεδα έκφρασης της p65 σε κύτταρα HEK293.

Κύτταρα HEK293 αναπτύχθηκαν σε six well plates (200.000 cells/well) για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς phenol red εμπλουτισμένο με 10% FBS (από το οποίο αφαιρέθηκαν με κατάλληλη κατεργασία τα στεροειδή), 1% L-γλουταμίνη και 1% Pen/Strep (starvation). Στην συνέχεια, προστέθηκαν τα προς μελέτη κλάσματα, απουσία και παρουσία DEX, στις συγκεντρώσεις 30 και 60 µg/ml, που φαίνονται στην παραπάνω εικόνα, και τα κύτταρα επωάστηκαν για 48 ώρες. Με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έγινε εντοπισμός της p65 και της β-ακτίνης. Τέλος, έγινε ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών με το πρόγραμμα ImageJ και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. A) Απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες της p65 και β-ακτίνης, B) διάγραμμα με τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της p65 μετά την κανονικοποίησή τους με τα αντίστοιχα επίπεδα της β-ακτίνης.

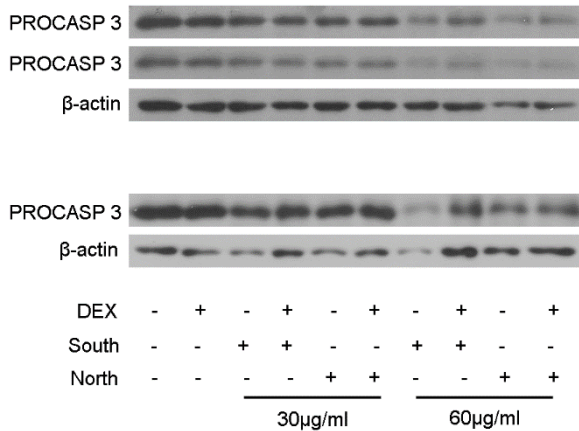
Παρατηρώντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p65 (Εικόνα 3.2), όπου είχαν προστεθεί τα κλάσματα των φύλλων του μαστιχόδεντρου Βόρειας και Νότιας Χίου στις συγκεντρώσεις των 30 µg/ml ήταν σχεδόν ίδια με εκείνα της συνθήκης αναφοράς, απουσία ή παρουσία της DEX, ενώ στις συγκεντρώσεις των 60 µg/ml τα επίπεδα της p65 αυξήθηκαν παρουσία του πολικού κλάσματος των φύλλων της Νότιας Χίου, όχι όμως της Βόρειας Χίου. Η αύξηση αυτή δεν ξεπερνά το 20% και δεν μεταβάλλεται κατά την συγχορήγηση με DEX. Η αύξηση αυτή παρότι στατιστικά σημαντική (p-value = 0,0035 και p-value =0,0057 αντίστοιχα) χρήζει περαιτέρω διερεύνησης και επαλήθευσης.

3.1.3) Διερεύνηση της αποπτωτικής δράσης του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου

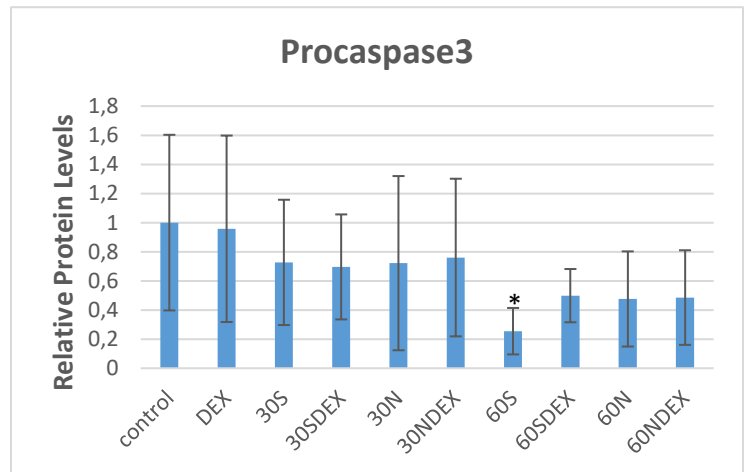
Τέλος, όσον αφορά το πολικό κλάσμα των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Βόρειας και Νότιας Χίου έγινε η αξιολόγηση της επίδρασης του στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-αποπτωτικής προ-κασπάσης 3 και της προ-αποπτωτικής προ-κασπάσης 9. Κύτταρα HEK293 επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζαν στεροειδείς ορμόνες για 48 ώρες. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη των προς μελέτη κλασμάτων φύλλων του μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου σε συγκεντρώσεις 30 και 60μg/ml, απουσία και παρουσία της δεξαμεθαζόνης (Dex) σε συγκέντρωση 10nM και επωάστηκαν για 48 ώρες. Ακολούθησε συλλογή των κυττάρων και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών από ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ανοσοαποτύπωση κατά Western και εντοπισμός με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων της προ-κασπάσης 3, της προ-κασπάσης 9, καθώς και της β-ακτίνης ως μόριο κανονικοποίησης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

A)

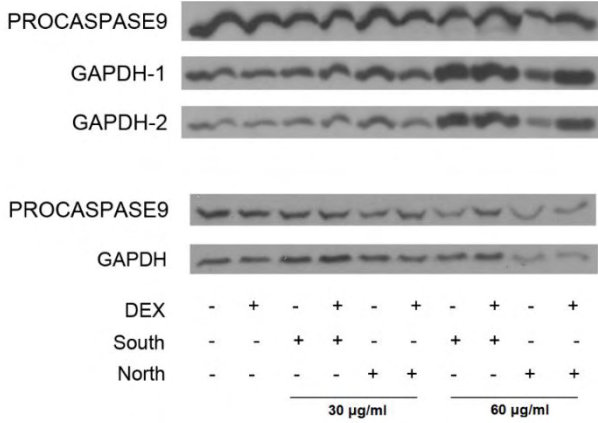
HEK293 cells
South/North c
48h



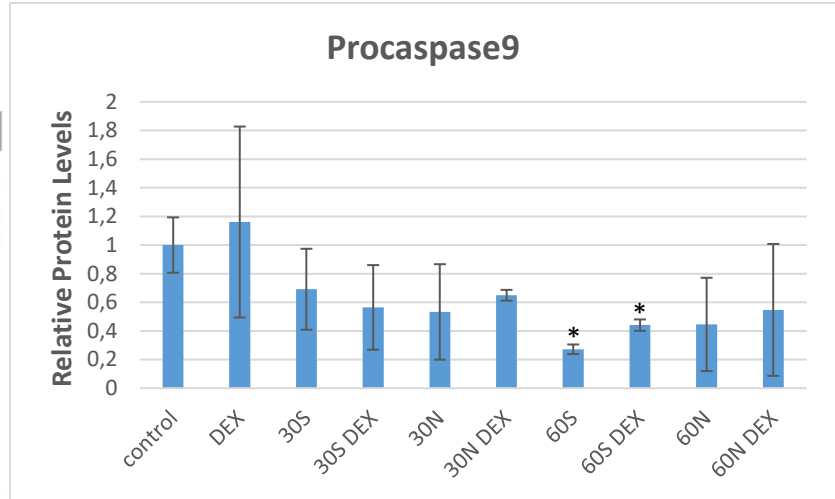
B)



Γ)

HEK293 cells
South/North c
48h

Δ)



Εικόνα 3.3: Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από φύλλα Pistacia Lentiscus Βόρειας και Νότιας Χίου στα επίπεδα έκφρασης της προ-κασπάσης 3 και 9 σε κύτταρα HEK293.

Κύτταρα HEK293 αναπτύχθηκαν σε six well plates (200.000 cells/well) για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς phenol red εμπλουτισμένο με 10% FBS (από το οποίο αφαιρέθηκαν με κατάλληλη κατεργασία τα στεροειδή), 1% L-γλουταμίνη και 1% Pen/Strep (starvation). Στην συνέχεια, προστέθηκαν τα προς μελέτη κλάσματα, απουσία και παρουσία DEX, στις συγκεντρώσεις που φαίνονται στην παραπάνω εικόνα και τα κύτταρα επωάστηκαν για 48 ώρες. Με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έγινε εντοπισμός της προ-κασπάσης 3 και προ-κασπάσης 9, καθώς και της β-ακτίνης και της GAPDH. Τέλος, έγινε ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών με το πρόγραμμα ImageJ και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Α) Απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες της προ-κασπάσης 3 και της β-ακτίνης, Β) διάγραμμα με τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 3 μετά την κανονικοποίησή τους με τα αντίστοιχα επίπεδα της β-ακτίνης. Γ) Απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες της προ-κασπάσης 9 και της GAPDH, Δ) διάγραμμα με τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 9 μετά την κανονικοποίηση ως προς τα αντίστοιχα της GAPDH. Οι τιμές αναπαριστούν στο διάγραμμα της προ-κασπάσης 9 το μέσο όρο \pm SD, n = 2 βιολογικές επαναλήψεις, όπου S: South, N: North.

Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 3 (Εικόνα 3.3.A, 3.3.B), η προσθήκη των κλασμάτων φύλλων του μαστιχόδεντρου της Βόρειας και Νότιας Χίου παρουσίασε μία μείωση των επιπέδων γενικώς σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς. Πιο αναλυτικά, η συγκέντρωση 30 µg/ml του πολικού κλάσματος των φύλλων της Βόρειας και Νότιας Χίου προκάλεσε τάση μείωσης των επιπέδων της προ-κασπάσης 3 σε ποσοστό περίπου 25% και 30% αντίστοιχα, είτε απουσία είτε παρουσία της DEX, χωρίς όμως αυτές οι μειώσεις να είναι στατιστικώς σημαντικές. Περνώντας στη συγκέντρωση 60µg/ml του πολικού κλάσματος η μείωση αυτή αυξάνει σε ποσοστό περίπου 50-70%. Η μείωση αυτή είναι στατιστικά σημαντική στην περίπτωση του

κλάσματος της Νότιας Χίου (p -value = 0,03) και δεν μεταβάλλεται στατιστικώς σημαντικά παρουσία DEX.

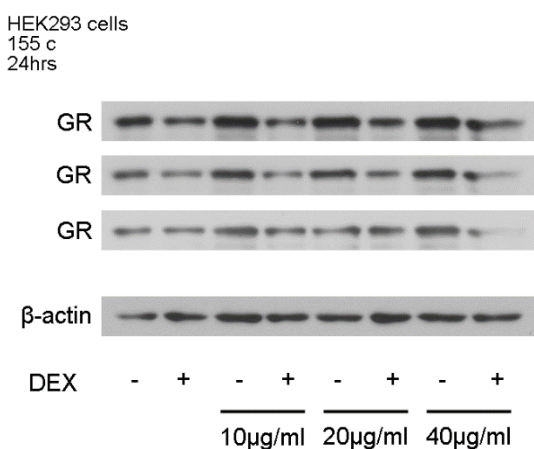
Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 9 (Εικόνα 3.3.Γ, 3.3.Δ), η συγκέντρωση 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ του πολικού κλάσματος προκάλεσε τάση μείωσης των επιπέδων της προ-κασπάσης 9 σε ποσοστό περίπου από 30% έως 50%, απουσία ή παρουσία της DEX, σχετικά με τη συνθήκη αναφοράς, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικώς σημαντικές. Όσον αφορά τη συγκέντρωση 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ του πολικού κλάσματος παρατηρείται μείωση των επιπέδων της προ-κασπάσης 9 σε ποσοστό περίπου από 45% έως 75%, απουσία και παρουσία της DEX, αντίστοιχα σε σύγκριση με τη συνθήκη αναφοράς, με την περίπτωση του κλάσματος της Νότιας Χίου η μείωση να είναι στατιστικώς σημαντική απουσία (p -value = 0,016) και παρουσία (p -value = 0,027) της DEX.

3.2) Διερεύνηση βιολογικών δράσεων ρητίνης του μαστιχόδεντρου Νότιας Χίου

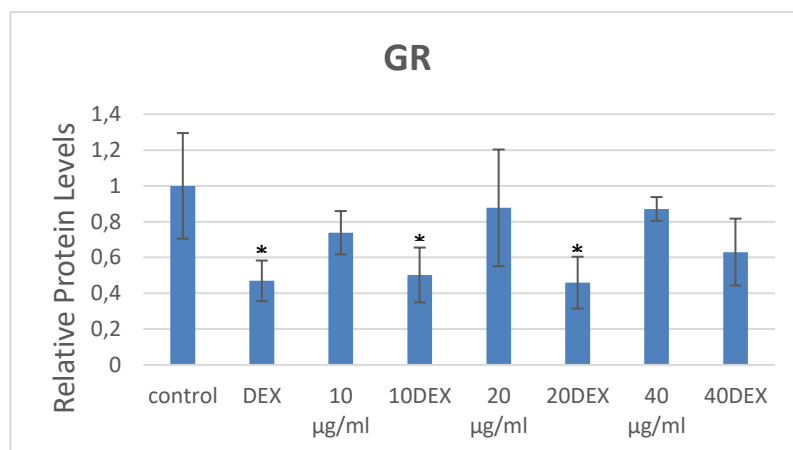
3.2.1) Διερεύνηση της επίδρασης του πολικού κλάσματος της ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα και στις γλυκογονογενετικές δράσεις του GR

Αρχικά, έγινε αξιολόγηση της επίδρασης του πολικού κλάσματος της ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα και στις γλυκογονογενετικές δράσεις του GR. Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων HEK293 σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζαν στεροειδείς ορμόνες για 48 ώρες. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη του προς μελέτη κλάσματος ρητίνης Χίου σε συγκεντρώσεις 10, 20 και 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, καθώς και της δεξαμεθαζόνης (Dex) σε συγκέντρωση 10nM και επώαστηκαν για 24 ώρες. Ακολούθησε συλλογή των κυττάρων και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών από ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ανοσοαποτύπωση κατά Western και εντοπισμός με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων του GR και της PEPCK. Ως μόριο κανονικοποίησης για τα δύο μόρια χρησιμοποιήθηκε η β -ακτίνη. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

A)

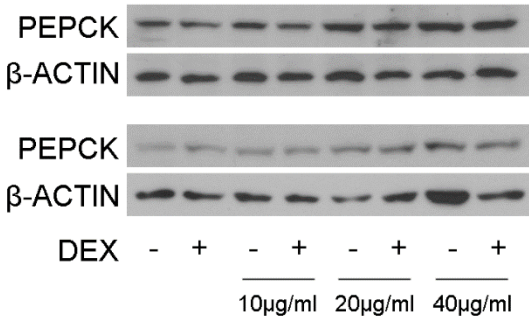


B)

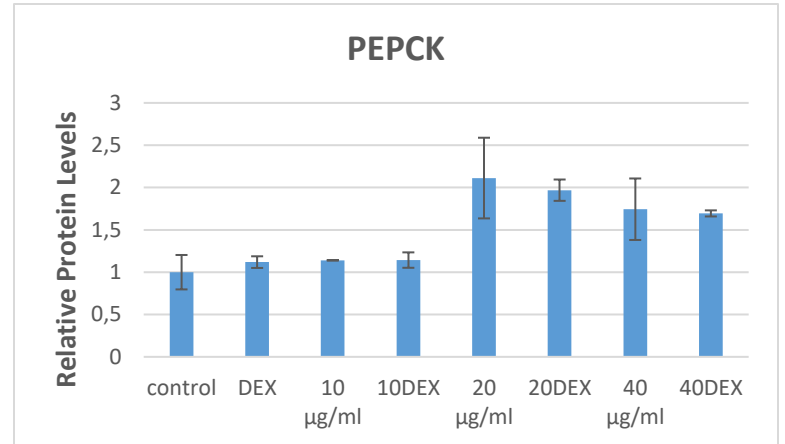


Γ)

HEK293 cells
Exp September 2019
24 hrs



Δ)



Εικόνα 3.4: Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από ρητίνη *Pistacia Lentiscus* της Νότιας Χίου στα επίπεδα έκφρασης του GR και της PEPCK σε κύτταρα HEK293.

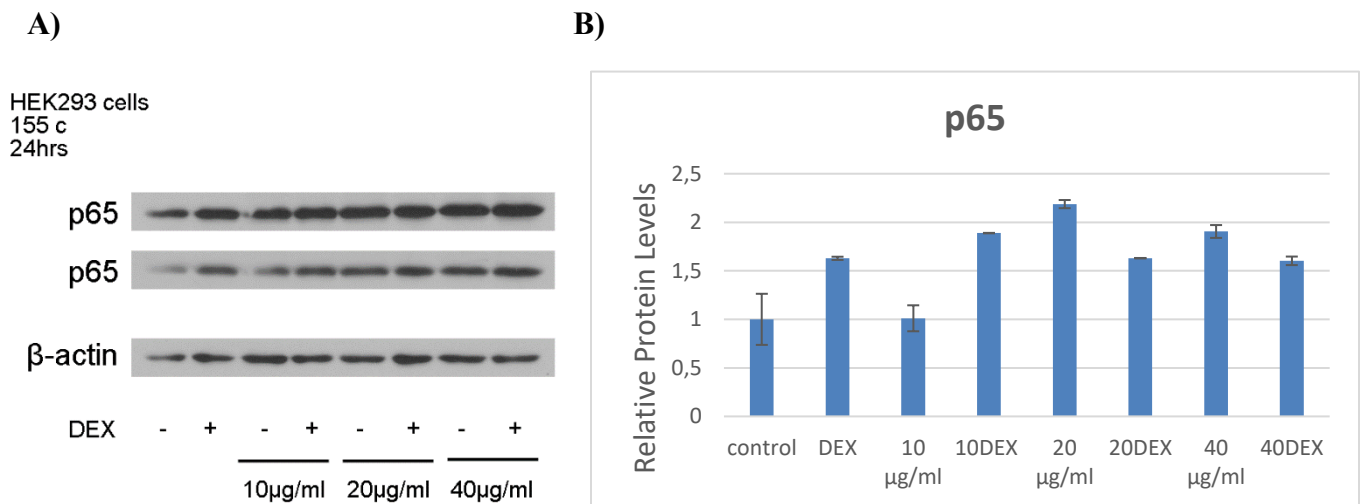
Κύτταρα HEK293 αναπτύχθηκαν σε six well plates (200.000 cells/well) για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς phenol red εμπλουτισμένο με 10% FBS (από το οποίο αφαιρέθηκαν με κατάλληλη κατεργασία τα στεροειδή), 1% L-γλουταμίνη και 1% Pen/Strep (starvation). Στην συνέχεια, προστέθηκε το προς μελέτη κλάσμα, απουσία και παρουσία DEX, στις συγκεντρώσεις που φαίνονται στην παραπάνω εικόνα και τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες. Με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έγινε εντοπισμός του GR και της PEPCK, καθώς και της β-ακτίνης. Τέλος, έγινε ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών με το πρόγραμμα ImageJ και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Α) Απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες του GR και β-ακτίνης, Β) διάγραμμα με τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα του GR μετά την κανονικοποίησή τους με τα αντίστοιχα επίπεδα της β-ακτίνης. Γ) Απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες της PEPCK και της β-ακτίνης, Δ) διάγραμμα με τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK μετά την κανονικοποίησή τους ως προς τα αντίστοιχα της β-ακτίνης, όπου S: South, N: North.

Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR (Εικόνα 3.4.A, 3.4.B), γενικά η προθήκη του κλάσματος ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου δεν προκάλεσε στατιστικώς σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης του GR. Συνχορήγηση των ουσιών με DEX οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική μείωση (p-value = 0,01) των επιπέδων του GR σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς. Η μείωση όμως αυτή οφείλεται στην παρουσία DEX και μόνο, δεδομένου ότι η DEX όταν χορηγείται μόνη της στα κύτταρα προκαλεί αντίστοιχο ποσοστό μείωσης των επιπέδων του GR (περίπου 50%).

Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK (Εικόνα 3.4.Γ, 3.4.Δ), σε γενικές γραμμές η προσθήκη του κλάσματος της ρητίνης οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της PEPCK κατά περίπου 2 φορές σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10µg/ml, παρουσία ή απουσία DEX, σε σχέση με την συνθήκη αναφοράς. Ωστόσο, οι παραπάνω μεταβολές δεν είναι στατιστικώς σημαντικές και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης και επαλήθευσης.

3.2.2) Διερεύνηση της αντιφλεγμονώδους δράσης του πολικού κλάσματος της ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση της επίδρασης του πολικού κλάσματος της ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα του p65. Για το σκοπό αυτό, έγινε καλλιέργεια κυττάρων HEK293 σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζαν στεροειδείς ορμόνες για 48 ώρες. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη του προς μελέτη κλάσματος ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου σε συγκεντρώσεις 10, 20 και 40μg/ml, καθώς και της δεξαμεθαζόνης (Dex) σε συγκέντρωση 10nM και επώαστηκαν για 24 ώρες. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών από ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ανοσοαποτύπωση κατά Western και εντοπισμός με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων της υπομονάδας p65 του NF-κβ και β-ακτίνης ως μόριο κανονικοποίησης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



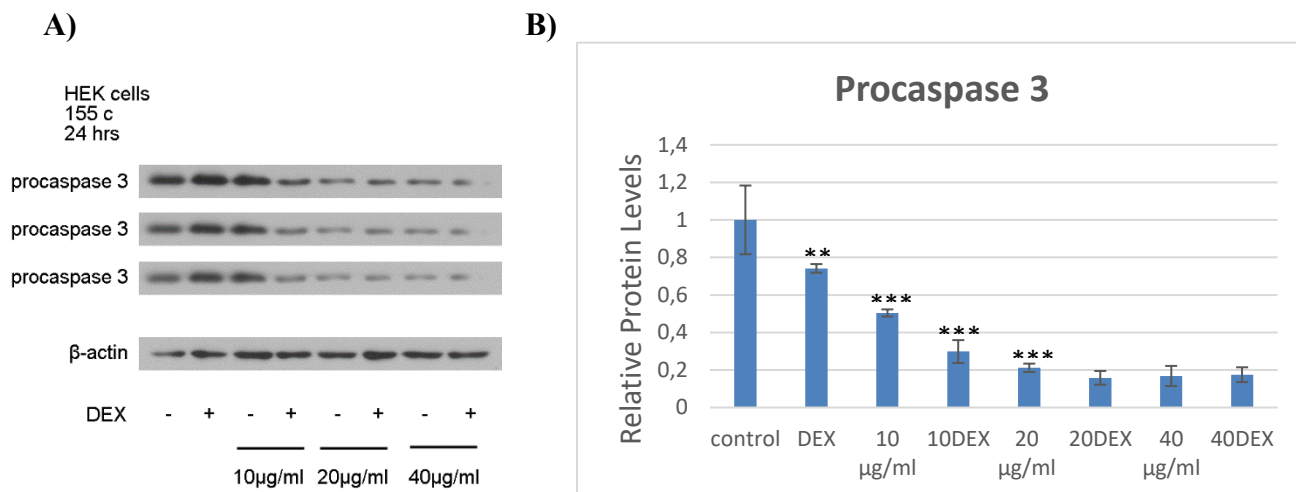
Εικόνα 3.5: Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από ρητίνη *Pistacia Lentiscus* της Νότιας Χίου στα επίπεδα έκφρασης της p65 σε κύτταρα HEK293.

Κύτταρα HEK293 αναπτύχθηκαν σε six well plates (200.000 cells/well) για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς phenol red εμπλουτισμένο με 10% FBS (από το οποίο αφαιρέθηκαν με κατάλληλη κατεργασία τα στεροειδή), 1% L-γλουταμίνη και 1% Pen/Strep (starvation). Στην συνέχεια, προστέθηκαν το προς μελέτη κλάσμα, απουσία και παρουσία DEX, στις συγκεντρώσεις που φαίνονται στην παραπάνω εικόνα και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες. Με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έγινε εντοπισμός της p65 υπομονάδας του NF-κβ και της β-ακτίνης. Τέλος, έγινε ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών με το πρόγραμμα ImageJ και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. A) Απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες της p65 και β-ακτίνης, B) διάγραμμα με τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της p65 μετά την κανονικοποίησή τους με τα αντίστοιχα επίπεδα της β-ακτίνης, όπου S: South, N: North.

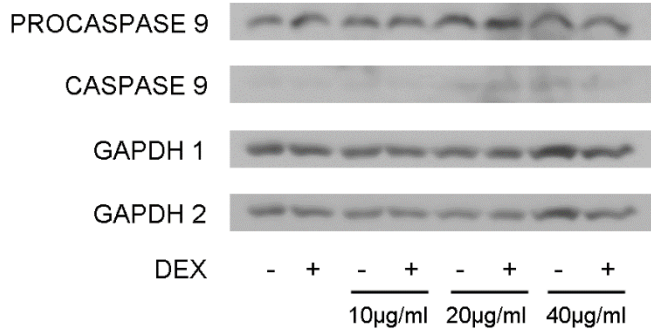
Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p65 (Εικόνα 3.5), γενικότερα παρατηρήθηκε μία τάση αύξησης στα επίπεδά της, κατά 1,5-2 φορές, με την προσθήκη των διάφορων συγκεντρώσεων του κλάσματος της ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 20 $\mu\text{g/ml}$, παρουσία ή απουσία DEX. Ωστόσο η δράση αυτή χρήζει περαιτέρω επαλήθευσης δεδομένου ότι οι παρατηρούμενες διαφορές δεν είναι στατιστικώς σημαντικές.

3.2.3) Διερεύνηση της αποπτωτικής δράσης του πολικού κλάσματος της ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου

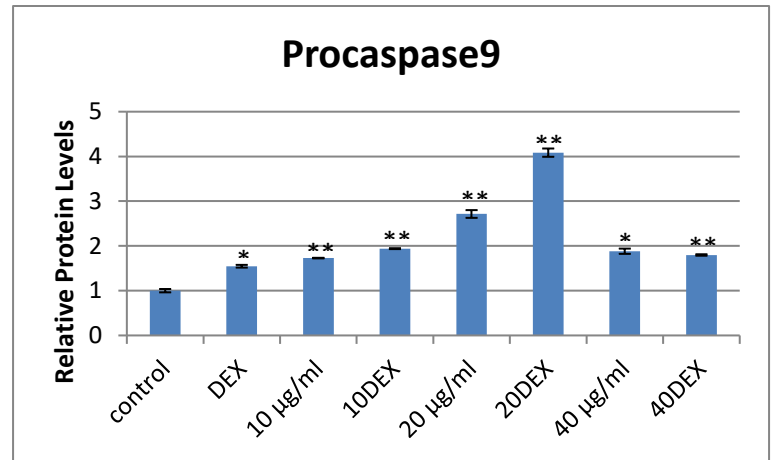
Τέλος, όσον αφορά το πολικό κλάσμα της ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου έγινε η αξιολόγηση της επίδρασης του στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-αποπτωτικής προ-κασπάσης 3, της προ-αποπτωτικής προ-κασπάσης 9, καθώς και της ενεργής κασπάσης 9. Κύτταρα HEK293 επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζαν στεροειδείς ορμόνες για 48 ώρες. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη του προς μελέτη κλάσματος ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου σε συγκεντρώσεις 10, 20 και 40 $\mu\text{g/ml}$, καθώς και της δεξαμεθαζόνης (Dex) σε συγκέντρωση 10nM και επωάστηκαν για 24 ώρες. Ακολούθησε συλλογή των κυττάρων και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών από ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ανοσοαποτύπωση κατά Western και εντοπισμός με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων της προ-κασπάσης 3 και της προ-κασπάσης 9. Ως μόρια κανονικοποίησης για τα δύο μόρια χρησιμοποιήθηκε η β -ακτίνη και η GAPDH. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



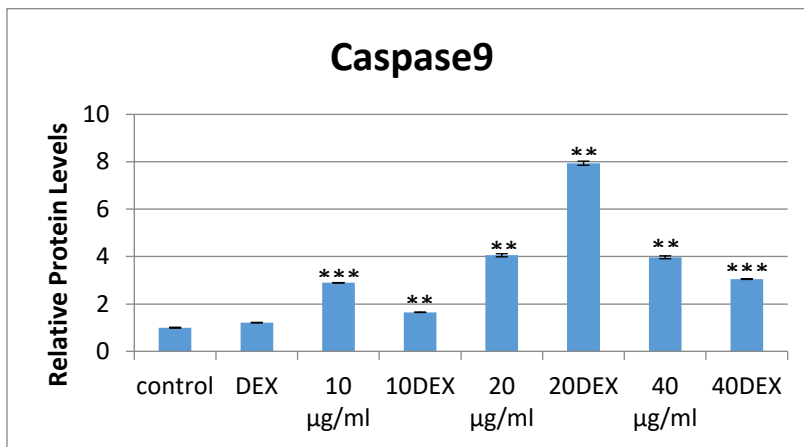
Γ)

HEK293
155 c
24h

Δ)



Ε)



Εικόνα 3.6: Διερεύνηση της επίδρασης κλασμάτων από ρητίνη Pistacia Lentiscus της Νότιας Χίου στα επίπεδα έκφρασης της προ-κασπάσης 3, 9 και κασπάσης 9 σε κύτταρα HEK293.

Κύτταρα HEK293 αναπτύχθηκαν σε six well plates (200.000 cells/well) για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς phenol red εμπλουτισμένο με 10% FBS (από το οποίο αφαιρέθηκαν με κατάλληλη κατεργασία τα στεροειδή), 1% L-γλουταμίνη και 1% Pen/Strep (starvation). Στην συνέχεια, προστέθηκαν το προς μελέτη κλάσμα, απουσία και παρουσία DEX, στις συγκεντρώσεις που φαίνονται στην παραπάνω εικόνα και τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες. Με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έγινε εντοπισμός της προ-κασπάσης 3 και της προ-κασπάσης 9, της κασπάσης 9, καθώς και της β-ακτίνης και της GAPDH. Τέλος, έγινε ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών με το πρόγραμμα ImageJ και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Α) Απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες της προ-κασπάσης 3 και β-ακτίνης, Β) διάγραμμα με τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 3 μετά την κανονικοποίησή τους με τα αντίστοιχα επίπεδα της β-ακτίνης. Γ) Απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες της προ-κασπάσης 9, της κασπάσης 9 και της GAPDH, Δ) διάγραμμα με τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 9 μετά την κανονικοποίησή τους ως προς τα αντίστοιχα της GAPDH, και Ε) διάγραμμα με τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της

κασπάσης 9 μετά την κανονικοποίησή τους με τα αντίστοιχα επίπεδα της GAPDH, όπου S: South, N: North.

Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 3 (Εικόνα 3.6.A, 3.6.B), παρατηρήθηκε γενικά μεγάλη μείωση σε ποσοστό από 50% έως 85% στα επίπεδά της με την προσθήκη των διάφορων συγκεντρώσεων του πολικού κλάσματος ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς. Η μείωση ήταν στατιστικώς σημαντική στην περίπτωση της συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p\text{-value} = 0,0006$) και της συγκέντρωσης 20 $\mu\text{g/ml}$ ($p\text{-value} = 0,0001$).

Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 9 (Εικόνα 3.6.Γ, 3.6.Δ), μετά την προσθήκη του πολικού κλάσματος ρητίνης παρατηρήθηκε μία τάση αύξησης των επιπέδων της, κατά 1,5-4 φορές, σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς είτε απουσία είτε παρουσία της DEX. Όλες οι μεταβολές είναι στατιστικώς σημαντικές.

Τέλος, όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ενεργούς κασπάσης 9, επίσης παρατηρήθηκε τάση αύξησης των επιπέδων της, κατά 1,5-8 φορές, με την προσθήκη του πολικού κλάσματος της ρητίνης, απουσία ή παρουσία της DEX, σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς, με όλες τις αυξήσεις να είναι στατιστικώς σημαντικές.

4) Συμπεράσματα

Η επιστημονική κοινότητα συνεχίζει να φέρνει στο φως όλο και περισσότερες αποδείξεις των ευεργετικών δράσεων τόσο των φύλλων έως και σήμερα, όσο και της ρητίνης του μαστιχόδεντρου Χίου, οι οποίες είναι γνωστές ακόμη και από την αρχαιότητα. Τόσο προ-κλινικές, όσο και κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει τις αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, επιδράσεις στο μεταβολισμό και καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις αυτού του ευεργετικού φυτού. Επιπλέον, με την πάροδο των χρόνων, νέες έρευνες εξακριβώνουν τους μηχανισμούς σε μοριακό επίπεδο με τους οποίους δρουν οι χημικές ενώσεις των φυτικών εκχυλισμάτων και στους οποίους οφείλονται αυτές οι ευεργετικές δράσεις του μαστιχόδεντρου Χίου (Balan K.V., et al., 2005, Dedoussis G.V.Z., et al., 2004, Dimas K.S., et al., 2012, Kaliora A.C., et al., 2007, Kim J.H., et al., 2016, Li S.J., et al., 2011, Pachi V.K., et al., 2020, Papada E. & Kaliora A.C., 2019, Zhou L., et al., 2009).

Έχουν γίνει πολλές χημικές αναλύσεις των εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων τόσο από ρητίνη της Μαστίχας Χίου, για την οποία έχουμε και τις περισσότερες αναφορές από την επιστημονική κοινότητα, όσο και από των φύλλων του μαστιχόδεντρου Χίου, για τα οποία δεν υπάρχει αρκετή βιβλιογραφία και είναι απαραίτητο περαιτέρω έρευνα, με σκοπό την εύρεση των συστατικών τους, στα οποία οφείλονται οι ευεργετικές δράσεις αυτού του φυτού. Αν και παρουσιάζονται διαφορές στη σύσταση των εκχυλισμάτων της ρητίνης και των φύλλων του μαστιχόδεντρου Χίου μεταξύ των διάφορων μελετών λόγω κυρίως περιβαλλοντικών παραγόντων, η κύρια κατηγορία που απαρτίζουν τα εκχυλίσματα ρητίνης και φύλλων είναι τα τριτερπένια, καθώς και φυτοστερόλες, πολυφαινολικά μόρια, φυσικά πολυμερή και πολλά ακόμη, αλλά σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Όλες αυτές οι χημικές ενώσεις δρουν είτε μεμονωμένα είτε συνδυαστικά και επάγουν τις θεραπευτικές δράσεις του φυτού (Bamprouli A., et al., 2015, Pachi V.K., et al., 2020, Spyridoulou et al., 2017, Tabanca N., et al., 2020).

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα τριτερπένια, η ομάδα χημικών ενώσεων που απαρτίζουν σε μεγάλο ποσοστό το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου, έχουν παρόμοια δομή με τα γλυκοκορτικοειδή, τα οποία δρουν μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Τα γλυκοκορτικοειδή είναι ορμόνες της οικογένειας στεροειδών, που συντίθενται και απελευθερώνονται από το φλοιό των επινεφριδίων. Αφού προσδεθούν στον GR και τον ενεργοποιήσουν, αυτός μετατοπίζεται στον πυρήνα και με αυτόν τον τρόπο επεμβαίνει στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στόχων του. Τα γλυκοκορτικοειδή εξακολουθούν να είναι τα πιο συχνά συνταγογραφούμενα φάρμακα παγκοσμίως για την καταπολέμηση διαφόρων δερματολογικών και αυτοάνοσων ασθενειών, οφθαλμικών παθήσεων, της οξείας και χρόνιας φλεγμονής, καθώς και για την αντιμετώπιση συγκεκριμένων τύπου καρκίνου. Δυστυχώς, η συστηματική χρήση τους οδηγεί συχνά σε ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως μεταβολικές ανωμαλίες, ευαισθησία σε λοιμώξεις, πεπτικό έλκος, οστεοπόρωση, απώλεια μυών, επαγωγή της γλυκονεογένεσης, ανακατανομή του λίπους και αυξημένος καταβολισμός λίπους και πρωτεϊνών και άλλες πολλές. Συνεπώς, καθίσταται αναγκαία η εύρεση και σύνθεση νέων γλυκοκορτικοειδών φυτικής προέλευσης, τα οποία να αποτελούν αγωνιστές του GR, επάγοντας τις θεραπευτικές του ιδιότητες με όσο το δυνατόν λιγότερο την εκδήλωση των παρενεργειών της σηματοδότησής του (Georgatza D., et al., 2016, Karra A.G., et al., 2019 Sulaiman R.S., et al., 2018).

Επομένως, στηριζόμενοι στα παραπάνω, σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η αξιολόγηση των βιολογικών δράσεων εκχυλισμάτων τόσο από τη ρητίνη όσο και από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου Χίου, καθώς και η σύγκριση των δράσεων των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου, που παράγει ρητίνη, με αυτό της Βόρειας Χίου που δεν παράγει. Πιο συγκεκριμένα, στόχος ήταν η διερεύνηση των αντι-πολλαπλασιαστικών και αντιφλεγμονωδών δράσεων των πολικών κλασμάτων από φύλλα του μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου, καθώς και κλασμάτων από τη ρητίνη του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου. Παράλληλα, έγινε διερεύνηση για τη συμμετοχή των παραπάνω εκχυλισμάτων στο σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, καθώς και των πιθανών μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων ασκούν τις δράσεις τους. Αυτή η μελέτη συμβάλλει στον χαρακτηρισμό των βιολογικών δράσεων εκχυλισμάτων από φύλλα και μαστίχα Χίου και συνεισφέρει στην πιθανή εύρεση επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, ώστε να καταπολεμηθούν σοβαρές ασθένειες, όπως τα αυτοάνοσα και μεταβολικά νοσήματα, ο καρκίνος, με όσο το δυνατόν λιγότερες παρενέργειες, από αυτές που προκαλούνται από τη χρήση του φυσικού στεροειδούς, την κορτιζόλη.

Αρχικά, έγινε σύγκριση της αξιολόγησης των βιολογικών δράσεων του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου μεταξύ της Βόρειας και Νότιας Χίου. Πρώτα, εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και της PEPCK, ώστε να διερευνηθεί η πιθανή επίδραση των κλασμάτων στις γλυκονεογενετικές δράσεις του GR σε κύτταρα HEK293. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και της PEPCK μειώθηκαν παρουσία των πολικών κλασμάτων των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Βόρειας και της Νότιας Χίου και η παρουσία της DEX οδηγούσε σε περαιτέρω μείωση των επιπέδων τους. Στις συγκεντρώσεις των 30 μg/ml παρατηρήθηκε ίδια μείωση στα επίπεδα του GR και της PEPCK και στα δύο κλάσματα των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Βόρειας και της Νότιας Χίου, ενώ στις συγκεντρώσεις των 60 μg/ml μεγαλύτερη μείωση προκάλεσε το κλάσμα της Νότιας Χίου έως 77% για τα επίπεδα του GR και έως 87% για τα επίπεδα της PEPCK, έναντι 60% και 50% μείωση των επιπέδων GR και PEPCK αντίστοιχα, που προκαλεί το αντίστοιχο πολικό κλάσμα από το σχίνο της Βόρειας Χίου. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν τη μη-επαγωγή των γλυκονεογενετικών δράσεων του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών από τα υπό μελέτη κλάσματα. Στη συνέχεια, εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p65, στα πλαίσια της μελέτης και χαρακτηρισμού των αντιφλεγμονωδών δράσεων των πολικών κλασμάτων των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Βόρειας και της Νότιας Χίου σε κύτταρα HEK293. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p65, σε κύτταρα που είχαν επωαστεί με τα κλάσματα των φύλλων του μαστιχόδεντρου Βόρειας και Νότιας Χίου στις συγκεντρώσεις 30 μg/ml δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή, απουσία ή παρουσία της DEX, ενώ στις συγκεντρώσεις 60 μg/ml τα επίπεδα της p65 αυξήθηκαν παρουσία του πολικού κλάσματος των φύλλων της Νότιας Χίου, όχι όμως της Βόρειας Χίου. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η παρατηρούμενη μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ που παρατηρήθηκε σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, δεν οφείλεται σε τυχόν μειωμένα πρωτεϊνικά του επίπεδα του NF-κΒ. Τέλος, εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-αποπτωτικής προ-κασπάσης 3 και της προ-αποπτωτικής προ-κασπάσης 9 σε κύτταρα HEK293, ώστε να διερευνηθεί η αποπτωτική δράση του πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 3 μειώθηκαν παρουσία των πολικών κλασμάτων των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Βόρειας και της Νότιας Χίου σε συγκεντρώσεις

30 $\mu\text{g/ml}$ είτε απουσία είτε παρουσία της DEX, ενώ σε συγκεντρώσεις 60 $\mu\text{g/ml}$ παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση στα επίπεδα της και στα δύο κλάσματα των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Βόρειας και της Νότιας Χίου, με τη μεγαλύτερη μείωση να παρατηρείται από το κλάσμα της Νότιας Χίου. Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 9, γενικά η προσθήκη των δύο κλασμάτων των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Βόρειας και της Νότιας Χίου οδήγησε στη μείωση των επιπέδων της. Στις συγκεντρώσεις 30 $\mu\text{g/ml}$ ήταν ελαφρώς πιο μειωμένα τα επίπεδα της στο κλάσμα των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου σε σχέση με εκείνο της Νότιας Χίου, ενώ στις συγκεντρώσεις 60 $\mu\text{g/ml}$ μεγαλύτερη μείωση έως 73% των επιπέδων της προ-κασπάσης 9 προκάλεσε το κλάσμα της Νότιας Χίου σε σχέση με αυτών στη συνθήκη αναφοράς. Επομένως, τα πολικά κλάσματα των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Βόρειας και της Νότιας Χίου επάγουν την απόπτωση, καθώς μειώνουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 3, ενώ η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προ-κασπάσης 9 δείχνει ότι είναι μιτοχονδριακά εξαρτώμενη (Gruver-Yates A. L., et al., 2013, Psarra A.M., et al., 2008).

Ακολούθησε η αξιολόγηση των βιολογικών επιδράσεων του πολικού κλάσματος της ρητίνης της Νότιας Χίου. Αρχικά, εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και της PEPCK, ώστε να διερευνηθεί η πιθανή επίδραση του συγκεκριμένου κλάσματος στις γλυκονεογενετικές δράσεις του GR σε κύτταρα HEK293. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR υπό την επίδραση του πολικού κλάσματος της ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου, ενώ κατά την συγχορήγηση του υπό μελέτη κλάσματος με DEX παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του GR, γεγονός που αποδίδεται στη δράση της DEX, καθώς η DEX έχει τη δυνατότητα από μόνη της να προκαλεί μείωση των επιπέδων του GR (περίπου 50%). Επιπλέον, όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της στις συγκεντρώσεις 20 και 40 $\mu\text{g/ml}$ του πολικού κλάσματος της ρητίνης της Νότιας Χίου είτε απουσία είτε παρουσία της DEX, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικώς σημαντική, γεγονός που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Ακόμη, εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65, ώστε να μελετηθεί και χαρακτηριστεί η παρατηρούμενη από άλλα μέλη της ομάδας μας αντιφλεγμονώδης δράση του πολικού κλάσματος της ρητίνης της Νότιας Χίου σε κύτταρα HEK293. Γενικότερα παρατηρήθηκε μία αύξηση στα επίπεδά της με την προσθήκη των διάφορων συγκεντρώσεων του πολικού κλάσματος της ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου, κυρίως σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 20 $\mu\text{g/ml}$, απουσία ή παρουσία της DEX, χωρίς όμως να είναι στατιστικώς σημαντική. Τέλος, εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-αποπτωτικής προ-κασπάσης 3 και της προ-αποπτωτικής προ-κασπάσης 9, καθώς και της ενεργούς κασπάσης 9 σε κύτταρα HEK293, ώστε να διερευνηθεί η αποπτωτική δράση του πολικού κλάσματος της ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου. Παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση, μέγιστη έως και 80% περίπου, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 3 με την προσθήκη των διάφορων συγκεντρώσεων του πολικού κλάσματος ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου με την παρουσία της DEX να ενισχύει αυτές τις μειώσεις. Τις μεγαλύτερες μειώσεις έδειξαν οι συγκεντρώσεις 20 και 40 $\mu\text{g/ml}$, υποδηλώνοντας την επαγωγή της απόπτωσης παρουσία του πολικού κλάσματος της ρητίνης. Τέλος, όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 9 και της κασπάσης 9, γενικά η προσθήκη του πολικού κλάσματος ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων τους. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αύξηση εντοπίστηκε στη συγκέντρωση των 20 $\mu\text{g/ml}$ και η παρουσία της DEX οδήγησε σε μικρή αύξηση των επιπέδων, εκτός από τη συγκέντρωση των 40 $\mu\text{g/ml}$, στην οποία παρουσίασε μία μικρή

μείωση, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παρατηρούμενη αποπτωτική δράση δεν είναι μιτοχονδριακά επαγόμενη, με το αποτέλεσμα να χρήζει περαιτέρω επαλήθευση και διερεύνηση. Ωστόσο, και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κασπάσης 9 παρατηρήθηκαν αυξημένα παρουσία του ίδιου κλάσματος, γεγονός που έρχεται σε αντιδιαστολή με την παρατηρούμενη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προ-κασπάσης 9 και απαιτεί κι αυτό περαιτέρω έλεγχο και διερεύνηση.

Συνοψίζοντας, όσον αφορά το πολικό κλάσμα των φύλλων του μαστιχόδεντρου της Βόρειας και Νότιας Χίου, βάσει των αποτελεσμάτων μας εμφανίζει αντι-υπεργλυκαιμικές και αποπτωτικές δράσεις σε κύτταρα HEK293, ενώ δεν προκαλεί μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της p65, υποδηλώνοντας ότι η παρατηρούμενη μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του παράγοντα φλεγμονής NF-κβ δεν οφείλεται σε μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα. Το πολικό κλάσμα της ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, παρουσία DEX, εμφανίζει αποπτωτικές δράσεις, ενώ για τις μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα PEPCK, της p65, και της προ-κασπάσης 9 είναι απαραίτητο να γίνει περαιτέρω έρευνα. Η συγκεκριμένη μελέτη μπορεί να συνεισφέρει στην έρευνα για τη μελλοντική χρήση των κλασμάτων των φύλλων και της ρητίνης του μαστιχόδεντρου της Χίου ως εν δυνάμει φάρμακο για την καταπολέμηση φλεγμονωδών νοσημάτων και καρκίνου, πιθανόν μέσω της αλληλεπίδρασής του με τη σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών, εξ ίσου αποτελεσματικά με το φυσικό γλυκοκορτικοειδές κορτιζόλη αλλά με όσο το δυνατόν λιγότερες πιθανές παρενέργειες.

Βιβλιογραφία

- Bampouli A., Kyriakopoulou K., Papaefstathiou G., Loulia V., Krokida M., Magoulas K., (2014), « Comparison of different extraction methods of Pistacialentiscus var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition», *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 1-11.
- 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.
- 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*, 19, 93–102.
- Barnes P.J., (2016), «Glucocorticosteroids», *Handbook of Experimental Pharmacology, Springer*, 1-23.
- Bekhbat M., Rowson S.A., Neigh G.N., (2017), « Checks and Balances: the Glucocorticoid Receptor and NFκB in Good Times and Bad», *Front Neuroendocrinol.*, 46, 15-31
- 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, 293–303
- Dimas K.S., Pantazis P., Ramanujam R., (2012), «Chios Mastic Gum: A Plant-produced Resin Exhibiting Numerous Diverse Pharmaceutical and Biomedical Properties», *In Vivo*, 26, 777-786.
- Georgatza D., Gorgogietas V.A., Kylindria P., Charalambousa M.C., Papadopoulou K., Hayes J.M., Anna-Maria G. Psarra A.M., (2016), «The triterpene echinocystic acid and its 3-O-glucoside derivative are revealed as potent and selective glucocorticoid receptor agonists», *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1-48.
- Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A., (2013), *Immunology-Kuby* (2nd Ed.), Cyprus: Broken Hill Publicers LTD.
- Gruver-Yates A., Cidlowski J., (2013), «Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword», *Cells*, 2, 202-223.
- He M.L., Chen W.W., Zhang P.J., Jiang A.L., Fan W., Yuan H.Q., Liu W.W., Zhang J.Y., (2007), «Gum mastic increases maspin expression in prostate cancer cells», *Acta Pharmacol Sin*, 28, 567-572.
- He B., Cruz-Topete D., Oakley R.H., Xiao X., Cidlowski J.A., (2016), «Human glucocorticoid receptor β regulates gluconeogenesis and inflammation in mouse liver», *Mollecular and Cell Biology*, 36, 714–730.

- Kaliora A.C., Stathopoulou M.G., Triantafillidis J.K., Dedoussis G.V.Z., Andrikopoulos N.K., (2007), «Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease», *World J Gastroenterol*, 13, 748–753.
- Kaliora A.C., Stathopoulou M.G., Triantafillidis J.K., Dedoussis G.V.Z., Andrikopoulos N.K., (2007), «Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn's disease treated with mastic», *World J Gastroenterol*, 13, 6031–6036.
- Karra A.G., Konstantinou M., Tzortziou M., Tsialtas I., Kalousi F.D., Garagounis C., Hayes J.M., Psarra A.M., (2019), «Potential Dissociative Glucocorticoid Receptor Activity for Protopanaxadiol and Protopanaxatriol», *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 94.
- Kim J.H., Choi J.H., Jung Y.S., Cho M.J., Lee Y.E., Park D.O., Song K.B., (2016), «Anticancer effect of mastic on human oral cancer cells» *J Korean Acad Oral Heal*, 40, 143.
- Li S.J., Cha I.H., Nam W., (2011), « Chios Mastic Gum Extracts as a Potent Antitumor Agent that Inhibits Growth and Induces Apoptosis of Oral Cancer Cells», *Asian Pacific J Cancer Prev*, 12, 1877-1880.
- Loutrari H., Magkouta S., Pyriochou A., Koika V., Kolisis F.N., Papapetropoulos A., Roussos C., (2006), «Mastic oil from Pistacia lentiscus var. chia inhibits growth and survival of human K562 leukemia cells and attenuates angiogenesis», *Nutr. Cancer*, 55, 86–93.
- Magkouta S., Stathopoulos G.T., Psallidas I., Papapetropoulos A., Kolisis F.N., Roussos C., Loutrari H., (2009), «Protective Effects of Mastic Oil From Pistacia Lentiscus Variation Chia Against Experimental Growth of Lewis Lung Carcinoma», *Nutr. Cancer*, 61, 640–8.
- 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*, 1-83.
- Papada E., Kaliora A.C., (2019), «Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Mastiha: A Review of Preclinical and Clinical Studies», *Antioxidants*, 8, 208.
- Papalois A., Gioxari A., Kaliora A.C., Lymperopoulou A., Agrogiannis G., Papada E., Andrikopoulos N.K., (2012), «Chios mastic fractions in experimental colitis: Implication of the nuclear factor B pathway in cultured HT29 cells», *J Med. Food*, 15, 974–983.
- Psarra A.M., Solakidi S., Trougakos I.P., Margaritis L.H., Spyrou G., Sekeris C.E., (2005), «Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli», *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 37, 2544-58.

- Psarra A.M., Sekeris C.E., (2008), «Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment», *Biochimica et Biophysica Acta, ELSEVIER*, 1783, 1 – 11.
- Psarra A.M., Sekeris C.E., (2009), «Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions», *Biochimica et Biophysica Acta, ELSEVIER*, 1787, 431-436.
- Psarra AM, Sekeris C.E., (2011), «Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: Role of the mitochondrial glucocorticoid receptor», *Biochimica et Biophysica Acta, ELSEVIER*, 1813, 1814– 1821.
- 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», *Sci. Rep.*, 7, 3782.
- Sulaiman R.S., Kadmiela M. and Cidlowski J.A., (2018), « Glucocorticoid receptor signaling in the eye», *Steroids*, 133, 60–66.
- 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, 2136.
- Vitellius G., Trabado S., Bouligand J., Delemer B., Lombès M., (2018), «Pathophysiology of Glucocorticoid Signaling», *Annales d'Endocrinologie*, 79, 98–106.

Ευχαριστίες

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 τη εμπιστοσύνη καθ' όλη της διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερώς την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, από την οποία προμηθευτήκαμε το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου και τα φύλλα του μαστιχόδεντρου για την άψογη συνεργασία μας, τη διαρκή επικοινωνία και την υλική υποστήριξη της έρευνας μας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, την Δρ. Σκαμνάκη, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού, και τον Δρ. Λεωνίδα Δημήτριο, Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτωρ Φωτεινή Καλούση για την υπομονή, τις γνώσεις την όρεξη και την καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο καθώς επίσης και τους υποψήφιους διδάκτορες Κατερίνα Καρρά, Ιωάννη Τσιάλτα και Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο για την υποστήριξη και βοήθεια τους. 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 στο πλευρό και με ηθική στήριξη με βοήθησαν να ολοκληρώσω ένα ακόμη σημαντικό βήμα για μένα.