



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ &  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



## ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ



Πτυχιακή Εργασία

Σοφία Δημόθουρα του Αποστόλου  
Λάρισα, 2021

# **ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ**

**ΣΟΦΙΑ ΔΗΜΟΘΥΡΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΔΡ. ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

## **INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM PISTACIA LENTISCUS VAR.CHIA**

**SOFIA DIMOTHYRA**

**SUPERVISOR: Dr. ANNA-MARIA PSARRA**

**LABORATORY OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL  
BIOCHEMISTRY**

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Άννα-Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας

Δημήτριος Λεωνίδας, Καθηγητής Βιοχημείας

Βασιλική Σκαμνάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας – Μεταβολισμού

Υπογραφή

Υπογραφή

Υπογραφή

ΨΑΡΡΑ ΑΜ

ΛΕΩΝΙΔΑΣ Δ

ΣΚΑΜΝΑΚΗ Β

## **Ευχαριστίες**

*Πριν την παρουσίαση αυτής της πτυχιακής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που ήταν αρωγοί στη διεκπεραίωση της.*

*Αρχικά, 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 ευκαιρία που μου έδωσε.. Η εμπιστοσύνη, η συνεχής ενθάρρυνση και η υποστήριξη της αποτέλεσαν πολύτιμα εφόδια για την εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας μου.*

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

*Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στην Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, η οποία μας προμήθευσε με το εκχύλισμα της Μαστίχας, για την υλική υποστήριξη της έρευνας μας και την εξαιρετική συνεργασία μας.*

*Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω εγκάρδια την υποψήφια διδάκτωρ Φωτεινή Καλούση για την άψογη συνεργασία μας, τη συνεχή καθοδήγηση της, τις πολύτιμες γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου, την υπομονή της και την ανιδιοτελή προσφορά της στην ολοκλήρωση των πειραμάτων και της πτυχιακής εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο και Ιωάννη Τσιάλτα για την υποστήριξη και τη βοήθεια τους. Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που απαρτίζουν το εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την εξαιρετική συνεργασία μας.*

*Κλείνοντας, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το απονέμω στην οικογένεια μου και σε όλους τους ανθρώπους που με υποστήριζαν έμπρακτα καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.*

Περιεχόμενα	
Περίληψη .....	5
Abstract .....	6
<b>1 Εισαγωγή.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Μαστίχα Χίου .....</b>	<b>7</b>
1.1.1 Σύσταση .....	7
1.2.1 Γαστροπροστατευτικές δράσεις .....	7
1.2.2 Αντιμικροβιακές δράσεις .....	8
1.2.3 Αντιοξειδωτικές δράσεις .....	9
1.2.4 Αντιφλεγμονώδεις δράσεις.....	10
1.2.5 Αντιαποπτωτικές – Αντικαρκινικές δράσεις .....	10
1.3 Γλυκοκορτικοειδή - Σύνθεση & έκκριση .....	12
1.5 Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) – Σηματοδοτικό μονοπάτι.....	14
1.6 Βιολογικές Δράσεις Γλυκοκορτικοειδών .....	15
1.6.1 Αντιφλεγμονώδεις δράσεις.....	15
1.6.2 Αποπτωτικές – Αντι-αποπτωτικές δράσεις .....	15
1.7 Γλυκοκορτικοειδή – Χρήση και Ανεπιθύμητες Ενέργειες.....	16
1.8 Σκοπός Πτυχιακής Εργασίας .....	17
<b>2 Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>17</b>
2.1 Υλικά .....	17
2.1.1 Όργανα.....	17
2.1.1 Χημικές Ενώσεις.....	18
2.1.2 Θρεπτικά Υλικά .....	19
2.2 Παρασκευή Διαλυμάτων.....	19
2.3 Αντισώματα .....	21
2.4.1 Κυτταροκαλλιέργειες .....	21
2.4.2 Συλλογή κυττάρων (Harvest) .....	22
2.4.3 Λύση κυττάρων.....	22
2.4.4 Προσδιορισμός κυτταρικού περιεχομένου με τη μέθοδο Bradford .....	22
2.4.5 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες .....	22
2.4.6 Ανοσοαποτύπωση κατά Western .....	23
2.4.7 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων .....	23
<b>3. Αποτελέσματα .....</b>	<b>24</b>
3.1 Αξιολόγηση της επίδρασης διαφόρων κλασμάτων από τη ρητίνη του μαστιχόδεντρου Χίου στη σηματοδότηση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών .....	24
3.2 Αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών κλασμάτων από τη ρητίνη του μαστιχόδεντρο στους μηχανισμούς της απόπτωσης.....	27
<b>4 Συζήτηση.....</b>	<b>30</b>
<b>5 Βιβλιογραφικές Αναφορές .....</b>	<b>33</b>

## Περίληψη

Τις τελευταίες δεκαετίες, τα φυσικά προϊόντα αποτελούν πόλο έλξης των ερευνητών για τις θεραπευτικές ιδιότητες τους και τους πιθανούς μηχανισμούς δράσεις αυτών. Η παγκόσμια επιστημονική κοινότητα αξιοποιώντας τα φυσικά, και κυρίως φυτικά, προϊόντα προσπαθεί να εντοπίσει νέα φάρμακα που να καταπολεμούν ανίατες ασθένειες όπως ο καρκίνος, αλλά και να περιορίζουν στο ελάχιστο τις ανεπιθύμητες ενέργειες ήδη συνταγογραφούμενων φαρμάκων. Από την άλλη, η Μαστίχα Χίου είναι ένα προϊόν που επί χιλιετίες χρησιμοποιείται, από λαούς της Μεσογείου, ως θεραπευτική αγωγή για γαστρεντερικές διαταραχές, για την επούλωση πληγών, αλλά και ως συντηρητικό τροφίμων. Μάλιστα, από το 2015, ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων έχει αναγνωρίσει επίσημα τη Μαστίχα Χίου ως φυσικό φαρμακευτικό προϊόν. Πλέον, είναι γνωστό ότι η μοναδική σύσταση των εκχυλισμάτων Μαστίχας Χίου της προσδίδει όλες τις θεραπευτικές ιδιότητες. Τα τριτερπένια είναι η ομάδα χημικών ενώσεων που κυριαρχεί στα εκχυλίσματα της και ομοιάζει δομικά με τα γλυκοκορτικοειδή. Μάλιστα, έρευνες έχουν αποδείξει ότι ορισμένα τριτερπένια δύναται να δράσουν ως επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με χαρακτηριστικότερα παραδείγματα αυτά των ενώσεων πρωτοπαναξαδιόλη, πρωτοπαναξατριόλη, εχινοκυστικό οξύ και παράγωγα μποςγουελικού οξέος. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του στον πυρήνα του κυττάρου και τη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων στόχων. Οι δράσεις που επιτελεί στο κύτταρο είναι πολλές με χαρακτηριστικότερες την καταστολή της φλεγμονής, τη γλυκονεογένεση και τον καθορισμό της πορείας του κυττάρου μέσω της ρύθμισης των αποπτωτικών μηχανισμών. Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση των αντιφλεγμονωδών, αντι-υπεργλυκαιμικών και αποπτωτικών δράσεων διάφορων κλασμάτων της ρητίνης από το μαστιχόδεντρο Χίου. Αυτή η μελέτη στοχεύει στην εύρεση νέων επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών ( Selective Glucocorticoid Receptors Agonists – SEGRAs) για την έγκαιρη και αποτελεσματική αντιμετώπιση παθήσεων όπως ο διαβήτης, τα αυτοάνοσα και ο καρκίνος με όσο το δυνατόν λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες.

## **Abstract**

The last decades, researchers are showing great interest in the healing properties and the possible mechanisms of action of many natural products. The global scientific community evaluates natural and mainly herbal, products to find new drugs that treat diseases such as cancer, with minimal or reduced side effects. On the other hand, Chios Mastic gum is a product that has been used more than 2500 years by the peoples of the Mediterranean, as traditional medicine for disorders of the gastrointestinal tract, for wound healing, but also as a food preservative. In fact, since 2015, the European Medicines Agency has officially recognized Chios Mastic gum as a natural medicinal product. It is now known that the unique composition of Chios Mastic gum extracts gives it all the healing properties. Triterpenes are the group of chemical compounds that dominate its extracts, and they share structural similarities with glucocorticoids. In fact, research has shown that some triterpenes can act as selective glucocorticoid receptor agonists with more typical examples of the compounds protopanaxadiol, protopanaxatriol, boswellic acids and their derivatives, and echinocystic acid. The activation of the glucocorticoid receptor (GR) results in its translocation into the cell nucleus where it regulates the transcription of its target genes. The actions it performs on the cell are numerous such as stimulating gluconeogenesis, suppressing inflammation, and regulating the apoptotic mechanisms. The purpose of this thesis is to investigate the anti-inflammatory, anti-hyperglycemic, and apoptotic effects of various fractions of resin extruded from the mastic tree of Chios. This study aims to find new selective Glucocorticoid Receptors Agonists (SEGRAs) for the timely and effective treatment of diseases such as diabetes, autoimmune diseases, and cancer with as few side effects as possible.

## 1 Εισαγωγή

### 1.1 Μαστίχα Χίου

#### 1.1.1 Σύσταση

Το φυτό *Pistacia lentiscus* ανήκει στην οικογένεια των Ανακαρδιοειδών και ευδοκίμει στη λεκάνη της Ανατολικής Μεσογείου. Η ποικιλία όμως Chia συναντάται κατά αποκλειστικότητα στο νότιο τμήμα του νησιού της Χίου. Η μαστίχα Χίου είναι μια ρητίνη που προκύπτει ύστερα από εκδορά του κορμού του μαστιχόδεντρου και έχει τη μορφή δακρύων <sup>(1)</sup>. Η χρήση της Μαστίχας Χίου εδώ και 2500 χρόνια στην ιατρική, την κοσμετολογία και τη διατήρηση τροφίμων έχει κινήσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και στη σύστασή της που προσδίδει αυτές τις μοναδικές ιδιότητες. Το 1997 αποτελεί σημαντικό έτος για τη Μαστίχα, καθώς το Μαστιχέλαιο Χίου, η Μαστίχα Χίου και η τσίχλα Χίου «ΕΛΜΑ» αναγνωρίζονται από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως προϊόντα προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (Π.Ο.Π) σύμφωνα με τον κανονισμό 2081/92 της ΕΟΚ. Έπειτα, το 2015 η διαδικασία καλλιέργειας της Μαστίχας Χίου εντάσσεται στον Αντιπροσωπευτικό Κατάλογο Άυλης Παγκόσμιας Πολιτιστικής Κληρονομιάς της UNESCO, ως πολιτιστικό αγαθό. Την ίδια χρονιά, ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA) δίνει τη μονογραφία στη Μαστίχα Χίου ως παραδοσιακό φυτικό φαρμακευτικό προϊόν για τη θεραπεία ήπιων διαταραχών της πέψης, για την αντιμετώπιση φλεγμονών του δέρματος καθώς και για την επούλωση ήπιων τραυμάτων <sup>(2)(3)</sup>

Η σύσταση των αιθέριων ελαίων της μαστίχας περιλαμβάνει πληθώρα πτητικών ενώσεων όπως τα μονοτερπένια και τα sesqui-τερπένια με εξέχοντα μόρια τα α-pinene, myrcene και β-pinene <sup>(2)</sup>. Αντιθέτως, η ρητίνη της διατηρεί τη στέρεη και συμπαγή μορφή της χάρη στον πολυμερισμό του trans-1,4-β-myrcene και ο διαχωρισμός των χημικών ενώσεων γίνεται με υγρή χρωματογραφία. Προκύπτει ένα όξινο κι ένα ουδέτερο κλάσμα, με τη συντριπτική πλειονότητα και των δύο να αποτελείται από τριτερπένια όπως το masticadienonic acid, isomasticadienonic acid, dammaradienone και oleanolic aldehyde <sup>(4)(2)</sup>. Ακόμη, με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας μάζας έχουν εντοπιστεί φαινολικές ενώσεις όπως vanillic, gallic, trans-cinnamic και o-coumaric <sup>(5)</sup>, αλλά και η α-τοκοφερόλη γνωστή και ως βιταμίνη E <sup>(6)</sup>. Συνολικά, πάνω από 120 ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί στη μαστίχα όπως το, camphene, α-pinene, myrcene και β-pinene trans-caryophyllene, και linalool που αποτελούν το 65-80% του βάρους της ρητίνης και συνεχώς διερευνώνται οι αντιμικροβιακές, αντιδιαβητικές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις τους <sup>(1)</sup>. Η μοναδική της σύσταση μαστίχας Χίου την ξεχωρίζει από τις άλλες μαστίχες και την καθιστά ένα «φυτικό φαρμακευτικό προϊόν» όπως ορίζει από το 2015 ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA/HMPC/46758/2015).

### 1.2 Μαστίχα Χίου – Βιολογικές Δράσεις

#### 1.2.1 Γαστροπροστατευτικές δράσεις

Από την αρχαιότητα οι Έλληνες και πολλοί λαοί της Ανατολικής Μεσογείου χρησιμοποιούσαν τη μαστίχα Χίου για την ανακούφιση από διαταραχές του πεπτικού συστήματος, όπως η δυσπεψία, η γαστραλγία και το πεπτικό έλκος <sup>(4)</sup>. Βέβαια, η πρώτη ερευνητική προσέγγιση των δράσεων της έγινε το 1984 σε κλινική μελέτη ατόμων με έλκος στο δωδεκαδάκτυλο. Η μελέτη έδειξε ενθαρρυντικά αποτελέσματα, καθώς το 80% των ασθενών που λαμβάνανε σκόνη της μαστίχας ένιωθαν ανακούφιση από τα συμπτώματα. Ενώ η γαστροπροστατευτική δράση της μαστίχας επιβεβαιώθηκε με ενδοσκοπική εξέταση του δωδεκαδάκτυλου δείχνοντας πως είχε

επουλωθεί πλήρως το έλκος των ασθενών σε ποσοστό 70% <sup>(7)</sup>. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξαν και τα *in vivo* πειράματα των Al.Said et al. <sup>(8)</sup> σε αρουραίους όταν προκαλούσαν έλκος στο στόμαχο και στο δωδεκαδάκτυλο τους με χημικό, φαρμακευτικό και μηχανικό τρόπο. Η χορήγηση της διαλυτοποιημένης μαστίχας πριν την πρόκληση του έλκους μείωσε τη βλάβη στο γαστρικό βλεννογόνο πιθανότατα χάρη στην τοπική κυτταροπροστατευτική δράση της <sup>(8)</sup>.

### 1.2.2 Αντιμικροβιακές δράσεις

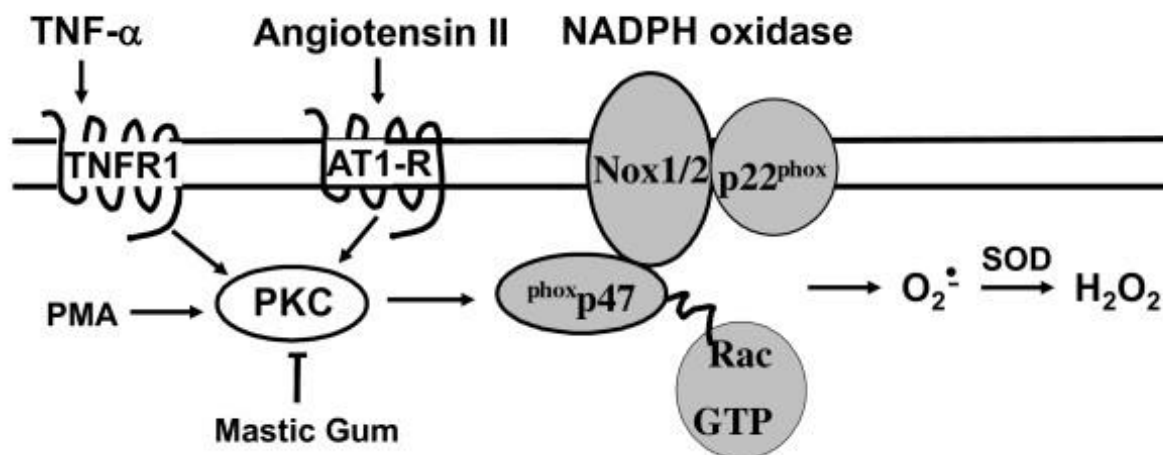
Αν και η μαστίχα Χίου έχει ευρεία θεραπευτική χρήση για το πεπτικό σύστημα αξίζει να αναφερθεί πως ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας για γαστρίτιδα, γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό έλκος είναι η μόλυνση από το βακτήριο *Helicobacter pylori* <sup>(9)</sup>. Σε πειράματα *in vitro* η προσθήκη 500mg μαστίχας Χίου ανά mL καλλιέργειας *H.pylori* ασθενών ήταν ικανή να σκοτώσει το 90% των βακτηρίων και να αλλάξει τη μορφολογία τους <sup>(10)</sup>. Το γεγονός αυτό προκάλεσε το ενδιαφέρον ερευνητών για τις ενώσεις που μπορεί να επιφέρουν αυτά τα αποτελέσματα. Έγιναν προσπάθειες απομόνωσης και χαρακτηρισμού των ενώσεων αυτών, όμως οι Kottakis et al. <sup>(11)</sup> δεν κατάφεραν να αποδείξουν *in vitro* ότι οι πρωτεΐνες Arabino-Galactan Proteins (AGPs) αλλάζουν τη μορφολογία των βακτηρίων *H.pylori* <sup>(11)</sup>. Παράλληλα, μια άλλη έρευνα έδειξε *in vitro* πως το isomasticadienolic acid σε συγκέντρωση 0,202 mg/mL μπορεί να σκοτώσει το 99,9% των *H.pylori* <sup>(12)</sup>. Η επιμονή στην εναλλακτική αντιμετώπιση του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού με εκχυλίσματα μαστίχας Χίου φαίνεται να είναι ατελέσφορη. Παρόλο που σε κλινική μελέτη αποδείχθηκε ότι το εκχύλισμα είχε αντιβακτηριδιακή δράση, εφόσον δε χορηγούταν ταυτόχρονα στους ασθενείς με αναστολείς πρωτονίων <sup>(13)</sup>, δύο νεότερες μελέτες <sup>(14),(15)</sup> απέρριψαν την εκρίζωση του ελικοβακτηριδίου σε ασθενείς. Βέβαια, η θέση πως τα εκχυλίσματα μαστίχας Χίου είναι δυνατόν να συμβάλλουν στην πρόληψη αλλά και καταπολέμηση του έλκους παραμένει ισχυρή <sup>(14),(15)</sup>. Η ερευνητική κοινότητα αναζητεί εναλλακτικές δράσεις της μαστίχας και μία από αυτές είναι η πρόληψη και καταπολέμηση παθήσεων της στοματικής κοιλότητας. Αναλυτικότερα, αποδείχθηκε πως το εκχύλισμα μαστίχας Χίου σταματά την ανάπτυξη του *P.gingivalis* <sup>(16)</sup>, ένα αναερόβιο βακτήριο που θεωρείται κατ' εξοχήν υπεύθυνο για την πρόκληση περιοδοντίτιδας <sup>(17)</sup>. Ακόμη, η μάσηση της μαστίχας μπορεί να λειτουργήσει ως μέτρο πρόληψης της πλάκας στα δόντια, καθώς βρέθηκαν λιγότερα βακτήρια στο σάλιο ατόμων που μάσησαν μαστίχα Χίου έναντι αυτών που μάσησαν «placebo μαστίχα» <sup>(18)</sup>. Αντιμικροβιακή δράση παρουσιάζουν και τα έλαια της μαστίχας προερχόμενα από ρητίνη και φύλλα του δέντρου <sup>(4)</sup>. Η προσθήκη των αιθέριων ελαίων σε καλλιέργειες Gram αρνητικών (*P.fragi*, *S.enteritidis*) και Gram θετικών (*St.aureus*, *L.plantarum*) βακτηρίων σε συγκεντρώσεις 0,4% & 0,8% v/v και 0,1% & 0,2% v/v αντίστοιχα ήταν ικανή να παρεμποδίσει πλήρως την ανάπτυξη τους <sup>(19)</sup>. Ενώ υδατικά διαλύματα σκόνης μαστίχας Χίου με συγκέντρωση 15μg/mL εμποδίζουν μερικώς την ανάπτυξη μυκήτων της τάξης των δερματόφυτων *T.violaceum*, *M.canis* & *T.mentagrophytes* <sup>(20)</sup>. Σε αναζήτηση της ουσίας ή των ουσιών ελαίων ή σκόνης της μαστίχας που έχουν αντιμικροβιακή δράση έρευνα έδειξε πως διάφορα μόρια όπως το β-myrcene, caryophyllene έχουν συνεργιστική δράση. Πιθανότατα ο συνδυασμός τους μαζί με άλλα μόρια οδηγούν στον περιορισμό της βακτηριακής ανάπτυξης <sup>(21)</sup>. Τέλος, μια πρόσφατη μελέτη παρουσιάζει νέα στοιχεία για την αντιική δράση της μαστίχας Χίου όπου η προσθήκη 0,3 μg/mL σε καλλιέργεια κυττάρων Vero & Hep-2 ήταν ικανή να καταστρέψει το 50% των ιών. Υπεύθυνα μόρια για αυτή τη δραστηριότητα του εκχυλίσματος αποδείχθηκαν, με φασματομετρία μάζας, τα τριτερπενοειδή dammaradienone και dammaradienol. Οι ερευνητές εικάζουν πως τα αυτά τα δύο μόρια μπορεί να δρουν ως



αναστολείς πρωτεασών ή να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες του ιού αποδιοργανώνοντας το φάκελο του. Ο μηχανισμός που το επιτυγχάνουν δεν είναι ξεκάθαρος και πρέπει να υπάρξουν περαιτέρω πειράματα για την αποσαφήνιση μιας τόσο σημαντικής δράσης της μαστίχας Χίου (22).

### 1.2.3 Αντιοξειδωτικές δράσεις

Πριν από μερικές χιλιετίες οι Αιγύπτιοι αξιοποιούσαν τη μαστίχα κι άλλες ρητίνες ως συντηρητικά τροφίμων, γεγονός που τροφοδότησε μια σειρά ερευνών για την αντιοξειδωτική ικανότητα της μαστίχας Χίου (23). Η συγχορήγηση της με κιτρικό οξύ, έναν χηλικό παράγοντα, σε ζωικό λίπος (λαρδί) και φυτικά λίπη (ηλιέλαιο, καλαμποκέλαιο και έξτρα παρθένο ελαιόλαδο) παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική δράση (24). Μάλιστα σε αναλογία 0,05-0,1% w/w η δράση της σε έλαιο βαμβακιού και ηλιόσπορου είναι εξίσου ικανοποιητική με αυτήν των κλασικών συντηρητικών τροφίμων όπως το BHA και Embanox B (23). Έτσι, η μαστίχα Χίου καθίσταται μια πολύ καλή επιλογή ως φυτικό και φυσικό συντηρητικό στους κλάδους της φαρμακολογίας, της κοσμετολογίας και της βιομηχανίας τροφίμων (24). Ταυτόχρονα, είναι γνωστό ότι σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως η καρδιαγγειακή νόσος και οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου εμφανίζεται χρόνιο οξειδωτικό stress (25), (26). Σε μια προσπάθεια πρόληψης και καταπολέμησης αυτών των παθογενειών, η επιστημονική κοινότητα στράφηκε προς τις αντιοξειδωτικές δράσεις της μαστίχας Χίου. Για την καρδιαγγειακή νόσο θεωρείται σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνη η παρουσία υψηλών ποσοστών οξειδωμένης λιποπρωτεΐνης μικρής πυκνότητας (Low Density Lipoprotein – LDL). Στην *in vitro* έρευνα των Andrikopoulos NK et al. (25) αποδεικνύεται πως 50mg μαστίχας ήταν αρκετά για να εμποδίσουν κατά 99,9% την οξείδωση της LDL μέσω διαλύματος  $\text{CuSO}_4$ . Για ακόμα μια φορά ως υπεύθυνα μόρια θεωρήθηκαν τα τριτερπένια και οι συγγραφείς επισημαίνουν ότι ο παραδοσιακός τρόπος εξαγωγής της ρητίνης από το δέντρο είναι σημαντικός για τον εμπλουτισμό της ρητίνης με δραστικά αντιοξειδωτικά μόρια όπως τα τριτερπένια (25). Η αντιοξειδωτική δράση της μαστίχας Χίου φάνηκε και σε *in vivo* κλινικές μελέτες φάσης II σε ανθρώπους με νόσο του Crohn ή ελκώδη κολίτιδα. Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς που λάμβαναν ως αγωγή 2,8 g μαστίχας/μέρα για 3 μήνες παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές, σε σχέση με την ομάδα placebo, σε βιοδείκτες στο πλάσμα αίματος όπως οξειδωμένη LDL και οξειδωτική ικανότητα ορού (serum oxidisability) (26). Αν και δεν είναι ξεκάθαρο πώς η μαστίχα Χίου συμβάλλει στη μείωση του οξειδωτικού stress του οργανισμού κερδίζει έδαφος ολοένα και περισσότερο η δράση ορισμένων συστατικών της ως πιθανοί αγωνιστές των PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors). Πρόκειται για μια οικογένεια με πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών δομικά παρόμοιους με αυτούς των στεροειδών. Σε αυτή την ομοιότητα ενέχεται και η θεωρία πως ίσως η μαστίχα Χίου να εμφανίζει αντιοξειδωτικές αλλά και αντιφλεγμονώδεις δράσεις μέσω των PPARs (27). Η ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα ερευνητική μελέτη των Triantafyllou et al. καταδεικνύει την πιθανή άμεση εμπλοκή της αντιοξειδωτικής δράσης της μαστίχας με την αντιφλεγμονώδη. Πιο συγκεκριμένα, οι επιστήμονες απέδειξαν με πειράματα στην κυτταρική σειρά RAMSC (Rat Aortic Smooth Muscle Cells) πως η μαστίχα Χίου αναστέλλει την ενεργότητα της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Αλυσιδωτά το μονοπάτι που φαίνεται στην εικόνα 1 οδηγεί στη μειωμένη ενεργότητα της οξειδάσης του NADPH και τη μείωση της συγκέντρωσης οξειδωτικών μορίων όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) και το υπεροξείδιο ( $\text{O}_2^-$ ) (28).



Εικόνα 1: Προτεινόμενος μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης της μαστίχας Χίου μέσω του μονοπατιού PKC <sup>(28)</sup>.

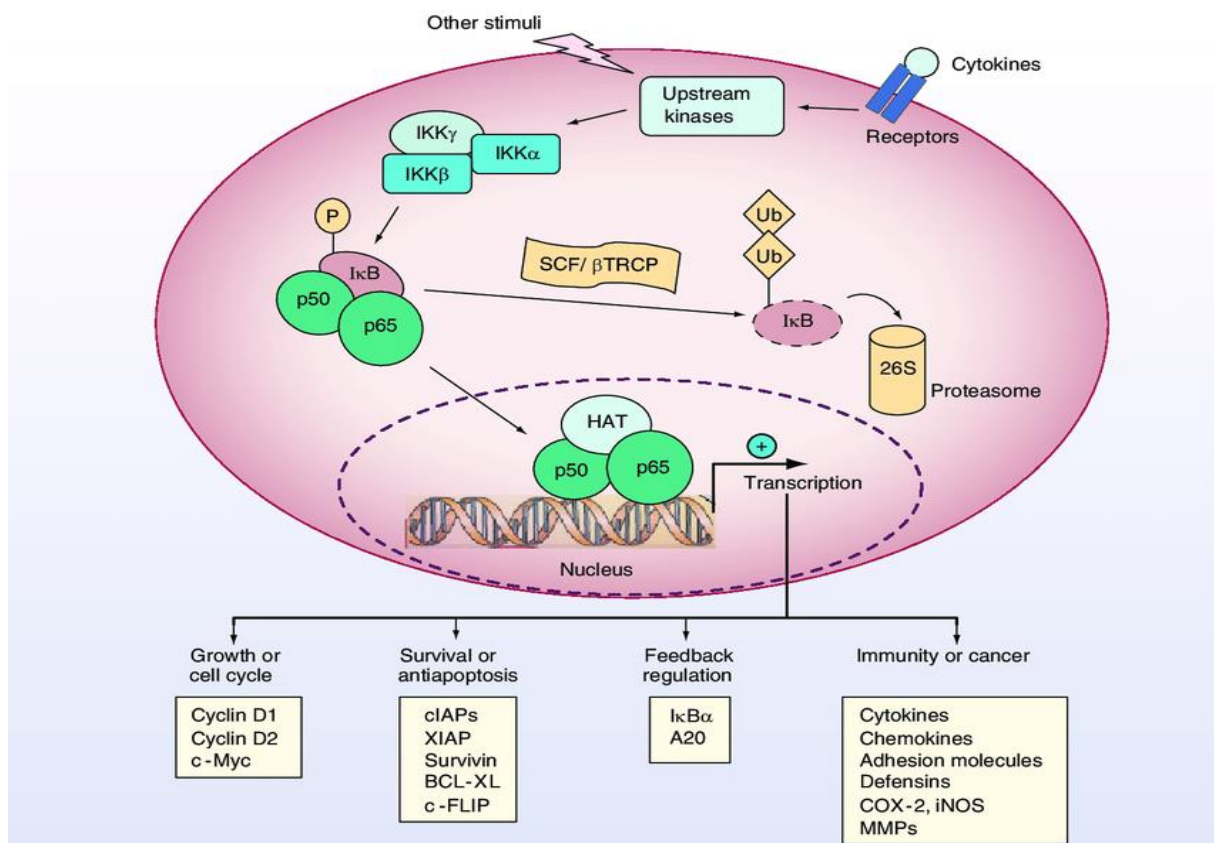
#### 1.2.4 Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Η αντιφλεγμονώδης δράση της μαστίχας άρχισε να φαίνεται με την έρευνα των Zhou et al. με πειράματα στην κυτταρική σειρά RAW264,7 που αποτελεί μακροφάγα κύτταρα ποντικών. Η φλεγμονώδης αντίδραση πυροδοτήθηκε με την προσθήκη LPS (Lipopolysaccharides) και η επώαση με τη μαστίχα οδηγούσε σε αναστολή της παραγωγής προφλεγμονωδών μορίων όπως η προσταγλανδίνη E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) και το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Ο μηχανισμός που το επιτυγχάνει είναι μέσω της μείωσης των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης των ενζύμων iNOS (inducible NO synthase) και COX-2 (Cyclooxygenase-2) που παράγουν το NO και την PGE<sub>2</sub> αντίστοιχα <sup>(29)</sup>. Τα ίδια αποτελέσματα ανέδειξε το ίδιο πείραμα σε πρωτογενή μονοκύτταρα που προέρχονται από υγιείς δότες <sup>(30)</sup>. Ακόμη, σε ποντίκια με άσθμα η χορήγηση μαστίχας μείωνε τα επίπεδα πρωτεϊνών φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η ιντερλευκίνη-5 (IL-5) και εμπόδιζε τη μετανάστευση ηωσινόφιλων. Έτσι, προμηνύεται πως η μαστίχα θα μπορούσε να συνεισφέρει στη θεραπεία χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων, όπως το άσθμα <sup>(31)</sup> και η νόσος του Crohn <sup>(32)</sup>. Κλινικές μελέτες σε ασθενείς με νόσο του Crohn έδειξαν ότι έπειτα από θεραπεία ενός μήνα με μαστίχα Χίου δείκτες φλεγμονής στο πλάσμα, όπως η CRP (C-Reactive Protein), η IL-6 <sup>(32)</sup> και ο Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) μειώθηκαν <sup>(33)</sup>.

#### 1.2.5 Αντιαποπτωτικές – Αντικαρκινικές δράσεις

Η πρώτη ένδειξη πως η μαστίχα Χίου μπορεί να έχει αντικαρκινικές ιδιότητες ήρθε με μια genome-wide gene expression level έρευνα, όπου το έλαιο της μαστίχας επηρέαζε την έκφραση 925 γονιδίων στην κυτταρική σειρά πνευμόνων (Lewis Lung Carcinoma - LLC). Πολλά από αυτά τα γονίδια αφορούσαν τον κύκλο ζωής και πολλαπλασιασμού του κυττάρου, το μονοπάτι NF-κB και τη διαδικασία της απόπτωσης <sup>(34)</sup>. Οι περισσότερες έρευνες που έχουν καταδείξει τις αντικαρκινικές δράσεις της μαστίχας Χίου έχουν υλοποιηθεί σε κυτταρικές σειρές προερχόμενες από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Στην κυτταρική σειρά LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate), η ανάπτυξη της οποίας εξαρτάται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα ανδρογόνων (AR), η προσθήκη μαστίχας Χίου περιόρισε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ακόμα και παρουσία αγωνιστή του AR. Φαίνεται ότι αυτό το επιτυγχάνει

δρώντας ως αρνητικός ρυθμιστής σε μεταγραφικό επίπεδο, για αυτό και τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του AR παρουσιάζονται μειωμένα <sup>(35)</sup>. Η αλληλεπίδραση της μαστίχας με το AR οδηγεί ως επακόλουθο και στην αύξηση των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης γονιδίων στόχων που ρυθμίζει αρνητικά ο υποδοχέας ανδρογόνων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μασπίνη, μια πρωτεΐνη της οικογένειας των αναστολέων πρωτεασών σερίνης και είναι κλειδί για την καταστολή ανάπτυξης και μετάστασης του όγκου <sup>(36)</sup>. Σε μια άλλη κυτταρική σειρά PC-3 (Prostate Carcinoma-3), η ανάπτυξη της οποίας δεν εξαρτάται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα ανδρογόνων (AR), η μαστίχα εμποδίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Παρεμβαίνει στο μονοπάτι του NF-κΒ μειώνοντας τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του NF-κΒ με αποτέλεσμα να μην εκφράζονται γονίδια στόχοι του, όπως η κυκλίνη D<sub>1</sub>, καθώς και ο αναστολέας του IκΒα όπως φαίνεται στην εικόνα 2. Συνεπώς τα κύτταρα παραμένουν στη μεσόφαση του κύκλου ζωής του κυττάρου, συγκεκριμένα στη φάση G<sub>1</sub>, περιορίζοντας την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και την πιθανότητα μετάστασης <sup>(37)</sup>.



Εικόνα 2: Το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κΒ και τα πιθανά γονίδια στόχοι <sup>(37)</sup>.

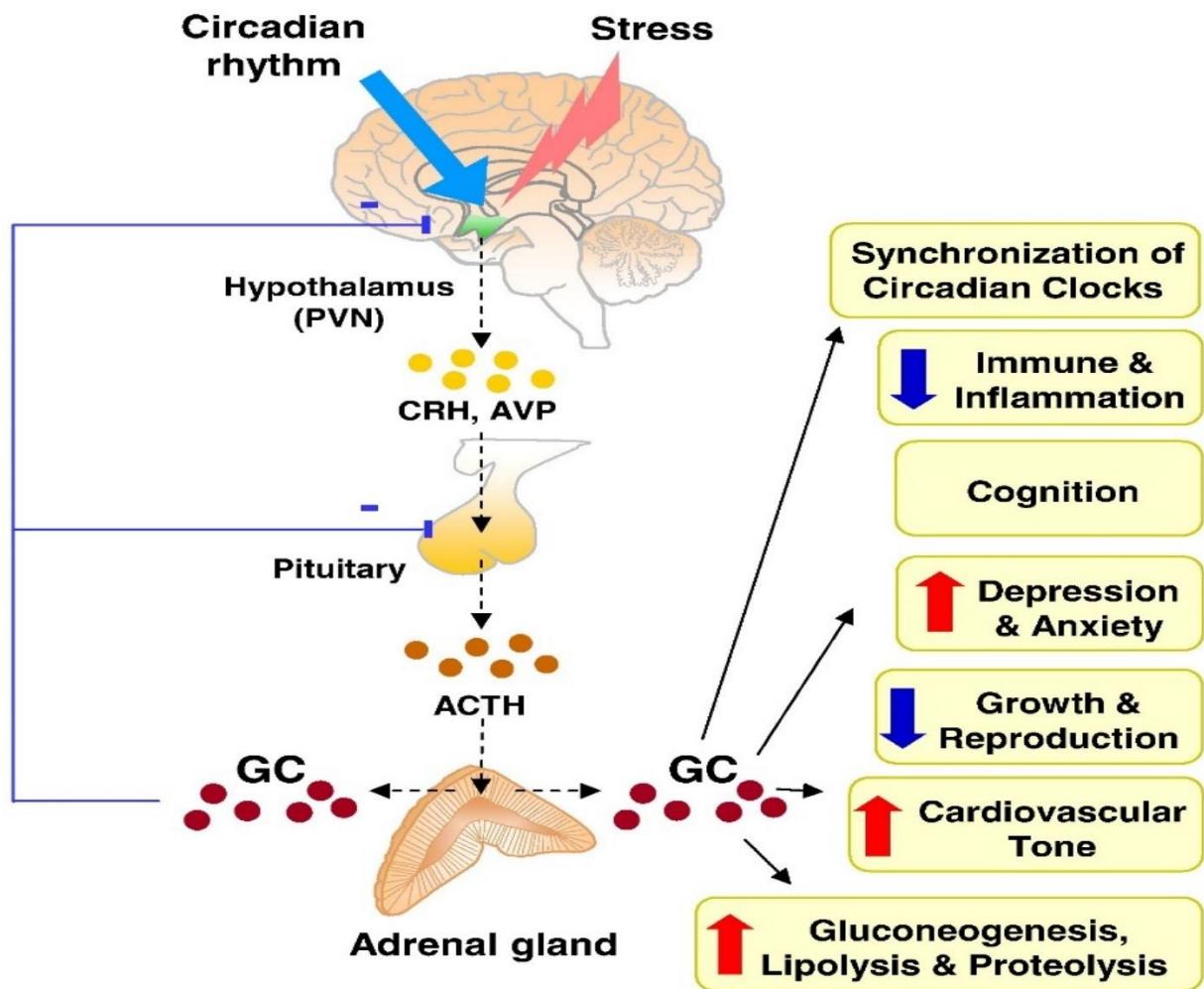
Σε ένα ακόμα πείραμα *in vitro* που υλοποιήθηκε σε κυτταρική σειρά από καρκίνωμα του παχέος εντέρου (HCT116) αποδείχθηκε ότι εκχύλισμα μαστίχας με εξάνιο δύναται να περιορίσει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Επάγει αποπτωτικά μονοπάτια που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της δράσης των προκασπασών 8,9 αλλά και τη δράση εναλλακτικών μηχανισμών που δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως <sup>(38)</sup>. Τέλος, η μαστίχα Χίου θα μπορούσε να αποτελέσει μέρος ενός φαρμακευτικού σχήματος για την καταπολέμηση του καρκίνου του παγκρέατος. Τα ποσοστά επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων παγκρέατος BxPC-3 ανέρχονταν στο 30% όταν γινόταν συγχορήγηση του γνωστού αντικαρκινικού φαρμάκου

gemcitabine με τη μαστίχα. Ενώ όταν χορηγούταν μόνο gemcitabine ή μαστίχα Χίου επιβίωνε το 60% των κυττάρων. Επίσης η συγχορήγηση των δύο ουσιών ανέστειλε το μονοπάτι NF-κΒ επηρεάζοντας την έκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η Bcl-2. Τα αποτελέσματα αυτά καθιστούν τη μαστίχα Χίου ως ένα φυτικό προϊόν με μεγάλη φαρμακευτική αξία για την καταπολέμηση του καρκίνου πολλών οργάνων με τις μελλοντικές κλινικές μελέτες να φαίνονται πολλά υποσχόμενες <sup>(39)</sup>.

### 1.3 Γλυκοκορτικοειδή - Σύνθεση & έκκριση

Τα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoids – GCs) είναι λιπόφιλες ενώσεις και αποτελούν μέρος της οικογένειας των στεροειδών ορμονών. Η σύνθεση και η έκκριση τους λαμβάνει χώρα στο φλοιό των επινεφριδίων και συγκεκριμένα στη στηλιδωτή ζώνη κάθε φλοιού. Πρόδρομο μόριο όλων των στεροειδών ορμονών αποτελεί η χοληστερόλη, η οποία τροποποιείται με μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων, σχηματίζοντας τις ενεργές ορμόνες που φέρουν διαφορετικές πλευρικές ομάδες <sup>(40)</sup>.

Το πιο γνωστό γλυκοκορτικοειδές στον άνθρωπο είναι η κορτιζόλη, η οποία διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό, στην προσαρμογή στο stress, στη φλεγμονώδη απόκριση και σε πολλούς ομοιοστατικούς μηχανισμούς. Συνεπώς η ρύθμιση της σύνθεσης και της έκκρισης της κορτιζόλης είναι μείζονος σημασίας και επιτελείται από το νευροενδοκρινικό σύστημα υποθαλάμου-υπόφυσης- επινεφριδίων. Ο υποθάλαμος δέχεται στρεσογόνα ερεθίσματα και ερεθίσματα που σχετίζονται με τον κερκάρδιο ρυθμό όπως η εναλλαγή φωτός-σκότους, και απελευθερώνει την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (Corticotropin-Releasing Hormone – CRH). Η CRH επιτελεί τη δράση της στον πρόσθιο τμήμα της υπόφυσης διεγείροντας την παραγωγή της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (Adrenocorticotrophic Hormone – ACTH), η οποία τελικά ενεργοποιεί το φλοιό των επινεφριδίων προς έκκριση γλυκοκορτικοειδών <sup>(40)</sup>. Τα GCs παίρνουν μέρος σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες όπως φαίνεται στην Εικόνα 3, όμως ταυτόχρονα αποτελούν και το κλειδί για τη ρύθμιση της έκκρισης τους. Τα γλυκοκορτικοειδή διατηρούν σταθερά τα επίπεδα τους γύρω από ένα καθορισμένο επίπεδο μέσω ενός συστήματος αρνητικής ανατροφοδότησης στον υποθάλαμο και την υπόφυση <sup>(41)</sup>. Όμως η βιοδιαθεσιμότητα και η δραστηριότητα της κορτιζόλης ρυθμίζεται τόσο σε κυτταρικό και ιστολογικό επίπεδο. Αναλυτικότερα, η σφαιρίνη δέσμευσης της κορτιζόλης μεταφέρει τη λιπόφιλη ορμόνη στο αίμα σε σύμπλοκο πρωτεϊνών καθιστώντας την ανενεργή. Ακόμη, η δραστηριότητα των γλυκοκορτικοειδών επηρεάζεται από την αντίθετη δράση των ενζύμων 11β-HSD2 (11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2) και 11β-HSD1 (11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1). Το ένζυμο 11β-HSD2 μετατρέπει την ενεργή κορτιζόλη σε ανενεργή κορτιζόνη καταναλώνοντας 1 μόριο NADPH και το αντίστροφο κάνει το ένζυμο 11β-HSD1 σχηματίζοντας 1 μόριο NADH. Ανάλογα τις συνθήκες και τις ανάγκες υπερέχει η έκφραση ενός εκ των δύο ενζύμων στο κύτταρο προσφέροντας έτσι ακόμα πιο εξειδικευμένη ρύθμιση <sup>(42)</sup>.



Εικόνα 3: Ρύθμιση των γλυκοκορτικοειδών και οι βιολογικές τους δράσεις <sup>(41)</sup>.

#### 1.4 Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) -Δομή

Τα γλυκοκορτικοειδή επιτελούν τις δράσεις τους μέσω της πρόσδεσης τους στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor – GR), ο οποίος αποτελεί μέλος της ευρύτερης κατηγορίας των πυρηνικών υποδοχέων και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας <sup>(43)</sup>. Στο 5<sup>ο</sup> χρωμόσωμα του ανθρώπινου γονιδιώματος εδράζεται το γονίδιο NR3C1, που κωδικοποιεί τον υποδοχέα. Αποτελείται από 9 εξόνια και διαθέτει δύο ισομορφές (α και β) προερχόμενες από εναλλακτικό μάτισμα στο 9<sup>ο</sup> εξόνιο <sup>(44)</sup>. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4, ο GR αποτελείται από τρεις βασικές επικράτειες: μια επικράτεια που ενεργοποιεί τη μεταγραφή in trans και βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο (N-Terminal Transactivation Domain – NTD), μια περιοχή δέσμησης στο DNA με δάχτυλα ψευδαργύρου (DNA Binding Domain – DBD) και μια περιοχή σύνδεσης του προσδέτη στο καρβοξυτελικό άκρο (Ligand Binding Domain – LBD). Ανάμεσα στις επικράτειες DBD και LBD μεσολαβεί η ευκίνητη περιοχή H που λειτουργεί ως άρθρωση και διευκολύνει τη μετακίνηση και αναδίπλωση του υποδοχέα μετά την πρόσδεση του αγωνιστή του, δηλαδή των γλυκοκορτικοειδών <sup>(44)(45)</sup>.

## Glucocorticoid Receptor Gene



## Glucocorticoid Receptor Alpha



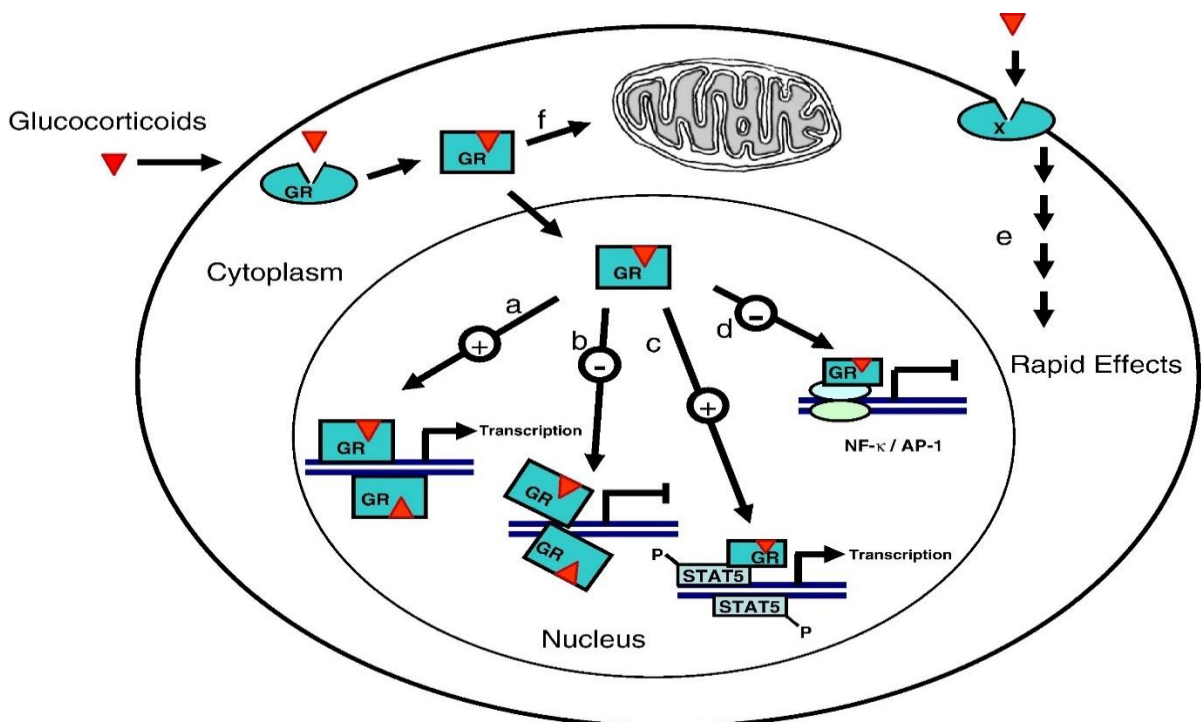
## Glucocorticoid Receptor Beta



Εικόνα 4: Η δομή του γονιδίου του GR <sup>(45)</sup>.

### 1.5 Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) – Σηματοδοτικό μονοπάτι

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο GR βρίσκεται μεταγραφικά ανενεργός στο κυττοσόλιο του κυττάρου σε επαφή με άλλες πρωτεΐνες όπως οι τσαπερονίνες HSP90, HSP70 και οι ανοσοφιλίνες FKBP4, FKBP55, δημιουργώντας ένα μεγάλο σύμπλοκο πρωτεϊνών. Η πρόσδεση του αγωνιστή οδηγεί σε αλλαγές στην τρισδιάστατη δομή του υποδοχέα, την απελευθέρωση του από το υπόλοιπο σύμπλοκο πρωτεϊνών και τη μετακίνηση του στον πυρήνα <sup>(46)</sup>. Η είσοδος του στον πυρήνα μέσω των πυρηνικών πόρων συνήθως οδηγεί στη στρατολόγηση ενός δεύτερου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και τελικά στο διμερισμό τους <sup>(47)</sup>. Χάρη στα δάχτυλα ψευδαργύρου της DBD επικράτειας, ο GR μπορεί να συνδεθεί σε στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Elements – GRE), δηλαδή συγκριμένες αλληλουχίες του DNA ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής <sup>(46)</sup> <sup>(48)</sup>. Έτσι, ρυθμίζει άμεσα την έκφραση γονιδίων στόχων είτε επάγοντας (a) είτε περιορίζοντας (b) τη μεταγραφή τους όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 5 <sup>(47)</sup>.



Εικόνα 5: Μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, GR <sup>(47)</sup>.



Με την πάροδο των χρόνων έχει αρχίσει να ξετυλίγεται σιγά σιγά το πολύπλοκο και πολυδιάστατο μονοπάτι σηματοδότησης του GR. Είναι πλέον γνωστό ότι ο GR δύναται να συμμετέχει και με έμμεσο τρόπο στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στόχων μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Εικόνα 5). Πιο συγκεκριμένα, ο GR ως μονομερές μπορεί να προάγει ή να εμποδίσει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων αν έρθει σε επαφή με τις πρωτεΐνες STAT5 (c) ή AP-1 και NF-κB (d) αντίστοιχα <sup>(49)</sup>. Βέβαια, ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών είναι δυνατό να αλληλεπιδράσει και με στοιχεία απόκρισης στις ορμόνες (Hormone Response Elements – HRE) που βρίσκονται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και να ρυθμίσει την έκφραση γονιδίων της αναπνευστικής αλυσίδας (e) <sup>(47)</sup> <sup>(50)</sup>. Φυσικά, ακόμα μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι άμεσες και γρήγορες επιδράσεις που έχει ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών στο κύτταρο χωρίς τη μεσολάβηση του γονιδιώματος, αλλά μέσω άλλων σηματοδοτικών μορίων (f) όπως οι GPCRs <sup>(47)</sup>. Παρ' όλα αυτά, η ύπαρξη στοιχείων GRE και η στρατολόγηση του GR στον πυρήνα και το μιτοχόνδριο δε συνεπάγεται με κάποιο βιολογικό αποτέλεσμα. Κάθε ιστός και κάθε κύτταρο ρυθμίζει μέσω μεθυλοτρανσφερασών και ακετυλοτρανσφερασών τη μεταγραφή των ίδιων γονιδίων στόχων με το GR αλλάζοντας τη δομή της χρωματίνης ώστε να είναι λιγότερο ή περισσότερο προσβάσιμη στον υποδοχέα <sup>(51)</sup>.

## **1.6 Βιολογικές Δράσεις Γλυκοκορτικοειδών**

Τα γλυκοκορτικοειδή διαθέτουν καίριο ρόλο στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και του λίπους. Βασική λειτουργία τους είναι η αύξηση της γλυκόζης του αίματος, κινητοποιώντας τον κατακερματισμό των αποθηκών λίπους, αποδομώντας πρωτεΐνες των μυών και διεγείροντας την ηπατική γλυκονεογένεση <sup>(40)</sup> <sup>(52)</sup>. Όμως ο λόγος που έχουν ξεχωρίσει στην κλινική έρευνα είναι οι ανοσοκατασταλτικές και οι αποπτωτικές δράσεις τους.

### **1.6.1 Αντιφλεγμονώδεις δράσεις**

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών ασκεί την αντιφλεγμονώδη δράση του με ποικίλους τρόπους. Αρχικά, προάγει τη μεταγραφή γονιδίων που εκφράζουν αντιφλεγμονώδεις πρωτεΐνες όπως η φωσφατάση MKP1 (Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase 1) και ο IκB <sup>(53)</sup> <sup>(54)</sup>. Η MKP1 αναστέλλει το μονοπάτι MAPK που υπό φυσιολογικές συνθήκες θα ενίσχυε τη φλεγμονώδη απόκριση. Ενώ ο IκB προσδένεται στις υπομονάδες (p50/p65) του NF-κB και εμποδίζει τη μετακίνηση του στον πυρήνα <sup>(54)</sup>. Βέβαια, η κύρια οδός μέσω της οποίας τα γλυκοκορτικοειδή εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δράση είναι η καταστολή της μεταγραφής γονιδίων προφλεγμονωδών και φλεγμονωδών μορίων. Πιο αναλυτικά, ο GR αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB και AP-1 καταστέλλοντας τη δραστηριότητα τους, συνεπώς δε μεταγράφονται γονίδια που θα έδιναν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο παράγοντας TNF-α, η IL-1α, IL-12 <sup>(53)</sup> <sup>(55)</sup>.

### **1.6.2 Αποπτωτικές – Αντι-αποπτωτικές δράσεις**

Η απουσία θρεπτικών συστατικών, η έκθεση σε ακτινοβολία UV και τα γλυκοκορτικοειδή ενεργοποιούν το εσωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης στα κύτταρα, δηλαδή έναν προγραμματισμένο θάνατο στον οποίο μεσολαβούν τα μιτοχόνδρια <sup>(45)</sup>. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών αλληλεπιδρά με προ-αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της

οικογένειας Bcl-2 όπως η Bax και η Bcl-2 αντίστοιχα. Πρόκειται για μια δυναμική ισορροπία όπου η αναλογία των προ-αποπτωτικών/αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών σε κάθε ιστό και κύτταρο καθορίζει το μέλλον του κυττάρου, δηλαδή αν θα οδηγηθεί σε θάνατο ή όχι <sup>(45)(56)</sup>. Ο GR επάγει την απόπτωση είτε ενεργοποιώντας μεταγραφικά τα γονίδια των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bad και Bax είτε καταστέλλοντας μεταγραφικά τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-x<sub>L</sub> και Bcl-2 <sup>(45)(57)</sup>. Ο ολιγομερισμός των Bad και Bax οδηγεί στη δημιουργία πόρων στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, την αλλαγή του δυναμικού και τελικά την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Στη συνέχεια, το κυτόχρωμα c ενεργοποιεί την πρωτεΐνη προσαρμογέα Araf-1 που ολιγομερίζεται και ενεργοποιεί την εναρκτήρια κασπάση-9. Οι τελεστικές κασπάσες 3,7 οδηγούν τελικά σε έναν καταρράκτη αντιδράσεων με στόχο τον κυτταρικό θάνατο <sup>(56)</sup>. Από την άλλη πλευρά έχει βρεθεί ότι ο GR επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου στα μιτοχόνδρια των ηωσινόφιλων μειώνοντας τα επίπεδα του mRNA της, αυξάνοντας έτσι τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS) στο μιτοχόνδριο, με τελικό αποτέλεσμα τη ρήξη του και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c <sup>(58)</sup>. Μια ακόμα σημαντική συμβολή του GR στη διαδικασία της απόπτωσης φαίνεται να διαμεσολαβείται χωρίς τη συμβολή του γονιδιώματος, αλλά μέσω ταχέων ενεργοποιήσεων των μορίων PI3K, MAPK και AKT στο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο, πρόκειται για ένα νέο πεδίο που χρήζει περαιτέρω πειραμάτων και έρευνας για την ανακάλυψη των μηχανισμών δράσης του GR εκτός του πυρήνα <sup>(59)</sup>.

### 1.7 Γλυκοκορτικοειδή – Χρήση και Ανεπιθύμητες Ενέργειες

Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή όπως η δεξαμεθαζόνη, η βηταμεθαζόνη και η υδροκορτιζόνη χρησιμοποιούνται ευρέως ως αποκλειστική θεραπεία για χρόνιες φλεγμονώδεις ή αυτοάνοσες παθήσεις, όπως το άσθμα <sup>(60)(61)</sup>, η ρευματοειδής αρθρίτιδα <sup>(61)</sup>, αλλά και για σοβαρές αλλεργίες και δερματικές παθήσεις <sup>(60)</sup>. Παρ' όλα αυτά, η υψηλή δοσολογία και η μακροχρόνια χορήγηση γλυκοκορτικοειδών σε ασθενείς προκαλούν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Παραδείγματος χάρη, προκαλούν σημαντική μείωση της μυϊκής μάζας, ανακατανομή του λίπους, αντίσταση στην ινσουλίνη άρα και διαβήτη τύπου II εξαιτίας των μεγάλων συγκεντρώσεων γλυκόζης στο αίμα <sup>(62)</sup>. Ακόμη, οι ασθενείς που λαμβάνουν μακροχρόνια αγωγή με συνθετικά γλυκοκορτικοειδή δύναται να εμφανίσουν υπέρταση, αδυναμία επούλωσης πληγών <sup>(63)</sup> και οστεοπόρωση <sup>(62)(63)</sup>. Οι περισσότερες από αυτές τις ανεπιθύμητες ενέργειες οφείλονται στην ενεργοποίηση του καταβολισμού από το GR μέσω της ενεργοποίησης της μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με τον καταβολισμό <sup>(62)(64)</sup>. Αντιθέτως, οι περισσότερες αντιφλεγμονώδεις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών σχετίζονται με την κατασταλτική δράση του GR σε φλεγμονώδεις παράγοντες όπως ο NF-κB και ο STAT3 <sup>(62)(65)</sup>. Έχει δημιουργηθεί λοιπόν η ανάγκη να εντοπιστούν χημικές ενώσεις που δεσμεύονται στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, αλλά επιτελούν αποκλειστικά τις επιθυμητές αντιφλεγμονώδεις και θεραπευτικές δράσεις χωρίς την ύπαρξη ανεπιθύμητων ενεργειών. Πρόκειται για ενώσεις που ονομάζονται selective glucocorticoid receptor agonists - modulators (SEGRAs – SGRMs) και τα τελευταία χρόνια έχουν προσελκύσει έντονα το ερευνητικό ενδιαφέρον. Μέχρι στιγμής ως πιθανοί SEGRAs έχουν εντοπιστεί ενώσεις προερχόμενες από φυτά όπως τα boswellic acids <sup>(62)</sup>, protopanaxadiol, protopanatriol <sup>(66)</sup>, αλλά και το echinocystic acid με το 3-O-glucoside παράγωγο του <sup>(64)</sup>. Κοινός παρονομαστής αυτών των ενώσεων αποτελεί το γεγονός πως ανήκουν στην κατηγορία των τριτερπενίων και η δομή τους ομοιάζει με αυτή των γλυκοκορτικοειδών <sup>(62)(64)(66)</sup>.



Τα τριτερπένια είναι μια ομάδα χημικών ενώσεων με μοριακό τύπο  $C_{30}H_{48}$  και απαρτίζονται από 6 μονομερή ισοπρενίου <sup>(67)</sup>. Πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες που συναντώνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις φλούδες των φρούτων, στα φύλλα και στον κορμό διάφορων φυτών όπως η ελιά και το δεντρολίβανο <sup>(68)</sup>. Οι βιολογικές τους δράσεις στα φυτά σχετίζονται με την αντοχή στις αβιοτικές καταπονήσεις <sup>(67)</sup> και με την άμυνα έναντι σε παθογόνα βακτήρια, φυτοφάγα ζώα και έντομα <sup>(69)</sup>. Τα τετρακυκλικά τριτερπένια δρουν ως φυτικά στεροειδή και μοιάζουν δομικά με τα γλυκοκορτικοειδή. Σήμερα, έχει αποδειχθεί ότι εκχύλισμα προερχόμενο από τη Μαστίχα Χίου είναι πλούσιο σε μονο-, σεσκι-και τρι-τερπένια <sup>(2) (4)</sup>, καθιστώντας τη μαστίχα Χίου μια εξαιρετική πηγή μορίων που εμφανίζουν δομικές ομοιότητες με τα γλυκοκορτικοειδή και συνεπώς μπορούν να δράσουν ως SEGRAs ή SGRMs <sup>(62) (64) (66)</sup>.

## 1.8 Σκοπός Πτυχιακής Εργασίας

Ο σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής είναι η διερεύνηση των βιολογικών δράσεων εκχυλισμάτων προερχόμενα από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* σε κύτταρα HEK293. Πιο συγκεκριμένα, ο χαρακτηρισμός των αντιφλεγμονωδών, αντι-υπεργλυκαιμικών και αποπτωτικών δράσεων των κλασμάτων της ρητίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η συγκεκριμένη μελέτη θα συμβάλει στην πιθανή εύρεση επιλεκτικών αγωνιστών του GR (SEGRA) για την αντιμετώπιση ποικίλων ασθενειών όπως οι αυτοάνοσες παθήσεις, ο διαβήτης τύπου I, II αλλά και ο καρκίνος, χωρίς τις ανεπιθύμητες ενέργειες των συνθετικών -και μη- γλυκοκορτικοειδών π.χ. δεξαμεθαζόνη και κορτιζόνη αντίστοιχα.

## 2 Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Υλικά

#### 2.1.1 Όργανα

- ❖ Συσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminar Flow Hood) Tel Star<sup>TM</sup> AV-30/70
- ❖ Επωαστήρας: Thermo Scientific Forma<sup>®</sup> Series II 3110 Water-Jacketed CO<sub>2</sub>, Hepa Class 100
- ❖ Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): A. Kruss Optronik Germany
- ❖ Φυγόκεντρος στις κυτταροκαλλιέργειες: OEMS Jouan BR4i
- ❖ Πλάκα Neubauer: BLAUBRAND<sup>®</sup>
- ❖ Υδατόλουτρο: P-SELECTA
- ❖ Vacuum Pump: Laboport<sup>®</sup>
- ❖ Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών από W.B Kodak
- ❖ Φυγόκεντρος: eppendorf 5417R
- ❖ Heat blocker: KISKER
- ❖ Quick spin: Nippon Genetics Europe GmbH
- ❖ Vortex: Bio Vortex V1
- ❖ Φωτόμετρο
- ❖ Κυψελίδες
- ❖ Συσκευή ηλεκτροφόρησης: Biorad mini-PROTEAN<sup>®</sup> tetra cell
- ❖ Συσκευή μεταφοράς (transfer): Biorad mini-trans Blot
- ❖ Mini- Rocker-Shaker MR-1 (bioSan)

- ❖ Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,22 μm διαμέτρου πόρων GE Healthcare Life Sciences Whatman
- ❖ Διηθητικό χαρτί Whatman
- ❖ Φιλμ εμφάνισης Western Fuji Film
- ❖ Sonicator: Helscher Ultrasound Technologies, model UP400S
- ❖ Ζυγοί: KERN EW + KERN 440-47 N

### 2.1.1 Χημικές Ενώσεις

- ❖ Αιθανόλη 100% (SIGMA)
- ❖ Μεθανόλη 100% (Sigma)
- ❖ Διμέθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide, DMSO) (Sigma)
- ❖ Εμβρυϊκός ορός βοοειδών (Fetal Bovine Serum, FBS) (Gibco®)
- ❖ Ζωάνθρακας
- ❖ Θρυψίνη με EDTA 5% 10× (Gibco™, Sigma)
- ❖ L-Γλουταμίνη (Gibco)
- ❖ Πενικιλίνη – Στρεπτομυκίνη (Gibco™)
- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα με άλατα φωσφόρου (Phosphate Buffered Saline, PBS) (Gibco™)
- ❖ Τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθάνιο [Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris-base] (Merk, SERVA)
- ❖ Χλωριούχο νάτριο (NaCl) (Panreac)
- ❖ Triton™ X-100 (Sigma)
- ❖ Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA) (Sigma-Aldrich)
- ❖ Φθοριοξύ φαινυλομεθυλοσουλφονύλιο (Phenyl Methyl Sulfonyl Floride, PMSF) (SERVA)
- ❖ Αναστολείς πρωτεασών (Sigma®)
- ❖ Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol, DTT) (SERVA)
- ❖ Αντιδραστήριο Bradford (Bio-Rad)
- ❖ Δωδεκυλ-θειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) (SIGMA)
- ❖ Ακρυλαμίδη/ Δις-ακρυλαμίδη 40% (Bio-Rad)
- ❖ Υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium persulfate, APS) (Sigma)
- ❖ TEMED (Appllichem)
- ❖ Γλυκερόλη (Thermo Scientific™)
- ❖ Μπλε τις βρωμοφαινόλης (Honeywell Fluka™)
- ❖ β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haën)
- ❖ Μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Pageruler™ Prestained Protein Ladder 10 to 180 kDa - 26616)
- ❖ Γλυκίνη (SERVA)
- ❖ Υδροχλωρικό οξύ 12N (HCl) (Sigma-Aldrich)
- ❖ Πολυσορβικό 20 (Tween 20) (Euroclone, Sigma)
- ❖ Σκόνη άπαχου γάλακτος Skimmed milk powder (Regilait)
- ❖ ECL A, B (Santa Cruz)
- ❖ Διάλυμα Developer για την ανάπτυξη σήματος (Fuji)
- ❖ Διάλυμα Fixer για τη μονιμοποίηση σήματος (Fuji)

## Αναλώσιμα

- ❖ Φλάσκα καλλιέργειας κυττάρων T-25 (Sarstedt)
- ❖ Πιάτο κυτταροκαλλιέργειας με 6 θέσεις (6-well plate, Sigma®)
- ❖ Σιφόνια κυτταροκαλλιέργειών 2,5,10 ml (SPL Life Sciences)
- ❖ Cryogenic vials 1,8 mL (Corning®)
- ❖ Falcons 15 & 50 mL
- ❖ Ηλεκτρονικές πιπέτες 2μL, 50μL, 200μL, 1000μL
- ❖ Universal Tips για τις αντίστοιχες πιπέτες

## Κλάσματα ρητίνης Μαστίχας Χίου

Η Μαστίχα Χίου παραλήφθηκε από την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου και απεστάλη για περαιτέρω κλασμάτωση στο Πανεπιστήμιο του Ανατολικού Piedmont (University of Eastern Piedmont, Novara, Italy). Τα κλάσματα παραλήφθηκαν σε λυοφιλιωμένη μορφή, διαλυτοποιήθηκαν σε EtOH 100% και αποθηκεύτηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , σε stock των 100mg/ml. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα κλάσματα 73A, 73B, 73C και 75A σε συγκεντρώσεις 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Κάθε κλάσμα ρητίνης δεν περιέχει μια μεμονωμένη χημική ένωση, αλλά ένα μείγμα ενώσεων άγνωστης σύστασης. Για την επώαση κυττάρων HEK 293 με τα κλάσματα της ρητίνης σε συγκέντρωση 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  προηγήθηκε αραιώση 1:1 από το stock 100  $\text{mg}/\text{mL}$  με EtOH 100%. Για κάθε ml θρεπτικού DMEM στο well αντιστοιχεί 1  $\mu\text{L}$  κλάσματος σε συγκέντρωση 50 ή 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$

### 2.1.2 Θρεπτικά Υλικά

- ❖ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose (4,5g/L), με κόκκινο τις φαινόλης (Gibco™). Εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

### 2.2 Παρασκευή Διαλυμάτων

- ❖ **Tris 20mM pH 7.5:** Για την παρασκευή του αναμειγνύονται 20μl stock διαλύματος Tris 1 M pH 7.5 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) με 980μl ddH<sub>2</sub>O και το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ **Tris-HCl 1.5 M pH 6.8:** Για την δημιουργία 0.1 L διαλύματος απαιτούνται 18,171gr Tris τα οποία εν συνεχεία διαλύονται σε dH<sub>2</sub>O. Η ρύθμιση του pH στο 6,8 πραγματοποιείται με προσθήκη HCl 12N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH<sub>2</sub>O. Αποθηκεύεται τις  $4^{\circ}\text{C}$ .
- ❖ **Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:** Για την δημιουργία 0.1 L διαλύματος απαιτούνται 18,171gr Tris τα οποία εν συνεχεία διαλύονται σε dH<sub>2</sub>O. Η ρύθμιση του pH στο 8,8 πραγματοποιείται με προσθήκη HCl 12N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH<sub>2</sub>O. Αποθηκεύεται τις  $4^{\circ}\text{C}$ .
- ❖ **PMSF 200mM:** Για την δημιουργία 2mL PMSF 200mM χρειάζεται να διαλυθούν 0.07gr PMSF σε 2mL ισοπροπανόλης. Η αποθήκευση του διαλύματος γίνεται τις  $-20^{\circ}\text{C}$ . Διαλύματα PMSF σε συγκέντρωση 20mM παρασκευάζονται με αραιώση του παραπάνω διαλύματος σε 10% ισοπροπανόλη.

- ❖ **DTT 1M:** Για την δημιουργία 10mL απαιτείται διάλυση 1,54 gr σκόνης DTT 1M σε ddH<sub>2</sub>O. Στην συνέχεια αναδεύεται και μοιράζεται σε aliquots. Αποθηκεύεται τις -20°C.
- ❖ **Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων (Lysis Buffer):** Περιέχει 0,5% TritonX-100, 20mM Tris pH 7.5, 3mM EDTA και 250mM NaCl. Αποθηκεύεται στους 4°C. Σε 500μL από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται επιπλέον 1μl DTT 1M (-20°C), 0.25μl PMSF 20mM (-20°C) και 5μl μείγματος αναστολέων πρωτεασών.
- ❖ **Αντιδραστήριο μέτρησης πρωτεϊνικού κυτταρικού περιεχομένου Bradford 1X:** Για τη δημιουργία 10mL διαλύματος Bradford απαιτούνται 2mL διάλυμα Bradford και 8mL ddH<sub>2</sub>O. Stock 5X → final 1X
- ❖ **SDS 10%:** Για τη δημιουργία 100mL διαλύματος διαλύονται σε ddH<sub>2</sub>O 10gr SDS σε ddH<sub>2</sub>O και αναδεύεται το διάλυμα υπό θέρμανση μέχρι να ομογενοποιηθεί. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ **APS 10%:** Για την Παρασκευή 1mL διαλύματος διαλύονται 0,1gr σκόνης APS σε ddH<sub>2</sub>O. Αναδεύεται και αποθηκεύεται τις -20°C.
- ❖ **Διάλυμα επιστοιβαξης δείγματος (sample buffer 4x) :** Για την Παρασκευή 10ml αναμειγνύονται 4mL glycerol 100%, 2mL Tris-HCl 1M pH 6,8, 1mL EDTA 0,5M, 0,8gr SDS, 8μL μπλε τις βρωμοφαινόλης 100mg/ml, 400μl β-μερκαπτοαιθανόλη και ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται τις -20°C.
- ❖ **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10x:** Για την Παρασκευή του απαιτείται η διάλυση 144.00gr γλυκίνης και 30.3gr Tris base σε 1L ddH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8,5 και το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1x:** Προκύπτει από την αραιώση 100mL Running Buffer 10x σε 900mL dH<sub>2</sub>O και την προσθήκη 10mL SDS 10% στο διάλυμα. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 1x:** Για τη δημιουργία 1L διαλύματος προστίθενται σε 695 mL παγωμένο dH<sub>2</sub>O, 200mL MeOH 100%, 100mL Running Buffer 10x και 5mL SDS 10%. Αποθηκεύεται τις 4 °C.
- ❖ **Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (TBS) 10x:** Για την Παρασκευή 1L TBS 10X ζυγίζονται και διαλύονται υπό ανάδευση σε 900mL dH<sub>2</sub>O, 88gr NaCl (MB 58,4) και 24gr Tris-base (MB 121,1). Το pH ρυθμίζεται στα 7,4-7,6 με προσθήκη πυκνού HCl 12N και ο όγκος 1L συμπληρώνεται με dH<sub>2</sub>O. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ **Ρυθμιστικό διάλυμα TBST 1x:** Διάλυμα 1L περιέχει 900mL dH<sub>2</sub>O, 100mL TBS 10x και 600μL Tween-20. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ **Διάλυμα για blocking 10%:** Περιέχει 2gr γάλα διαλυμένο σε 20mL TBST 1X.

- ❖ **Developer:** Για τη δημιουργία 500mL διαλύματος αναμειγνύονται 334,87mL dH<sub>2</sub>O, 138,15mL διαλύματος A, 14,375mL διαλύματος B και 12,5 mL διαλύματος C τις Fuji Film. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος.
- ❖ **Fixer:** Για τη δημιουργία 500mL διαλύματος αναμειγνύονται 347,4mL dH<sub>2</sub>O, 131,6mL διαλύματος A, 21,05mL διαλύματος B τις Fuji Film. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος.

### 2.3 Αντισώματα

Τα αντισώματα χρησιμοποιούνται, αφού διαλυθούν σε TBST 1x, γάλα 2% w/v ή BSA 2% και αποθηκεύονται τις -20°C.

#### Πρωτογενή

Rabbit antibody for PEPCCK (Santa Cruz), 1:1000

Rabbit antibody for p65 (Santa Cruz), 1:1000

Rabbit antibody for Bcl-2 (Cell Signaling), 1:1000

Rabbit antibody for Procaspase-3 (Abcam), 1:1000

Mouse antibody for GR (Santa Cruz), 1:1000

Mouse antibody for Procaspase-9 (Cell Signaling), 1:1000

Mouse antibody for β-actin (Sigma-Aldrich), 1:4000

Mouse antibody for GAPDH (Santa Cruz), 1:1000

#### Δευτερογενή

Goat Anti-mouse HRP (Pierce), 1:50000

Goat Anti-rabbit HRP (Pierce), 1:50000

### 2.4 Μέθοδοι

#### 2.4.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Για τα πειράματα τις παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά εμβρυικού νεφρού ανθρώπου (Human Embryonic Kidney, HEK 293). Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε φλάσκες T-25 με σταθερές συνθήκες 5% CO<sub>2</sub> και των 37°C μέσα στον επωαστήρα. Ως θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το DMEM με κόκκινο της φαινόλης με 4,5mg/ml γλυκόζη, εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Η αποθήκευση των κυττάρων γίνεται τις -80°C ή σε υγρό άζωτο σε cryovials μαζί με DMSO και FBS σε αναλογία 1:9. Όταν τα κύτταρα καλύψουν κατά προσέγγιση το 75% τις φλάσκας απαιτείται θρυψινοποίηση με τη χρήση του ενζύμου θρυψίνης για την αποκόλληση των κυττάρων από τον πάτο τις φλάσκας. Για την επίστρωση των κυττάρων σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 6 wells προηγείται θρυψινοποίηση και καταμέτρηση των κυττάρων με τη χρήση της πλάκας Neubauer και στρώσιμο του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε θρεπτικό DMEM, με κόκκινο της φαινόλης,

4,5g/L γλυκόζης, εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

#### **2.4.2 Συλλογή κυττάρων (Harvest)**

Τα κύτταρα επωάζονται με τις υπό μελέτη ουσίες για 48ώρες και στη συνέχεια συλλέγονται από το πιάτο κυτταροκαλλιέργειας. Μέσα στον πάγο αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, προστίθεται PBS 1x (cold) και γίνεται scrapping με μια μικρή σπάτουλα, έτσι ώστε να ξεπλυθούν και να ξεκολλήσουν από το πιάτο καλλιέργειας τα κύτταρα HEK293. Έπειτα, τα κύτταρα συλλέγονται σε erpendorf και φυγοκεντρώνονται (2000rpm, 5min, 4°C) με σκοπό να κατακρημνιστεί το κυτταρικό ίζημα στον πάτο του erpendorf. Η αφαίρεση του υπερκείμενου (PBS 1x) είναι απαραίτητη για να αποθηκευτούν τα κύτταρα στους -80°C μέχρι τη λύση τους.

#### **2.4.3 Λύση κυττάρων**

Η λύση των κυττάρων επιτυγχάνεται με τη προσθήκη του Lysis Buffer ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος, στη συνέχεια ακολουθεί η επώασή τους στον πάγο για 20'. Έπειτα, πραγματοποιείται sonication, με τη χρήση του οποίου σπάει το DNA και οι κυτταρικές μεμβράνες που δεν έσπασαν με την προσθήκη του lysis buffer και παραμένει αναλλοίωτο το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Για κάθε δείγμα ακολουθούν 5 κύκλοι έκθεσης του 1'' με 30'' μεσοδιάστημα σε 40% ένταση.

#### **2.4.4 Προσδιορισμός κυτταρικού περιεχομένου με τη μέθοδο Bradford**

Η μέθοδος βασίζεται στην αλλαγή χρώματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 από καφέ σε μπλε όταν υπό όξινες συνθήκες αλληλεπιδράσει με πρωτεΐνες<sup>(70)</sup>.

Το διάλυμα Bradford αραιώθηκε από το 5x (stock) στο 1x με ddH<sub>2</sub>O και προστέθηκε 1mL του αντιδραστηρίου σε 1 μL δείγματος. Για την αποφυγή σφάλματος στο πιπετάρισμα λόγω του μικρού όγκου, προηγήθηκε αραιώση 5μL κυτταρολύματος σε 20μL buffer Tris 20mM και έγινε προσθήκη 5μL από το αραιωμένο δείγμα για την τελική μέτρηση. Τα δείγματα επωάστηκαν στο σκοτάδι για 20 λεπτά, αναδεύτηκαν με vortex και φωτομετρήθηκαν σε μήκος κύματος 595nm. Με την εξίσωση  $y=0,0345x+0,01$ , η οποία προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA, υπολογίσαμε τη συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος. Όπου y η απορρόφηση του δείγματος και όπου x η συγκέντρωση του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε μg/μL.

#### **2.4.5 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες**

Για τη δημιουργία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση προστέθηκαν πρωτεϊνικό εκχύλισμα (20-30μg / διαδρομή), Tris 20mM και Sample buffer 4x σε κατάλληλες ποσότητες με βάση την περιεκτικότητα του πρωτεϊνικού φορτίου των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Πριν τοποθετηθούν τα δείγματα στην συσκευή της ηλεκτροφόρησης θερμαίνονται στους 95°C για 5' και τελικά φορτώνονται σε gel ηλεκτροφόρησης με 10% ακρυλαμίδα.

Αρχικά δημιουργούμε το gel διαχωρισμού (separating) σύμφωνα με τις αναλογίες στον Πίνακα 1 και ύστερα από 25' που έχει στερεοποιηθεί, φτιάχνουμε από πάνω το gel επιστοίβαξης (stacking) σύμφωνα με τον Πίνακα 2. Φορτώνουμε 1μL μάρτυρα μοριακού βάρους και 10μL δείγματος στα πηγαδάκια που έχουν δημιουργηθεί στο gel επιστοίβαξης περιτριγυρισμένο από Running Buffer 1x μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για 2-3ώρες στα 80V.

Πίνακας 1: Συνταγή για gel διαχωρισμού

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
ddH <sub>2</sub> O	2,425mL
Tris-HCL (pH=8,8 c=1,5M)	1,25mL
SDS 10%	50μL
Acrylamide/ Bis-acrylamide	1,25mL
APS 10%	25μL
TEMED	2,5μL

Πίνακας 2: Συνταγή για gel επιστοίβαξης

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
ddH <sub>2</sub> O	2,025mL
Tris-HCL (pH=6,8 c=1,5M)	0,21mL
SDS 10%	25μL
Acrylamide/ Bis-acrylamide	0,25mL
APS 10%	12,5μL
TEMED	2,5μL

#### 2.4.6 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων γίνεται η μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0,22μM. Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικής τάσης ύψους 0,35A για χρονικό διάστημα 70 λεπτών σε Transfer Buffer και διατηρώντας το περιβάλλον ψυχρό. Ακολουθεί ανάδευση της μεμβράνης σε διάλυμα blocking 10% w/v για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαζεται με πρωτογενές αντίσωμα για μια ολόκληρη νύχτα (12-16 ώρες) στους 4°C. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση, ακολουθούν 4 πλύσεις των 5 λεπτών με TBST 1x και επώαση με δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα στους 25°C. Μετά από μία ώρα πραγματοποιούνται πάλι 3 πεντάλεπτες πλύσεις με TBST 1x ή 4 αν πρόκειται για δευτερογενές αντίσωμα anti-rabbit. Ακολουθεί η προσθήκη 200μL των ECL A και B για 3 λεπτά, διαλύματα τα οποία αποτελούν υπόστρωμα του ενζύμου HRP, που είναι συνδεδεμένο στο δευτερογενές αντίσωμα. 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 ανάπτυξης σήματος developer πρώτα και μονιμοποίησης σήματος fixer στη συνέχεια, για ένα λεπτό στο καθένα υπό ανάδευση.

#### 2.4.7 Επεξεργασία των 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 Adobe Photoshop 2018 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 2016.

### 3. Αποτελέσματα

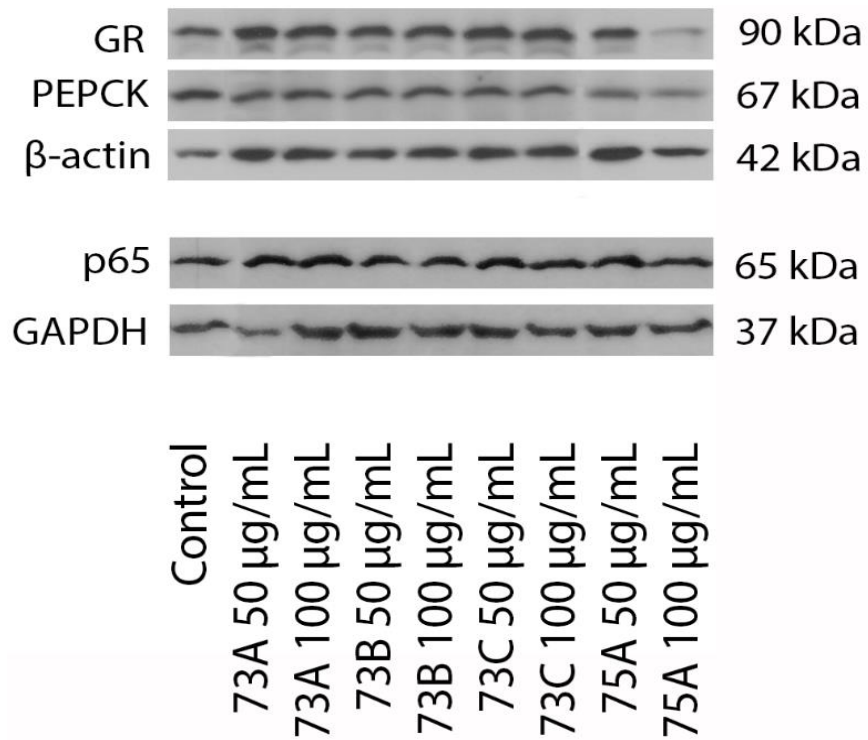
#### 3.1 Αξιολόγηση της επίδρασης διαφόρων κλασμάτων από τη ρητίνη του μαστιχόδεντρου Χίου στη σηματοδότηση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών από την πρόσδεση του γλυκοκορτικοειδούς σε αυτόν, μετατοπίζει το GR στον πυρήνα, όπου ρυθμίζει τη μεταγραφή διάφορων γονιδίων στόχων <sup>(46) (51)</sup>. Η σύνδεση του υποδοχέα σε στοιχεία GRE (Glucocorticoid receptor Response Elements) ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων όπως η καρβοξυκινάση του φωσφο-ενολοπυροσταφυλικού (Phospho-enolpyruvate Carboxykinase, PEPCK) <sup>(46) (71)</sup>. Η PEPCK είναι ένα ένζυμο της κατηγορίας των λυασών και συμμετέχει στη πορεία της γλυκονεογένεσης, δηλαδή την παραγωγή γλυκόζης από μη υδατανθρακικές πρόδρομες ενώσεις. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του οξαλοξικού οξέος σε φωσφο-ενολοπυροσταφυλικό οξύ με τη δαπάνη ενός μορίου GTP και την απομάκρυνση ενός μορίου CO<sub>2</sub> <sup>(72)</sup>. Πρόκειται για το ρυθμοκαθοριστικό βήμα στη διαδικασία της γλυκονεογένεσης, δηλαδή την αντίδραση που καθορίζει την ταχύτητα της συνολικής αντίδρασης <sup>(73)</sup>. Επιπλέον, ο ενεργοποιημένος GR μπορεί να ρυθμίσει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων χωρίς να δεσμευτεί στο DNA, αλλά μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες με χαρακτηριστικό παράδειγμα τον NF-κB <sup>(74)</sup>. Ο GR καταστέλλει τη μεταγραφική δραστηριότητα του παράγοντα NF-κB, ενός μεταγραφικού παράγοντα που προάγει τη μεταγραφή προφλεγμονωδών μορίων όπως κυτοκίνες και χημειοκίνες, καθώς αλληλεπιδρά με την υπομονάδα p65 του NF-κB <sup>(75)</sup>.

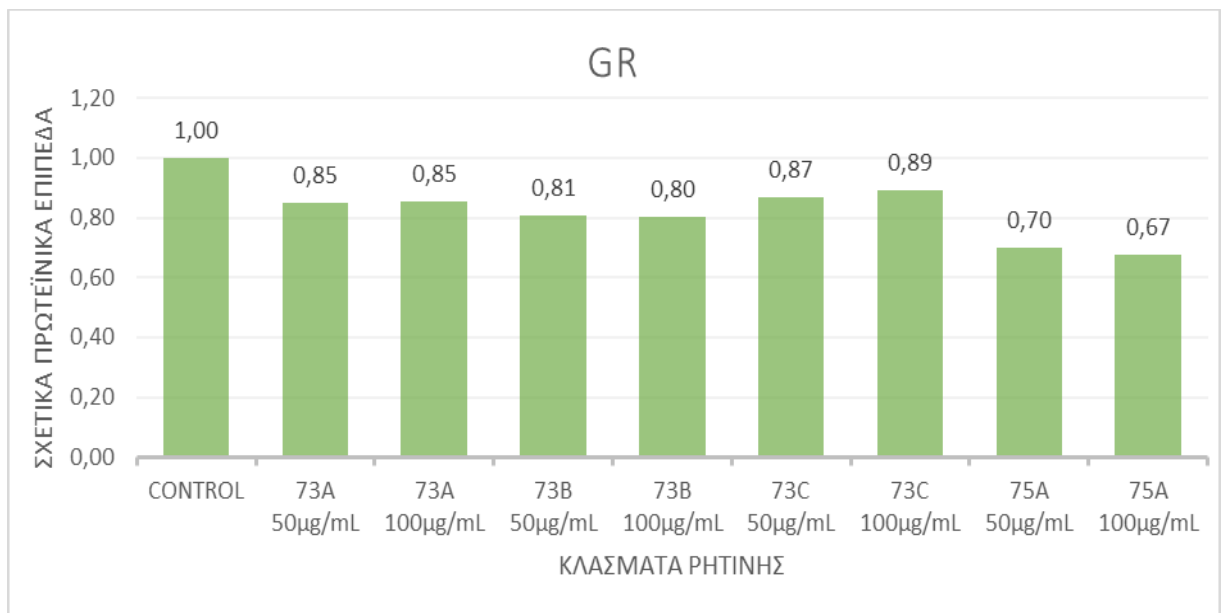
Με σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης των κλασμάτων από τη ρητίνη του μαστιχόδεντρου Χίου στη σηματοδότηση του GR, ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων GR, PEPCK και p65. Για να διερευνηθεί η επίδραση των κλασμάτων 73A, 73B, 73C και 75A στα επίπεδα των πρωτεϊνών GR, PEPCK και p65 πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων HEK293 σε six-wells (200.000 κύτταρα/θέση) σε θρεπτικό μέσο DMEM, high glucose (4,5g/L), για 48 ώρες. Έπειτα, έγινε προσθήκη των προς μελέτη κλασμάτων σε συγκεντρώσεις 50, 100 µg/ml διαλυμένα σε EtOH 100% και τα κύτταρα επώαστηκαν για επιπλέον 48 ώρες. Τα κύτταρα στη συνθήκη αναφοράς του πειράματος (control) επώαστηκαν για 48 ώρες με την αντίστοιχη ποσότητα EtOH 100%, που αποτελεί το διαλύτη των ουσιών. Εν συνεχεία, έγινε συλλογή των κυττάρων σε πάγο, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών από ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση κατά Western, με τη χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων. Ως μόρια κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκαν η β-ακτίνη (β-actin) και η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης (GAPDH). Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 6:



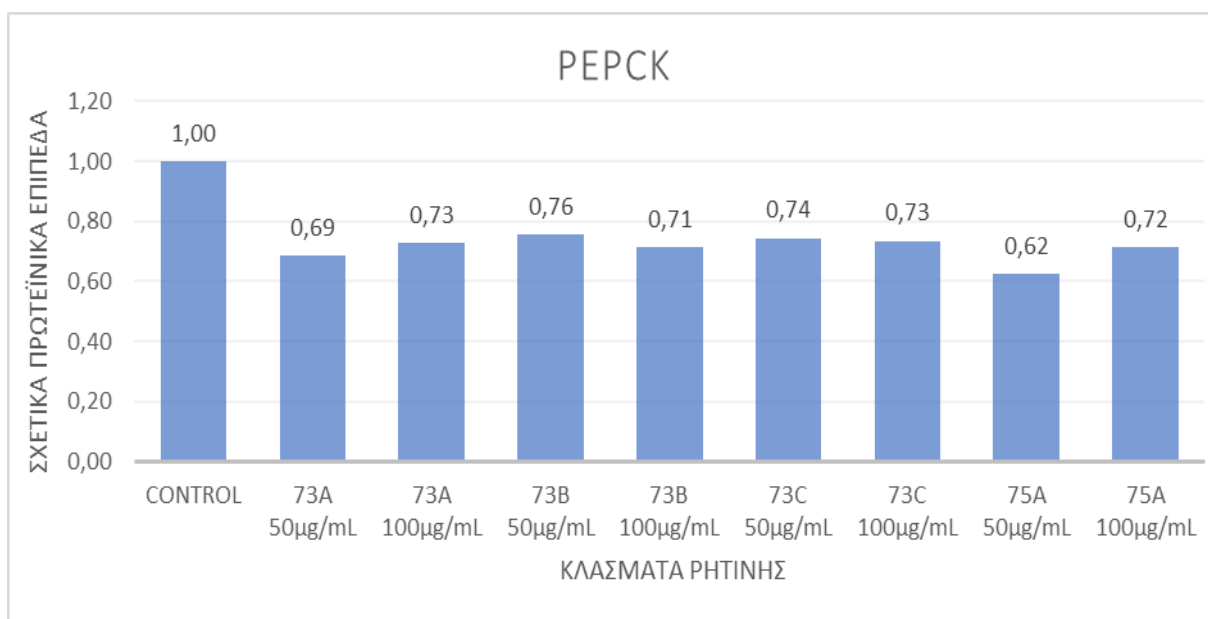
Εικόνα 6.A)



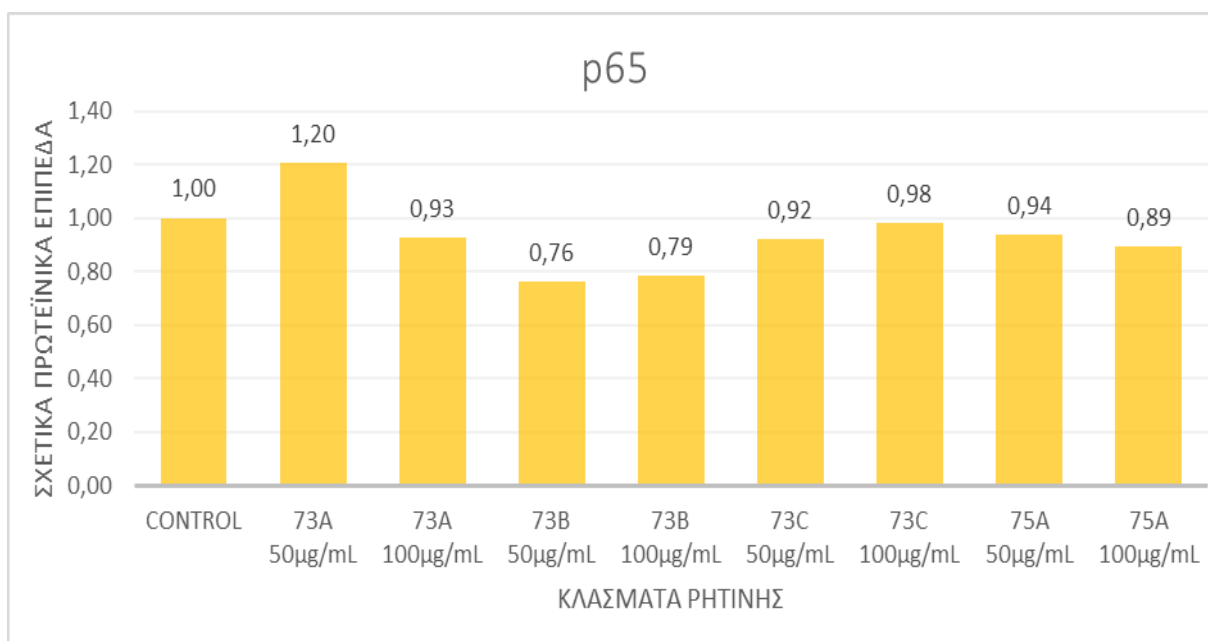
Εικόνα 6.B)



Εικόνα 6.Γ)



Εικόνα 6.Δ)



**Εικόνα 6:** Διερεύνηση της επίδρασης διαφόρων κλασμάτων από τη ρητίνη του φυτού *Pistacia lentiscus* στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, της PERCK και της p65 σε συγκεντρώσεις 50 και 100 μg/mL. Αναλυτικότερα, απεικονίζονται : **A)** Αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τις πρωτεΐνες GR, PERCK και p65. **B)** Διάγραμμα με τα επίπεδα της πρωτεΐνης GR, ύστερα από κανονικοποίηση ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα της πρωτεΐνης β-actin. **Γ)** Διάγραμμα με τα επίπεδα της πρωτεΐνης PERCK, ύστερα από κανονικοποίηση ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα της πρωτεΐνης β-actin. **Δ)** Διάγραμμα με τα επίπεδα της πρωτεΐνης p65, ύστερα από κανονικοποίηση ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα της πρωτεΐνης GAPDH.

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) μειώνονται παρουσία των κλασμάτων της ρητίνης του μαστιχόδεντρου Χίου, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6Α και ποσοτικοποιούνται στο διάγραμμα της εικόνας 6Β. Το ποσοστό κατά το οποίο μειώνονται τα επίπεδα του GR σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς κυμαίνεται γύρω στο 15%, τόσο στη συγκέντρωση των 50 όσο και στη συγκέντρωση των 100μg/ml. Γεγονός που υποδεικνύει ότι η μείωση αυτή είναι περιορισμένη και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης κατά πόσο είναι και στατιστικά σημαντική. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η επίδραση του κλάσματος 75Α στα επίπεδα του GR, καθώς παρουσία αυτού, παρατηρείται μείωση κατά 30%, και στις δύο συγκεντρώσεις, συγκριτικά με τη συνθήκη control.

Όσον αφορά τα επίπεδα του ενζύμου PEPCK παρατηρείται κι εδώ μείωση τους με την προσθήκη των κλασμάτων της ρητίνης του μαστιχόδεντρου Χίου, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6Α και ποσοτικοποιούνται στο διάγραμμα της εικόνας 6Γ. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK παρουσιάζονται μειωμένα περίπου κατά 30%, τόσο στη συγκέντρωση των 50 όσο και σε αυτή των 100μg/ml, συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα του control.

Επιπλέον, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που αποτυπώνονται στις Εικόνες 6Α και 6Δ, εμφανίζουν μια μικρή τάση μείωσης ύστερα από την προσθήκη των κλασμάτων ρητίνης του μαστιχόδεντρου Χίου. Αξιοσημείωτη είναι η μείωση των επιπέδων της p65 κατά περίπου 20%, σε σχέση πάντα με τη συνθήκη αναφοράς, όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με τις δύο συγκεντρώσεις του κλάσματος 73Β.

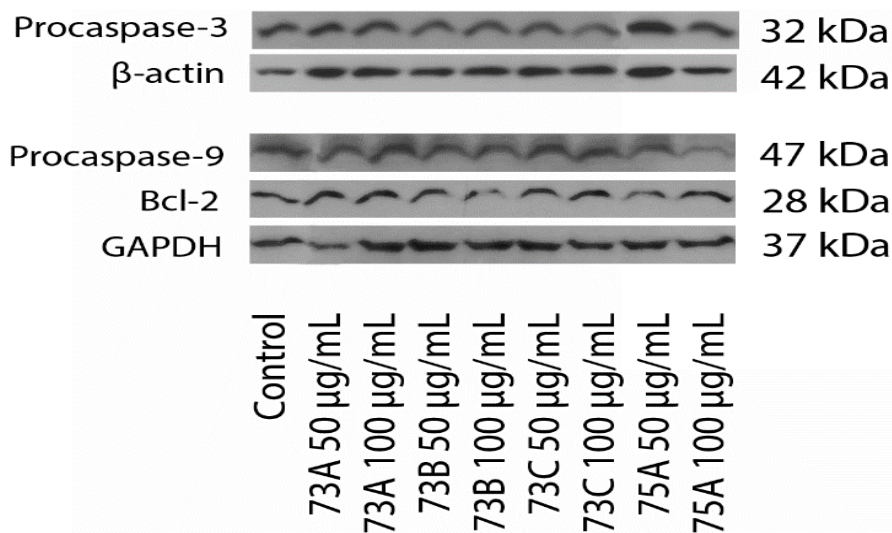
Ωστόσο, τα παραπάνω αποτελέσματα χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης και όπως προαναφέρθηκε, είναι απαραίτητο να διενεργηθούν κι άλλες βιολογικές επαναλήψεις, προκειμένου να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με τη στατιστική σημαντικότητά τους.

### **3.2 Αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών κλασμάτων από τη ρητίνη του μαστιχόδεντρο στους μηχανισμούς της απόπτωσης.**

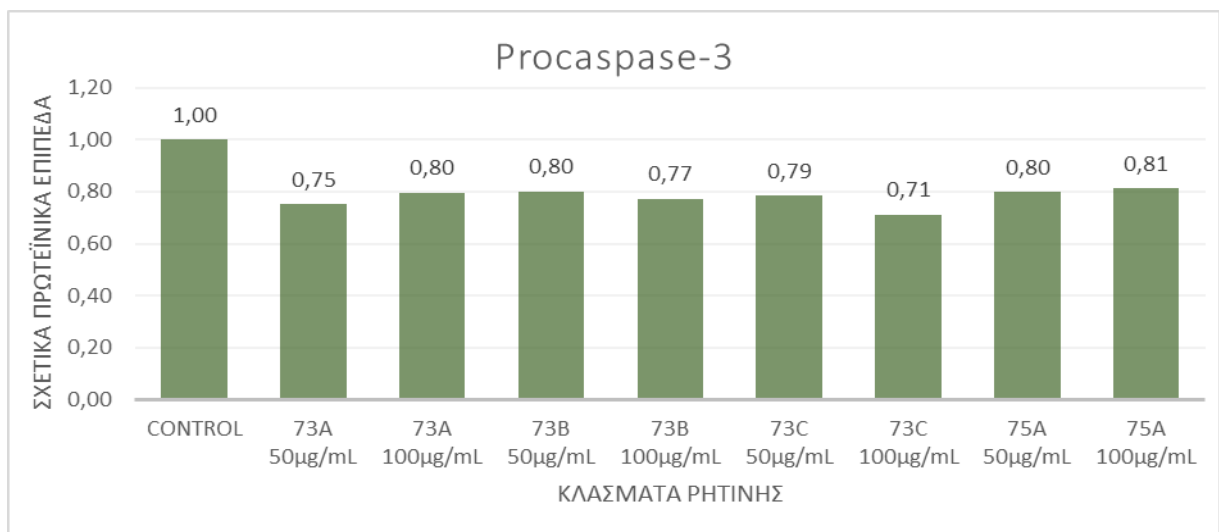
Η επιστημονική κοινότητα αναζητεί συνεχώς έναν τρόπο για να καταπολεμήσει αποτελεσματικά τη μαστίγια του αιώνα, τον καρκίνο. Μέσα από πολλές ερευνητικές μελέτες, η μαστίγια Χίου έχει προαχθεί ως πιθανό αντικαρκινικό φαρμακευτικό προϊόν χάρη στις αποπτωτικές δράσεις που εμφανίζει <sup>(76)</sup> <sup>(77)</sup>. Πιο συγκεκριμένα, πειράματα *in vitro* σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (HCT 116) έχουν αποδείξει πως η ρητίνη του *Pistacia lentiscus* επάγει αποπτωτικά μονοπάτια ενεργοποιώντας τα προαποπτωτικά μόρια κασπάση 8 και κασπάση-9, χωρίς να είναι ξεκάθαρος ο μηχανισμός που το επιτυγχάνει <sup>(38)</sup>. Ακόμη, κλινικές μελέτες σε καρκινοπαθείς συγκλίνουν στην αποπτωτική δράση της μαστίγιας, καθώς τα επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 μειώνονται στους ασθενείς που έλαβαν συνδυαστική αγωγή gemcitabine και μαστίγια Χίου <sup>(39)</sup>.

Για να διερευνηθεί η επίδραση των κλασμάτων ρητίνης του μαστιχόδεντρου στους αποπτωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των προ-αποπτωτικών μορίων προκασπάση-3 και προκασπάση-9 και της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων HEK293 σε six-wells (200.000 κύτταρα/well), σε θρεπτικό μέσο DMEM, high glucose (4,5g/L), για 48 ώρες. Έπειτα, έγινε προσθήκη των προς μελέτη κλασμάτων σε συγκεντρώσεις 50, 100 µg/mL διαλυμένα σε EtOH 100% και τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες. Τα κύτταρα στη συνθήκη αναφοράς του πειράματος (control) επώαστηκαν για 48 ώρες με την αντίστοιχη ποσότητα EtOH 100%, που αποτελεί το διαλύτη των κλασμάτων. Εν συνεχεία, έγινε συλλογή των κυττάρων σε πάγο, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών από ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση κατά Western, με τη χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων. Ως μόρια κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκαν η β-ακτίνη (β-actin) και η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης (GAPDH). Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 7:

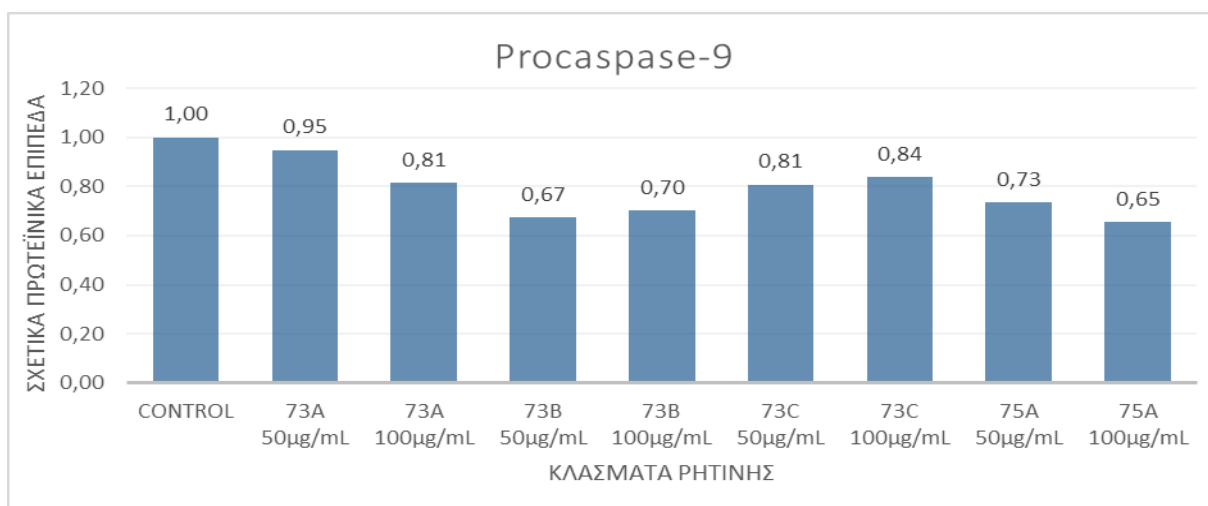
Εικόνα 7.A)



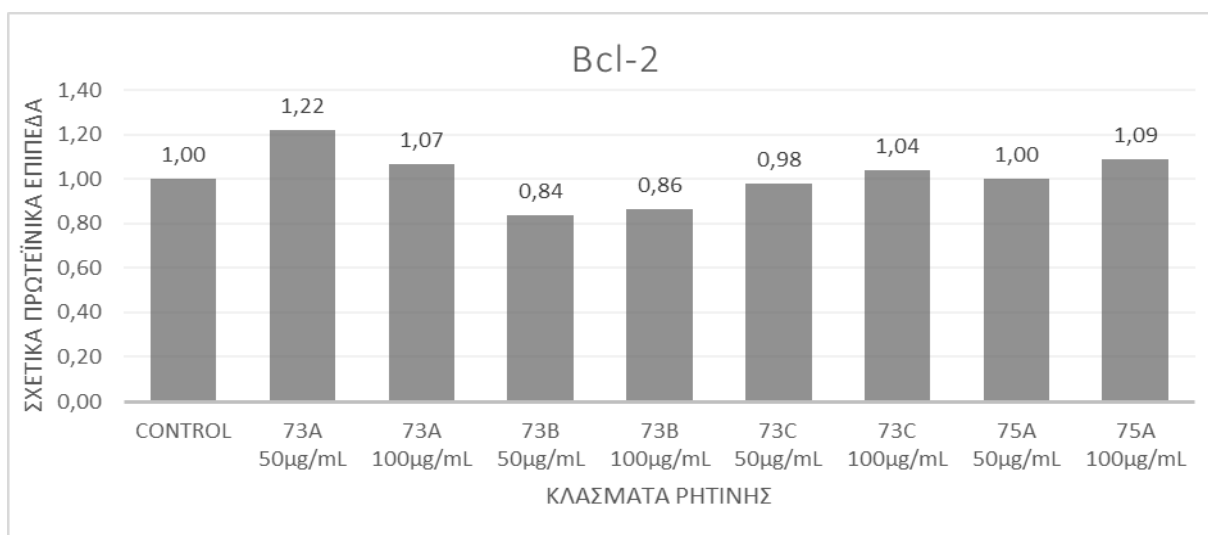
Εικόνα 7.B)



Εικόνα 7.Γ)



Εικόνα 7.Δ)



**Εικόνα 7:** Διερεύνηση της επίδρασης κλασμάτων ρητίνης του φυτού *Pistacia lentiscus* στα πρωτεϊνικά επίπεδα της Procaspase-3, Procaspase-9 και της Bcl-2 σε συγκεντρώσεις 50 και 100 µg/mL. Αναλυτικότερα, απεικονίζονται : **A)** Αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τις πρωτεΐνες προκασπάση-9, προκασπάση-3, Bcl-2. **B)** Διάγραμμα με τα επίπεδα της πρωτεΐνης προκασπάση-9, ύστερα από κανονικοποίηση ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα της πρωτεΐνης β-actin. **Γ)** Διάγραμμα με τα επίπεδα της πρωτεΐνης προκασπάση-3, ύστερα από κανονικοποίηση ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα της πρωτεΐνης GAPDH. **Δ)** Διάγραμμα με τα επίπεδα της πρωτεΐνης Bcl-2, κανονικοποιημένα ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα της πρωτεΐνης GAPDH.

Αναφορικά με τα πρωτεϊνικά επίπεδα της μη πρωτεολυμένης κασπάσης-3 (Procaspase-3), αυτά μειώνονται κατά 20% με την προσθήκη των κλασμάτων της ρητίνης του μαστιχόδεντρου Χίου, τόσο στη συγκέντρωση των 50 όσο και στη συγκέντρωση των 100µg/ml, σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς, όπως φαίνεται στην Εικόνα 7Α και στο διάγραμμα της εικόνας 7Β, όπου απεικονίζεται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Αναφορικά με τα επίπεδα της προκασπάσης-9 παρατηρείται κι εδώ μείωση τους ύστερα από την προσθήκη των κλάσμάτων της ρητίνης του μαστιχόδεντρου Χίου, όπως φαίνεται στην Εικόνα 7Α και στο διάγραμμα της εικόνας 7Γ, όπου απεικονίζεται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Η ελάττωση των επιπέδων της πρωτεΐνης προκασπάση-9 συγκριτικά με αυτά του control διαφοροποιείται ανάλογα το κλάσμα ρητίνης με το οποίο επωάστηκαν τα κύτταρα. Μεγαλύτερη μείωση παρατηρείται παρουσία του κλάσματος 73B, 30% συγκριτικά με τη συνθήκη control, και στις δύο συγκεντρώσεις.

Τέλος, αναφορικά με τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Bcl-2, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που αποτυπώνονται στις Εικόνες 7Α και 7Δ, δεν παρατηρούνται διαφορές, ύστερα από την προσθήκη των κλάσμάτων ρητίνης του μαστιχόδεντρου Χίου, συγκριτικά με τη συνθήκη control. Ωστόσο, το κλάσμα 73B φαίνεται ότι προκαλεί μια μείωση της τάξης του 15%, συγκριτικά με τη συνθήκη control.

#### 4 Συζήτηση

Τα φυσικά προϊόντα από το μαστιχόδεντρο Χίου χρησιμοποιούνται εδώ και χιλιετίες ως θεραπεία για διαταραχές στο στομάχι, για την επούλωση πληγών, στη μαγειρική, στη διατήρηση τροφίμων και στην κοσμετολογία <sup>(1) (4)</sup>. Οι συνεχείς έρευνες μεγάλωνουν ολοένα και περισσότερο τον κατάλογο των βιολογικών δράσεων της Μαστίχας Χίου, προσθέτοντας σε αυτόν τις αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές δράσεις <sup>(1) (2) (4) (34)</sup>. Για τη διερεύνηση των βιολογικών δράσεων της μαστίχας και των μηχανισμών με τους οποίους τις επιτυγχάνει, η ερευνητική κοινότητα στράφηκε στη χημική σύσταση των εκχυλισμάτων ρητίνης και των αιθέριων ελαίων. Οι χημικές ενώσεις που κυριαρχούν στα προϊόντα του μαστιχόδεντρου είναι τα τερπένια και οι φαινολικές ενώσεις. Δρουν ως επί το πλείστον συνεργατικά, αν και έχει αποδειχθεί και η μεμονωμένη δράση τους, προσδίδοντας τις μοναδικές θεραπευτικές ιδιότητες στα εκχυλίσματα <sup>(2) (4) (5) (6)</sup>.

Τα τριτερπένια, που είναι μια κατηγορία τερπενίων, έχουν παρόμοια χημική δομή με τα γλυκοκορτικοειδή, συνεπώς δύναται ενδεχομένως να επιτελέσουν τις δράσεις τους μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) και να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων στόχων του <sup>(62) (64) (66) (67)</sup>. Μέχρι και σήμερα, τα συνθετικά -και μη- γλυκοκορτικοειδή όπως η δεξαμεθαζόνη και η κορτιζόλη αντίστοιχα αποτελούν κάποια από τα πιο ευρέως συνταγογραφούμενα φάρμακα για την αντιμετώπιση χρόνιων νοσημάτων όπως το άσθμα, οι αυτοάνοσες και οι δερματικές παθήσεις <sup>(60) (61) (62)</sup>. Δυστυχώς, οι υψηλές δοσολογίες και η μακροχρόνια χρήση τους προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στους ασθενείς με κάποιες από τις σοβαρότερες να είναι ο διαβήτης τύπου II, η υπέρταση, η απώλεια μυϊκής μάζας και η οστεοπόρωση <sup>(62) (63)</sup>. Κρίνεται λοιπόν αναγκαία η εύρεση νέων ενώσεων που θα προκαλούν μειωμένες ανεπιθύμητες ενέργειες και παράλληλα θα έχουν θεραπευτικές ιδιότητες. Οι επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Selective Glucocorticoid Receptor Agonists – SEGRAs) προερχόμενοι από φυτά έχει αποδειχθεί πως συγκεντρώνουν αυτά τα χαρακτηριστικά και θα μπορούσαν στο μέλλον να αντικαταστήσουν τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή <sup>(62) (64) (66) (78)</sup>.

Βασιζόμενοι λοιπόν στα παραπάνω, ο σκοπός αυτής της πτυχιακής ήταν η διερεύνηση των βιολογικών δράσεων εκχυλισμάτων προερχόμενα από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* σε κύτταρα HEK293. Με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western εξετάστηκαν τα

πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR), της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) και της υπομονάδας p65 του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, προκειμένου να αξιολογηθούν οι πιθανές αντιφλεγμονώδεις και αντι-υπεργλυκαιμικές δράσεις των διαφορετικών κλασμάτων ρητίνης που προέρχεται από το *Pistacia lentiscus*. Εστιάσαμε σε αυτές τις πρωτεΐνες, καθώς ο ενεργοποιημένος GR εισέρχεται στον πυρήνα και ρυθμίζει τη μεταγραφή του γλυκονεογενετικού ενζύμου PEPCK<sup>(46)</sup> <sup>(71)</sup>, αλλά και τη διαθεσιμότητα της υπομονάδας p65 του παράγοντα φλεγμονής NF-κB<sup>(75)</sup>. Όπως φαίνεται στις εικόνες 6A, 6B και 6Γ, ο GR και η PEPCK μειώνονται σε επίπεδο πρωτεϊνών παρουσία των κλασμάτων της ρητίνης του μαστιχόδεντρου Χίου κατά 15% και 30% αντίστοιχα, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του κάθε κλάσματος (στο εύρος συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν). Μεγαλύτερη μείωση στα επίπεδα του GR (μέχρι 30%) προκαλούν τα εκχυλίσματα του κλάσματος 75A, με ανάλογη μείωση των επιπέδων της PEPCK. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πως τα υπό μελέτη κλάσματα ρητίνης δεν επάγουν τις γλυκονεογενετικές δράσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, και πιθανόν να εμφανίζουν αντι-υπεργλυκαιμικές δράσεις. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 δεν παρουσιάζουν κάποια μεταβολή, εκτός από τα επίπεδα σε κύτταρα που επώαστηκαν με το κλάσμα 73B. Συνεπώς, η μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB, που καταγράφηκε από προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, δεν οφείλεται σε μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της p65, με εξαίρεση τα αποτελέσματα από το κλάσμα ρητίνης 73B. Τα τελευταία μειώθηκαν κατά 20% και πιθανότατα σχετίζονται με αποπτωτικές δράσεις αυτού του κλάσματος όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

Επιπλέον, υπάρχουν έρευνες που συσχετίζουν την αποπτωτική δράση της μαστίχας Χίου με την επίδρασή της στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9, προκασπάσης-3 και της Bcl-2<sup>(38)</sup> <sup>(39)</sup>. Με βάση αυτά τα δεδομένα, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα των προαποπτωτικών μορίων προκασπάση 9 (Procaspase-9), προκασπάση 3 (Procaspase-3) και της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2), υπό την επίδραση των υπό μελέτη κλασμάτων, με σκοπό να εξεταστεί η αποπτωτική δράση των εκχυλισμάτων ρητίνης από το μαστιχόδεντρο Χίου στα κύτταρα HEK 293. Όσον αφορά τα επίπεδα της προκασπάσης-3 και της προκασπάσης-9 παρατηρείται μείωση τους, υπό την επίδραση των εκχυλισμάτων, υποδηλώνοντας πως τα κύτταρα υφίστανται απόπτωση. Ειδικά η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9 οδηγεί στο συμπέρασμα πως πιθανότατα ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος διαμεσολαβείται από τα μιτοχόνδρια. Πρόκειται για έναν καταρράκτη αντιδράσεων που ενεργοποιείται από πλήθος ερεθισμάτων και οδηγεί στην απώλεια του μιτοχονδριακού δυναμικού με συνέπεια την ελευθέρωση πρωτεϊνών του μιτοχονδρίου παραδείγματος χάριν το κυτόχρωμα c. Το κυτόχρωμα c πυροδοτεί τον ολιγομερισμό της πρωτεΐνης Araf-1, η οποία κινητοποιεί την κασπάση-9 και η τελευταία ενεργοποιεί την κασπάση-3<sup>(56)</sup>. Το κλάσμα ρητίνης 73B φαίνεται να έχει εντονότερη αποπτωτική δράση μέσω μιτοχονδρίων δεδομένης της μεγαλύτερης μείωσης των επιπέδων της προκασπάσης-9, κατά την επώαση των κυττάρων με το εν λόγω εκχύλισμα. Ο πιθανός αυτός μηχανισμός απόπτωσης για το κλάσμα 73B ενισχύεται κι από τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Bcl-2 τα οποία μειώνονται, ενώ παραμένουν σχετικά σταθερά όταν τα κύτταρα επωάζονται με τα υπόλοιπα κλάσματα ρητίνης 73A, 73C και 75A. Επίσης, η αποπτωτική δράση που λαμβάνει χώρα εξαιτίας της επώασης των κυττάρων με το κλάσμα ρητίνης της μαστίχας Χίου 73B φαίνεται πως επιβεβαιώνεται και από τα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της p65. Έχει αποδειχθεί ότι η κασπάση-3 κατακερματίζει την υπομονάδα p65, εντείνοντας την απόπτωση και την ανοσοκαταστολή<sup>(79)</sup>. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας συνάδουν με αυτά από άλλες

ερευνητικές εργασίες, δηλαδή η μαστίχα Χίου προκαλεί απόπτωση των κυττάρων που επώαστηκαν με τα εκχύλισματά της μειώνοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9, της προκασπάσης-3<sup>(38)</sup>, της Bcl-2<sup>(39)</sup> και της p65<sup>(79)</sup>. Ο χαρακτηρισμός της σύστασης των εν λόγω εκχυλισμάτων θα συντελέσει στον χαρακτηρισμό των βιοδραστικών μορίων για κάθε βιολογική δράση που μελετάται. Η Μαστίχα Χίου θα μπορούσε να θεωρηθεί, λοιπόν, ως πιθανό αντικαρκινικό φάρμακο, δεδομένης της πλούσιας σύστασης της σε τριτερπένια με αντιπολλαπλασιαστική δράση<sup>(76)(77)</sup>.

Συνοψίζοντας, τα κλάσματα ρητίνης του μαστιχόδεντρου που μελετήθηκαν, μειώνουν τα επίπεδα του GR και της PEPCK στα κύτταρα HEK293 υποδεικνύοντας μια πιθανή αντι-υπεργλυκαιμική δράση αυτών, με πιθανό πιο δραστικό εκχύλισμα το 75A. Επιπλέον, όλα τα κλάσματα, ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης τους, παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα της προκασπάσης-3 και της προκασπάσης-9 υποδηλώνοντας ότι διαθέτουν και αποπτωτική δράση. Συνεκτιμώντας τα μειωμένα επίπεδα της p65 και Bcl-2, φαίνεται ότι το κλάσμα 73B επάγει ισχυρότερα την απόπτωση μέσω του μιτοχονδριακού μηχανισμού κυτταρικού θανάτου. Στο σύνολό τους οι παραπάνω δράσεις φαίνεται ότι δεν εξαρτώνται από τη συγκέντρωση, καθότι σε κάθε εκχύλισμα το ποσοστό των παρατηρούμενων μειώσεων είναι ίδιο τόσο στη συγκέντρωση των 50 όσο και στη συγκέντρωση των 100μg/mL. Φυσικά για την επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων απαιτούνται περαιτέρω βιολογικές επαναλήψεις του ίδιου πειράματος για να εξαχθούν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των μορίων που μελετήσαμε. Ακόμη, η προσθήκη δεξαμεθαζόνης στα κύτταρα HEK293 ως θετικό control θα αποτελούσε μια ακόμα παράμετρο για να εξεταστεί πόσο αποτελεσματικά είναι τα κλάσματα ρητίνης συγκριτικά με ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές που χρησιμοποιείται ευρέως κλινικά. Μελλοντικά, θα μπορούσε να γίνει διαχωρισμός και ταυτοποίηση των ενώσεων που εντοπίζονται στο κλάσμα της ρητίνης που προκαλεί τις επιθυμητές βιολογικές δράσεις π.χ. 73B, 75A. Ύστερα να ακολουθήσει μια *in silico* ανάλυση των υποψήφιων προσδετών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με πρόγραμμα docking για να εντοπιστούν οι ενώσεις που δημιουργούν σταθερότερο σύμπλοκο με τον υποδοχέα, συνεπώς αποτελούν καλύτερους αγωνιστές του. Σε μεταγενέστερο επίπεδο, η ένωση ή οι ενώσεις που έχουν την πιο αποτελεσματική δράση μπορούν να απομονωθούν από τη ρητίνη της Μαστίχας Χίου ή να συντεθούν σε βιομηχανικό επίπεδο και να δοκιμαστούν για την αποτελεσματικότητά τους *in vivo* και σε κλινικές μελέτες. Τέλος, θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα εξειδικευμένο φυσικό, φυτικό, φαρμακευτικό προϊόν που θα προσφέρει εναλλακτικές λύσεις στην αντιμετώπιση χρόνιων παθήσεων όπως οι αυτοάνοσες, ο διαβήτης, το άσθμα και ο καρκίνος.



## 5 Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. Dimas KS, Pantazis P, Ramanujam R. Review: Chios mastic gum: a plant-produced resin exhibiting numerous diverse pharmaceutical and biomedical properties. *Vivo Athens Greece*. 2012 Oct;26(5):777–85.
2. Pachi VK, Mikropoulou EV, Gkiouvetidis P, Siafakas K, Argyropoulou A, Angelis A, et al. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Chios mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*, Anacardiaceae): A review. *J Ethnopharmacol*. 2020 May 23;254:112485.
3. Smymioudis I. OVERVIEW OF THE MAJOR SCIENTIFIC PUBLICATIONS ON THE BENEFICIAL ACTIVITY OF CHIOS MASTIHA [Internet]. THE CHIOS GUM MASTIC GROWERS ASSOCIATION. 2019. Available from: [https://www.gummastic.gr/el/?option=com\\_k2&view=item&layout=item&id=783](https://www.gummastic.gr/el/?option=com_k2&view=item&layout=item&id=783)
4. S. Paraschos, S. Mitakou, A.-L. Skaltsounis. Chios Gum Mastic: A Review of its Biological Activities. *Curr Med Chem*. 2012 Apr 24;19(14):2292–302.
5. Kaliora AC, Mylona A, Chiou A, Petsios DG, Andrikopoulos NK. Detection and Identification of Simple Phenolics in *Pistacia lentiscus* Resin. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2004 Jan;27(2):289–300.
6. Kivçak B, Akay S. Quantitative determination of  $\alpha$ -tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. *chia*, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia*. 2005 Jan;76(1):62–6.
7. Al-Habbal MJ, Al-Habbal Z, Huwez FU. A DOUBLE-BLIND CONTROLLED CLINICAL TRIAL OF MASTIC AND PLACEBO IN THE TREATMENT OF DUODENAL ULCER. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1984 Oct;11(5):541–4.
8. Al-Said MS, Ageel AM, Parmar NS, Tariq M. Evaluation of mastic, a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *J Ethnopharmacol*. 1986 Mar;15(3):271–8.
9. Aebischer T, Meyer TF, Andersen LP. Inflammation, Immunity, and Vaccines for Helicobacter: Inflammation, Immunity, and Vaccines for Helicobacter. *Helicobacter*. 2010 Sep;15:21–8.
10. Marone P, Bono L, Leone E, Bona S, Carretto E, Perversi L. Bactericidal Activity of *Pistacia lentiscus* Mastic Gum Against *Helicobacter pylori*. *J Chemother*. 2001 Jan;13(6):611–4.
11. Kottakis F, Lamari F, Matragkou Ch, Zachariadis G, Karamanos N, Choli-Papadopoulou T. Arabino-Galactan Proteins from *Pistacia lentiscus* var. *chia*: isolation, characterization and biological function. *Amino Acids*. 2008 Apr;34(3):413–20.
12. Paraschos S, Magiatis P, Mitakou S, Petraki K, Kalliaropoulos A, Maragkoudakis P, et al. In Vitro and In Vivo Activities of Chios Mastic Gum Extracts and Constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Feb;51(2):551–9.
13. Dabos KJ, Sfika E, Vlatta LJ, Giannikopoulos G. The effect of mastic gum on *Helicobacter pylori*: A randomized pilot study. *Phytomedicine*. 2010 Mar;17(3–4):296–9.
14. Loughlin MF. Monotherapy with mastic does not eradicate *Helicobacter pylori* infection from mice. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Feb 1;51(2):367–71.

15. Bebb JR. Mastic gum has no effect on *Helicobacter pylori* load in vivo. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Aug 13;52(3):522–3.
16. Sakagami H, Kishino K, Kobayashi M, Hashimoto K, Iida S, Shimetani A, et al. Selective antibacterial and apoptosis-modulating activities of mastic. *Vivo Athens Greece.* 2009 Apr;23(2):215–23.
17. Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett.* 2012 Aug;333(1):1–9.
18. Takahashi K, Fukazawa M, Motohira H, Ochiai K, Nishikawa H, Miyata T. A Pilot Study on Antiplaque Effects of Mastic Chewing Gum in the Oral Cavity. *J Periodontol.* 2003 Apr;74(4):501–5.
19. Tassou CC, Nychas GJE. Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in Model Food System. *Int Biodeterior Biodegrad.* 1995 Oct;36(3–4):411–20.
20. Ali-Shtayeh MS, Abu Ghdeib SI. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses.* 1999 Dec;42(11–12):665–72.
21. Koutsoudaki C, Krsek M, Rodger A. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil and the Gum of *Pistacia lentiscus* Var . *chia*. *J Agric Food Chem.* 2005 Oct;53(20):7681–5.
22. Bouslama L, Benzekri R, Nsaibia S, Papetti A, Limam F. Identification of an antiviral compound isolated from *Pistacia lentiscus*. *Arch Microbiol.* 2020 Nov;202(9):2569–78.
23. Abdel-Rahman A-HY, SOAD, Youssef AM. Mastich as an antioxidant. *J Am Oil Chem Soc.* 1975 Oct;52(10):423–423.
24. Assimopoulou A, Zlatanov S, Papageorgiou V. Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. *Food Chem.* 2005 Oct;92(4):721–7.
25. Andrikopoulos NK, Kaliora AC, Assimopoulou AN, Papapeorgiou VP. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. *Phytother Res.* 2003 May;17(5):501–7.
26. Papada E, Forbes A, Amerikanou C, Torović L, Kalogeropoulos N, Tzavara C, et al. Antioxidative Efficacy of a *Pistacia Lentiscus* Supplement and Its Effect on the Plasma Amino Acid Profile in Inflammatory Bowel Disease: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Nutrients.* 2018 Nov 16;10(11):1779.
27. Georgiadis I, Karatzas T, Korou L-M, Katsilambros N, Perrea D. Beneficial Health Effects of Chios Gum Mastic and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Indications of Common Mechanisms. *J Med Food.* 2015 Jan;18(1):1–10.
28. Triantafyllou A, Bikineyeva A, Dikalova A, Nazarewicz R, Lerakis S, Dikalov S. Anti-inflammatory activity of Chios mastic gum is associated with inhibition of TNF-alpha induced oxidative stress. *Nutr J.* 2011 Dec;10(1):64.

29. Zhou L, Satoh K, Takahashi K, Watanabe S, Nakamura W, Maki J, et al. Re-evaluation of anti-inflammatory activity of mastic using activated macrophages. *Vivo Athens Greece*. 2009 Aug;23(4):583–9.
30. Santarsiero A, Onzo A, Pascale R, Acquavia MA, Coviello M, Convertini P, et al. Pistacia lentiscus Hydrosol: Untargeted Metabolomic Analysis and Anti-Inflammatory Activity Mediated by NF- $\kappa$ B and the Citrate Pathway. de Oliveira MR, editor. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Nov 1;2020:1–14.
31. Qiao J, Li A, Jin X, Wang J. Mastic alleviates allergic inflammation in asthmatic model mice by inhibiting recruitment of eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Jul;45(1):95–100.
32. Kaliora AC. Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13(5):748.
33. Kaliora AC, Stathopoulou MG, Triantafillidis JK, Dedoussis GV, Andrikopoulos NK. Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn's disease treated with mastic. *World J Gastroenterol*. 2007;13(45):6031.
34. Moulos P, Papadodima O, Chatziioannou A, Loutrari H, Roussos C, Kolis FN. A transcriptomic computational analysis of mastic oil-treated Lewis lung carcinomas reveals molecular mechanisms targeting tumor cell growth and survival. *BMC Med Genomics*. 2009 Dec;2(1):68.
35. He M-L, Yuan H-Q, Jiang A-L, Gong AY, Chen W-W, Zhang P-J, et al. Gum mastic inhibits the expression and function of the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer*. 2006 Jun 15;106(12):2547–55.
36. He M, Chen W, Zhang P, Jiang A, Fan W, Yuan H, et al. Gum mastic increases maspin expression in prostate cancer cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2007 Apr;28(4):567–72.
37. He M, Li A, Xu C, Wang S, Zhang M, Gu H, et al. Mechanisms of antiprostate cancer by gum mastic: NF- $\kappa$ B signal as target. *Acta Pharmacol Sin*. 2007 Mar;28(3):446–52.
38. Balan KV, Demetzos C, Prince J, Dimas K, Cladaras M, Han Z, et al. Induction of apoptosis in human colon cancer HCT116 cells treated with an extract of the plant product, Chios mastic gum. *Vivo Athens Greece*. 2005 Feb;19(1):93–102.
39. Huang X, Wang H, Yuan Z, Li A, He M, Ai K, et al. Gemcitabine combined with gum mastic causes potent growth inhibition and apoptosis of pancreatic cancer cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2010 Jun;31(6):741–5.
40. Sherwood L. *Introduction to human physiology*. 8. ed. s.l.: Brooks/Cole, Cengage Learning; 2012.
41. Chung S, Son GH, Kim K. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: Its regulation and clinical implications. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2011 May;1812(5):581–91.
42. Cain DW, Cidlowski JA. Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015 Aug;29(4):545–56.
43. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*. 1995 Dec;83(6):835–9.
44. Weikum ER, Knuesel MT, Ortlund EA, Yamamoto KR. Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017 Mar;18(3):159–74.

45. Gruver-Yates A, Cidlowski J. Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword. *Cells*. 2013 Mar 26;2(2):202–23.
46. Sulaiman RS, Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in the eye. *Steroids*. 2018 May;133:60–6.
47. Psarra A-MG, Sekeris CE. Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2008 Jan;1783(1):1–11.
48. Glucocorticoid Response Elements (GRE). In: *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2008 [cited 2021 Sep 10]. p. 803–803. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6754-9\\_6937](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6754-9_6937)
49. Scheller K, Seibel P, Sekerist CE. Glucocorticoid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. In: *International Review of Cytology* [Internet]. Elsevier; 2003 [cited 2021 Sep 10]. p. 1–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074769602220112>
50. Psarra A-MG, Sekeris CE. Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2011 Oct;1813(10):1814–21.
51. Ratman D, Vanden Berghe W, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM, et al. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering. *Mol Cell Endocrinol*. 2013 Nov;380(1–2):41–54.
52. Rose AJ, Herzig S. Metabolic control through glucocorticoid hormones: An update. *Mol Cell Endocrinol*. 2013 Nov;380(1–2):65–78.
53. Barnes PJ. Biochemical Basis of Asthma Therapy. *J Biol Chem*. 2011 Sep;286(38):32899–905.
54. Muñoz-Carrillo JL, Muñoz-López JL, Muñoz-Escobedo JJ, Maldonado-Tapia C, Gutiérrez-Coronado O, Contreras-Cordero JF, et al. Therapeutic Effects of Resiniferatoxin Related with Immunological Responses for Intestinal Inflammation in Trichinellosis. *Korean J Parasitol*. 2017 Dec 31;55(6):587–99.
55. Refojo D, Liberman A, Holsboer F, Arzt E. Transcription factor-mediated molecular mechanisms involved in the functional cross-talk between cytokines and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol*. 2001 Aug;79(4):385–94.
56. Γεώργιος Ν. Θωμόπουλος. ΕΙΔΙΚΑ ΘΕΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ - ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ [Internet]. 4th ed. Thessaloniki: University Studio Press; 2014. 874 p. Available from: <http://www.universitystudiopress.gr/general/bookTitle.asp?tblCode=2188-14>
57. Prenek L, Boldizsár F, Kugyelka R, Ugor E, Berta G, Németh P, et al. The regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by glucocorticoid receptor in collaboration with Bcl-2 family proteins in developing T cells. *Apoptosis*. 2017 Feb;22(2):239–53.
58. Ilmarinen P, Moilanen E, Kankaanranta H. Mitochondria in the Center of Human Eosinophil Apoptosis and Survival. *Int J Mol Sci*. 2014 Mar 5;15(3):3952–69.
59. Schlossmacher G, Stevens A, White A. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *J Endocrinol*. 2011 Oct;211(1):17–25.

60. Page CP, Barnes PJ. Pharmacology and therapeutics of asthma and COPD. Cham: Springer; 2017. (Handbook of experimental pharmacology).
61. Paragliola RM, Papi G, Pontecorvi A, Corsello SM. Treatment with Synthetic Glucocorticoids and the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis. *Int J Mol Sci*. 2017 Oct 20;18(10):2201.
62. Karra AG, Tziortziou M, Kylindri P, Georgatza D, Gorgogietas VA, Makiou A, et al. Boswellic acids and their derivatives as potent regulators of glucocorticoid receptor actions. *Arch Biochem Biophys*. 2020 Nov;695:108656.
63. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1711–23.
64. Georgatza D, Gorgogietas VA, Kylindri P, Charalambous MCh, Papadopoulou KK, Hayes JM, et al. The triterpene echinocystic acid and its 3-O-glucoside derivative are revealed as potent and selective glucocorticoid receptor agonists. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Oct;79:277–87.
65. Kotthoff P, Heine A, Held SAE, Brossart P. Dexamethasone induced inhibition of Dectin-1 activation of antigen presenting cells is mediated via STAT-3 and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Sci Rep*. 2017 Dec;7(1):4522.
66. Karra A, Konstantinou M, Tzortziou M, Tsialtas I, Kalousi F, Garagounis C, et al. Potential Dissociative Glucocorticoid Receptor Activity for Protopanaxadiol and Protopanaxatriol. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 27;20(1):94.
67. Breitmaier E. Terpenes [Internet]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006 [cited 2021 Sep 13]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527609949>
68. Jäger S, Trojan H, Kopp T, Laszczyk M, Scheffler A. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. *Molecules*. 2009 Jun 4;14(6):2016–31.
69. Ríos J-L. Effects of triterpenes on the immune system. *J Ethnopharmacol*. 2010 Mar;128(1):1–14.
70. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248–54.
71. van Raalte DH, Ouwens DM, Diamant M. Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options? *Eur J Clin Invest*. 2009 Feb;39(2):81–93.
72. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L. *Stryer Biochemie*. 8. Auflage. Berlin [Heidelberg]: Springer Spektrum; 2018. 1401 p. (Lehrbuch).
73. Yang J, Kalhan SC, Hanson RW. What Is the Metabolic Role of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase? *J Biol Chem*. 2009 Oct;284(40):27025–9.
74. Sundahl N, Bridelance J, Libert C, De Bosscher K, Beck IM. Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds. *Pharmacol Ther*. 2015 Aug;152:28–41.
75. Petta I, Dejager L, Ballegeer M, Lievens S, Tavernier J, De Bosscher K, et al. The Interactome of the Glucocorticoid Receptor and Its Influence on the Actions of Glucocorticoids in Combatting Inflammatory and Infectious Diseases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016 Jun;80(2):495–522.

76. Giaginis C, Theocharis S. Current Evidence on the Anticancer Potential of Chios Mastic Gum. *Nutr Cancer*. 2011 Nov;63(8):1174–84.
77. Loutrari H, Magkouta S, Papapetropoulos A, Roussos C. Mastic Oil Inhibits the Metastatic Phenotype of Mouse Lung Adenocarcinoma Cells. *Cancers*. 2011 Feb 23;3(1):789–801.
78. Sergeant CA, Africander D, Swart P, Swart AC. *Sutherlandia frutescens* modulates adrenal hormone biosynthesis, acts as a selective glucocorticoid receptor agonist (SEGRA) and displays anti-mineralocorticoid properties. *J Ethnopharmacol*. 2017 Apr;202:290–301.
79. Kang K-H, Lee K-H, Kim M-Y, Choi K-H. Caspase-3-mediated Cleavage of the NF- $\kappa$ B Subunit p65 at the NH2 Terminus Potentiates Naphthoquinone Analog-induced Apoptosis. *J Biol Chem*. 2001 Jan;276(27):24638–44.