

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΦΩΤΕΙΝΗ ΚΑΛΟΥΣΗ

Χαρακτηρισμός των βιολογικών δράσεων και των βιοχημικών μηχανισμών δράσης κλασμάτων από ρητίνη και φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* και η εμπλοκή τους στη σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών ορμονών



Λάρισα, 06/2023

«Χαρακτηρισμός των βιολογικών δράσεων και των βιοχημικών μηχανισμών δράσης κλασμάτων από ρητίνη και φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* και η εμπλοκή τους στη σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών ορμονών»

«Characterization of the biological actions and the biochemical mechanisms of functions of resin and leaves fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* and their interference with glucocorticoids signaling»

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

**Αννα-Μαρία Ψαρρά**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, επιβλέπουσα

**Δημήτριος Λεωνίδας**, Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέλος

**Καλλιόπη Παπαδοπούλου**, Καθηγήτρια Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέλος

### **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

**Αννα-Μαρία Ψαρρά**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, επιβλέπουσα

**Δημήτριος Λεωνίδας**, Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέλος

**Καλλιόπη Παπαδοπούλου**, Καθηγήτρια Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέλος

**Ευθυμία Κιτράκη**, Καθηγήτρια Οδοντιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, μέλος

**Δημήτριος Κουρέτας**, Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέλος

**Δήμητρα Μήτσιου**, Κύρια Ερευνήτρια Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, μέλος

**Δανιέλα Τσίκου**, Επίκουρος Καθηγήτρια Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέλος

## Φωτεινή Καλούση

«Χαρακτηρισμός των βιολογικών δράσεων και των βιοχημικών μηχανισμών δράσης κλασμάτων από ρητίνη και φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* και η εμπλοκή τους στη σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών ορμονών»

«Characterization of the biological actions and the biochemical mechanisms of functions of resin and leaves fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* and their interference with glucocorticoids signaling»

Φωτεινή Καλούση

2023

Χαρακτηρισμός των βιολογικών δράσεων και των βιοχημικών μηχανισμών δράσης κλασμάτων από ρητίνη και φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* και η εμπλοκή τους στη σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών ορμονών

Διδακτορική Διατριβή

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 7

Συνολικός αριθμός σελίδων: 170

Αριθμός πινάκων: 7

Αριθμός εικόνων: 47

Αριθμός παραρτημάτων: 17

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 257

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

### Δημοσιεύσεις διδακτορικής διατριβής

**Foteini D. Kalousi**, Federica Pollastro, Evgenia C. Christodoulou, Aikaterini G. Karra, Ioannis Tsialtas, Achilleas Georgantopoulos, Stefano Salamone and Anna-Maria G. Psarra, Apoptotic, Anti-Inflammatory Activities and Interference with the Glucocorticoid Receptor Signaling of Fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* Leaves, *Plants MDPI*, 2022; 11(7): 934

**Foteini D. Kalousi**, Federica Pollastro, Aikaterini G. Karra, Ioannis Tsialtas, Achilleas Georgantopoulos, Stefano Salamone and Anna-Maria G. Psarra, Regulation of energy metabolism and anti-inflammatory activities of Mastiha fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, *Foods MDPI*, 2023; 12: 1930

### Δημοσιεύσεις συναφών αντικειμένων

Aikaterini G. Karra, Maria Konstantinou, Maria Tzortziou, Ioannis Tsialtas, **Foteini D. Kalousi**, Constantine Garagounis, Joseph M. Hayes and Anna-Maria G. Psarra, Potential Dissociative Glucocorticoid Receptor Activity for Protopanaxadiol and Protopanaxatriol, *International Journal of Molecular Sciences MDPI*, 2018; 20(1): 94

Aikaterini G. Karra, Maria Tziortziou, Paraskevi Kyliandri, Dimitra Georgatza, Vyron A. Gorgogietas, Anthi Makiou, Afroditi Krokida, Ioannis Tsialtas, **Foteini D. Kalousi**, Georgios E. Papadopoulos, Kalliope K. Papadopoulou, Anna-Maria G. Psarra, Boswellic acids and their derivatives as potent regulators of glucocorticoid receptor actions, *Archives of Biochemistry and Biophysics ELSEVIER*, 2020; 695: 108656

Ioannis Tsialtas, Vyron A. Gorgogietas, Maria Michalopoulou, Aggeliki Komninou, Eleni Liakou, Achilleas Georgantopoulos, **Foteini D. Kalousi**, Aikaterini G. Karra, Evagelia Protopapa, Anna-Maria G. Psarra, Neurotoxic effects of aluminum are associated with its interference with estrogen receptors signaling, *Neurotoxicology ELSEVIER*, 2020; 77:114-126

Ioannis Tsialtas, Achilleas Georgantopoulos, Maria E. Karipidou, **Foteini D. Kalousi**, Aikaterini G. Karra, Demetrios D. Leonidas and Anna-Maria G. Psarra, Anti-Apoptotic and Antioxidant Activities of the Mitochondrial Estrogen Receptor Beta in N2A Neuroblastoma Cells, *International Journal of Molecular Sciences MDPI*, 2021; 22(14): 7620

Aikaterini G. Karra, Ioannis Tsialtas, **Foteini D. Kalousi**, Achilleas Georgantopoulos, Evangelia Sereti, Konstantinos Dimas and Anna-Maria G. Psarra, Increased Expression of the Mitochondrial Glucocorticoid Receptor Enhances Tumor Aggressiveness in a Mouse Xenograft Model, *International Journal of Molecular Sciences MDPI*, 2023; 24(4):3740

## *Ευχαριστίες*

Έχοντας ολοκληρώσει τη διδακτορική μου διατριβή, θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Άννα-Μαρία Ψαρρά, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ήδη από το 2015 που με ενέταξε στην ερευνητική της ομάδα ως προπτυχιακή φοιτήτρια. Ήταν ιδιαίτερη τιμή για μένα που με επέλεξε στη συνέχεια ως υποψήφια διδάκτορα το 2018 για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Την ευχαριστώ πολύ για όλη την καθοδήγηση και την βοήθεια που μου προσέφερε σε οποιοδήποτε πρόβλημα παρουσιαζόταν κατά την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας. Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Δημήτριο Λεωνίδα και την καθηγήτρια Καλλιόπη Παπαδοπούλου, για την επικοινωνία που είχαμε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής, όντας μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου. Ένα ακόμη ευχαριστώ στην ερευνητική ομάδα του Dr. Giovanni Appendino (Professor of Chemistry, Università del Piemonte Orientale, Faculty of Pharmacy, Novara (Italy)), και την Dr. Federica Pollastro (Associate Professor, Università del Piemonte Orientale, Faculty of Pharmacy, Novara (Italy)), για την κλασμάτωση και τον χημικό χαρακτηρισμό των φύλλων και της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια Ευθυμία Κιτράκη, τον καθηγητή Δημήτριο Κουρέτα, την κύρια ερευνήτρια Δήμητρα Μήτσιου καθώς και την επίκουρο καθηγήτρια Δανιέλα Τσίκου που δέχτηκαν να εξετάσουν την παρούσα διατριβή, ως λοιπά μέλη της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους διδάκτορες Βύρωνα Γοργογιέτα και Αικατερίνη Καρρά για την εκπαίδευση και την καθοδήγηση που προσέφεραν στα αρχικά μου βήματα στο χώρο του εργαστηρίου και στην εκμάθηση των πειραματικών διαδικασιών, καθώς και τον διδάκτορα Ιωάννη Τσιάλτα και υποψήφιο διδάκτορα Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο για την άψογη συνεργασία καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές Ιωάννη Γκαντούνα, Στέφανο Χριστοδούλου, Άντρια Θεοδόση, Ευγενία Χριστοδούλου, Ειρήνη Ράζγκελη και Σοφία Δημόθυρα για την σημαντική συμβολή τους στην ολοκλήρωση των πειραματικών διαδικασιών της παρούσας διατριβής. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη και υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την άψογη συνεργασία μας, και ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Διονύσιο Αντωνόπουλο για την ηθική και επιστημονική υποστήριξη που μου προσέφερε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ) για τη χορήγηση 34μηνιας υποτροφίας που μου προσέφερε στο πλαίσιο της 2<sup>ης</sup> προκήρυξης υποτροφιών για υποψήφιους διδάκτορες, καθώς και την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου και το Mastiha Shop που χρηματοδότησαν την διεξαγωγή των πειραμάτων στην παρούσα έρευνα.

Κλείνοντας, το μεγαλύτερο ευχαριστώ θα ήθελα να το πω στην οικογένεια μου, τους γονείς μου Δημήτρη και Ευαγγελία, την αδελφή μου Ευθυμία και τον σύντροφό μου Γιάννη για την ηθική και ψυχική στήριξη που μου προσέφεραν σε όλη τη μακροχρόνια διάρκεια των σπουδών μου.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	17
ABSTRACT .....	21
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	24
1.1. Η Μαστίχα Χίου .....	24
1.1.1. Από την αρχαιότητα έως σήμερα .....	24
1.1.2. Το Μαστιχόδεντρο Χίου.....	25
1.1.3. Η καλλιέργεια της Μαστίχας Χίου .....	26
1.2. Χημική σύσταση της ρητίνης και των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου .....	28
1.2.1. Χημική σύσταση της ρητίνης.....	28
1.2.2. Χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου της ρητίνης .....	28
1.2.3. Χημική σύσταση των φύλλων .....	29
1.3. Βιολογικές δράσεις της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου .....	30
1.3.1. Αντιμικροβιακές δράσεις.....	30
1.3.2. Αντιοξειδωτικές δράσεις.....	31
1.3.3. Αντιφλεγμονώδεις δράσεις .....	32
1.3.4. Καρδιοπροστατευτικές δράσεις.....	34
1.3.5. Αντι-υπερλιπιδαιμικές δράσεις της Μαστίχας Χίου .....	34
1.3.6. Υπογλυκαιμικές δράσεις.....	35
1.3.7. Ηπατο-προστατευτικές δράσεις .....	36
1.3.8. Αντι-πολλαπλασιαστικές και αντικαρκινικές δράσεις .....	36
1.4. Βιολογικές δράσεις των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου καθώς και άλλων ποικιλιών του <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	39
1.4.2. Αντιοξειδωτικές δράσεις.....	40
1.4.3. Αντιφλεγμονώδεις δράσεις .....	40
1.4.4. Αντι-διαβητικές δράσεις .....	41
1.4.5. Ηπατο-προστατευτικές δράσεις .....	41
1.4.6. Αντι-πολλαπλασιαστικές δράσεις.....	41
1.4.7. Νευροπροστατευτικές δράσεις .....	42
1.5. Γλυκοκορτικοειδή .....	42
1.5.1. Γενικά περί γλυκοκορτικοειδών.....	42
1.5.2. Σύνθεση γλυκοκορτικοειδών.....	43



1.5.3. Έκκριση γλυκοκορτικοειδών.....	43
1.5.4. Βιοδιαθεσιμότητα γλυκοκορτικοειδών.....	45
1.6. Υποδοχέας Γλυκοκορτικοειδών (GR).....	46
1.6.1. Ταξινόμηση του GR.....	46
1.6.2. Δομή του γονιδίου του GR.....	47
1.6.3. Ισομορφές του GR.....	47
1.6.4. Δομή της πρωτεΐνης του GR.....	49
1.6.5. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του GR.....	50
1.6.6. Ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR.....	52
1.6.7. Σηματοδότηση του GR.....	53
1.7. Φυσιολογικές δράσεις της σηματοδότησης του GR.....	56
1.7.1. Ο ρόλος της σηματοδότησης του GR στους διάφορους ιστούς.....	56
1.7.2. Μηχανισμοί επαγωγής γλυκονεογένεσης από τη σηματοδότηση του GR.....	57
1.7.3. Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της σηματοδότησης του GR.....	58
1.7.4. Μηχανισμοί αποπτωτικής/αντι-αποπτωτικής δράσης της σηματοδότησης του GR.....	60
1.8. Εμπλοκή του GR στη σηματοδότηση της AMPK.....	62
1.8.1. Δομή και ενεργοποίηση της AMPK.....	62
1.8.2. Επίδραση της AMPK στις κυτταρικές λειτουργίες.....	63
1.8.3. Διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ της σηματοδότησης της AMPK και του GR.....	63
1.9. Εμπλοκή του GR στη σηματοδότηση των υποδοχέων PPAR.....	64
1.9.1. Λειτουργία των υποδοχέων PPAR.....	64
1.9.2. Διασταύρωση της σηματοδότησης των υποδοχέων PPARα και του GR.....	65
1.10. Συνθετικά και φυτικής προέλευσης γλυκοκορτικοειδή.....	66
1.10.1. Παρενέργειες συνθετικών γλυκοκορτικοειδών.....	66
1.10.2. Επιλεκτικοί αγωνιστές και ρυθμιστές του GR.....	67
1.10.3. Φυτικής προέλευσης γλυκοκορτικοειδή.....	68
1.11. Σκοπός.....	70
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	71
2.1. Οργανολογία.....	71
2.2. Χημικά/Αντιδραστήρια.....	72
2.3. Αναλώσιμα υλικά.....	74

2.4. Κυτταρικές σειρές .....	74
2.5. Πλασμιδιακοί φορείς.....	75
2.6. Αντισώματα.....	75
2.6.1. Πρωτογενή αντισώματα.....	75
2.6.2. Δευτερογενή αντισώματα.....	75
2.7. Διαλύματα .....	76
2.8. Κλάσματα φύλλων και ρητίνης από το Μαστιχόδεντρο Χίου.....	79
2.8.1. Κλασμάτωση των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου .....	79
2.8.2. Χημικός χαρακτηρισμός των μη πολικών, ημι-πολικών και πολικών κλασμάτων από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου.....	80
2.8.3. Κλασμάτωση της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου.....	80
2.8.4. Χημικός χαρακτηρισμός του μη πολικού, ημι-πολικού και πολικού κλάσματος της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου .....	81
2.8.4. Υποκλασμάτωση του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου.....	82
2.8.5. Χημικός χαρακτηρισμός των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου .....	82
2.9. Καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων .....	83
2.10. Δημιουργία απενεργοποιημένου εμβρυϊκού βόειου ορού .....	83
2.11. Καλλιέργεια και μετασχηματισμός βακτηρίων .....	83
2.11.1. Δημιουργία δεκτικών για μετασχηματισμό βακτηρίων .....	83
2.11.2. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων.....	84
2.11.3. Ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας βακτηρίων .....	84
2.11.4. Απομόνωση πλασμιδίου από υγρή καλλιέργεια βακτηρίων .....	85
2.12. Συλλογή και λύση κυττάρων με τη χρήση υπερήχων για SDS-PAGE .....	85
2.13. Προσδιορισμός ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου με τη μέθοδο Bradford .....	85
2.14. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western .....	86
2.14.1. SDS-PAGE και αποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	86
2.14.2. Εμφάνιση σήματος .....	86
2.15. Δοκιμή λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης.....	87
2.15.1. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς.....	87
2.15.2. Συλλογή κυττάρων .....	87

2.15.3. Μέτρηση λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης.....	87
2.16. Μέτρηση κυτταρικής βιωσιμότητας με τη δοκιμασία MTT.....	88
2.17. Real-time PCR.....	89
2.17.1. Απομόνωση ολικού RNA από κυτταρικό εκχύλισμα.....	89
2.17.2. Σύνθεση cDNA από ολικό RNA.....	89
2.17.3. Συνθήκες αντίδρασης.....	90
2.18. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	90
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>91</b>
3.1. Αξιολόγηση βιολογικών δράσεων κλασμάτων από τα φύλλα του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> .....	91
3.1.1. Χαρακτηρισμός της χημικής σύστασης των κλασμάτων από τα φύλλα του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> της Νότιας και Βόρειας Χίου.....	91
3.1.2. Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από τα φύλλα του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> στη βιωσιμότητα των κυττάρων HEK293.....	94
3.1.3. Καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών από τα κλάσματα των φύλλων του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> .....	96
3.1.4. Αναστολή της επαγόμενης από τα κλάσματα των φύλλων του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, παρουσία του αναστολέα του πρωτεασώματος MG-132.....	100
3.1.5. Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από τα φύλλα του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> στην σηματοδότηση της AMPK.....	102
3.1.6. Καταστολή της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB από τα κλάσματα των φύλλων του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> .....	104
3.1.7. Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από τα φύλλα του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> στους αποπτωτικούς μηχανισμούς.....	107
3.2. Αξιολόγηση βιολογικών δράσεων κλασμάτων από τη ρητίνη του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> .....	109
3.2.1. Χημικός χαρακτηρισμός των κλασμάτων από τη ρητίνη του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> .....	109
3.2.2. Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από τη ρητίνη του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> στη βιωσιμότητα κυττάρων HEK293.....	114
3.2.3. Καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τα κλάσματα της ρητίνης του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> .....	115
3.2.4. Καταστολή της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB από το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα της ρητίνης του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> .....	120
3.2.5. Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από τη ρητίνη του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> στους αποπτωτικούς μηχανισμούς.....	122

3.3. Αξιολόγηση βιολογικών δράσεων του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> .....	124
3.3.1. Χημικός χαρακτηρισμός των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> .....	124
3.3.2. Διερεύνηση της επίδρασης των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> στη βιωσιμότητα κυττάρων HEK293 .....	128
3.3.3. Καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τα υποκλάσματα του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του Μαστιχόδεντρου Χίου.....	129
3.3.4. Καταστολή της επαγόμενης από τον TNF $\alpha$ μεταγραφικής δραστηριότητας του NF- $\kappa$ B από τα υποκλάσματα του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> .....	133
3.3.5. Διερεύνηση της επίδρασης των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> στους αποπτωτικούς μηχανισμούς.....	135
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>137</b>
4.1. Συμπεράσματα βιολογικών δράσεων των κλασμάτων από τα φύλλα του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> .....	137
4.2. Συμπεράσματα βιολογικών δράσεων των κλασμάτων από τη ρητίνη του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> .....	143
4.3. Συμπεράσματα βιολογικών δράσεων των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του <i>Pistacia lentiscus</i> L. var. <i>chia</i> .....	150
<b>BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>154</b>
<b>ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ .....</b>	<b>170</b>

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

**ACTH**, Adenocorticotropin Hormone, ορμόνη αδενοκορτικοτροπίνη

**ADP**, Adenosine Diphosphate, διφωσφορική αδενοσίνη

**AF**, Activation Function, λειτουργία ενεργοποίησης της μεταγραφής

**ALP**, Alkaline phosphatase, αλκαλική φωσφατάση

**ALT**, Alanine Aminotransferase, αμινοτρασφεράση της αλανίνης

**AMPK**, 5' AMP-activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από την 5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη

**AP-1**, Activator Protein 1, ενεργοποιός πρωτεΐνη-1

**ApoA-1**, Apolipoprotein A-1, απολιποπρωτεΐνη A-1

**ApoB**, Apolipoprotein B, απολιποπρωτεΐνη B

**AR**, Androgen Receptor, υποδοχέας ανδρογόνων

**AST**, Aspartate Transaminase, τρανσαμινάση του ασπαραγινικού ή ασπαραγινική τρανσαμινάση

**ATP**, Adenosine Triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη

**BAECs**, Bovine Aortic Endothelial Cells, ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής βοοειδών

**BSA**, Bovine Serum Albumin, αλβουμίνη βόειου ορού

**CAMKK2**, calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase 2, κινάση της πρωτεϊνικής κινάσης 2 που εξαρτάται από ασβέστιο/καλμοδουλίνη

**CBG**, Corticosteroid Binding Globulin, σφαιρίνη που συνδέεται στα κορτικοστεροειδή

**COX**, Cyclooxygenase, κυκλοοξυγενάση

**CREA**, Creatine, κρεατινίνη

**CRH**, Corticotropin Release Hormone, ορμόνη απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης

**CRH-R1**, CRH Receptor type 1, υποδοχέας της CRH τύπου 1

**CRP**, C-Reactive Protein, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη

**DBD**, DNA-binding domain, επικράτεια σύνδεσης στο DNA

**DEX**, Dexamethasone, δεξαμεθαζόνη

**EFSA**, European Food Safety Authority, ευρωπαϊκή αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων

**EMA**, European Medicines Agency, ευρωπαϊκός οργανισμός φαρμάκων

**eNOS**, endothelial Nitric Oxide synthetase, συνθετάση του ενδοθηλιακού νιτρικού οξειδίου

**ERK1/2**, Extracellular Signal-Regulated Kinase, κινάση που ρυθμίζεται από εξωκυττάρια σήματα 1/2

**gamma GT**, gamma Glutamyl-Transpeptidase, γ γλουταμυλο-τρανσπεπτιδάση

**GCs**, Glucocorticoids, γλυκοκορτικοειδή

**GCNF**, Germ Cell Nuclear Factor, πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στους ορφανούς υποδοχείς

**GILZ**, Glucocorticoid-Inducible Leucine Zipper, φερμουάρ λευκίνης που επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή

**GLUT**, Glucose Transporters, μεταφορέας γλυκόζης

**G6Pase**, Glucose 6-Phosphatase, φωσφατάση της 6-γλυκόζης

**G6PC**, Glucose-6-Phosphatase Catalytic subunit, καταλυτική υπομονάδα της φωσφατάσης της 6-γλυκόζης

**GPCR**, G Protein-Coupled Receptor, υποδοχέας που συνδέεται με G πρωτεΐνες

**GR**, Glucocorticoid Receptor, υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών

**GREs**, Glucocorticoid Response Elements, στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή

**GSH**, Glutathione, γλουταθειόνη

**HAECs**, Human Aortic Endothelial Cells, ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής

**HDAC**, Histone Deacetylase, αποακετυλάση των ιστονών

**HDL**, High-Density Lipoprotein, λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας

**HPA axis**, Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis, άξονας υποθαλάμου – υπόφυσης -επινεφριδίων

**HP-NAP**, Helicobacter Pylori Neutrophil-Activating Protein, πρωτεΐνη του ελικοβακτηρίου του πυλωρού που ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα

**HUVECs**, Human Umbilical Vein Endothelial Cells, ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας

**HSP**, Heat Shock Protein, πρωτεΐνη θερμικού σοκ

**IBD**, Inflammatory Bowel Disease, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου

**ICAM**, Intercellular Adhesion Molecule, πρωτεΐνη διακυτταρικής προσκόλλησης

**IL**, Interleukin, ιντερλευκίνη

**HSD**, Hydroxysteroid-Dehydrogenase, αφυδρογονάση των υδροξυστεροειδών

**LBD**, Ligand-binding domain, επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη

**LDL**, Low-Density Lipoprotein, λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας

**LLC**, Lewis Lung Carcinoma, καρκίνωμα πνεύμονα Lewis

**Lpa**, Lipoprotein a, λιποπρωτεΐνη a

**LPS**, Lipopolysaccharides, λιποπολυσακχαρίδιο

**LKB1**, Liver Kinase B1, ηπατική κινάση B1

**LRH-1**, Liver Receptor Homolog 1, πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας

**MAPK**, Mitogen-Activated Protein Kinase, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα

**MCP**, Monocyte Chemoattractant Protein, χημειοπροσελκυστική πρωτεΐνης των μονοκυττάρων

**MIP-2**, Macrophage Inflammatory Protein, πρωτεΐνη φλεγμονής μακροφάγων 2

**MKP**, MAPK phosphatase, φωσφατάση της MAPK

**MVECs**, Microvascular Endothelial Cells, μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα

**NADH**, Nicotinamide Adenine Dinucleotide, νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο

**NADPH**, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο

**NAFLD**, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, μη αλκοολική νόσος του λιπώδους ήπατος

**NF-κB**, Nuclear Factor-κB, πυρηνικός παράγοντας - κB

**NGF-1B**, Nerve Growth Factor 1B, πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στους ορφανούς υποδοχείς

**NLS**, Nuclear localization signal, σήμα πυρηνικού εντοπισμού

**NOR-1**, Neuron-Derived Orphan Receptor 1, πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στους ορφανούς υποδοχείς

**NOS**, Nitric Oxide Synthase, συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου

**NTD**, N-terminal domain, αμινοτελική επικράτεια

**NURR1**, Nurr-Related Factor 1, πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στους ορφανούς υποδοχείς

**Ox-LDL**, Oxidized Low-Density Lipoprotein, οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας

**OXPHOS**, Oxidative Phosphorylation, οξειδωτική φωσφορυλίωση

**PARP**, Poly-ADP- Ribose Polymerase, πολυμεράση της πολύ-ADP-ριβόζης

**PBMCs**, Peripheral Blood Mononuclear Cells, περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα αίματος

**PDH**, Pyruvate Dehydrogenase, αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού

**PDK4**, Pyruvate Dehydrogenase Kinase, κινάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού 4

**PEPCK**, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού

**PFKFB3**, 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase, 6-φωσφοφρουκτο-2-κινάση/φρουκτόζη-2,6-διφωσφατάση

**PGE2**, Prostaglandin E2, προσταγλαδίνη E2

**PI3K**, Phosphoinositide 3-Kinase, κινάση της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης

**PKC**, Protein Kinase C, πρωτεϊνική κινάση C

**PLD1**, Phospholipase D1, φωσφολιπάση D1

**POMC**, Pro-Opiomelanocortin, προ-οπιομελανοκορτίνη

**PPAR**, Peroxisome Proliferator - Activated Receptor, μεταγραφικός παράγοντας που αποτελεί υποδοχέα που ενεργοποιείται από παράγοντες που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων

**PSA**, Prostate-Specific Antigen, αντιγόνο του καρκίνου του προστάτη

**RASMCs**, Rat Aortic Smooth Muscles Cells, λεία μυϊκά κύτταρα αορτής αρουραίου

**SEGRAs**, Selective Glucocorticoid Receptor Agonists, επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

**SEGRMs**, Selective Glucocorticoid Receptor Modulators, επιλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

**SGOT**, Serum Glutamic-Oxaloacetic Transaminase, γλουταμική-οξαλοοξική τρανσαμινάση του ορού

**SGPT**, Serum Glutamic Pyruvic Transaminase, γλουταμική πυροσταφυλική τρανσαμινάση ορού

**STAT**, Signal Transducer and Activator of Transcription, μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής

**STZ**, Streptozotocin, στρεπτοζοκίνη

**SUMO**, Small ubiquitin-related modifier, πρωτεΐνη τροποποιητής της οικογένειας της ουβικουΐνης

**TAT**, Tyrosine Aminotransferase, αμινοτρανσφεράση της τυροσίνης

**TFAM**, Mitochondrial Transcription Factor A, μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A

**TFB1M**, Mitochondrial Transcription Factor B1, μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας B1

**TFIID**, Transcription Factor IID, μεταγραφικός παράγοντας IID

**TLR**, Toll-like receptor, υποδοχέας Toll-like

**TNF $\alpha$** , Tumor Necrosis Factor alpha, παράγοντας νέκρωσης όγκου άλφα

**TTP**, Tristetraprolin, τριστετραπρολίνη

**UTR**, Untranslated Region, αμετάφραστη περιοχή

**VCAM-1**, Vascular Cell Adhesion Molecule-1, πρωτεΐνη αγγειακής κυτταρικής προσκόλλησης 1

**VEGF**, Vascular Endothelial Growth Factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

**VLDL**, Very-Low Density Lipoprotein, λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας

**ΠΟΠ**, Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Μαστίχα Χίου αποτελεί τη ρητινώδη έκκριση του φυτού *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* (Μαστιχόδεντρο Χίου). Το Μαστιχόδεντρο Χίου αποτελεί ελληνικό ενδημικό φυτό, το οποίο καλλιεργείται αποκλειστικά στο νότιο τμήμα της Χίου, σε περιοχές που είναι γνωστές ως Μαστιχοχώρια. Η καλλιέργειά του διαρκεί όλο το χρόνο, με την έκκριση και συλλογή της Μαστίχας να λαμβάνει χώρα τους φθινοπωρινούς μήνες. Η χρήση της Μαστίχας ως παραδοσιακό θεραπευτικό προϊόν ξεκινάει από την αρχαιότητα και μετράει πάνω από 2500 χιλιάδες χρόνια. Σήμερα, η Μαστίχα Χίου χρησιμοποιείται ευρέως ως πρόσθετο τροφίμων και ποτών, ενώ έχει πολλές εφαρμογές στην κοσμητολογία και στην οδοντιατρική. Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες επιστημονικές μελέτες έχουν αναδείξει τις ευεργετικές βιολογικές δράσεις της Μαστίχας Χίου. Πειραματικά δεδομένα έχουν αποκαλύψει τις αντι-μικροβιακές, αντι-φλεγμονώδεις, αντι-οξειδωτικές, υπογλυκαιμικές, υπολιπιδαιμικές, αντι-πολλαπλασιαστικές και αντικαρκινικές δράσεις της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου. Ταυτόχρονα, αρκετές μελέτες έχουν εστιάσει στην ανάλυση της χημικής σύστασης του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου, αναφέροντας ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της ακατέργαστης ρητίνης καταλαμβάνουν τα τριτερπένια (60-70%), ενώ το υπόλοιπο 25-30% καταλαμβάνει το κολλώδες πολυμερές 1,4-poly-β-μυρσένιο.

Τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή, όπως η κορτιζόλη, αποτελούν στεροειδείς ορμόνες απαραίτητες για θεμελιώδεις λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού, όπως ο μεταβολισμός, η αύξηση, η ανάπτυξη και η νοητική λειτουργία. Ασκούν τις δράσεις τους αφού συνδεθούν στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Ο GR απουσία προσδέτη/ορμόνης βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, σε ανενεργή κατάσταση. Μετά τη σύνδεση του προσδέτη/ορμόνης, ο GR αλλάζει στερεοδιαμόρφωση και μετατοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου. Εντός του πυρήνα, ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση είτε μέσω άμεσης σύνδεσης στο DNA, είτε μέσω έμμεσης σύνδεσης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, γεγονός που είτε επάγει είτε καταστέλλει την έκφραση διαφόρων γονιδίων στόχων. Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή, όπως η δεξαμεθαζόνη (DEX), αποτελούν τα πιο συχνά συνταγογραφούμενα φάρμακα λόγω των ισχυρών αντι-φλεγμονωδών και ανοσοκατασταλτικών τους δράσεων. Ωστόσο, η υψηλή δοσολογία ή η μακροχρόνια λήψη μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές παρενέργειες, όπως υπεργλυκαιμία, ανάπτυξη διαβήτη, οστεοπόρωση, μυϊκή ατροφία, γλαύκωμα και υπέρταση. Οι παρενέργειες αυτές οφείλονται ως επί το πλείστον στην ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, ενώ οι επιθυμητές αντιφλεγμονώδεις δράσεις οφείλονται στην καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας που προκαλεί το σύμπλοκο GR/ορμόνης.

Τα τριτερπένια, που έχουν εντοπιστεί ως η κυρίαρχη ομάδα συστατικών της Μαστίχας Χίου, έχουν μελετηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια ως εν δυνάμει επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, αφού έχει δειχθεί ότι επάγουν τις επιθυμητές αντι-φλεγμονώδεις δράσεις της σηματοδότησης του GR και ταυτόχρονα καταστέλλουν τη σηματοδότηση που οδηγεί στις ανεπιθύμητες παρενέργειες. Σε αυτό το πλαίσιο, στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής κατέστη η αξιολόγηση των βιολογικών δράσεων, και συγκεκριμένα των αντι-πολλαπλασιαστικών, αποπτωτικών και αντι-φλεγμονωδών δράσεων κλασμάτων από τα φύλλα και τη ρητίνη του Μαστιχόδεντρου Χίου, του χαρακτηρισμού των βιοχημικών μηχανισμών επιτέλεσης των δράσεων αυτών και της διερεύνησης των βιοδραστικών συστατικών, υπεύθυνων για αυτές τις δράσεις. Λόγω του εμπλουτισμού του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου δόθηκε

έμφαση στη διερεύνηση της εμπλοκής των κλασμάτων στη σηματοδότηση του GR. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν 3 αυξανόμενης πολικότητας κλάσματα (μη πολικό, ημι-πολικό, πολικό) από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου, 3 αυξανόμενης πολικότητας κλάσματα (μη πολικό, ημι-πολικό, πολικό) από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου, καθώς και 3 αυξανόμενης πολικότητας κλάσματα (μη πολικό, ημι-πολικό, πολικό) από τη ρητίνη του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου. Τέλος, εξετάστηκαν 8 υποκλάσματα (1, 2A, 2B, 3A, 3B, 3Γ, 4A, 5A) από το ουδέτερο κλάσμα της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου. Οι μελέτες των βιολογικών δράσεων πραγματοποιήθηκαν στην ανθρώπινη εμβρυϊκή νεφρική κυτταρική σειρά HEK293, η οποία εκφράζει ενδογενώς τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

Η φυτοχημική ανάλυση, σε συνεργασία με τους Prof. Giovanni Appendino και Associate Prof. Federica Pollastro, (Department of Pharmaceutical Sciences, University of Piemonte Orientale, Novara, Italy), έδειξε ότι το μη πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου αποτελείται από τριγλυκερίδια λιπαρών οξέων και ίχνη τριτερπενοειδών, ενώ το ημι-πολικό κλάσμα αποτελείται από τα τριτερπένια λουπεόλη και α-αμυρενόνη. Στο πολικό κλάσμα εντοπίστηκαν φαινολικές ενώσεις και ίχνη τριτερπενοειδών. Το μη πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου αποτελείται, ομοίως, από τριγλυκερίδια λιπαρών οξέων και ίχνη τριτερπενοειδών, ενώ το μη πολικό κλάσμα αποτελείται από τα τριτερπένια λουπεόλη και β-σιτοστερόλη. Στο πολικό κλάσμα εντοπίστηκαν, ομοίως, φαινολικές ενώσεις και ίχνη τριτερπενοειδών. Στο μη πολικό κλάσμα της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου (Μαστίχας Χίου) εντοπίστηκε το πολυμερές 1,4-poly-β-μυρσένιο, καθώς και τα τριτερπένια keto-ολεανολική αλδεΰδη και ολεανολική αλδεΰδη. Στο ημι-πολικό κλάσμα της Μαστίχας Χίου βρέθηκαν μόνο τα τριτερπένια λουπεόλη, ολεανολική αλδεΰδη, μεθυλεστέρας του 24Z-μαστιχαδιενονικού οξέος και μεθυλεστέρας του 24Z-ισομαστιχαδιενονικού οξέος. Τέλος, στο πολικό κλάσμα της Μαστίχας Χίου εντοπίστηκαν φαινολικά συστατικά, ενώ απουσίαζαν τα τριτερπένια. Όσο αφορά τα υποκλάσματα που προήλθαν από το ουδέτερο κλάσμα της Μαστίχας Χίου, το κλάσμα 1 βρέθηκε ότι περιέχει το πολυμερές 1,4-poly-β-μυρσένιο και σε μικρότερη ποσότητα keto-ολεανολική αλδεΰδη. Το τριτερπένιο keto-ολεανολική αλδεΰδη ήταν το κυρίαρχο στο υποκλάσμα 2A, ενώ στο υποκλάσμα 2B ταυτοποιήθηκε η β-αμυρίνη. Στο υποκλάσμα 3A εντοπίστηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα η λουπεόλη, το οποίο ταυτοποιήθηκε και στο υποκλάσμα 3B. Το τριτερπένιο λουπεόλη εντοπίστηκε και στο υποκλάσμα 3Γ, αλλά σε μικρότερη ποσότητα από την keto-ολεανολική αλδεΰδη, που ήταν η κυρίαρχη. Στο υποκλάσμα 4A βρέθηκε ένα μείγμα τριτερπενίων και άλλων αλειφατικών ενώσεων και τέλος, το υποκλάσμα 5A περιείχε λουπεόλη, αλλά το πιο άφθονο τριτερπένιο σε αυτό ήταν η β-αμυρίνη.

Στην παρούσα μελέτη, τα ημι-πολικά και πολικά κλάσματα των φύλλων και της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου, καθώς και των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου προκάλεσαν δόσο-εξαρτώμενη καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR. Η καταστολή αυτή συνοδεύτηκε και από μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, καθώς και των πρωτεϊνικών επιπέδων μορίων στόχων του, όπως της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυρισταφυλικό (PEPCK), της συνθετάσης της γλουταμίνης (GS), καθώς και του υποδοχέα άλφα που ενεργοποιείται από παράγοντες που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων (PPARα), ασκώντας αντι-υπεργλυκαιμική και ρυθμιστική δράση στο μεταβολισμό των λιπιδίων, αντίστοιχα. Το ημι-πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου ήταν περισσότερο δραστικό όσο αφορά την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR και τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων

της PEPCK, συγκριτικά με το αντίστοιχο του Μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου. Η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR από τα ημι-πολικά και πολικά κλάσματα των φύλλων βρέθηκε ότι επιτελείται μέσω ενεργοποίησης του πρωτεολυτικού μηχανισμού του πρωτεασώματος. Τα μη πολικά κλάσματα των φύλλων και της ρητίνης δεν παρουσίασαν αξιόλογη επίδραση στη σηματοδότηση του GR, πιθανόν και λόγω της δυσκολίας του χειρισμού τους εξαιτίας της χαμηλής διαλυτότητάς του σε διαλύτες συμβατούς με την καλλιέργεια των κυττάρων HEK293, λόγω του εμπλουτισμού τους, όσο αφορά τη ρητίνη, στο πολυμερές 1,4-poly-β-μυρσένιο, το οποίο παρεμποδίζει/καλύπτει την εκδήλωση των βιολογικών δράσεων των υπόλοιπων συστατικών. Παράλληλα, το κλάσμα 1, καθώς και τα υποκλάσματα 2B, 3B και 5A από το ουδέτερο κλάσμα της Μαστίχας Χίου προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, αλλά σε μικρότερο βαθμό από ότι τα ημι-πολικά και πολικά κλάσματα των φύλλων και της ρητίνης. Η μείωση αυτή δε συνοδεύτηκε από μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR και της PEPCK, γεγονός που υποδηλώνει απόδοση αυτής της δράσης αποκλειστικά σε εμπλοκή των κλασμάτων στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR και όχι στα επίπεδα έκφρασής του. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η καταστολή της επαγόμενης από τη δεξαμεθαζόνη μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τα ουδέτερα υποκλάσματα συνοδεύτηκε επίσης και από μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα, υποδηλώνοντας πιθανή ρυθμιστική δράση των υποκλασμάτων στο μεταβολισμό των λιπιδίων.

Παράλληλα, τα ημι-πολικά και πολικά κλάσματα των φύλλων και της ρητίνης εξετάστηκαν και ως προς την εμπλοκή τους στη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού. Η AMPK αποτελεί ρυθμιστή του ενεργειακού ισοζυγίου του κυττάρου, ανιχνεύοντας μεταβολές των επιπέδων της ATP και αποκαθιστώντας τα επίπεδά του. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα ημι-πολικά και πολικά κλάσματα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου οδήγησαν σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κινάσης που ενεργοποιείται από την AMP (AMPK), συνοδευόμενη από μείωση και της φωσφορυλιωμένης μορφής αυτής στην υπομονάδα άλφα (pAMPKα). Από τις συγκριτικές μελέτες, φάνηκε ότι το ημι-πολικό κλάσμα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου ήταν περισσότερο δραστικό από το αντίστοιχο των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου. Αντίθετα, το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα από τη ρητίνη του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου αύξησε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης AMPKα, χωρίς να προκαλεί αλλαγές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της μη φωσφορυλιωμένης μορφής, υποδηλώνοντας την επαγόμενη από τα κλάσματα ενεργοποίηση των καταβολικών έναντι των αναβολικών δράσεων.

Ακόμη, στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνήθηκαν οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των κλασμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ημι-πολικά και πολικά κλάσματα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου προκάλεσαν δόσο-εξαρτώμενη καταστολή της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ, η οποία οφείλεται αποκλειστικά στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του παράγοντα φλεγμονής, δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκαν παράλληλα μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κΒ. Το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα από το Μαστιχόδεντρο της Νότιας Χίου, ήταν περισσότερο δραστικά συγκριτικά με τα αντίστοιχα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου. Τα μη πολικά κλάσματα των φύλλων μείωσαν την μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κΒ, αλλά σε μικρότερο βαθμό. Το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκάλεσαν μείωση τόσο της

μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB, όσο και των πρωτεϊνικών επιπέδων της υπομονάδας p65, ενώ το μη πολικό κλάσμα δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντικές μεταβολές. Παράλληλα, τα ουδέτερα υποκλάσματα προκάλεσαν επίσης δοσο-εξαρτώμενη μείωση τόσο της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB, όσο και των πρωτεϊνικών επιπέδων της υπομονάδας p65, ασκώντας αντι-φλεγμονώδη δράση, με το υποκλάσμα 5A να είναι το πιο δραστικό.

Τέλος, στην συγκεκριμένη μελέτη, διερευνήθηκε η επίδραση των κλασμάτων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HEK293 και τους μηχανισμούς της απόπτωσης. Πιο συγκεκριμένα, τα μη πολικά, ημι-πολικά και πολικά κλάσματα των φύλλων και της ρητίνης μείωσαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων HEK293, με δοσο-εξαρτώμενο και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Τα κλάσματα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου ήταν περισσότερο κυτταροτοξικά από τα αντίστοιχα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου. Επίσης, το ημι-πολικό κλάσμα της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου ήταν το περισσότερο κυτταροτοξικό, σε σχέση με το μη πολικό και πολικό κλάσμα, υποδηλώνοντας αποπτωτικές δράσεις των συστατικών αυτού, συμπεριλαμβανομένων της λουπεόλης, του μεθυλεστέρα του 24Z-μαστιχαδιενονικού οξέος και του μεθυλεστέρα του 24Z-ισομαστιχαδιενονικού οξέος. Όσο αφορά τα ουδέτερα υποκλάσματα της ρητίνης, μόνο τα 2A, 2B, 3A, 3B και 5A προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας με το υποκλάσμα 5A να είναι το περισσότερο κυτταροτοξικό. Παράλληλα, τα ημι-πολικά και πολικά κλάσματα των φύλλων και της ρητίνης προκάλεσαν επαγωγή της απόπτωσης στα κύτταρα HEK293. Συγκεκριμένα, μείωσαν με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3, προκασπάσης-9 και bcl-2. Η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9 υποδηλώνει ότι η επαγόμενη απόπτωση διαμεσολαβείται από το μιτοχondριακό μονοπάτι. Ομοίως, τα ουδέτερα υποκλάσματα της ρητίνης οδήγησαν σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3 και bcl-2, χωρίς όμως να προκαλούν μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9, υποδεικνύοντας την επαγωγή απόπτωσης με μηχανισμό που δεν εξαρτάται από τα μιτοχόνδρια. Εξαίρεση αποτέλεσε το ουδέτερο υποκλάσμα 5A, το οποίο προκάλεσε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9.

## ABSTRACT

Chios Mastiha constitutes a resin secreted from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* (Chios Mastiha tree). *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, an endemic plant, is cultivated exclusively in the Northern part of Chios Greek island. Its cultivation last throughout the year with the Mastiha's secretion and collection taking place in the autumn. Chios Mastiha is being used as traditional medicinal product over 2500 years, even since ancient time. Nowadays, *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* resin is widely used as food and beverages additive, with applications in cosmetology and dentistry as well. Interestingly, recent years many scientific studies have revealed Chios Mastiha biological properties, such as antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, hypoglycemic, hypolipidemic, antiproliferative and anticancer properties. The above biological activities have been attributed to Chios Mastiha chemical composition, in which the major group are triterpenes (60-70%), while the rest 40-30% is occupied by the sticky polymer 1,4-poly- $\beta$ -myrcene.

The steroid hormones glucocorticoids play fundamental role in basic functions of the human body, such as metabolism, development, growth and cognition. They exert their actions after binding to glucocorticoid receptor (GR). In the absence of hormone GR resides in the cytoplasm in its inactive state. After hormone binding, GR changes stereo-conformation and translocates to the nucleus. Within the nucleus, GR regulates gene expression after direct or indirect binding with DNA, inducing or repressing expression of its target gene. Synthetic glucocorticoids, such as dexamethasone, are the most common prescribed medication due to their immunosuppressive and anti-inflammatory effects. However, long-term or high doses of them cause severe side effects, such as hyperglycemia and diabetes, osteoporosis and muscle atrophy, glaucoma and hypertension. The above side effects are attributed to GR transcriptional activation, while beneficial anti-inflammatory actions caused by suppression of GR transcriptional activation.

Recently, triterpenes, which have been identified as the major chemical group in Chios Mastiha extract, have been studied as potential selective glucocorticoid receptor agonists, inducing its beneficial anti-inflammatory actions, while minimizing its harmful effects. In this context, the purpose of this research was to evaluate the biological actions and their biochemical mechanisms of actions, and specifically the anti-proliferative, the anti-inflammatory, anti-hyperglycemic actions of different polarity fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* resin and leaves. Due to Chios Mastiha enrichment with triterpenes, emphasis was given on fractions interference with glucocorticoid receptor signaling. Specifically, three different polarity fractions of *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* leaves cultivating in the South Chios and *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* leaves growing in the Northern part but without secreting Mastiha, were examined. Moreover, three different polarity fractions of Chios Mastiha and eight subfractions (F1, SF2A, SF2B, SF3A, SF3B, SF3C, SF4A, SF5A) from neutral fraction of Chios Mastiha were also evaluated. Biological assays were performed in the human embryonic kidney cell line HEK293, which overexpresses endogenously the glucocorticoid receptor.

Phytochemical analysis of *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* leaves and resin was conducted by Prof. Giovanni Appendino and Associate Prof. Federica Pollastro (Department of Pharmaceutical Sciences, University of Piemonte Orientale, Novara, Italy). These results showed that apolar fraction from Southern tree consists of fatty acid triglycerides and traces of triterpenoids, while in the medium-polar fraction the triterpenes lupeol and  $\alpha$ -amyrenone were identified. In polar fraction from Southern tree phenolic compounds and traces of triterpenoids were detected.

Similarly, apolar fraction from Northern tree consists of fatty acid triglycerides and traces of triterpenoids, while in medium-polar fraction the triterpenes lupeol and  $\beta$ -sitosterol were found. In polar fraction from Northern tree phenolic compounds and traces of triterpenoids were detected, as well. Apolar fraction from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* resin was rich in the sticky polymer 1,4-poly- $\beta$ -myrcene, and the triterpenes keto-oleanolic aldehyde and oleanolic aldehyde, too. In medium-polar fraction of Chios Mastiha the triterpenes lupeol, oleanolic aldehyde, 24Z-masticadienonic acid methyl ester and 24Z-isomasticadienonic acid methyl ester were identified. In polar fraction of Chios Mastiha phenolic compounds were found, without any triterpenoids. As far as neutral subfractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* resin, fraction 1 contains the sticky polymer 1,4-poly- $\beta$ -myrcene and the triterpene keto-oleanolic aldehyde. Keto-oleanolic aldehyde was also found in subfraction 2A, while the triterpene  $\beta$ -amyrin was identified in subfraction 2B. The triterpene lupeol was found in subfractions 3A, 3B and 3C. In subfraction 3C keto-oleanolic aldehyde was the major compound. A mixture of triterpenes and other aliphatic compounds were found in subfraction 4A. Lupeol was also identified in subfraction 5A, while  $\beta$ -amyrin was the major compound.

In the present study, medium-polar and polar fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* resin and leaves caused a dose-dependent suppression of the DEX-induced GR transcriptional activation. This suppression was followed up by reduction in GR protein levels, and its target phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), glutamine synthetase (GS) and peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) protein levels, revealing anti-hyperglycemic and regulatory actions on lipid metabolism. Medium-polar leaves fraction from the Southern tree was more active than the Northern one, as far as suppression of GR transcriptional activation and reduction of PEPCK protein levels. Reduction in GR protein levels by the medium-polar and polar fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* leaves is mediated through proteasomal proteolytic pathway. The apolar fractions did not cause any remarkable change in GR transcriptional activation, possibly due to their low solubility in solvents compatible with HEK293 culture and the presence of the sticky polymer 1,4-poly- $\beta$ -myrcene, which hinders the biological activity of the other compounds. Fraction 1, as well as subfractions 2B, 3B and 5A from Chios Mastiha neutral fraction caused suppression in the DEX-induced GR transcriptional activation, although to a lower extent compared to medium-polar and polar fractions. This suppression was not followed up by reduction in GR and PEPCK protein levels, indicating regulation of GR transcriptional activation by the neutral subfractions, without affecting its protein levels. Interestingly, suppression of the DEX-induced GR transcriptional activation was followed up by reduction of PPAR $\alpha$  protein levels, indicating the potential regulatory actions of neutral subfractions on lipid metabolism.

Moreover, fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* leaves and resin were examined regarding their effect on energy metabolism regulation. AMPK constitutes a major energy balance regulator, sensing changes in ATP levels and restoring them. Medium-polar and polar fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* leaves caused reduction in AMP-activated protein kinase (AMPK) protein levels and its phosphorylated state. Comparative studies showed that medium-polar fraction of Southern tree was more active than the Northern one. However, medium-polar and polar fractions *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* resin increased phosphorylated AMPK $\alpha$  protein levels, without any impact on its non-phosphorylated state, indicating induction of catabolic versus anabolic pathways.

Furthermore, in this research anti-inflammatory actions of fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* were investigated. Our results showed that medium-polar and polar fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* leaves caused a dose-dependent suppression of the TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B transcriptional activation. Leaves fractions from Southern tree were more active than the Northern ones. The absence of any remarkable changes in p65 subunit of NF- $\kappa$ B by leaves fractions indicates regulation only at transcriptional activation level. Apolar fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* leaves suppressed the NF- $\kappa$ B transcriptional activation, but to a much lower extent than medium-polar and polar ones. Medium-polar and polar fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* resin reduced both the TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B transcriptional activation and the p65 protein levels, while apolar fraction did not cause any remarkable changes. Neutral subfractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* resin also suppressed the NF- $\kappa$ B transcriptional activation, in a dose-dependent manner and reduced the p65 subunit of NF- $\kappa$ B protein levels, with subfraction 5A being the most active one.

Finally, in this study the effect of fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* on HEK293 cell proliferation and apoptotic mechanism were assessed. Specifically, fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* reduced HEK293 cell viability in a time and dose-dependent manner. Leaves fractions from the Southern tree were more cytotoxic than the Northern ones. Medium-polar fraction from resin was more cytotoxic than the apolar and polar ones, indicating possible apoptotic effects of the triterpenes lupeol, methyl ester of 24Z-masticadienonic acid and methyl ester of 24Z-isomasticadienonic acid. Neutral subfractions 2A, 2B, 3A, 3B and 5A caused reduction in HEK293 cell viability, with subfraction 5A being the most active one. Moreover, medium-polar and polar fractions from resin and leaves induced apoptosis in HEK293 cells, as indicated by reduction in procaspase-3, procaspase-9 and bcl-2 protein levels, in a dose-dependent manner. Reduction in procaspase-9 protein levels indicates that apoptosis is mediated by the mitochondrial pathway. Similarly, neutral subfractions from resin reduced procaspase-3 and bcl-2 protein levels, but without affecting procaspase-9 protein levels, indicating that apoptosis is not mediated by mitochondria. Subfraction 5A was the most apoptotic and the only one which reduced procaspase-9 protein levels.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Η Μαστίχα Χίου

### 1.1.1. Από την αρχαιότητα έως σήμερα

Η Μαστίχα Χίου αποτελεί τη ρητινώδη έκκριση του Μαστιχόδεντρου που ανήκει στην οικογένεια Anacardiaceae, στο γένος *Pistacia*, στο είδος *lentiscus*, στην ποικιλία *chia* (*Pistacia lentiscus* L. var. *chia*) και καλλιεργείται αποκλειστικά στο νότιο τμήμα της νήσου Χίου (πηγή: Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου). Η χρήση της στην ελληνική παραδοσιακή ιατρική μετράει πάνω από 2500 χρόνια, κυρίως για τη θεραπεία γαστρεντερικών διαταραχών, όπως το έλκος στομάχου. Ο Διοσκουρίδης, ένας σημαντικός Έλληνας Ιατρός – Βοτανολόγος, που έζησε τον 1<sup>ο</sup> αιώνα μ.Χ., συγκαταλέγει τη Μαστίχα Χίου στα έργα του, ως θεραπεία του στομαχικού έλκους και του χρόνιου βήχα, καθώς και ως καθαριστικό των δοντιών. Επίσης, αναφέρει ότι το “μαστιχινόν έλαιον” παρουσιάζει ευεργετικές δράσεις σε φλεγμονές του στομάχου, καθώς και σε κοιλιακές και εντερικές διαταραχές. Αργότερα, ο Γαληνός, ο δεύτερος σπουδαιότερος Έλληνας Ιατρός της αρχαιότητας μετά τον Ιπποκράτη, αναφέρει σε πολλά έργα του τη “λευκή μαστίχα” από τη Χίο, ως μαλακτικό και στυπτικό φυτό, κατάλληλο για τη θεραπεία φλεγμονών του στομάχου, του εντέρου και του ήπατος. Μάλιστα σε ένα από τα έργα του περιλαμβάνεται μια συνταγή για την θεραπεία του στομαχικού έλκους, που περιέχει Μαστίχα Χίου, ρίζες μανδραγόρα και χρυσοβάλανο [1].

Κατά τα Βυζαντινά χρόνια, η χρήση της Μαστίχας Χίου επεκτείνεται κατά πολύ και οι ανατολικοί λαοί διεκδικούν την κατοχή της νήσου της Χίου, με σκοπό να εξασφαλίσουν το αποκλειστικό εμπόριο της Μαστίχας. Εκείνη την εποχή, η Μαστίχα χρησιμοποιείται για τη θεραπεία στομαχικών έλκων, για τη στοματική υγιεινή, για παραγωγή σαπουνιού και οδοντόπαστας, καθώς και ως κρέμα προσώπου. Ακόμη, πολλοί συγγραφείς εκείνης της περιόδου αναφέρουν τη Μαστίχα ως προσθετικό σε αλκοολούχα ποτά, στο ψωμί, σε επουλωτικές αλοιφές, καθώς και ως θεραπευτικό προϊόν για το στομαχικό άλγος και τον εμετό, για τη λεύκανση των δοντιών και τη δυσοσμία του στόματος. Κατά τον 19<sup>ο</sup> αιώνα, η Μαστίχα Χίου συμπεριλαμβάνεται σε συνταγές για αλοιφές και χάπια της Ελληνικής Φαρμακοποιίας, καθώς και άλλων χωρών της Ευρώπης, για τη θεραπεία δυσπεψιών, τραυμάτων του δέρματος, ως αναλγητικό στην οδοντιατρική καθώς και ως διουρητικό [1], [Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (gummastic.gr)].

Το εμπόριο της Μαστίχας Χίου συνεχίζει να ακμάζει ως τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, ώσπου εισήλθε σε κρίση εξαιτίας της απαρχής του πρώτου παγκοσμίου πολέμου, οπότε και σταματάει η συστηματική καλλιέργεια του Μαστιχόδεντρου. Μετά το τέλος του πολέμου οι Μαστιχοπαραγωγοί ξεκινούν εκ νέου την καλλιέργεια του Μαστιχόδεντρου, αλλά η Μαστίχα δεν καταφέρνει να φτάσει στην προγενέστερη ακμή της. Το 1938 η ελληνική πολιτεία θεσπίζει την ίδρυση 20 Συνεταιρισμών Μαστιχοπαραγωγών, με μέλη όλους τους Μαστιχοπαραγωγούς. Επακόλουθο αυτού είναι η σύσταση της Ένωσης των 20 Συνεταιρισμών με την επωνυμία “Ένωσις Μαστιχοπαραγωγών Χίου”, με σκοπό τη συστηματοποίηση της παραγωγής Μαστίχας, της συλλογής, της συσκευασίας και της διανομής της. Το γεγονός αυτό εκτοξεύει την παραγωγή



της και εξαγωγή της σε πολλές χώρες. Το 1950 ξεκινάει η βιομηχανική επεξεργασία της Μαστίχας, αρχίζει να παρασκευάζεται το Μαστιχέλαιο, και το 1957 η παρασκευή τσίχλας, συμβάλλοντας σημαντικά στην άνθιση της οικονομία του νησιού αλλά και στην οικονομική ανάκαμψη των Μαστιχοπαραγωγών [Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (gummastic.gr)].

Το 1997 η Μαστίχα Χίου, το Μαστιχέλαιο Χίου και η τσίχλα Χίου ΕΛΜΑ αναγνωρίζονται από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως προϊόντα με προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π) σύμφωνα με τον κανονισμό 2081/92 της ΕΟΚ. Έπειτα, το 2015 η καλλιέργεια του Μαστιχόδεντρου Χίου και κατά επέκταση και της Μαστίχας Χίου εντάσσεται στον Αντιπροσωπευτικό Κατάλογο της Άυλης Παγκόσμιας Πολιτιστικής Κληρονομιάς της UNESCO, ως πολιτιστικό αγαθό. Το 2015 επίσης, η Μαστίχα Χίου λαμβάνει τη μονογραφία από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA) ως θεραπευτικό παραδοσιακό φυτικό προϊόν για την αντιμετώπιση ήπιων δυσπεπτικών διαταραχών, φλεγμονών του δέρματος καθώς και ήπιων τραυμάτων [Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (gummastic.gr)], [2]).

### 1.1.2. Το Μαστιχόδεντρο Χίου

Το Μαστιχόδεντρο Χίου ή σχίνος αποτελεί έναν αειθαλή θάμνο που φτάνει σε ύψος τα 2-3 μέτρα, αναπτύσσεται αργά και η πλήρης ανάπτυξή του επιτυγχάνεται μετά το πέρας 40-50 ετών, φτάνοντας ακόμη και τα 5 μέτρα σε ύψος. Η Μαστίχα αρχίζει να εκκρίνεται μετά το 5<sup>ο</sup>-6<sup>ο</sup> έτος, ενώ η μέγιστη απόδοση παραγωγής της επιτυγχάνεται μετά το 15<sup>ο</sup> έτος ανάπτυξης του Μαστιχόδεντρου. Κάθε Μαστιχόδεντρο παράγει κατά μέσο όσο 150-180 γραμμάρια Μαστίχας ανά έτος. Το ιδανικό κλίμα για την καλλιέργειά του είναι εύκρατο και δροσερό. Είναι σχετικά ανθεκτικό φυτό και δεν απαιτεί ιδιαίτερη φροντίδα, με αποτέλεσμα να καταφέρνει να ευδοκιμεί και σε φτωχά και πετρώδη εδάφη, αλλά το γόνιμο έδαφος ευνοεί περισσότερο την απόδοση σε Μαστίχα. Αντίθετα, η υψηλή υγρασία, το ψύχος και ο παγετός παρεμποδίζουν την ανάπτυξή του, με αποτέλεσμα να καταστρέφεται [Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (gummastic.gr)], [3].

Δέντρα και μίσχοι του γένους *Pistacia lentiscus* ευδοκιμούν σε πολλές χώρες της λεκάνης της Μεσογείου, αλλά μόνο το Μαστιχόδεντρο της νότιας Χίου παράγει τη Μαστίχα. Το γεγονός ότι μόνο το Μαστιχόδεντρο που καλλιεργείται στο νότιο τμήμα του νησιού παράγει Μαστίχα οφείλεται κυρίως σε τρεις λόγους: πρώτον, στο ιδιαίτερο μικροκλίμα της περιοχής, που χαρακτηρίζεται από ήπιους χειμώνες και ξηρά καλοκαίρια, σε αντίθεση με το βόρειο τμήμα του νησιού που συγκρατεί της βροχές και την υγρασία, λόγω των ψηλών δασωμένων βουνών του, δεύτερον, από τα αρχαία χρόνια οι καλλιεργητές του Μαστιχόδεντρου Χίου εντόπιζαν τα δέντρα με την μεγαλύτερη και καλύτερη απόδοση σε Μαστίχα και τα πολλαπλασίαζαν, δημιουργώντας καινούριες φυτείες δέντρων με καλύτερα χαρακτηριστικά. Έτσι, με το πέρασμα των χρόνων και μετά από αλληπάλληλες επιλογές των αποδοτικότερων δέντρων, δημιουργήθηκε ένα νέο είδος σχίνου, που υπερπαράγει Μαστίχα, γνωστό στη σύγχρονη βοτανολογία ως ποικιλία Χίου (*Pistacia lentiscus* L. var. *chia*). Τέλος, ένας ακόμη λόγος είναι η καλή διαχείριση και διατήρηση του μίσχου από τα αρχαία χρόνια έως σήμερα, η τυποποίησή του και η εξαγωγή του στην αγορά ως ελληνικό ΠΟΠ προϊόν από τους σύγχρονους μαστιχοπαραγωγούς [Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (gummastic.gr)].



**Εικόνα 1:** Το Μαστιχόδεντρο Χίου. Το Μαστιχόδεντρο Χίου (*Pistacia lentiscus* L. var. *chia*) ευδοκimei σε πολλές περιοχές του νησιού, αλλά μόνο το δέντρο που καλλιεργείται στο νότιο τμήμα της Χίου, στα Μαστιχοχώρια, παράγει τη ρητίνη, γνωστή και ως Μαστίχα Χίου [Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (gummastic.gr)].

### 1.1.3. Η καλλιέργεια της Μαστίχας Χίου

Η καλλιέργεια της Μαστίχας ξεκινάει από το Δεκέμβριο με τη λίπανση και το κλάδεμα του Μαστιχόδεντρου. Από τα μέσα Ιουλίου μέχρι και τέλος Αυγούστου ξεκινάει ίσως το πιο σημαντικό στάδιο για την παραγωγή της Μαστίχας που είναι το “κέντημα”. Οι Μαστιχοπαραγωγοί χαράσσουν τομές στον κορμό και τα μεγάλα κλαδιά των μαστιχόδεντρων με μικρά αιχμηρά αντικείμενα, μέσα από τις οποίες αρχίζει και ρέει η Μαστίχα, ως κολλώδες διαυγές υγρό, καθώς εκκρίνεται από τον φλοιό του δέντρου. Μέσα σε 15 με 20 μέρες από το πρώτο κέντημα, η Μαστίχα αρχίζει να στερεοποιείται και παίρνει τη μορφή δακρύου, οπότε και ξεκινάει η συλλογή της μετά τα μέσα του Αυγούστου. Στη συνέχεια η Μαστίχα αποθηκεύεται σε δροσερό μέρος, οι Μαστιχοπαραγωγοί ξεκινούν το καθάρισμά της και την αφήνουν να στεγνώσει. Τέλος, το σύνολο της παραγωγής καταλήγει στην Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, όπου υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία, συσκευάζεται και διατίθεται στην αγορά [Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (gummastic.gr)], [3].



**Εικόνα 2:** Η καλλιέργεια της Μαστίχας Χίου. Οι Μαστιχοπαραγωγοί δημιουργούν τομές στον κορμό του Μαστιχόδεντρου μέσα από τις οποίες ρέει η ρητίνη ως κολλώδες υγρό. Έπειτα, η ρητίνη στερεοποιείται και παίρνει τη μορφή δακρύου [Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (gummastic.gr)].



**Εικόνα 3:** Η συγκομιδή της Μαστίχας Χίου. Αφού στερεοποιηθεί η ρητίνη ξεκινάει η συλλογή της και ακολουθεί ο καθαρισμός από τους Μαστιχοπαραγωγούς. Τέλος, το σύνολο της παραγωγής καταλήγει στην Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, όπου η Μαστίχα συσκευάζεται και διατίθεται στην αγορά [Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (gummastic.gr)].

## 1.2. Χημική σύσταση της ρητίνης και των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου

### 1.2.1. Χημική σύσταση της ρητίνης

Τα τελευταία χρόνια, έχει μελετηθεί εκτενώς η χημική σύσταση της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου, στην οποία έχει ταυτοποιηθεί μία μεγάλη ποικιλία συστατικών, που είναι υπεύθυνα για το ευρύ φάσμα των βιολογικών της δράσεων. Τη μεγαλύτερη χημική ομάδα της ακατέργαστης ρητίνης αποτελούν τα τριτερπένια (65-70%), ενώ το υπόλοιπο 25-30% καταλαμβάνει ένα μη διαλυτό κολλώδες πολυμερές, το β-μυρσένιο. Η παρουσία του παραπάνω πολυμερούς, καθιστά την ακατέργαστη ρητίνη μη διαλυτή στο νερό, προσδίδοντάς της μια δυσκολία στο χειρισμό και τη μελέτη της. Το β-μυρσένιο συγκρατεί τα βιοενεργά συστατικά της ρητίνης όλα μαζί, γι' αυτό το λόγο συχνά γίνεται προσπάθεια πρώτα να αφαιρεθεί και έπειτα να μελετηθεί η βιολογική της δράση. Από το 65-70% της ομάδας των τριτερπενίων, το 38% περίπου αποτελεί το όξινο κλάσμα, ενώ το 27% περίπου το ουδέτερο κλάσμα [2]. Στο όξινο κλάσμα της ακατέργαστης Μαστίχας Χίου έχουν ταυτοποιηθεί πολλά πεντα- και τετρακυκλικά τριτερπένια, όπως τα moronate, oleanonate, oleanolate, masticadienonate, isomasticadienonate, dihydromasticadienonate, masticadienolate, dihydromasticadienolate, 3-epi-isomasticadienolate, dihydro-3-epimasticadienolate, 3-acetoxy-3-epimasticadienolate και 3-acetoxy-3-epiisomasticadienolate [4-6]. Επίσης, στο όξινο κλάσμα της Μαστίχας έχουν εντοπιστεί τα τριτερπενικά οξέα oleanonic acid, moronic acid, 24Z-masticadienonic acid, 24Z-isomasticadienonic acid, 24Z-masticadienolic acid και 24Z-isomasticadienolic acid [7, 8]. Παράλληλα, στο ουδέτερο κλάσμα της Μαστίχας Χίου έχουν ταυτοποιηθεί τα τριτερπένια 28-norolean-17-en-3-one, oleanolic aldehyde, oleanonic aldehyde, 28-norolean-12-en-3-one, β-amyrone, olean-18-en-3-one, dammaradienone, hydroxy-dammarenone, norlupenone 3-hydroxy-6-hydroxymethyl-28-norolean-17-ene, 3-hydroxy-28-norolean-17-en-6-al, 3-methoxy-28-norolean-12-ene, 3-methoxy-28-norolean-17-ene, 6-methyl-28-norolean-17-en-3-one, 3-Oxo-28-norolean-17-en-6-al, isomasticadienolic aldehyde, tirucallol, tirucallone, β-amyrone, β-amyrine, lupenone, dammaradienol, dammaradienone [4, 5, 8, 9]. Επίσης, από μελέτες χημικής ανάλυσης της ρητίνης της Μαστίχας Χίου έχουν εντοπιστεί πολλές φαινολικές ενώσεις, όπως gallic acid, tyrosol, syringic acid, p-hydroxy-benzoic acid, p-hydroxy-phenylacetic acid, caffeic acid, vanillic acid, o-coumaric acid, ferulic acid, cinnamic acid, oleanolic acid and ursolic acid [10]. Τέλος, η μελέτη των Kottakis F. *et al.*, 2008 απέδειξε την παρουσία σακχάρων (αραβινόζη, γαλακτόζη), ουρονικών οξέων και πρωτεϊνών στο κλάσμα της Μαστίχας Χίου [11].

### 1.2.2. Χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου της ρητίνης

Ακόμη, έχει μελετηθεί εκτενώς και η σύσταση του αιθέριου ελαίου της Μαστίχας Χίου. Τα αιθέρια έλαια αποτελούν αρωματικά μείγματα πτητικών, υδρόφοβων, δευτερογενών μεταβολιτών, τα οποία μπορούν να απομονωθούν από οποιοδήποτε ιστό του φυτού. Οι κυριότερες κατηγορίες συστατικών που περιέχονται στα αιθέρια έλαια είναι φαινολικά, τερπενοειδή και φλαβονοειδή, επιδεικνύοντας πληθώρα βιολογικών δράσεων, όπως αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αποπρωτικές [12]. Το αιθέριο έλαιο της Μαστίχας Χίου αποτελεί το 2,8% v/w της ρητίνης που συλλέγεται αφού στερεοποιηθεί και

στεγνώσει, ενώ η εξαγωγή του μπορεί να φτάσει το 13,5% v/w όταν η ρητίνη συλλεχθεί νωρίτερα σε υγρή μορφή, πριν προλάβει να στερεοποιηθεί [13]. Η σύσταση του αιθέριου ελαίου της ρητίνης έχει μελετηθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες και σε αυτό έχουν ταυτοποιηθεί πολλές πτητικές ενώσεις, κυρίως μονο- και sesqui-τερπένια, τα πιο άφθονα από τα οποία είναι τα  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -myrcene,  $\beta$ -pinene, linalool, trans-caryophyllene, limonene, camphene, caryophyllene, linalool [9, 14-17]. Μάλιστα, ο χρόνος συλλογής της Μαστίχας από το Μαστιχόδεντρο διαφοροποιεί κατά πολύ τα ποσοστά των παραπάνω συστατικών στο συνολικό κλάσμα του μαστιχέλαιου [14].

### 1.2.3. Χημική σύσταση των φύλλων

Εκτός από τη σύσταση της ρητίνης, έχει μελετηθεί και η σύνθεση του αιθέριου ελαίου των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου. Ειδικότερα, η ανάλυση της σύστασης του αιθέριου ελαίου των φύλλων αποκάλυψε και εδώ μια μεγάλη ποικιλία παρόμοιων τερπενικών ενώσεων με τη ρητίνη, όπως myrcene,  $\delta$ -germacrene, trans-caryophyllene,  $\gamma$ -cadinene,  $\delta$ -cadinene, limonene,  $\alpha$ -cadinol, *epi*- $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -humulene,  $\alpha$ -murolene [16, 18, 19]. Ωστόσο, η ανάλυση της σύστασης του αιθέριου ελαίου αποξηραμένων φύλλων ανέδειξε ένα διαφορετικό προφίλ συστατικών, όπως τα  $\delta$ -cadinene,  $\alpha$ -amorphene,  $\delta$ -germacrene, trans-caryophyllene,  $\alpha$ -cubebene, naphthalene, nerolidol, aromadendrene,  $\alpha$ -cadinene,  $\beta$ -cubebene,  $\alpha$ -humulene,  $\gamma$ -terpinene [18]. Ακόμη, στα φύλλα της ποικιλίας του Μαστιχόδεντρου Χίου ταυτοποιήθηκε και η  $\alpha$ -τοκοφερόλη, καθιστώντας το Μαστιχόδεντρο Χίου ως μια νέα πηγή του συγκεκριμένου συστατικού [19]. Από μελέτη της σύστασης χλωρών και αποξηραμένων φύλλων από το Μαστιχόδεντρο Χίου προέκυψε ότι τα χλωρά φύλλα παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση σε πολυφαινολικά, ενώ το συνολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή είναι σχεδόν ίδιο. Τέλος, η χημική ανάλυση των χλωρών φύλλων αποκάλυψε αρκετές πολυφαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις, όπως τις galloyl quinic acid, D-gallicacathenin, myricetin-O-rhamnoside, quercetin glycoside, neorehmannioside, caempferol glycoside και luteolin [20].

### 1.2.4. Χημική σύσταση των φύλλων άλλων ποικιλιών του *Pistacia Lentiscus L.*

Στα φύλλα των μαστιχόδεντρων *Pistacia lentiscus* που φύονται σε περιοχές της Ιταλίας, του Ισραήλ, της Κροατίας και της Αλγερίας εντοπίστηκαν πολλές φλαβονοειδείς ενώσεις, όπως οι 3,4,5-O-trigalloyl quinic acid, 5-O-galloyl quinic acid, digalloylquinic acid, trigalloylquinic acid, monogalloyl-glucose, quercetin 3-O-rhamnoside, myricetin 3-O-rhamnoside, myricetin rhamnoside, myricetin glucuronide, myricetin 3-O-rutinoside, myricetin galactoside, quercitrin-O-gallate, delphinidin 3-O-glucoside, cyaniding 3-O-glucoside, kaempferol, kaempferol rhamnoside, luteolin, genistein, beta glucogallin, ταννίνες και κατεχίνες [21-24]. Επίσης, η χημική ανάλυση του αιθέριου ελαίου των φύλλων από τα μαστιχόδεντρα *Pistacia lentiscus* που φύονται σε περιοχές της Σαρδηνίας, της Τυνησίας, της Αλγερίας ανέδειξε μια μεγάλη ποικιλομορφία τερπενικών ενώσεων, με κυριότερες τις  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, terpinen-4-ol,  $\beta$ -myrcene,  $\beta$ -cymenene,  $\alpha$ -phellandrene,  $\beta$ -phellandrene, sabinene,  $\gamma$ -terpinene, p-cymene, camphene, germacrene,  $\delta$ -cadinene,  $\beta$ -caryophyllene, cubebol [25-28].

### 1.3. Βιολογικές δράσεις της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου

#### 1.3.1. Αντιμικροβιακές δράσεις

Οι ενώσεις που εντοπίστηκαν τόσο στη ρητίνη όσο και στα φύλλα του Μαστιχόδεντρου Χίου, είναι υπεύθυνες για τη μεγάλη ποικιλία των βιολογικών του δράσεων, όπως αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, καρδιοπροστατευτικές, αντικαρκινικές [2, 29, 30]. Πιο συγκεκριμένα, ολικό εκχύλισμα, καθώς και το ουδέτερο και όξινο κλάσμα από τη Μαστίχα Χίου, ανέστειλαν την ανάπτυξη διαφόρων στελεχών Gram θετικών, Gram αρνητικών βακτηρίων, μυκήτων και παθογόνων των τροφίμων, όπως *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella roona* [31]. Επίσης, το αιθέριο έλαιο της Μαστίχας Χίου φάνηκε να μειώνει την ανάπτυξη διαφόρων στελεχών βακτηρίων και ζυμομυκήτων *in vitro*, όπως *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *K. Pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *C. albicans* και *C. tropicalis* [16, 32]. Το συστατικό του αιθέριου ελαίου της ρητίνης με τη μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση στα στελέχη *S. aureus* και *Bacillus subtilis* αποδείχθηκε ότι είναι το β-myrcene, καθώς και το α-pinene, το οποίο είναι και το πιο άφθονο. Επίσης, σημαντική αντιβακτηριακή δράση στα *E. coli*, *S. Aureus* και *B. subtilis* εμφάνισαν και τα συστατικά linalool, verbenone και α-terpineol, παρόλο που εντοπίζονται σε πολύ μικρές ποσότητες στο αιθέριο έλαιο της ρητίνης [15].

Πολλές ακόμη μελέτες επικεντρώθηκαν στην αντιμικροβιακή δράση της Μαστίχας Χίου έναντι στο ελικοβακτήριο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*), το οποίο προκαλεί φλεγμονή του στομάχου, μέσω απελευθέρωσης της πρωτεΐνης του ελικοβακτηρίου του πυλωρού που ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα (HP-NAP). Η πρωτεΐνη HP-NAP είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και την επικείμενη ενεργοποίησή τους [33]. Μέσα από *in vitro* έρευνες διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα της Μαστίχας Χίου προκαλούν μείωση του πολλαπλασιασμού του ελικοβακτηρίου του πυλωρού *in vitro*. Μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι αυτού εμφανίζει το όξινο κλάσμα της ρητίνης, ενώ το ουδέτερο κλάσμα εμφανίζει τη μικρότερη αντιβακτηριακή δράση. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το τριτερπένιο 24Z-isomasticadienolic acid, συστατικό του όξινου κλάσματος της ρητίνης, προκαλεί τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση έναντι του ελικοβακτηρίου του πυλωρού *in vitro*, ακολουθούμενο από τα τριτερπένια 24Z-masticadienolic acid, oleanonic acid, moronic acid, 24Z-isomasticadienonic acid και 24Z-masticadienonic acid, επίσης συστατικά του όξινου κλάσματος [8]. Παράλληλα, δείχθηκε ότι οι γλυκοπρωτεΐνες αραβινογαλακτάνες (arabino-galactan proteins), που αποτελούν συστατικά της ρητίνης αναστέλλουν την επαγόμενη από την HP-NAP-προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό του ελικοβακτηρίου του πυλωρού *in vitro*. Εκτός από τις *in vitro* μελέτες, η Μαστίχα Χίου φάνηκε να μειώνει την ενεργοποίηση ουδετερόφιλων σε ασθενείς με ελικοβακτήριο του πυλωρού μετά από δίμηνη κατανάλωσή της (1g/ημέρα) [34]. Ακόμη μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ελικοβακτήριο του πυλωρού, κατέγραψε τη μείωση του

πολλαπλασιασμού του βακτηρίου κατά 30% και 38% μετά από κατανάλωση 350mg και 1gr Μαστίχας ημερησίως, αντίστοιχα, για 14 ημέρες [35]. Τέλος, η αντιμικροβιακή δράση της Μαστίχας διαπιστώθηκε και όταν χορηγήθηκε κλάσμα ρητίνης, σε ποντικούς μολυσμένους με το ελικοβακτήριο του πυλωρού, στους οποίους μειώθηκε ο πολλαπλασιασμός του βακτηρίου στην κοιλότητα του στομάχου [8].

### 1.3.2. Αντιοξειδωτικές δράσεις

Εκτός από αντιμικροβιακές δράσεις, έρευνες πολλών ετών έφεραν στο φως και πολλές αντιοξειδωτικές δράσεις της Μαστίχας Χίου [30]. Ειδικότερα, η Μαστίχα φάνηκε ότι προστατεύει την λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) από οξείδωση, *in vitro* [36]. Η οξειδωμένη LDL (oxLDL) έχει αναγνωριστεί από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) ως αξιόπιστος και εξειδικευμένος δείκτης αξιολόγησης της οξειδωτικής βλάβης [37]. Η ox-LDL προσλαμβάνεται μέσω μεμβρανικών υποδοχέων του κυττάρου και τα οξειδωμένα λιπίδια που περιέχονται σε αυτήν οδηγούν σε παραγωγή ROS, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο [38]. Ένας από τους υποδοχείς στους οποίους προσδένεται η ox-LDL και εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων είναι ο CD36, ο οποίος ανήκει στην υπερ-οικογένεια των μεμβρανικών υποδοχέων “scavenger” [39]. Ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής έδειξε ότι η Μαστίχα μειώνει την έκφραση του υποδοχέα CD36, κατά 6%-30%, σε περιφερικά μονοπύρηνια κύτταρα αίματος (PBMCs), μετά από 48-72 ώρες επώασης, *in vitro*. Μάλιστα, η μείωση του mRNA του CD36, ήταν κατά 70-90% μεγαλύτερη συν-παρουσία Μαστίχας και ox-LDL, συγκριτικά με την ox-LDL μόνο. Επίσης, η ταυτόχρονη επώαση κυττάρων PBMC με την ox-LDL και τη ρητίνη του Μαστιχόδεντρου Χίου, αύξησε τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) [40]. Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά φυσικά αντιοξειδωτικά, που στην ανηγμένη της μορφή, συμβάλλει, μεταξύ άλλων, στην διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης του οργανισμού και στην εξουδετέρωση των βλαβερών ελευθέρων ριζών [41]. Παρόμοια αντιοξειδωτική δράση σημειώθηκε και μετά από επώαση κυττάρων PBMC με το πολυφαινολικό και τριτερπενικό κλάσμα της ρητίνης, όπου παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της GSH, κατά 5% και 23,6%, αντίστοιχα [40]. Ακόμη, 2,5-50mg ρητίνης μείωσαν τα επίπεδα των θειοβαρβιτουρικών οξέων από 70%-99%, ενώ προστατευτική δράση έναντι της οξείδωσης της LDL σημείωσαν επίσης το αιθέριο έλαιο, το όξινο και το ουδέτερο κλάσμα της ρητίνης [36]. Τα θειοβαρβιτουρικά οξέα αποτελούν την πλέον διαδεδομένη μέθοδο προσδιορισμού της οξείδωσης των λιπιδίων, καθώς και αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας, με τα επίπεδά τους να είναι ανάλογα της οξείδωσης του λιπιδίου του δείγματος προς μέτρηση [42]. Συγκεκριμένα, σε ασθενείς με τη νόσο του Crohn, οι οποίοι λάμβαναν 2,8g/ημέρα Μαστίχα Χίου για 3 μήνες μειώθηκε η οξειδωμένη LDL (ox-LDL), ο λόγος oxLDL/LDL, καθώς και ο λόγος της oxLDL προς την λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL) [37]. Σε υγιείς εθελοντές, η Μαστίχα Χίου αποδείχθηκε ότι αναστέλλει την επαγόμενη από την ox-LDL απόπτωση και νεκρόπτωση στα κύτταρα PBMCs).

Στα λεία μυϊκά κύτταρα RASMC, η ρητίνη διαπιστώθηκε ότι μειώνει τα επίπεδα του σουπεροξειδίου και καταστέλλει την δραστικότητα της οξειδάσης του NADPH στα

ενεργοποιημένα από τον TNF $\alpha$ , κύτταρα RASMC [43]. Η οξειδάση του NADPH αποτελεί ένα διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο, που καταλύει την παραγωγή σουπεροξειδίου, μεταφέροντας ένα ηλεκτρόνιο από το NADPH στο οξυγόνο, συμβάλλοντας στην ανοσοαπόκριση και άλλες κυτταρικές λειτουργίες [44]. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο TNF $\alpha$  μπορεί να ενεργοποιήσει την οξειδάση του NADPH, οδηγώντας σε παραγωγή σουπεροξειδίου αλλά και γενικότερη παραγωγή ROS [45]. Είναι γνωστό ότι, η υπομονάδα p47 της οξειδάσης του NADPH αποτελεί υπόστρωμα για την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), την οποία έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνει με χρονο- και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, ενεργοποιώντας την οξειδάση του NADPH [46]. Σε κύτταρα RASMC, η Μαστίχα Χίου μείωσε τα επίπεδα σουπεροξειδίου και ανέστειλε κατά 60% τη δραστηριότητα της PKC, *in vitro*, υποδεικνύοντας μία άμεση καταστολή της PKC [43]. Επίσης, η ρητίνη από το Μαστιχόδεντρο Χίου ανέστειλε την επαγόμενη από την αγγειοτενσίνη II παραγωγή σουπεροξειδίου σε βόεια αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα BAEC [43]. Η αγγειοτενσίνη II έχει βρεθεί ότι επάγει μέσω της σηματοδότησής της, την ενεργοποίηση της PKC [47]. Επομένως, τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι η αντιοξειδωτική δράση της Μαστίχας Χίου επιτελείται μέσω αναστολής του μονοπατιού της NADPH που επάγεται από την PKC [43].

Σε μακροφαγικά κύτταρα RAW264.7 ενεργοποιημένα από το λιποπολυσακχαρίδιο (LPS), η Μαστίχα παρατηρήθηκε ότι μειώνει την παραγωγή του οξειδίου του αζώτου (NO) και της προσταγλαδίνης E2 (PGE2), μέσω μείωσης των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) και της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) [48]. Το οξείδιο του αζώτου αποτελεί κομβικό μόριο που συμμετέχει σε ποικίλες αντιδράσεις του ανθρώπινου οργανισμού. Ανήκει στις ελεύθερες ρίζες, έχοντας στην κατοχή του ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Αυτό το καθιστά ιδιαίτερα τοξικό, αφού μπορεί να καταστρέψει κυτταρικές μεμβράνες και να προκαλέσει ρήξεις στο DNA. Ωστόσο, φυσικά αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να προσφέρουν ένα υδρογόνο στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο των ελευθέρων ριζών και να τις εξουδετερώνουν [49]. Το οξείδιο του αζώτου παράγεται από τη συνθάση NOS, η οποία εκφράζεται στα μακροφάγα καθώς και σε άλλους ιστούς, ως απόκριση της σηματοδότησης προφλεγμονωδών μορίων [50]. Οι προσταγλαδίνες αποτελούν λιπιδιακούς μεσολαβητές που συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες των νεφρών, ενώ οι κυκλοοξυγενάσες αποτελούν τα ένζυμα που καταλύουν τη σύνθεσή τους. Η COX-1 εκφράζεται συνεχώς και είναι ιδιοσυστατικά ενεργή, ενώ η έκφραση της COX-2 επάγεται ως απόκριση στη φλεγμονή [51].

### 1.3.3. Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της Μαστίχας Χίου. Ειδικότερα, η Μαστίχα Χίου έχει δείχθει ότι εμφανίζει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση σε ασθενείς με νόσο Crohn [52]. Η νόσος του Crohn είναι μία πολυπαραγοντική φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, τα ακριβή αίτια της οποίας παραμένουν αδιευκρίνιστα. Από παθοφυσιολογικής σκοπιάς, δείκτες που έχουν βρεθεί σε υψηλά επίπεδα και έχουν συσχετιστεί με τη νόσο είναι ο TNF $\alpha$ , η ιντελευκίνη-6 (IL-6) και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) [53]. Η IL-6 είναι μία κυτταροκίνη με πλειοτροπική δράση, καθώς συμμετέχει στην ανοσολογική απόκριση



ενεργοποιώντας τις πρωτεΐνες οξείας φάσης και την παραγωγή αντισωμάτων. Η μειωμένη λειτουργικότητά της μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια φλεγμονή και εμφάνιση αυτοάνοσης διαταραχής. Η CRP αποτελεί μία από τις πρωτεΐνες της οξείας φάσης της φλεγμονής, τη σύνθεση της οποίας επάγει η IL-6 [54]. Τα πρωτεϊνικά της επίπεδα αυξάνονται κατά πολύ μετά από ιστική/κυτταρική βλάβη, μόλυνση και φλεγμονή και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τη φλεγμονώδη απόκριση [55]. Η κατανάλωση δισκίων Μαστίχας (2,2g/ημέρα) για 4 εβδομάδες από ασθενείς με νόσο Crohn, οδήγησε σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του TNFα κατά 80% [52]. Επίσης, μείωσε την IL-6 κατά 66%, την CRP κατά 51% και παράλληλα αύξησε το ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό κατά 3,8 φορές στο πλάσμα του αίματος [56]. Ομοίως, σε αρουραίους με κολίτιδα, μια φλεγμονή του εντέρου, η χορήγηση Μαστίχας Χίου μείωσε τα επίπεδα του TNFα κατά 56%, της IL-6 κατά 61% και της IL-8 κατά 74% [3]. Εκτός από το ολικό κλάσμα Μαστίχας, τόσο το όξινο όσο και το ουδέτερο κλάσμα της ρητίνης μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των TNFα, IL-6 και IL-8 στον εντερικό ιστό αρουραίων με κολίτιδα. Εξίσου μειωμένα ήταν και τα επίπεδα του mRNA της IL-8, ενώ βελτιώθηκε και η βλάβη του εντερικού ιστού [57]. Σε αρουραίους με φλεγμονή του βλεννογόνου του στομάχου, η χορήγηση Μαστίχας Χίου μείωσε την υπεραιμία, την αιμοραγική διήθηση και το οίδημα στο βλεννογόνο του στομάχου. Ακόμη, μειωμένα κατά 34,6% και 63,9% ήταν και τα επίπεδα του TNFα και της ιντερλευκίνης 1β (IL-1β), αντίστοιχα. Στα ζώα που τους χορηγήθηκε παράλληλα με τη Μαστίχα και ομεπραζόλη, η Μαστίχα μείωσε κατά 45,7% περισσότερο από την ομεπραζόλη τα επίπεδα του TNFα και κατά 19% περισσότερο τα επίπεδα της IL-1β [58].

Σε ενεργοποιημένα από τον TNFα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής HAEC, το ουδέτερο κλάσμα της Μαστίχας Χίου, καθώς και το απομονωμένο τριτερπένιο τιρουκαλόλη ανέστειλαν την έκφραση της πρωτεΐνης αγγειακής κυτταρικής προσκόλλησης VCAM-1 και της πρωτεΐνης διακυτταρικής προσκόλλησης ICAM-1 [59]. Οι VCAM-1 και ICAM-1 είναι γλυκοπρωτεΐνες που παράγονται στους φλεγμαίνοντες ιστούς και συμβάλλουν στην προσκόλληση κυττάρων του ανοσοποιητικού, όπως λευκοκύτταρα, στα ενδοθηλιακά αγγεία [60, 61]. Η παραγωγή τους επάγεται από κυτταροκίνες, όπως ο TNFα, ενώ στους υποκινητές των γονιδίων τους έχουν βρεθεί στοιχεία απόκρισης στον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, η δέσμευση του οποίου ενεργοποιεί την έκφρασή τους [62]. Ομοίως, σε αρουραίους στους οποίους είχε προκληθεί κολίτιδα, μια φλεγμονή του εντέρου, η χορήγηση Μαστίχας Χίου μείωσε τα επίπεδα του ICAM-1 κατά 42-50% [3]. Επίσης, τόσο το ουδέτερο κλάσμα της ρητίνης όσο και η τιρουκαλόλη, ενός συστατικού της, προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης της υπομονάδας p65 του NF-κB, σε ενεργοποιημένα από τον TNFα κύτταρα HAEC, ενισχύοντας την άποψη ότι η Μαστίχα Χίου ρυθμίζει τη σηματοδότηση του NF-κB. Τέλος, το ουδέτερο κλάσμα της ρητίνης και η τιρουκαλόλη μείωσαν την προσκόλληση των μονοκυττάρων U937 στα ενεργοποιημένα από τον TNFα κύτταρα HAEC [59].

Σε ασθενείς με μη αλκοολική νόσο του λιπώδους ήπατος (NAFLD) και φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (IBD), τα οποία αποτελούν χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, με κοινά παθοφυσιολογικά ευρήματα, η πρόσληψη Μαστίχας βελτίωσε την πορεία της νόσου. Στα συγκεκριμένα νοσήματα αρκετά micro RNAs ρυθμίζουν μοριακά μονοπάτια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό, στη

φλεγμονή και στο οξειδωτικό στρες. Για παράδειγμα, το miR-155 έχει δειχθεί ότι υπερπαράγεται σε συνθήκες φλεγμονής και έχει ανιχνευτεί σε υψηλά επίπεδα σε ασθενείς με IBD. Σε ασθενείς με IBD που λάμβαναν 2,1 gr Μαστίχα Χίου καθημερινά τα επίπεδα του miR-155 δεν επηρεάστηκαν σημαντικά, ενώ στην ομάδα placebo αυξήθηκαν, ενισχύοντας την άποψη ότι η αντιφλεγμονώδης δράση που ασκεί η Μαστίχα Χίου διενεργείται μέσω ρύθμισης των επιπέδων του miR-155 [63].

Σε ποντικούς με άσθμα στους οποίους χορηγήθηκε Μαστίχα, μειώθηκε η διήθηση ηωσινόφιλων στο βρογχοκυψελιδικό υγρό κατά 30-55%, καθώς και η αναπνευστική υπερευαισθησία. Ακόμη, στο βρογχοκυψελιδικό υγρό παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα των IL-5 και IL-13, καθώς και ορισμένων χημειοκινών, μετά τη χορήγηση Μαστίχας. Επίσης, η Μαστίχα μπορεί να δρα απευθείας ως αντι-χημειοπροσελκυστικό και να παρεμποδίζει τη μετανάστευση των ηωσινόφιλων που προκαλείται από τις εοταξίνες, μέσω αναστολής του υποδοχέα των εοταξινών (C-C chemokine receptor 3) [64]. Οι εοταξίνες ανήκουν στην οικογένεια των CC-χημειοκινών και έχουν την ικανότητα να προσελκύουν και να ενεργοποιούν κύτταρα φλεγμονής, όπως λεμφοκύτταρα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, συμβάλλοντας στην παραγωγή βλέννας στο βρογχικό άσθμα. Οι δράσεις τους μεσολαβούνται μέσω της σύνδεσής τους στους αντίστοιχους υποδοχείς (CC-chemokines receptors), οι οποίοι εκφράζονται σε περιορισμένους τύπους κυττάρων, όπως ηωσινόφιλα, βασεόφιλα και T-κύτταρα [65].

#### **1.3.4. Καρδιοπροστατευτικές δράσεις**

Παράλληλα, έρευνες έφεραν στον φως και πολλές καρδιοπροστατευτικές δράσεις της Μαστίχας Χίου. Σε υπερτασικούς αρουραίους στους οποίους χορηγήθηκαν 40mg/kg/ημέρα Μαστίχας Χίου για 2 εβδομάδες, σημειώθηκε μείωση σε σημαντικό βαθμό της συστολικής και της διαστολικής περιφερικής πίεσης, καθώς και πτώση της έκκρισης ρενίνης, των επιπέδων CRP και IL-6, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου [66]. Η ρενίνη αποτελεί ένα μικρό ένζυμο που εκκρίνεται από τους νεφρούς όταν η αρτηριακή πίεση ελαττωθεί, και μέσω της ενεργοποίησης της αγγειοτενσίνης II οδηγεί σε αύξηση και αποκατάσταση των αρχικών επιπέδων της [67]. Ακόμη, μεταθανάτια ιστοπαθολογική εξέταση αποκάλυψε ότι στην ομάδα που χορηγήθηκε Μαστίχα μειώθηκε η δυσκαμψία του τοίχους της αορτής, καθώς και η υπερτροφία των μικρών αγγείων της καρδιάς [66]. Τέλος, σε υπερτασικούς εθελοντές, η χορήγηση Μαστίχας Χίου (2,8g) μείωσε τόσο την περιφερική όσο και την αορτική συστολική πίεση του αίματος, καθώς και την περιφερική πίεση παλμού, 2-3 ώρες μετά την χορήγησή της. [68].

#### **1.3.5. Αντι-υπερλιπιδαιμικές δράσεις της Μαστίχας Χίου**

Από πειραματικά δεδομένα έχουν επίσης αναδειχθεί και οι αντι-υπερλιπιδαιμικές δράσεις της Μαστίχας Χίου. Πιο συγκεκριμένα, υγιείς εθελοντές μετά από καθημερινή κατανάλωση Μαστίχας Χίου (5gr), παρουσίασαν σημαντική μείωση της ολικής χοληστερόλης, της LDL, της απολιποπρωτεΐνης A-1 (ApoA-1), της απολιποπρωτεΐνης B (ApoB) και της λιποπρωτεΐνης a (Lpa), ενώ αντίθετα τα επίπεδα της γλυκόζης, της HDL και των τριγλυκεριδίων παρέμειναν αμετάβλητα [69]. Ομοίως, η καθημερινή κατανάλωση 5g/ημέρα Μαστίχας Χίου μείωσε τα

τριγλυκερίδια σε άνδρες υγιείς εθελοντές, από 129,6mg/dL σε 97,6mg/dL και 102,1mg/dL, μετά από 3 και 6 μήνες κατανάλωσης, αντίστοιχα [70]. Σε υπερλιπιδαιμικούς εθελοντές, η χορήγηση δισκίων Μαστίχας (1g/ημέρα) προκάλεσε μείωση της ολικής χοληστερόλης κατά 11,5mg/dl και της γλυκόζης νηστείας κατά 4,5mg/dl, ενώ προκάλεσε μία τάση μείωσης στα επίπεδα τριγλυκεριδίων κατά 4,7mg/dl, της LDL κατά 6,3mg/dl και της HDL κατά 3,3mg/dl. Αξιοσημείωτο είναι πώς η μείωση που προκάλεσε η χορήγηση των δισκίων Μαστίχας ήταν ακόμα μεγαλύτερη στους υπέρβαρους και παχύσαρκους εθελοντές, με την ολική χοληστερόλη να μειώνεται κατά 13,5mg/dl και η γλυκόζη νηστείας κατά 5,1mg/dl [71].

Σε in vivo μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε υπερλιπιδαιμικά κουνέλια, η χορήγηση Μαστίχας Χίου από την οποία είχε αφαιρεθεί το πολυμερές β-myrcene, καθώς και του ουδέτερου κλάσματος προκάλεσαν μείωση της ολικής χοληστερόλης κατά 47% και 88%, αντίστοιχα. Την ίδια σχεδόν μείωση προκάλεσαν τα παραπάνω κλάσματα και στα επίπεδα της LDL, ενώ τα επίπεδα της ox-LDL παρέμειναν αμετάβλητα. Ακόμη, ενώ στα ζώα ελέγχου παρατηρήθηκε αυξημένη αθηροσκλήρωση στην αορτή, στις ομάδες που χορηγήθηκαν τα κλάσματα της Μαστίχας δεν εντοπίστηκαν καθόλου αθηρωματικές αλλοιώσεις [72]. Παράλληλα, η χορήγηση Μαστίχας Χίου (20mg/kg/ημέρα) σε διαβητικά ποντίκια προκάλεσε μείωση της ολικής χοληστερόλης, της LDL, της HDL και των τριγλυκεριδίων μετά από 8 εβδομάδες [73, 74]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στα ζώα που χορηγήθηκε υψηλή δόση Μαστίχας (500mg/kg/ημέρα), οι παραπάνω δείκτες αυξήθηκαν μετά το πέρας των 8 εβδομάδων, εκτός από τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων που μειώθηκαν κατά 13mg/dl [73]. Επίσης, η χορήγηση 2,5-4% v/v μαστιχέλαιου σε υγιή ποντίκια μείωσε την ολική χοληστερόλη κατά 29-53,6%, την LDL κατά 23,9-45,2% και τα τριγλυκερίδια κατά 21,2-30,6%, ενώ η χορήγηση μαστιχέλαιου σε υπερλιπιδαιμικά ποντίκια μείωσε την ολική χοληστερόλη, την LDL και τα τριγλυκερίδια κατά 50% [75].

### 1.3.6. Υπογλυκαιμικές δράσεις

Αξιοσημείωτες είναι και οι υπογλυκαιμικές δράσεις της Μαστίχας Χίου. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση 990mg/ημέρα Μαστίχας προκάλεσε μείωση της γλυκόζης νηστείας κατά 4,5mg/dl σε υπερλιπιδαιμικούς εθελοντές. Μάλιστα, στους υπέρβαρους και παχύσαρκους εθελοντές η δράση ήταν ακόμα μεγαλύτερη, με τη γλυκόζη νηστείας να μειώνεται κατά 5,1mg/dl [71]. Ομοίως, η καθημερινή κατανάλωση 5010mg/ημέρα Μαστίχας Χίου από υγιείς εθελοντές μείωσε την γλυκόζη, από 103mg/dL σε 97,6mg/dL και 88mg/dL, αντίστοιχα, ενώ περιόρισε και την αντίσταση στην ινσουλίνη, μετά από 3 και 6 μήνες κατανάλωσης [70]. Παράλληλα, η πρόσληψη Μαστίχας Χίου (20mg/kg/ημέρα) από διαβητικά ποντίκια προκάλεσε μείωση της γλυκόζης νηστείας κατά 55,45mg/dl, μετά από 8 εβδομάδες, ενώ η πρόσληψη υψηλότερης δόσης (500mg/kg/ημέρα) μείωσε τη γλυκόζη κατά 49,67mg/dl [73].

Ένας πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου η Μαστίχα Χίου ασκεί υπογλυκαιμικές δράσεις είναι η τροποποίηση του μεταβολισμού των γλυκοκορτικοειδών [76]. Η κορτιζόλη, το πιο διαδεδομένο φυσικό γλυκοκορτικοειδές, συνδέεται στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών μέσω του οποίου ασκεί της δράσεις της [77]. Ενδοκυτταρικά, η διατήρηση της ομοιόστασής της ρυθμίζεται

από το ένζυμο 11β-αφυδρογονάση των υδροξυ-στεροειδών (11β-HSD). Η ισομορφή 1 του ενζύμου 11β-HSD μετατρέπει την κορτιζόνη, από την ανενεργή της μορφή σε κορτιζόλη, που αποτελεί την ενεργή μορφή, ενώ αντίθετα, η ισομορφή 2 του ενζύμου 11β-HSD μετατρέπει την ενεργή κορτιζόλη σε ανενεργή κορτιζόνη [78]. Δομικές μελέτες απέδειξαν ότι η ρητίνη, το όξινο κλάσμα, καθώς και τα τριτερπένια masticadienonic και isomasticadienonic acid που περιέχονται στο όξινο κλάσμα της Μαστίχας Χίου, αναστέλλουν τη δραστηριότητα του ενζύμου 11β-HSD 1, με τιμές αναστολής IC<sub>50</sub> 1.33μg/ml, 2.10μg/ml, 2.51μM και 1.94μM, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, τα τριτερπένια masticadienonic και isomasticadienonic acid βρέθηκε ότι δεσμεύονται στο θύλακα πρόσδεσης της κορτιζόλης, παρεμποδίζοντας την πρόσδεση του φυσικού προσδέτη [76].

### 1.3.7. Ηπατο-προστατευτικές δράσεις

Επίσης, έχουν καταγραφεί και ορισμένες ηπατο-προστατευτικές δράσεις της Μαστίχας Χίου. Ειδικότερα, υγιείς εθελοντές μετά από καθημερινή κατανάλωση Μαστίχας Χίου (5g/ημέρα), παρουσίασαν σημαντική μείωση των επιπέδων των ηπατικών ενζύμων SGOT, SGPT και gamma-GT. Οι τιμές των ενζύμων SGPT και gamma-GT δεν διέφεραν μεταξύ ανδρών και γυναικών, εκτός από τη μείωση της SGOT που ήταν μεγαλύτερη στους άνδρες [69]. Επιπρόσθετα, ιστοπαθολογική ανάλυση του ήπατος διαβητικών ποντικών που προσλάμβαναν καθημερινά Μαστίχα Χίου για 8 εβδομάδες, τόσο σε χαμηλή δόση (20mg/kg), όσο και σε υψηλή (500mg/kg) έδειξε μείωση της ηπατικής στεάτωσης, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου [73, 74]. Η ηπατική στεάτωση ή ασθένεια του λιπώδους ήπατος χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση τριακυλογλυκερολών ή λιπιδίων εντός των ηπατοκυττάρων, που όμως δεν οφείλεται σε φλεγμονή ή τραυματισμό [79]. Σε πέντε από τα εννιά ζώα της ομάδας χαμηλής δόσης Μαστίχας, η ασθένεια χαρακτηρίστηκε ως “ήπια”, ενώ αντίθετα στην ομάδα υψηλής δόσης, σε δύο από τα εννιά ζώα χαρακτηρίστηκε ως “ήπια” και σε έναν ως “μέτρια” [73].

### 1.3.8. Αντι-πολλαπλασιαστικές και αντικαρκινικές δράσεις

Τέλος, πολλές έρευνες έχουν στραφεί και αναδείξει τις αντι-πολλαπλασιαστικές και αντικαρκινικές δράσεις της Μαστίχας Χίου. Πιο συγκεκριμένα, η Μαστίχα Χίου βρέθηκε ότι προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων εντερικών κυττάρων HCT116 με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, μέσω αναστολής της προόδου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Μάλιστα η αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 συμβαίνει στις πρώτες 48 ώρες επώασης των κυττάρων με Μαστίχα, όπου παρατηρήθηκε και μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών p53 και p21 [80]. Η p53 έχει μελετηθεί εκτενώς ως ογκο-κατασταλτική πρωτεΐνη που αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, αλλά έχει βρεθεί ότι συμμετέχει σε πολλές διεργασίες του κυττάρου, όπως απόπτωση, επιδιόρθωση του DNA, επιβίωση, αυτοφαγία, αντιοξειδωτικός μηχανισμός. Ένα από τα άμεσα γονίδια στόχους της είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p21, μέσω της οποίας αναστέλλεται η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου [81]. Παράλληλα, η Μαστίχα Χίου βρέθηκε να προκαλεί απόπτωση σε αποκολλημένα από το υπόστρωμά τους κύτταρα HCT116, μετά από 48 ώρες επώαση, στα οποία εντοπίστηκαν μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3 και πρωτεολυτικά κλάσματα της PARP [80].

Η προκασπάση-3 αποτελεί τον τελικό αποδέκτη του μονοπατιού της απόπτωσης, που μετά από πρωτεόλυση σε κασπάση-3, την ενεργή της μορφή, οδηγεί σε κατακερματισμό του DNA, αποικοδόμηση πυρηνικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και σχηματισμό αποπτωτικών σωμάτων. Μεταξύ των πρωτεϊνών στόχων που πρωτεολύει η ενεργή κασπάση-3 είναι η PARP [82]. Η PARP αποτελεί ένα ένζυμο που καταλύει την μετα-μεταφραστική πολυ-ADP-ριβοζυλίωση σε πρωτεΐνες στόχους και συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως επιδιόρθωση του DNA, μεταγραφή, αποικοδόμηση πρωτεϊνών, καθώς και προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Μάλιστα, η πρωτεόλυση της PARP που μεσολαβείται από τις κασπάσες αποτελεί τον πλέον κυτταρικό δείκτη έναρξης του μηχανισμού της απόπτωσης [83].

Στα ίδια κύτταρα HCT116, κλάσμα από τη Μαστίχα Χίου που είχε εκχυλιστεί με εξάνιο, έναν μη-πολικό διαλύτη, προκάλεσε κυτταροτοξικότητα και αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, τόσο με δοσο-εξαρτώμενο όσο και με χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Ακόμη, παρατηρήθηκε αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα σε μεγάλες συγκεντρώσεις (>50μg/ml) και μετέπειτα ενεργοποίηση των κασπασών-3, -8 και -9 στα αποκολλημένα κύτταρα, φαινόμενο που ονομάζεται “apoptosis” απόπτωση [84]. Η “apoptosis” απόπτωση είναι αποτέλεσμα της προγραμματισμένης αποκόλλησης των επιθηλιακών κυττάρων από τα γειτονικά κύτταρα του ιστού με σκοπό τη διατήρηση της αρχικής φυσιολογίας του και της αποφυγής της μη ομαλής κυτταρικής ανάπτυξης ή κυτταρικής μετανάστευσης, γεγονότα που μπορεί να οδηγήσουν σε ογκογένεση [85]. Σε έρευνα σε *in vivo* σύστημα καρκινογένεσης, όπου προκλήθηκε ανάπτυξη όγκων σε μύες μετά από έγχυση κυττάρων HCT116, το εκχύλισμα εξανίου της Μαστίχα Χίου (200mg/kg/day) μείωσε κατά 30% την ανάπτυξη των όγκων, χωρίς σημαντικές παρενέργειες [86].

Ακόμη, η Μαστίχα Χίου προκάλεσε κυτταροτοξικότητα σε ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα HL-60, ML-1, KG-1 και K-562, σε στοματικά καρκινικά κύτταρα HSC-2, HSC-3 και HSC-4, καθώς και ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος HepG2. Ειδικότερα, στα ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα προκάλεσε απόπτωση μέσω επαγωγής κατακερματισμού του DNA και ενεργοποίηση της κασπάσης-3 [87]. Κατακερματισμός του DNA και μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προ-κασπάσης-3 παρατηρήθηκε και σε στοματικά καρκινικά κύτταρα YD-10B, μετά από επώασή τους με εκχύλισμα Μαστίχας Χίου, τόσο με δοσο-εξαρτώμενο, όσο και με χρονο-εξαρτώμενο τρόπο [88]. Κυτταροτοξικότητα της Μαστίχας έναντι των κυττάρων HepG2 σημειώθηκε και στη μελέτη των Gortzi O., *et al*, 2022, όπου ολικό εκχύλισμα Μαστίχας, καθώς και ουδέτερο και όξινο κλάσμα της, ανέστειλαν την κυτταρική βιωσιμότητα, επίσης με τρόπο που εξαρτάται από τη δοσολογία και το χρόνο [31].

Οι αντι-πολλαπλασιαστικές δράσεις της Μαστίχας Χίου παρατηρήθηκαν επίσης σε ανθρώπινες παγκρεατικές κυτταρικές σειρές BxPC-3 και COLO357, όπου η Μαστίχα Χίου σε συνδυασμό με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο γεμισιταβίνη, ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό *in vitro*. Επίσης, ο συνδυασμός Μαστίχας και γεμισιταβίνης οδήγησε σε επαγωγή της απόπτωσης στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές, μειώνοντας τα επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2, αυξάνοντας τα επίπεδα της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης bax, και αναστέλλοντας την αποικοδόμηση του αναστολέα του NF-κB, IκB [89]. Ο IκB αποτελεί τον αναστολέα που

δεσμεύεται στο διμερές p65/p50 του NF-κB στο κυτταρόπλασμα και τον απενεργοποιεί. Ανοδικά του IκB, η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της κινάσης AKT οδηγεί σε φωσφορυλίωση της κινάσης IKK, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει τον αναστολέα IκB. Η φωσφορυλίωση του IκB τον οδηγεί στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση και το διμερές του NF-κB απελευθερώνεται και εισέρχεται στον πυρήνα [90, 91]. Στα κύτταρα καρκίνου του προστάτη PC-3, η Μαστίχα προκάλεσε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της φωσφορυλιωμένης AKT, καθώς και αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του αναστολέα IκB, αναστέλλοντας τη σηματοδότηση του NF-κB. Ακόμη, στα κύτταρα PC-3 η Μαστίχα προκάλεσε μείωση της έκφρασης του NF-κB, αναστολή της μεταγραφικής του δραστηριότητας, καθώς και μείωσης της έκφρασης της κυκλίνης D1, το γονίδιο της οποίας αποτελεί άμεσο στόχο του NF-κB. Η αναστολή της σηματοδότησης του NF-κB φάνηκε ότι επιτελείται μέσω της αναστολής της φωσφορυλίωσης της AKT κινάσης [92].

Οι ανασταλτικές δράσεις της Μαστίχας παρατηρήθηκαν και στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου του προστάτη LNCaP, όπου η ρητίνη ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, ενώ μείωσε και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης D1 και της p21. Στην ίδια κυτταρική σειρά η Μαστίχα μείωσε τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του υποδοχέα ανδρογόνων (AR), υποδηλώνοντας ότι η ανασταλτική δράση συμβαίνει σε μεταγραφικό επίπεδο [93]. Στο 30-50% περιστατικών καρκίνου του προστάτη, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα έκφρασης του AR [94]. Στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά LNCaP, η Μαστίχα Χίου μείωσε τη μεταγραφική δραστηριότητα του AR, καθώς και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PSA, το γονίδιο του οποίου αποτελεί άμεσο στόχο της σηματοδότησης του AR [93]. Ακόμη, στα παραπάνω κύτταρα παρατηρήθηκε αύξηση των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων της maspin, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων Μαστίχας. Η maspin αποτελεί μια πρωτεΐνη αναστολέα πρωτεασών σερίνης, η έκφραση της οποίας μειώνεται κατά την πρόοδο της ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι η υπερέκφρασή της μπορεί να αναστείλει την μετάστασή του [95]. Ομοίως, στην ανθρώπινη καρκινική σειρά καρκίνου του προστάτη PC-3, η Μαστίχα ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό *in vitro*, τόσο με δοσο-εξαρτώμενο όσο και με χρονο-εξαρτώμενο τρόπο και προκάλεσε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου [92].

Παράλληλα, μελέτες έχουν δείξει ότι το αιθέριο έλαιο από τη Μαστίχα Χίου εμφανίζει επίσης αντι-πολλαπλασιαστικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, το μαστιχέλαιο ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων λευχαιμικών κυττάρων K562, αύξησε την ενεργότητα της κασπάσης-3 και μείωσε τα επίπεδα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο [96]. Ο VEGF διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της αγγειογένεσης, τόσο στη φυσιολογική, όσο και στην παθολογική που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου ή φλεγμονής. Συγκεκριμένα, συμμετέχει στο σχηματισμό αγγείων από πρόδρομα κύτταρα κατά το εμβρυϊκό στάδιο, καθώς και στο σχηματισμό νέων αγγείων από ήδη υπάρχοντα σε μεταγενέστερο αναπτυξιακό στάδιο [97]. Ακόμη, το αιθέριο έλαιο Μαστίχας (0,01-0,02% v/v) μείωσε τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων MVEC και HUVEC, ενώ ανέστειλε και το σχηματισμό κυτταρικών δομών που προσομοιάζουν αγγειακό

δίκτυο, σε συγκεντρώσεις 0,01-0,04% v/v, in vitro. Τέλος, το αιθέριο έλαιο Μαστίχας μείωσε τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης κινάσης ERK1/2, επίσης με τρόπο που εξαρτάται από τη δόση και το χρόνο [96]. Η κινάση ERK 1/2 ανήκει στην οικογένεια των κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα MAPK και αφού φωσφορυλιωθεί μετατοπίζεται στον πυρήνα κι επάγει την έκφραση αυξητικών γονιδίων, ρυθμίζοντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, αλλά και τον κυτταρικό θάνατο [98].

Επίσης, το αιθέριο έλαιο Μαστίχας ανέστειλε την επαγόμενη από κύτταρα καρκινώματος πνεύμονα Lewis (LLC) ανάπτυξη όγκου σε ποντίκια (45mg/kg), καθώς και τον in vitro πολλαπλασιασμό των κυττάρων LLC (0.01-0.02% v/v). Στο μικροπεριβάλλον του όγκου, το αιθέριο έλαιο προκάλεσε απόπτωση, ανέστειλε το σχηματισμό νέων αγγείων και μείωσε την έκφραση της χημειοπροσελκυστικής πρωτεΐνης των μονοκυττάρων (MCP-1) και της MIP-2, ενώ μείωσε και την έκφραση των MCP-1 και VEGF σε κύτταρα LLC in vitro [99]. Η MIP-2 είναι μια χημειοκίνη που συμμετέχει στην προσέλκυση των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων σε περιοχές φλεγμονής ή τραυματισμού ρυθμίζοντας ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις [100]. Επίσης, τόσο στους όγκους των κυττάρων LLC όσο και στα κύτταρα LLC in vitro, το αιθέριο έλαιο Μαστίχας παρατηρήθηκε ότι μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα των Ras και RhoA [99]. Οι πρωτεΐνες Ras και RhoA αποτελούν κυτταρικούς “διακόπτες” μεταγωγής σήματος που συνδέονται με την τριφωσφορική/διφωσφορική γουανωσύνη (GTP/GDP) και μεταπίπτουν από την ενεργή στην ανενεργή κατάσταση, ρυθμίζοντας διάφορα κυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Μεταλλάξεις ρυθμιστών της Ras, καθώς και δυσλειτουργίες στη σηματοδότηση της RhoA έχουν συσχετιστεί με ανάπτυξη ανθρώπινων καρκινωμάτων [101, 102]. Τέλος, το αιθέριο έλαιο Μαστίχας Χίου μείωσε τη μεταγραφική δραστικότητα του NF-κΒ, τόσο στους όγκους κυττάρων LLC in vivo, όσο και σε κύτταρα LLC in vitro [99]. Σε προσπάθεια διαλεύκανσης του μοριακού μηχανισμού της αντι-πολλαπλασιαστικής δράσης που προκαλεί η Μαστίχα Χίου στα κύτταρα LLC, βρέθηκε ότι το Μαστιχέλαιο προκαλεί αλλαγές στο προφίλ έκφρασης 925 γονιδίων. Μεταξύ αυτών, επάγει την αύξηση της έκφρασης ογκο-κατασταλτικών γονιδίων, παρεμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου [103].

## **1.4. Βιολογικές δράσεις των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου καθώς και άλλων ποικιλιών του *Pistacia lentiscus* L.**

### **1.4.1. Αντιμικροβιακές δράσεις**

Έρευνες έχουν φέρει στο φως αντιμικροβιακές δράσεις των φύλλων τόσο του Μαστιχόδεντρου Χίου όσο και άλλων ποικιλιών *Pistacia lentiscus* L.. Πιο συγκεκριμένα, το αιθέριο έλαιο των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου, παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση, in vitro, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των θετικών κατά Gram βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, καθώς και του μύκητα *Candida albicans* [16]. Αντιβακτηριακή και αντι-μεταλλαξογόνο δράση, in vitro, εμφάνισε και το αιθέριο έλαιο των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. της Τυνησίας, έναντι των στελεχών *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* και *Salmonella typhimurium* [26]. Ομοίως, το υδατικό και το φαινολικό εκχύλισμα από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. της

Τυνησίας προκάλεσαν αναστολή της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* και *Staphylococcus aureus*, *in vitro*, καθώς και αντιμεταλλαξογόνο δράση στα στελέχη TA98, TA100 και TA1535 του *Salmonella typhimurium* [104]. Εκχυλίσματα από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. της Αλγερίας παρουσίασαν σημαντική αντιβακτηριακή δράση έναντι των στελεχών *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Listeria monocytogenes*. Ακόμη, τα ίδια εκχυλίσματα εμφάνισαν αντι-μυκητιακή δράση έναντι των στελεχών *Aspergillus flavus*, *Trichoderma* spp. και *Fusarium* spp. [105]. Τέλος, το αιθέριο έλαιο από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. της Σαρδηνίας εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση έναντι βακτηριακών στελεχών της στοματικής κοιλότητας, και συγκεκριμένα των *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* και *Streptococcus gordonii* [27].

#### 1.4.2. Αντιοξειδωτικές δράσεις

Εκτός από τις αντιμικροβιακές δράσεις, αρκετές έρευνες ανέδειξαν και τις αντιοξειδωτικές δράσεις των φύλλων διαφόρων ποικιλιών *Pistacia lentiscus* L. από χώρες της Μεσογείου. Ειδικότερα, τα παράγωγα του galloyl acid από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. της Ιταλίας και συγκεκριμένα τα 5-O-galloyl quinic acid, 3-5-O-digalloyl quinic acid, 3-4-5-O-trigalloyl quinic acid παρατηρήθηκε ότι μπορούν να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες DPPH, σουπεροξειδίου και υδροξυλίου, και να παρεμποδίζουν την οξείδωση της LDL, μέσα από *in vitro* μελέτες. Μάλιστα, δείχθηκε ότι όσο αυξάνονταν οι ομάδες του galloyl αυξανόταν και η δραστηριότητα, με αποτέλεσμα τα 3-5-O-digalloyl quinic acid να 3-4-5-O-trigalloyl quinic acid να αποτελούν πιο αποτελεσματικούς εξουδετερωτές ελευθέρων ριζών συγκριτικά με το 5-O-galloyl quinic acid [106]. Επίσης, μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. της Ιταλίας δείχθηκε ότι μειώνει τις ελεύθερες ρίζες ABTS και DPPH κατά 50% [107]. Το αιθέριο έλαιο των φύλλων του *Pistacia lentiscus* της Σαρδηνίας μπορεί να εξουδετερώσει τις ελεύθερες ρίζες DPPH, *in vitro*, με την αντιοξειδωτική δράση να διαφέρει τόσο μεταξύ των δέντρων των διαφορετικών περιοχών όσο και μεταξύ του διαφορετικού αναπτυξιακού σταδίου του κάθε δέντρου [25]. Εκχυλίσματα φύλλων από το *Pistacia lentiscus* L. της Αλγερίας εμφάνισαν αυξημένη αναγωγική δραστηριότητα και ικανότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου, *in vitro* [105]. Ομοίως, υδατικά και οργανικά εκχυλίσματα των φύλλων από το *Pistacia lentiscus* L. της Αλγερίας ήταν ικανά να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες DPPH κατά 90%, υπεροξειδίου κατά 22-75% και να αναστείλουν την λιπιδική υπεροξείδωση κατά 99%, ενώ η μεγαλύτερη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα παρατηρήθηκε παρουσία των υδατικών εκχυλισμάτων εξανίου και χλωροφορμίου [108].

#### 1.4.3. Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Το αιθέριο έλαιο από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. της Σαρδηνίας εμφάνισε αντιφλεγμονώδη δράση, προκαλώντας αναστολή της δραστηριότητας των COX-1 και COX-2, *in vitro*, με τιμές IC<sub>50</sub> 10,3μg/ml και 6,1μg/ml, αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι τιμές IC<sub>50</sub> της ιβουπροφαίνης που χρησιμοποιήθηκε ως θετικό κοντρόλ ήταν μόνο 7 φορές



χαμηλότερες από τις αντίστοιχες του αιθέριου ελαίου των φύλλων και συγκεκριμένα 1,3μg/ml και 0,87μg/ml, για τις COX-1 και COX-2, αντίστοιχα [27]. Άλλη in vivo έρευνα σε αρουραίους ανέδειξε τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. της Τυνησίας. Ειδικότερα, οργανικά εκχυλίσματα χλωροφορμίου, αιθυλοξικού και μεθανόλης από τα φύλλα προκάλεσαν μείωση έως και 70% του επαγόμενου από την καραγενάνη οιδήματος των κάτω άκρων των αρουραίων, με δοσο-εξαρτώμενο και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Ακόμη, τα παραπάνω εκχυλίσματα μείωσαν έως και 96% τις επαγόμενες από το HCl και την EtOH αλλοιώσεις του γαστρικού βλεννογόνου των ζώων [109].

#### **1.4.4. Αντι-διαβητικές δράσεις**

Επίσης, αιθανολικό εκχύλισμα από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. της Αλγερίας εμφάνισε αντι-διαβητική δράση in vivo. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα των φύλλων ανέστειλε την επαγόμενη από τη στρεπτοζοκίνη (STZ) αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα αρουραίων, σε συγκεντρώσεις 50 και 125mg/kg, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, αποκαθιστώντας μετά από δύο ώρες τη γλυκόζη στα φυσιολογικά της επίπεδα. Η στρεπτοζοκίνη χρησιμοποιείται για την επαγωγή σακχαρώδους διαβήτη σε πειραματόζωα, λόγω της επιλεκτικής ικανότητάς της να προκαλεί κυτταροτοξικότητα στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Ακόμη, το αιθανολικό εκχύλισμα από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. της Αλγερίας ανέστειλε την δραστικότητα της παγκρεατικής α-αμυλάσης, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, in vitro [110]. Η παγκρεατική α-αμυλάση συντίθεται από κύτταρα του παγκρέατος και στη συνέχεια εκκρίνεται στο δωδεκαδάκτυλο, όπου διασπά το άμυλο σε μαλτόζη. Η περεταίρω διάσπαση της μαλτόζης καταλήγει σε παραγωγή γλυκόζης, η οποία έπειτα απορροφάται από τα κύτταρα του λεπτού εντέρου. Γι' αυτό το λόγο, έχουν μελετηθεί εκτενώς πιθανοί αναστολείς της παγκρεατικής α-αμυλάσης, για την θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 [111].

#### **1.4.5. Ηπατο-προστατευτικές δράσεις**

Παράλληλα, αιθανολικά εκχυλίσματα από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. της Αλγερίας, ανέστειλαν την κυτταροτοξικότητα στο ήπαρ αρουραίων σε χαμηλή δόση (50mg/kg), γεγονός που επιβεβαιώθηκε τόσο από τις βιοχημικές παραμέτρους αμινοτρασφεράση της αλανίνης (ALT), αμινοτρασφεράση του ασπαραγινικού (AST), αλκαλική φωσφατάση (ALP) και κρεατινίνη (CREA) όσο και από ιστοπαθολογική εξέταση. Ωστόσο, σε μεγαλύτερη δόση των 250mg/kg παρατηρήθηκε μια τάση για ηπατο-τοξικότητα. Ακόμη, 125mg/kg αιθανολικού εκχυλίσματος των φύλλων μείωσαν την επαγόμενη από την παρακεταμόλη ηπατο-τοξικότητα μέσω αξιολόγησης των βιοχημικών παραμέτρων ALT, AST, ALP και ολικής χολερυθρίνης [110].

#### **1.4.6. Αντι-πολλαπλασιαστικές δράσεις**

Επιπρόσθετα, το μη-πολικό εκχύλισμα από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. της Ιταλίας προκάλεσε μείωση στην κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων νευροβλαστώματος SK-N-BE-(2)C και SH-SY5Y, με δοσο-εξαρτώμενο και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Ακόμη, το μη-πολικό

εκχύλισμα ήταν ικανό να αυξήσει την ενεργότητα της κασπάσης-3 στις παραπάνω κυτταρικές σειρές, με τα κύτταρα SH-SY5Y να είναι τα πιο ευάλωτα στην απόπτωση, στα οποία εντοπίστηκαν και τα πρωτεολύματα της κασπάσης-3 [112].

#### **1.4.7. Νευροπροστατευτικές δράσεις**

Τέλος, αρκετές έρευνες ανέδειξαν τις νευροπροστατευτικές δράσεις των φύλλων διαφόρων ποικιλιών του *Pistacia lentiscus* L.. Πιο συγκεκριμένα, εκχύλισμα από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. της Αλγερίας προκάλεσε αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης, *in vitro*, με τη δράση να οφείλεται πιθανόν στα παράγωγα quercetin που έχουν εντοπιστεί στα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. [113]. Η ακετυλοχολινεστεράση εντοπίζεται στις νευρομυϊκές συνάψεις και καταλύει την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης, ενός νευροδιαβιβαστή, σε χολίνη και οξικό, στη μετασυναπτική μεμβράνη, τερματίζοντας τη νευρική μεταβίβαση [114]. Πολλά φυτικά είδη παράγουν αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, όπως αλκαλοειδή, τερπένια, κουμαρίνες και πολυφαινόλες. Αποτέλεσμα της δράσης τους είναι η αύξηση των επιπέδων της ακετυλοχολίνης στη νευρική σύναψη και η επακόλουθη βελτίωση της χολινεργικής λειτουργίας στον εγκέφαλο, αποτελώντας φάρμακα για τη θεραπεία της νόσου του Alzheimer [115]. Ομοίως, μεθανολικό εκχύλισμα από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* της Ιταλίας, πλούσιο σε πολυφαινολικά συστατικά, παρουσίασε νευροπροστατευτική δράση *in vitro*. Συγκεκριμένα, 25-100μg/ml εκχυλίσματος των φύλλων μείωσαν κατά 50% την κυτταροτοξικότητα στα ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος SK-N-BE-(2)C που προκαλείται από την β-αμυλοειδή πρωτεΐνη [107]. Η β-αμυλοειδής πρωτεΐνη είναι ένα μικροπεπτίδιο μεγέθους 4kDa και η εναπόθεσή της εξωκυτταρικά στον εγκέφαλο έχει συσχετιστεί με την νόσο του Alzheimer [116]. Επίσης, η χορήγηση αιθέριου ελαίου από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. της Σαρδηνίας στον εγκέφαλο αρουραίων ήταν ικανή να παρεμποδίσει την οξειδωση και αποικοδόμηση του εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος, καθώς επίσης και να μειώσει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της COX-2 στον εγκεφαλικό ιστό. Το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ αποτελεί ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, απαραίτητο για την ανάπτυξη και λειτουργία του ανθρώπινου κεντρικού νευρικού συστήματος, η έλλειψη του οποίου έχει συνδεθεί με νευροεκφυλιστικές διαταραχές [117].

### **1.5. Γλυκοκορτικοειδή**

#### **1.5.1. Γενικά περί γλυκοκορτικοειδών**

Τα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoids, GCs) αποτελούν στεροειδείς ορμόνες του στρες, οι οποίες ανακαλύφθηκαν τη δεκαετία του 1940. Διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε βασικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως στη ρύθμιση του μεταβολισμού, στη γνωστική λειτουργία, στην ψυχική υγεία, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην ανάπτυξη, στην αναπαραγωγή και στη φλεγμονή [118]. Αποτελούν τα πλέον συνταγογραφούμενα φάρμακα, λόγω της ισχυρής αντιφλεγμονώδους και ανοσοκατασταλτικής δράσης τους. Χορηγούνται κυρίως για τη θεραπεία αυτοάνοσων, φλεγμονωδών και αλλεργικών διαταραχών, για την αποφυγή απόρριψης του μοσχεύματος, καθώς και ως αντικαρκινικά φάρμακα για τη θεραπεία αιματολογικών καρκίνων

[118], λόγω των ιστοειδικών αποπτωτικών τους δράσεων [119]. Θεωρούνται ορμόνες καταβολισμού, διότι επάγουν την λιπόλυση και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση γλυκερόλης και αμινοξέων, αντίστοιχα, τα οποία χρησιμοποιούνται κατά τη γλυκονεογένεση για την παραγωγή γλυκόζης [120]. Έτσι, η θεραπευτική χρήση των γλυκοκορτικοειδών, ως αντιφλεγμονώδη φάρμακα, ενέχει και κάποιες παρενέργειες. Η χρόνια και παρατεταμένη λήψη τους οδηγεί σε οστεοπόρωση, μυϊκή ατροφία, εναπόθεση λίπους, υπεργλυκαιμία, ανοχή στην ινσουλίνη, ανάπτυξη διαβήτη και υπέρταση. Προκειμένου να περιοριστούν αυτές οι παρενέργειες, κρίνεται αναγκαία η περειαίρω διερεύνηση των βιοχημικών μηχανισμών δράσης των γλυκοκορτικοειδών, καθώς και η χημική τροποποίηση της δομής τους, η ρύθμιση της φαρμακοκινητικής και της μεταφοράς τους. Για αυτό το λόγο τα τελευταία χρόνια γίνονται πολλές προσπάθειες από τους ερευνητές να ανακαλύψουν νέα ή να τροποποιήσουν υπάρχοντα γλυκοκορτικοειδή, ώστε να ενισχύσουν τις επιθυμητές αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών και παράλληλα να περιορίσουν όσο γίνεται περισσότερο τις παρενέργειές τους [118].

### 1.5.2. Σύνθεση γλυκοκορτικοειδών

Τα γλυκοκορτικοειδή εκκρίνονται από τον επινεφριδιακό φλοιό και ασκούν τις δράσεις τους μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών [121]. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεσή τους λαμβάνει χώρα στη στυλιδωτή ζώνη στον επινεφριδιακό φλοιό ως απόκριση τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε στρεσογόνα ερεθίσματα. Πρόδρομο μόριο είναι η χοληστερόλη, η οποία πρωταρχικά μεταφέρεται από την εξωτερική στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Εντός της μιτοχονδριακής μήτρας, η χοληστερόλη μετατρέπεται σε πρεγνενολόνη μέσω του ενζύμου P450<sub>sc</sub>. Έπειτα, η πρεγνενολόνη μεταφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου υδροξυλιώνεται σε 17 $\alpha$ -υδροξυ-πρεγνενολόνη από το ένζυμο P450<sub>c17</sub>, και στη συνέχεια μετατρέπεται σε προγεστερόνη από το ένζυμο 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase). Ακολουθεί η μετατροπή της προγεστερόνης σε 11-δεοξυ-κορτιζόλη από το ένζυμο CYP21, με τελικό στάδιο την μεταφορά της εν νέου στη μιτοχονδριακή μήτρα και την υδροξυλίωσή της σε κορτιζόλη, από το ένζυμο 11 $\beta$ -υδροξυλάση που κωδικοποιείται από το γονίδιο CYP11B1. Στα τρωκτικά το ένζυμο CYP21 μετατρέπει την προγεστερόνη σε 11-δεοξυ-κορτικοστερόνη, η οποία τελικά μετατρέπεται σε κορτικοστερόνη από την 11 $\beta$ -υδροξυλάση [122, 123]. Εκτός από τα επινεφρίδια, τα γλυκοκορτικοειδή παράγονται και από άλλους ιστούς, όπως ο θύμος αδένας, το δέρμα, ο εγκέφαλος, οι πνεύμονες, το έντερο και τα αγγεία [122].

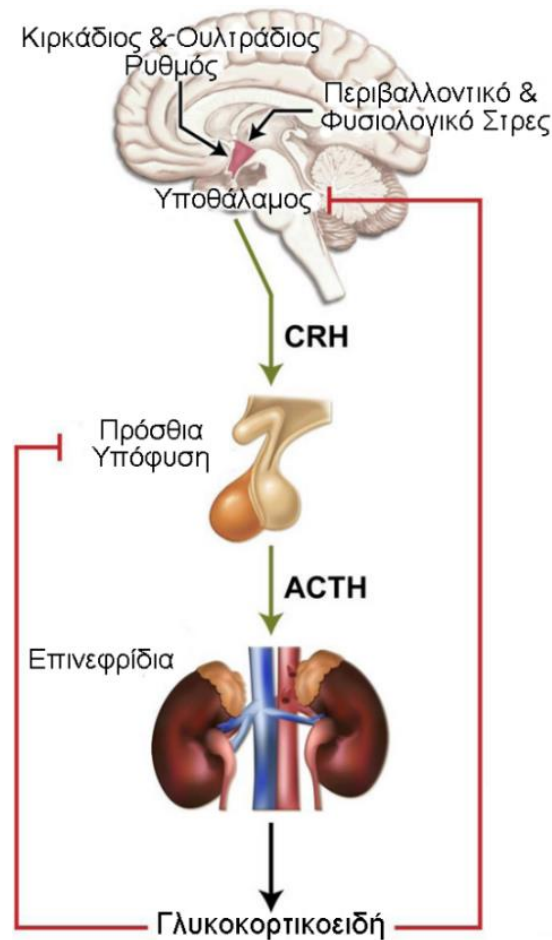
### 1.5.3. Έκκριση γλυκοκορτικοειδών

Η παραγωγή και η έκκριση γλυκοκορτικοειδών ρυθμίζεται από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων, (HPA axis), μέσω ενός συστήματος αρνητικής ανατροφοδότησης [124]. Εναρκτήριο μόριο για την παραγωγή των GCs αποτελεί η ορμόνη απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης (CRH), η παραγωγή της οποίας λαμβάνει χώρα στον υποθάλαμο ως απόκριση στο στρες. Έπειτα, μέσω του αγγειακού δικτύου του υποθαλάμου, η CRH μεταφέρεται στην πρόσθια υπόφυση, όπου προσδένεται στον υποδοχέα CRH-R1 των κορτικοτρόπων κυττάρων της

υπόφυσης, με αποτέλεσμα να επάγει την έκφραση και τη σύνθεση της πρόδρομης πρωτεΐνης προ-οπιομελανοκορτινής (POMC), η οποία πρωτεολύεται, παράγοντας την ορμόνη αδενοκορτικοτροπίνη (ACTH). Στη συνέχεια η ACTH απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος και μεταφέρεται στη σπηλιδωτή ζώνη του επινεφριδιακού φλοιού, όπου επάγει τη μεταφορά της χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια, για να ξεκινήσει η σύνθεση και η παραγωγή των γλυκοκορτικοειδών [125]. Τα γλυκοκορτικοειδή με τη σειρά τους ρυθμίζουν τη δική τους έκκριση μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης, το οποίο είναι σημαντικό για τον τερματισμό της λειτουργίας του άξονα HPA σε καταστάσεις στρες, καθώς και για τη βελτιστοποίηση της έκκρισης σε φυσιολογικές μη στρεσογόνες καταστάσεις. Συγκεκριμένα, τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν τον άξονα HPA μέσω ενός γρήγορου μη γενωμικού μηχανισμού, που διαρκεί από μερικά δευτερόλεπτα έως λεπτά, καθώς και μέσω ενός αργού γενωμικού μηχανισμού, που διαρκεί από μερικές ώρες έως ημέρες. Στην πρώτη περίπτωση, τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την έκκριση των CRH και ACTH, από τον υποθάλαμο και την υπόφυση, αντίστοιχα. Στη δεύτερη περίπτωση, τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για την CRH και την POMC, το πρόδρομο μόριο της ACTH [126].

Η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια πραγματοποιείται με κερκάρδιο και ουλτράδιο ρυθμό. Ο κερκάρδιος ρυθμός αποτελείται από ένα περιοδικό πρότυπο κύκλων ημέρας – νύχτας διάρκειας 24 ωρών, που συγχρονίζει τις βιολογικές λειτουργίες του οργανισμού με τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα [127]. Ο κερκάρδιος ρυθμός έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών ρυθμίζεται από νευρικά σήματα που απελευθερώνονται από τον υπερχιασματικό πυρήνα του υποθαλάμου, ο οποίος αποτελεί το βιολογικό ρολόι του οργανισμού. Στον άνθρωπο, κατά τη διάρκεια της ημέρας, το φως μέσω του αμφιβληστροειδούς επάγει την έκκριση βαζοπρεσίνης από τον υπερχιασματικό πυρήνα του υποθαλάμου, η οποία στη συνέχεια επάγει την έκκριση της CRH από τον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου, αυξάνοντας την έκκριση γλυκοκορτικοειδών κατά τη διάρκεια της ημέρας. Αντίθετα, στα νυχτόβια ζώα, η έκκριση βαζοπρεσίνης από τον υπερχιασματικό πυρήνα αναστέλλει την έκκριση της CRH [128]. Ως αποτέλεσμα, στα νυχτόβια ζώα η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών φτάνει στα μέγιστα επίπεδα τη νύχτα, κατά την οποία τα ζώα εμφανίζουν τη μέγιστη δραστηριότητα και στα ελάχιστα επίπεδα κατά τη διάρκεια της ημέρας [129]. Στον άνθρωπο η μέγιστη έκκριση των γλυκοκορτικοειδών, και συγκεκριμένα της κορτιζόλης, παρατηρείται 8 με 10 το πρωί (250-850nmol/L), ενώ στη συνέχεια η κορτιζόλη αρχίζει να μειώνεται, φτάνοντας τα ελάχιστα επίπεδα από τις 2 έως τις 4 τη νύχτα (110-390nmol/L) [127]. Επίσης, κατά τη διάρκεια του 24ωρου, τα γλυκοκορτικοειδή εκκρίνονται με ταλαντώσεις/παλμούς ανά 60-90 λεπτά (ουλτράδιος ρυθμός). Συγκεκριμένα, έχουν καταγραφεί 12-18 κύριοι παλμοί κορτιζόλης στο πλάσμα, μετά από δειγματοληψίες αίματος από υγιείς εθελοντές ανά 15 λεπτά, κατά τη διάρκεια του 24ωρου [128]. Τα είδη των στρεσογόνων ερεθισμάτων καθορίζουν τόσο τη διάρκεια όσο και την ένταση της απόκρισης του άξονα HPA. Ερεθίσματα μεγάλης έντασης και διάρκειας, όπως για παράδειγμα φλεγμονώδη ερεθίσματα, συνήθως προκαλούν παρατεταμένη απόκριση του άξονα HPA, συνολικής διάρκειας 4-6 ωρών, με κορυφή στις 1-2 ώρες, σε μια προσπάθεια περιορισμού της ανοσολογικής απόκρισης. Αντίθετα, η έκθεση σε φυσιολογικά στρεσογόνα ερεθίσματα, όπως για

παράδειγμα η παραμονή σε ένα περίεργο ή απειλητικό περιβάλλον, οδηγεί σε συντομότερη απόκριση του άξονα HPA, συνολικής διάρκειας 2-3 ωρών, με κορυφή στα 30-60 λεπτά [130].



**Εικόνα 4:** Ρύθμιση της έκκρισης γλυκοκορτικοειδών μέσω του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA). Αρχικά, ο υποθάλαμος εκκρίνει τη CRH ως απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα. Η CRH επάγει την έκκριση της ACTH από την πρόσθια υπόφυση. Η ACTH έπειτα μεταφέρεται στα επινεφρίδια όπου εγείρει την παραγωγή και την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών, με κιρκάδιο και ουλτράδιο ρυθμό. Τα γλυκοκορτικοειδή μέσω ενός συστήματος αρνητικής ανατροφοδότησης αναστέλλουν την έκκριση της CRH από τον υποθάλαμο και της ACTH από την πρόσθια υπόφυση (τροποποίηση από [131]).

#### 1.5.4. Βιοδιαθεσιμότητα γλυκοκορτικοειδών

Εκτός από τη ρύθμιση της παραγωγής και της έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια, η βιοδιαθεσιμότητα τους ρυθμίζεται και σε επίπεδο ιστού και κυττάρου. Το 95% των γλυκοκορτικοειδών που εκκρίνονται στην κυκλοφορία του αίματος συνδέονται με μεταφορικές πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα, το 80-90% παραμένει συνδεδεμένο με σφαιρίνες που συνδέονται στα κορτικοστεροειδή (CBG) και το 10-15% συνδέεται με αλβουμίνη. Αντίθετα, το 5% των γλυκοκορτικοειδών παραμένει ελεύθερο και ενεργό, οπότε διαχέεται μεταξύ των κυτταρικών μεμβρανών και συνδέεται στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Επομένως, η βιοδιαθεσιμότητα των ελεύθερων γλυκοκορτικοειδών καθορίζεται τόσο από τη συγκέντρωση όσο και από την ικανότητα σύνδεσης με τις CBG. Οι CBG αποτελούν μονομερείς

γλυκοπρωτεΐνες που παράγονται κυρίως στο ήπαρ και η σύνθεση και λειτουργία τους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το φύλο, η θερμοκρασία και τα επίπεδα γλυκοζυλίωσης [132].

Σε κυτταρικό επίπεδο, η ενεργότητα των γλυκοκορτικοειδών ρυθμίζεται από το ένζυμο 11β-αφυδρογονάση των υδροξυστεροειδών (11β-HSD), που στον άνθρωπο συναντάται σε δύο ισομορφές. Η ισομορφή 1 (11β-HSD1), καταλύει τη μετατροπή της ανενεργής κορτιζόνης σε ενεργή κορτιζόλη, ενώ η ισομορφή 2 (11β-HSD2) απενεργοποιεί τα γλυκοκορτικοειδή, μετατρέποντας την ενεργή κορτιζόλη σε ανενεργή κορτιζόνη [133, 134]. Στα ενήλικα θηλαστικά, η 11β-HSD1 κατανέμεται σε όλους τους ιστούς, με τη μεγαλύτερη ποσότητα να εντοπίζεται στο ήπαρ. Αντιθέτως, η κατανομή της 11β-HSD2 περιορίζεται σε ιστούς που αποτελούν στόχους της σηματοδότησης της αλδοστερόνης, όπως οι νεφροί, οι ιδρωτοποιοί και σιελογόνοι αδένες, το εντερικό επιθήλιο, το πάγκρεας και ο επινεφριδιακός φλοιός [78]. Σε αντίθεση με τα ενδογενή γλυκοκορτικοειδή, τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή δεν έχουν την ικανότητα σύνδεσης με τις CBG, ούτε μεταβολίζονται από την 11β-HSD2 [78, 134].



**Εικόνα 5:** Ρύθμιση της ενεργότητας των γλυκοκορτικοειδών. Η ανενεργή κορτιζόνη ενεργοποιείται και μετατρέπεται σε ενεργή κορτιζόλη από το ένζυμο 11β-HSD1, ενώ αντίθετα η ενεργή κορτιζόλη απενεργοποιείται και μετατρέπεται σε ανενεργή κορτιζόνη από το ένζυμο 11β-HSD2 (τροποποίηση από [131]).

## 1.6. Υποδοχέας Γλυκοκορτικοειδών (GR)

### 1.6.1. Ταξινόμηση του GR

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών ταξινομικά ανήκει στην υποομάδα 3 της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων. Οι πυρηνικοί υποδοχείς αποτελούν μια υπεροικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, με καθοριστικό ρόλο σε βασικές διεργασίες του κυττάρου, όπως ο μεταβολισμός, η φλεγμονή και η αναπαραγωγή. Ενεργοποιούνται από μικρά λιπόφιλα μόρια, όπως στεροειδή, ρετινοειδή, φωσφολιπίδια, τα οποία συνδέονται πάνω τους, αλλάζοντας τη στερεοδιαμόρφωσή τους με αποτέλεσμα τη σύνδεσή των υποδοχέων σε ειδικές αλληλουχίες στο DNA και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων περιλαμβάνει 7 υποομάδες. Στην υποομάδα 0, ανήκουν οι άτυποι πυρηνικοί υποδοχείς, οι οποίοι διαθέτουν μόνο περιοχή σύνδεσης προσδέτη, και λειτουργούν καταστέλλοντας τη δράση άλλων πυρηνικών υποδοχέων [135]. Στην υποομάδα 1, ανήκουν οι υποδοχείς θυρεοειδών ορμονών, οι υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος, οι υποδοχείς PPAR και οι υποδοχείς της βιταμίνης D. Στην υποομάδα 2 ανήκουν οι ορφανοί υποδοχείς για τους οποίους δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί προσδέτες. Στην

υποομάδα 3 ανήκει η οικογένεια των υποδοχέων στεροειδών ορμονών και συγκεκριμένα, ο υποδοχέας ανδρογόνων, ο υποδοχέας προγεστερονών, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών, ο υποδοχέας μεταλλοκορτικοειδών και οι υποδοχείς οιστρογόνων άλφα και βήτα. Στην υποομάδα 4 ανήκουν οι ορφανοί υποδοχείς NGF-1B, NURR1 και NOR-1. Στη υποομάδα 5 ανήκει ο στεροειδογόνος παράγοντας 1 (Steroidogenic Factor 1) και ο υποδοχέας LRH-1, και τέλος, στην υποομάδα 6 ανήκει ο ορφανός υποδοχέας GCNF (Germ Cell Nuclear Factor) [136].

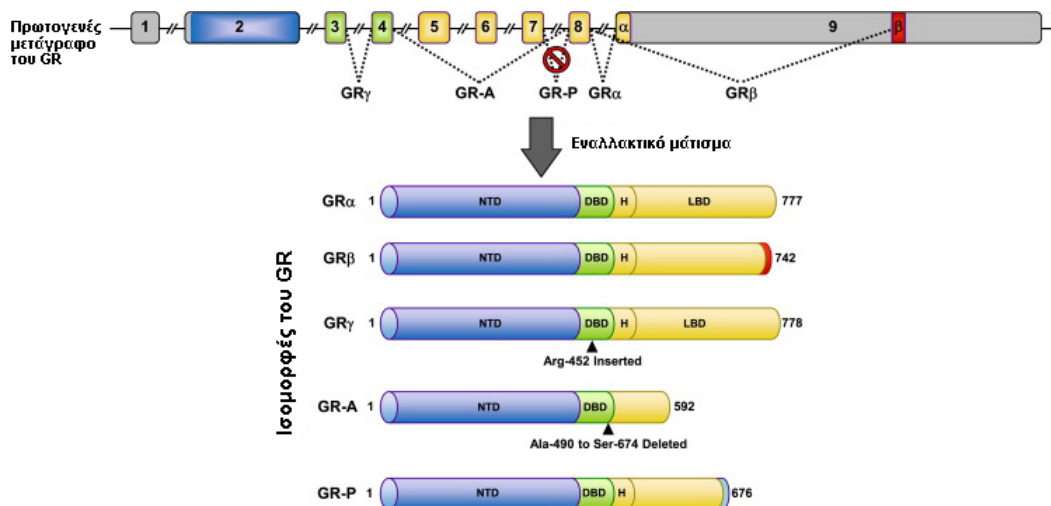
### 1.6.2. Δομή του γονιδίου του GR

Στον άνθρωπο, ο GR κωδικοποιείται από το γονίδιο NR3C1 (Nuclear Receptor subfamily 3 group C member 1) το οποίο εντοπίζεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (5q31Y32). Το αντίστοιχο γονίδιο NR3C1 στον ποντικό εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18. Το ανθρώπινο γονίδιο του GR αποτελείται από 9 εξόνια, εκ των οποίων τα εξόνια 2 έως 9 κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη του GR [121]. Στο εξόνιο 1 βρίσκεται η 5' αμετάφραστη περιοχή (UTR), η οποία περιέχει 9 διαφορετικούς υποκινητές (1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1H, 1I, 1J), προσδίδοντας πολυπλοκότητα και πλαστικότητα στη ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου του GR [137]. Ακόμη, στην 5'UTR βρίσκεται περιοχή με νησίδα CpG, πλούσια σε CG (72%), χωρίς ωστόσο να περιέχει TATA ή CAT box, ενώ η θέση έναρξης της μετάφρασης με το κωδικόνιο έναρξης ATG εντοπίζεται στο εξόνιο 2 [138]. Στους παραπάνω υποκινητές προσδένονται διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως οι AP-1, AP-2, NF-κB, GCrf1 και c-Ets-1/2, οι οποίοι είτε επάγουν είτε καταστέλλουν την έκφραση του γονιδίου του GR. Η πρόσδεση διαφορετικών συνδυασμών μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές του γονιδίου του GR μπορεί να εξηγήσει τις ιστοειδικές δράσεις της σηματοδότησής του. Επίσης, ο ίδιος ο GR έχει την ικανότητα να συνδέεται σε περιοχές του υποκινητή του δικού του γονιδίου, σε στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid response elements, GREs), τόσο μόνος του όσο και σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, ρυθμίζοντας τα επίπεδα έκφρασής του, μέσω ενός αυτο-ρυθμιστικού μηχανισμού [137].

### 1.6.3. Ισομορφές του GR

Το πρωτογενές μετάγραφο του GR υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα κατά τη διαδικασία της μεταγραφής με αποτέλεσμα την παραγωγή 5 διαφορετικών ισομορφών, οι οποίες διαφέρουν στο καρβοξυ-τελικό άκρο. Εναλλακτικό μάτισμα στο εξόνιο 9 δημιουργεί τις ισομορφές hGRα και hGRβ, οι οποίες είναι πανομοιότυπες μέχρι τα πρώτα 727 αμινοξέα και από εκεί και έπειτα διαφέρουν. Συγκεκριμένα, ο GRα αποτελείται από επιπλέον 50αα, έχοντας συνολικό μήκος 777αα, ενώ στον GRβ τα τελευταία 50αα αντικαθίστανται από 15 διαφορετικά, με αποτέλεσμα να έχει σύνολο 742αα [133, 139, 140]. Ο GRα εκφράζεται σε όλους του κυτταρικούς τύπους και ενεργοποιείται μετά την πρόσδεση του προσδέτη. Αντίθετα, ο GRβ παρουσιάζει ιστοειδική κατανομή, δεν διαθέτει ικανότητα σύνδεσης με προσδέτη, αλλά έχει την ικανότητα να συνδέεται με τον GRα και να τον καταστέλλει [141]. Άλλη ισομορφή που έχει εντοπιστεί σε ποσοστό 4-8% είναι η hGRγ. Αυτή σχηματίζεται μετά από την εισαγωγή μιας επιπρόσθετης αργινίνης στο ιντρόνιο που παρεμβάλλεται μεταξύ των εξονίων 3 και 4, με αποτέλεσμα τη μη αποκοπή του

μετά το μάτισμα [139]. Τέλος, άλλες 2 ισομορφές από τις οποίες απουσιάζει μεγάλο τμήμα που κωδικοποιεί για την περιοχή σύνδεσης του προσδέτη είναι η GR-A και η GR-P. Η GR-A προκύπτει μετά από εναλλακτικό μάτισμα στο τέλος του εξονίου 4, ενώνοντάς το με την αρχή του εξονίου 8 και παραλείποντας τα εξόνια 5, 6 και 7, ενώ η GR-P δημιουργείται μετά από αποτυχία ματίσματος στο τέλος του εξονίου 7, με αποτέλεσμα την απουσία των εξονίων 7 και 8 από το τελικό μετάγραφο [142].

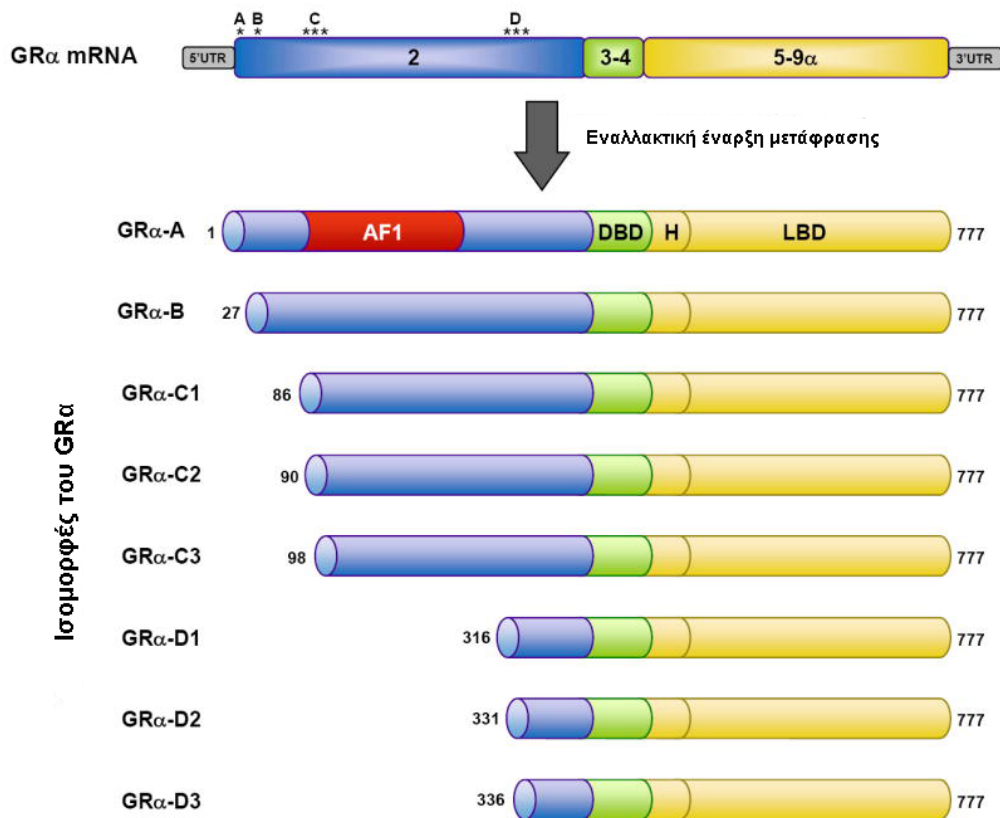


**Εικόνα 6:** Εναλλακτικό μάτισμα του πρωτογενούς μεταγράφου του GR. Το πρωτογενές μετάγραφο του GR διαθέτει 9 εξόνια. Εναλλακτικό μάτισμα στο εξόνιο 9 δημιουργεί τις ισομορφές GRα και GRβ. Η ισομορφή GRγ δημιουργείται από εναλλακτικό μάτισμα μεταξύ των εξονίων 3 και 4, ενώ οι ισομορφές GR-A και GR-P δημιουργούνται έπειτα από εναλλακτικό μάτισμα στα εξόνια 4 και 8, αντίστοιχα (τροποποίηση από [143]).

Το μετάγραφο του hGRα διαθέτει 8 διαφορετικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης στο αμινοτελικό άκρο με αποτέλεσμα το σχηματισμό 8 εναλλακτικών ισομορφών GRα, και συγκεκριμένα των GRα-A, GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D1, GRα-D2 και GRα-D3 [133, 140, 144]. Η GRα-A αποτελεί την πλήρους μήκους ισομορφή με μέγεθος 777 αμινοξέα, και προκύπτει όταν η μετάφραση ξεκινάει από το πρώτο κωδικόνιο έναρξης που αντιστοιχεί στη θέση 1. Οι υπόλοιπες ισομορφές GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D1, GRα-D2 και GRα-D3 προκύπτουν όταν το ριβόσωμα προσπερνάει το πρώτο κωδικόνιο έναρξης και ξεκινάει τη μετάφραση από τις θέσεις 27, 86, 90, 98, 316, 331 και 336, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα να διαφέρουν στο αμινοτελικό άκρο [139]. Λόγω του γεγονότος ότι το καρβοξυτελικό άκρο παραμένει το ίδιο σε αλληλουχία, όλες οι ισομορφές του GRα είναι λειτουργικές και διαθέτουν ικανότητα σύνδεσης με προσδέτη. Όσο αφορά τη μεταγραφική τους δραστηριότητα, έχει δειχθεί ότι η ισομορφή GRα-C3 παρουσιάζει 2 φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα από την αγρίου τύπου GRα-A, ενώ η GRα-D παρουσιάζει περίπου τη μισή μεταγραφική δραστηριότητα της GRα-A. Οι υπόλοιπες ισομορφές GRα-B, -C1 και -C2 εμφανίζουν ενδιάμεση μεταγραφική δραστηριότητα [133]. Η έκφραση των ισομορφών του GRα διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ιστών, αλλά η συνύπαρξη δύο ισομορφών φαίνεται ότι δρα αθροιστικά στην απόκριση του κυττάρου στα γλυκοκορτικοειδή, ως αποτέλεσμα της αθροιστικής μεταγραφικής δραστηριότητας και των δύο [141]. Λόγω του γεγονότος ότι τα μετάγραφα hGRα και hGRβ διαθέτουν πανομοιότυπες



αλληλουχίες όσο αφορά τις θέσεις έναρξης της μετάφρασης, από το μετάγραφο hGRβ προκύπτουν εξίσου 8 ισομορφές, οι GRβ-A, GRβ-B, GRβ-C1, GRβ-C2, GRβ-C3, GRβ-D1, GRβ-D2 και GRβ-D3 [145].



**Εικόνα 7:** Ισομορφές του GRα. Το μετάγραφο του GRα διαθέτει 8 εναλλακτικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης στο αμινοτελικό άκρο, σχηματίζοντας 8 ισομορφές, τις GRα-A, GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D1, GRα-D2 και GRα-D3. Οι ισομορφές διαφέρουν στο αμινοτελικό άκρο, ενώ διαθέτουν πανομοιότυπο καρβοξυτελικό άκρο (τροποποίηση από [143]).

#### 1.6.4. Δομή της πρωτεΐνης του GR

Η δομή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών μοιάζει κατά πολύ με τη δομή των υπόλοιπων υποδοχέων στεροειδών ορμονών και οργανώνεται σε 3 κύριες επικράτειες, την αμινοτελική επικράτεια (NTD), την επικράτεια σύνδεσης στο DNA (DBD) και την επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη (LBD), που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η αμινοτελική επικράτεια είναι η λιγότερο συντηρημένη τόσο μεταξύ των υποδοχέων στεροειδών ορμονών όσο και μεταξύ των διαφορετικών ισομορφών του hGRα. Στην πλήρους μήκους ισομορφή hGRα-A, η NTD καταλαμβάνει τα πρώτα 417 αμινοξέα και περιέχει την ισχυρή περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής με ορμονο-ανεξάρτητο τρόπο, AF-1 [139]. Η NTD αποτελείται από α-έλικες και β-φύλλα, σχηματίζοντας μια υδρόφοβη θήκη μέσα στην οποία συνδέεται ο προσδέτης. Με τη σύνδεση του προσδέτη, οι α-έλικες αλλάζουν διαμόρφωση κλείνοντας τη θήκη και σχηματίζοντας μια νέα επιφάνεια αναγνώρισης και σύνδεσης άλλων μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι περιέχουν μοτίβα λευκίνης LxxLL [146]. Ακόμη, η NTD αποτελεί στόχο κινασών για

φωσφορυλιώσεις, καθώς και περιοχή αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες [147]. Αμέσως μετά την NTD, βρίσκεται η επικράτεια σύνδεσης στο DNA (DBD), από το αμινοξύ 418 έως 487, η οποία είναι υψηλά συντηρημένη και περιέχει 2 μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου, εντός των οποίων βρίσκονται 3 αμινοξέα που συγκροτούν το τμήμα P-box [139]. Η DBD αποτελείται από δύο κάθετα προσανατολισμένες  $\alpha$ -έλικες, η μία από τις οποίες είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση του GR στο DNA, και συγκεκριμένα με τα στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs) [148]. Ακόμη, η DBD περιέχει μια περιοχή διμερισμού του υποδοχέα καθώς και μια περιοχή 1 με σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS1) [139]. Μετά την DBD και πριν την επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη (LBD), παρεμβάλλεται μια μικρή περιοχή, από το αμινοξύ 488 έως 520, που ονομάζεται περιοχή εύκαμπτης σύνδεσης. Έπειτα, ακολουθεί η επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη (LBD), στο καρβοξυτελικό άκρο, από το αμινοξύ 521 έως το 777, η οποία αναγνωρίζει και συνδέει τον προσδέτη πάνω στον υποδοχέα. Στο σύμπλοκο GR/προσδέτη, η LBD αποτελείται από 11  $\alpha$ -έλικες και 4  $\beta$ -κλώνους που σχηματίζουν 2  $\beta$ -πτυχωτά φύλλα [147]. Η LBD περιέχει επίσης μια δεύτερη αλλά ασθενέστερη περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής AF-2, καθώς και μια δεύτερη περιοχή μη σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS2). Τέλος, στην LBD εντοπίζονται αλληλουχίες υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση του GR με πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs) και άλλους πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες, καθώς και αλληλουχίες διμερισμού του υποδοχέα [139].

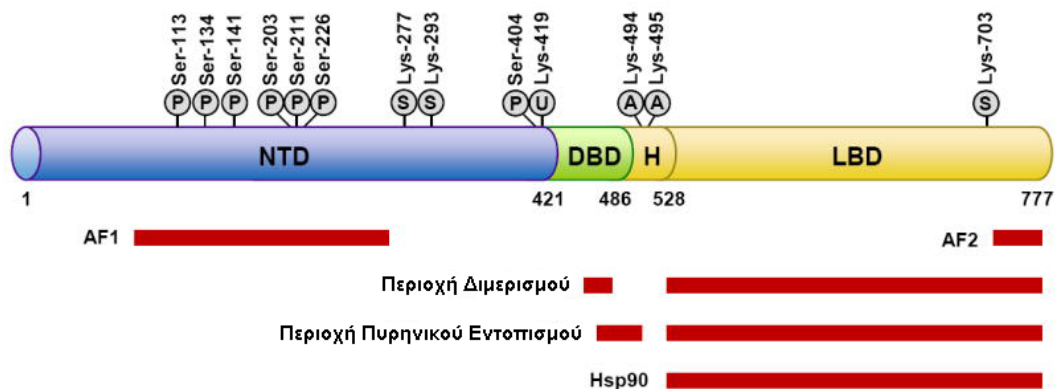
### 1.6.5. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του GR

Ο GR φωσφορυλιώνεται σε 8 κατάλοιπα σερίνης (Ser113, Ser134, Ser141, Ser143, Ser203, Ser211, Ser226 και Ser404) της αμινοτελικής επικράτειας (NTD), με ορμονο-εξαρτώμενο τρόπο [131, 149]. Η φωσφορυλίωση του GR έχειδειχθεί ότι μειώνει το χρόνο ημίσειας ζωής της πρωτεΐνης, ενώ μεταλλάξεις σε διάφορες θέσεις φωσφορυλίωσης οδηγούν σε αύξηση τόσο των πρωτεϊνικών όσο και των επιπέδων mRNA του υποδοχέα [150]. Επίσης, η φωσφορυλίωση σε κάθε ξεχωριστή θέση έχει διαφορετική επίδραση στη λειτουργία του υποδοχέα. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση της Ser211, δημιουργεί αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση της περιοχής AF-1, ευνοώντας την αλληλεπίδραση με συν-ρυθμιστές και αυξάνοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα [151]. Η φωσφορυλίωση της Ser203 οδηγεί τον GR στον πυρήνα του κυττάρου, ενώ η φωσφορυλίωση της Ser226 έχει ως αποτέλεσμα την έξοδο του υποδοχέα από τον πυρήνα [152].

Παράλληλα, ο GR ακετυλιώνεται σε δύο κατάλοιπα λυσίνης (Lys494 και Lys495) [131], τα οποία εντοπίζονται μέσα στην επικράτεια σύνδεσης στο DNA (DBD), ενώ η αποακετυλίωση 2 των ιστονών (HDAC2) καταλύει την απακετυλίωσή του. Έχειδειχθεί ότι η απακετυλίωση του GR, μέσω της HDAC2 είναι απαραίτητο βήμα για την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την υπομονάδα p65 του NF- $\kappa$ B, με αποτέλεσμα την καταστολή της επακόλουθης έκφρασης των προφλεγμονωδών γονιδίων στόχων του NF- $\kappa$ B [140]. Η ακετυλίωση καταλύεται από την ακετυλο-τρανσφεράση CLOCK και έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR. Η ακετυλίωση/απακετυλίωση διαφόρων συν-ρυθμιστών του GR επίσης επηρεάζει τη δραστηριότητά του. Για παράδειγμα, η απακετυλίωση της Hsp90 πρωτεΐνης συνοδού

του GR από την HDAC6 είναι απαραίτητη για τη συναρμολόγηση του συμπλόκου GR/Hsp90, τη σύνδεση του προσδέτη και τη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα [151].

Όσο αφορά τη μεθυλίωση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών δεν έχει αποσαφηνιστεί πώς επηρεάζει τη δραστηριότητά του. Ωστόσο, έχειδειχθεί ότι η μεθυλίωση ορισμένων συν-ενεργοποιητών του GR, όπως του p300 και της HSP90, μπορεί να ρυθμίσει τη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα [136]. Ο GR αποτελεί επίσης στόχο για ουβικουιτυλίωση, σε κατάλοιπα λυσίνης (Lys419), μέσω της οποίας σημαίνεται για να οδηγηθεί στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση, ρυθμίζοντας έτσι τα πρωτεϊνικά του επίπεδα. Έχειδειχθεί ότι η φωσφορύλιωση του GR επιταχύνει τη σύνδεση μορίων ουβικουιτυλίνης σε κατάλοιπα λυσίνης του υποδοχέα, μέσω των ενζύμων E2 και E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης [149]. Ωστόσο, η E3 λιγάση της ουβικουιτίνης μπορεί να δράσει και ως συν-ενεργοποιητής του GR. Ακόμη, ο GR σουμυλιώνεται σε κατάλοιπα λυσίνης, απουσία προσδέτη, σε δύο θέσεις που εντοπίζονται στην αμινοτελική του επικράτεια (Lys277, Lys293) και σε μια τρίτη που εντοπίζεται στην επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη (Lys703) [134]. Η ομάδα SUMO αποτελεί μια πρωτεΐνη 11kDa η οποία συνδέεται σε κατάλοιπα λυσίνης με ομοιοπολικό δεσμό. Η σουμυλίωση του GR στην NTD ασκεί αρνητική επίδραση στη μεταγραφική του δραστηριότητα, ενώ η σουμυλίωση στην LBD ρυθμίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα με τρόπο που εξαρτάται από την αλληλουχία των υποκινητών των γονιδίων στόχων [151]. Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι η σουμυλίωση του GR επάγει την αποικοδόμησή του [134]. Τέλος, ο GR υφίσταται N-νιτροζυλίωση σε κατάλοιπα κυστεΐνης που εντοπίζονται στα μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου, εντός της DBD. Η N-νιτροζυλίωση αποτελεί την σύνδεση ομάδων μονοξειδίου του αζώτου σε ομάδεςθειόλης των καταλοίπων κυστεΐνης, με ομοιοπολικό δεσμό, με ταυτόχρονη απομάκρυνση του  $Zn^{2+}$ . Έχειδειχθεί ότι η N-νιτροζυλίωση του GR παρεμποδίζει τη σύνδεση με τον προσδέτη, το διμερισμό και την πρόσδεση του υποδοχέα στο DNA [136, 152].



**Εικόνα 8:** Δομή της πρωτεΐνης του GR και αμινοξικά κατάλοιπα που αποτελούν θέσεις μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Στο αμινο-τελικό άκρο εντοπίζεται η αμινοτελική επικράτεια (NTD) και διαθέτει περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (AF1). Ακολουθεί η επικράτεια σύνδεσης στο DNA (DBD), εντός της οποίας εντοπίζονται οι περιοχές διμερισμού και πυρηνικού εντοπισμού. Μετά την DBD ακολουθεί η περιοχή εύκαμπτης σύνδεσης (H) και τέλος στο καρβοξυτελικό άκρο εντοπίζεται η επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη (LBD), η οποία διαθέτει επίσης περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (AF2), περιοχή πυρηνικού εντοπισμού, καθώς και περιοχή σύνδεσης με πρωτεΐνες θερμικού σοκ (τροποποίηση από [143]).

### 1.6.6. Ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR

Από έρευνες που έχουν διεξαχθεί έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα mRNA του GR μειώνονται κατά 50-80%, παρουσία γλυκοκορτικοειδών, ενώ η σύνδεση του GR με τον προσδέτη οδηγεί σε μείωση του χρόνου ημίσειας ζωής του από 18 σε 9 ώρες [153]. Έτσι, σε περιπτώσεις συσσώρευσης γλυκοκορτικοειδών στην κυκλοφορία του αίματος, η ίδια η ορμόνη επάγει μία μείωση των επιπέδων του GR, ώστε να αποφευχθεί μια πιθανή υπερ-ενεργοποίηση της σηματοδότησής του. Επίσης, μια παρατεταμένη χορήγηση GCs μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων του GR, μακροπρόθεσμα και μείωση της ευαισθησίας των κυττάρων στα γλυκοκορτικοειδή [153, 154].

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου αποικοδομούνται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR με τρόπο που εξαρτάται από την παρουσία της ορμόνης/προσδέτη περιλαμβάνει την συμμετοχή του μονοπατιού του πρωτεασώματος. Η φωσφορυλίωση του GR λειτουργεί ως σήμα για την αναγνώρισή του από τα ένζυμα E2 και E3 του μονοπατιού της ουβικουιτυλίωσης, με αποτέλεσμα την προσθήκη μονομερών ουβικουιτίνης σε κατάλοιπα λυσίνης. Η πολυουβικουιτυλίωση έπειτα οδηγεί τον GR στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Έχει ταυτοποιηθεί ένα μοτίβο PEST στο αμινοτελικό άκρο του GR πριν από την DBD, το οποίο περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης, αποτελώντας ταυτόχρονα και υποψήφιες θέσεις πολυουβικουιτυλίωσης [154]. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι παρουσία του αναστολέα του πρωτεασώματος MG-132 παρεμποδίζεται η επαγόμενη από τη DEX μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR. Ακόμη, η χορήγηση του MG-132 αυξάνει τη μεταγραφική δραστηριότητα του GR, καθώς και την ευαισθησία των κυττάρων στα γλυκοκορτικοειδή. Μεταλλάγματα των καταλοίπων Lys419 και Lys426 παρεμποδίζουν την επαγόμενη από τον προσδέτη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, ενώ παράλληλα αυξάνουν τη μεταγραφική δραστηριότητά του και την ευαισθησία των κυττάρων στα GCs. Επομένως, τα παραπάνω αμινοξικά κατάλοιπα, αποτελούν θέσεις πολυουβικουιτυλίωσης του GR και λειτουργούν ως σήματα για την αναγνώριση του υποδοχέα από το πρωτεάσωμα και την μετέπειτα αποικοδόμησή του [153, 154]. Ομοίως, από την έρευνα των Deroo B.J. et al., φάνηκε ότι η αναστολή του πρωτεασώματος παρουσία του MG-132 αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, αυξάνει τη μεταγραφική δραστηριότητά του, ενώ παράλληλα μειώνει και την κινητικότητά του εντός του πυρήνα [155].

Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι ο GR αλληλεπιδρά με την β-αρρεστίνη 1, η οποία σταθεροποιεί τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα, ενώ η απώλειά της οδηγεί τον GR για αποικοδόμηση. Η β-αρρεστίνη 1 χαρακτηρίστηκε αρχικά ως αρνητικός ρυθμιστής των υποδοχέων GPCR. Αργότερα, φάνηκε ότι συμμετέχει και σε άλλες διεργασίες, όπως στην πρωτεϊνική μετακίνηση, στην υποκυτταρική ανακατανομή, στη ρύθμιση της μεταγραφής, καθώς και σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση [156]. Από την έρευνα των Petrillo M.G. et al., δείχθηκε ότι η β-αρρεστίνη 1 συνδέεται στο κυτταρόπλασμα με τον GR, απουσία προσδέτη, ενώ η αποσιώπηση του γονιδίου της αποσταθεροποιεί τον υποδοχέα. Συγκεκριμένα, η αποσιώπηση της β-αρρεστίνης 1, σταθεροποιεί τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Pellino-1, η οποία διαθέτει δραστηριότητα E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης. Η Pellino-1, έπειτα συνδέεται στον GR και επάγει την αποικοδόμησή του μέσω του μονοπατιού του πρωτεασώματος. Επομένως, η σύνδεση του GR με την β-αρρεστίνη 1,

παρεμποδίζει την αυξημένη αποικοδόμησή του και αυξάνει τη διάρκεια της μεταγραφικής του δραστηριότητας [156].

### 1.6.7. Σηματοδότηση του GR

#### Κλασικό μονοπάτι

Στο κλασικό μονοπάτι σηματοδότησης, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών ασκεί τις δράσεις του μέσω ενός γενωμικού μηχανισμού, που περιλαμβάνει αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση. Απουσία προσδέτη/ορμόνης, ο GR εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, ως ένα πολύ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο, συνδεδεμένος με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ HSP70, HSP90, HSP56, την p23, τις ανοσοφιλίνες FKBP51, FKBP52, Cyr44 και την PP5β [140]. Οι πρωτεΐνες αυτές διαμορφώνουν τη δομή του συμπλόκου του GR, έτσι ώστε να είναι δεκτικό στη σύνδεση του προσδέτη, σταθεροποιούν τη σύνδεση του προσδέτη στον GR και ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του υποδοχέα [157]. Ακόμη, η σύνδεση του GR με τις παραπάνω πρωτεΐνες παρεμποδίζει τη μετακίνηση του υποδοχέα στον πυρήνα και τη σύνδεσή του στο DNA [152]. Μετά τη σύνδεση του προσδέτη, το σύμπλοκο GR/ορμόνης υφίσταται μια αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωσή του, καθώς και ορισμένες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλιώσεις και ακετυλιώσεις. Αυτή η αλλαγή οδηγεί στην αποδέσμευση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών από τον GR, εκθέτει στην επιφάνεια του υποδοχέα τις δύο περιοχές NLS1 και NLS2 και έπειτα το σύμπλοκο GR/ορμόνης μετατοπίζεται στον πυρήνα διαμέσου των πυρηνικών πόρων. Εντός του πυρήνα, ο GR ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση με τρεις τρόπους: 1) μέσω απευθείας πρόσδεσης στο DNA σε αλληλουχίες απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoids response elements, GREs), 2) μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, 3) μέσω ταυτόχρονης πρόσδεσης στο DNA και σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες [143, 158].

Τα στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή εντοπίζονται στους υποκινητές, σε εξόνια ή σε ιντρόνια των διαφόρων γονιδίων στόχων του GR. Η ομόλογη αλληλουχία των GREs είναι η 5'-GGAACAnnnTGTTCT-3' και αποτελεί ένα ατελές παλίνδρομο με δύο τμήματα έξι ζευγών βάσεων, που τα χωρίζουν τρία τυχαία νουκλεοτίδια. Ο GR προσδένεται στα GREs, ως ομοδιμερές, με κάθε υπομονάδα να συνδέεται στο ένα από τα δύο τμήματα, ενώ τα τρία ενδιάμεσα νουκλεοτίδια έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητα για τον διμερισμό του υποδοχέα. Τα GREs έχουν ενεργοποιητικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, επάγοντας την μεταγραφή των ακόλουθων γονιδίων, και αποκαλούνται ως θετικά ή ενεργοποιητικά GREs (positive GREs). Εκτός από τα ενεργοποιητικά GREs, έχουν ταυτοποιηθεί και άφθονα αρνητικά GREs (negative GREs, nGREs), με την αλληλουχία 5'-CTCCn(0-2v)GGAGA-3', που επίσης αποτελούν παλίνδρομα. Σε αντίθεση με τα θετικά GREs, στα αρνητικά GREs, προσδένονται δύο μονομερή του GR, τα οποία δεν ομοδιμερίζονται [143, 158]. Παρόλο που το γονιδίωμα διαθέτει άφθονα GREs και nGREs, έρευνες έχουν δείξει ότι στην πραγματικότητα μόνο ένα μικρό ποσοστό των συνολικών GREs στο γονιδίωμα καταλαμβάνεται από τον GR. Επίσης, η σύνδεση του GR στα GREs παρουσιάζει ιστο-ειδικότητα, λόγω της διαφορετικής δομής της χρωματίνης από ιστό σε ιστό, η οποία καθορίζει ποια GREs θα είναι προσβάσιμα για τη σύνδεση του υποδοχέα, οδηγώντας σε μεγάλη ετερογένεια της κυτταρικής απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή

[77]. Τέλος, η προσδεσιμότητα του GR στα GREs καθορίζεται και από την εκάστοτε ποσότητα των γλυκοκορτικοειδών στους διαφόρους ιστούς. Σε ορισμένα υπερευαίσθητα GREs ο GR προσδένεται ακόμη και με χαμηλή συγκέντρωση γλυκοκορτικοειδών, ενώ σε άλλα GREs απαιτείται υψηλή συγκέντρωση γλυκοκορτικοειδών, ώστε να προσδεθεί σε αυτά ο GR. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή να εμφανίζει ιστο-ειδικότητα και κυτταροειδικότητα [143].

Όπως προαναφέρθηκε, ένας από τους μηχανισμούς που ο GR ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση είναι μέσω απευθείας πρόσδεσης στο DNA σε αλληλουχίες απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs). Στην περίπτωση που τα GREs βρίσκονται σε κοντινή απόσταση από το TATA-box, ο GR έχει την ικανότητα να στρατολογεί πρωτεΐνες της μεταγραφικής μηχανής, όπως τον μεταγραφικό παράγοντα TFIID, επάγοντας άμεσα την μεταγραφή του γονιδίου στόχου. Στην περίπτωση που τα GREs βρίσκονται σε πιο μακρινή απόσταση από το TATA-box, ο GR έχει την ικανότητα να συνδέεται με πρωτεΐνες συν-ρυθμιστές, οι οποίες λειτουργούν ως γέφυρες, ώστε να στρατολογηθούν οι απαραίτητες πρωτεΐνες της μεταγραφικής μηχανής, για να ξεκινήσει η μεταγραφή του γονιδίου στόχου [159]. Ορισμένοι συν-παράγοντες του GR, οδηγούν σε επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης, ενώ άλλοι που στρατολογούνται μετά την πρόσδεση του GR σε αρνητικά GREs οδηγούν σε καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Ο GR μπορεί επίσης να ρυθμίσει τη γονιδιακή έκφραση μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, η σύνδεση του GR με μέλη της οικογένειας STAT, επάγει τη γονιδιακή έκφραση, ενώ η σύνδεσή του με τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 και NF-κB, καταστέλλει τη γονιδιακή έκφραση. Όσο αφορά την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, σε ορισμένα γονίδια στόχους η καταστολή επιτυγχάνεται μόνο μέσω της αλληλεπίδρασης του GR με τους αντίστοιχους μεταγραφικούς παράγοντες, ενώ για άλλα γονίδια απαιτείται τόσο η αλληλεπίδραση του GR με τους μεταγραφικούς παράγοντες όσο και η αλληλεπίδρασή του με γειτονικές αλληλουχίες GREs στο DNA [143].

#### Μη κλασικό μονοπάτι

Στο μη κλασικό μονοπάτι σηματοδότησης, ο GR ασκεί τις δράσεις του μέσω ενός μη γενωμικού μηχανισμού, επάγοντας γρήγορη κυτταρική απόκριση μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα έως λεπτά, χωρίς να απαιτούνται αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση. Αυτό το μονοπάτι σηματοδότησης ξεκινάει από τον μεμβρανικό GR, ο οποίος είναι αγκυροβολημένος στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Για τη σύνδεση του GR στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, έχειδειχθεί ότι είναι απαραίτητη η μετα-μεταφραστική παλμιτοϋλίωση ενός καταλοίπου κυστεΐνης, εντός ενός συντηρημένου μοτίβου 9-11 αμινοξέων [160]. Με την σύνδεση του προσδέτη το σύμπλοκο του GR υφίσταται αλλαγές στη στεροδιαμόρφωσή του, απελευθερώνοντας τις πρωτεΐνες συνοδούς. Αυτές με τη σειρά τους ενεργοποιούν διάφορες κινάσες, όπως τις PI3K, AKT και MAPK, οι οποίες συμμετέχουν σε καταρράκτες φωσφορυλίωσης, επάγοντας ταχείες κυτταρικές αποκρίσεις [143, 158].

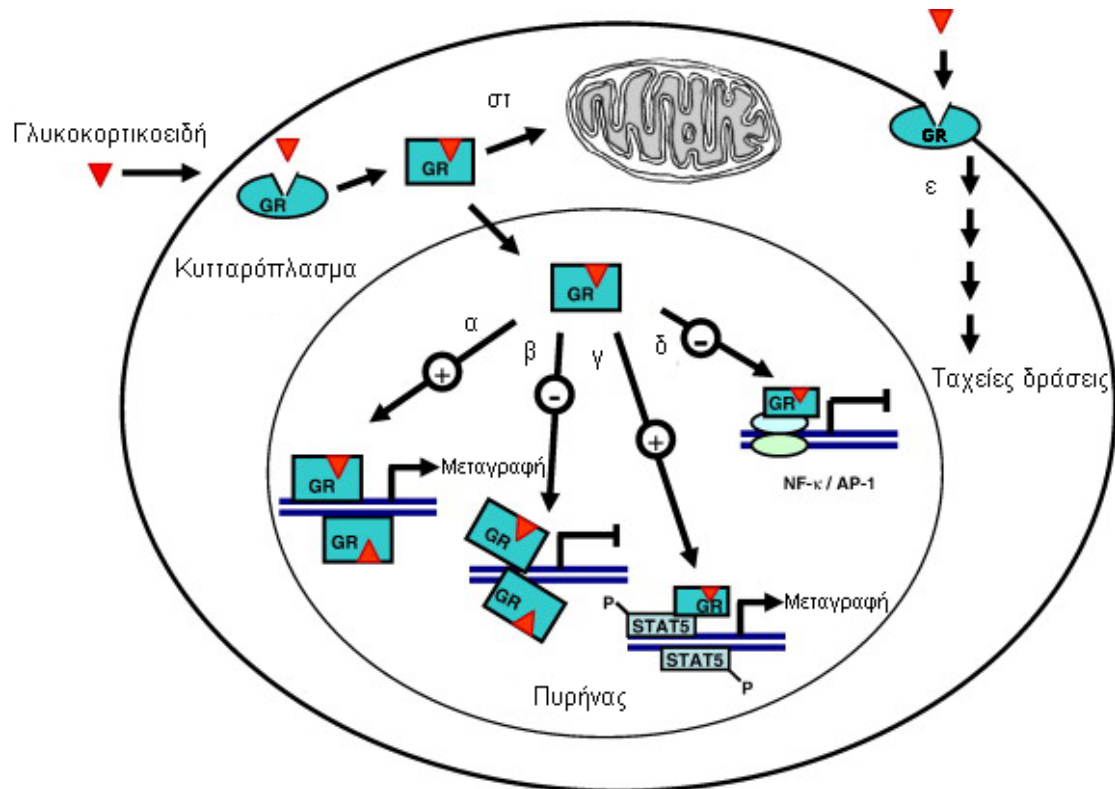
#### Μιτοχονδριακό μονοπάτι

Σημαντικές έρευνες έφεραν στο φως τη μιτοχονδριακή εντόπιση της ισομορφής GRα, σε διάφορους ιστούς, όπως νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του ματιού [161], εγκεφαλικά κύτταρα [162], κύτταρα ηπατοκαρκινώματος HepG2 και ιστεοσαρκώματος SaOS-2 [163-165], κύτταρα HeLa [163, 164], επιθηλιακά κύτταρα του θύμου αδένος και περιοδοντικά κύτταρα [166]. Αντίθετα, η ισομορφή GRβ φαίνεται ότι εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα, και συγκεκριμένα στους πυρηνίσκους, σε κύτταρα HepG2 και SaOS-2. Έχει προταθεί ότι η απουσία μιτοχονδριακού εντοπισμού της ισομορφής GRβ στις παραπάνω κυτταρικές σειρές, έγκειται στο γεγονός ότι η GRβ δεν διαθέτει ικανότητα σύνδεσης με προσδέτη, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η μετακίνησή της διαμέσου της μιτοχονδριακής μεμβράνης [165]. Η παρουσία GRα στα μιτοχόνδρια, καθώς και ορμονο-εξαρτώμενων αλληλουχιών GREs στο μιτοχονδριακό DNA [161, 165], οδήγησε στη διατύπωση της υπόθεσης της απευθείας δράσης των υποδοχέων στα μιτοχόνδρια [163, 167, 168].

Τα μιτοχόνδρια παράγουν το 90% των κυτταρικών απαιτήσεων σε ενέργεια διαμέσου της αναπνευστικής αλυσίδας. Εκτός από αυτό, στα μιτοχόνδρια επιτελούνται πολλές σημαντικές διεργασίες, όπως ο κύκλος του Krebs, η οξείδωση των λιπαρών οξέων, η βιοσύνθεση της αίμης, ενώ συμμετέχουν και στο οξειδωτικό στρες μέσω αναγέννησης ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Τα περισσότερα ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρήνα, ενώ ορισμένα κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακά γονίδια. Παράλληλα, πυρηνικά κωδικοποιούμενες μιτοχονδριακές ρυθμιστικές πρωτεΐνες, μεταβαίνουν στα μιτοχόνδρια όπου επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στη λειτουργία της OXPHOS, θέτοντας τη συνεργασία πυρήνα-μιτοχονδρίου ως απαραίτητη για την παραγωγή ενέργειας. Από έρευνες που έχουν γίνει έχει δείχθει ότι τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν τη βιοσύνθεση των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας με δύο μηχανισμούς. Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει την επαγωγή της μεταγραφής πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν για μιτοχονδριακές ρυθμιστικές πρωτεΐνες και για ένζυμα της OXPHOS, ενώ ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την απευθείας πρόσδεση του συμπλόκου GR/ορμόνης σε αντίστοιχες αλληλουχίες στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και τη μετέπειτα επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας [169, 170].

Στη μελέτη των Psarra A.-M.G. & Sekeris C.E., 2011, χαρακτηρίστηκε ο ρόλος του μιτοχονδριακού GRα σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος HepG2, τα οποία διαθέτουν ενδογενή επίπεδα GRα, καθώς και κύτταρα HepG2 τα οποία υπερεκφράζουν σταθερά τον GRα στα μιτοχόνδρια. Φάνηκε ότι η δεξαμεθαζόνη, που αποτελεί ένα ισχυρό συνθετικό γλυκοκορτικοειδές και αγωνιστή του GRα, προκάλεσε την επαγωγή της έκφρασης των μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων TFAM, TFB1M, TFB2M που κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια, καθώς και επαγωγή της έκφρασης πυρηνικά και μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων της OXPHOS και των μιτοχονδριακών ριβοσωμικών 12S και 16S RNA, σε κύτταρα HepG2. Μάλιστα, σε κύτταρα HepG2 που υπερεκφράζουν τον GRα στα μιτοχόνδρια, η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων της OXPHOS ήταν μεγαλύτερη, ενώ αυξήθηκαν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενης οξειδάσης I του κυτοχρώματος c, που αποτελεί την κύρια υπομονάδα του συμπλόκου IV της αναπνευστικής

αλυσίδας. Ακόμη, η υπερέκφραση του GRα στα μιτοχόνδρια αύξησε το σύνολο της μιτοχονδριακής σύνθεσης RNA, καθώς και της συνολικής παραγωγής ATP. Τέλος, από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης δείχθηκε ότι ο GRα δεσμεύεται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα σε αλληλουχίες που διαθέτουν ομολογία με τα GREs, οι οποίες εντοπίστηκαν κυρίως στη ρυθμιστική περιοχή D-loop, καθώς και σε περιοχές των γονιδίων 12S και NADH I, αλλά λιγότερο ισχυρά [168].



**Εικόνα 9:** Μονοπάτια σηματοδότησης του GRα. Τα γλυκοκορτικοειδή συνδέονται στον GRα στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου προσδένονται άμεσα στο DNA α) επάγοντας ή β) καταστέλλοντας τη μεταγραφή. Εναλλακτικά, το σύμπλοκο GRα-προσδέτη μπορεί να συνδεθεί σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και γ) να επάγει ή δ) να καταστείλει τη μεταγραφή. Ε) τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν επίσης να επάγουν ταχείες μη γενωμικές δράσεις συνδεόμενα στον μεμβρανικό GRα. Στ) τέλος, το σύμπλοκο GR-προσδέτη έχει εντοπιστεί και στα μιτοχόνδρια, όπου ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή (τροποποίηση από [169]).

## 1.7. Φυσιολογικές δράσεις της σηματοδότησης του GR

### 1.7.1. Ο ρόλος της σηματοδότησης του GR στους διάφορους ιστούς

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών εκφράζεται σε διάφορα όργανα και ιστούς του σώματος, με τις επιμέρους δράσεις του να εξαρτώνται από τον τύπο του ιστού και του κυττάρου. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, ο GR συμβάλλει στην ωρίμανση των πνευμόνων, καθώς και στη ρύθμιση της ανάπτυξης του εγκεφάλου, του ήπατος, των επινεφριδίων και του άξονα HPA. Υψηλά επίπεδα GCs στον εγκέφαλο έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση ψυχιατρικών νόσων, ενώ από έρευνες έχει δείχθει ότι η λειτουργία του GR στην περιοχή του εγκεφάλου επηρεάζει τα επίπεδα άγχους. Ακόμη, η λειτουργία του GR στην περιοχή της αμυγδαλής του εγκεφάλου συμβάλλει στη διατήρηση της μνήμης, ενώ στην περιοχή του πρόσθιου εγκεφάλου ρυθμίζει τη λειτουργία του



άξονα HPA. Τα GCs χρησιμοποιούνται για την θεραπεία διαφόρων ειδών φλεγμονής του οφθαλμού, καθώς και για τον περιορισμό της ανάπτυξης νέων αγγείων που ενδεχομένως θα οδηγούσαν σε απώλεια όρασης. Η χρόνια χορήγηση GCs ως θεραπεία μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της οφθαλμικής πίεσης και ανάπτυξη γλαυκώματος. Στον καρδιακό μυ, η αυξημένη συγκέντρωση GCs έχει συνδεθεί με την εμφάνιση καρδιαγγειακών διαταραχών. Σε καταστάσεις στρες τα GCs έχειδειχθεί ότι ασκούν καρδιο-προστατευτική δράση. Τα ενδογενή GCs έχει φανεί ότι μειώνουν τη φλεγμονή των καρδιομυοκυττάρων, ενώ η DEX μπορεί να αναστείλει την καρδιακή υπερτροφία. Όσο αφορά το ανοσοποιητικό σύστημα, τα GCs ασκούν αντι-φλεγμονώδη δράση μέσω σχεδόν όλων των κυττάρων του ανοσοποιητικού και αποτελούν ισχυρά αντι-φλεγμονώδη και ανοσο-κατασταλτικά φάρμακα. Χορηγούνται σε περιπτώσεις μεταμοσχεύσεων για να παρεμποδίσουν την απόρριψη του μοσχεύματος, καθώς και για τη θεραπεία αυτοάνοσων διαταραχών και λεμφωμάτων. Λόγω της αντιφλεγμονώδους δράσης τους, τα GCs χορηγούνται επίσης για τη θεραπεία χρόνιων φλεγμονών των αεραγωγών, όπως το άσθμα. Επίσης, η σηματοδότηση του GR ρυθμίζει την ανάπτυξη, τον μεταβολισμό και την ομοιοστάση της γλυκόζης. Σε καταστάσεις στρες, ο GR επάγει μηχανισμούς γλυκονεογένεσης και γλυκογονόλυσης, με σκοπό την αποκατάσταση των επιπέδων της γλυκόζης. Ωστόσο, η υπέρμετρη παραγωγή GCs, όπως στην περίπτωση του συνδρόμου Cushing, οδηγεί σε υπεργλυκαιμία, υπερχοληστερολαιμία, ανάπτυξη λιπώδους ήπατος και παχυσαρκία. Όσο αφορά το αναπαραγωγικό σύστημα, τα GCs έχειδειχθεί ότι ρυθμίζουν την ανάπτυξη των γονάδων αδένων και στα δύο φύλα, επηρεάζοντας τη γονιμότητα. Τα υψηλά επίπεδα GCs έχουν συνδεθεί με διαταραχές στο αναπαραγωγικό σύστημα, ενώ η παρατεταμένη έκθεση των εμβρύων στα GCs έχει συνδεθεί με μετέπειτα διαταραχές της γονιμότητας. Ακόμη, η χρόνια χορήγηση GCs ή η υπέρμετρη παραγωγή ενδογενών GCs προκαλεί ατροφία των σκελετικών μυών. Συγκεκριμένα, αυξάνει τον καταβολισμό και μειώνει τον αναβολισμό στους μύες, με αποτέλεσμα την αυξημένη πρωτεϊνική αποικοδόμηση. Ωστόσο, τα GCs χορηγούνται και για θεραπεία μυοσκελετικών διαταραχών, όπως της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, που αποτελεί μια αυτοάνοση φλεγμονή των αρθρώσεων. Τέλος, η αυξημένη παραγωγή GCs μπορεί να προκαλέσει οστεοπόρωση, καθώς τα GCs αυξάνουν το χρόνο ζωής των οστεοκλαστών, ενώ ταυτόχρονα μειώνουν το χρόνο ζωής των οστεοβλαστών [131].

### **1.7.2. Μηχανισμοί επαγωγής γλυκονεογένεσης από τη σηματοδότηση του GR**

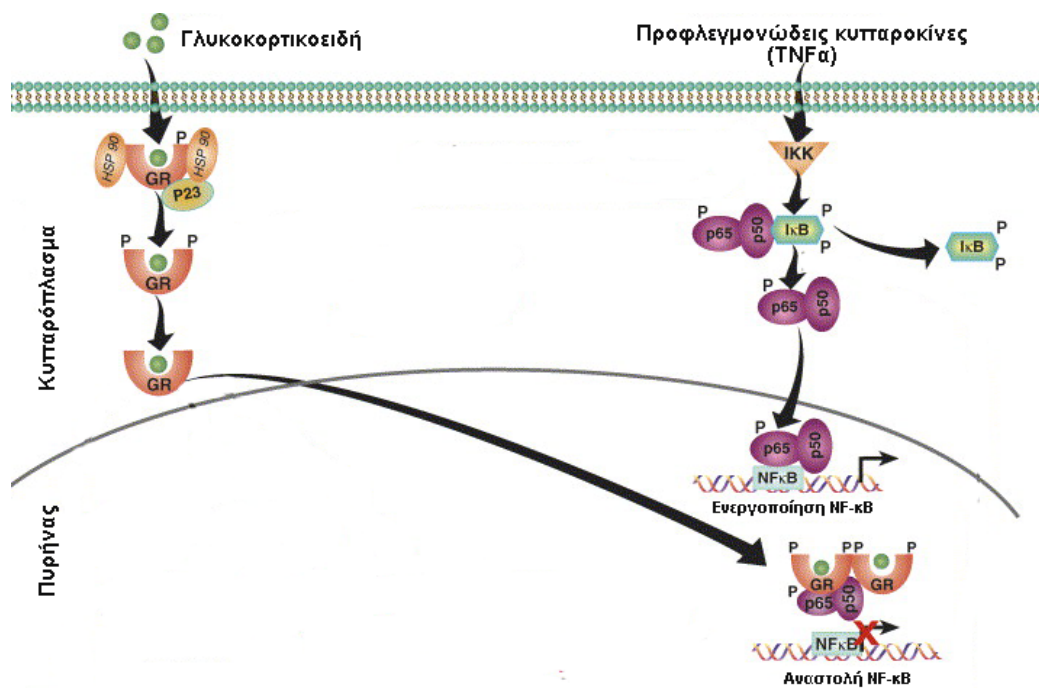
Έρευνες έχουν δείξει ότι η υπερενεργοποίηση του άξονα HPA σε καταστάσεις στρες οδηγεί σε υπέρμετρη παραγωγή κορτιζόλης. Η χρόνια παραγωγή κορτιζόλης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την υπεργλυκαιμία, υπερλιπιδαιμία, αντίσταση στην ινσουλίνη και φλεγμονή, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη τύπου II. Σε μοριακό επίπεδο, τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν τη γλυκονεογένεση, μέσω επαγωγής της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για γλυκονεογενετικά ένζυμα, μέσω απευθείας σύνδεσης σε GREs. Μερικά γονίδια που αποτελούν άμεσο στόχο της σηματοδότησης του GR είναι αυτά της PEPCK, της αμινοτρανφεράσης της τυροσίνης (TAT), της καταλυτικής υπομονάδας της φωσφατάσης της 6-γλυκόζης (G6PC) και της 6-φωσφοφρουκτο-2-κινάσης/φρουκτόζη-2,6-διφωσφατάσης 1 (PKFFB1) και τα οποία συμμετέχουν στο γλυκονεογενετικό μονοπάτι. Ακόμη, τα GCs, μέσω της

σηματοδότησης του GR, επάγουν την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον GLUT4, αλλά παράλληλα παρεμποδίζουν τη μετακίνησή του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη [171]. Ο GLUT4 εκφράζεται σε υψηλές ποσότητες στους σκελετικούς μύες και στον λιπώδη ιστό και εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά γλυκόζης από την κυκλοφορία στο εσωτερικό του κυττάρου, μέσω ενός μηχανισμού διευκολυνόμενης διάχυσης. Ως εκ τούτου, αποτελεί σημαντικό διαμεσολαβητή της μείωσης της συγκέντρωσης της γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος, καθώς και ρυθμιστή της ομοιόστασης της συνολικής γλυκόζης του οργανισμού [172]. Επομένως, η παρεμπόδιση της μετακίνησης του GLUT4 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη από τη σηματοδότηση των GCs, παρεμποδίζει και την είσοδο της γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συγκέντρωσή της στο αίμα και να προκαλείται υπεργλυκαιμία. Ένα ακόμη γονίδιο στόχος της άμεσης σηματοδότησης του GR είναι αυτό της κινάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού 4 (PDK4) [171]. Η PDK4 φωσφορυλιώνει κι απενεργοποιεί την αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού (PDH), η οποία αποτελεί ένα μιτοχονδριακό σύμπλοκο που μετατρέπει το πυροσταφυλικό σε ακετύλο-συνένζυμο Α. Σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα mRNA της PDK4 σε βιοψίες μυών [173]. Έχει δειχθεί ότι τα GCs αυξάνουν την έκφραση της PDK4 με αποτέλεσμα τη μειωμένη δραστηριότητα της PDH, τη συσσώρευση πυροσταφυλικού και την επακόλουθη αναστολή της οξείδωσης της γλυκόζης [171].

### **1.7.3. Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της σηματοδότησης του GR**

Τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν ισχυρή ανοσοκατασταλτική και αντιφλεγμονώδη δράση, συμμετέχοντας τόσο στην πυροδότηση όσο και στη συνέχιση και στον τερματισμό της φλεγμονώδους απόκρισης. Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλοκο GR-προσδέτη αναστέλλει μεταγραφικούς παράγοντες που συμμετέχουν στο μονοπάτι της σηματοδότησης του υποδοχέα Toll-like (TLR), όπως τον NF-κB, ενώ παράλληλα επάγει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για αναστολείς της σηματοδότησης του TLR [174]. Οι υποδοχείς TLR βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και αναγνωρίζουν εξωτερικά σήματα/ερεθίσματα, όπως προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, τμήματα από βακτήρια, μύκητες και ιούς, ενεργοποιούνται και επάγουν άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια καθοδικά, όπως το μονοπάτι του NF-κB, το οποίο οδηγεί σε επαγωγή φλεγμονής. Ο NF-κB αποτελεί έναν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή μεταγραφικό παράγοντα, αποτελούμενο από τις υπομονάδες p65 (Rel A), c-Rel, Rel B, p52/p100 και p50/p105, με το κυρίαρχο ετεροδιμερές να είναι το p65/p50. Όπως προαναφέρθηκε, στην ανενεργή του κατάσταση το διμερές του NF-κB βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, συνδεδεμένο με τον αναστολέα IκB, παρεμποδίζοντας την μετατόπισή του στον πυρήνα [175]. Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης των υποδοχέων TLR από εξωτερικά ερεθίσματα οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης IKK, η οποία φωσφορυλιώνει τον αναστολέα IκB και τον οδηγεί στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται το διμερές του NF-κB. Το ελεύθερο πλέον διμερές του NF-κB, αποτελούμενο από τις υπομονάδες p50/p65, μετατοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου επάγει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (πχ. TNFα, IL-6, IL-1) και χημειοκίνες [176, 177]. Το σύμπλοκο GR/προσδέτη μπλοκάρει τη σηματοδότηση του NF-κB, μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με την

υπομονάδα p65, με αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κB και την μετέπειτα καταστολή της φλεγμονής [164, 175, 178].



**Εικόνα 10:** Αναστολή της σηματοδότησης του NF-κB από τα γλυκοκορτικοειδή. Προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως ο TNFα, οδηγούν στην ενεργοποίηση της κινάσης IKK, η οποία οδηγεί στην πρωτεόλυση του αναστολέα IκB, με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται το διμερές του NF-κB και να μετατοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου επάγει την έκφραση προ-φλεγμονωδών γονιδίων. Το σύμπλοκο GR-προσδέτη συνδέεται άμεσα με την υπομονάδα p65 του NF-κB, αναστέλλοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB (τροποποίηση από [175]).

Η σηματοδότηση των υποδοχέων TLR οδηγεί επίσης στην ενεργοποίηση καθοδικά του μεταγραφικού παράγοντα AP-1, οποίος εισέρχεται κι αυτός στον πυρήνα του κυττάρου κι επάγει την έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων, πυροδοτώντας την έναρξη της φλεγμονώδους απόκρισης [176]. Ο AP-1 αποτελεί ένα ομοδιμερές ή ετεροδιμερές σύμπλοκο, στο οποίο η μία υπομονάδα είναι ένα από τα μέλη της οικογένειας Jun (c-Jun, v-Jun, Jun-B, Jun-D), ενώ η άλλη είναι ένα από τα μέλη της οικογένειας Fos (c-Fos, Fos-B, Fra-1, Fra-2). Έχει βρεθεί ότι τα ετεροδιμερή Fos/Jun έχουν μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης στο DNA από ότι τα μονομερή Jun/Jun. Όταν εισέλθει στον πυρήνα του κυττάρου, το διμερές AP-1 επάγει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για κυτταροκίνες, καθώς και για ένζυμα που καταστρέφουν τον φλεγμαίνοντα ιστό, όπως η κολλαγενάση. Ο μηχανισμός με τον οποίο το σύμπλοκο GR/προσδέτη καταστέλλει τη σηματοδότηση του AP-1 είναι παρόμοιος με αυτόν του NF-κB, μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με την υπομονάδα c-Jun, με αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του AP-1 και την ακόλουθη καταστολή της φλεγμονής [164, 175, 178].

Εκτός από τους μηχανισμούς της trans-μεταγραφικής καταστολής, ο GR καταστέλλει τη φλεγμονή και μέσω επαγωγής της έκφρασης αντι-φλεγμονωδών γονιδίων, όπως αυτό που

κωδικοποιεί για την φωσφατάση 1 της MAPK (MKP-1) [175, 179]. Οι κινάσες MAPK έχει φανεί ότι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονώδους απόκρισης. Συγκεκριμένα, το μονοπάτι p38 MAPK έχει δείχθει ότι σταθεροποιεί τα mRNA διαφόρων κυτταροκινών, όπως των TNF $\alpha$ , COX-2, IL-6 και IL-8. Το σύμπλοκο GR/προσδέτη αυξάνει τη μεταγραφή του γονιδίου της φωσφατάσης MKP-1, η οποία με τη σειρά της μπλοκάρει τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της p38 MAPK, αποσταθεροποιώντας τα mRNA φλεγμονωδών γονιδίων [175]. Άλλα αντι-φλεγμονώδη γονίδια που επάγονται από τη σηματοδότηση των GCs είναι αυτά που κωδικοποιούν για ανεξίνη-1, I $\kappa$ B $\alpha$ , τριστετραπρολίνη (TTP), φερμουάρ λευκίνης που επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή (GILZ), αναστολέα της λευκοπρωτεάσης του ορού, ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 και νευρική ενδοπεπτιδάση [178].

Παράλληλα, κατά τη διάρκεια της φλεγμονής παρατηρείται διαστολή των αγγείων στον φλεγμαίνοντα ιστό. Τα GCs έχει δείχθει ότι αναστέλλουν την παραγωγή εικοσανοειδών, τα οποία είναι απαραίτητα για την διαστολή των αγγείων και την αύξηση της διαπερατότητάς τους. Ακόμη, τα GCs έχει δείχθει ότι μειώνουν την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για τις ICAM-1 και VCAM-1, οι οποίες συνδέονται με ντεγκρίνες διαμεμβρανικά, σταθεροποιώντας αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων του ανοσοποιητικού, όπως λευκοκυττάρων, στο σημείο της φλεγμονής. Επίσης, τα γλυκοκορτικοειδή έχει δείχθει ότι επάγουν την επαγόμενη από τα μακροφάγα και μονοκύτταρα φαγοκυττάρωση αποπτωτικών κυττάρων στον φλεγμαίνοντα ιστό καθώς και την υπερέκφραση αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως της IL-10, τερματίζοντας την φλεγμονή [174]. Τέλος, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα GCs μπορούν να ασκούν αντιφλεγμονώδη δράση με μηχανισμό που δεν περιλαμβάνει αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση. Πιο συγκεκριμένα, η σηματοδότηση των GCs οδηγεί σε ενεργοποίηση της κινάσης PI3K (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase), η οποία έπειτα φωσφορυλιώνει κι ενεργοποιεί την κινάση Akt. Η φωσφορυλιωμένη Akt με τη σειρά της φωσφορυλιώνει κι ενεργοποιεί την συνθετάση του ενδοθηλιακού νιτρικού οξειδίου (eNOS), η οποία οδηγεί σε παραγωγή οξειδίου του αζώτου και μείωση της φλεγμονής [179].

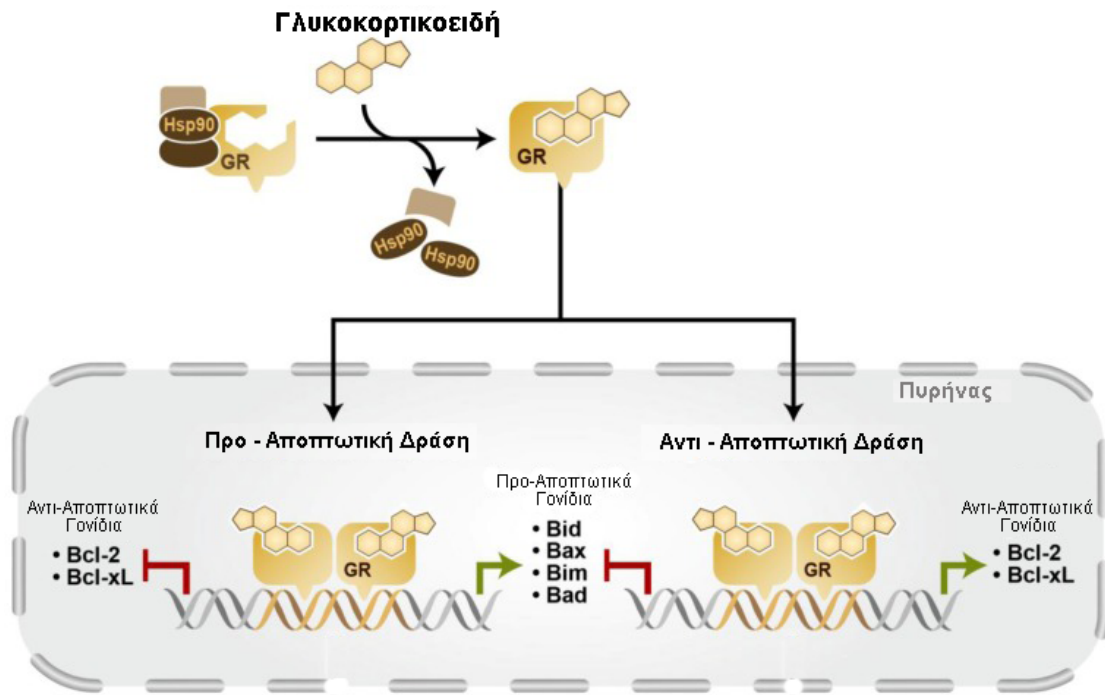
#### **1.7.4. Μηχανισμοί αποπτωτικής/αντι-αποπτωτικής δράσης της σηματοδότησης του GR**

Η σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών μέσω του υποδοχέα τους μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα είτε την επαγωγή είτε την καταστολή των μηχανισμών της απόπτωσης, με το τελικό αποτέλεσμα να εξαρτάται τόσο από τον ιστό όσο και από τον κυτταρικό τύπο. Ο κλασικός μηχανισμός μέσω του οποίου η σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών οδηγεί σε επαγωγή της απόπτωσης είναι μέσω του εσωτερικού/μιτοχονδριακού αποπτωτικού μηχανισμού. Συγκεκριμένα, η σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών αυξάνει τα επίπεδα της bim, μια προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης της οικογένειας Bcl-2. Στη συνέχεια η bim ενεργοποιεί τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες bax και bak, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, που οδηγεί τελικά στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9 και της κασπάσης-3, και την έναρξη της διαδικασίας της απόπτωσης. Ακόμη, η σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση άλλων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως των bad και puma, ή

σε μείωση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως των bcl-2 και bcl-xL. Αντίθετα, σε περιπτώσεις όπου η σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών οδηγεί σε κυτταρική επιβίωση, προηγείται μείωση των επιπέδων των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bim, bid, bax και bad, ή/και αύξηση των επιπέδων των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2 και bcl-xL [119].

Έρευνες έχουν δείξει ότι η μακροχρόνια ή υψηλή δόση γλυκοκορτικοειδών μπορεί να προκαλέσει οστεοπόρωση μέσω επαγωγής απόπτωσης των οστεοβλαστών, των κυττάρων δηλαδή που ευθύνονται για το σχηματισμό των οστών, ενώ μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική επιβίωση των οστεοκλαστών, που είναι υπεύθυνοι για την απορρόφηση των οστών. Επίσης, η σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών επάγει απόπτωση σε μυϊκά κύτταρα ή μυϊκές ίνες, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μυοπαθειών και μυϊκής αδυναμίας σε άτομα που λαμβάνουν χρόνια θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή. Έρευνες έχουν δείξει ότι τα GCs προκαλούν απόπτωση στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων της κυκλοφορίας του αίματος, συνεισφέροντας στην εμφάνιση υπέρτασης. Παράλληλα, έχειδειχθεί ότι η παρατεταμένη ή υψηλή δόση GCs επάγει απόπτωση σε κύτταρα του οφθαλμού, προκαλώντας οφθαλμική πίεση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε γλαύκωμα. Ωστόσο, και άλλοι νευρικοί ιστοί είναι ευάλωτοι στην επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση, όπως ο ιππόκαμπος του εγκεφάλου, οδηγώντας σε εμφάνιση κατάθλιψης και άλλων ψυχιατρικών διαταραχών. Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν επίσης να προκαλέσουν απόπτωση σε παγκρεατικά β-κύτταρα και να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη διαβήτη τύπου II, μέσω μείωσης της έκκρισης ινσουλίνης. Τέλος, έρευνες αναφέρουν ότι τα GCs επάγουν απόπτωση σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως θυμοκύτταρα, T-κύτταρα, B-κύτταρα, μακροφάγα, ώριμα δενδριτικά κύτταρα, ηωσινόφιλα και φυσικά φονικά κύτταρα, ενισχύοντας τις ανοσοκατασταλτικές τους δράσεις [119].

Αντίθετα, σε άλλους κυτταρικούς τύπους, όπως για παράδειγμα στα ουδετερόφιλα ή σε κύτταρα των ωοθηκών, η σηματοδότηση των GCs αναστέλλει την απόπτωση. Στα κερατινοκύτταρα, η παρουσία της DEX προστατεύει από την απόπτωση που προκαλείται από ακτινοβολία UV. Ακόμη, στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα, η DEX αναστέλλει την απόπτωση που προκαλείται από την ιντερφερόνη-γ (IFN-gamma). Η DEX ασκεί επίσης προστατευτικές δράσεις στα ηπατοκύτταρα, όπου έχειδειχθεί ότι προκαλεί αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2 και bcl-xL και μείωση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης bax. Στα κύτταρα του λιπώδους ιστού, η DEX δείχθηκε ότι προστατεύει από την απόπτωση που προκαλεί ο TNFα. Ακόμη, τα GCs ασκούν προστατευτικές δράσεις στην καρδιά και τους νεφρούς. Ειδικότερα, τα GCs αναστέλλουν την απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων και προστατεύουν τον καρδιακό μυ από ισχαιμικό επεισόδιο. Όσο αφορά τους νεφρούς, έχειδειχθεί ότι η DEX μειώνει τα επίπεδα της p53 και αυξάνει τα επίπεδα της bcl-2 [119].



**Εικόνα 11:** Μηχανισμοί επαγωγής προ-αποπτωτικής/αντι-αποπτωτικής δράσης από τα γλυκοκορτικοειδή. Τα γλυκοκορτικοειδή είτε μπλοκάρουν την έκφραση αντι-αποπτωτικών είτε επάγουν την έκφραση προ-αποπτωτικών γονιδίων οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση. Αντίθετα, σε άλλους κυτταρικούς τύπους, τα γλυκοκορτικοειδή είτε μπλοκάρουν την έκφραση προ-αποπτωτικών γονιδίων είτε επάγουν την έκφραση αντι-αποπτωτικών γονιδίων, αναστέλλοντας την απόπτωση (τροποποίηση από [119]).

## 1.8. Εμπλοκή του GR στη σηματοδότηση της AMPK

### 1.8.1. Δομή και ενεργοποίηση της AMPK

Όλες οι φυσιολογικές διαδικασίες του κυττάρου πραγματοποιούνται με την ενέργεια που παρέχει η υδρόλυση της τριφωσφορικής (ATP) σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP). Γι' αυτό το λόγο, είναι αναγκαία η διατήρηση της συγκέντρωσης της ATP σε σταθερά επίπεδα, περίπου 5mM για τα κύτταρα των θηλαστικών, αντισταθμίζοντας τις αυξομειώσεις που λαμβάνουν χώρα. Ένας από τους μηχανισμούς που διαθέτει το κύτταρο για να ανιχνεύει και να αποκαθιστά τις μεταβολές στη συγκέντρωση της ATP είναι η πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από τη μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMPK). Η βασική λειτουργία της AMPK είναι να ρυθμίζει τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής ATP, επάγοντας μονοπάτια που οδηγούν σε παραγωγή ATP και παράλληλα αναστέλλοντας μονοπάτια που καταναλώνουν ATP [180, 181]. Από δομικής άποψης, η AMPK είναι ένα τριμερές σύμπλεγμα αποτελούμενο από τις υπομονάδες α, β και γ. Η υπομονάδα α περιέχει την καταλυτική περιοχή κινάσης, ενώ οι β και γ έχουν ρυθμιστικό ρόλο. Η AMPK ενεργοποιείται ανταποκρινόμενη σε αλλαγές των ενεργειακών επιπέδων, και συγκεκριμένα όταν μειώνονται οι λόγοι ATP/ADP ή ATP/AMP. Απαραίτητο βήμα για την ενεργοποίηση της AMPK είναι η πρόσδεση μονομερών AMP στην ρυθμιστική υπομονάδα γ. Η πρόσδεση της AMP επάγει τη φωσφορυλίωση της Thr172 που βρίσκεται στην υπομονάδα α, προστατεύει την Thr172 από τη δράση φωσφατασών και επάγει την ενεργοποίηση της AMPK με αλλοστερικό μηχανισμό. Συγκεκριμένα, το AMP διευκολύνει την αλληλεπίδραση της AMPK με την αζίνη, η οποία επιτρέπει τη φωσφορυλίωση της Thr172 από την κινάση LKB1 και την ακόλουθη ενεργοποίηση

της AMPK. Ακόμη, η AMPK μπορεί να φωσφορυλιωθεί στη Thr172 και να ενεργοποιηθεί από την κινάση CAMKK2, αποκρινόμενη σε αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου [181, 182].

### **1.8.2. Επίδραση της AMPK στις κυτταρικές λειτουργίες**

Η AMPK εκφράζεται στο μεγαλύτερο μέρος του εγκεφάλου και συμμετέχει στον έλεγχο της όρεξης. Κατά τη διάρκεια της νηστείας παρατηρείται αυξημένη ενεργότητα της AMPK, η οποία οδηγεί στη αύξηση σημάτων που επιταχύνουν την όρεξη. Αντίθετα, μετά τη λήψη τροφής η ενεργότητα της AMPK μειώνεται, καταστέλλοντας τα σήματα που επιταχύνουν την όρεξη. Όσο αφορά τους περιφερικούς ιστούς, η AMPK εκφράζεται σε σκελετικούς μύες, ήπαρ, λιπώδη ιστό και μυοκάρδιο [183]. Όπως προαναφέρθηκε, όταν η συγκέντρωση της ATP μειώνεται, η AMPK ενεργοποιείται, προωθώντας καταβολικές διεργασίες που οδηγούν σε παραγωγή ATP, και παράλληλα αναστέλλοντας αναβολικές διεργασίες που δαπανούν ATP. Όσο αφορά το μεταβολισμό της γλυκόζης, η ενεργοποιημένη AMPK φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες-στόχους που επάγουν την μετακίνηση των GLUT1 και GLUT4 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, με αποτέλεσμα την αύξηση της εισόδου γλυκόζης εντός του κυττάρου [182, 183]. Ακόμη, φωσφορυλιώνει την φωσφολιπάση D1 (PLD1), που οδηγεί σε αύξηση των εισροών γλυκόζης με έμμεσο τρόπο. Ακόμη, η AMPK φωσφορυλιώνει την PFKFB3, επάγοντας τη γλυκολυτική πορεία προς παραγωγή ATP [182].

### **1.8.3. Διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ της σηματοδότησης της AMPK και του GR**

Τόσο το σηματοδοτικό μονοπάτι της AMPK όσο και το σηματοδοτικό μονοπάτι του GR διασταυρώνονται σε διάφορα σημεία. Σε *in vivo* πειράματα με αρουραίους, η ενεργοποίηση της AMPK ανέστειλε την επαγωγή του μεταβολισμού της γλυκόζης και της ηπατικής στεάτωσης που προκαλείται από τη DEX. Σε κυτταρικό επίπεδο, η ενεργοποίηση της AMPK ανέστειλε την αύξηση που προκαλεί η DEX στα επίπεδα της PEPCK και της φωσφατάσης της 6-γλυκόζης (G6Pase), καταστέλλοντας τις γλυκονεογενετικές δράσεις της σηματοδότησης του GR. Ακόμη, έχει δειχθεί ότι η AMPK επάγει τη φωσφορυλίωση του GR στη Ser211, με έμμεσο τρόπο, μέσω διαμεσολάβησης της p38 κινάσης MAPK, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Μάλιστα, μέσω της φωσφορυλίωσης του GR, φαίνεται ότι η AMPK τροποποιεί το μοτίβο των συν-ρυθμιστών του GR που στρατολογούνται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του [184]. Παράλληλα, έρευνες έχουν δείξει ότι η επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στη δραστηριότητα της AMPK είναι ιστο-ειδική. Συγκεκριμένα, τα GCs επάγουν την ενεργοποίηση της AMPK στον υποθάλαμο και στο ήπαρ, ενώ αναστέλλουν τη δραστηριότητα της AMPK στο λιπώδη ιστό και στην καρδιά. Σε καλλιέργεια αστροκυττάρων του προμετωπιαίου φλοιού, η DEX προκάλεσε μείωση τόσο των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR όσο και της φωσφορυλιωμένης AMPK, με χρονο-εξαρτώμενο τρόπο [185].

## 1.9. Εμπλοκή του GR στη σηματοδότηση των υποδοχέων PPAR

### 1.9.1. Λειτουργία των υποδοχέων PPAR

Οι υποδοχείς PPAR (Peroxisome Proliferator – Activated Receptor) αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες που ανήκουν στην υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και συγκεκριμένα στην υποομάδα 1. Δομικά μοιάζουν με τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών, αποτελούμενοι από μια περιοχή trans-ενεργοποίησης της μεταγραφής στο αμινο-τελικό άκρο, που ακολουθείται από μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA, μια περιοχή διμερισμού, καθώς και μια περιοχή σύνδεσης του προσδέτη στο καρβοξυ-τελικό άκρο. Οι φυσικοί τους προσδέτες είναι τα λιπαρά οξέα ή παράγωγα αυτών, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στον ενεργειακό μεταβολισμό. Στους υποδοχείς PPAR ανήκουν 3 μέλη, οι PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta/\beta$  και PPAR $\gamma$ , με διακριτές λειτουργίες [186].

Ο υποδοχέας PPAR $\alpha$  εκφράζεται σε διάφορους ιστούς, όπως στο ήπαρ, στους νεφρούς, στην καρδιά, στους σκελετικούς μύες, στο λιπώδη ιστό και στο έντερο. Ωστόσο, τις σημαντικότερες λειτουργίες του τις ασκεί στο ήπαρ, ρυθμίζοντας το μεταβολισμό των λιπιδίων. Συγκεκριμένα, ο PPAR $\alpha$  στο ήπαρ επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που καταλύουν τη μεταφορά λιπαρών οξέων διαμέσου των μεμβρανών, την ενεργοποίησή τους, την ενδοκυτταρική τους μετακίνηση, την οξείδωση λιπαρών οξέων, την κετογένεση και τη λιπόλυση. Ακόμη, ο PPAR $\alpha$  επάγει την μεταγραφή γονιδίων που καταλύουν την είσοδο των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια και τη μετέπειτα β-οξείδωσή τους. Συνθετικοί αγωνιστές του PPAR $\alpha$  χορηγούνται ευρέως σήμερα για την αντιμετώπιση της υπερλιπιδαιμίας, καθώς μειώνουν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα. Ωστόσο, η χρόνια χορήγηση αγωνιστών του PPAR $\alpha$  μπορεί να οδηγήσει σε επαγωγή της έκφρασης γονιδίων που επάγουν τη βιοσύνθεση λιπιδίων [187].

Ακόμη, ο PPAR $\alpha$  διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό της γλυκόζης, επάγοντας τη μεταγραφή γλυκονογενετικών γονιδίων, όπως της PEPCK και της κινάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού 4 (PDK4). Έχει αναφερθεί ότι ο PPAR $\alpha$  ασκεί αντιφλεγμονώδη δράση σε ηπατοκύτταρα, αορτικά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι ο PPAR $\alpha$  μειώνει την παραγωγή των IL-6 και COX-2, επάγει την έκφραση του αναστολέα του NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , και συνδέεται άμεσα με τις p65 και c-Jun, αναστέλλοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα των NF- $\kappa$ B και AP-1, αντίστοιχα [188].

Ο υποδοχέας PPAR $\delta/\beta$  εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και συμμετέχει στην β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα, επάγει τον καταβολισμό των λιπιδίων, και αναστέλλει την οξεία και χρόνια φλεγμονή του ήπατος. Τέλος, ο υποδοχέας PPAR $\gamma$  παρουσιάζει τη μεγαλύτερη έκφραση στον λευκό λιπώδη ιστό, αλλά εκφράζεται επίσης και στο ήπαρ, στους σκελετικούς μύες, στο έντερο και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Ακόμη, επάγει τη λιπογένεση και τη σύνθεση λιπιδίων, συνεισφέροντας στην αποθήκευση ενέργειας, ρυθμίζει την ωρίμανση και τον μεταβολισμό των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων και καταστέλλει την ενεργοποίηση των T κυττάρων [189].



### 1.9.2. Διασταύρωση της σηματοδότησης των υποδοχέων PPARα και του GR

Το γονίδιο του PPARα αποτελεί άμεσο στόχο της σηματοδότησης των γλυκοκορτικοειδών. Από μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα αρουραίων *in vitro*, δείχθηκε ότι τόσο η υδροξυκορτιζόνη όσο και η δεξαμεθαζόνη προκαλούν δόσο-εξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων mRNA του PPARα, μετά από 6 και 24 ώρες επώασης, αντίστοιχα. Η συγκεκριμένη ρύθμιση λαμβάνει χώρα σε μεταγραφικό επίπεδο, με άμεσο τρόπο, χωρίς να επηρεάζει τη σταθερότητα του mRNA μετα-μεταγραφικά. Ομοίως, σε *in vivo* πειράματα με αρουραίους, η πρόκληση 4ωρου στρες αυξάνει τα επίπεδα κορτικοστερόνης στο πλάσμα, καθώς και τα επίπεδα mRNA του PPARα στο ήπαρ. Η παρουσία του ανταγωνιστή της DEX RU486, αναστέλλει τη μείωση των επιπέδων mRNA του PPARα που προκαλείται από το στρες, υποδεικνύοντας ότι η μείωση της έκφρασης του PPARα διαμεσολαβείται από τη σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών. Επίσης, τα επίπεδα mRNA του PPARα ακολουθούν το πρότυπο της έκκρισης κορτικοστερόνης στους αρουραίους, με τα μεγαλύτερα επίπεδα να παρατηρούνται 5-6 το απόγευμα και τα μικρότερα στις 9 το πρωί [190].

Από την έρευνα των Bougarne N. *et al.*, 2009 δείχθηκε ότι ο GRα μπορεί να αλληλεπιδρά με φυσικό τρόπο με τον PPARα, με ορμονο-ανεξάρτητο τρόπο. Προκειμένου να πραγματοποιεί αυτή η φυσική αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη η συμμετοχή των επικρατειών LDB και των δύο υποδοχέων. Ο GR και ο PPARα συνεργάζονται και καταστέλλουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB με αθροιστικό τρόπο, μπλοκάροντας την έκφραση προ-φλεγμονωδών γονιδίων. Ακόμη, η ενεργοποίηση του PPARα παρουσία αγωνιστών του μπλοκάρει την πρόσδεση του GR σε στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs) των γονιδίων-στόχων του [191]. Η συγχορήγηση αγωνιστών του GR και του PPARα δρα αθροιστικά όσο αφορά την αντιφλεγμονώδη δράση, και παράλληλα αντισταθμίζει την ανοχή στα επίπεδα της γλυκόζης που προκαλείται από τα γλυκοκορτικοειδή. Επομένως, η συνδυαστική θεραπεία αγωνιστών του PPARα και του GR αναδεικνύεται πολλά υποσχόμενη, αφού έχει προταθεί ότι οι αγωνιστές του PPARα βελτιστοποιούν τη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή [118]. Έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση του PPARα δεν επηρεάζει ούτε τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR ούτε την μετακίνησή του στον πυρήνα, διότι η διασταύρωση της σηματοδότησης συμβαίνει μετά την πρόσδεση της DEX στον GR και την πυρηνική του μετακίνηση [191].

Επόμενη μελέτη έδειξε ότι η σηματοδότηση του GR οδηγεί στην επαγωγή της έκφρασης γονιδίων στόχων που είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων ερυθροειδών κυττάρων BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid), προωθώντας κατά συνέπεια τη διαφοροποίησή τους σε ερυθροβλάστες. Στα κύτταρα BFU-E, έχει δειχθεί ότι η χορήγηση της DEX επάγει την στρατολόγηση του GR στον ενισχυτή του γονιδίου του PPARα, με αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφής του, καθώς και των πρωτεϊνικών του επιπέδων, μέσω ενός μηχανισμού θετικής ανατροφοδότησης. Στα ίδια κύτταρα η DEX προκαλεί την άμεση φυσική αλληλεπίδραση του GR και του PPARα. Τέλος, η συγχορήγηση αγωνιστών του PPARα και της DEX στα κύτταρα BFU-E, επάγει την αλληλεπίδραση του PPARα και του GR, την στρατολόγησή τους σε γονίδια στόχους του GR, με αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των παραπάνω κυττάρων σε ερυθροβλάστες [192].

Σε πρωτογενή κύτταρα ηπατοκυττάρων από ποντικούς, η συγχορήγηση αγωνιστών του PPAR $\alpha$  και της DEX προκαλεί τη στρατολόγηση του GR σε στοιχεία απόκρισης στον PPAR $\alpha$ , ρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων του μεταβολισμού των λιπιδίων. Συγκεκριμένα, οι PPAR $\alpha$  και GR δρουν συνεργιστικά ώστε να αντισταθμίσουν τη λιπογένεση και να μειώσουν την συσσώρευση λιπαρών οξέων στο ήπαρ που προκαλεί η DEX [193]. Έχειδειχθεί ότι ο συνδυασμός αγωνιστών του GR και του PPAR $\alpha$  έχει ως αποτέλεσμα στην ενίσχυση της έκφρασης γονιδίων που οδηγούν στον καταβολισμό των λιπιδίων [118]. Επίσης, σε συνθήκες στέρσης θρεπτικών, η συγχορήγηση αγωνιστών του PPAR $\alpha$  και της DEX και ο συνακόλουθος συνεντοπισμός των PPAR $\alpha$  και GR σε γονίδια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων, επάγει τη στρατολόγηση της φωσφορυλιωμένης AMPK και τη δημιουργία ενός συμπλόκου PPAR $\alpha$ /GR/AMPK. Το σύμπλοκο PPAR $\alpha$ /GR/AMPK έπειτα επάγει την έκφραση γονιδίων που οδηγούν σε αύξηση της οξειδωσης των λιπαρών οξέων, ενεργοποιώντας έναν μηχανισμό καταβολισμού λιπιδίων με σκοπό την προσαρμογή των κυττάρων στην παρατεταμένη στέρση θρεπτικών [193].

## **1.10. Συνθετικά και φυτικής προέλευσης γλυκοκορτικοειδή**

### **1.10.1. Παρενέργειες συνθετικών γλυκοκορτικοειδών**

Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή αποτελούν τα πλέον συνταγογραφούμενα φάρμακα για την αντιμετώπιση της οξείας και χρόνιας φλεγμονής, διαφόρων αυτοάνοσων διαταραχών, καθώς και λεμφωμάτων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω [194]. Το έναυσμα για τη χορήγησή τους δόθηκε με την ανακάλυψη της κορτιζόνης μεταξύ των ετών 1936-1940 [195]. Ωστόσο, μετά από πολλά χρόνια συνεχούς χορήγησης των γλυκοκορτικοειδών ως θεραπευτικά σκευάσματα, παρατηρήθηκε ότι η χρόνια και παρατεταμένη χρήση σε υψηλές δοσολογίες οδηγεί σε ανεπιθύμητες και μη αναστρέψιμες παρενέργειες [196]. Έχειδειχθεί ότι η παρατεταμένη χορήγηση πρεδνιζολόνης (2.5-5mg/ημέρα) αυξάνει τη συχνότητα καταγμάτων στα ισχία και τους σπονδύλους, καθώς και την εμφάνιση οστεοπόρωσης. Αυτό οφείλεται στην αναστολή της λειτουργίας των οστεοβλαστών από τα γλυκοκορτικοειδή και τον ακόλουθο μειωμένο ρυθμό σχηματισμού οστού, ακόμη και τους πρώτους 6 μήνες της θεραπείας. Γι' αυτό είναι σύνηθες η μακροπρόθεσμη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή (> 3 μήνες) να συνοδεύεται με καθημερινή λήψη ασβεστίου και βιταμίνης D. Τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν απόπτωση των οστεοκυττάρων, με αποτέλεσμα, το 40% των ασθενών που λαμβάνουν χρόνια αγωγή με γλυκοκορτικοειδή να παρουσιάζουν οστεονέκρωση, που συνοδεύεται από πόνο στις αρθρώσεις και μειωμένη κινητικότητα. Η χορήγηση φθοριούχων γλυκοκορτικοειδών, όπως δεξαμεθαζόνη και βηταμεθαζόνη, μπορεί επίσης να οδηγήσει σε μυοπάθεια, με τους ασθενείς να υποφέρουν από μυϊκή αδυναμία, μυϊκή ατροφία και κούραση. Η εμφάνιση μυοπάθειας οφείλεται στην αύξηση του καταβολισμού των πρωτεϊνών και τη μειωμένη πρωτεϊνική σύνθεση που προκαλούν τα γλυκοκορτικοειδή. Ακόμη, η χρόνια θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή σε παιδιά μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της ανάπτυξης, λόγω της ικανότητας των γλυκοκορτικοειδών να αναστέλλουν την απελευθέρωση της αναπτυξιακής ορμόνης και την βιοδιαθεσιμότητα του IGF-

1. Γι' αυτό είναι σύνηθες σε αυτές τις περιπτώσεις η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή να συνοδεύεται από εξωγενή χορήγηση της αναπτυξιακής ορμόνης [197].

Όσο αφορά το μεταβολισμό της γλυκόζης, ασθενείς που λαμβάνουν γλυκοκορτικοειδή συχνά εμφανίζουν μικρή αύξηση της γλυκόζης νηστείας και λίγο μεγαλύτερη αύξηση της μεταγευματίας γλυκόζης. Σε ορισμένους ασθενείς έχει παρατηρηθεί και *de novo* ανάπτυξη διαβήτη, αλλά λιγότερο συχνά. Η υπεργλυκαιμία που προκαλούν τα γλυκοκορτικοειδή οφείλεται στην επαγωγή της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ και στην μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης στον λιπώδη ιστό. Περισσότερο σπάνια είναι η εμφάνιση δυσλιπιδαιμίας σε ασθενείς που λαμβάνουν γλυκοκορτικοειδή. Έχει δειχθεί ότι τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν τη λιπόλυση, αυξάνουν τη σύνθεση της λιποπρωτεΐνης πολύ χαμηλής πυκνότητας VLDL και προωθούν την παραγωγή και τη συσσώρευση λιπαρών οξέων στο ήπαρ. Η εμφάνιση χαρακτηριστικών του συνδρόμου Cushing έχουν επίσης συνδεθεί με την λήψη γλυκοκορτικοειδών. Τέτοια συμπτώματα αποτελούν η ανακατανομή του λιπώδους ιστού, η συσσώρευση λίπους στον κορμό και στην κοιλιακή χώρα, ύψος βουβαλιού και πανσεληνοειδές πρόσωπο, λόγω συσσώρευσης λίπους στην περιοχή του αυχένα και του προσώπου, αντίστοιχα [197].

Έρευνες έχουν δείξει ότι η λήψη γλυκοκορτικοειδών για διάστημα μεγαλύτερο των 3 μηνών οδηγεί σε εμφάνιση υπέρτασης στο 9% των ασθενών, και μάλιστα το ποσοστό αυτό αυξάνεται στο 37% σε ασθενείς των οποίων η ηλικία ξεπερνά τα 65 έτη. Η υπέρταση, η υπεργλυκαιμία και η δυσλιπιδαιμία που προκαλούν τα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Έχει δειχθεί ότι η πρεδνιζολόνη (>7.5mg / ημέρα) αυξάνει 2-4 φορές τον κίνδυνο για εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, ισχαιμικού επεισοδίου και καρδιακής δυσλειτουργίας. Ακόμη, ένα μικρό ποσοστό ασθενών (περίπου 5%) που λαμβάνουν γλυκοκορτικοειδή για περισσότερο από 1 χρόνο μπορεί να εμφανίσουν δερματική ατροφία, εκχύμωση, μειωμένη επούλωση τραυμάτων και απώλεια του δερματικού φραγμού. Νευροψυχιατρικές παρενέργειες μπορεί να εμφανιστούν συχνά σε ασθενείς που λαμβάνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα γλυκοκορτικοειδή. Τα πιο συχνά συμπτώματα είναι μεταβολές της διάθεσης, ευερεθιστότητα, άγχος, κατάθλιψη, απόσπαση της συγκέντρωσης, ενώ πιο σπάνια ψύχωση, άνοια και ντελίριο και οφείλονται στην επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στη λειτουργία του ιπόκαμπου. Η δόση και η διάρκεια της θεραπείας με γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης οφθαλμολογικών διαταραχών. Το 11-15% και το 12% των ασθενών εμφανίζουν καταρράκτη και γλαύκωμα, αντίστοιχα, λόγω της ικανότητας των γλυκοκορτικοειδών να αυξάνουν την ενδοφθάλμια πίεση και να μεταβάλλουν τα επίπεδα των ενδοφθάλμιων αυξητικών παραγόντων. Η χρόνια λήψη γλυκοκορτικοειδών μπορεί επίσης να προκαλέσει γαστρεντερικές διαταραχές, όπως γαστρίτιδα, πεπτικό έλκος και γαστρεντερική αιμορραγία. Τέλος, η παρατεταμένη χορήγηση γλυκοκορτικοειδών καταστέλλει τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, αυξάνοντας τον κίνδυνο για μολύνσεις από ιούς, βακτήρια, μύκητες και παράσιτα [197].

### **1.10.2. Επιλεκτικοί αγωνιστές και ρυθμιστές του GR**

Στόχος των ερευνητών ήταν και είναι ακόμη να αυξηθούν οι ευεργετικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών, ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα τις επιβλαβείς δράσεις. Έχει καταστεί σαφές

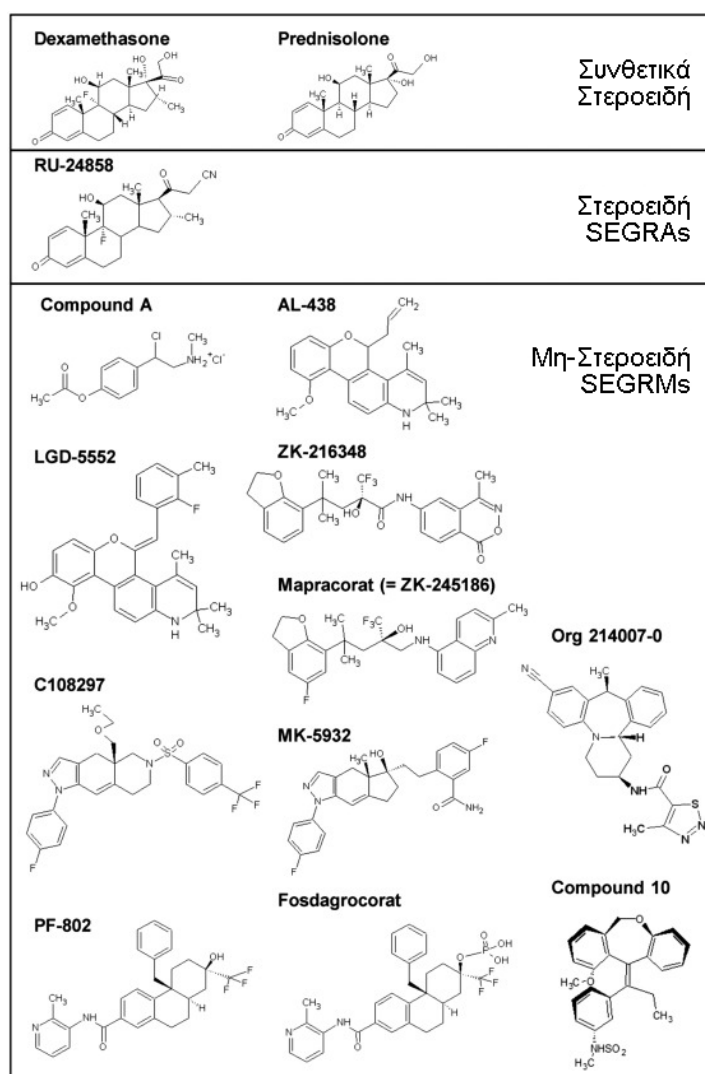
ότι οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στους μηχανισμούς trans-καταστολής της μεταγραφής, ενώ οι περισσότερες παρενέργειες διαμεσολαβούνται από τους μηχανισμούς ενεργοποίησης της μεταγραφής. Η έναρξη και η διάρκεια των ανεπιθύμητων συμπτωμάτων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η έναρξη και η διάρκεια λήψης των γλυκοκορτικοειδών. Παρόλο που στην πλειοψηφία τους οι περισσότερες παρενέργειες οφείλονται στους μηχανισμούς ενεργοποίησης της μεταγραφής, ορισμένες, όπως για παράδειγμα η ευαισθησία στις μολύνσεις, οφείλονται στους μηχανισμούς trans-καταστολής της μεταγραφής [118, 198]. Οι ενώσεις που επάγουν τους μηχανισμούς trans-καταστολής, αλλά καταστέλλουν ή δεν επηρεάζουν τους μηχανισμούς ενεργοποίησης χαρακτηρίζονται ως επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs) ή επιλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRMs) [198].

Τα πρώτα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή που δημιουργήθηκαν ήταν τα RU 24782, RU 24858 και RU 40066 και τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως SEGRAs. Είχαν αποτελεσματική δράση στο να επάγουν επιλεκτικά το μονοπάτι της trans-καταστολής και να καταστέλλουν το μονοπάτι της ενεργοποίησης της μεταγραφής από τον GR, *in vitro*. Ωστόσο, σε *in vivo* μελέτες φάνηκε ότι δεν είχαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα [195, 196]. Το πρόβλημα αυτό ξεπεράστηκε με την μετέπειτα ανακάλυψη δύο μη στεροειδών SEGRMs, των AL-438 και ZK-216348, οι οποίοι προκαλούσαν επαγωγή των αντι-φλεγμονωδών δράσεων με ταυτόχρονη ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων δράσεων της σηματοδότησης του GR, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [196, 199]. Η ανάγκη για ακόμη μεγαλύτερη μείωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών της χορήγησης συνθετικών γλυκοκορτικοειδών έστρεψε τις έρευνες στην εύρεση νέων αντικαταστατών φυτικής προέλευσης. Έτσι, στη συνέχεια, απομονώθηκε από ένα θαμνοειδές φυτό *Salsola tuberculatifomis* της Νοτίου Αφρικής, η πρώτη μη στεροειδής ένωση που ονομάστηκε Compound A, η οποία χαρακτηρίστηκε ως ισχυρός SEGRM. Το Compound A αποδείχθηκε ότι ανταγωνίζεται τη δεξαμεθαζόνη για τη θέση πρόσδεσης στον GR, επάγει την πυρηνική του μετακίνηση, καταστέλλει την επαγόμενη από TNF $\alpha$  έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων, μέσω καταστολής των μονοπατιών των NF- $\kappa$ B και AP-1, καταστέλλοντας ταυτόχρονα την trans-ενεργοποίηση και τη έκφραση γλυκονεογενετικών γονιδίων [198-201]. Άλλες μη στεροειδείς ενώσεις που χαρακτηρίστηκαν ως SEGRMs ήταν οι Mapracorat, Fosdagrocorat, PF-802, LGD-5552, MK-5932, Org 214007-0, C-108297 και Compound 10. Οι ενώσεις Mapracorat και Fosdagrocorat ολοκλήρωσαν τη φάση II των κλινικών δοκιμών για τη θεραπεία ατοπικής δερματίτιδας και ρευματοειδής αρθρίτιδας, αντίστοιχα [198, 199].

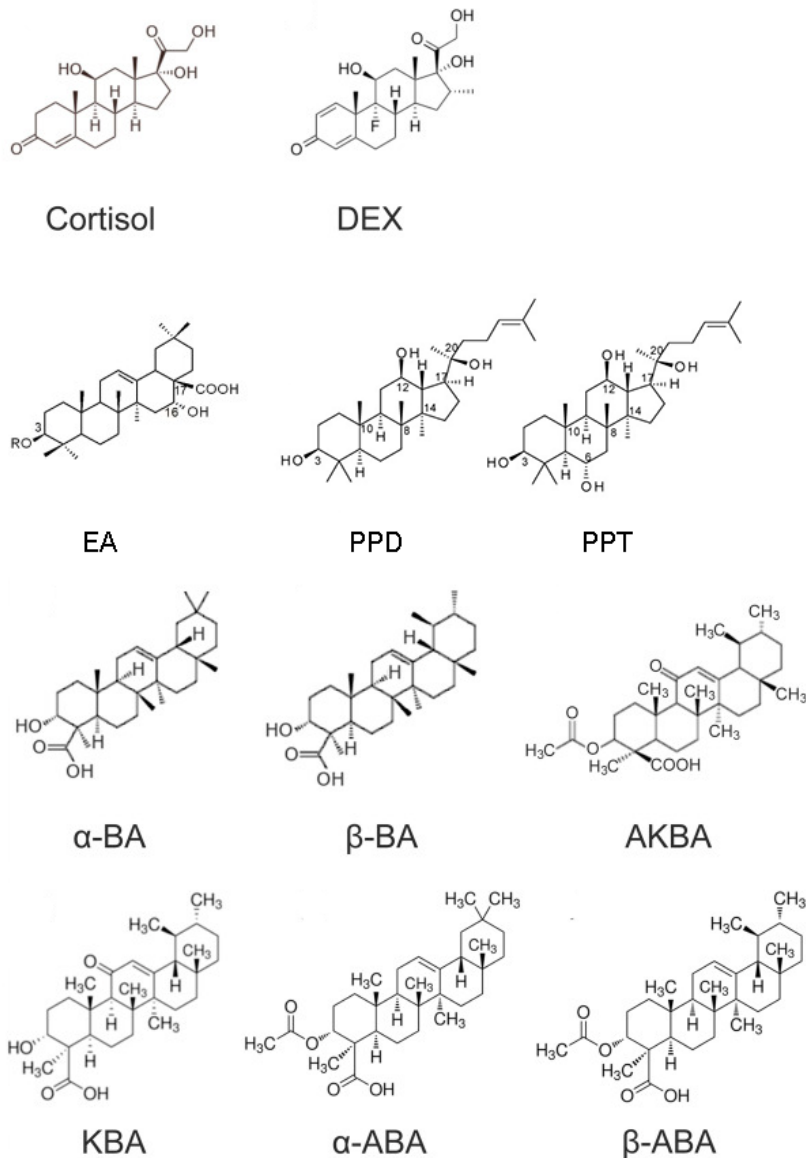
### 1.10.3. Φυτικής προέλευσης γλυκοκορτικοειδή

Τα τελευταία χρόνια αρκετές μελέτες ανέδειξαν το ρόλο των τριτερπενοειδών ενώσεων ως εν δυνάμει επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Τα τριτερπένια είναι ισοπρενοειδείς ενώσεις, βιοσυντίθενται στα φυτά και αποτελούν μια από τις πιο πολυπληθείς ομάδες πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών. Έχουν είτε δομικό ρόλο, ως συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, είτε αμυντικό για το φυτό ρόλο, παρέχοντας προστασία από μικρόβια, μύκητες και παράσιτα. Ακόμη, έχουν πολλές εφαρμογές σε διάφορους τομείς όπως στη

φαρμακευτική, στη βιομηχανία τροφίμων και στην κοσμητολογία, ως φυσικά γλυκαντικά, γαλακτωματοποιητές και σαπούνια [202, 203]. Πιο συγκεκριμένα, η αβισίνη D, το εχινοκυστικό οξύ και το παράγωγό του 3-O-γλυκοσίδιο, η πρωτοπαναξαδιόλη, η πρωτοπαναξατριόλη, καθώς και τα μποςγουελικά οξέα και τα παράγωγά τους ανήκουν στην ομάδα των τριτερπενίων και διαθέτουν δομή όμοια με την ενδογενή κορτιζόλη και με το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη. Έχει δείχθει ότι δρουν ως εν δυνάμει επιλεκτικοί αγωνιστές του GR, επάγοντας την πυρηνική μετατόπισή του, χωρίς ωστόσο να αυξάνουν την μεταγραφική του δραστηριότητα, ελαχιστοποιώντας τις παρενέργειες της παρατεταμένης σηματοδότησής του και μειώνοντας την επαγόμενη από τον TNF $\alpha$  μεταγραφική δραστηριότητα του NF- $\kappa$ B, διατηρώντας τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις του GR. Επίσης, οι ενώσεις αυτές ενεργοποιούν το μηχανισμό της μιτοχονδριακά εξαρτώμενης απόπτωσης, στις κυτταρικές σειρές HeLa, HepG2, HEK293 και A549 [204-208].



**Εικόνα 12:** Δομή συνθετικών στεροειδών, στεροειδών SEGRAs και μη-στεροειδών SEGRMs (τροποποίηση από [198]).



**Εικόνα 13:** Δομή κορτιζόλης, δεξαμεθαζόνης και διαφόρων τριτεροενοειδών ενώσεων που έχουν χαρακτηριστεί ως SEGRAs και SEGRMs. DEX: Dexamethasone, EA: Echinocystic Acid, PPD: Protopanaxadiol, PPD: Protopanaxatriol,  $\alpha$ -BA: Boswellic Acid alpha,  $\beta$ -BA: Boswellic Acid beta, AKBA: Acetyl-11-keto beta Boswellic Acid, KBA: 11-keto beta Boswellic Acid,  $\alpha$ -ABA: 3-O-acetyl Boswellic Acid alpha,  $\beta$ -ABA: 3-O-acetyl Boswellic Acid beta (τροποποίηση από [204, 206, 207]).

## 1.11. Σκοπός

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως σκοπό την αξιολόγηση των βιολογικών δράσεων διαφόρων κλασμάτων από τα φύλλα και τη ρητίνη του Μαστιχόδεντρου Χίου (*Pistacia lentiscus* L. var. *Chia*). Έμφαση δόθηκε στον χαρακτηρισμό των βιοχημικών μηχανισμών επιτέλεσης αυτών των δράσεων και στη διερεύνηση της εμπλοκής τους στην επαγόμενη από τα γλυκοκορτικοειδή σηματοδότηση. Συγκεκριμένα, για πρώτη φορά πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη των βιολογικών δράσεων τριών κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας (μη πολικό, ημι-πολικό και πολικό) από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου που καλλιεργείται συστηματικά στη Νότια Χίο και το οποίο παράγει ρητίνη, με αντίστοιχα κλάσματα (μη πολικό, ημι-πολικό και

πολικό) από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου που ευδοκιμεί στη Βόρεια Χίο και δεν παράγει ρητίνη. Ακόμη, στόχος ήταν η διερεύνηση των βιολογικών δράσεων τριών αυξανόμενης πολικότητας κλασμάτων (μη πολικό, ημι-πολικό και πολικό) από τη ρητίνη του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου, καθώς και υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης, στοχεύοντας στην εύρεση των βιοδραστικών συστατικών αυτής.

Πρωταρχικός στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης των παραπάνω κλασμάτων στη βιωσιμότητα ανθρώπινων εμβρυϊκών νεφρικών κυττάρων HEK293 και του προσδιορισμού του εύρους των ασφαλών μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων. Δεδομένης της υψηλής περιεκτικότητας της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου σε τριτερπένια, τέθηκε ως στόχος η μελέτη της πιθανής εμπλοκής των παραπάνω κλασμάτων στη σηματοδότηση της ισομορφής άλφα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και συγκεκριμένα, η διερεύνηση της επίδρασής τους στη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα καθώς και στα πρωτεϊνικά του επίπεδα. Ακόμη, η μελέτη επικεντρώθηκε στον έλεγχο της αντιφλεγμονώδους δράσης των υπό μελέτη κλασμάτων, μέσω διερεύνησης της επίδρασής τους στη μεταγραφική δραστηριότητα του παράγοντα φλεγμονής NF-κΒ, καθώς και της αποπτωτικής δράση τους, μέσω διερεύνησης της επίδρασής τους σε αποπτωτικά μονοπάτια. Τέλος, στο πλαίσιο διερεύνησης των βιοχημικών μηχανισμών μέσω των οποίων οι παραπάνω δράσεις επιτελούνται, ως στόχος τέθηκε η μελέτη της επίδρασης των παραπάνω κλασμάτων στον ενεργειακό μεταβολισμό και συγκεκριμένα στη σηματοδότηση της ενεργοποιούμενης από την AMP πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK).

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Οργανολογία

Τα εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών της παρούσας διατριβής παρατίθενται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1:** Εργαστηριακά όργανα.

Ανακινήτης Vortex	BioSan
Ανάστροφο μικροσκόπιο κυτταροκαλλιιεργειών	Kruss
Επιτραπέζια φυγόκεντρος (έως 1000g)	Nippon Genetics Europe GmbH
Επωαστήρας κυτταροκαλλιιεργειών	Thermo Electronic Corporation
Επωαστήρας βακτηριακής καλλιέργειας	Daihan Labtech
Ζυγός	Kern 440-47N
Ζυγός	Kern EW
Θερμαινόμενη πλάκα	Kisker
Λουσιφερόμετρο	Berthold
Μαγνητικός αναδευτήρας (stirrer)	Nuova thermolyne
Οριζόντιος αναδευτήρας	GFL 3015
Πεχάμετρο	Metrohm 827 pH lab
Συσκευή καθέτου νηματικής ροής	Telstar AV-30/70

Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς	BioRad
Συσκευή ηλεκτροφόρησης	BioRad
Συσκευή υπερήχων (UP400S)	Hielscher Ultrasound Technology
Τροφοδοτικό	Wealtec Elite 200
Φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου (έως 100μl)	Thermo Scientific
Φυγόκεντρος κυτταροκαλλιιεργειών	Jouan BR4
Φυγόκεντρος για 50mL falcons	Hermle
Φυγόκεντρος για 1.5mL tubes	Eppendorf 5417R
Φυγόκεντρος για 1.5mL tubes	Hermle Z 233 MK-2
Φωτόμετρο (UV/Visible)	Avantor, VWR
Υδατόλουτρο κυτταροκαλλιιεργειών	Selecta
Mini-Rocker Shaker	BioSan
PCR πραγματικού χρόνου	Applied Biosystems Step OnePlus

## 2.2. Χημικά/Αντιδραστήρια

Τα χημικά υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών της παρούσας διατριβής παρατίθενται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2:** Χημικά υλικά και αντιδραστήρια.

Αιθανόλη 100%	Honeywell
Αμπικιλίνη	AppliChem
Αναστολείς πρωτεασών	Roche
Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη	Regilait
Γλυκερόλη	Kalochem
Γλυκίνη	Serva
Εμβρυϊκός βόειος ορός (FBS)	Gibco
Ενεργός άνθρακας	Merck
Δεξαμεθαζόνη διαλυμένη σε αιθανόλη	Sigma
Δεξτράνη	Pharmacia
Θρυψίνη-EDTA 0.25% (1X)	Gibco
Μεθανόλη 100%	Honeywell
2-μερκαπτοαιθανόλη	Aldrich
Μπλε της βρομοφαινόλης	Research Organics
2-προπανόλη 100%	Sigma
Πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (5000U/mL)	Gibco
Πρωτεϊνικός μάρτυρας	Thermo Scientific
Τετρακυκλίνη	Serva
Υδροχλωρικό οξύ (HCl)	Scharlau
Υπερθεϊκό αμμώνιο (APS)	Serva



Χλωριούχο νάτριο (NaCl)	Scharlau
Acrylamide/Bis 40%, Solution 37.5:1	Bio-Rad
Adenosine 5'-triphosphate (ATP)	Sigma
Beetle luciferin	Promega
Bradford (5X)	Bio-Rad
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Calcium Chloride (CaCl <sub>2</sub> )	Merck
Coenzyme-A free acid	AppliChem
Developer	Fuji
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	AppliChem
DNase treatment of RNA kit	Promega
Dodecyl sulfate-Na-salt (SDS)	Serva
DTT	AppliChem
ECL (Enhanced Chemiluminescence) A, B	Santa Cruz
EDTA	Scharlau
Fixer	Fuji
Hepes	Serva
LB agar	Fisher BioReagents
LB broth (MILLER)	Merck
L-γλουταμίνη 200mM (100X)	Gibco
MG-132 διαλυμένος σε ddH <sub>2</sub> O	Sigma
MgSO <sub>4</sub>	AppliChem
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Serva
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	AppliChem
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	AppliChem
2-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside (ONPG)	Sigma
Phosphate Buffered Saline (PBS) (10X)	Gibco
PMSF	AppliChem
Sodium fluoride (NaF)	AnalaR
Sodium pyrophosphate (SPP)	AnalaR
SYBR Select Master Mix	Applied biosystems
Superscript II reverse transcriptase	Invitrogen
TEMED	AppliChem
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma
TNFα διαλυμένος σε ddH <sub>2</sub> O	Peprotech
Tris (hydroxymethyl) – aminomethane	Serva
Triton X-100	Sigma
Trizol	Invitrogen
Tween 20	Sigma

### 2.3. Αναλώσιμα υλικά

Τα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών της παρούσας διατριβής παρατίθενται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3:** Αναλώσιμα υλικά

Ρύγχη πιπετών 0.1-10μl	Gilson
Ρύγχη πιπετών 10-200μl	FL medical
Ρύγχη πιπετών 100-1000μl	FL medical
Σιφόνια 2mL	Sarstedt
Σιφόνια 5mL	Sarstedt
Σιφόνια 10mL	Sarstedt
Σιφόνια 25mL	Sarstedt
Σωλήνες φυγοκέντρησης 15mL	Capp
Σωλήνες φυγοκέντρησης 50mL	Capp
Σωλήνες φυγοκέντρησης 1.5mL	FL medical
Τρυβλία καλλιέργειας 6 θέσεων	Corning Costar
Τρυβλία καλλιέργειας 24 θέσεων	Corning Costar
Τρυβλία καλλιέργειας 96 θέσεων	Corning Costar
Φλάσκες καλλιέργειας T25	Corning
Φλάσκες καλλιέργειας T75	Corning
Cryogenic vials 1.5mL	Corning

### 2.4. Κυτταρικές σειρές

Η ευκαρυωτική κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι η ανθρώπινη νεφρική κυτταρική σειρά HEK293 (Human Embryonic Kidney 293). Τα κύτταρα HEK293 προέρχονται από πρωτογενή ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα. Έχουν γίνει αθάνατα μέσω ενσωμάτωσης ενός αδενοϊκού γενετικού τμήματος στο χρωμόσωμα 19, γεγονός που τροποποιεί τον κυτταρικό τους κύκλο. Παρουσιάζουν πυραμιδική ή ρομβική μορφολογία, με φιλοπόδια που προεξέχουν από την επιφάνειά τους. Τα κύτταρα HEK293 αποτελούν ιδανικά μοντέλα μελέτης *in vitro*, διότι διαθέτουν υψηλή ικανότητα διαμόλυνσης με πλασμιδιακούς φορείς, έχουν υψηλό ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ευκολία γενετικής τροποποίησης και τέλος παρουσιάζουν υψηλή απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα καθιστώντας τα ιδανικά μοντέλα για μελέτη νέων υποψήφιων φαρμάκων και τεστ κυτταροτοξικότητας [209]. Η βακτηριακή κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση και την απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων για τις μετρήσεις λουσιφεράσης/ $\beta$ -γαλακτοσιδάσης είναι η E. Coli XL1-blue.

## 2.5. Πλασμιδιακοί φορείς

- pMMTV-GRE-Luc: εκφράζει τη λουσιφεράση υπό τον έλεγχο υποκινητή που περιέχει στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs)
- pMMTV-NF-κB-Luc: εκφράζει τη λουσιφεράση υπό τον έλεγχο υποκινητή που περιέχει στοιχεία απόκρισης στον NF-κB
- pSV40-β-Gal: εκφράζει τη β-γαλακτοσιδάση

## 2.6. Αντισώματα

### 2.6.1. Πρωτογενή αντισώματα

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης κατά Western στην παρούσα διατριβή παρατίθενται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4:** Πρωτογενή αντισώματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

	<u>Πηγή</u>	<u>kDa</u>	<u>Εταιρεία</u>
Glucocorticoid receptor (GR)	Anti-mouse	95, 90	Santa-Cruz, sc-393232
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)	Anti-rabbit	67	Santa-Cruz, sc-32879
Glutamine synthetase (GS)	Anti-rabbit	45	Chemicon
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ )	Anti-mouse	55	Santa-Cruz, sc-398394
AMP-activated protein kinase (AMPK)	Anti-rabbit	62	Cell Signaling, 2532
Phosphorylated-AMPK $\alpha$ at threonine 172 (pAMPK $\alpha$ )	Anti-rabbit	62	Cell Signaling, 2535
p65 subunit of NF-κB	Anti-rabbit	65	Santa Cruz, sc-109
Caspase-3	Anti-rabbit	35, 19, 17	Cell Signaling, 9662
Caspase-9	Anti-mouse	47, 37, 35	Cell Signaling, 9508
B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)	Anti-rabbit	28	Cell Signaling, 2876
β-actin	Anti-mouse	42	Sigma
β-actin	Anti-mouse	42	Proteintech, 66009
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Anti-mouse	37	Santa Cruz, sc-365062
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Anti-mouse	36	Proteintech, 60004

### 2.6.2. Δευτερογενή αντισώματα

Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαποτύπωση κατά Western είναι είτε anti-mouse (μονοκλωνικά) είτε anti-rabbit (πολυκλωνικά) και είναι συζευγμένα με το ένζυμο υπεροξειδάση χρένου HRP (horseradish peroxidase). Παρατίθενται στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 5:** Δευτερογενή αντισώματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Anti-mouse-HRP	1:50000	Pierce
Anti-rabbit-HRP	1:50000	Pierce

## 2.7. Διαλύματα

### Πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM για καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων

Το πλήρες θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων αποτελείται από το Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1X), το οποίο περιέχει 4.5g/L D-γλυκόζη, L-γλουταμίνη, πυροσταφυλικό οξύ και κόκκινο φαινόλης και το οποίο εμπλουτίζεται περαιτέρω με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

### Θρεπτικό μέσο DMEM χωρίς κόκκινο φαινόλης ελεύθερο στεροειδών ορμονών για καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων

Το θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων χωρίς κόκκινο φαινόλης ελεύθερο στεροειδών ορμονών αποτελείται από το DMEM (1X), το οποίο περιέχει 4.5g/L D-γλυκόζη, L-γλουταμίνη και 25mM HEPES και το οποίο εμπλουτίζεται περαιτέρω με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Το FBS που προστίθεται στο συγκεκριμένο θρεπτικό έχει υποστεί φιλτράρισμα με ενεργό άνθρακα για την απομάκρυνση των στεροειδών ορμονών.

### Θρεπτικό μέσο για υγρή καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων

Το θρεπτικό μέσο για την υγρή καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων περιέχει 2.5% (w/v) LB broth σε dH<sub>2</sub>O. Αναδεύεται, αποστειρώνεται και διατηρείται στους 4°C.

### Θρεπτικό μέσο για στερεή καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων

Το θρεπτικό μέσο για τη στερεή καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων περιέχει 3.5% (w/v) LB agar σε dH<sub>2</sub>O. Αναδεύεται, αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

### Διάλυμα ενεργού άνθρακα

Το διάλυμα ενεργού άνθρακα περιέχει 2.5% (w/v) ενεργό άνθρακα και 0.25% (w/v) δεξτράνη σε 10mM Tris-HCl pH 7.5. Το διάλυμα αναδεύεται και διατηρείται στους 4°C.

### Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων

Το διάλυμα λύσης κυττάρων περιέχει 20mM Tris pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 250mM NaCl και 3mM EDTA. Πριν τη χρήση του προστίθενται σε αυτό 1/100 μείγμα αναστολέων πρωτεασών, 2mM DTT και 1mM PMSF. Όταν προορίζεται για μελέτη φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών προστίθενται επιπλέον οι αναστολείς φωσφατασών, 1mM sodium pyrophosphate και 10mM sodium fluoride. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

### Sample buffer 4X

Για την παρασκευή 10mL Sample buffer 4X γίνεται ανάμειξη 0,8gr SDS, 2mL 1M Tris-HCl pH 6.8, 1mL 0.5M EDTA και περίπου 2mL ddH<sub>2</sub>O. Ακολουθεί ανάδευση με vortex και θέρμανση στο υδατόλουτρο στους 50°C, ώσπου να διαλυτοποιηθεί το SDS και το διάλυμα γίνει διαυγές. Έπειτα, γίνεται προσθήκη 80μl 100mg/mL bromophenol blue και 4mL 100% γλυκερόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O έως τα 10mL και το διάλυμα αναδεύεται και θερμαίνεται εκ νέου. Τέλος, γίνεται διαχωρισμός του διαλύματος σε aliquots των 960μl, στα οποία προστίθενται 40μl 2-μερκαπτοαιθανόλη και αποθηκεύεται στους -20°C.

### Πηκτή διαχωρισμού για SDS-PAGE

Η πηκτή διαχωρισμού για SDS-PAGE περιέχει 0.375M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 10% (v/v) Acrylamide/Bis, 1% (w/v) APS και 0.4% (v/v) TEMED. Το διάλυμα αφήνεται να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.

### Πηκτή επιστοίβαξης για SDS-PAGE

Η πηκτή επιστοίβαξης για SDS-PAGE περιέχει 0.125M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 4% Acrylamide/Bis, 1% (w/v) APS και 0.4% (v/v) TEMED. Το διάλυμα αφήνεται να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.

### Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10X

Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10X περιέχει 14,4% (w/v) γλυκίνη και 3% (w/v) Tris base σε dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αναδεύεται και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

### Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1X

Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X περιέχει 10% (v/v) Running Buffer 10X και 0.1% (w/v) SDS σε dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αναδεύεται και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

### Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 1X

Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς 1X περιέχει 10% (v/v) Running Buffer 10X, 20% (v/v) μεθανόλη και 0.05% (w/v) SDS σε dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αναδεύεται και αποθηκεύεται στους 4°C.

### Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (TBS) 10X

Το ρυθμιστικό διάλυμα TBS 10X περιέχει 1.5M NaCl και 0.2M Tris base σε dH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 7.5 με την προσθήκη πυκνού HCl 12N και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

### Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1X

Το ρυθμιστικό διάλυμα TBST 1X περιέχει 10% (v/v) TBS 10X και 0.06% (v/v) Tween σε dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αναδεύεται και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

### Διάλυμα blocking 10% για ανοσοαποτύπωση κατά Western

Το διάλυμα blocking για την ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western περιέχει 10% (w/v) αποβουτυρωμένο γάλα σε TBST 1X.

### Διάλυμα πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων

Το διάλυμα πρωτογενούς/δευτερογενούς αντισώματος περιέχει 2% (w/v) αποβουτυρωμένο γάλα σε TBST 1X. Έπειτα γίνεται προσθήκη κατάλληλης ποσότητας stock πρωτογενούς ή δευτερογενούς αντισώματος σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το διάλυμα αναδεύεται και αποθηκεύεται στους -20°C.

### Διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer)

Για την παρασκευή 1L διαλύματος ανάπτυξης σήματος για ανοσοαποτύπωση κατά Western γίνεται ανάμειξη 334.8mL dH<sub>2</sub>O, 138.15mL διαλύματος A, 14.5mL διαλύματος B και 12.5mL διαλύματος Γ, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το διάλυμα αποθηκεύεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

### Διάλυμα σταθεροποίησης σήματος (Fixer)

Για την παρασκευή 1L διαλύματος σταθεροποίησης σήματος για ανοσοαποτύπωση κατά Western γίνεται ανάμειξη 347.4mL dH<sub>2</sub>O, 131.6 διαλύματος A και 21.05mL διαλύματος B, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το διάλυμα αποθηκεύεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

### HBS 2X

Το διάλυμα HBS 2X που χρησιμοποιείται για την παροδική διαμόλυνση κυττάρων με CaCl<sub>2</sub> περιέχει 50mM HEPES, 1.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> και 280mM NaCl. Το pH ρυθμίζεται στο 7.1 και το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.

### Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (Sodium phosphate) 0.1M

Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.1M pH 7.5 περιέχει 41% (v/v) 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> και 9% (v/v) 0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> σε ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα δεν απαιτεί ρύθμιση pH και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

### Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης και MgCl<sub>2</sub>

Το διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης και MgCl<sub>2</sub> που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της β-γαλακτοσιδάσης περιέχει 4.5M β-μερκαπτοαιθανόλη και 0.1M MgCl<sub>2</sub> σε ddH<sub>2</sub>O.

### Διάλυμα ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG)

Το διάλυμα ONPG περιέχει 0.4% (w/v) ONPG σε sodium phosphate. Αναδεύεται στους 4°C και διατηρείται στους -20°C.

### Αντιδραστήριο μέτρησης λουσιφεράσης

Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της λουσιφεράσης περιέχει 20mM Tris pH 8, 2.67mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1mM EDTA, 33.3mM DTT, 270μM συνένζυμο-A, 470μM λουσιφερίνη, 530μM ATP σε dH<sub>2</sub>O. Το αντιδραστήριο διατηρείται στους -20°C, σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο.

## 2.8. Κλάσματα φύλλων και ρητίνης από το Μαστιχόδεντρο Χίου

### 2.8.1. Κλασμάτωση των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου

Τα φύλλα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των κλασμάτων ήταν ευγενική χορηγία της Ένωσης Μαστιχοπαραγωγών Χίου και συλλέχθηκαν από το φυτό *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* (Μαστιχόδεντρο Χίου) που φύτεται στην Νότια και Βόρεια Χίο, κατά τη διάρκεια της περιόδου του κλαδέματος, περίπου στα τέλη Οκτώβρη, από τους Μαστιχοπαραγωγούς. Η κλασμάτωση των φύλλων πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Dr. Giovanni Appendino, Professor of Chemistry, Università del Piemonte Orientale (UPO), Faculty of Pharmacy, Novara (Italy). Συνολικά έλαβαν χώρα 3 παρτίδες συλλογής και κλασμάτωσης φύλλων και συγκεκριμένα, μία παρτίδα 35gr από φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου (Οκτώβριος 2018), μία παρτίδα 78gr από φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου (Οκτώβριος 2018) και μια παρτίδα 20.12gr από φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου (Οκτώβριος 2017). Δείγμα από κάθε παρτίδα αποθηκεύτηκε σε φυτοχημικό εργαστήριο στη Novara με τις κωδικές ονομασίες UPO153-2018 (φύλλα Νότιας Χίου, 2018), UPO154-2018 (φύλλα Βόρειας Χίου, 2018) και UPO131-2017 (φύλλα Νότιας Χίου, 2017), αντίστοιχα. Τα φύλλα ομογενοποιήθηκαν με ακετόνη (αναλογία 10:1 όγκος ακετόνης / βάρος φυτικού ιστού) και αφέθηκαν για ανάδευση για 12 ώρες. Τα εναιωρήματα έπειτα φιλτραρίστηκαν ώστε να απομακρυνθεί ο φυτικός ιστός και τα ακετονικά κλάσματα υπέστησαν εξάτμιση ώστε να μείνουν ως ίζημα, βάρους 0.96gr (απόδοση 2.7%, UPO153-2018), 1.93gr (απόδοση 2.5%, UPO154-2018) και 701mg (απόδοση 3.48%, UPO131-2017). Τα αποξηραμένα εκχυλίσματα στη συνέχεια διαλυτοποιήθηκαν σε ακετόνη, προστέθηκε silica gel (1:3 βάρος/βάρος gr) και ακολούθησε ολική εξάτμιση. Η σκόνη που αποκτήθηκε διαχωρίστηκε σε μια στιβάδα Celite (1:3 βάρος/βάρος gr), βρεγμένη με πετρελαϊκό αιθέρα (Pe) στην επιφάνεια της οποίας είχε τοποθετηθεί διηθητικό χαρτί. Έπειτα, προστέθηκαν διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας και συγκεκριμένα: πετρελαϊκός αιθέρας (Pe), οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) και τετραϋδροφουράνιο (THF), σε αναλογία 1:30 βάρος/όγκο mL, και ακολούθως πέρασαν διαμέσου του φίλτρου. Τα τρία διηθήματα (Pe, EtOAc, THF) της κάθε παρτίδας φύλλων συλλέχθηκαν ξεχωριστά και εξατμίστηκαν ώστε να παραληφθούν τα παρακάτω κλάσματα:

#### Φύλλα *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* Νότιας Χίου-2018 (UPO153-2018)

- 0.186gr μη πολικού κλάσματος (0.52% του διηθήματος Pe)
- 0.505gr ημι-πολικού κλάσματος (1.4% του διηθήματος EtOAc)
- 0.178gr πολικού κλάσματος (0.5% του διηθήματος THF)

#### Φύλλα *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* Βόρειας Χίου-2018 (UPO154-2018)

- 0.606gr μη πολικού κλάσματος (0.77% του διηθήματος Pe)

- 1.09gr ημι-πολικού κλάσματος (1.39% του διηθήματος EtOAc)
- 0.215gr πολικού κλάσματος (0.27% του διηθήματος THF)

Φύλλα *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* Νότιας Χίου-2017 (UPO131-2017)

- 0.202gr μη πολικού κλάσματος (1.03% του διηθήματος Pe)
- 0.158gr ημι-πολικού κλάσματος (0.80% του διηθήματος EtOAc)
- 0.129gr πολικού κλάσματος (0.66% του διηθήματος THF)

Τα παραπάνω κλάσματα στη συνέχεια παραλήφθηκαν από την ερευνητική ομάδα της Δρ. Άννας-Μαρίας Ψαρρά και αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Ακολούθως, τα ημι-πολικά και πολικά κλάσματα διαλυτοποιήθηκαν σε 100% DMSO αποκτώντας τελική συγκέντρωση 100mg/mL και αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Τα μη πολικά κλάσματα, λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς τους σε DMSO, διαλυτοποιήθηκαν σε 100% EtOH αποκτώντας τελική συγκέντρωση 50mg/mL και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

### **2.8.2. Χημικός χαρακτηρισμός των μη πολικών, ημι-πολικών και πολικών κλασμάτων από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου**

Ο χημικός χαρακτηρισμός των φύλλων από το Μαστιχόδεντρο της Νότιας και Βόρειας Χίου πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Dr. Giovanni Appendino, Professor of Chemistry, Università del Piemonte Orientale (UPO), Faculty of Pharmacy, Novara (Italy). Τα μη πολικά κλάσματα των ακετονικών εκχυλισμάτων των φύλλων χαρακτηρίστηκαν με <sup>1</sup>H NMR. Έπειτα, 0.36gr του ημι-πολικού κλάσματος από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου κλασματώθηκαν με χρωματογραφία σε silica gel (18gr, διαβάθμιση Pe-EtOAc από 80:20 έως 50:50), αποκτώντας ένα μείγμα τριτερπενοειδών. Αυτό καθαρίστηκε περαιτέρω με χρωματογραφία σε neutral alumina (8mL, διαβάθμιση Pe-EtOAc από 100 έως 90:10), αποκτώντας 55mg β-αμυρενόνη και 59.56mg λουπεόλη, μετά από εξάτμιση. Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε βάσει βιβλιογραφίας [210, 211]. Έπειτα, 1gr του ημι-πολικού κλάσματος από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου κλασματώθηκαν με χρωματογραφία σε silica gel (50gr, διαβάθμιση Pe-EtOAc από 80:20 έως 50:50), αποκτώντας ένα μείγμα τριτερπενοειδών. Αυτό καθαρίστηκε περαιτέρω με χρωματογραφία σε neutral alumina (12mL, διαβάθμιση Pe-EtOAc από 100 έως 90:10). Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε βάσει βιβλιογραφίας [211, 212]. Τα πολικά κλάσματα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας (77mg) και Βόρειας Χίου (125mg) καθαρίστηκαν με διήθηση κενού σε RP C-18 silica gel (1:5 βάρος/βάρος g) με μεθανόλη και THF (1:5 βάρος/όγκο mL), αποκτώντας δύο κλάσματα τα οποία, μετά από εξάτμιση, αναλύθηκαν περαιτέρω με <sup>1</sup>H NMR.

### **2.8.3. Κλασμάτωση της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου**

Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των κλασμάτων ήταν ευγενική χορηγία της Ένωσης Μαστιχοπαραγωγών Χίου και συλλέχθηκε από το φυτό *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* (Μαστιχόδεντρο Χίου) που φύεται στην Νότια, κατά τη διάρκεια της περιόδου του κλαδέματος, περίπου στα τέλη Οκτώβρη, από τους Μαστιχοπαραγωγούς. Η κλασμάτωση της ρητίνης πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Dr. Giovanni Appendino, Professor of



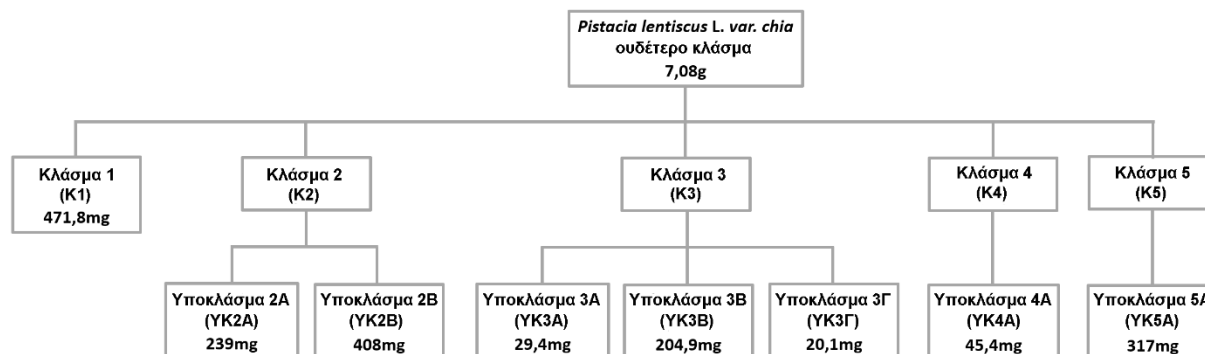
Chemistry, Università del Piemonte Orientale (UPO), Faculty of Pharmacy, Novara (Italy). Δείγμα από την παρτίδα της ρητίνης αποθηκεύτηκε σε φυτοχημικό εργαστήριο στη Novara με την κωδική ονομασία UPO155-2018. Αρχικά, 10gr ρητίνης ομογενοποιήθηκαν σε ακετόνη (αναλογία ακετόνης/ρητίνη 10:1 όγκος/βάρος) και αφέθηκαν για ανάδευση για 2 ώρες. Το διάλυμα φιλτραρίστηκε ώστε να απομακρυνθούν αδιάλυτα τμήματα, παράγοντας μετά από εξάτμιση του διαλύτη 9.5gr (95%) ενός κίτρινου κρεμώδους ακετονικού εκχυλίσματος. Το αποξηραμένο εκχύλισμα στη συνέχεια διαλυτοποιήθηκε εκ νέου σε ελάχιστη ποσότητα ακετόνης και προστέθηκε σε silica gel (1:3 βάρος/βάρος gr) και εξατμίστηκε εντελώς ώστε να μειωθεί η πίεση. Η σκόνη που προέκυψε μέσω αυτής της διαδικασίας διαχωρίστηκε σε μια στιβάδα Celite (1:3 βάρος/βάρος gr) βρεγμένη με πετρελαϊκό αιθέρα (40-60) και προστατευμένη στην επιφάνεια με διηθητικό χαρτί. Έπειτα, προστέθηκαν διαδοχικά διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας και συγκεκριμένα πετρελαϊκός αιθέρας (Pe), οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) και τετραϋδροφουράνιο (THF), σε αναλογία 1:30 βάρος/όγκο mL και ακολούθως πέρασαν διαμέσου του φίλτρου. Τα τρία διηθήματα (Pe, EtOAc, THF) συλλέχθηκαν ξεχωριστά και εξατμίστηκαν, δίνοντας 1.91gr μη πολικού κλάσματος (20.08% του διηθήματος Pe), 5.81gr ημι-πολικού κλάσματος (61.2% του διηθήματος EtOAc) και 0.56gr πολικού κλάσματος (5.9% του διηθήματος THF). Τα παραπάνω κλάσματα στη συνέχεια παραλήφθηκαν από την ερευνητική ομάδα της Δρ. Άννας-Μαρίας Ψαρρά και αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Ακολούθως, διαλυτοποιήθηκαν σε 100% DMSO αποκτώντας τελική συγκέντρωση 100mg/mL και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

#### **2.8.4. Χημικός χαρακτηρισμός του μη πολικού, ημι-πολικού και πολικού κλάσματος της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου**

Ο χημικός χαρακτηρισμός των κλασμάτων της ρητίνης από το Μαστιχόδεντρο της Νότιας Χίου πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Dr. Giovanni Appendino, Professor of Chemistry, Università del Piemonte Orientale (UPO), Faculty of Pharmacy, Novara (Italy). Τα 1.91gr του μη πολικού κλάσματος από τη ρητίνη του *P. lentiscus* L. var. *chia* καθαρίστηκαν με χρωματογραφία χαμηλής πίεσης σε silica gel (95gr Pe-EtOAc, σε αναλογία από 100 έως 70:30), αποκτώντας 235.5mg του πολυμερούς 1,4-poly-β-μυρσένιο, 418.2mg keto-ολεανολική αλδεΐδη και 152.3mg ολεανολική αλδεΐδη. Οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση <sup>1</sup>H NMR βάσει της διεθνούς βιβλιογραφίας [213, 214]. Έπειτα, τα 5.81gr του ημι-πολικού κλάσματος κλασματώθηκαν με χρωματογραφία σε silica gel (300gr, διαβάθμιση Pe-EtOAc από 80:20 έως 50:50), αποκτώντας ξανά 261.5mg ολεανολική αλδεΐδη, 218.5mg λουπεόλη και 341.3mg μείγματος τριτερπενοειδών οξέων. Το μείγμα τριτερπενοειδών οξέων καθαρίστηκε περαιτέρω, και τα τριτερπενοειδή οξέα εστεροποιήθηκαν με TMSiCHN<sub>2</sub> (1mL, 2.0M, MW 114.2 g/Mol) σε MeOH (4mL) και διαιθυλικό αιθέρα (4mL). Ακολούθως στο μείγμα εφαρμόστηκε χρωματογραφία λεπτής στιβάδος TLC (Pe-EtOAc 80:20). Μετά από ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, το διάλυμα υπέστη εξάτμιση και το ίζημα καθαρίστηκε περαιτέρω με HPLC σε silica (Pe-EtOAc διαβάθμιση από 90:10 σε 80:20), αποκτώντας 49.9mg μεθυλεστέρα του 24Z-μαστιχαδιενονικού οξέος και 69.9mg μεθυλεστέρα του 24Z-ισομαστιχαδιενονικού οξέος. Οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν βάσει της διεθνούς βιβλιογραφίας [2, 215-217]. Τα 0.56gr του πολικού κλάσματος της ρητίνης του *P. lentiscus* L. var. *chia* αναλύθηκαν με <sup>1</sup>H NMR.

#### 2.8.4. Υποκλασμάτωση του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου

Η υποκλασμάτωση του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Dr. Giovanni Appendino, Professor of Chemistry, Università del Piemonte Orientale (UPO), Faculty of Pharmacy, Novara (Italy). Συγκεκριμένα, 10g ρητίνης από το *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* (Μαστίχα Χίου), διαλυτοποιήθηκαν σε 100mL EtOAc και διαχωρίστηκε δύο φορές με 50mL 2% διαλύματος NaOH/dH<sub>2</sub>O. Το βασικό διάλυμα που προέκυψε οξύνθηκε έπειτα με H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> έως pH=3, ώσπου να πάρει τη υφή γαλακτώματος. Το όξινο γαλακτώμα έπειτα διαχωρίστηκε με CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 50mL), αφυδατώθηκε με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, και εξατμίστηκε πλήρως δίνοντας 2.76g όξινου κλάσματος. Το κλάσμα EtOAc που περιείχε τα μη όξινα μόρια εξατμίστηκε δίνοντας 7.08g ουδέτερου κλάσματος. Το ουδέτερο κλάσμα, κλασματώθηκε περαιτέρω με χρωματογραφία χαμηλής πίεσης (low-pressure chromatography (LPC)), σε silica gel (250g, petroleum ether-EtOAc σε αναλογία από 95:5 έως 60:40v/v), δίνοντας 5 κλάσματα (K1-K5). Τα 5 αυτά κλάσματα κλασματώθηκαν περαιτέρω, εκτός από το κλάσμα 1 (471.8mg), που χρησιμοποιήθηκε ως έχει για την αξιολόγηση της βιολογικής του δράσης. Η διαδικασία της κλασμάτωσης πραγματοποιήθηκε όπως και στην κλασμάτωση του ολικού εκχυλίσματος της ρητίνης (Kalousi F.D *et al*, 2023). Από την υποκλασμάτωση των κλασμάτων 2-5, προέκυψαν τα υποκλάσματα 2A (239mg), 2B (408mg), 3A (29.4mg), 3B (204.9mg), 3Γ (20.1mg), 4A (45.4mg), 3B (204.9mg), 3C (20.1mg), 4A (45.4mg) και 5A (317mg), ως έλαια.



**Εικόνα 14:** Υποκλασμάτωση του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*. Από την κλασμάτωση του ουδέτερου κλάσματος προέκυψαν 5 κλάσματα (K1-K5). Εκτός από το κλάσμα 1 (K1), τα υπόλοιπα κλασματώθηκαν περαιτέρω δίνοντας τα υποκλάσματα 2A (YK2A), 2B (YK2B), 3A (YK3A), 3B (YK3B), 3Γ (YK3Γ), 4A (YK4A), 5A (YK5A).

#### 2.8.5. Χημικός χαρακτηρισμός των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου

Ο χημικός χαρακτηρισμός των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Dr. Giovanni Appendino, Professor of Chemistry, Università del Piemonte Orientale (UPO), Faculty of Pharmacy, Novara (Italy). Τόσο το κλάσμα 1 (K1) όσο και τα υποκλάσματα 2A (YK2A), 2B (YK2B), 3A (YK3A), 3B (YK3B), 3Γ (YK3Γ), 4A (YK4A) και 5A (YK5A), καθαρίστηκαν με

Isolera One σε RP C-18 silica gel (12g, διάλυμα A: MeOH 0.03% formic acid, διάλυμα B: H<sub>2</sub>O 0.03% formic acid gradient from 50:50 to 95:5) ή με κρυσταλλοποίηση σε MeOH και αναλύθηκαν με <sup>1</sup>H NMR. Η ταυτοποίηση των ενώσεων που εντοπίστηκαν έγινε σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία [2, 213, 214, 218].

## **2.9. Καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων**

Οι ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές διατηρούνται είτε στους -80°C για βραχυπρόθεσμη φύλαξη είτε στο υγρό άζωτο (-190°C) για μακροπρόθεσμη φύλαξη. Η διαδικασία της ψύξης των κυττάρων ξεκινάει με διαλυτοποίηση του κυτταρικού ιζήματος με εμβρυϊκό βόειο ορό και DMSO σε αναλογία 9:1 v/v. Ακολουθεί γρήγορη ανάδευση και μεταφορά στους -80°C/-190°C. Η απόψυξη των κυττάρων πραγματοποιείται με σταδιακή θέρμανση στο υδατόλουτρο στους 37°C και απευθείας μεταφορά σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 500xg, στους 25°C, για 5 λεπτά, επαναδιαλυτοποίηση του κυτταρικού ιζήματος εν νέου σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM και μεταφορά σε φλάσκα καλλιέργειας. Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών λαμβάνει χώρα σε επωαστικό κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO<sub>2</sub>, σε στείρες συνθήκες. Οι χειρισμοί των κυτταρικών σειρών πραγματοποιούνται σε συσκευή καθέτου νηματικής ροής βιοασφάλειας 2. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα τα κύτταρα ελέγχονται με PCR για πιθανή μόλυνση από μυκόπλασμα.

## **2.10. Δημιουργία απενεργοποιημένου εμβρυϊκού βόειου ορού**

Σκοπός της δημιουργίας απενεργοποιημένου εμβρυϊκού βόειου ορού είναι η απομάκρυνση των στεροειδών ορμονών μέσω του ενεργού άνθρακα. Αρχικά προστίθενται σε falcon 5mL διαλύματος ενεργού άνθρακα τα οποία φυγοκεντρώνται στα 10.000xg, στους 25°C, για 10 λεπτά. Αφαιρείται το υπερκείμενο, προστίθενται 25mL εμβρυϊκού βόειου ορού και ακολουθεί επώαση στους 56°C για 30 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση. Έπειτα, γίνεται πάλι φυγοκέντρηση στα 10.000xg, στους 25°C, για 10 λεπτά και απόχυση του υπερκείμενου σε καθαρό falcon στη συσκευή καθέτου νηματικής ροής των κυτταροκαλλιέργειών. Το υπερκείμενο επωάζεται ξανά με ενεργό άνθρακα στους 56°C για 30 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση. Έπειτα, γίνεται πάλι φυγοκέντρηση στα 10.000xg, στους 25°C, για 10 λεπτά και απόχυση του υπερκείμενου σε καθαρό falcon. Το υπερκείμενο, τέλος, του εμβρυϊκού βόειου ορού φιλτράρεται 2-3 φορές χρησιμοποιώντας φίλτρο 0.22μm ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του ενεργού άνθρακα και φυλάσσεται στους -20°C.

## **2.11. Καλλιέργεια και μετασχηματισμός βακτηρίων**

### **2.11.1. Δημιουργία δεκτικών για μετασχηματισμό βακτηρίων**

Όλες οι διεργασίες πραγματοποιούνται στο φλόγιστρο για την εξασφάλιση μερικώς στειρών συνθηκών. Αρχικά, παρασκευάζονται 100mL CaCl<sub>2</sub> 100mM, φιλτράρονται με φίλτρο 0.2μm και μοιράζονται σε δύο σωλήνες φυγοκέντρησης όγκου 50mL. Σε 20mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth προστίθεται τετρακυκλίνη τελικής συγκέντρωσης 10μg/mL και μοιράζεται

ισόποσα σε δύο σωλήνες φυγοκέντρησης όγκου 50mL. Ακολουθεί εμβολιασμός των δύο καλλιιεργειών από μητρικές αποικίες E. coli XL1-Blue και επώαση στους 37°C, υπό ανάδευση, για 12-16 ώρες. Την επόμενη ημέρα, σε 200mL επίσης αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth γίνεται προσθήκη τετρακυκλίνης τελικής συγκέντρωσης 10μg/mL και εμβολιασμός με 2mL της μικρής καλλιέργειας από το overnight. Ακολουθεί επώαση στους 37°C, υπό ανάδευση για 2-3 ώρες και φωτομέτρηση δείγματος της καλλιέργειας ανά τακτά χρονικά διαστήματα στα 600nm έως ότου η απορρόφηση φτάσει σε OD 0.5-0.7. Όταν η καλλιέργεια φτάσει στην επιθυμητή απορρόφηση, απομακρύνεται από τον επωαστικό κλίβανο και επωάζεται για 15 λεπτά στον πάγο. Έπειτα, χωρίζεται σε τέσσερις σωλήνες φυγοκέντρησης όγκου 50mL και φυγοκεντρείται στα 2000xg, στους 4°C, για 6 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα αφήνεται στον πάγο. Γίνεται προσθήκη 20mL CaCl<sub>2</sub> 100mM σε κάθε σωλήνες φυγοκέντρησης όγκου 50mL και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος. Το βακτηριακό διάλυμα επωάζεται έπειτα για 20 λεπτά στον πάγο και μοιράζεται σε δύο σωλήνες φυγοκέντρησης όγκου 50mL (40mL/σωλήνα). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 2000xg, στους 4°C, για 6 λεπτά και απόχυση υπερκείμενου. Έπειτα προστίθενται 1,6mL 100mM CaCl<sub>2</sub> σε κάθε βακτηριακό ίζημα, επαναδιαλυτοποιείται, ενώνεται σε ένα σωλήνα φυγοκέντρησης όγκου 15mL και αφήνεται στους 4°C, για 12-16 ώρες. Την επόμενη ημέρα, στο διάλυμα των δεκτικών βακτηρίων γίνεται προσθήκη 0.8mL αποστειρωμένης γλυκερόλης 50%, αναδεύεται, χωρίζεται σε 50μl/tube και αποθηκεύεται στους -80°C.

### **2.11.2. Μετασηματισμός δεκτικών βακτηρίων**

Αρχικά, γίνεται επίστρωση τρυβλίων με αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB agar στο οποίο έχει προστεθεί αμικιλίνη τελικής συγκέντρωσης 50μg/mL και αφήνονται να στεγνώσουν. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται προσθήκη 1μl πλασμιδίου συγκέντρωσης 50ng/μl σε 50μl δεκτικών βακτηρίων. Τα βακτήρια επωάζονται για 30 λεπτά στον πάγο και ανά 10 λεπτά αναδεύονται με το χέρι. Ακολουθεί επώαση των βακτηρίων στους 42°C για 45sec και απευθείας επώαση στον πάγο για 2-3 λεπτά. Έπειτα, γίνεται προσθήκη 1mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth και επώαση στους 37°C, υπό ανάδευση για 1 ώρα. Το διάλυμα των βακτηρίων (50-150μl) στρώνεται στα τρυβλία ομοιόμορφα κι έπειτα αυτά αφήνονται για επώαση στους 37°C, για 12-16 ώρες.

### **2.11.3. Ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας βακτηρίων**

Σε 5mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth προστίθενται 5μl αμικιλίνης τελικής συγκέντρωσης 100μg/ml. Ακολούθως, πικάρεται μια απομονωμένη αποικία με την άκρη του tip από το τρυβλίο και προστίθεται στα 5mL του LB Broth. Η βακτηριακή καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C, υπό ανάδευση για 8 ώρες έως ότου η απορρόφηση στα 600nm φτάσει την τιμή 0.6. Στη συνέχεια, σε 100mL επίσης αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth προστίθενται 100μl αμικιλίνης τελικής συγκέντρωσης 100μg/ml και γίνεται εμβολιασμός 100μl από την μικρή βακτηριακή καλλιέργεια των 5mL. Η μεγάλη βακτηριακή καλλιέργεια αφήνεται στη συνέχεια για επώαση στους 37°C, υπό ανάδευση για 12-16 ώρες έως ότου θολώσει. Την επόμενη

ημέρα, η καλλιέργεια των 100mL συλλέγεται σε δύο σωλήνες φυγοκέντρησης όγκου 50mL και φυγοκεντρείται στα 6000g, στους 4°C, για 15 λεπτά. Γίνεται απόχυση του υπερκείμενου και το βακτηριακό ίζημα φυλάσσεται στους -20°C ή -80°C για βραχυπρόθεσμη ή μακροπρόθεσμη χρήση, αντίστοιχα.

#### **2.11.4. Απομόνωση πλασμιδίου από υγρή καλλιέργεια βακτηρίων**

Η απομόνωση πλασμιδίου πραγματοποιείται με plasmid DNA Midiprep kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, το βακτηριακό ίζημα αρχικά επαναδιαλυτοποιείται σε 4mL από το Buffer P1 του kit, κι έπειτα προστίθενται 4mL από το Buffer P2, το οποίο προκαλεί λύση των μεμβρανών και αφήνεται για επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της επώασης, προστίθενται 4mL από το Buffer P3 κι αφήνεται για άλλα 15 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση βακτηριακού λύματος στα 15000xg, για 30 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα φυγοκέντρησης όγκου 50mL και ξαναφυγοκεντρείται στα 15000xg, για άλλα 15 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο, στη συνέχεια, μεταφέρεται σε στήλη, στην οποία προσδένεται το πλασμιδιακό DNA. Ακολουθούν δύο πλύσεις της στήλης με 10mL από το Buffer QC και στη συνέχεια το πλασμιδιακό DNA εκλούεται από τη στήλη σε 5mL από το Buffer QF και συλλέγεται σε νέο σωλήνα φυγοκέντρησης όγκου 50mL. Έπειτα, γίνεται προσθήκη 3,5mL ισοπροπανόλης, η οποία κατακρημνίζει το DNA και φυγοκέντρηση στα 15000xg, για 30 λεπτά, στους 4°C. Αφαιρείται το υπερκείμενο, και το πλασμιδιακό ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε αιθανόλη 70%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000xg, για 15 λεπτά, στους 4°C, αφαίρεση υπερκείμενου και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου εξατμιστεί εντελώς η αιθανόλη. Το πλασμιδιακό ίζημα επαναδιαλυτοποιείται τέλος σε 210μl ddH<sub>2</sub>O. Πραγματοποιείται μέτρηση της συγκέντρωσής του σε φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου (NanoDrop) και αποθηκεύεται στους -20°C.

#### **2.12. Συλλογή και λύση κυττάρων με τη χρήση υπερήχων για SDS-PAGE**

Αρχικά, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από τα πιάτα καλλιέργειας των κυττάρων και προστίθεται 1mL κρύο PBS 1X. Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων με scraper, μεταφορά σε σωλήνες φυγοκέντρησης όγκου 1.5mL και φυγοκέντρηση στα 1000xg, στους 4°C, για 5 λεπτά. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με διάλυμα λύσης κυττάρων. Τα κύτταρα επωάζονται με το διάλυμα λύσης στον πάγο για 20 λεπτά και έπειτα πραγματοποιείται περεταίρω λύση με χρήση υπερήχων, έντασης 40%, διάρκειας 1sec 5 διαδοχικές φορές με 30sec μεσοδιάστημα.

#### **2.13. Προσδιορισμός ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου με τη μέθοδο Bradford**

Για τον προσδιορισμό του ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου από κυτταρόλυμα ευκαρυωτικών κυττάρων χρησιμοποιείται η μέθοδος Bradford. Βασίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στις πρωτεΐνες. Η πρόσδεση της χρωστικής στις πρωτεΐνες αλλάζει το μέγιστο της απορρόφησης από τα 465nm στα 595nm. Όσο περισσότερη χρωστική προσδένεται στις πρωτεΐνες τόσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση, η οποία είναι ανάλογη του

ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου [219]. Όσο αφορά την πειραματική διαδικασία, γίνεται ανάμειξη 1μl από το κυτταρόλυμα και 1mL από το αντιδραστήριο Bradford 1X. Ακολουθεί vortex και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της επώασης, τα δείγματα φωτομετρούνται στα 595nm. Το ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο προσδιορίζεται βάσει της πρότυπης καμπύλης  $y=0.0345x+0.0101$ , που έχει δημιουργηθεί με διαδοχικές αραιώσεις BSA.

## **2.14. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western**

### **2.14.1. SDS-PAGE και αποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

Αρχικά, τα δείγματα της ηλεκτροφόρησης θερμαίνονται στους 95°C στο heatblock, για 5 λεπτά. Σε κάθε διαδρομή της πηκτής φορτώνονται 10μl δείγματος, τα οποία περιέχουν 25μg πρωτεϊνικού περιεχομένου, όπως έχει υπολογιστεί από τη μέτρηση Bradford, 25% sample buffer 4X και Tris 20mM pH 7.5 μέχρι τη συμπλήρωση του όγκου. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε Running buffer 1X, στα 80-90V για περίπου 2-2μισή ώρες. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί αποτύπωση των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0.45 ή 0.22μm σε Transfer Buffer 1X, στα 0.35A για 70 λεπτά. Μετά το πέρας της αποτύπωσης, η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα blocking 10% για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση.

### **2.14.2. Εμφάνιση σήματος**

Μετά το blocking πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης στόχου στους 4°C, για 16-20 ώρες, υπό συνεχή ανάδευση. Την επόμενη ημέρα γίνεται απομάκρυνση του πρωτογενούς αντισώματος από τη μεμβράνη και ακολουθούν 4 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα PBST 1X. Έπειτα, η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα που είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (Horseradish Peroxidase) και ειδικό έναντι του πρωτογενούς αντισώματος για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με PBST 1X και η μεμβράνη επωάζεται με τα υποστρώματα ECL A και ECL B, σε αναλογία 1:1, για 3 λεπτά στο σκοτάδι. Μετά την προσθήκη του ECL, η μεμβράνη μεταφέρεται σε σκοτεινό θάλαμο και εκτίθεται σε φιλμ ραδιογραφίας. Η χημειοφωταύγεια που παράγεται από την αντίδραση καίει το φιλμ ανιχνεύοντας τις πρωτεϊνικές ζώνες με ειδικότητα. Μετά το πέρας της έκθεσης, το φιλμ επωάζεται σε διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer) για λίγα δευτερόλεπτα μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες, ξεπλένεται σε νερό και τέλος επωάζεται σε διάλυμα σταθεροποίησης του σήματος (Fixer) για 1 λεπτό. Πραγματοποιούνται διαδοχικές εκθέσεις φιλμ στη μεμβράνη διαφορετικού χρόνου μέχρι να επιτευχθεί η λήψη της επιθυμητής έντασης σήματος.

## 2.15. Δοκιμή λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης

### 2.15.1. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς

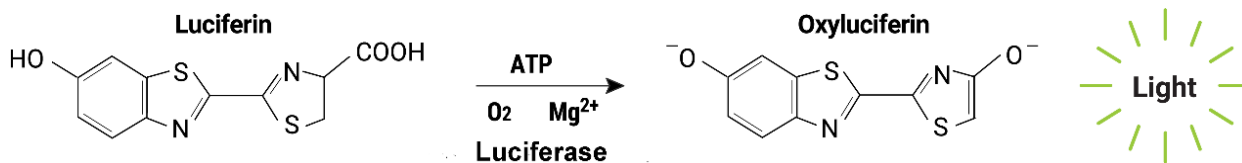
Αρχικά, πραγματοποιείται στρώσιμο του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε πιάτα καλλιέργειας 24 θέσεων και αφήνονται για επώαση για 24 ώρες, σε θρεπτικό μέσο DMEM χωρίς κόκκινο της φαινόλης, εμπλουτισμένο με 10% απενεργοποιημένου FBS, 1% Pen/Strep και 1% L-glut. Την επόμενη ημέρα, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και προστίθενται 270μl φρέσκου θρεπτικού DMEM χωρίς κόκκινο φαινόλης, εμπλουτισμένο με 10% απενεργοποιημένου FBS, 1% Pen/Strep και 1% L-glut. Σε κάθε θέση τρυβλίου γίνεται προσθήκη 0.15μg από τον κάθε πλασμιδιακό φορέα, 1.5μl CaCl<sub>2</sub> 2M, 15μl HBS 2X και ο όγκος συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O έως τα 30μl, ώστε ο συνολικός όγκος σε κάθε θέση τρυβλίου να είναι 300μl. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάζεται ένα μείγμα στο οποίο γίνεται προσθήκη της συνολικής ποσότητας των πλασμιδίων, του CaCl<sub>2</sub> και του ddH<sub>2</sub>O και σε ένα δεύτερο η προσθήκη του HBS 2X. Τα 2 μείγματα προεπώάζονται για 5 λεπτά ξεχωριστά σε θερμοκρασία δωματίου, έπειτα αναμειγνύονται και επώάζονται μαζί για άλλα 25 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη 30μl από το τελικό μείγμα της διαμόλυνσης σε κάθε θέση τρυβλίου και αφήνεται για επώαση για 12-16 ώρες. Έπειτα, το μείγμα της διαμόλυνσης απομακρύνεται από τα κύτταρα και γίνεται προσθήκη 500μl φρέσκου θρεπτικού DMEM χωρίς κόκκινο φαινόλης, εμπλουτισμένο με 10% απενεργοποιημένου FBS, 1% Pen/Strep και 1% L-glut και τα κύτταρα αφήνονται για καλλιέργεια για άλλες 24 ώρες για ανάκαμψη. Μετά το πέρας της ανάκαμψης από τη διαμόλυνση, γίνεται προσθήκη των υπό μελέτη κλασμάτων του Μαστιχόδεντρου Χίου στα κύτταρα στις επιθυμητές συγκεντρώσεις για 6 ώρες.

### 2.15.2. Συλλογή κυττάρων

Αφού ολοκληρωθεί η επώαση των κυττάρων με τα υπό μελέτη κλάσματα, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από το τρυβλίο καλλιέργειας και γίνεται προσθήκη 70μl reporter lysis buffer 1X σε κάθε θέση τρυβλίου, στον πάγο. Το τρυβλίο αφήνεται για επώαση για 30 λεπτά στους 4°C, υπό ανάδευση και έπειτα γίνεται απόξυση της επιφάνειας των κυττάρων και συλλογή του κυτταρολύματος (~70μl) σε σωλήνες φυγοκέντρησης όγκου 1.5mL, στον πάγο. Το κυτταρόλυμα φυγοκεντρείται στα 19000xg, στους 4°C, για 30 λεπτά και το υπερκείμενο που περιέχει τις πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος συλλέγεται σε νέους σωλήνες φυγοκέντρησης όγκου 1.5mL και αποθηκεύεται στους -80°C.

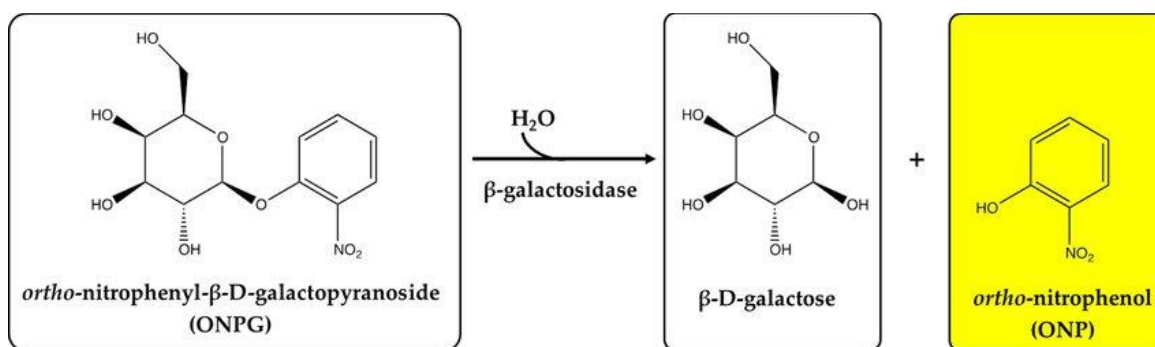
### 2.15.3. Μέτρηση λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης

Για τη δοκιμή της λουσιφεράσης γίνεται προσθήκη 10μl κυτταρολύματος από κάθε δείγμα σε δοκιμαστικούς σωλήνες κι έπειτα προσθήκη 100μl αντιδραστηρίου λουσιφεράσης, στο σκοτάδι. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα βασίζεται στην οξείδωση της λουσιφερίνης σε οξυ-λουσιφερίνη καταναλώνοντας ATP από το ένζυμο της λουσιφεράσης, από την οποία εκλύεται βιοφωταύγεια, CO<sub>2</sub> και AMP (Εικόνα 15). Η μέτρηση γίνεται στο λουσιφερόμετρο, το οποίο μετράει την εκλυόμενη βιοφωταύγεια στα 380nm [220].



**Εικόνα 15:** Αντίδραση λουσιφεράσης [220].

Για τη δοκιμή της β-γαλακτοσιδάσης γίνεται προσθήκη 20μl κυτταρολύματος από κάθε δείγμα σε σωλήνες φυγοκέντρησης όγκου 1.5mL κι έπειτα προστίθενται 200μl διαλύματος φωσφορικού νατρίου (sodium phosphate) αρχικής συγκέντρωσης 0.1M, 3μl από το μείγμα της β-μερκαπτοαιθανόλης και του MgCl<sub>2</sub> και τέλος 66μl από το διάλυμα υποστρώματος ONPG (ortho-nitrophenyl-β-galactopyranoside) αρχικής συγκέντρωσης 0.4% (w/v). Τα δείγματα επωάζονται στους 37°C και όταν αποκτήσουν υποκίτρινο χρώμα, η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 500μl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα βασίζεται στην υδρόλυση του ONPG σε β-D-γαλακτόζη και ortho-nitrophenol (ONP) από το ένζυμο της β-γαλακτοσιδάσης. Το ONP παράγει κίτρινο χρώμα το οποίο φωτομετρείται στα 420nm (Εικόνα 16) [221].



**Εικόνα 16:** Αντίδραση β-γαλακτοσιδάσης [221].

## 2.16. Μέτρηση κυτταρικής βιωσιμότητας με τη δοκιμασία MTT

Η δοκιμασία MTT είναι μια χρωματομετρική μέθοδος που μετράει τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Στηρίζεται στην αναγωγή του άλατος του τετραζολίου (MTT) σε κρυστάλλους φορμαζάνης από αφυδρογονάσες του μιτοχονδρίου, επομένως η αντίδραση λαμβάνει χώρα μόνο σε ζωντανά κύτταρα [222]. Αρχικά, πραγματοποιείται στρώσιμο του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε τρυβλίο καλλιέργειας 96 θέσεων σε θρεπτικό μέσο DMEM με κόκκινο της φαινόλης, εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-glut και 1% pen/strep. Την επόμενη ημέρα γίνεται προσθήκη των υπό μελέτη κλασμάτων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις και επώαση με τα κύτταρα από 6-48 ώρες. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση των κυττάρων με τα υπό μελέτη κλάσματα, προστίθεται MTT σε τελική συγκέντρωση 0.5mg/mL θρεπτικού. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με το διάλυμα MTT για 3-4 ώρες, στον επωαστικό κλίβανο υπό συνθήκες 37°C και 5% CO<sub>2</sub>, ώσπου να σχηματιστούν οι κρυστάλλοι φορμαζάνης. Μετά τον σχηματισμό των κρυστάλλων αφαιρείται το διάλυμα MTT και προστίθενται 150μl 2-προπανάλης 100%, η οποία διαλυτοποιεί τους κρυστάλλους. Το τρυβλίο επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση



τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο για 20-30 λεπτά, ώσπου να αποκτήσει ομοιογενές μωβ χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση του MTT στα 570nm και η μέτρηση του background στα 690nm σε φωτόμετρο κατάλληλο για τρυβλίο 96 θέσεων (multimode plate reader).

## **2.17. Real-time PCR**

### **2.17.1. Απομόνωση ολικού RNA από κυτταρικό εκχύλισμα**

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης των κυττάρων με τα υπό μελέτη κλάσματα, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από το τρυβλίο καλλιέργειας και γίνεται προσθήκη 500μl trizol σε κάθε θέση τρυβλίου. Έπειτα, τα λυμένα κύτταρα συλλέγονται σε σωλήνες φυγοκέντρησης όγκου 1.5mL και προστίθενται 100μl χλωροφόρμιο. Αναδεύονται πολύ καλά και αφήνονται για επώαση για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13.000xg, στους 4°C, για 15 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση το δείγμα διαχωρίζεται σε 3 φάσεις. Η επάνω φάση, στην οποία περιέχεται το ολικό κυτταρικό RNA, μεταφέρεται σε νέους σωλήνες φυγοκέντρησης πολύ προσεκτικά, χωρίς να αναμειχθεί με την ενδιάμεση φάση στην οποία βρίσκεται το DNA. Στην τρίτη και τελευταία φάση συγκεντρώνονται οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Στη συνέχεια, σε κάθε tube προστίθενται 250μl 2-propanol και αφήνεται για επώαση για 5-10 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13.000xg, στους 4°C, για 10 λεπτά και απόρριψη υπερκείμενου. Έπειτα, το ίζημα του RNA επαναδιαλυτοποιείται σε 1mL αιθανόλης 80% και φυγοκεντρείται στα 19.000xg, στους 4°C, για 5λεπτά. Ακολουθεί απόρριψη υπερκείμενου και τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου ώσπου να εξατμιστεί η αιθανόλη. Τέλος, το ίζημα RNA επαναδιαλυτοποιείται ήπια σε 15μl υπερκάθαρου νερού (ddH<sub>2</sub>O) και αποθηκεύεται στους -20°C. Η μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του (λόγος 280/230) του πραγματοποιείται στο NanoDrop.

### **2.17.2. Σύνθεση cDNA από ολικό RNA**

Η σύνθεση cDNA από ολικό κυτταρικό RNA πραγματοποιείται με kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, για την αντίδραση της πέψη του RNA απαιτούνται 2μg ολικού RNA, 2μl RQ1 DNase, 1μl RQ1 Reaction Buffer 10X και συμπλήρωση του όγκου με ddH<sub>2</sub>O έως τα 10μl. Το μείγμα της πέψης επωάζεται στους 37°C, για 30 λεπτά. Έπειτα γίνεται προσθήκη 1μl RQ1 DNase Stop Solution και η αντίδραση της πέψης σταματάει με επώαση στους 65°C, για 10 λεπτά. Σε νέους σωλήνες φυγοκέντρησης προστίθενται 5μl από τα μείγματα RNA και 5.2μl ddH<sub>2</sub>O και επωάζονται στους 95°C, για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 1μl dNTPs, 0.8μl ρυθμιστικού διαλύματος τυχαίων εκκινήτων και το μείγμα επωάζεται στους 65°C, για 5 λεπτά. Ακολουθεί στιγμιαία ψύξη (chill) στον πάγο, σύντομη φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα περιστροφής και ξανά επώαση στον πάγο. Έπειτα, γίνεται προσθήκη 4μl Strand Buffer, 2μl DTT 0.1M, 1μl RNase out, 1μl Super Script II RT και επώαση στους 25°C, για 12 λεπτά, στους 42°C για 50 λεπτά, στους 70°C για 15 λεπτά και τέλος τα cDNAs αποθηκεύονται στους -20°C.

### 2.17.3. Συνθήκες αντίδρασης

Για την αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου αναμειγνύονται 10μl SYBR Green, 0.5μl από Forward και Reverse Primer (Πίνακας 6), 1μl cDNA και 8μl ddH<sub>2</sub>O. Οι συνθήκες της PCR είναι οι εξής: 52°C για 2 λεπτά, 95°C για 2 λεπτά, 40 κύκλοι στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα και στους 55°C για 20 δευτερόλεπτα, και τέλος 72°C για 20 δευτερόλεπτα. Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 6:** Forward και reverse primers των GR και GAPDH

	Forward primer	Reverse primer
GR	5' CAGTCCTCAACAGCAACAACA 3'	5' GTGCTGTCCTTCCACTGCTC 3'
GAPDH	5' CATGAGAAGTATGACAACAGCCT 3'	5' AGTCCTTTCACGATACCAAAGT 3'

### 2.18. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η σύνθεση των εικόνων των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας Adobe Photoshop 2020. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό υπολογιστικών φύλλων Microsoft Excel, με το οποίο εφαρμόστηκε η στατιστική ανάλυση Student's *t*-test. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι διαφορές με *p*-value < 0.05. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας MTT και της μέτρησης λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD). Τα αποτελέσματα του MTT αναλύθηκαν στην συνέχεια με One-Way analysis of variance (ANOVA), ενώ τα αποτελέσματα της μέτρησης λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης αναλύθηκαν με Two-Way ANOVA, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα λογισμικού StatPlus LE. Τα φιλμ ραδιογραφίας που προέκυψαν από την ανοσοαποτύπωση κατά Western σκαναρίστηκαν με ανάλυση 300dpi σε κλίμακα του γκρι. Η ένταση των ζωνών στη συνέχεια ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας ImageJ. Τα δεδομένα που προέκυψαν από το ImageJ αναλύθηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας το λογισμικό υπολογιστικών φύλλων Microsoft Excel, με το οποίο υπολογίστηκαν οι λόγοι της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων (π.χ. GR, PEPCK) προς την ένταση των ζωνών των μορίων αναφοράς (π.χ. β-actin, GAPDH). Τέλος, για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR) εφαρμόστηκε η μέθοδος των Livak K.J. & Schmittgen T.D  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  [223], με την οποία υπολογίστηκε η σχετική έκφραση.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Αξιολόγηση βιολογικών δράσεων κλασμάτων από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*

##### 3.1.1. Χαρακτηρισμός της χημικής σύστασης των κλασμάτων από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της Νότιας και Βόρειας Χίου

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε χημικός χαρακτηρισμός των υπό μελέτη κλασμάτων από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου, προκειμένου να εντοπιστούν τα βιοδραστικά συστατικά, από την ερευνητική ομάδα του Dr. Giovanni Appendino, (Professor of Chemistry, Università del Piemonte Orientale (UPO), Faculty of Pharmacy, Novara, Italy). Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε κλασμάτωση και χημική ανάλυση για τον χαρακτηρισμό τριτερπενοειδών ενώσεων στα ημι-πολικά κλάσματα, ενώ στα μη πολικά και πολικά κλάσματα εφαρμόστηκε  $^1\text{H}$  NMR για ποιοτική ανάλυση των κυριότερων ενώσεων (Παράρτημα 1).

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 7, στα μη πολικά κλάσματα εντοπίστηκαν ακόρεστα τριγλυκερίδια λιπαρών οξέων. Τα συγκεκριμένα τριγλυκερίδια ανιχνεύτηκαν με  $^1\text{H}$  NMR από την τυπική παρουσία πρωτονίου στους διπλούς δεσμούς που επικαλύπτεται στα  $\delta_{\text{H}} = 5.38\text{--}5.36$  ppm, αλλυλικού πρωτονίου στα  $\delta_{\text{H}} = 2.80$  και  $2.35$  ppm, εστερικής ομάδας στα  $\delta_{\text{H}} = 2.25$  ppm, πρωτονίου λιπαρών οξέων στα  $\delta_{\text{H}} = 1.30\text{--}1.27$  ppm και τυπικής ομάδας γλυκερόλης στα  $\delta_{\text{H}} = 4.30\text{--}4.15$  ppm. Στα μη πολικά κλάσματα ανιχνεύτηκαν επίσης και ίχνη τριτερπενοειδών.

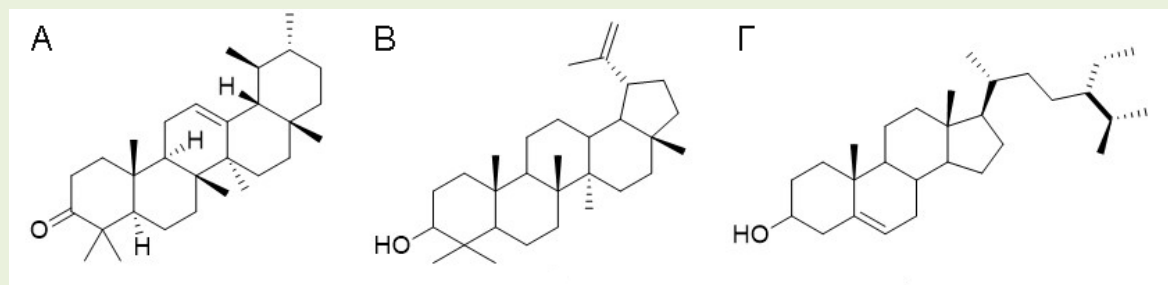
Τα πολικά κλάσματα αναλύθηκαν με διήθηση κενού σε RP C-18 silica gel χρησιμοποιώντας μεθανόλη, με σκοπό την απομάκρυνση της χλωροφύλλης και τη συμπύκνωση των φαινολικών ενώσεων. Οι φαινολικές ενώσεις (25.97% στο πολικό κλάσμα μεθανόλης της Νότιας Χίου και 36.58% στο αντίστοιχο της Βόρειας Χίου) ανιχνεύτηκαν ως μείγματα με  $^1\text{H}$  NMR από τις χημικές μετατοπίσεις μεταξύ των  $\delta_{\text{H}} = 7.6\text{--}6.4$  ppm και  $\delta_{\text{H}} = 3.90\text{--}3.87$  ppm. Στα πολικά κλάσματα τετραϋδροφουρανίου (THF) ανιχνεύτηκαν επίσης και τριτερπενοειδή με διήθηση RP C-18 χρησιμοποιώντας  $^1\text{H}$  NMR (Πίνακας 7).

Τα ημι-πολικά κλάσματα αναλύθηκαν με χρωματογραφία και σε αυτά εντοπίστηκαν τριτερπενοειδείς ενώσεις. Όπως, αναμενόταν στα κλάσματα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου εντοπίστηκαν διαφορές τόσο στη σύσταση των τριτερπενοειδών ενώσεων όσο και στην ποσότητα. Στο ημι-πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου ανιχνεύτηκε  $\alpha$ -αμυρενόνη (Πίνακας 7, Παράρτημα 2) σε ποσοστό 15.28% και λουπεόλη (Πίνακας 7, Παράρτημα 3) σε ποσοστό 16.54%. Αντίθετα, στο ημι-πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου ανιχνεύτηκε πάλι λουπεόλη (Πίνακας 7), αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό 0.073%, καθώς και  $\beta$ -σιτοστερόλη (Πίνακας 7, Παράρτημα 4) σε ποσοστό 0.02%. Στο ημι-πολικό κλάσμα της Βόρειας Χίου δεν εντοπίστηκε η  $\alpha$ -αμυρενόνη.

**Πίνακας 7:** Χημικός χαρακτηρισμός των κλασμάτων από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της Νότιας και Βόρειας Χίου [224].

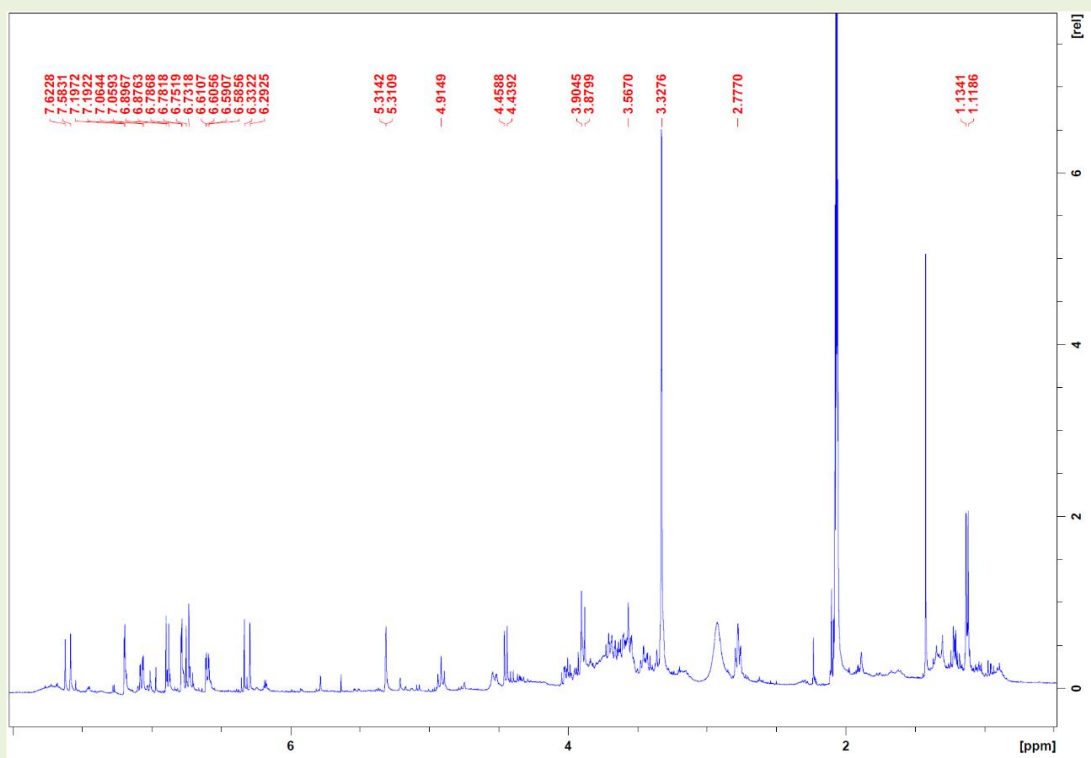
	Σύσταση μη πολικού κλάσματος	Σύσταση ημι-πολικού κλάσματος	Σύσταση πολικού κλάσματος
<b>Φύλλα Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου</b>	Τριγλυκερίδια λιπαρών οξέων	lupeol 16.54%	Φαινολικές ενώσεις 25.97%
	Ίχνη τριτερπενοειδών	α-amyrenone 15.28%	Ίχνη τριτερπενοειδών
	Σύσταση μη πολικού κλάσματος	Σύσταση ημι-πολικού κλάσματος	Σύσταση πολικού κλάσματος
<b>Φύλλα Μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου</b>	Τριγλυκερίδια λιπαρών οξέων	lupeol 0.073%	Φαινολικές ενώσεις 36.58%
	Ίχνη τριτερπενοειδών	β-sitosterol 0.02%	Ίχνη τριτερπενοειδών

### Παράρτημα 1



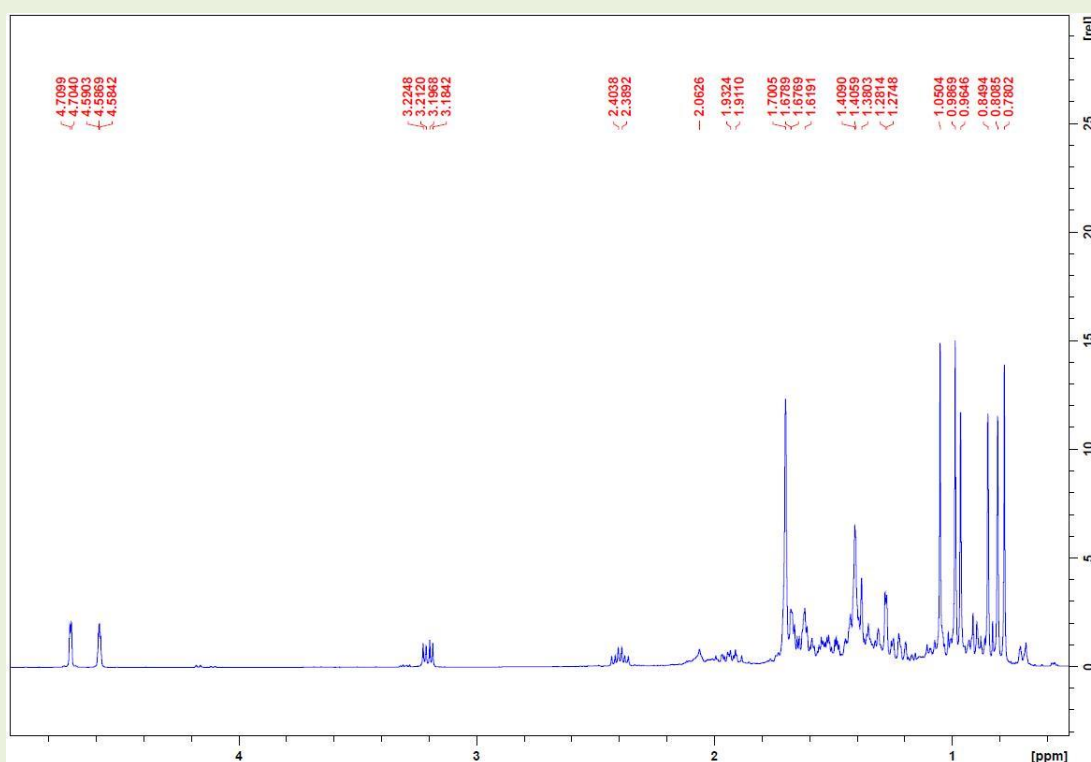
Χημική δομή των συστατικών α-amyrenone (A), lupeol (B), και β-sitosterol (Γ).

## Παράρτημα 2



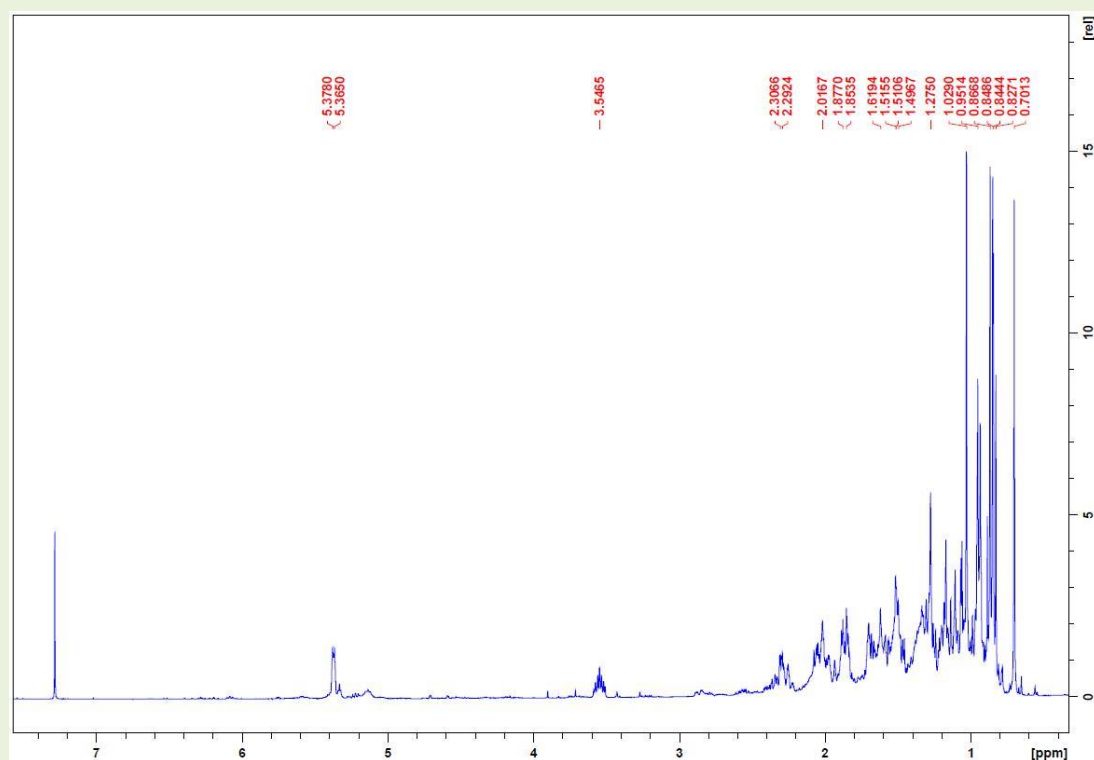
$^1\text{H}$  NMR του συστατικού  $\alpha$ -amyrone σε  $\text{CDCl}_3$

## Παράρτημα 3



$^1\text{H}$  NMR του συστατικού lupeol σε  $\text{CDCl}_3$

## Παράρτημα 4

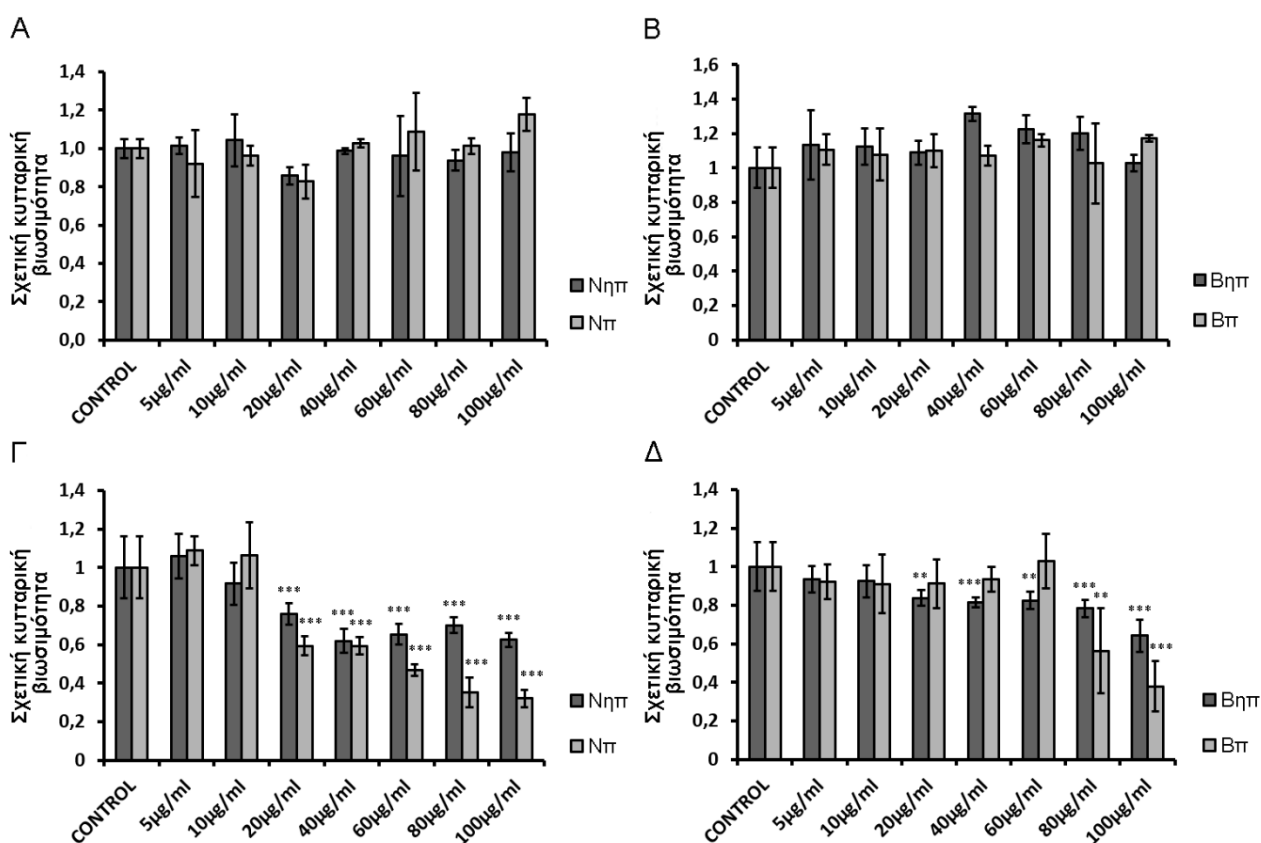


$^1\text{H}$  NMR του συστατικού  $\beta$ -sitosterol σε  $\text{CDCl}_3$

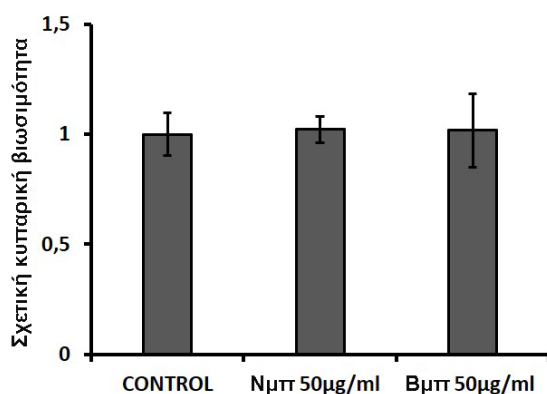
### 3.1.2. Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* στη βιωσιμότητα των κυττάρων HEK293

Αρχικός στόχος της παρούσας μελέτης κατέστη ο προσδιορισμός του εύρους των ασφαλών μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των κλασμάτων από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου, ώστε να επιλεγούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις για την περαιτέρω διερεύνηση των βιολογικών δράσεων των κλασμάτων. Για τη διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου, στη βιωσιμότητα κυττάρων HEK293 εφαρμόστηκε η δοκιμασία MTT. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα HEK293 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 96 θέσεων, σε πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM, με πυκνότητα  $1.5 \times 10^4$ /θέση, για 24 ώρες. Έπειτα, έγινε η προσθήκη των υπό μελέτη κλασμάτων, δηλαδή του μη πολικού κλάσματος της Νότιας Χίου (Νμπ), του ημι-πολικού κλάσματος της Νότιας Χίου (Νηπ), του πολικού κλάσματος της Νότιας Χίου (Νπ), του μη πολικού κλάσματος της Βόρειας Χίου (Βμπ), του ημι-πολικού κλάσματος της Βόρειας Χίου (Βηπ) και του πολικού κλάσματος της Βόρειας Χίου (Βπ), και αφέθηκαν για επώαση 6 (Εικόνα 17Α, 17Β) και 48 ωρών (Εικόνα 17Γ, 17Δ), σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 5-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 DMSO. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 17, μετά τις 6 ώρες επώασης τα υπό μελέτη κλάσματα των φύλλων δεν προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Η κυτταροτοξική επίδραση ξεκίνησε να παρατηρείται μετά τις 48 ώρες επώασης (Εικόνα 17Γ, 17Δ), όπου το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκάλεσαν 25-

40% και 40-60% στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, σε συγκεντρώσεις 20-100μg/ml, αντίστοιχα. Το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου ήταν τα λιγότερο κυτταροτοξικά, καθώς προκάλεσαν 20-60% στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, αλλά μόνο στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 80 και 100μg/ml. Συγκρίνοντας, τα ημι-πολικά και πολικά κλάσματα και των δύο δέντρων, παρατηρείται ότι τα πολικά κλάσματα από τα φύλλα και των δύο Μαστιχόδεντρων είναι περισσότερο κυτταροτοξικά, σε σύγκριση με τα ημι-πολικά. Τέλος, τα μη πολικά κλάσματα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου δεν προκάλεσαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην κυτταρική βιωσιμότητα, στη συγκέντρωση των 50μg/ml, μετά από επώαση 48 ωρών, συγκριτικά με τη συνθήκη ελέγχου (control), η οποία περιείχε 1/1000 EtOH. Εξαιτίας της κυτταροτοξικότητας που παρουσιάζει η EtOH, δεν κατέστη δυνατή η προσθήκη μικρότερης αραίωσης από τα 1/1000 EtOH, που θα αντιστοιχούσε σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 50μg/ml, όσο αφορά τα μη πολικά κλάσματα (Εικόνα 18).



**Εικόνα 17:** Αξιολόγηση της επίδρασης του ημι-πολικού και πολικού κλάσματος από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της Νότιας (Α,Γ) και Βόρειας Χίου (Β,Δ), στη βιωσιμότητα κυττάρων HEK293, μετά από επώαση 6 ωρών (Α,Β) και 48 ωρών (Γ,Δ). Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως η κυτταρική βιωσιμότητα παρουσία των υπό μελέτη κλασμάτων συγκρινόμενη με τη συνθήκη ελέγχου (control). Η κυτταρική βιωσιμότητα στη συνθήκη ελέγχου ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  SD, (n=5-9), \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. Νηπ: ημι-πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Νπ: πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Βηπ: ημι-πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου, Βπ: πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου [224].



**Εικόνα 18:** Αξιολόγηση της επίδρασης των μη πολικών κλασμάτων από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της Νότιας και Βόρειας Χίου, μετά από επώαση 48 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως η κυτταρική βιωσιμότητα παρουσία των υπό μελέτη κλασμάτων συγκρινόμενη με τη συνθήκη ελέγχου (control). Η κυτταρική βιωσιμότητα στη συνθήκη ελέγχου ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  SD, (n=3), Νμπ: μη πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Βμπ: μη πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου [224].

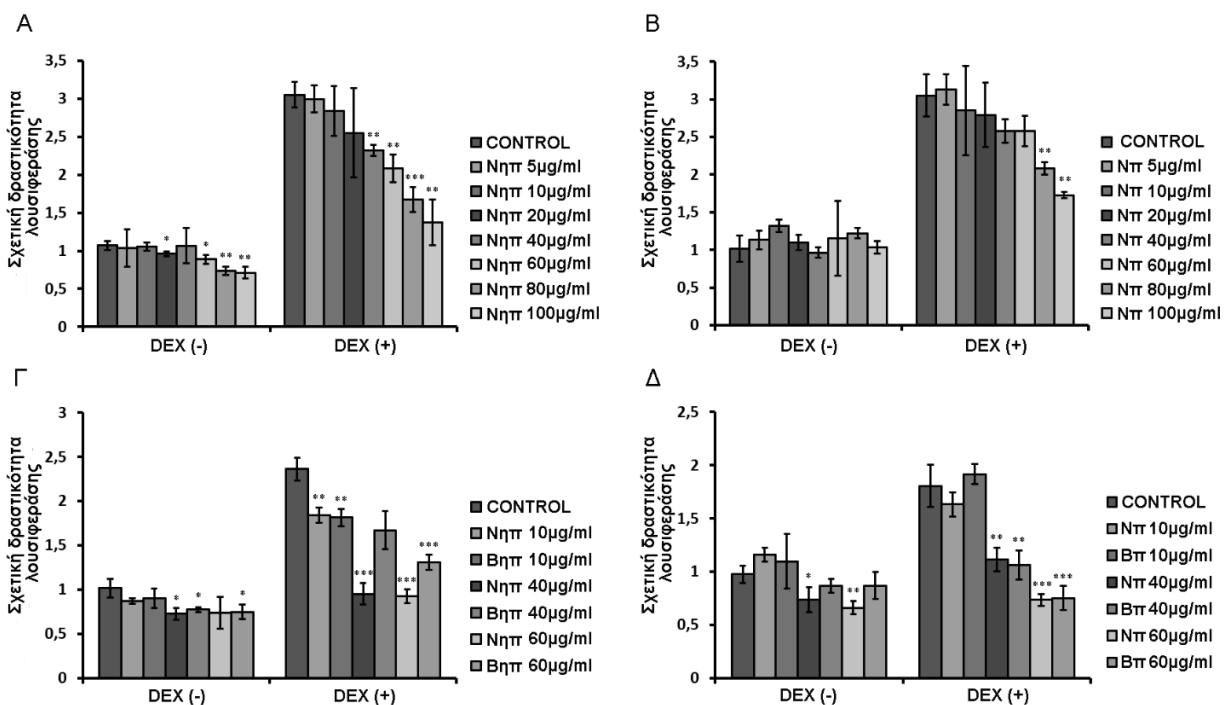
### 3.1.3. Καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών από τα κλάσματα των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*

Ακολούθως, μελετήθηκε η εμπλοκή των κλασμάτων από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου στη σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών, μέσω διερεύνησης της επίδρασής τους στη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Όπως προαναφέρθηκε, το σύμπλοκο προσδέτη/GR, μετά την ενεργοποίησή του μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου συνδέεται σε αλληλουχίες του DNA, γνωστές ως στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Οι επιθυμητές αντιφλεγμονώδεις δράσεις της σηματοδότησης των γλυκοκορτικοειδών οφείλονται στην trans-καταστολή της μεταγραφής προ-φλεγμονωδών γονιδίων, ενώ οι περισσότερες παρενέργειες είναι αποτέλεσμα της trans-ενεργοποίησης της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων στόχων [118, 198], όπως για παράδειγμα γλυκονεογενετικών γονιδίων [225]. Για την αξιολόγηση της επίδρασης των κλασμάτων στην μεταγραφική δραστηριότητα του GR εφαρμόστηκε η δοκιμή λουσιφεράσης/ $\beta$ -γαλακτοσιδάσης. Διαφορετικής πολικότητας κλάσματα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου εξετάστηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 5-100μg/ml, απουσία ή παρουσία 1μM DEX, μετά από επώαση των κυττάρων για 6 ώρες. Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 DMSO και 1/1000 EtOH.

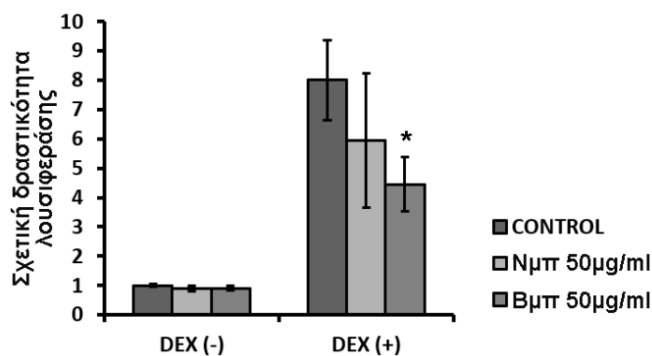
Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 19, η DEX προκάλεσε 2-3 επαγωγή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, ενώ κανένα από τα υπό μελέτη κλάσματα δεν προκάλεσε αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποδοχέα, είτε απουσία είτε παρουσία DEX, σε σύγκριση με τη συνθήκη ελέγχου. Το ημι-πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου (Εικόνα 19A), προκάλεσε 20-50% στατιστικά σημαντική μείωση της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, σε συγκεντρώσεις 40-100μg/ml. Παρόμοιας τάξης μείωση, 30-40%, προκάλεσε και το πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου (Εικόνα 19B), αλλά στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 80 και 100μg/ml.



Επομένως, το ημι-πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου φαίνεται ότι είναι πιο δραστικό σε σύγκριση με το πολικό, όσο αφορά την καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR. Από τις συγκριτικές μελέτες (Εικόνα 19Γ, 19Δ), προέκυψε ότι το ημι-πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκαλεί 20-30% περισσότερη στατιστικά σημαντική μείωση της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, σε σύγκριση με το αντίστοιχο κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου, στις συγκεντρώσεις των 40 και 60μg/ml (Εικόνα 19Γ). Όσο αφορά τα πολικά κλάσματα των δύο δέντρων, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Εικόνα 19Δ). Τέλος, το μη πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην επαγόμενη από τη DEX μεταγραφική δραστηριότητα του GR, ενώ το μη πολικό κλάσμα της Βόρειας Χίου τη μείωσε κατά 50%, στη συγκέντρωση των 50μg/ml (Εικόνα 20).



**Εικόνα 19:** Καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της Νότιας Χίου (Α,Β), και συγκριτική ανάλυση με τα αντίστοιχα κλάσματα από το Μαστιχόδεντρο της Βόρειας Χίου (Γ,Δ), μετά από επώαση 6 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης προκύπτει μετά από κανονικοποίηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης με τη δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης στη συνθήκη ελέγχου απουσία DEX ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  SD, (n=6-9), \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. Νηπ: ημι-πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Νπ: πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Βηπ: ημι-πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου, Βπ: πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου [224].



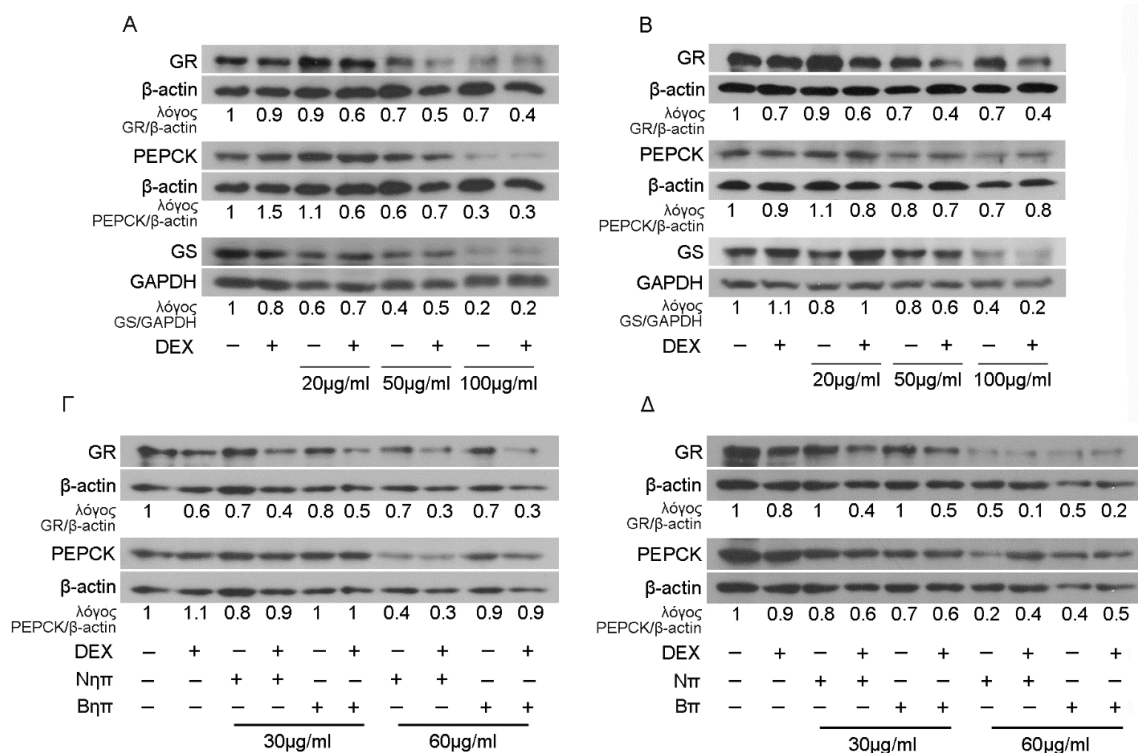
**Εικόνα 20:** Καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τα μη πολικά κλάσματα των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της Νότιας και Βόρειας Χίου, μετά από επώαση 6 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης προκύπτει μετά από κανονικοποίηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης με τη δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης στη συνθήκη ελέγχου απουσία DEX ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  SD, (n=6-9), \*p<0.05. Νμπ: μη πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Βμπ: μη πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου [224].

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρατηρούμενη μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τα υπό μελέτη κλάσματα, ακολούθησε αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων τόσο του ίδιου του υποδοχέα, όσο και μορίων στόχων της σηματοδότησής του, όπως της PEPCK και της γλουταμινικής συνθετάσης (GS) [225, 226]. Για τη διερεύνηση της επίδρασης των ημι-πολικών και πολικών κλασμάτων από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, της PEPCK και της GS, εφαρμόστηκε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Διαφορετικής πολικότητας κλάσματα από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της Νότιας και Βόρειας Χίου μελετήθηκαν, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 20-100μg/ml, απουσία ή παρουσία 10nM DEX, μετά από επώαση στα κύτταρα HEK293 για 72 (Εικόνα 21Α, 21Β) και 48 ώρες (Εικόνα 21Γ, 21Δ). Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 DMSO και 1/1000 EtOH.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο το ημι-πολικό (Εικόνα 21Α) όσο και το πολικό κλάσμα (Εικόνα 21Β) από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκάλεσαν 10-30% δοσο-εξαρτώμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, σε συγκεντρώσεις 20-100μg/ml. Μάλιστα, η συγχορήγησή τους με τη DEX είχε συνεργιστική δράση, μειώνοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR κατά 40-60%, συγκριτικά με τη συνθήκη ελέγχου. Όσο αφορά την PEPCK, το ημι-πολικό κλάσμα (Εικόνα 21Α) από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκάλεσε 40 και 70% μείωση των πρωτεϊνικών της επιπέδων, στις συγκεντρώσεις των 50 και 100μg/ml, αντίστοιχα, τόσο απουσία όσο και παρουσία DEX. Μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK προκλήθηκε και από το πολικό κλάσμα (Εικόνα 21Β), αλλά σε μικρότερο βαθμό, και συγκεκριμένα 20 και 30%, στις συγκεντρώσεις των 50 και 100μg/ml, απουσία και παρουσία DEX. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της γλουταμινικής συνθετάσης ήταν εξίσου μειωμένα παρουσία των υπό μελέτη κλασμάτων. Ειδικότερα, το ημι-πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκάλεσε 30-80% μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της GS, σε συγκεντρώσεις 20-100μg/ml, ενώ η συγχορήγηση με τη DEX δεν είχε συνεργιστική ή αθροιστική δράση. Μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της GS προκλήθηκε και από το πολικό

κλάσμα (Εικόνα 21B), και συγκεκριμένα 20-60%, απουσία DEX, σε συγκεντρώσεις 20-100μg/ml, ενώ η συγχορήγησή του με τη DEX είχε αθροιστική επίδραση, προκαλώντας μια επιπλέον μείωση κατά 20% στα πρωτεϊνικά επίπεδα της GS, στις συγκεντρώσεις των 50 και 100μg/ml. Επομένως, το ημι-πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου φαίνεται ότι είναι πιο δραστικό σε σύγκριση με το πολικό, όσο αφορά τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK και της GS, επιβεβαιώνοντας και την μεγαλύτερη καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, συγκριτικά με το αντίστοιχο πολικό κλάσμα, που σημειώθηκε στη δοκιμή της λουσιφεράσης.

Από τις συγκριτικές μελέτες (Εικόνα 21Γ, 21Δ) δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές της επίδρασης του ημι-πολικού και πολικού κλάσματος από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου, συγκριτικά με τα αντίστοιχα της Βόρειας Χίου, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR. Ωστόσο, αξιοσημείωτο ενδιαφέρον προέκυψε όσο αφορά τα επίπεδα της PEPCK, όπου το ημι-πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκάλεσε 60% μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της, στη συγκέντρωση των 60μg/ml, ενώ το αντίστοιχο κλάσμα από το Μαστιχόδεντρο της Βόρειας Χίου στην ίδια συγκέντρωση μείωσε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK μόλις 10% (Εικόνα 21Γ). Αυτό συνάδει με την 20-30% περισσότερη καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR που παρατηρήθηκε παρουσία του ημι-πολικού κλάσματος από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου, συγκριτικά με το αντίστοιχο της Βόρειας Χίου. Ομοίως, το πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκάλεσε 80% μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK, σε σύγκριση με το αντίστοιχο της Βόρειας Χίου, που μείωσε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK κατά 60%, στη συγκέντρωση των 60μg/ml (Εικόνα 21Δ). Επομένως, δοσο-εξαρτώμενες μειώσεις των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, της PEPCK και της GS προκαλούνται από όλα τα υπό μελέτη κλάσματα, με τα κλάσματα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου, και ειδικότερα του ημι-πολικού, να είναι πιο δραστικά όσο αφορά τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK, πιθανόν λόγω του μεγαλύτερου εμπλουτισμού τους σε τριτερπένια [227]. Τα μη πολικά κλάσματα δεν αξιολογήθηκαν όσο αφορά την επίδρασή τους στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, της PEPCK και της GS, αφενός λόγω της χαμηλής τους επίδρασης στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR και της χαμηλής τους σύστασης σε τριτερπένια, και αφετέρου λόγω δυσκολίας στη διαλυτοποίηση και το χειρισμό τους.

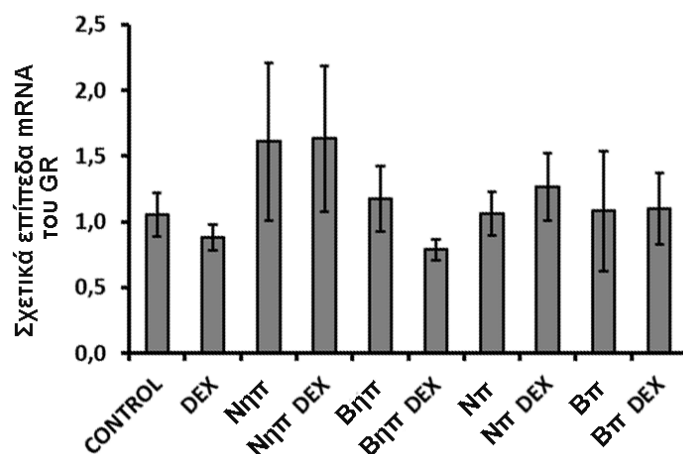


**Εικόνα 21:** Αξιολόγηση της επίδρασης του ημι-πολικού και πολικού κλάσματος των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της Νότιας Χίου (Α,Β), στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, της PEPCK και της GS, καθώς και συγκριτική ανάλυση με τα αντίστοιχα κλάσματα από το Μαστιχόδεντρο της Βόρειας Χίου (Γ,Δ), μετά από επώαση 72 (Α,Β) και 48 ωρών (Γ,Δ), σε κύτταρα HEK293. Οι λόγοι προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων με τις αντίστοιχες της β-actin ή GAPDH. Nηπ: ημι-πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Nπ: πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Βηπ: ημι-πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου, Βπ: πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου [224].

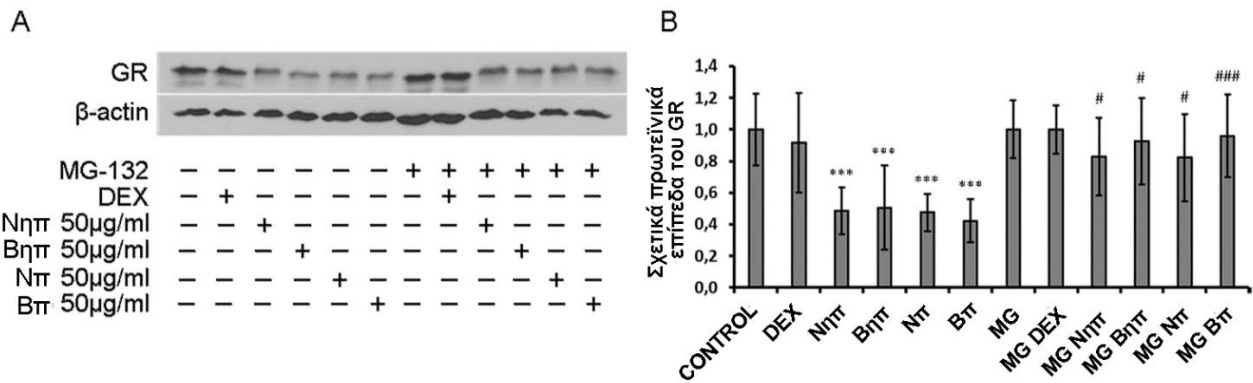
### 3.1.4. Αναστολή της επαγόμενης από τα κλάσματα των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, παρουσία του αναστολέα του πρωτεασώματος MG-132

Στη συνέχεια, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο βιοχημικός μηχανισμός μέσω του οποίου τα κλάσματα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου, προκαλούν μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, αρχικά εξετάστηκε η επίδραση των κλασμάτων στα μεταγραφικά επίπεδα του υποδοχέα. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HEK293 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6 θέσεων, σε θρεπτικό μέσο DMEM, χωρίς κόκκινο της φαινόλης, ελεύθερο στεροειδών ορμονών, με πυκνότητα  $2 \times 10^5$ /θέση, για 48 ώρες. Έπειτα, τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 ώρες με το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα των φύλλων της Νότιας και Βόρειας Χίου, στη συγκέντρωση των 50µg/ml, απουσία και παρουσία 0.1µM DEX. Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 DMSO και 1/1000 EtOH. Τέλος, ακολούθησε απομόνωση ολικού κυτταρικού mRNA και ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου του GR, μέσω εφαρμογής real-time PCR. Βάσει των αποτελεσμάτων, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα mRNA του GR, παρουσία των υπό μελέτη κλασμάτων, συγκριτικά με τη συνθήκη ελέγχου (control) (Εικόνα 22).

Ακολούθησε διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου στην προτεολυτική αποικοδόμηση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, μέσω του μονοπατιού του πρωτεασώματος. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HEK293 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6 θέσεων, σε θρεπτικό μέσο DMEM, χωρίς κόκκινο της φαινόλης, ελεύθερο στεροειδών ορμονών, με πυκνότητα  $2 \times 10^5$ /θέση, για 48 ώρες. Έπειτα, τα κύτταρα προ-επώαστηκαν για 1 ώρα με 5μM του αναστολέα του πρωτεασώματος MG-132. Ακολούθησε, η προσθήκη των υπό μελέτη κλασμάτων, δηλαδή του ημι-πολικού κλάσματος της Νότιας Χίου (Νηπ), του πολικού κλάσματος της Νότιας Χίου (Νπ), του ημι-πολικού κλάσματος της Βόρειας Χίου (Βηπ) και του πολικού κλάσματος της Βόρειας Χίου (Βπ), στη συγκέντρωση των 50μg/ml, και αφέθηκαν για επώαση 24 ωρών. Ακολούθησε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western για την αξιολόγηση της επίδρασης των υπό μελέτη κλασμάτων στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR. Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε ddH<sub>2</sub>O, 1/1000 DMSO και 1/1000 EtOH. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κλάσματα των φύλλων προκάλεσαν έως 60% στατιστικά σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, όπως αναμενόταν, μετά από την επώαση των 24 ωρών, συγκριτικά με τη συνθήκη ελέγχου (control). Το ενδιαφέρον είναι ότι η προ-επώαση των κυττάρων με τον αναστολέα του πρωτεασώματος MG-132, αποκατέστησε την επαγόμενη από τα κλάσματα των φύλλων μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, σε επίπεδα όμοια με τη συνθήκη ελέγχου (control) (Εικόνα 23). Τα αποτελέσματα αυτά, υποδεικνύουν έναν μηχανισμό ρύθμισης των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR από τα κλάσματα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου, ο οποίος περιλαμβάνει την εμπλοκή του μονοπατιού του πρωτεασώματος.



**Εικόνα 22:** Αξιολόγηση της επίδρασης των κλασμάτων από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της Νότιας και Βόρειας Χίου, στα επίπεδα mRNA του GR, σε κύτταρα HEK293, εφαρμόζοντας real-time PCR. Τα σχετικά επίπεδα mRNA του GR προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση με τα αντίστοιχα της GAPDH, που αποτελεί γονίδιο αναφοράς [224].



**Εικόνα 23:** Ενεργοποίηση της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης του GR από τα κλάσματα των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της Νότιας και Βόρειας Χίου, μέσω του μονοπατιού του πρωτεασώματος. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western του GR, σε κύτταρα HEK293, τα οποία προ-επωάστηκαν με 5μM MG-132 για 1 ώρα, κι έπειτα με τα υπό μελέτη κλάσματα στη συγκέντρωση των 50μg/ml, για επιπλέον 24 ώρες (A). Ποσοτικοποίηση των σχετικών πρωτεϊνικών επιπέδων του GR μετά από κανονικοποίηση των αντίστοιχων της β-actin. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± SD, (n=3), \*\*\*p<0.001, σύγκριση με τη συνθήκη ελέγχου (control), #p<0.05, ###p<0.001, σύγκριση των συνθηκών παρουσία του MG-132 με τις αντίστοιχες συνθήκες απουσία του MG-132 (B). Νηπ: ημι-πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Νπ: πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Βηπ: ημι-πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου, Βπ: πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου [224].

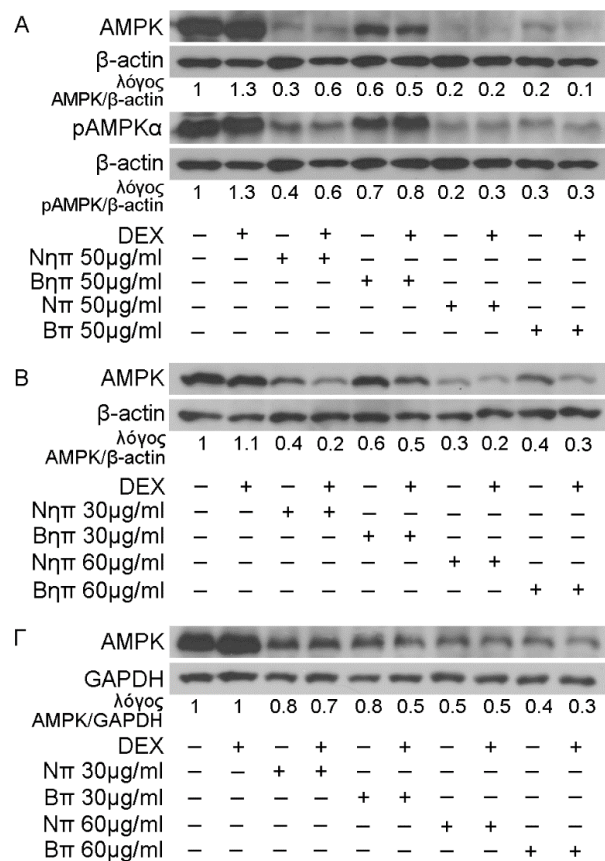
### 3.1.5. Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* στην σηματοδότηση της AMPK

Παράλληλα, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των υπό μελέτη κλασμάτων από τα φύλλα στον ενεργειακό μεταβολισμό, εξετάστηκε η επίδρασή τους στα πρωτεϊνικά επίπεδα και την ενεργοποίηση της AMPK. Η AMPK είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης και αποτελεί τον ενεργειακό αισθητήρα του κυττάρου, ρυθμίζοντας την ενεργειακή ομοιόσταση. Συγκεκριμένα, όταν τα κυτταρικά επίπεδα της AMP αυξάνονται και της ATP μειώνονται, η AMPK φωσφορυλιώνεται από άλλες κινάσες ανοδικά και ενεργοποιείται. Η φωσφορυλιωμένη και ενεργοποιημένη AMPK ενεργοποιεί έπειτα μονοπάτια που οδηγούν σε καταβολισμό και παράλληλα αναστέλλει μονοπάτια που οδηγούν σε αναβολισμό, προκειμένου να παραχθεί ATP και να αποκατασταθεί η έλλειψη ενέργειας [181]. Έχει δειχθεί ότι η σηματοδότηση της AMPK διασταυρώνεται με τη σηματοδότηση του GR, οδηγώντας σε φωσφορυλίωση του GR στη Ser211 και στη ρύθμιση της μεταγραφικής του δραστηριότητας [184]. Επιπλέον, η AMPK ρυθμίζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, και πιο συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι η φωσφορυλιωμένη και ενεργοποιημένη AMPK αναστέλλει την επαγόμενη από τη DEX-μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR [185]. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη ότι η κατάσταση φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης της AMPK επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα καθώς και τη μεταγραφική δραστηριότητα του GR, προχωρήσαμε σε μελέτη της επίδρασης των κλασμάτων από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα τόσο της AMPK όσο και της κατάστασης φωσφορυλίωσης αυτής.

Για τη διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της AMPK καθώς και της φωσφορυλιωμένης AMPK στη θρεονίνη 172 της άλφα υπομονάδας (p-AMPKα-Thr172), εφαρμόστηκε ανάλυση

ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα ημι-πολικά και πολικά κλάσματα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου εξετάστηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 30-60μg/ml, απουσία και παρουσία 1μM DEX, μετά από επώαση στα κύτταρα HEK293 για 1 ώρα (Εικόνα 24Α), καθώς και απουσία και παρουσία 10nM DEX, μετά από επώαση για 48 ώρες (Εικόνα 24Β, 24Γ). Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 DMSO και 1/1000 EtOH.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24, μετά από επώαση 1 ώρας (Εικόνα 24Α), όλα τα υπό μελέτη κλάσματα των φύλλων μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα τόσο της AMPK όσο και της p-AMPKα-Thr172, κατά 40-90% και 20-80%, αντίστοιχα. Το ενδιαφέρον είναι ότι το ημι-πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκάλεσε 30% μεγαλύτερη μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα των AMPK και p-AMPKα-Thr172, συγκριτικά με το αντίστοιχο κλάσμα της Βόρειας Χίου, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των πολικών κλασμάτων. Επίσης, τα πολικά κλάσματα των φύλλων και από τα δύο δέντρα, ήταν περισσότερο δραστικά σε σύγκριση με τα ημι-πολικά. Συγκεκριμένα, τα πολικά κλάσματα μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της AMPK και p-AMPKα-Thr172, κατά 10-40% περισσότερο, συγκριτικά με τα ημι-πολικά (Εικόνα 24Α). Ομοίως, μετά από την επώαση των 48 ωρών, όλα τα υπό μελέτη κλάσματα προκάλεσαν δοσο-εξαρτώμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της AMPK (Εικόνα 24Β, 24Γ). Από τη συγκριτική μελέτη προέκυψε ότι το ημι-πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκάλεσε 10-20% περισσότερη μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της AMPK, συγκριτικά με το αντίστοιχο κλάσμα της Βόρειας Χίου, στις συγκεντρώσεις των 30 και 60μg/ml (Εικόνα 24Β). Ωστόσο, όσο αφορά τη συγκριτική μελέτη των πολικών κλασμάτων από τα φύλλα των Μαστιχόδεντρων της Νότιας και Βόρειας Χίου, δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές (Εικόνα 24Γ). Τέλος, η συγχορήγηση των κλασμάτων με τη DEX επίσης δεν προκάλεσε αξιοσημείωτες μεταβολές.



**Εικόνα 24:** Αξιολόγηση της επίδρασης του ημι-πολικού και πολικού κλάσματος των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της Νότιας και Βόρειας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της AMPK καθώς και της φωσφορυλιωμένης AMPKα στη Thr172 (p-AMPKα-Thr172), μετά από επώαση 1 ώρας (A) και 48 ωρών (B,Γ), σε κύτταρα HEK293. Οι λόγοι προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων με τις αντίστοιχες της β-actin ή GAPDH. Nηπ: ημι-πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Nπ: πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Bηπ: ημι-πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου, Bπ: πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου [224].

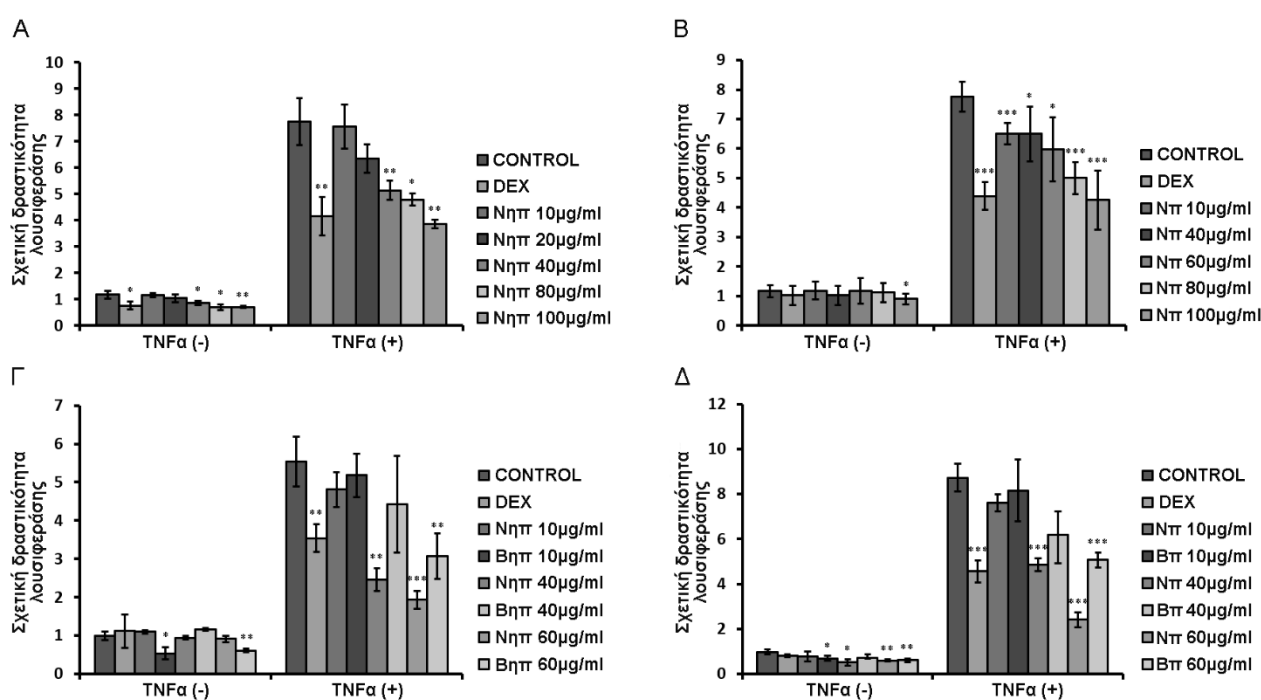
### 3.1.6. Καταστολή της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB από τα κλάσματα των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*

Επόμενος στόχος τέθηκε η διερεύνηση της αντιφλεγμονώδους δράσης των υπό μελέτη κλασμάτων από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου. Για το σκοπό αυτό, ελέγχθηκε η επίδραση των κλασμάτων, στη μεταγραφική δραστηριότητα του παράγοντα φλεγμονής NF-κB, εφαρμόζοντας τη δοκιμή λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μελέτη των ημι-πολικών και πολικών κλασμάτων από φύλλα Μαστιχόδεντρων που φύονται στο Νότιο και Βόρειο τμήμα της Χίου, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 10-100μg/ml, καθώς και της DEX (1μM), απουσία ή παρουσία 20nM TNFα, μετά από επώαση στα κύτταρα για 6 ώρες. Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε ddH<sub>2</sub>O, 1/1000 DMSO και 1/1000 EtOH.

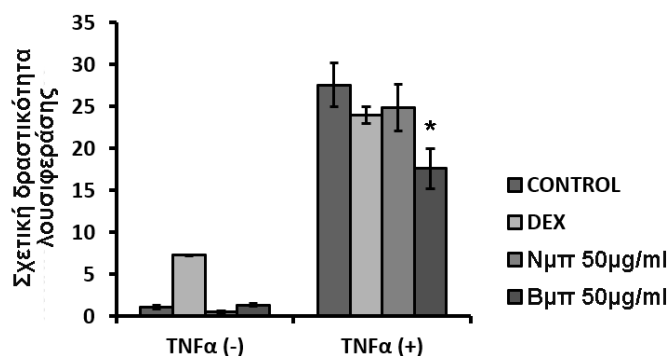
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29, ο TNFα προκάλεσε 6-9 φορές επαγωγή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB, ενώ η DEX όπως αναμενόταν μείωσε κατά 40-50% την επαγόμενη από τον TNFα μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ημι-



πολικό και πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκάλεσαν 30-50% και 15-45%, αντίστοιχα, στατιστικά σημαντική μείωση της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ, σε συγκεντρώσεις 40-100μg/ml και 10-100μg/ml, αντίστοιχα (Εικόνα 25Α, 25Β). Από τις συγκριτικές μελέτες (Εικόνα 25Γ, 25Δ), προέκυψε ότι το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκαλούν περισσότερη κατά 20-30% στατιστικά σημαντική μείωση της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ, συγκριτικά με τα αντίστοιχα κλάσματα από το Μαστιχόδεντρο της Βόρειας Χίου, στη συγκέντρωση των 60μg/ml. Τέλος, το μη πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντικές μεταβολές, ενώ το μη πολικό κλάσμα της Βόρειας Χίου μείωσε κατά 35%, την επαγόμενη από τον TNFα μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κΒ, στη συγκέντρωση των 50μg/ml (Εικόνα 26).

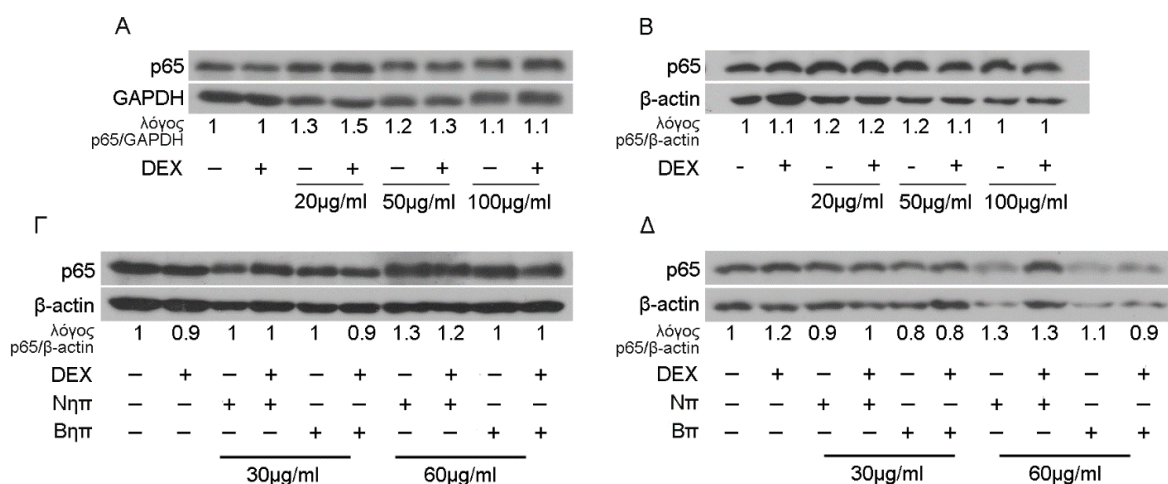


**Εικόνα 25:** Καταστολή της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ από το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της Νότιας Χίου (Α,Β), και συγκριτική μελέτη με τα αντίστοιχα κλάσματα της Βόρειας Χίου (Γ,Δ), μετά από επώαση 6 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης προκύπτει μετά από κανονικοποίηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης με τη δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης στη συνθήκη ελέγχου (control) απουσία TNFα ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  SD, (n=6-9), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Νηπ: ημι-πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Νπ: πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Βηπ: ημι-πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου, Βπ: πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου [224].



**Εικόνα 26:** Καταστολή της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ από τα μη πολικά κλάσματα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου, μετά από επώαση 6 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης προκύπτει μετά από κανονικοποίηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης με τη δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης στη συνθήκη ελέγχου (control) απουσία TNFα ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  SD, (n=3-6), \*p<0.05. Νμπ: μη πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Βμπ: μη πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου [224].

Έπειτα, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο βιοχημικός μηχανισμός της παρατηρούμενης μείωσης της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ, μελετήθηκε η επίδραση των κλασμάτων από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65. Όπως προαναφέρθηκε, ο NF-κΒ αποτελεί έναν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή μεταγραφικό παράγοντα, αποτελούμενο από τις υπομονάδες p65 (Rel A), c-Rel, Rel B, p52/p100 και p50/p105, με το κυρίαρχο ετεροδιμερές να είναι το p65/p50 [175]. Επομένως, για τη διερεύνηση της επίδρασης των υπό μελέτη κλασμάτων, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του παράγοντα φλεγμονής NF-κΒ, εφαρμόστηκε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western, χρησιμοποιώντας κατάλληλο αντίσωμα. Αναλυτικότερα, τα διαφορετικής πολικότητας κλάσματα από τα φύλλα των Μαστιχόδεντρων που φύονται στη Νότια και Βόρεια Χίο ελέγχθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 20-100μg/ml, απουσία και παρουσία 10nM DEX, μετά από επώαση στα κύτταρα HEK293 για 72 (Εικόνα 27Α, 27Β) και 48 ώρες (Εικόνα 27Γ, 27Δ). Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 DMSO και 1/1000 EtOH. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 27, δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κΒ, παρουσία των υπό μελέτη κλασμάτων, συγκριτικά με τη συνθήκη ελέγχου. Επομένως, η παρατηρούμενη μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ που προκαλούν τα κλάσματα των φύλλων, όπως προέκυψε από τις μετρήσεις λουσιφεράσης, δεν οφείλεται σε μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65, αλλά σε ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας. Τα μη πολικά κλάσματα δεν αξιολογήθηκαν όσο αφορά την επίδρασή τους στα πρωτεϊνικά επίπεδα της p65, αφενός λόγω της χαμηλής τους επίδρασης στη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κΒ και της χαμηλής τους σύστασης σε τριτερπένια, και αφετέρου λόγω δυσκολίας στη διαλυτοποίηση και το χειρισμό τους, όπως προαναφέρθηκε.



**Εικόνα 27:** Αξιολόγηση της επίδρασης του ημι-πολικού και πολικού κλάσματος των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου (Α,Β) στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κΒ, και συγκριτική μελέτη με τα αντίστοιχα κλάσματα από το Μαστιχόδεντρο της Βόρειας Χίου (Γ,Δ), μετά από επώαση 72 (Α,Β) και 48 ωρών (Γ,Δ), σε κύτταρα HEK293. Οι λόγοι προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων με τις αντίστοιχες της β-actin ή GAPDH. Νηπ: ημι-πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Νπ: πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Βηπ: ημι-πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου, Βπ: πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου [224].

### 3.1.7. Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* στους αποπτωτικούς μηχανισμούς

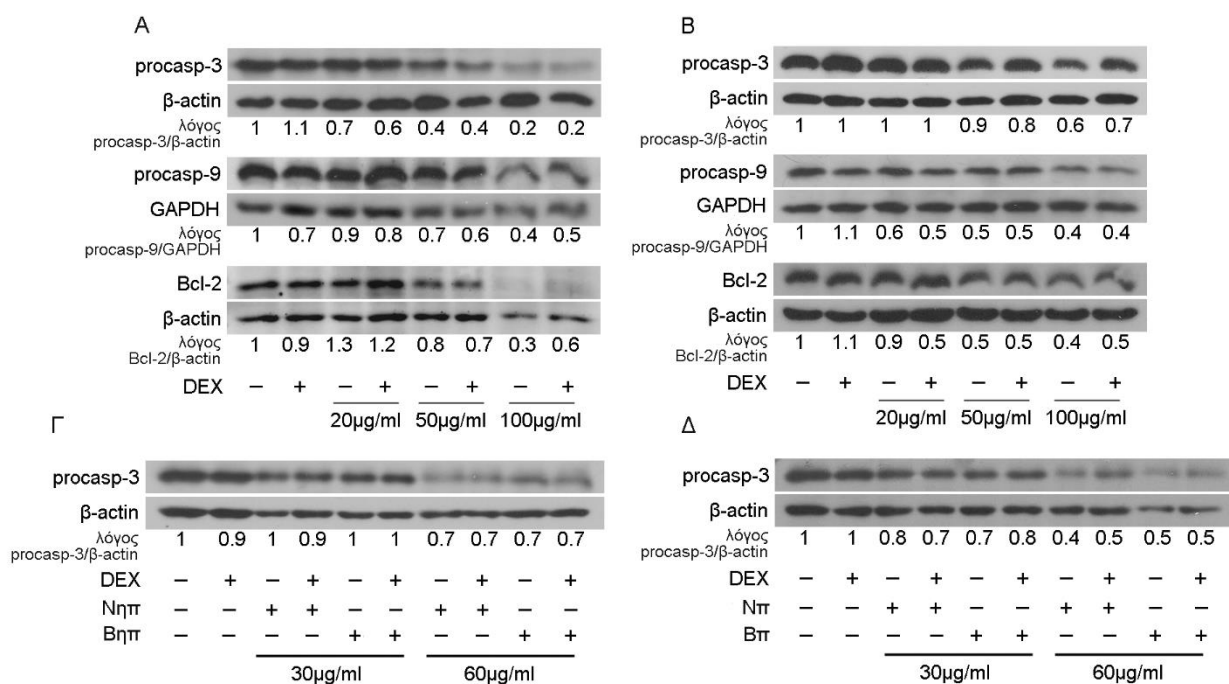
Στη συνέχεια, στόχος της παρούσας μελέτης τέθηκε η διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου στη ρύθμιση των αποπτωτικών μηχανισμών στα κύτταρα HEK293, καθώς και η αποσαφήνιση του βιοχημικού μηχανισμού μέσω του οποίου αυτή πραγματοποιείται. Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των κλασμάτων στους αποπτωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, εφαρμόστηκε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western, για την αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3, της προκασπάσης-9 και της bcl-2. Αναλυτικότερα, τα διαφορετικής πολικότητας κλάσματα από τα φύλλα από το *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της Νότιας και Βόρειας Χίου εξετάστηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 20-100μg/ml, απουσία και παρουσία 10nM DEX, μετά από επώαση στα κύτταρα HEK293 για 72 (Εικόνα 28Α, 28Β) και 48 ώρες (Εικόνα 28Γ, 28Δ). Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 DMSO και 1/1000 EtOH.

Αρχικά αξιολογήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3, η οποία αποτελεί το πρόδρομο μόριο της κασπάσης-3. Η κασπάση-3, μαζί με τις κασπάσες-6 και -7, αποτελούν τις κασπάσες τελεστές της απόπτωσης που καταλύουν την τελική αποικοδόμηση ρυθμιστικών και δομικών πρωτεϊνών, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο. Πρόδρομο μόριο της κασπάσης-3 είναι η προκασπάση-3, η οποία πρωτεολύεται δημιουργώντας μια μεγάλη υπομονάδα την p20 και μια μικρή την p12. Η υπομονάδα p20 πρωτεολύεται περαιτέρω δημιουργώντας την υπομονάδα p17. Επομένως, η ενεργή πλέον κασπάση-3 αποτελείται από τις υπομονάδες p17 και p12 [228]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το ημι-πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου (Εικόνα 28Α) προκάλεσε 30-80% μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3, σε συγκεντρώσεις 20-100μg/ml, ενώ το πολικό κλάσμα (Εικόνα 28Β) ήταν

λιγότερο δραστικό αφού μείωσε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3 κατά 10-40%, σε συγκεντρώσεις 50-100μg/ml.

Έπειτα, προκειμένου να διερευνηθεί ο αποπτωτικός μηχανισμός ακολούθησε μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9, η οποία συμμετέχει στο ενδογενές μιτοχονδριακά εξαρτώμενο μονοπάτι [229]. Βάσει των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, το ημι-πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου (Εικόνα 28Α) προκάλεσε μείωση κατά 30-60% των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9, σε συγκεντρώσεις 50-100μg/ml, απουσία ή παρουσία DEX, ενώ το αντίστοιχο πολικό (Εικόνα 28Β) προκάλεσε μείωση κατά 40-60% ακόμη και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 20μg/ml, απουσία ή παρουσία DEX.

Ακολούθησε αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2. Η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη bcl-2 ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2, η οποία περιλαμβάνει τόσο προ-αποπτωτικές (bax, bad, bak, bid, bim, bik, κ.α.) όσο και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες (bcl-2, bcl-xL, bcl-w, κ.α.). Εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και παρεμποδίζει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, καταστέλλοντας την ενεργοποίηση των κασπασών και της απόπτωσης [230]. Ομοίως με την προκασπάση-9, το ημι-πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου (Εικόνα 28Α) μείωσε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 κατά 20-70% σε συγκεντρώσεις 50-100μg/ml, ενώ το αντίστοιχο πολικό κλάσμα προκάλεσε μείωση κατά 50-60% στις ίδιες συγκεντρώσεις (Εικόνα 28Β). Από τη συγκριτική μελέτη (Εικόνα 28Γ, 28Δ) δεν διαπιστώθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3, γι' αυτό το λόγο δεν προχωρήσαμε σε περαιτέρω συγκριτικές μελέτες αποσαφήνισης του αποπτωτικού μηχανισμού. Επομένως, από την αξιολόγηση των αποπτωτικών δράσεων του ημι-πολικού και πολικού κλάσματος από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου (Εικόνα 28Α, 28Β) προκύπτει ότι το ημι-πολικό είναι πιο δραστικό όσο αφορά τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3 και bcl-2, ενώ και τα δύο παραπάνω κλάσματα επάγουν τον μιτοχονδριακά-εξαρτώμενο αποπτωτικό μηχανισμό, όπως υποδεικνύει η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9.



**Εικόνα 28:** Αξιολόγηση της επίδρασης του ημι-πολικού και πολικού κλάσματος των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της Νότιας Χίου (Α,Β), στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3, προκασπάσης-9 και bcl-2, και συγκριτική μελέτη με τα αντίστοιχα κλάσματα της Βόρειας Χίου (Γ,Δ), μετά από επώαση 72 (Α,Β) και 48 ωρών (Γ,Δ), σε κύτταρα HEK293. Οι λόγοι προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων με τις αντίστοιχες της β-actin ή GAPDH. Νηπ: ημι-πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Νπ: πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Βηπ: ημι-πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου, Βπ: πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου [224]

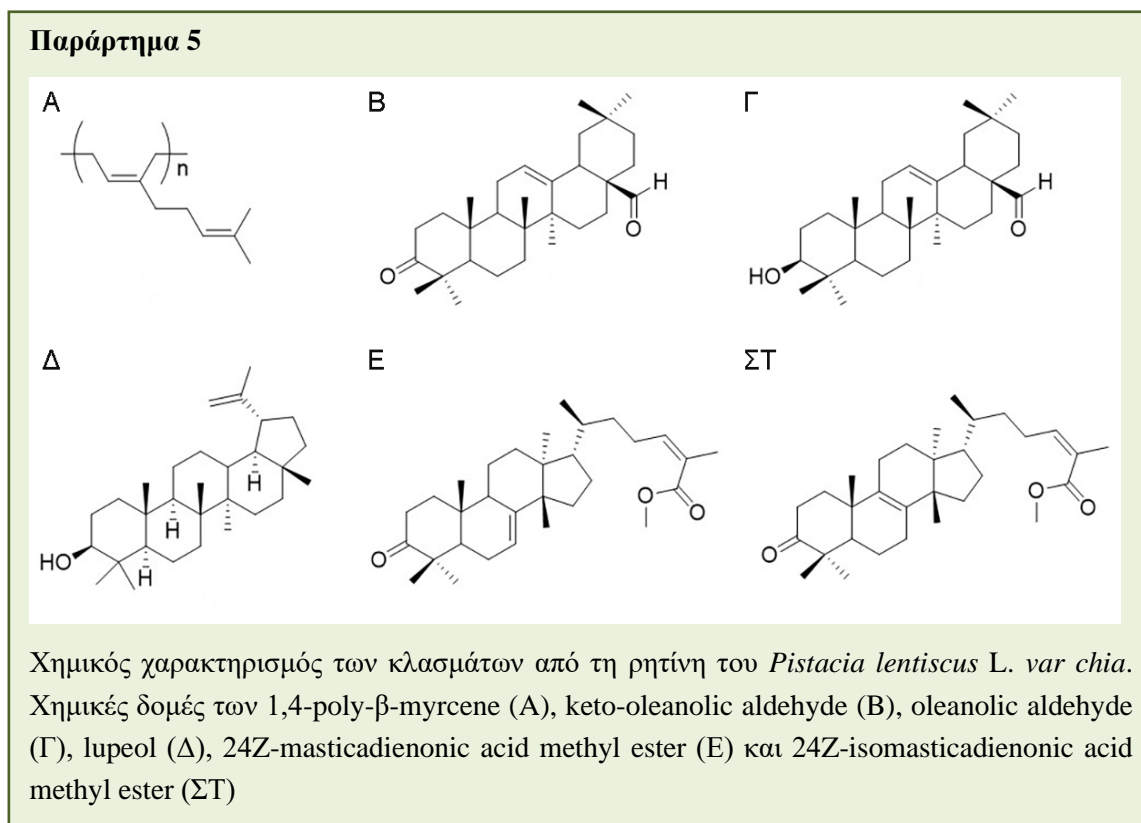
### 3.2. Αξιολόγηση βιολογικών δράσεων κλασμάτων από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*

#### 3.2.1. Χημικός χαρακτηρισμός των κλασμάτων από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*

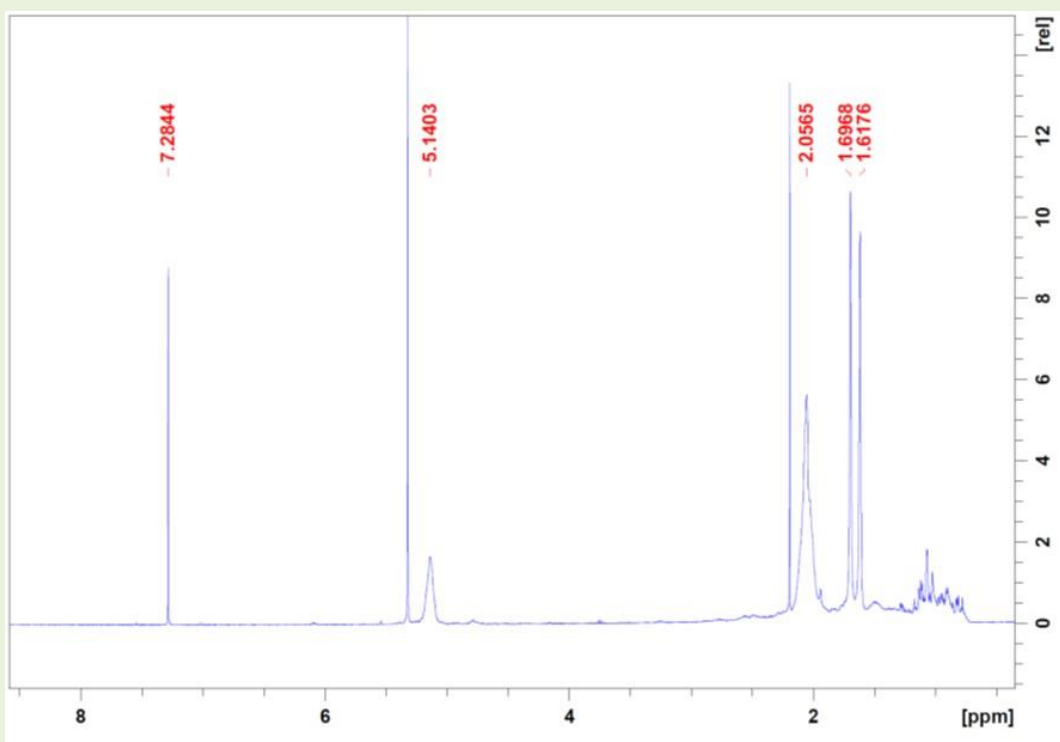
Ο χημικός χαρακτηρισμός των κλασμάτων από τη ρητίνη του Μαστιχόδεντρου Χίου πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Dr. Giovanni Appendino, (Professor of Chemistry, Università del Piemonte Orientale (UPO), Faculty of Pharmacy, Novara, Italy). Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την κλασμάτωση της ρητίνης είχε ως σκοπό τον εντοπισμό βιοενεργών συστατικών. Βάσει αυτού, το μη πολικό κλάσμα αντιστοιχεί σε ένα ουδέτερο κλάσμα, ενώ τα τριτερπενοειδή οξέα απομονώνονται στο ημι-πολικό κλάσμα. Επομένως, ο χημικός χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε ψάχνοντας για τριτερπενοειδή συστατικά στο μη πολικό και στο ημι-πολικό κλάσμα. Αντίθετα, το πολικό κλάσμα αναλύθηκε με <sup>1</sup>H NMR με σκοπό τον ποιοτικό χαρακτηρισμό των κυριότερων συστατικών (Παράρτημα 5).

Το μη πολικό κλάσμα της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου αποτελείται από το πολυμερές 1,4-*poly-β-μυρσένιο* που εντοπίζεται από την τυπική παρουσία πρωτονίου στους διπλούς δεσμούς που επικαλύπτεται στα H=5.14ppm, αλλυλικού πρωτονίου στα H=2.05ppm και μεθυλικής ομάδας στα H=1.61 και H=1.69ppm (Παράρτημα 6). Σε αυτό το κλάσμα τα τριτερπενοειδή που εντοπίστηκαν ήταν τα keto-ολεανολική αλδεΰδη και ολεανολική αλδεΰδη, στα οποία η ομάδα

αλδεϋδης εντοπίζεται στα  $H=9.39\text{ppm}$  και για τα δύο τριτερπενοειδή. Η ολεανολική αλδεϋδη ταυτοποιήθηκε από την υδροξυλική ομάδα που εντοπίζεται στα  $H=3.23\text{-}3.19\text{ppm}$  (Παράρτημα 8) και η οποία απουσιάζει από την keto-ολεανολική αλδεϋδη, λόγω της κετονικής οξείδωσης (Παράρτημα 7). Η πιο άφθονη ποσότητα τριτερπενοειδών βρέθηκε στο ημι-πολικό κλάσμα, στο οποίο ταυτοποιήθηκε η λουπεόλη (Παράρτημα 9) [218] μαζί με μια μικρή ποσότητα ολεανολικής αλδεϋδης. Στο ημι-πολικό κλάσμα εντοπίστηκαν και καθαρίστηκαν μετά από μια αντίδραση μεθυλίωσης, τα τριτερπενοειδή μεθυλεστέρας του 24Z-μαστιχαδιενονικού οξέος και μεθυλεστέρας του 24Z-ισομαστιχαδιενονικού οξέος. Τα παραπάνω οξέα ταυτοποιήθηκαν λόγω της αντίδρασης εστεροποίησης της καρβοξυλικής ομάδας ( $H=3.74$  και  $H=3.73\text{ppm}$ ). Ακόμη, ο μεθυλεστέρας του 24Z-ισομαστιχαδιενονικού οξέος χαρακτηρίζεται από την παρουσία αλλυλικού πρωτονίου στα  $H=5.96\text{ppm}$  (Παράρτημα 11), ενώ ο μεθυλεστέρας του 24Z-μαστιχαδιενονικού οξέος διαθέτει πρόσθετα σήματα στα  $H=5.31\text{ppm}$  (Παράρτημα 10). Τέλος, η ανάλυση με  $^1\text{H NMR}$  του πολικού κλάσματος της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου ανέδειξε την παρουσία φαινολικών συστατικών όπως υποδεικνύεται από τη χημική μετατόπιση μεταξύ των  $H=7.26\text{-}7.57\text{ppm}$  (Παράρτημα 12) [231].

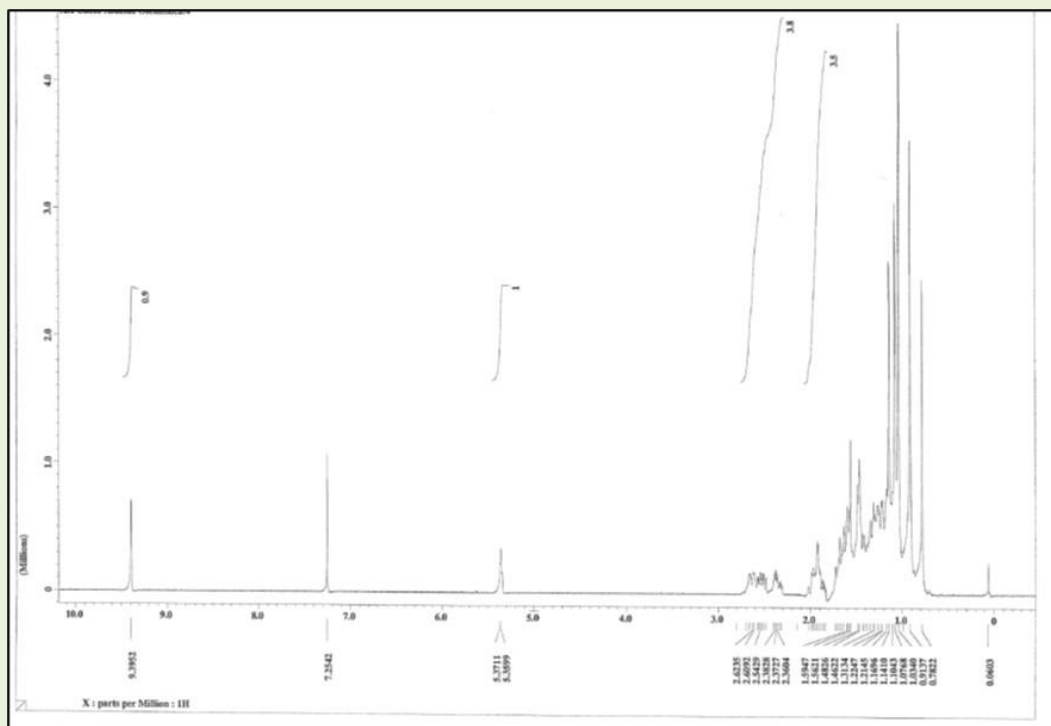


### Παράρτημα 6



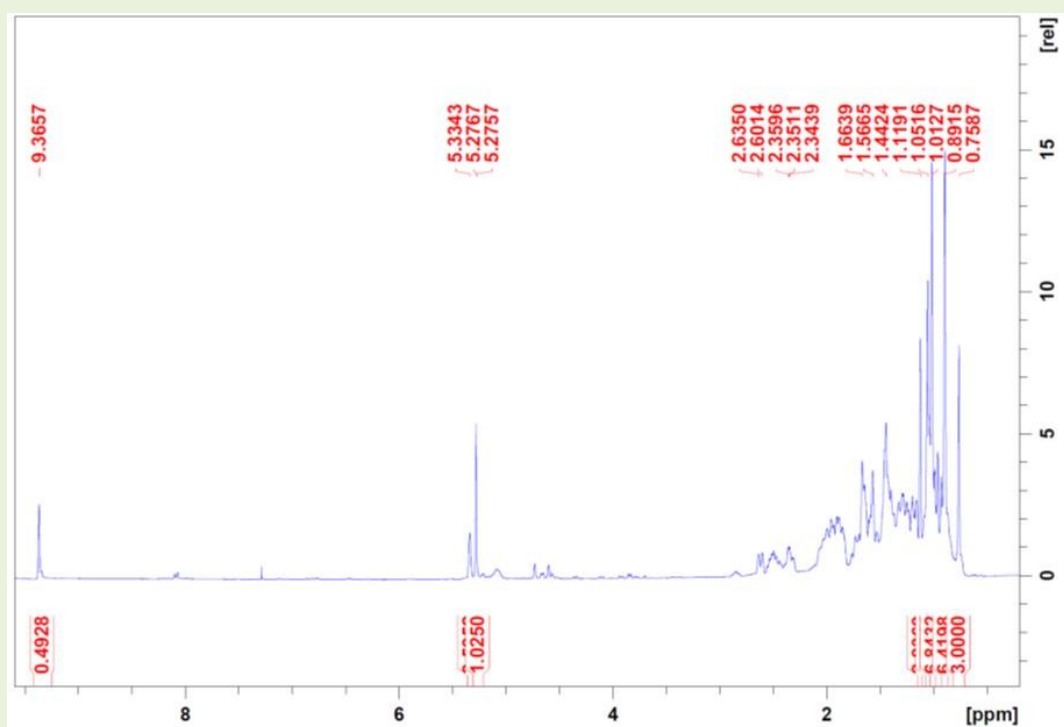
<sup>1</sup>H NMR του συστατικού 1,4-poly-β-myrcene σε CDCl<sub>3</sub> 400 MHz

### Παράρτημα 7



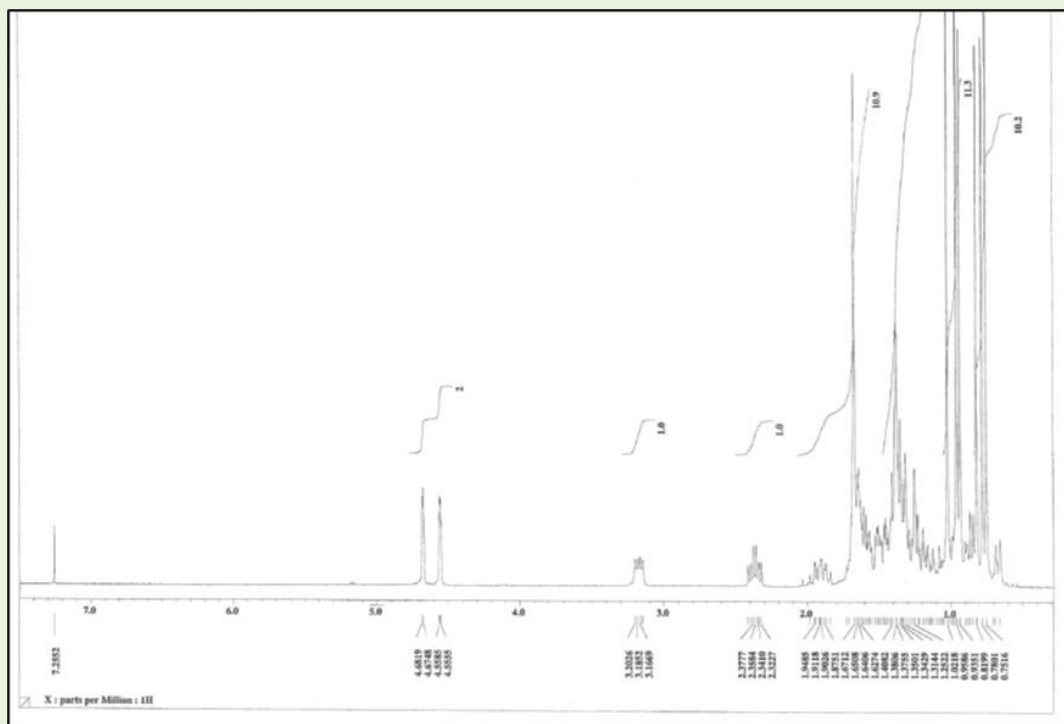
<sup>1</sup>H NMR του συστατικού keto-oleanolic aldehyde σε CDCl<sub>3</sub> 400 MHz

### Παράρτημα 8



$^1\text{H}$  NMR του συστατικού oleanolic aldehyde σε  $\text{CDCl}_3$  400 MHz

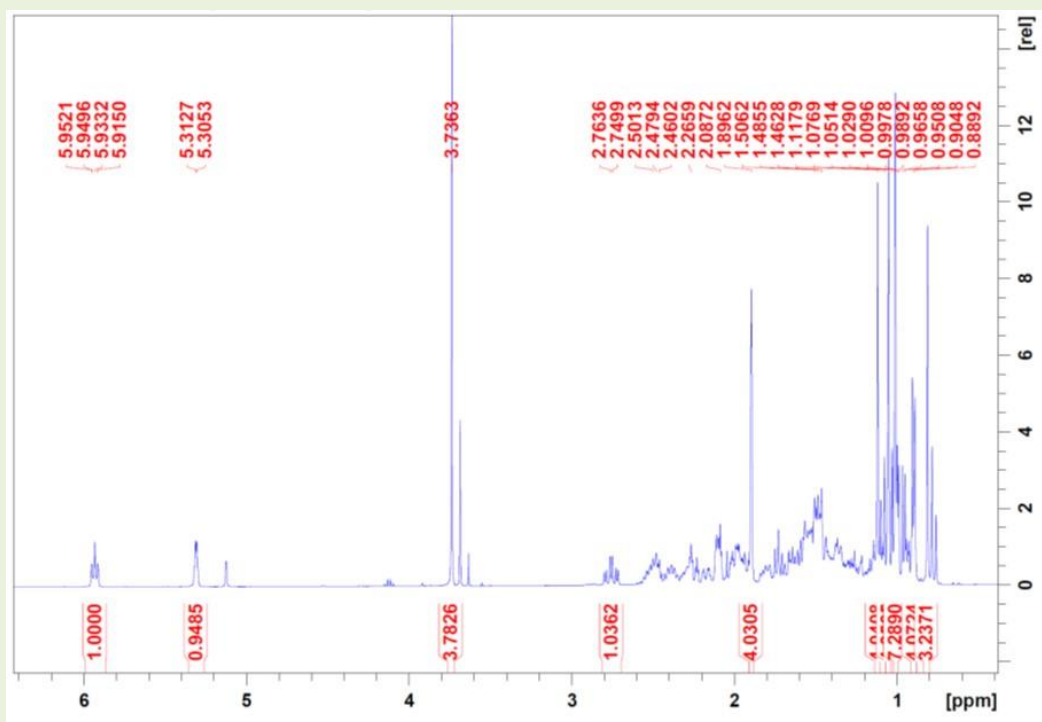
### Παράρτημα 9



$^1\text{H}$  NMR του συστατικού luprol σε  $\text{CDCl}_3$  400 MHz

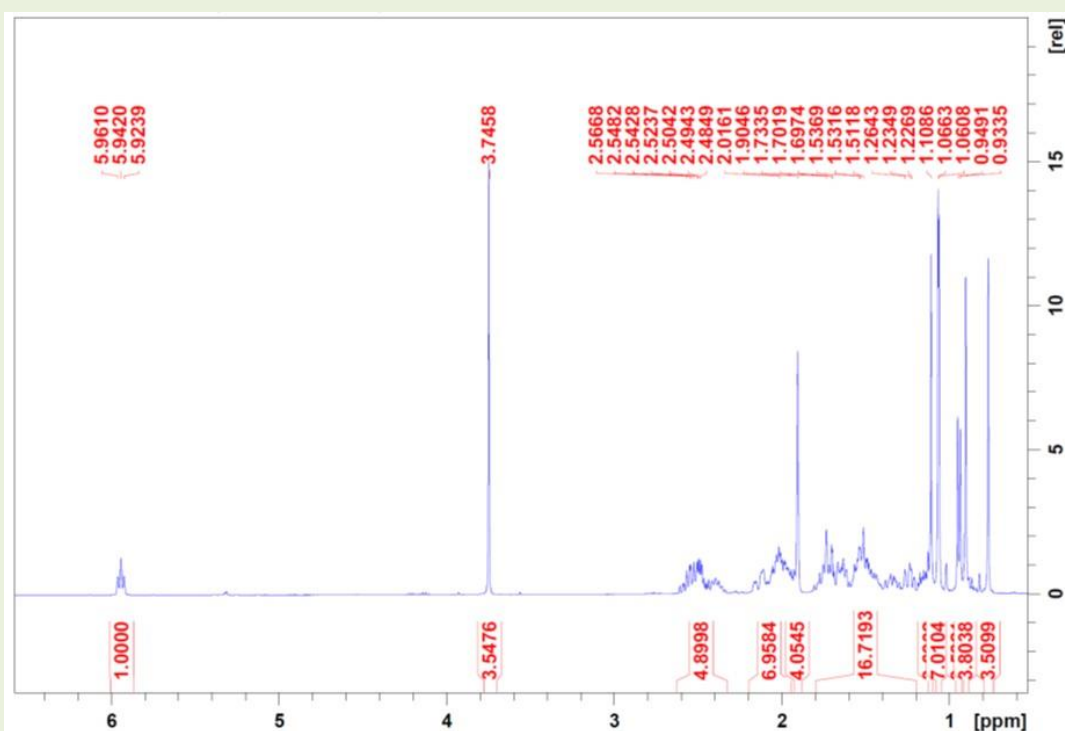


### Παράρτημα 10



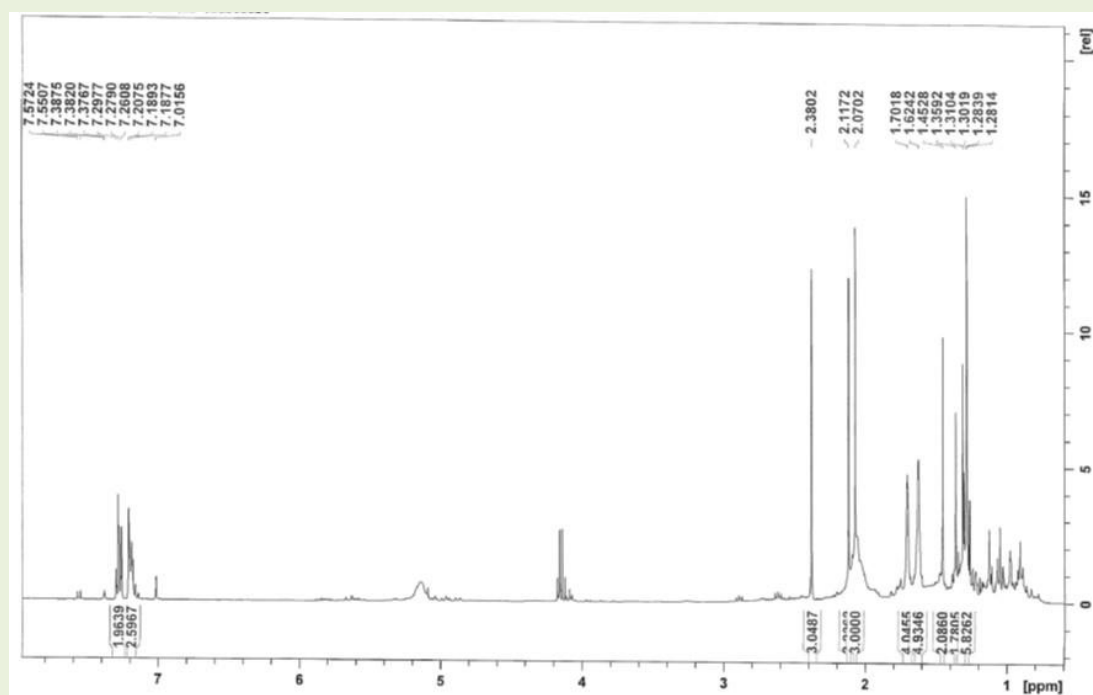
<sup>1</sup>H NMR του συστατικού 24Z-masticadienonic acid methyl ester σε CDCl<sub>3</sub> 400 MHz

### Παράρτημα 11



<sup>1</sup>H NMR του συστατικού 24Z-isomasticadienonic acid methyl ester σε CDCl<sub>3</sub> 400 MHz

## Παράρτημα 12

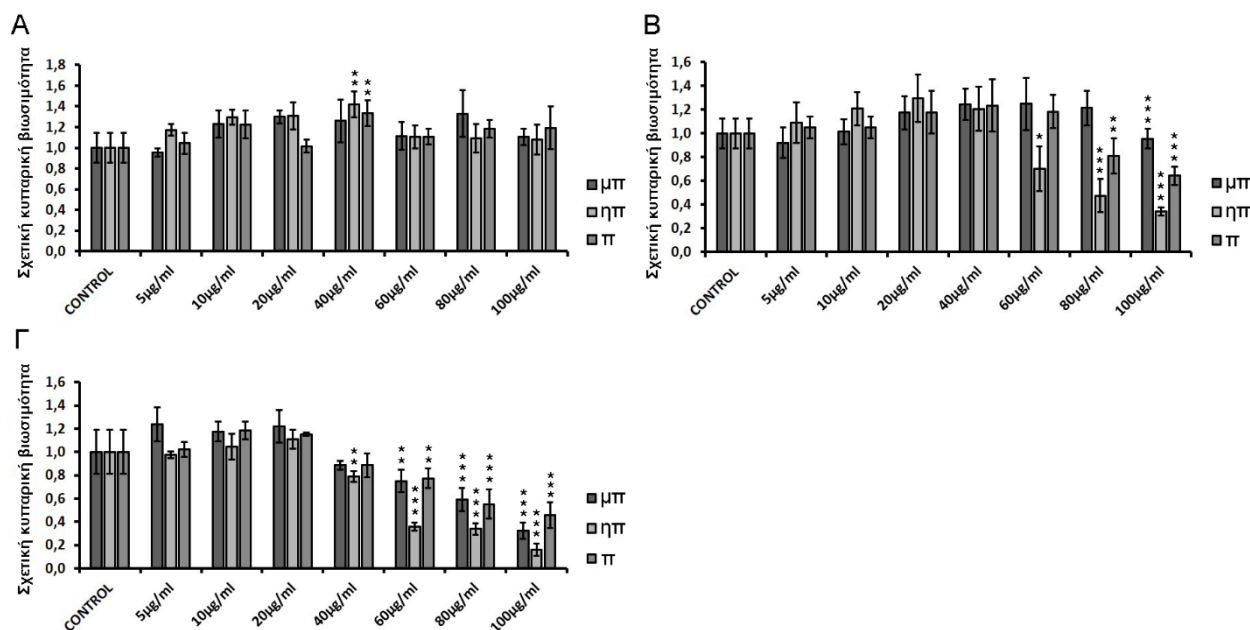


$^1\text{H}$  NMR του πολικού κλάσματος σε  $\text{CDCl}_3$  400 MHz

### 3.2.2. Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* στη βιωσιμότητα κυττάρων HEK293

Αρχικός στόχος της παρούσας μελέτης κατέστη ο προσδιορισμός του εύρους των ασφαλών μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των τριών αυξανόμενης πολικότητας κλασμάτων από τη ρητίνη του Μαστιχόδεντρου Χίου, ώστε να επιλεγούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις για την περαιτέρω διερεύνηση των βιολογικών δράσεων των κλασμάτων. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε η δοκιμασία MTT. Πιο συγκεκριμένα, τα τρία διαφορετικής πολικότητας κλάσματα από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* εξετάστηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 5-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , μετά από επώαση στα κύτταρα HEK293 για 6 (Εικόνα 29A), 24 (Εικόνα 29B) και 48 ώρες (Εικόνα 29Γ). Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 DMSO. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29A, στις 6 ώρες επώασης δεν προκλήθηκε στατιστικά σημαντική κυτταροτοξικότητα. Η κυτταροτοξική δράση των κλασμάτων της ρητίνης ξεκίνησε μετά τις 24 ώρες επώασης (Εικόνα 29B) και σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , με το ημι-πολικό κλάσμα να είναι το πιο κυτταροτοξικό από όλα. Συγκεκριμένα, στις μεγάλες συγκεντρώσεις των 60-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , το ημι-πολικό κλάσμα προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 30-65%. Το πολικό κλάσμα μείωσε τη βιωσιμότητα των κυττάρων HEK293 από 19-35%, στις συγκεντρώσεις των 80 και 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Αντίθετα, το μη πολικό κλάσμα προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας έως 4,5%, μόνο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Η μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα παρατηρήθηκε μετά τις 48 ώρες επώασης (Εικόνα 29Γ), με το ημι-πολικό κλάσμα να είναι και σε αυτή την περίπτωση το περισσότερο κυτταροτοξικό, προκαλώντας στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 20-80% περίπου, σε συγκεντρώσεις από 40-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Το μη πολικό και πολικό κλάσμα της ρητίνης προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση κατά περίπου 25-70% και 22-55%, αντίστοιχα,

σε συγκεντρώσεις 60-100μg/ml, ενώ στη συγκέντρωση των 40μg/ml δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές της κυτταρικής βιωσιμότητας. Αντιθέτως, στη συγκέντρωση των 40μg/ml το ημι-πολικό κλάσμα προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 20% [231].

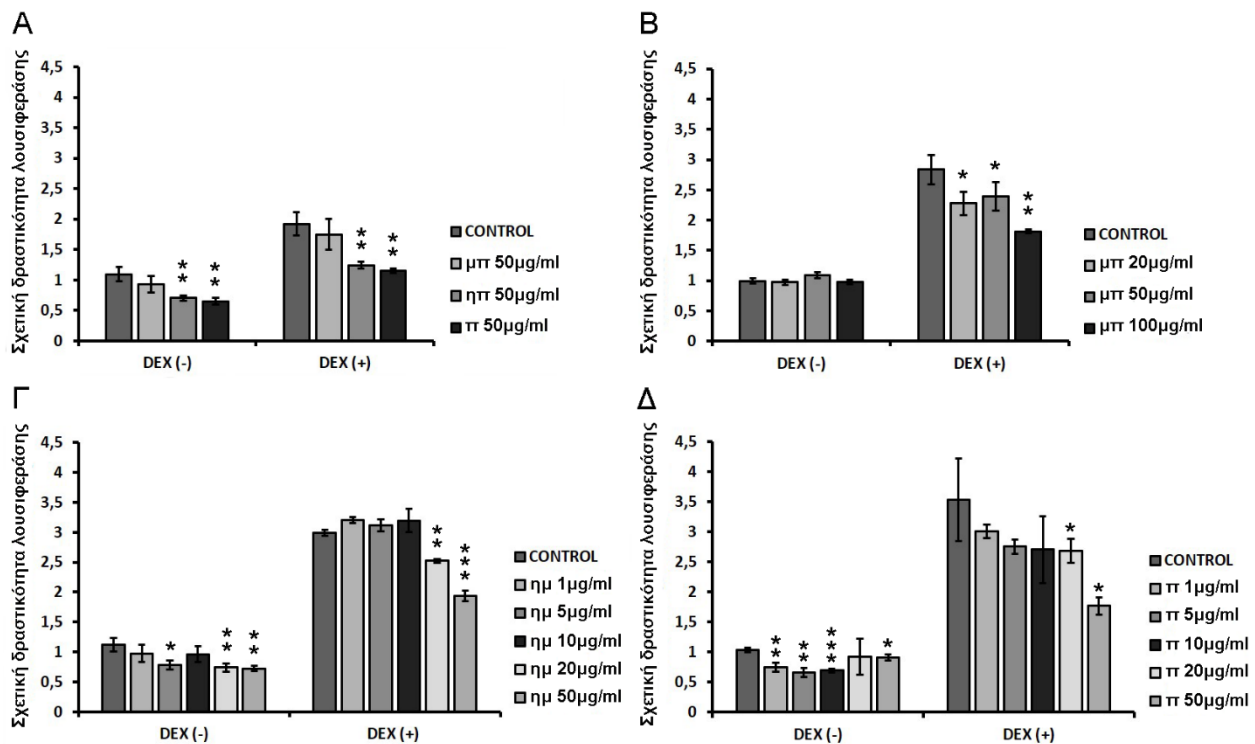


**Εικόνα 29:** Αξιολόγηση της επίδρασης του μη πολικού, ημι-πολικού και πολικού κλάσματος από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* στη βιωσιμότητα κυττάρων HEK293, μετά από επώαση 6 (Α), 24 (Β) και 48 ωρών (Γ). Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως η κυτταρική βιωσιμότητα παρουσία των υπό μελέτη κλασμάτων συγκρινόμενη με τη συνθήκη ελέγχου (control). Η κυτταρική βιωσιμότητα στη συνθήκη ελέγχου ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  SD, (n=3-9), \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. μπ: μη πολικό κλάσμα, ηπ: ημι-πολικό κλάσμα, π: πολικό κλάσμα [231].

### 3.2.3. Καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τα κλάσματα της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*

Ακολούθως, μελετήθηκε η εμπλοκή των τριών κλασμάτων της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου στη σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών. Για το σκοπό αυτό αρχικά διερευνήθηκε η επίδραση των κλασμάτων στην επαγόμενη από τη δεξαμεθαζόνη (DEX) μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR), εφαρμόζοντας τη δοκιμή λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης. Πιο συγκεκριμένα, διαφορετικής πολικότητας κλάσματα από τη ρητίνη του Μαστιχόδεντρου Χίου εξετάστηκαν, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 1-100μg/ml, απουσία ή παρουσία 1μM DEX, μετά από επώαση στα κύτταρα HEK293 για 6 ώρες. Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 DMSO και 1/1000 EtOH. Αρχικά πραγματοποιήθηκε μια σάρωση και των τριών κλασμάτων στη συγκέντρωση των 50μg/ml, από όπου φάνηκε ότι το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα είναι τα πιο δραστικά, αφού μείωσαν την επαγόμενη από τη DEX μεταγραφική δραστηριότητα του GR, έως 35 και 40%, αντίστοιχα, τόσο απουσία όσο και παρουσία DEX (Εικόνα 30Α). Ακολούθησε αξιολόγηση της επίδρασης του μη πολικού κλάσματος στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 20-100μg/ml, καθώς και του ημι-πολικού και πολικού κλάσματος σε ένα εύρος 1-50μg/ml. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 30Β, το μη πολικό κλάσμα προκάλεσε δόσο-εξαρτώμενη μείωση της επαγόμενης από τη

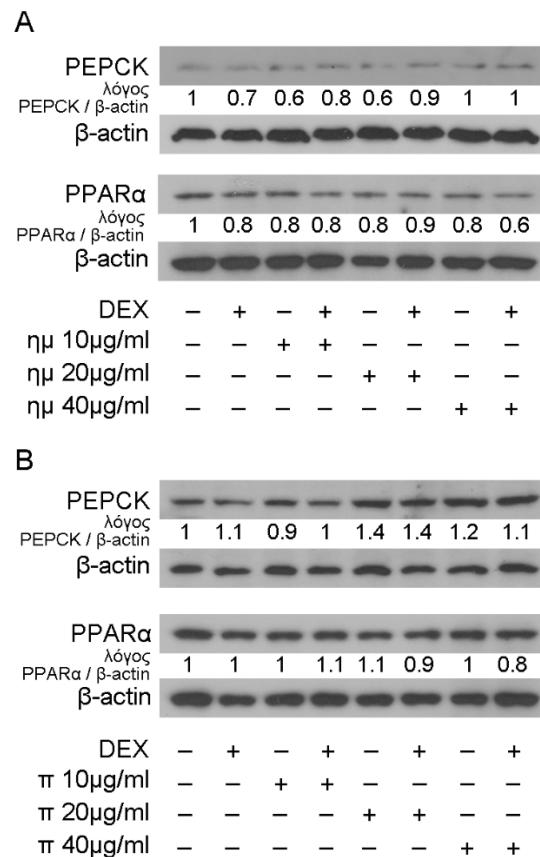
DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, κατά 15-35% περίπου, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 20-100μg/ml. Το ημι-πολικό κλάσμα μείωσε την επαγόμενη από τη DEX μεταγραφική δραστηριότητα του GR κατά 15 και 35% στις συγκεντρώσεις των 20 και 50μg/ml (Εικόνα 30Γ). Και τέλος, το πολικό κλάσμα της ρητίνης προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση στην επαγόμενη από τη DEX μεταγραφική δραστηριότητα του GR, κατά 24 και 50%, στις συγκεντρώσεις των 20 και 50μg/ml, όντας το περισσότερο δραστικό από όλα (Εικόνα 30Δ) [231].



**Εικόνα 30:** Καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από το μη πολικό (Α,Β), ημι-πολικό (Α,Γ) και πολικό κλάσμα (Α,Δ) της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, μετά από επώαση 6 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης προκύπτει μετά από κανονικοποίησή της με τη δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης στη συνθήκη ελέγχου απουσία DEX ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  SD, (n=2-3), \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. μη: μη πολικό κλάσμα, ημ: ημι-πολικό κλάσμα, π: πολικό κλάσμα [231].

Η παρατηρούμενη μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τα υπό μελέτη κλάσματα, μας ώθησε στην αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων τόσο του ίδιου του GR, όσο και άμεσων γονιδίων στόχων της σηματοδότησής του, όπως της PEPCK και του υποδοχέα PPARα [190, 225]. Για τη διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, της PEPCK και του PPARα, εφαρμόστηκε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα HEK293 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6 θέσεων, σε θρεπτικό υλικό χωρίς κόκκινο της φαινόλης, ελεύθερο στεροειδών ορμονών, με πυκνότητα  $2 \times 10^5$ /θέση, για 48 ώρες. Έπειτα, έγινε η προσθήκη των υπό μελέτη κλασμάτων, δηλαδή του μη πολικού (μηπ), του ημι-πολικού (ημ) και πολικού (π) κλάσματος της ρητίνης, απουσία και παρουσία 10nM DEX, και αφέθηκαν για επώαση για 24

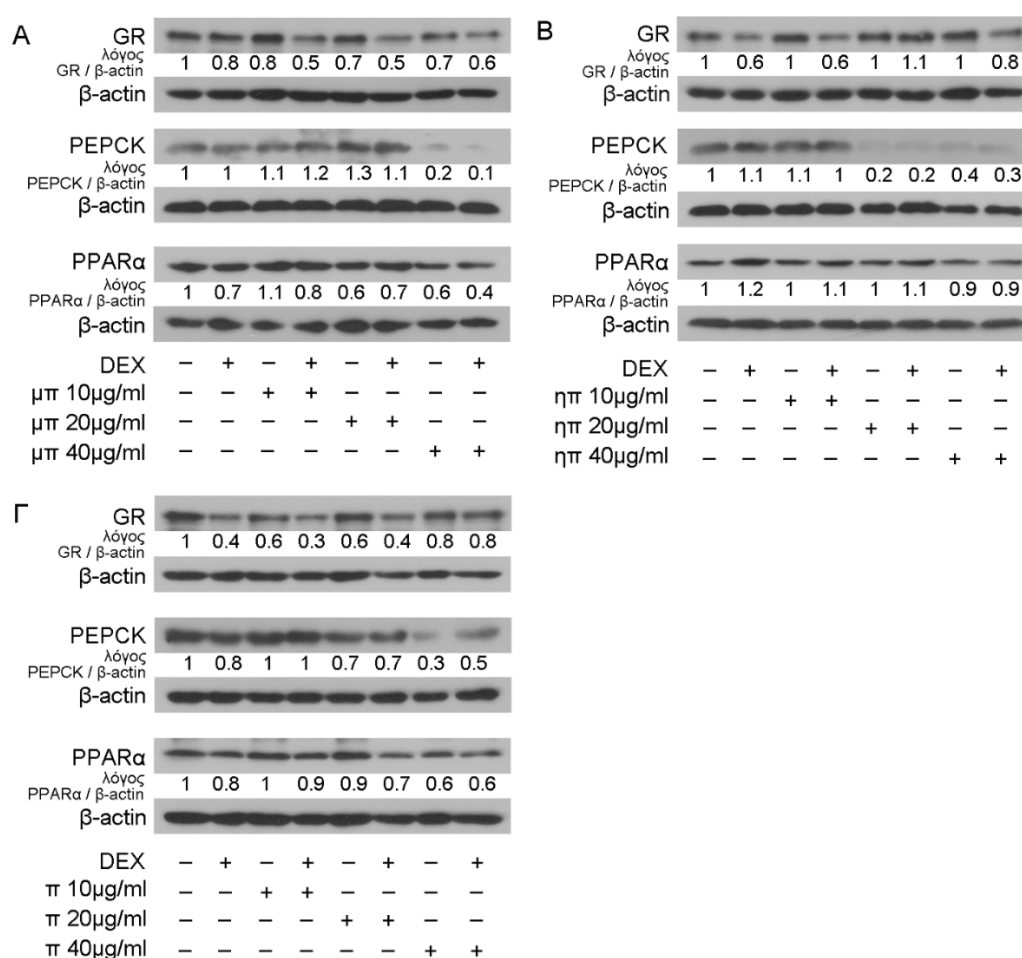
(Εικόνα 31) και 48 ώρες (Εικόνα 32), σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 10-40μg/ml. Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 DMSO και 1/1000 EtOH. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 31, μετά τις 24 ώρες επώασης, δεν σημειώθηκαν αξιόλογες μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK και του PPARα, παρουσία του ημι-πολικού και πολικού κλάσματος της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου [231].



**Εικόνα 31:** Αξιολόγηση της επίδρασης του ημι-πολικού (A) και πολικού (B) κλάσματος της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK και του PPARα, μετά από επώαση 24 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Οι λόγοι προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων με τις αντίστοιχες της β-actin. ηπ: ημι-πολικό κλάσμα, π: πολικό κλάσμα [231].

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε σε επώαση των κυττάρων HEK293 με τα τρία κλάσματα της ρητίνης, απουσία και παρουσία DEX, για 48 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν (Εικόνα 32) ότι το μη πολικό και πολικό κλάσμα μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, κατά 20-30% και 20-40%, αντίστοιχα, με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, σε συγκεντρώσεις 10-40μg/ml. Η συγχορήγησή τους με τη DEX είχε συνεργιστική δράση, προκαλώντας μια επιπλέον μείωση κατά 10-30%. Το ημι-πολικό κλάσμα της ρητίνης δεν προκάλεσε κάποια μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, παρά μόνο συνδυαστικά με τη DEX, κατά 20-40%. Όσο αφορά την PEPCK, το ημι-πολικό κλάσμα μείωσε τα πρωτεϊνικά της επίπεδα κατά 60-80%, στις συγκεντρώσεις των 20 και 40μg/ml, όντας το πιο δραστικό από όλα. Το μη πολικό κλάσμα μείωσε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK, κατά 80%, αλλά μόνο στη μεγάλη συγκέντρωση των 40μg/ml, ενώ το πολικό κλάσμα προκάλεσε μείωση κατά 30 και 70%, με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, στις συγκεντρώσεις των 20 και 40μg/ml. Τέλος, όσο αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα, το μη πολικό και το

πολικό κλάσμα προκάλεσαν επίσης μείωση κατά 10-40%, σε συγκεντρώσεις 20-40μg/ml. Αντίθετα, παρουσία του ημι-πολικού κλάσματος της ρητίνης παρατηρήθηκε μόνο μια μικρή μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα κατά 10%, στη μεγάλη συγκέντρωση των 40μg/ml [231]. Επομένως, το ημι-πολικό κλάσμα είναι το πιο δραστικό όσο αφορά τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK, αλλά χωρίς να προκαλεί αξιοσημείωτες μεταβολές στα επίπεδα των GR και PPARα, υποδηλώνοντας ότι η δράση αυτή οφείλεται στην παρατηρούμενη καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, υπό την επίδραση του ημι-πολικού κλάσματος. Το μη πολικό και πολικό κλάσμα, ωστόσο, όπως αποδεικνύεται είναι περισσότερο δραστικά όσο αφορά τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των GR και PPARα, συγκριτικά με το ημι-πολικό, αποκαλύπτοντας επίδραση των εν λόγω κλασμάτων τόσο στα επίπεδα όσο και στη δραστηριότητα του GR.

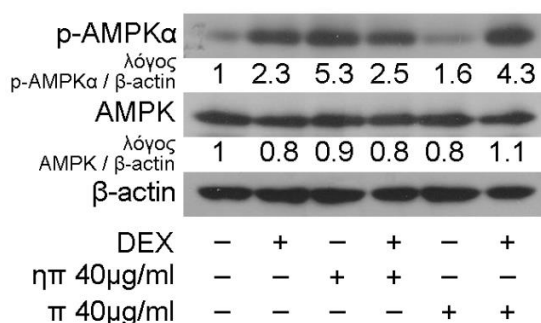


**Εικόνα 32:** Αξιολόγηση της επίδρασης του μη πολικού (Α), ημι-πολικού (Β) και πολικού κλάσματος (Γ) της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, της PEPCK και του PPARα, μετά από επώαση 48 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Οι λόγοι προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων με τις αντίστοιχες της β-actin. μπ: μη πολικό κλάσμα, ηπ: ημι-πολικό κλάσμα, π: πολικό κλάσμα [231].

Η παρατηρούμενη μείωση της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τα πιο δραστικά κλάσματα, το ημι-πολικό και πολικό, οδήγησε στην αξιολόγηση της επίδρασής τους στη ρύθμιση της ενεργοποίησης της AMPK. Όπως προαναφέρθηκε, η AMPK

ρυθμίζει τον μεταβολισμό του κυττάρου μέσω εξισορρόπησης της ενεργειακής ομοιόστασης. Συγκεκριμένα, ανιχνεύει τα μειωμένα επίπεδα ATP, ενώ τα υψηλά επίπεδα AMP προκαλούν τη φωσφορυλίωσή της στο κατάλοιπο Thr172, οδηγώντας στην ενεργοποίησή της. Η ενεργοποιημένη AMPK επάγει καταβολικές και αναστέλλει αναβολικές διεργασίες, με σκοπό την παραγωγή ATP και την αποκατάσταση της έλλειψης ενέργειας [181]. Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν επίσης γνωστές καταβολικές ορμόνες [232]. Ακόμη, έχει δειχθεί ότι η σηματοδότηση της AMPK και του GR διασταυρώνονται, και συγκεκριμένα, η ενεργοποιημένη AMPK ρυθμίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του GR [185].

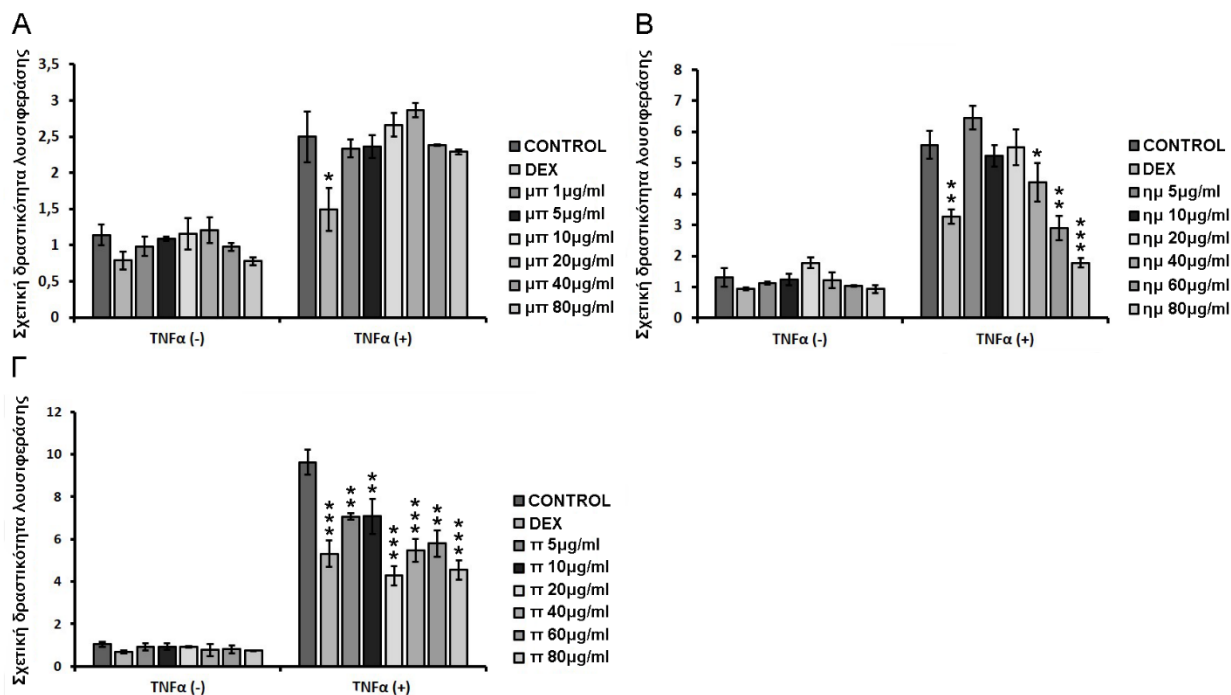
Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των υπό μελέτη κλασμάτων της ρητίνης στον ενεργειακό μεταβολισμό, εξετάστηκε η επίδρασή τους στα πρωτεϊνικά επίπεδα της AMPK και της φωσφορυλιωμένης AMPKα στο κατάλοιπο Thr172 (p-AMPKα-Thr172), εφαρμόζοντας ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western, χρησιμοποιώντας κατάλληλα αντισώματα. Πιο συγκεκριμένα, τα διαφορετικής πολικότητας κλάσματα της ρητίνης εξετάστηκαν, στη συγκέντρωση των 40μg/ml, απουσία και παρουσία 1μM DEX, μετά από επώαση στα κύτταρα HEK293 για 45 λεπτά. Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 DMSO και 1/1000 EtOH. Βάσει των αποτελεσμάτων, τόσο το ημι-πολικό όσο και το πολικό κλάσμα της ρητίνης δεν προκάλεσαν αξιοσημείωτες μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της AMPK. Αντίθετα, και τα δύο κλάσματα προκάλεσαν αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της p-AMPKα-Thr172, γεγονός που επάγει την ενεργοποίησή της. Συγκεκριμένα, το ημι-πολικό κλάσμα αύξησε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης AMPKα περίπου 5 φορές, ενώ το πολικό κλάσμα προκάλεσε αύξηση 1.5 φορές περίπου. Η συγχορήγηση του ημι-πολικού κλάσματος με τη DEX κατέστειλε την αύξηση που προκάλεσε από μόνο του το ημι-πολικό κλάσμα, υποδεικνύοντας μια ανταγωνιστική σχέση. Αντίθετα, η συγχορήγηση του πολικού κλάσματος με τη DEX είχε συνεργιστική δράση προσδίδοντας μια επιπλέον αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης AMPKα έως 4.3 φορές (Εικόνα 33) [231]. Επομένως, τόσο το ημι-πολικό όσο και το πολικό κλάσμα της ρητίνης επάγουν τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της AMPK, οδηγώντας στη μετέπειτα επαγωγή καταβολικών οδών σηματοδότησης προκειμένου να παραχθεί ATP και να αποκατασταθεί το ενεργειακό ισοζύγιο.



**Εικόνα 33:** Αξιολόγηση της επίδρασης του ημι-πολικού και πολικού κλάσματος της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της AMPK, καθώς και της φωσφορυλιωμένης AMPKα (Thr172) (pAMPKα-Thr172), μετά από επώαση 45 λεπτών, σε κύτταρα HEK293. Οι λόγοι προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων με την αντίστοιχη της β-actin. ηπ: ημι-πολικό κλάσμα, π: πολικό κλάσμα [231].

### 3.2.4. Καταστολή της επαγόμενης από τον TNF $\alpha$ μεταγραφικής δραστηριότητας του NF- $\kappa$ B από το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*

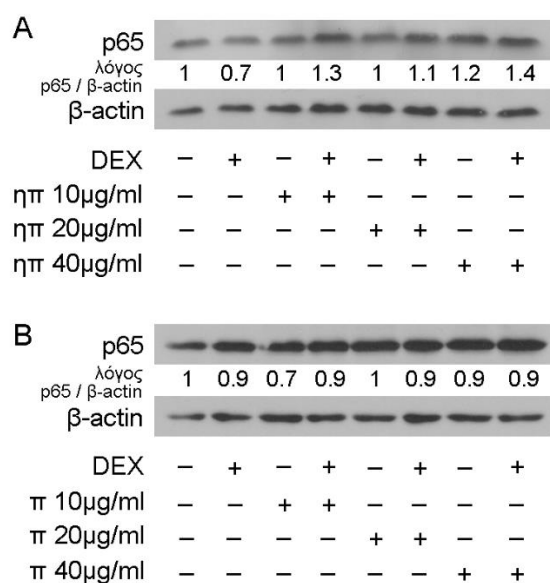
Επόμενος στόχος τέθηκε η διερεύνηση της αντιφλεγμονώδους δράσης των τριών αυξανόμενης πολικότητας κλασμάτων της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε αρχικά η επίδραση των κλασμάτων στη μεταγραφική δραστηριότητα του παράγοντα φλεγμονής NF- $\kappa$ B, εφαρμόζοντας τη δοκιμή λουσιφεράσης/ $\beta$ -γαλακτοσιδάσης. Αναλυτικότερα, τα τρία διαφορετικής πολικότητας κλάσματα της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου, ελέγχθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 1-80 $\mu$ g/ml, καθώς και η DEX (1 $\mu$ M), απουσία ή παρουσία 20nM TNF $\alpha$ , μετά από επώαση για 6 ώρες. Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε ddH $_2$ O, 1/1000 DMSO και 1/1000 EtOH. Βάσει των αποτελεσμάτων (Εικόνα 34), το μη πολικό κλάσμα δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στη μεταγραφική δραστηριότητα του παράγοντα φλεγμονής NF- $\kappa$ B, τόσο απουσία όσο και παρουσία TNF $\alpha$ , συγκριτικά με τη συνθήκη ελέγχου (Εικόνα 34A). Το ημι-πολικό κλάσμα της ρητίνης ήταν το πιο δραστικό, προκαλώντας μείωση της επαγόμενης από τον TNF $\alpha$  μεταγραφικής δραστηριότητας του NF- $\kappa$ B, κατά 20-70% περίπου, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, σε συγκεντρώσεις 40-80 $\mu$ g/ml (Εικόνα 34B). Το πολικό κλάσμα της ρητίνης μείωσε την επαγόμενη από τον TNF $\alpha$  μεταγραφική δραστηριότητα του NF- $\kappa$ B, κατά 25-50% περίπου, επίσης με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, σε συγκεντρώσεις 5-80 $\mu$ g/ml (Εικόνα 34Γ) [231].



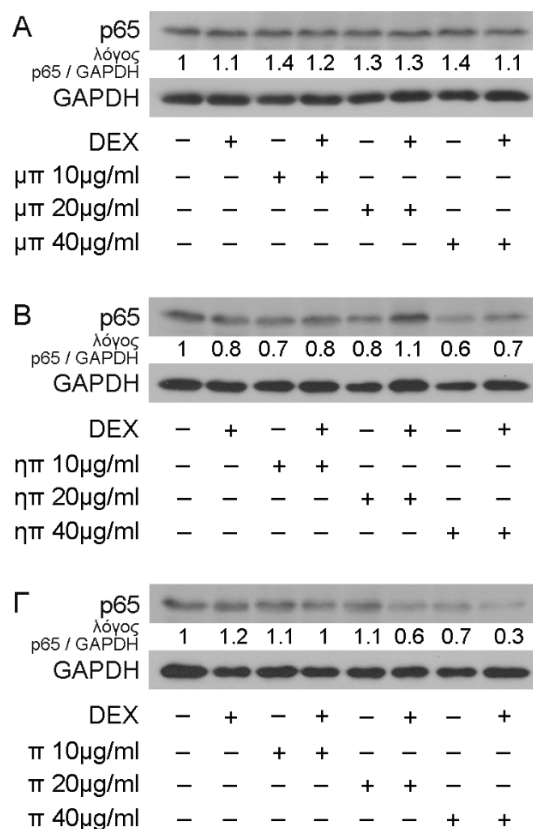
**Εικόνα 34:** Καταστολή της επαγόμενης από τον TNF $\alpha$  μεταγραφικής δραστηριότητας του NF- $\kappa$ B από το μη πολικό (A), ημι-πολικό (B) και πολικό (Γ) κλάσμα της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, μετά από επώαση 6 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης προκύπτει μετά από κανονικοποίησή της με τη δραστηριότητα της  $\beta$ -γαλακτοσιδάσης. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης στη συνθήκη ελέγχου απουσία DEX ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  SD, (n=2-6), \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. μηπ: μη πολικό κλάσμα, ηπ: ημι-πολικό κλάσμα, π: πολικό κλάσμα [231].



Έπειτα, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο βιοχημικός μηχανισμός της παρατηρούμενης αντιφλεγμονώδους δράσης των κλασμάτων της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου, μελετήθηκε η επίδρασή τους στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κB. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρήση κατάλληλου αντισώματος. Πιο συγκεκριμένα, τα τρία υπό μελέτη κλάσματα της ρητίνης εξετάστηκαν, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 10-40μg/ml, απουσία και παρουσία 10nM DEX, μετά από επώαση στα κύτταρα HEK293 για 24 (Εικόνα 35) και 48 ώρες (Εικόνα 36). Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 DMSO και 1/1000 EtOH. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 35, μετά τις 24 ώρες επώασης, δεν παρατηρήθηκαν αξιολογές μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κB. Ωστόσο, μετά την επώαση των 48 ωρών (Εικόνα 36), το μη πολικό κλάσμα της ρητίνης αύξησε τα πρωτεϊνικά επίπεδα του NF-κB, κατά 30-40%, σε συγκεντρώσεις 10-40μg/ml (Εικόνα 36Α). Το ημι-πολικό κλάσμα μείωσε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p65, κατά 30-40% ακόμη και από τη χαμηλή συγκέντρωση των 10μg/ml, όντας το πιο δραστικό (Εικόνα 36B). Τέλος, το πολικό κλάσμα προκάλεσε μείωση έως 30% στα πρωτεϊνικά επίπεδα της p65, αλλά μόνο στην υψηλή συγκέντρωση των 40μg/ml (Εικόνα 36Γ) [231]. Επομένως, η παρατηρούμενη από το ημι-πολικό κλάσμα καταστολή της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB οφείλεται τόσο σε ρύθμιση στο επίπεδο της μεταγραφής όσο και σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της υπομονάδας του.



**Εικόνα 35:** Αξιολόγηση της επίδρασης του ημι-πολικού (A) και πολικού (B) κλάσματος της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κB, μετά από επώαση 24 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Οι λόγοι προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων με τις αντίστοιχες της β-actin. ηπ: ημι-πολικό κλάσμα, π: πολικό κλάσμα [231].



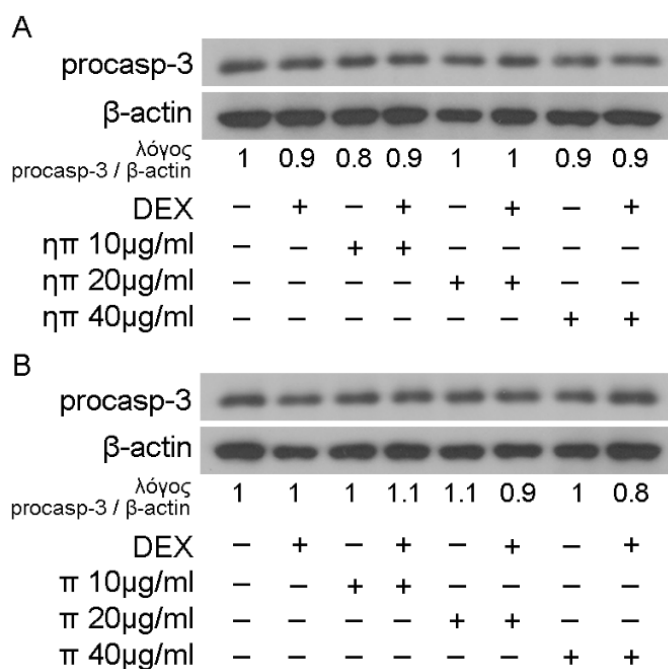
**Εικόνα 36:** Αξιολόγηση της επίδρασης του μη πολικού (Α), ημι-πολικού (Β) και πολικού (Γ) κλάσματος της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κB, μετά από επώαση 48 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Οι λόγοι προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων με τις αντίστοιχες της GAPDH. μπ: μη πολικό κλάσμα, ηπ: ημι-πολικό κλάσμα, π: πολικό κλάσμα [231].

### 3.2.5. Διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* στους αποπτωτικούς μηχανισμούς

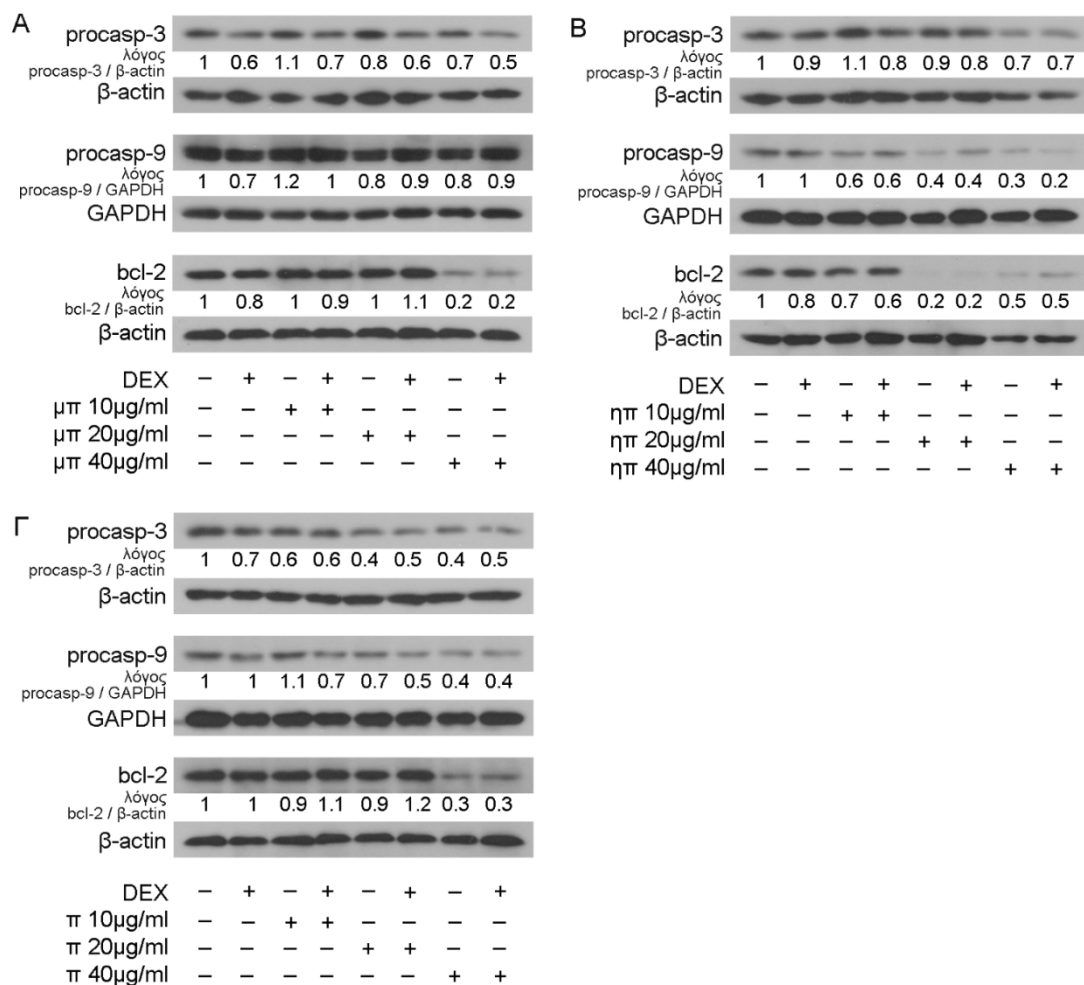
Στη συνέχεια, στόχος της παρούσας μελέτης τέθηκε η διερεύνηση της δυνατότητας των κλασμάτων της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου να επάγουν την απόπτωση των κυττάρων HEK293, καθώς και η αποσαφήνιση του βιοχημικού μηχανισμού μέσω του οποίου επιτελείται. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western, για την αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3, της προκασπάσης-9 και της bcl-2, χρησιμοποιώντας κατάλληλα αντισώματα. Πιο συγκεκριμένα, τα τρία αυξανόμενης πολικότητας κλάσματα από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* ελέγχθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 10-40μg/ml, απουσία και παρουσία 10nM DEX, μετά από επώαση στα κύτταρα HEK293 για 24 (Εικόνα 37) και 48 ώρες (Εικόνα 38). Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 DMSO και 1/1000 EtOH.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά την επώαση 24 ωρών (Εικόνα 37) δεν προκλήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3, παρουσία του ημι-πολικού και πολικού κλάσματος της ρητίνης. Αντίθετα, μετά την επώαση των 48 ωρών, το μη-πολικό, ημι-πολικό και πολικό κλάσμα προκάλεσαν μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3, κατά 20-30%, 10-30% και 40-60%, αντίστοιχα, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο σε

συγκεντρώσεις 10-40μg/ml. Ακόμη, το ημι-πολικό και το πολικό κλάσμα της ρητίνης μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, κατά 40-70% και 30-60%, αντίστοιχα, σε συγκεντρώσεις 10-40μg/ml (Εικόνα 38B, 38Γ). Το μη πολικό κλάσμα προκάλεσε μείωση έως 20% στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9, σε συγκεντρώσεις 20 και 40μg/ml (Εικόνα 50A). Και τέλος, όσο αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2, τη μεγαλύτερη μείωση προκάλεσε το ημι-πολικό κλάσμα κατά 30-80%, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, ακόμη και στη χαμηλή συγκέντρωση των 20μg/ml (Εικόνα 38B). Το μη πολικό και το πολικό κλάσμα της ρητίνης μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της bcl-2 κατά 80% και 70%, αντίστοιχα, αλλά μόνο στη μεγάλη συγκέντρωση των 40μg/ml (Εικόνα 38A, 38Γ) [231].



**Εικόνα 37:** Αξιολόγηση της επίδρασης του ημι-πολικού (A) και πολικού κλάσματος (B) της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3, μετά από επώαση 24 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Οι λόγοι προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων με τις αντίστοιχες της β-actin. ηπ: ημι-πολικό κλάσμα, π: πολικό κλάσμα [231].



**Εικόνα 38:** Αξιολόγηση της επίδρασης του μη πολικού (A), ημι-πολικού (B) και πολικού (Γ) κλάσματος της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3, προκασπάσης-9 και bcl-2, μετά από επώαση 48 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Οι λόγοι προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων με τις αντίστοιχες της β-actin ή GAPDH. μπ: μη πολικό κλάσμα, ηπ: ημι-πολικό κλάσμα, π: πολικό κλάσμα [231].

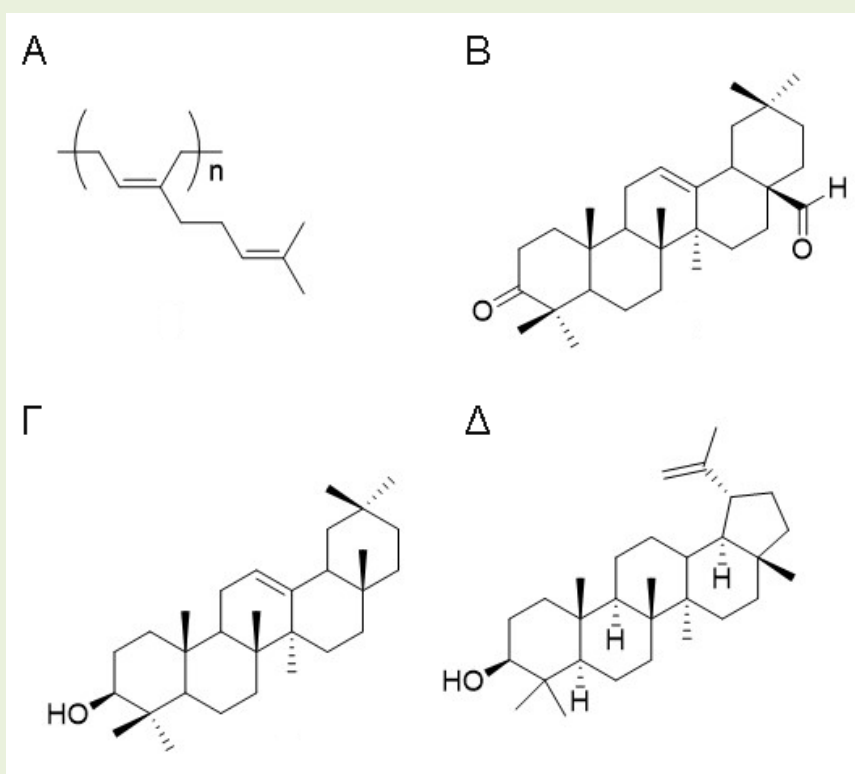
### 3.3. Αξιολόγηση βιολογικών δράσεων του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*

#### 3.3.1. Χημικός χαρακτηρισμός των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*

Ο χημικός χαρακτηρισμός των υποκλασμάτων από το ουδέτερο κλάσμα της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Dr. Giovanni Appendino, (Professor of Chemistry, Università del Piemonte Orientale (UPO), Faculty of Pharmacy, Novara, Italy). Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε είχε ως σκοπό το διαχωρισμό των τριτερπενίων σε δύο κύρια κλάσματα, το όξινο και το ουδέτερο κλάσμα. Το ουδέτερο κλάσμα αποτελούνταν από ένα μείγμα ουδέτερων τριτερπενίων τα οποία κλασματώθηκαν περαιτέρω, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.8.4 (Kalousi F.D et al., υπό συγγραφή), με την τελική ταυτοποίηση να γίνεται με ανάλυση  $^1\text{H}$  NMR. Δεν ταυτοποιήθηκαν όλα τα συστατικά αλλά μόνο αυτά που ήταν σε μεγαλύτερη ποσότητα (Παράρτημα 13). Το κλάσμα 1 (K1) περιείχε κυρίως

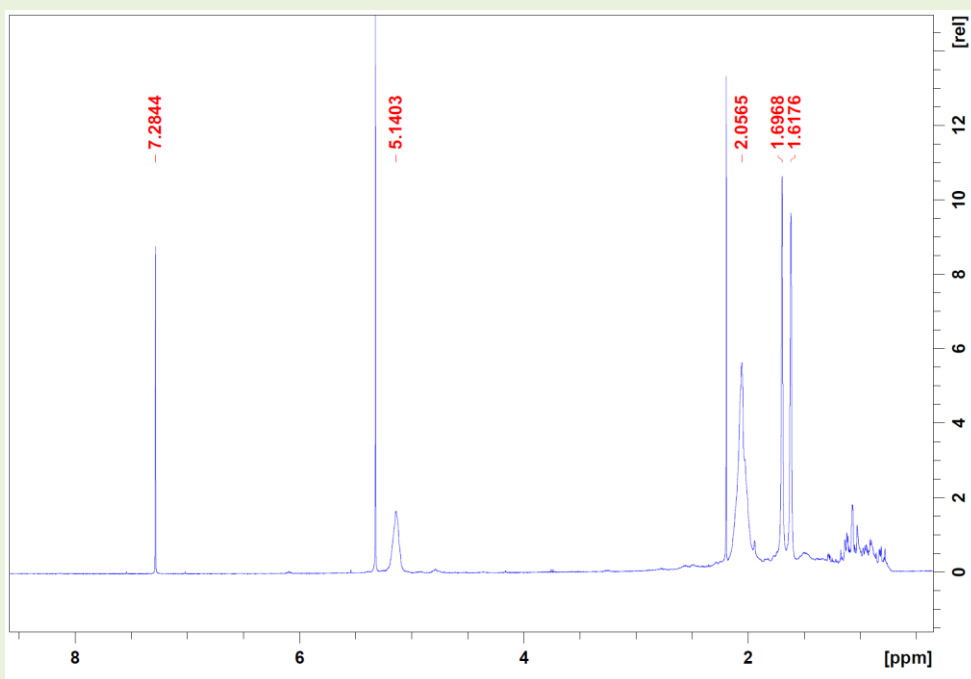
1,4-poly-β-μυρσένιο (Παράρτημα 14) και σε μικρότερη ποσότητα keto-ολεανολική αλδεΐδη (Παράρτημα 15). Το τριτερπένιο keto-ολεανολική αλδεΐδη ήταν το κυρίαρχο στο υποκλάσμα 2A (ΥΚ2Α), ενώ στο υποκλάσμα 2B (ΥΚ2Β) ταυτοποιήθηκε η β-αμυρίνη (Παράρτημα 16). Στο υποκλάσμα 3A (ΥΚ3Α) εντοπίστηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα η λουπεόλη (lupeol) (Παράρτημα 17), το οποίο ταυτοποιήθηκε και στο υποκλάσμα 3B (ΥΚ3Β). Το τριτερπένιο λουπεόλη εντοπίστηκε και στο υποκλάσμα 3Γ (ΥΚ3Γ), αλλά σε μικρότερη ποσότητα από το keto-ολεανολική αλδεΐδη, που ήταν το κυρίαρχο. Το υποκλάσμα 4A (ΥΚ4Α) αποτελείται από ένα μείγμα τριτερπενίων και άλλων αλειφατικών ενώσεων, η ταυτοποίηση των οποίων δεν επιτεύχθηκε. Τέλος, το υποκλάσμα 5A (ΥΚ5Α) περιείχε λουπεόλη, αλλά το πιο άφθονο τριτερπένιο ήταν η β-αμυρίνη (Kalousi F.D. et al., υπό συγγραφή).

### Παράρτημα 13



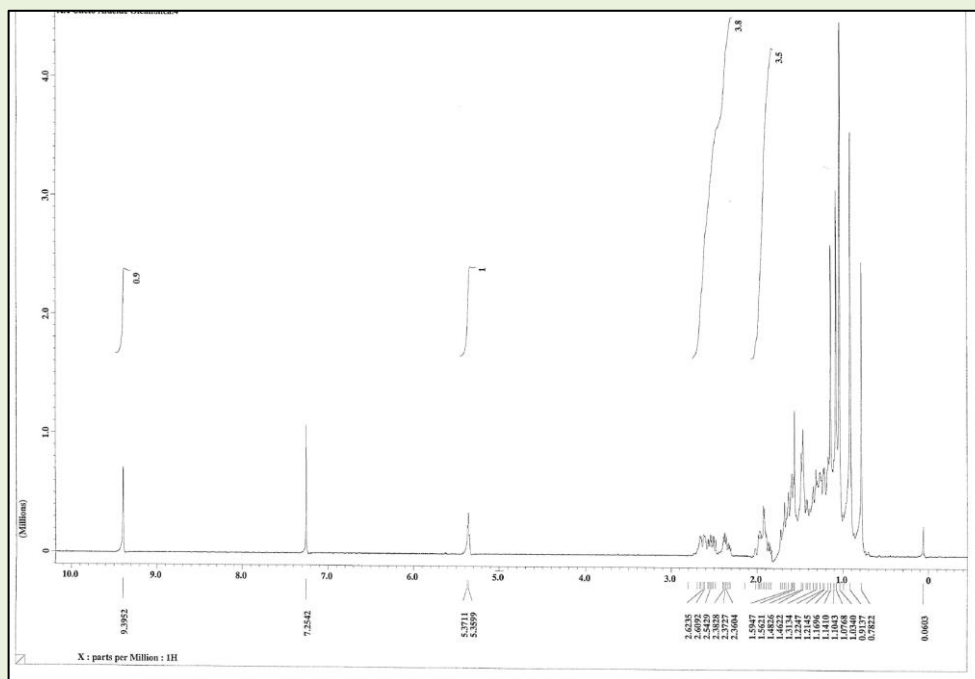
Χημικός χαρακτηρισμός των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*. Χημική δομή των 1,4-poly-β-myrcene (A), keto-oleanolic aldehyde (B), β-amyrin (Γ) και lupeol (Δ).

### Παράρτημα 14



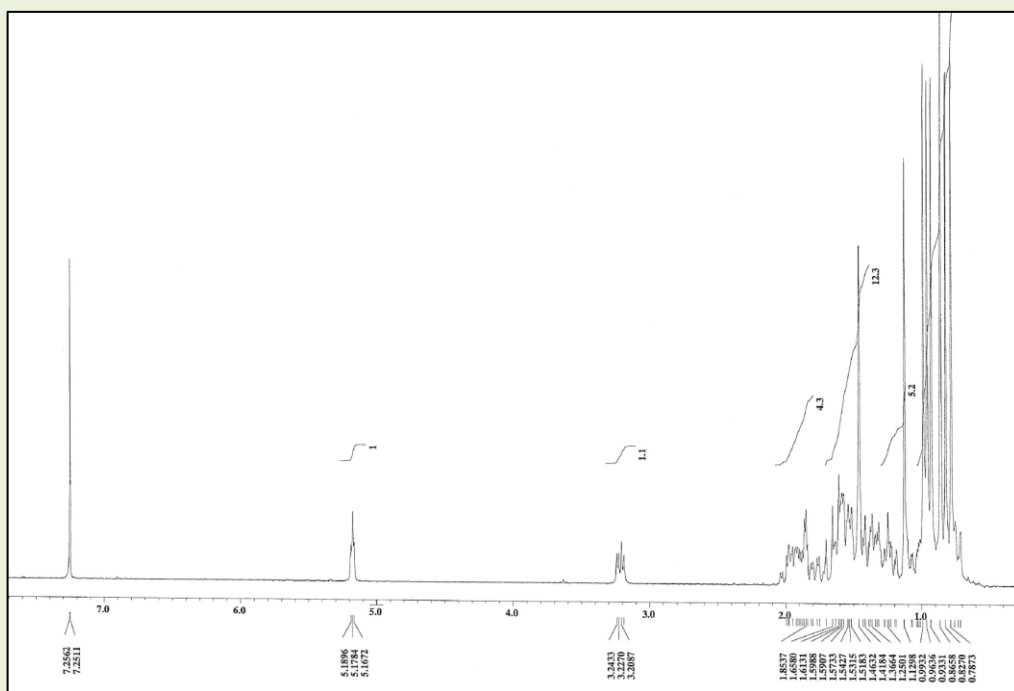
<sup>1</sup>H NMR του συστατικού 1,4-poly-β-myrcene σε CDCl<sub>3</sub> 400 MHz

### Παράρτημα 15



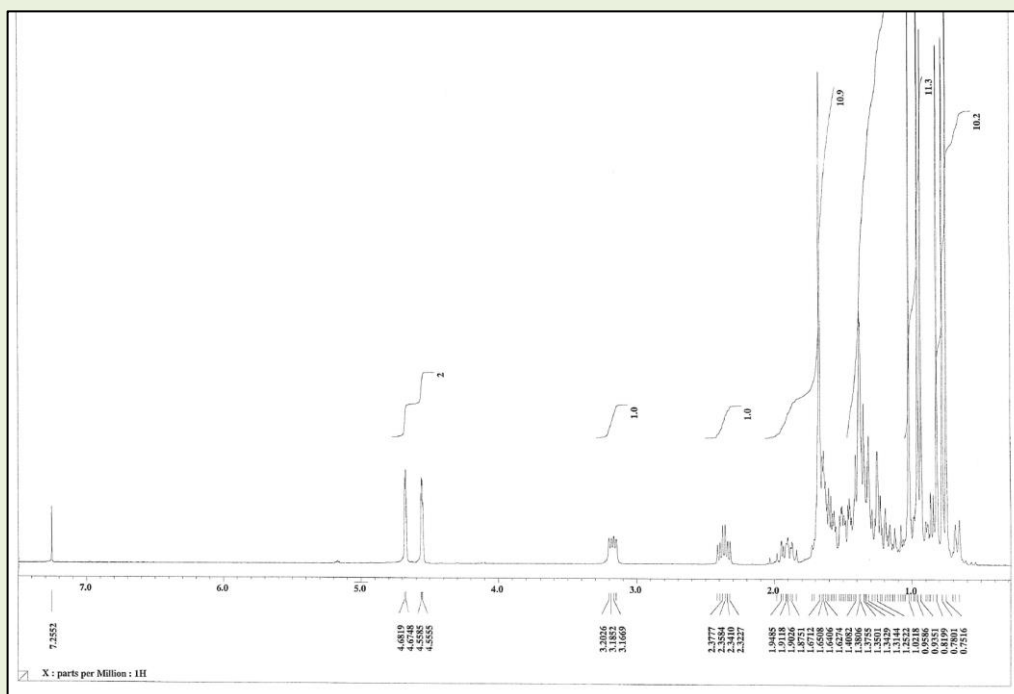
<sup>1</sup>H NMR του συστατικού keto-oleanolic aldehyde σε CDCl<sub>3</sub> 400 MHz

## Παράρτημα 16



<sup>1</sup>H NMR του συστατικού β-amyrin σε CDCl<sub>3</sub> 400 MHz

## Παράρτημα 17

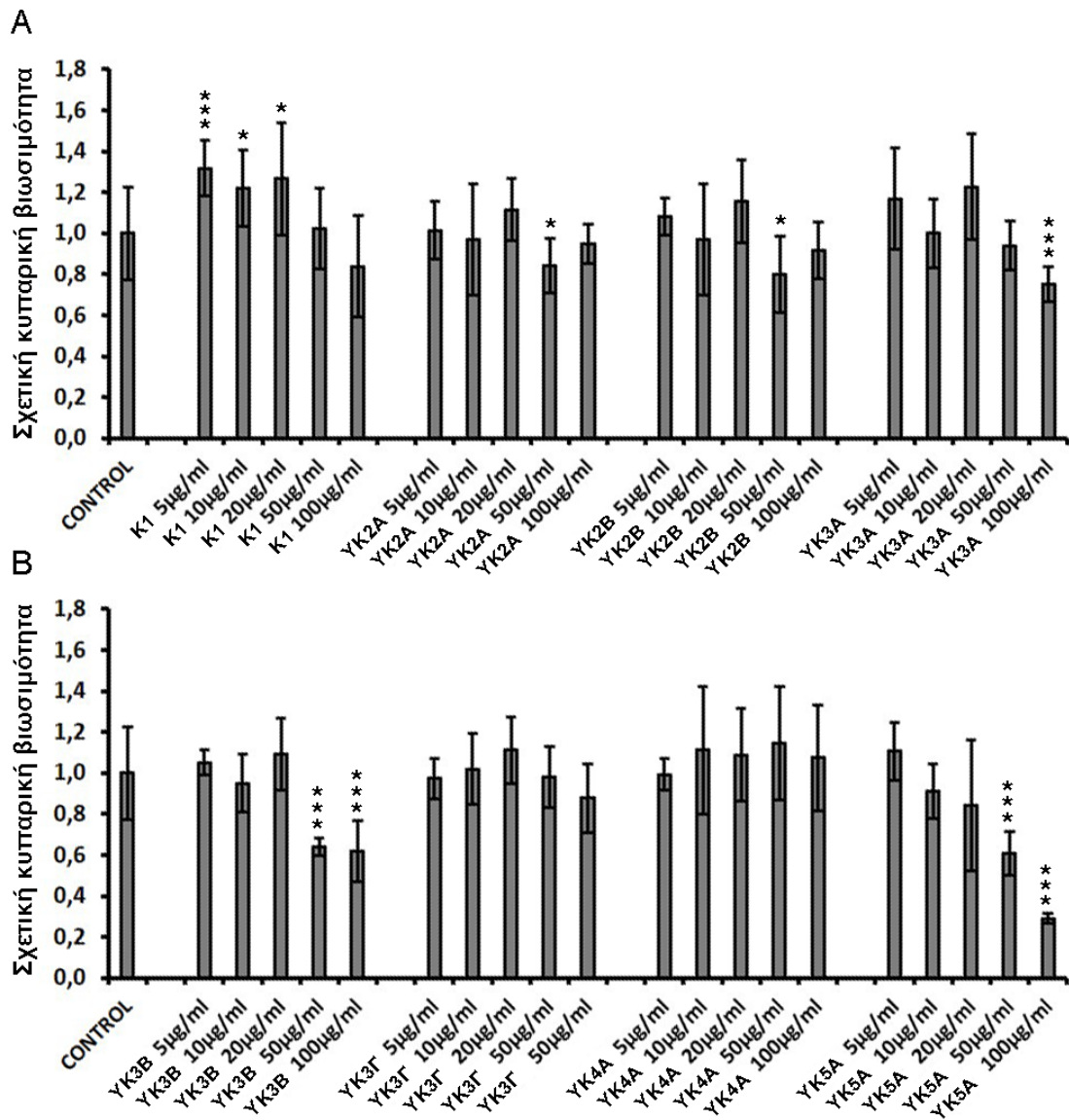


<sup>1</sup>H NMR του συστατικού lupeol σε CDCl<sub>3</sub> 400 MHz

### 3.3.2. Διερεύνηση της επίδρασης των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* στη βιωσιμότητα κυττάρων HEK293

Αρχικός στόχος της παρούσας μελέτης κατέστη ο προσδιορισμός του εύρους των ασφαλών μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, ώστε να επιλεγούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις για την περαιτέρω διερεύνηση των βιολογικών δράσεων των κλασμάτων. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε η δοκιμασία ΜΤΤ. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα HEK293 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 96 θέσεων, σε πλήρες θρεπτικό υλικό, με πυκνότητα  $1.5 \times 10^4$ /θέση, για 48 ώρες. Έπειτα, έγινε η προσθήκη των υπό μελέτη υποκλασμάτων, και αφέθηκαν για επώαση 48 ωρών, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 5-100μg/ml. Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 EtOH. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 39, μετά την επώαση των 48 ωρών, το κλάσμα 1 (K1) προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων HEK293 έως 30%, σε συγκεντρώσεις 5-20μg/ml. Αντίθετα, τα υποκλάσματα 2A (YK2A) και 2B (YK2B) (Εικόνα 39A), προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 15 και 20%, αντίστοιχα, στη συγκέντρωση των 50μg/ml. Τη μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα ωστόσο την προκάλεσαν τα υποκλάσματα 3A (YK3A), 3B (YK3B) και 5A (YK5A), έως 25%, 35% and 70%, αντίστοιχα, σε συγκεντρώσεις 20-100μg/ml, με το υποκλάσμα 5A (YK5A) (Εικόνα 39B) να είναι το πιο κυτταροτοξικό από όλα. Τέλος, τα υποκλάσματα 3Γ (YK3Γ) και 4A (YK4A) δεν προκάλεσαν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή (Kalousi F.D. et al., υπό συγγραφή).



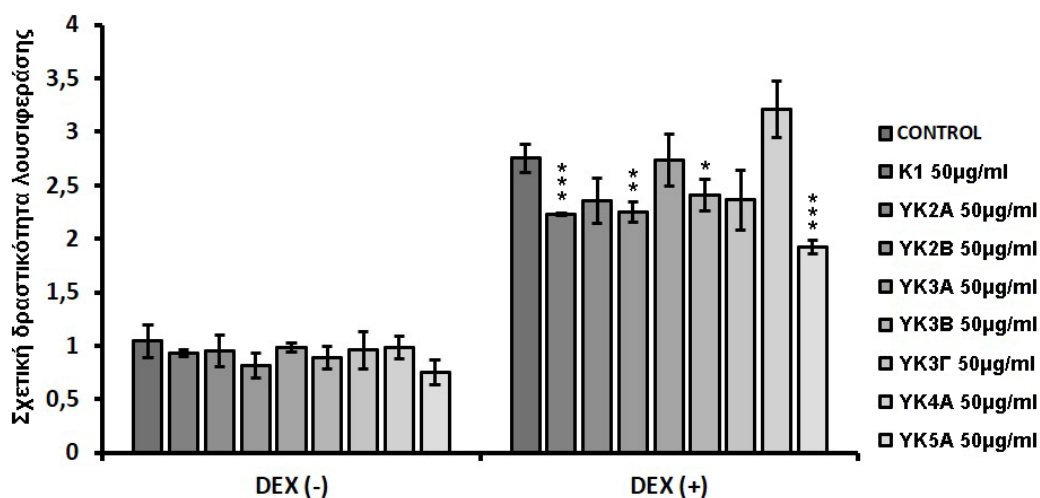


**Εικόνα 39:** Αξιολόγηση της επίδρασης των K1, YK2A, YK2B, YK3A (Α) και YK3B, YK3Γ, YK4A, YK5A (Β) του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, στη βιωσιμότητα κυττάρων HEK293, μετά από επώαση 48 ωρών. Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως η κυτταρική βιωσιμότητα παρουσία των υπό μελέτη κλασμάτων συγκρινόμενη με τη συνθήκη ελέγχου (control). Η κυτταρική βιωσιμότητα στη συνθήκη ελέγχου ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  SD, (n=3-9), \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. K1: Κλάσμα 1, YK2A: Υποκλάσμα 2A, YK2B: Υποκλάσμα 2B, YK3A: Υποκλάσμα 3A, YK3B: Υποκλάσμα 3B, YK3Γ: Υποκλάσμα 3Γ, YK4A: Υποκλάσμα 4A, YK5A: Υποκλάσμα 5A (Kalousi F.D. et al., υπό συγγραφή).

### 3.3.3. Καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τα υποκλάσματα του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του Μαστιχόδεντρου Χίου

Ακολούθως, μελετήθηκε η εμπλοκή των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* στη σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών. Για το σκοπό αυτό αρχικά διερευνήθηκε η επίδρασή τους στη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR), εφαρμόζοντας τη δοκιμή λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης. Πιο συγκεκριμένα, τα υπό μελέτη κλάσματα της ρητίνης εξετάστηκαν στη συγκέντρωση των 50µg/ml, απουσία ή παρουσία 1µM DEX, μετά από επώαση στα κύτταρα HEK293 για 6 ώρες. Η

συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 EtOH. Βάσει των αποτελεσμάτων (Εικόνα 40), το κλάσμα 1 (K1), καθώς και τα υποκλάσματα 2B (YK2B), 3B (YK3B) και 5A (YK5A) προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR κατά περίπου 20% (K1, YK2B), 15% (YK3B) και 30% (YK5A), με το υποκλάσμα 5A (YK5A) να είναι το πιο δραστικό. Αντίθετα, τα υποκλάσματα 2A (YK2A), 3A (YK3A), 3Γ (YK3Γ) και 4A (YK4A) δεν προκάλεσαν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή στην επαγόμενη από τη DEX μεταγραφική δραστηριότητα του GR. Απουσία DEX δεν προκλήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR, παρουσία των υπό μελέτη κλασμάτων (Kalousi F.D. et al., υπό συγγραφή).

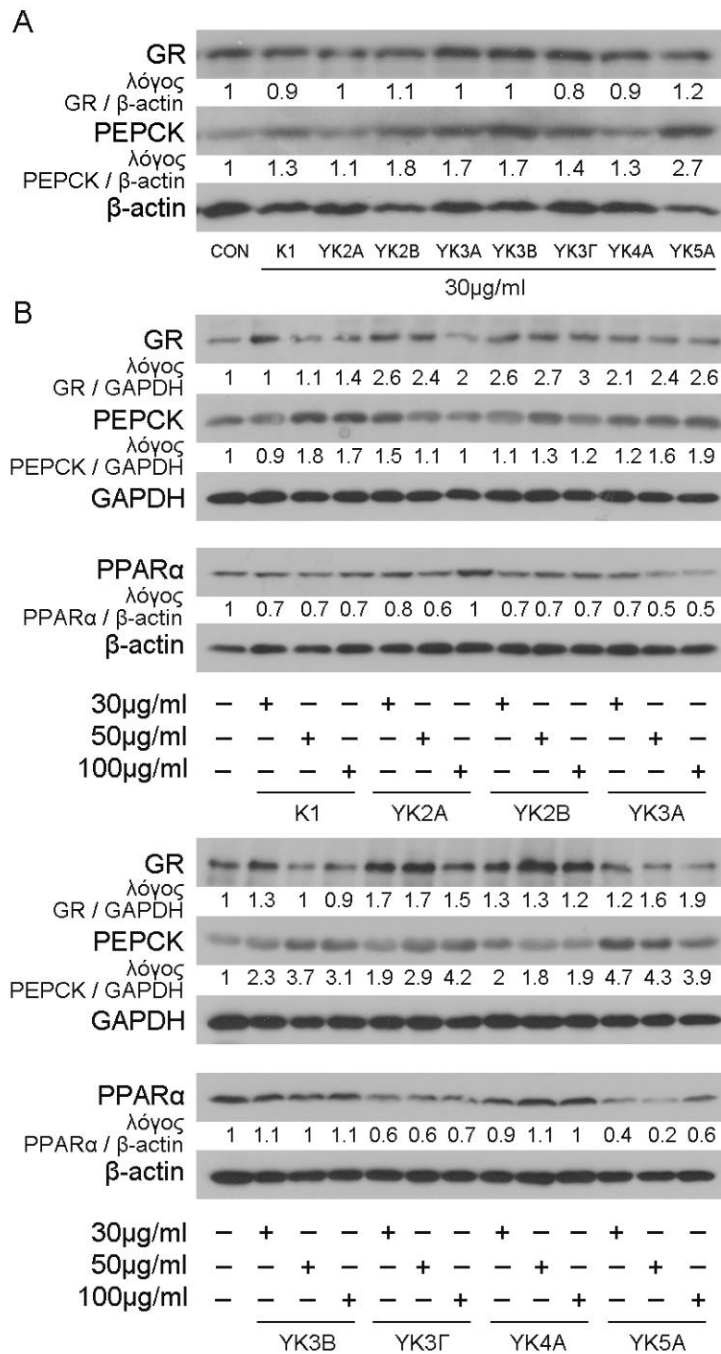


**Εικόνα 40:** Καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τα υποκλάσματα του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, μετά από επώαση 6 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης προκύπτει μετά από κανονικοποίησή της με τη δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης στη συνθήκη ελέγχου απουσία DEX ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  SD, (n=2-3), \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. K1: Κλάσμα 1, YK2A: Υποκλάσμα 2A, YK2B: Υποκλάσμα 2B, YK3A: Υποκλάσμα 3A, YK3B: Υποκλάσμα 3B, YK3Γ: Υποκλάσμα 3Γ, YK4A: Υποκλάσμα 4A, YK5A: Υποκλάσμα 5A (Kalousi F.D. et al., υπό συγγραφή).

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρατηρούμενη μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από το κλάσμα 1 (K1), καθώς και τα υποκλάσματα 2B (YK2B), 3B (YK3B) και 5A (YK5A), ακολούθησε αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων τόσο του ίδιου του GR, όσο και μορίων στόχων της σηματοδότησής του, της PEPCK [225] και του PPAR $\alpha$  (Lemberger T. et al., 2011). Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα HEK293 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6 θέσεων, σε πλήρες θρεπτικό υλικό, με πυκνότητα  $2 \times 10^5$ /θέση, για 48 ώρες. Έπειτα, έγινε η προσθήκη των υπό μελέτη υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, και αφέθηκαν για επώαση 36 (Εικόνα 41A) και 48 ωρών (Εικόνα 41B), σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 30-100µg/ml. Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 EtOH.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 58A, μετά τις 36 ώρες επώασης τα υποκλάσματα 3Γ (YK3Γ) και 4A (YK4A) προκάλεσαν μικρή μείωση κατά 20% και 10%, αντίστοιχα, των πρωτεϊνικών επιπέδων

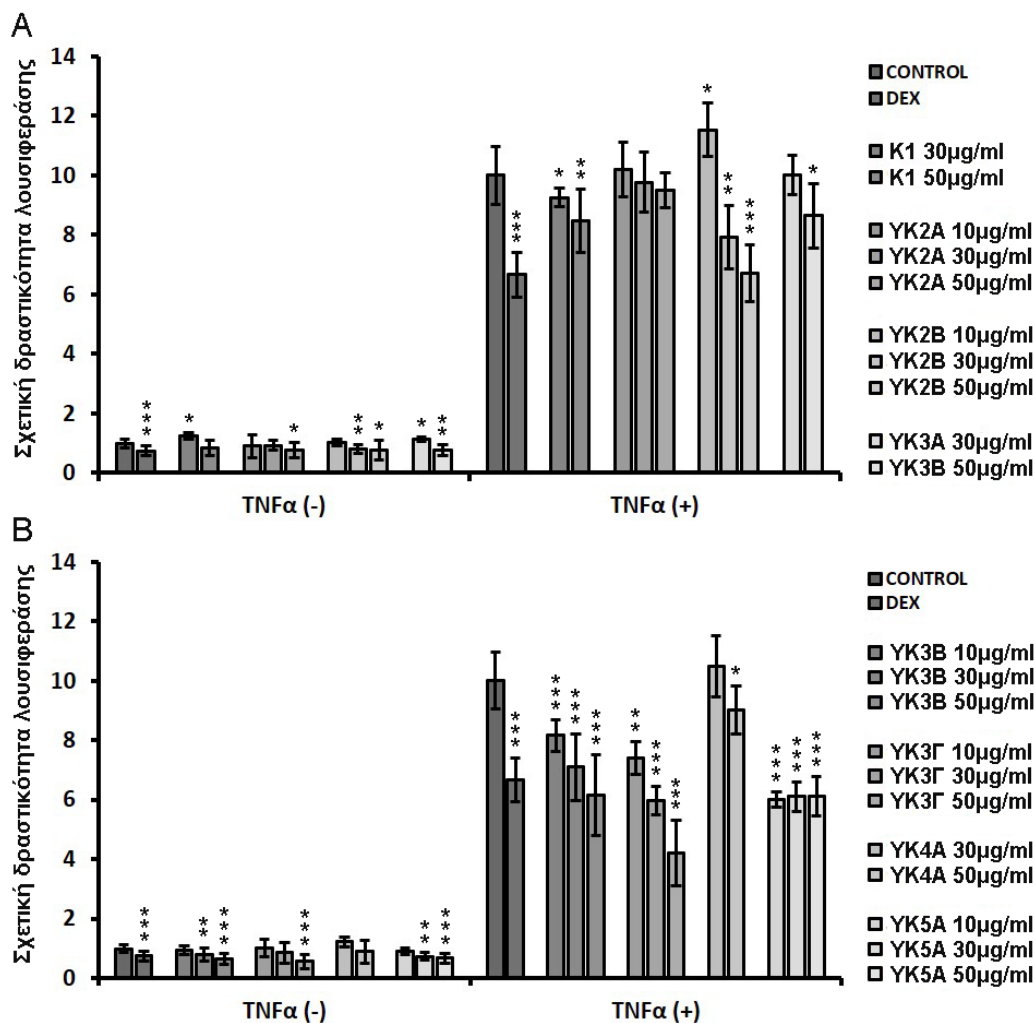
του GR, ενώ τα υποκλάσματα 2B (YK2B) και 5A (YK5A) αύξησαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR κατά 10% και 20%, αντίστοιχα, στη συγκέντρωση των 30μg/ml. Τα υπόλοιπα υποκλάσματα δεν προκάλεσαν αξιοσημείωτες μεταβολές. Όσο αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK, όλα τα υποκλάσματα προκάλεσαν αύξηση των πρωτεϊνικών της επιπέδων, με το υποκλάσμα 5A (YK5A) να είναι το πιο δραστικό, προκαλώντας αύξηση έως 2.7 φορές (Εικόνα 41A). Μετά τις 48 ώρες επώασης (Εικόνα 41B), όλα τα υπό μελέτη υποκλάσματα του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης αύξησαν ακόμη περισσότερο τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, με το υποκλάσμα 2B (YK2B) να είναι το πιο δραστικό, προκαλώντας αύξηση έως 2.7 φορές. Όσο αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK μετά την επώαση των 48 ωρών, όλα τα υπό μελέτη υποκλάσματα του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης προκάλεσαν εξίσου αύξηση, με το κλάσμα 75A να είναι το πιο δραστικό, προκαλώντας αύξηση έως 4.7 φορές. Επομένως, η παρατηρούμενη μείωση της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR παρουσία του κλάσματος 1 (K1), καθώς και των υποκλασμάτων 2B (YK2B), 3B (YK3B) και 5A (YK5A), δε συνοδεύεται από επακόλουθη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK. Η παρατηρούμενη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK πιθανόν να σχετίζεται με την επαγόμενη από τα υποκλάσματα αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR. Η αύξηση αυτή πιθανόν περιορίζει την κατασταλτική δράση των υποκλασμάτων στην επαγόμενη από τη DEX μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα. Ωστόσο, όσο αφορά τον PPARα (Εικόνα 41B), όλα τα προς τα μελέτη υποκλάσματα, με εξαίρεση τα YK3B και YK4A, οδήγησαν σε μείωση των πρωτεϊνικών του επιπέδων, με το υποκλάσμα 5A (YK5A) να είναι και σε αυτή την περίπτωση το περισσότερο δραστικό, μειώνοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα έως 80% (Kalousi F.D. et al., υπό συγγραφή).



**Εικόνα 41:** Αξιολόγηση της επίδρασης των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, της PEPCK και του PPAR $\alpha$ , μετά από επώαση 36 (A) και 48 ωρών (B), σε κύτταρα HEK293. Οι λόγοι προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων με τις αντίστοιχες των  $\beta$ -actin ή GAPDH. K1: Κλάσμα 1, YK2A: Υποκλάσμα 2A, YK2B: Υποκλάσμα 2B, YK3A: Υποκλάσμα 3A, YK3B: Υποκλάσμα 3B, YK3Γ: Υποκλάσμα 3Γ, YK4A: Υποκλάσμα 4A, YK5A: Υποκλάσμα 5A (Kaloussi F.D. et al., υπό συγγραφή).

### **3.3.4. Καταστολή της επαγόμενης από τον TNF $\alpha$ μεταγραφικής δραστηριότητας του NF- $\kappa$ B από τα υποκλάσματα του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia***

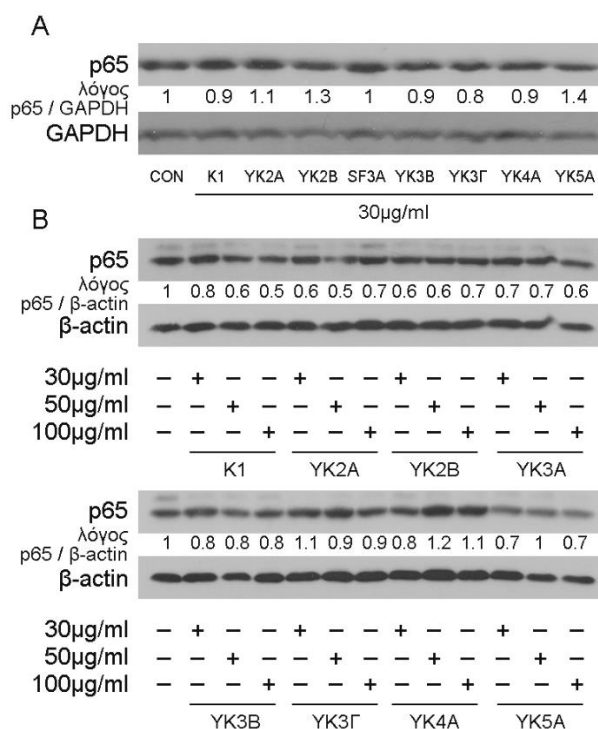
Επόμενος στόχος τέθηκε η διερεύνηση της αντιφλεγμονώδους δράσης των υπό μελέτη υποκλασμάτων από το ουδέτερο κλάσμα της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε αρχικά η επίδραση των υποκλασμάτων στη μεταγραφική δραστηριότητα του παράγοντα φλεγμονής NF- $\kappa$ B, εφαρμόζοντας τη δοκιμή λουσιφεράσης/ $\beta$ -γαλακτοσιδάσης. Πιο συγκεκριμένα, τα υπό μελέτη υποκλάσματα της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, εξετάστηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 10-50 $\mu$ g/ml, καθώς και η DEX (1 $\mu$ M), απουσία ή παρουσία 20nM TNF $\alpha$ , μετά από επώαση στα κύτταρα για 6 ώρες. Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε ddH<sub>2</sub>O και 1/1000 EtOH. Τα αποτελέσματα από τη δοκιμή λουσιφεράσης έδειξαν ότι το κλάσμα 1 (K1), καθώς και τα υποκλάσματα 2B, 3A, 3B, 3Γ, 4A και 5A προκάλεσαν δόσο-εξαρτώμενη μείωση στην επαγόμενη από τον TNF $\alpha$  μεταγραφική δραστηριότητα του NF- $\kappa$ B, έως περίπου 15%, 30%, 15%, 35%, 55%, 10% και 40%, αντίστοιχα, σε συγκεντρώσεις 10-50 $\mu$ g/ml. Το υποκλάσμα 5A ήταν το πιο δραστικό σημειώνοντας τη μεγαλύτερη μείωση ακόμη και στη χαμηλή συγκέντρωση των 10 $\mu$ g/ml. Τέλος, το υποκλάσμα 2A (YK2A) δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντικές μεταβολές (Εικόνα 42) (Kalousi F.D. et al., υπό συγγραφή).



**Εικόνα 42:** Καταστολή της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ από τα K1, YK2A, YK2B, YK3A (A) και YK3B, YK3Γ, YK4A, YK5A (B) του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, μετά από επώαση 6 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης προκύπτει μετά από κανονικοποίηση με τη δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης στη συνθήκη ελέγχου απουσία DEX ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  SD, (n=2-6), \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. K1: Κλάσμα 1, YK2A: Υποκλάσμα 2A, YK2B: Υποκλάσμα 2B, YK3A: Υποκλάσμα 3A, YK3B: Υποκλάσμα 3B, YK3Γ: Υποκλάσμα 3Γ, YK4A: Υποκλάσμα 4A, YK5A: Υποκλάσμα 5A (Kalousi F.D. et al., υπό συγγραφή).

Έπειτα, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο βιοχημικός μηχανισμός της παρατηρούμενης αντιφλεγμονώδους δράσης των υποκλασμάτων μελετήθηκε η επίδρασή τους στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κΒ. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα HEK293 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6 θέσεων, σε πλήρες θρεπτικό υλικό, με πυκνότητα  $2 \times 10^5$ /θέση, για 48 ώρες. Έπειτα, έγινε η προσθήκη των υπό μελέτη υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, και αφέθηκαν για επώαση 36 (Εικόνα 43A) και 48 ωρών (Εικόνα 43B), σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 30-100μg/ml. Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 EtOH. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 43A, μετά τις 36 ώρες επώασης δεν προκλήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κΒ παρουσία των

υπό μελέτη υποκλασμάτων, στη συγκέντρωση των 30μg/ml. Αντίθετα, μετά το πέρας της 48ωρης επώασης (Εικόνα 43B), όλα τα υποκλάσματα προκάλεσαν μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της υπομονάδας p65, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, σε συγκεντρώσεις 30-100μg/ml. Επομένως, η παρατηρούμενη καταστολή της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB οφείλεται τόσο σε ρύθμιση σε μεταγραφικό επίπεδο (σε χρονικό διάστημα 6-24 ώρες), όσο και σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ίδιου του μεταγραφικού παράγοντα (Kalousi F.D. et al., υπό συγγραφή).



**Εικόνα 43:** Αξιολόγηση της επίδρασης των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus L. var. chia*, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κB, μετά από επώαση 36 (A) και 48 ωρών (B), σε κύτταρα HEK293. Οι λόγοι προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων με τις αντίστοιχες των β-actin ή GAPDH. K1: Κλάσμα 1, YK2A: Υποκλάσμα 2A, YK2B: Υποκλάσμα 2B, YK3A: Υποκλάσμα 3A, YK3B: Υποκλάσμα 3B, YK3Γ: Υποκλάσμα 3Γ, YK4A: Υποκλάσμα 4A, YK5A: Υποκλάσμα 5A (Kalousi F.D. et al, υπό συγγραφή).

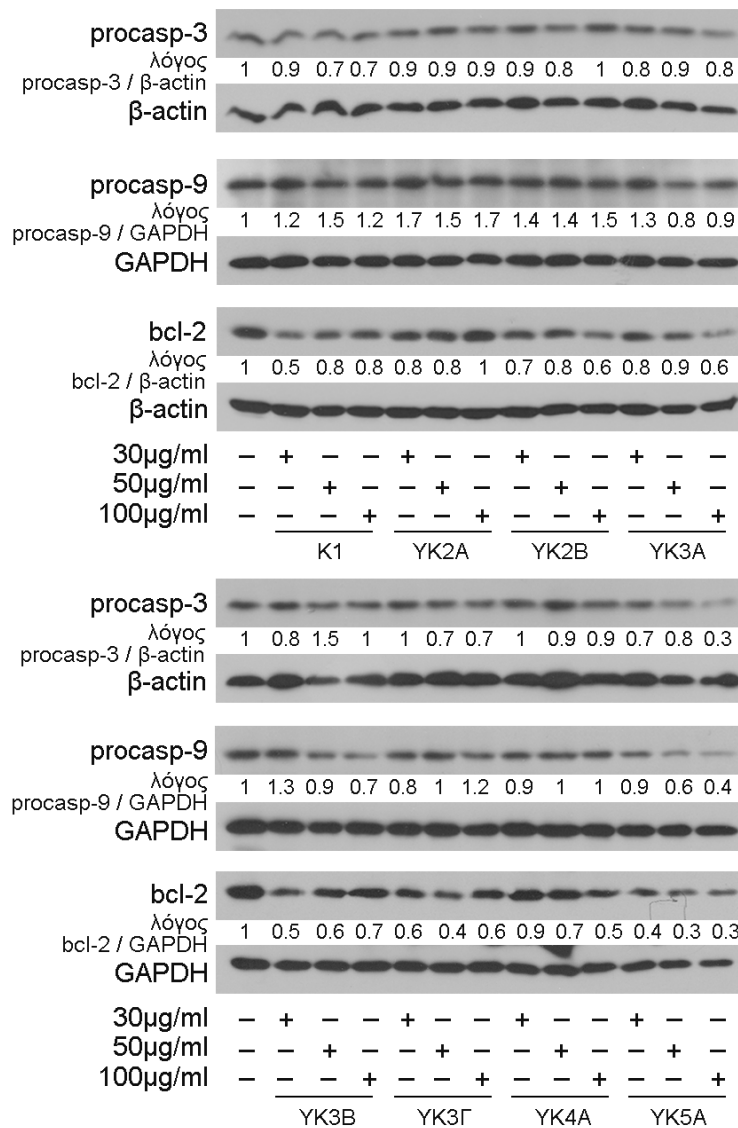
### 3.3.5. Διερεύνηση της επίδρασης των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus L. var. chia* στους αποπτωτικούς μηχανισμούς

Στη συνέχεια, στόχος της παρούσας μελέτης τέθηκε η διερεύνηση της δυνατότητας των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης του *Pistacia lentiscus L. var. chia* να επάγουν την απόπτωση των κυττάρων HEK293, καθώς και η αποσαφήνιση του βιοχημικού μηχανισμού μέσω του οποίου επιτελείται. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western, για την αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3, της προκασπάσης-9 και της bcl-2. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα HEK293 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6 θέσεων, σε πλήρες θρεπτικό υλικό, με πυκνότητα  $2 \times 10^5$ /θέση, για 48 ώρες. Έπειτα, έγινε η προσθήκη των υπό μελέτη υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος

της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, και αφέθηκαν για επώαση 48 ωρών (Εικόνα 44), σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 30-100μg/ml. Η συνθήκη ελέγχου (control) περιείχε 1/1000 EtOH.

Τα πειραματικά δεδομένα από την ανοσοαποτύπωση κατά Western έδειξαν ότι μετά το πέρας των 48 ωρών (Εικόνα 44), όλα τα υπό μελέτη υποκλάσματα προκάλεσαν μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3, σε συγκεντρώσεις 30-100μg/ml, με το υποκλάσμα 5A (YK5A) να είναι το πιο δραστικό, προκαλώντας τη μεγαλύτερη μείωση (έως 70%). Ομοίως, όλα τα υπό μελέτη υποκλάσματα προκάλεσαν μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της αντι-αποπτωτικής bcl-2, με το υποκλάσμα 5A (YK5A) να είναι εξίσου το περισσότερο δραστικό, οδηγώντας σε μείωση έως 70%. Έπειτα, προκειμένου να διαπιστωθεί αν η επαγόμενη απόπτωση διαμεσολαβείται από το μιτοχονδριακό μονοπάτι μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9. Τα υποκλάσματα 3A (YK3A), 3B (YK3B) και 5A (YK5A) μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9 έως 20%, 30% και 60%, αντίστοιχα, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 50 και 100μg/ml, με το υποκλάσμα 5A (YK5A) να είναι το περισσότερο δραστικό προκαλώντας μείωση έως 60%. Επομένως, τα παραπάνω υποκλάσματα επάγουν την απόπτωση μέσω ενεργοποίησης του μιτοχονδριακού μονοπατιού, όπως υποδηλώνει η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9. Όσο αφορά τα υπόλοιπα κλάσματα, η επαγόμενη απόπτωση πιθανόν διαμεσολαβείται μέσω άλλου μονοπατιού (Kalousi F.D. et al., υπό συγγραφή).





**Εικόνα 44:** Αξιολόγηση της επίδρασης των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3, προκασπάσης-9 και bcl-2, μετά από επώαση 48 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Οι λόγοι προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων με τις αντίστοιχες των β-actin ή GAPDH. K1: Κλάσμα 1, YK2A: Υποκλάσμα 2A, YK2B: Υποκλάσμα 2B, YK3A: Υποκλάσμα 3A, YK3B: Υποκλάσμα 3B, YK3Γ: Υποκλάσμα 3Γ, YK4A: Υποκλάσμα 4A, YK5A: Υποκλάσμα 5A (Kalousi F.D. et al., υπό συγγραφή)

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 4.1. Συμπεράσματα βιολογικών δράσεων των κλασμάτων από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*

Η Μαστίχα Χίου αποτελεί την φυσική και αρωματική ρητίνη που εκκρίνεται από τον κορμό και τα μεγάλα κλαδιά του Μαστιχόδεντρου Χίου, *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*. Το Μαστιχόδεντρο Χίου καλλιεργείται αποκλειστικά στο νότιο τμήμα της Χίου, ωστόσο φύεται και στο βόρειο τμήμα του νησιού αλλά χωρίς να παράγει ρητίνη. Το γεγονός ότι μόνο τα Μαστιχόδεντρα της Νότιας Χίου παράγουν Μαστίχα οφείλεται στο μικροκλίμα της περιοχής, που χαρακτηρίζεται από ήπιους χειμώνες και ξηρά καλοκαίρια. Αντίθετα, η Βόρεια Χίος διαθέτει ψηλά δασωμένα

βουνά τα οποία συγκρατούν τις βροχές και την υγρασία, γεγονός που δε βοηθάει την παραγωγή Μαστίχας. Η καλλιέργεια της Μαστίχας και η φροντίδα των Μαστιχόδεντρων διαρκεί όλο το χρόνο, με τη συγκομιδή της να ξεκινάει μετά τα μέσα του Αυγούστου, με το σύνολο της παραγωγής της να καταλήγει στην Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου από όπου διατίθεται στο εμπόριο (πηγή: Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου).

Η Μαστίχα Χίου χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή ιατρική πάνω από 2500 χρόνια, με τον Διοσκουρίδη και τον Γαληνό να την αναφέρουν ως θεραπευτικό φυτό για την αντιμετώπιση φλεγμονών του στομάχου, αλλά και ως καθαριστικό των δοντιών [1]. Το 1997 η Μαστίχα Χίου χαρακτηρίστηκε ως προϊόν με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ), ενώ το 2015 η καλλιέργεια της Μαστίχας Χίου από τους Μαστιχοπαραγωγούς εντάχθηκε στην Άυλη Παγκόσμια Πολιτιστική Κληρονομιά της UNESCO. Το 2015 επίσης η Μαστίχα Χίου αναγνωρίστηκε από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων ως παραδοσιακό φυτικό φαρμακευτικό προϊόν για την αντιμετώπιση πεπτικών διαταραχών και φλεγμονών του δέρματος [2]. Τα τελευταία χρόνια έρχονται στο φως όλο και περισσότερα επιστημονικά δεδομένα για το ευρύ φάσμα των βιολογικών δράσεων της Μαστίχας Χίου, οι οποίες οφείλονται ως επί το πλείστον στα βιοενεργά συστατικά που έχουν εντοπιστεί στο εκχυλίσμά της. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου αποτελείται από τριτερπένια (65-70%), ενώ το υπόλοιπο 20-30% καταλαμβάνει το κολλώδες πολυμερές β-myrcene [2, 8]. Τα αιθέρια έλαια τόσο της Μαστίχας Χίου όσο και των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου αποτελούνται κυρίως μονο- και sesqui-τερπένια, καθώς και από πολυφαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις [9, 16, 18, 20].

Τα τριτερπένια που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο τμήμα του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου αποτελούν πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών. Ο ρόλος τους μπορεί να είναι είτε δομικός, ως συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, είτε προστατευτικός, παρέχοντας στα φυτά αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή και αντιπαρασιτική δράση [202]. Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια τα τριτερπένια έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών λόγω της ικανότητάς τους να δρουν ως εν δυνάμει επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Συγκεκριμένα, έρευνες έχουν δείξει ότι τα τριτερπένια επάγουν επιλεκτικά το μονοπάτι της trans-καταστολή της μεταγραφής από τον GR, αποτέλεσμα της οποίας είναι η καταστολή της φλεγμονής, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν το μονοπάτι της ενεργοποίησης της μεταγραφής από τον GR, που οδηγεί στις περισσότερες από τις ανεπιθύμητες δράσεις [204-208].

Σ αυτό το πλαίσιο, στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση των βιολογικών δράσεων κλασμάτων διαφορετικής πολικότητας από τα φύλλα και τη ρητίνη του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου, καθώς και των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου. Απώτερος σκοπός ήταν η διερεύνηση των βιοχημικών μηχανισμών επιτέλεσης των δράσεων αυτών, και της πιθανούς εμπλοκής των κλασμάτων στη σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε χημική ανάλυση των κλασμάτων της ρητίνης και των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου από την ερευνητική ομάδα του Dr. Giovanni Appendino, (Professor of Chemistry, Università del Piemonte Orientale (UPO), Faculty of Pharmacy, Novara, Italy), με σκοπό την κλασμάτωση των βιοενεργών συστατικών και τον

περεταίρω χαρακτηρισμό των βιοδραστικών μορίων. Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης των κλασμάτων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κυττάρων HEK293, στον ενεργειακό μεταβολισμό, τους μηχανισμούς της απόπτωσης, καθώς και διερεύνηση της αντιφλεγμονώδους τους δράσης. Ακόμη, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας της Μαστίχας Χίου σε τριτερπένια και της ομοιότητας της δομής τους με τα γλυκοκορτικοειδή επικεντρωθήκαμε στην εμπλοκή των κλασμάτων στη σηματοδότηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Ο GR συμμετέχει στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών λειτουργιών, όπως η ανάπτυξη, ο μεταβολισμός, η ομοιόσταση της γλυκόζης, η ανοσολογική απόκριση και η απόπτωση [119, 131]. Η πιθανή ρύθμιση της σηματοδότησης του GR από τα κλάσματα του Μαστιχόδεντρου Χίου μπορεί να φέρει στο φως νέες ενώσεις που θα μπορούν να χορηγηθούν είτε μόνες τους είτε συνδυαστικά με τα γλυκοκορτικοειδή, με σκοπό την αύξηση της αποτελεσματικότητας των GC και τη μείωση των παρενεργειών.

Ο χημικός χαρακτηρισμός των κλασμάτων των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου αποκάλυψε την υψηλή περιεκτικότητα του ημι-πολικού κλάσματος σε τριτερπένια. Συγκεκριμένα, στο ημι-πολικό κλάσμα και των δύο δέντρων ταυτοποιήθηκε η παρουσία των α-αμυρενόνη, λουπεόλη και β-σιτοστερόλη, μέσω ανάλυσης <sup>1</sup>H-NMR [224]. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες αναλύσεις χημικής σύστασης τόσο του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* όσο και του ιταλικού *Pistacia lentiscus* L. στα φύλλα των οποίων είχαν εντοπιστεί τα παραπάνω τριτερπένια [18, 112].

Για πρώτη φορά, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικής πολικότητας κλασμάτων από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* στην επαγόμενη από το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη (DEX) μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR). Τόσο το ημι-πολικό όσο και το πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου μείωσαν με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο την επαγόμενη από τη DEX μεταγραφική δραστηριότητα του GR. Το ημι-πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκάλεσε μεγαλύτερη μείωση συγκριτικά με το πολικό κλάσμα της ίδιας προέλευσης δέντρου, καθώς και συγκριτικά με το ημι-πολικό κλάσμα του Μαστιχόδεντρου της Βόρειας Χίου. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των πολικών κλασμάτων των διαφορετικής προέλευσης δέντρων. Ακόμη, καμία επίδραση στην μεταγραφική δραστηριότητα του GR δεν προκάλεσε το μη πολικό κλάσμα των φύλλων [224]. Το μη πολικό κλάσμα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου, βάσει προηγούμενων μελετών αλλά και της παρούσας έρευνας, χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση ακόρεστων τριγλυκεριδίων λιπαρών οξέων, το ημι-πολικό κλάσμα περιέχει τριτερπένια, ενώ το πολικό κλάσμα αποτελείται κυρίως από πολυφαινόλες. Επομένως, η μειωμένη δραστηριότητα του μη πολικού κλάσματος των φύλλων όσο αφορά την επαγόμενη από τη DEX μεταγραφική δραστηριότητα του GR πιθανόν να οφείλεται στην χαμηλή του περιεκτικότητα σε τριτερπένια. Αντίθετα, η αυξημένη κατασταλτική δράση του ημι-πολικού κλάσματος των φύλλων στην επαγόμενη από τη DEX μεταγραφική δραστηριότητα του GR πιθανόν οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητά του σε τριτερπένια [112, 233, 234]. Επομένως, κρίνεται αναγκαίο να διερευνηθούν οι βιολογικές δράσεις και να χαρακτηριστούν πλήρως τα βιοενεργά συστατικά που είναι υπεύθυνα για τις συγκεκριμένες παρατηρούμενες δράσεις. Αυτά

θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανά μελλοντικά φάρμακα τόσο για μεμονωμένη όσο και για συνδυαστική χρήση με τα γλυκοκορτικοειδή, ελαχιστοποιώντας τις παρενέργειές τους [198].

Η παρατηρούμενη καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τα υπό μελέτη κλάσματα των φύλλων μας ώθησε να μελετήσουμε την επίδρασή τους στα πρωτεϊνικά επίπεδα γονιδίων στόχων του GR, όπως της PEPCK και της γλουταμινικής συνθετάσης (GS) [225, 226]. Η PEPCK αποτελεί ένα σημαντικό ένζυμο που καταλύει την πρώτη αντίδραση της ηπατικής γλυκονεογένεσης, ρυθμίζοντας το μεταβολισμό της γλυκόζης. Έχει δειχθεί ότι η υπερέκφραση του γονιδίου της PEPCK ή η αυξημένη δραστηριότητα της ίδιας της PEPCK μπορεί να οδηγήσει σε υπεργλυκαιμία και ανάπτυξη διαβήτη [235]. Βάσει της παρούσας έρευνας, τόσο το ημι-πολικό όσο και το πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK και της GS, κυρίως σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 50μg/ml, τόσο απουσία όσο και παρουσία DEX. Η συγκριτική μας μελέτη έδειξε ότι τα κλάσματα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου ήταν πιο δραστικά από τα αντίστοιχα της Βόρειας Χίου. Επομένως, η μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα του GR σε συνδυασμό με τα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK αναδεικνύουν τις αντι-υπεργλυκαιμικές δράσεις των κλασμάτων των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου [224]. Η συγχορήγηση των κλασμάτων με τα γλυκοκορτικοειδή θα μπορούσε να συνεισφέρει στη μείωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών που προκαλούνται από την παρατεταμένη χρήση τους [197]. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με μια προηγούμενη έρευνα στην οποία το εκχύλισμα των φύλλων από το *Pistacia lentiscus* L της Αλγερίας μείωσε τη γλυκόζη στο αίμα διαβητικών αρουραίων, παρουσιάζοντας υπογλυκαιμική δράση [110]. Η παρατηρούμενη αντι-υπεργλυκαιμική δράση του ημι-πολικού και πολικού κλάσματος των φύλλων στην παρούσα έρευνα πιθανόν οφείλεται στην παρουσία των τριτερπενίων λουπεόλη και α-αμυρενόνη, τα οποία έχει δειχθεί από παλαιότερες έρευνες ότι παρουσιάζουν υπογλυκαιμική δράση [236-238].

Από τη συγκεκριμένη έρευνα επίσης αποκαλύφθηκε και η επίδραση των κλασμάτων από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Πιο συγκεκριμένα, τόσο το ημι-πολικό όσο και το πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR κατά 30%, ενώ η συγχορήγηση τους με τη DEX προκάλεσε μείωση έως 60%. Ωστόσο, από τη συγκριτική μελέτη δεν προέκυψαν διαφορές μεταξύ των κλασμάτων από τα διαφορετικής προέλευσης δέντρα [224]. Η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK που προκλήθηκε από τα κλάσματα των φύλλων θα μπορούσε να οφείλεται στα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, εφόσον το γονίδιο της PEPCK αποτελεί άμεσο στόχο της σηματοδότησής του [225]. Ακόμη, δείχθηκε ότι παρουσία του αναστολέα του πρωτεασώματος MG-132 αναστέλλεται η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR που προκαλούν τα κλάσματα των φύλλων. Αυτό υποδεικνύει ότι η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR που προκαλούν τα κλάσματα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου, πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης του υποδοχέα από το πρωτεάσωμα [224].

Επιπλέον, μέσα από τη αυτή την μελέτη αποκαλύφθηκε για πρώτη φορά η επίδραση των κλασμάτων των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου στον ενεργειακό μεταβολισμό. Πιο

συγκεκριμένα, τόσο το ημι-πολικό όσο και το πολικό κλάσμα από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ενεργοποιούμενης από το AMP κινάσης (AMPK) καθώς και της φωσφορυλιωμένης AMPKα (phospho-AMPKα). Τα πολικά κλάσματα φάνηκε να προκαλούν μεγαλύτερη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της phospho-AMPKα από τα ημι-πολικά. Επίσης, το ημι-πολικό κλάσμα του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου φάνηκε να είναι πιο δραστικό όσο αφορά τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της AMPK και phospho-AMPKα από το αντίστοιχο της Βόρειας Χίου [224]. Η AMPK αποτελεί ένα ένζυμο κλειδί για τη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού. Ειδικότερα, όταν τα επίπεδα της ATP μειώνονται και του AMP αυξάνονται, η AMPK αναστέλλει διεργασίες του αναβολισμού και ενεργοποιεί διεργασίες του καταβολισμού, με σκοπό την παροχή ενέργειας για το κύτταρο [181]. Ακόμη, προγενέστερη μελέτη σε αστροκύτταρα του προμετωπιαίου φλοιού αρουραίων είχε δείξει ότι τα γλυκοκορτικοειδή μειώνουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της phospho-AMPKα, γεγονός που οδηγεί σε μείωση και των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR [185]. Παράλληλα, προηγούμενη μελέτη είχε δείξει ότι η ενεργοποιημένη AMPK οδηγεί σε ενεργοποίηση της κινάσης p38 MAPK, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στη φωσφορυλίωση του GR στη Ser211, ρυθμίζοντας έτσι τη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών [184]. Επομένως, η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της AMPK και της phospho-AMPKα από τα κλάσματα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου πιθανόν να οδηγεί στη μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, και μετέπειτα στα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK και της GS [224].

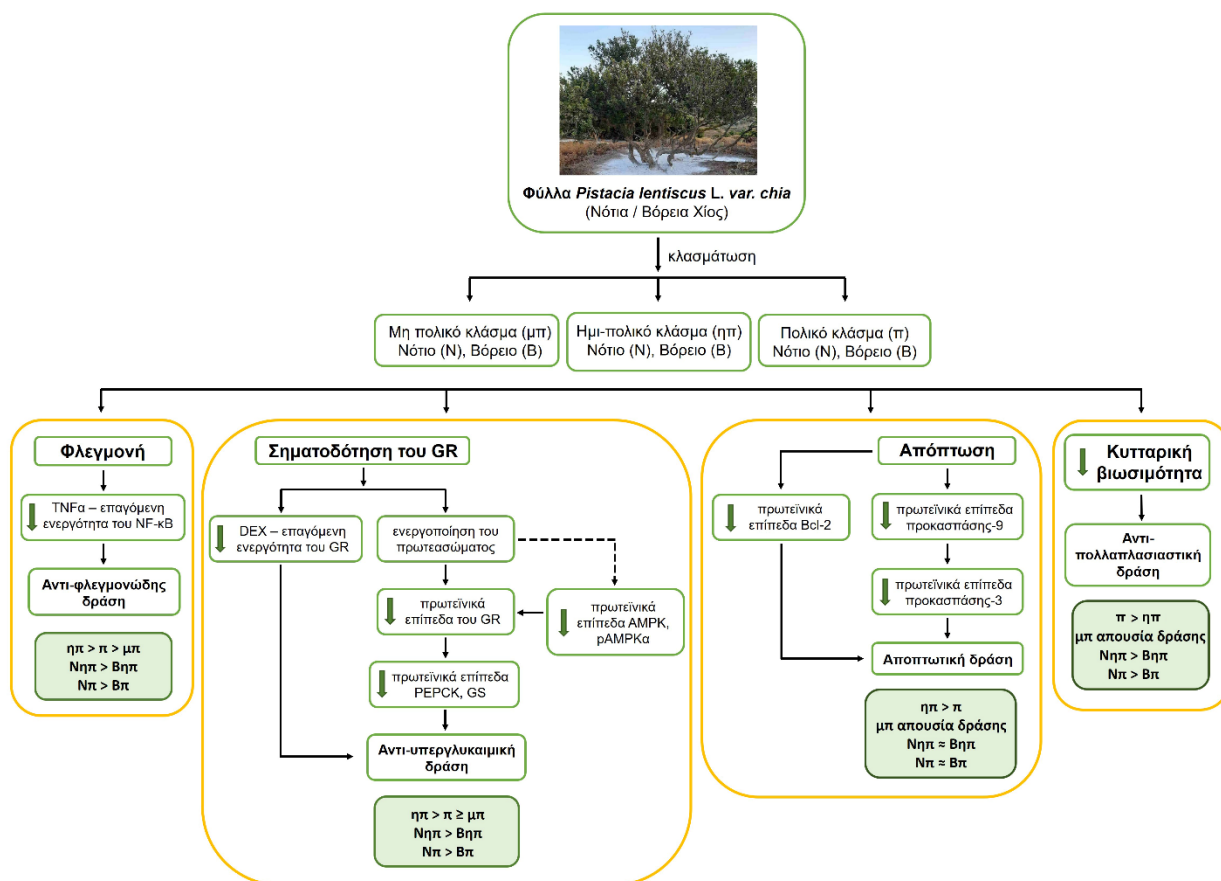
Η αντιφλεγμονώδης δράση των γλυκοκορτικοειδών οφείλεται, όπως προαναφέρθηκε, στην trans-καταστολή της μεταγραφής του NF-κΒ από τον GR. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα, αλλά όχι το μη πολικό, των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου μειώνουν την επαγόμενη από τον TNFα μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κΒ. Από τη συγκριτική μελέτη φάνηκε ότι τόσο το ημι-πολικό όσο και το πολικό κλάσμα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκάλεσαν 1.5-2 φορές περισσότερη καταστολή στη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κΒ από τα αντίστοιχα της Βόρειας Χίου. Ακόμη, η απουσία επίδρασης στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κΒ από τα κλάσματα των φύλλων υποδεικνύει ότι η παρατηρούμενη μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ είναι αποτέλεσμα ρύθμισης της μεταγραφής κι όχι ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων του NF-κΒ [224]. Ένα από τα τριτερπένια που εντοπίστηκαν στα κλάσματα των φύλλων και συγκεκριμένα, στα ημι-πολικά κλάσματα, είναι η λουπεόλη, που είναι γνωστή για την αντιφλεγμονώδη δράση της [239, 240]. Η μεγαλύτερη κατασταλτική δράση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ από το ημι-πολικό κλάσμα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου σε σύγκριση με το αντίστοιχο της Βόρειας Χίου, πιθανόν οφείλεται στην μεγαλύτερη ποσότητα λουπεόλης που εντοπίστηκε στο ημι-πολικό κλάσμα [224]. Όπως προαναφέρθηκε, ένα από τα φαινολικά συστατικά που έχουν εντοπιστεί στα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* είναι το γαλλυλ-κινικό οξύ (galloyl quinic acid) [20]. Προηγούμενη μελέτη είχε δείξει ότι παράγωγα του κινικού οξέος (quinic acid) αναστέλλουν τη δραστηριότητα του NF-κΒ, στον ίδιο βαθμό με τη DEX, ασκώντας αντιφλεγμονώδη δράση [241]. Επομένως, η αντιφλεγμονώδης δράση των πολικών κλασμάτων του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της παρούσας μελέτης πιθανόν οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην παρουσία φαινολικών

συστατικών που εντοπίστηκαν από την ανάλυση  $^1\text{H-NMR}$  [224]. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που ανέφεραν την αντιφλεγμονώδη δράση των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. άλλων προελεύσεων. Συγκεκριμένα, εκχυλίσματα των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. από την Παλαιστίνη μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του TNF $\alpha$  και της IL-6, σε πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα [242]. Επίσης, το αιθέριο έλαιο των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. από την Σαρδηνία ανέστειλε τη δραστηριότητα των COX-1 και COX-2, καθώς και της λιποοξυγενάσης LOX, in vitro, παρουσιάζοντας αντι-φλεγμονώδη δράση [27].

Παράλληλα, από τη συγκεκριμένη έρευνα αποκαλύφθηκαν για πρώτη φορά η αποπτωτική δράση αντι-πολλαπλασιαστική δράση των κλασμάτων από τα φύλλα του Μαστιχόδεντρου Χίου. Πιο συγκεκριμένα, τα πολικά κλάσματα προκάλεσαν μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα HEK293 σε σχέση με τα ημι-πολικά. Η συγκριτική μελέτη έδειξε ότι το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου προκαλεί μεγαλύτερη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας των HEK293 από ότι τα αντίστοιχα κλάσματα της Βόρειας Χίου. Στην παρούσα μελέτη, η αποπτωτική δράση που παρουσίασαν τα κλάσματα των φύλλων διαμεσολαβείται μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού, όπως υποδεικνύεται από τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9, με το πολικό κλάσμα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου να είναι πιο δραστικό από το αντίστοιχο ημι-πολικό [224]. Ένα από τα φαινορικά συστατικά που εντοπίστηκε στα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* είναι το γλυκοσίδιο της καεμπερόλης (kaempferol glycoside) [20], το οποίο έχει αναφερθεί ότι επάγει απόπτωση μέσω αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της κασπάσης-9, -7 και -3, στην ανθρώπινη ηπατοκαρκινική σειρά HepG2 [243]. Επομένως, η μιτοχονδριακά επαγόμενη αποπτωτική δράση των πολικών κλασμάτων του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* της παρούσας μελέτης πιθανόν οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην παρουσία φαινολικών συστατικών που εντοπίστηκαν από την ανάλυση  $^1\text{H-NMR}$  [224]. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που ανέφεραν την αποπτωτική και αντι-πολλαπλασιαστική δράση των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. άλλων προελεύσεων. Ειδικότερα, εκχυλίσματα από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. από την Ιταλία και τη Σαρδηνία ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων νευρικών κυττάρων SH-SY5Y και SK-N-BE(2)C και ενεργοποίησαν την κασπάση-3, in vitro [112].

Συνοψίζοντας (Εικόνα 45), τα ημι-πολικά και πολικά κλάσματα των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* από τη Νότια και Βόρεια Χίο παρουσίασαν αντι-πολλαπλασιαστική, αντι-φλεγμονώδη, αντι-υπεργλυκαιμική και μιτοχονδριακά-επαγόμενη αποπτωτική δράση, με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Επίσης, τα παραπάνω κλάσματα κατέστειλαν την επαγόμενη από τη DEX μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, με ακόλουθη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα και των στόχων του, PEPCK και γλουταμινική συνθετάση. Τα τριτερπένια που εντοπίστηκαν στα κλάσματα των φύλλων πιθανόν ανταγωνίζονται την επαγόμενη από τη DEX γλυκονεογενετική δράση. Η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της AMPK και της φωσφορυλιωμένης της μορφής από τα κλάσματα των φύλλων πιθανόν οδηγεί στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, μέσω ενεργοποίησης του πρωτεολυτικού μονοπατιού του πρωτεασώματος. Ακόμη πιο ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι τα κλάσματα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας Χίου αποκαλύφθηκε ότι είναι πιο

δραστικά από τα αντίστοιχα του Μαστιχόδεντρου που φύεται στη Βόρεια Χίο, δίνοντας το έναυσμα για περισσότερη ανάλυση των πιθανών εφαρμογών τους στην φαρμακευτική, κοσμητολογία και βιομηχανία τροφίμων [224].



**Εικόνα 45:** Οι βιολογικές δράσεις και οι βιοχημικοί μηχανισμοί των κλασμάτων από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*. μπ: μη πολικό κλάσμα, ηπ: ημι-πολικό κλάσμα, π: πολικό κλάσμα, Νηπ: ημι-πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Νπ: πολικό κλάσμα Νότιας Χίου, Βηπ: ημι-πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου, Βπ: πολικό κλάσμα Βόρειας Χίου [224].

## 4.2. Συμπεράσματα βιολογικών δράσεων των κλασμάτων από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*

Η ρητίνη του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* (Μαστίχα Χίου), χρησιμοποιείται εκτενώς στη Μεσογειακή κουζίνα, ως πρόσθετο τροφίμων και ποτών, καθώς και στην κοσμητολογία και την οδοντιατρική [1, 2]. Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες *in vitro*, *in vivo* και κλινικές μελέτες έρχονται στο φως αποκαλύπτοντας το φάσμα των ευεργετικών βιολογικών δράσεων της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* (Μαστίχα Χίου). Οι ερευνητές έχουν αναδείξει τις αντιμικροβιακές [8, 16, 31, 32], αντιοξειδωτικές [30, 43, 48], αντιφλεγμονώδεις [3, 56, 58, 59], αντι-υπερλιπιδαιμικές [69, 72, 73, 75], αντι-υπεργλυκαιμικές [69, 71, 73, 75] και αντικαρκινικές δράσεις [95, 96, 99] της Μαστίχας Χίου. Οι παραπάνω βιολογικές δράσεις οφείλονται στα βιοδραστικά συστατικά που έχουν εντοπιστεί στο εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου, όπως τριτερπένια [4-8], το πολυμερές β-myrcene [2], φαινολικά [52], σάκχαρα και ουρονικά οξέα [11].

Τα τριτερπένια που αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα των βιοενεργών συστατικών του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου παρουσιάζουν παρόμοια δομή με τα γλυκοκορτικοειδή [204]. Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή, όπως η δεξαμεθαζόνη, χορηγούνται ευρέως ως ισχυρά αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα για τη θεραπεία αυτοάνοσων ασθενειών και φλεγμονωδών νόσων, καθώς και καρκίνων του αίματος, λόγω των κυτταρο-ειδικών αποπτωτικών τους δράσεων. Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών διαμεσολαβούνται μέσω της δέσμευσής τους με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Η δέσμευση αυτή επάγει την πυρηνική μετακίνηση του GR από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και καταστέλλει τη μεταγραφική δραστηριότητα του παράγοντα φλεγμονής NF-κΒ [175]. Η δέσμευση των γλυκοκορτικοειδών στον GR και η πυρηνική του μετακίνηση επάγει επίσης την μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα, που οδηγεί, μεταξύ άλλων, στην ενεργοποίηση του καταβολισμού και της γλυκονογένεσης. Επομένως, η υψηλή δόση και η χρόνια χορήγηση συνθετικών γλυκοκορτικοειδών μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές παρενέργειες, όπως υπεργλυκαιμία, εμφάνιση διαβήτη, γλαύκωμα, μυϊκή ατροφία, οστεοπόρωση και υπέρταση [197]. Γι' αυτό το λόγο οι ερευνητές έχουν επικεντρώσει το ενδιαφέρον τους στην χημική τροποποίηση των υπαρχόντων γλυκοκορτικοειδών, στην ανακάλυψη νέων εκλεκτικών αγωνιστών του GR (SEGRAs) και στην δημιουργία νέων συστημάτων μεταφοράς, ώστε να ελαχιστοποιήσουν τις παρενέργειες της μακροχρόνιας λήψης γλυκοκορτικοειδών και να ενισχύσουν τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις τους [196]. Παράλληλα, τα φυτικής προέλευσης τριτερπένια έχουν αναδειχθεί ως νέοι επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών [204-208].

Στη δεύτερη ενότητα της παρούσας διδακτορικής διατριβής ως σκοπός τέθηκε η διερεύνηση της αντι-πολλαπλασιαστικής, αντι-φλεγμονώδους και αποπτωτικής δράσης τριών αυξανόμενης πολικότητας κλασμάτων της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* (Μαστίχας Χίου), η εμπλοκή τους στη σηματοδότηση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, καθώς και η συσχέτιση αυτών των δράσεων με τη χημική σύσταση των κλασμάτων. Προγενέστερες μελέτες είχαν αποκαλύψει την παρουσία διαφόρων βιοδραστικών συστατικών στη Μαστίχα Χίου, όπως keto-ολεανολική αλδεΰδη, ολεανολική αλδεΰδη, 24Z-μαστιχαδιενονικό οξύ, 24Z-ισομαστιχαδιενονικό οξύ, καθώς και φαινολικά συστατικά [4, 7-9, 52]. Στην παρούσα μελέτη, το εκχύλισμα της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* αρχικά υπέστη κλασμάτωση, ώστε να προκύψουν τρία αυξανόμενης πολικότητας κλάσματα, το μη πολικό, το ημι-πολικό και το πολικό, με σκοπό τον περαιτέρω εντοπισμό των βιοενεργών συστατικών τους. Από τη χημική ανάλυση προέκυψε ότι το μη πολικό και το ημι-πολικό κλάσμα ήταν εμπλουτισμένα με τριτερπένια, και συγκεκριμένα τα keto-ολεανολική αλδεΰδη, ολεανολική αλδεΰδη, λουπεόλη, μεθυλεστέρας του 24Z-μαστιχαδιενονικού οξέος και μεθυλεστέρας του 24Z-ισομαστιχαδιενονικού οξέος. Στο μη πολικό κλάσμα ταυτοποιήθηκε επίσης με ανάλυση <sup>1</sup>H NMR το κολλώδες πολυμερές 1,4-poly-β-μυρσένιο, όπως αναμενόταν [4, 7-9]. Αντίθετα, από το πολικό κλάσμα της ρητίνης απουσίαζαν τα τριτερπένια, αλλά εντοπίστηκε πληθώρα φαινολικών συστατικών [231].

Ακολούθησε χαρακτηρισμός των βιολογικών δράσεων των τριών κλασμάτων της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας της Μαστίχας σε τριτερπένια ελέγχθηκε η εμπλοκή των κλασμάτων στη σηματοδότηση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Έτσι, μέσα από την παρούσα μελέτη, αποκαλύφθηκε για πρώτη φορά ότι το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα της ρητίνης καταστέλλουν την επαγόμενη από τη DEX μεταγραφική



δραστικότητα του GR, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η δράση αυτή πιθανόν οφείλεται σε συστατικά των κλασμάτων που έχουν όμοια δομή με τις στεροειδείς ορμόνες. Παρόμοια συστατικά εντοπίστηκαν και στο μη πολικό κλάσμα, αλλά το τελευταίο παρουσίασε τη μικρότερη καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR [231]. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην παρουσία του κολλώδους πολυμερούς 1,4-poly- $\beta$ -myrcene, το οποίο βάσει βιβλιογραφίας έχει προταθεί ότι συγκρατεί τα βιοδραστικά συστατικά της Μαστίχας, περιορίζοντας τη βιοδιαθεσιμότητά τους και τις βιολογικές τους δράσεις [2].

Το πολικό κλάσμα της ρητίνης εκτός από την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR μείωσε και τα πρωτεϊνικά του επίπεδα, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Επομένως, είναι πιθανόν η καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από το πολικό κλάσμα να οφείλεται στη μείωση των πρωτεϊνικών του επιπέδων [231]. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τον έλεγχο που πραγματοποιήθηκε στα κλάσματα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου της Νότιας και Βόρειας Χίου, τα οποία ομοίως κατέστειλαν την επαγόμενη από τη DEX μεταγραφική δραστηριότητα του GR και μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, στα κύτταρα HEK293, μέσω ενεργοποίησης του πρωτεολυτικού μηχανισμού του πρωτεασώματος [224]. Προηγούμενες μελέτες είχαν επίσης δείξει ότι η Μαστίχα Χίου καταστέλλει τη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα ανδρογόνων (AR), αναστέλλει τη δέσμευση του AR στα στοιχεία απόκρισής του στο DNA και μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα, σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη LNCaP και PC-3 [93]. Στην παρούσα μελέτη ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός της μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR από το μη πολικό κλάσμα της ρητίνης, στο οποίο επίσης εντοπίστηκαν τριτερπένια. Επομένως, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ένα κοινό μηχανισμό δράσης των κλασμάτων της Μαστίχας Χίου και των στεροειδών ορμονών, όσο αφορά την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας των υποδοχέων στεροειδών ορμονών και τη ρύθμιση των πρωτεϊνικών τους επιπέδων. Αυτή η δράση πιθανόν συνδέεται με την παρουσία βιοδραστικών συστατικών στα κλάσματα της Μαστίχας Χίου, που έχουν παρόμοια δομή με τις στεροειδείς ορμόνες [231].

Σε συμφωνία με τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, τα κλάσματα της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου ρυθμίζουν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK και του PPAR $\alpha$ , τα γονίδια των οποίων αποτελούν άμεσους στόχους της σηματοδότης του GR [190, 225]. Η PEPCK συμμετέχει στο μεταβολισμό της γλυκόζης καταλύοντας το πρώτο στάδιο της γλυκονεογένεσης. Η υπερέκφραση του γονιδίου της PEPCK ή αυξημένη δραστηριότητα της PEPCK μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και ανάπτυξη διαβήτη [235]. Στην παρούσα μελέτη, το μη πολικό και ημι-πολικό κλάσμα της ρητίνης, στα οποία έχουν ταυτοποιηθεί τριτερπένια, μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK. Η παρατηρούμενη καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από το ημι-πολικό κλάσμα συνοδεύεται από μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK [231]. Έχει προταθεί σε προηγούμενη μελέτη ότι τα μαστιχαδιενονικά και ισομαστιχαδιενονικά οξέα εμπλέκονται στη σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών, μέσω αναστολής του ενζύμου 11 $\beta$ -HSD1, το οποίο μετατρέπει την ανενεργή κορτιζόνη σε κορτιζόλη, ασκώντας υπογλυκαιμική δράση [76]. Η μείωση των πρωτεϊνικών

επιπέδων της PECK και της δραστηριότητας του GR από τα κλάσματα της ρητίνης πιθανόν συμβαίνει παράλληλα με την αναστολή του 11β-HSD1. Ταυτόχρονα, η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR από το μη πολικό κλάσμα της ρητίνης συνοδεύεται και από μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCCK [231]. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η καθημερινή λήψη Μαστίχας Χίου μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης και την αντίσταση στην ινσουλίνη σε υγιείς εθελοντές και ποντίκια με σακχαρώδη διαβήτη [70, 71, 73]. Τα αποτελέσματά μας έρχονται σε συμφωνία με τις προηγούμενες μελέτες σχετικά με τις αντι-υπεργλυκαιμικές και αντι-διαβητικές δράσεις της Μαστίχας Χίου. Παράλληλα, ρίχνουν φως στην αποσαφήνιση του βιοχημικού μηχανισμού μέσω του οποίου ασκείται η παρατηρούμενη αντι-υπεργλυκαιμική δράση, υποδεικνύοντας την εμπλοκή της Μαστίχας Χίου και συγκεκριμένα των τριτερπενίων στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR και των πρωτεϊνικών του επιπέδων [231].

Ένα ακόμη γονίδιο στόχος της σηματοδότησης του GR είναι αυτό που κωδικοποιεί για τον PPARα, που αποτελεί μόριο ρυθμιστή του μεταβολισμού των λιπιδίων [244]. Ο PPARα, πιο συγκεκριμένα, οδηγεί στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για ρυθμιστικά ένζυμα που συμμετέχουν στην είσοδο λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια καθώς και τη β-οξειδωση λιπαρών οξέων, έχοντας ως αποτέλεσμα την παραγωγή ATP. Η παρατεταμένη χορήγηση αγωνιστών του PPARα σε ποντικούς μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν σε βιοσυνθετικά μονοπάτια λιπαρών οξέων [187]. Επιπλέον, η υπερέκφραση του γονιδίου του PPARα στον καρδιακό μυ ποντικών με σακχαρώδη διαβήτη συσχετίστηκε με καρδιακή δυσλειτουργία [244]. Παράλληλα, έχουν αναδειχθεί και αντι-υπερλιπιδαιμικές δράσεις της Μαστίχας Χίου. Σε υγιείς εθελοντές που λάμβαναν Μαστίχα Χίου, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης, LDL, τριγλυκεριδίων, απολιποπρωτεΐνης A-1, απολιποπρωτεΐνης B και λιποπρωτεΐνης a [69-71]. Στην παρούσα μελέτη, το μη πολικό και πολικό κλάσμα τα οποία μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR μείωσαν επίσης και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα. Αντίθετα, το ημι-πολικό κλάσμα που δεν προκάλεσε μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR. Αυτό υποδηλώνει ότι η ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα διαμεσολαβείται, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω ρύθμισης των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR. Ο PPARα αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων. Σε συνθήκες έλλειψης ενέργειας επάγει τόσο την πρόσληψη λιπαρών οξέων από το ήπαρ όσο και την ακόλουθη οξειδωσή τους, ενώ σε συνθήκες παρατεταμένης έλλειψης ενέργειας οδηγεί στην παραγωγή κετονοσωμάτων, με σκοπό την τροφοδότηση με ενέργεια των περιφερειακών ιστών. Αντίθετα, σε συνθήκες αυξημένης πρόσληψης ενέργειας, όπως μετά το γεύμα, οδηγεί σε de novo σύνθεση λιπαρών οξέων [245, 246]. Η παρατηρούμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCCK και του PPARα, μορίων στόχων του GR, επιβεβαιώνει προηγούμενες μελέτες που ανέδειξαν τις αντι-υπεργλυκαιμικές δράσεις της Μαστίχας Χίου, καθώς και τις ρυθμιστικές της επιδράσεις στο μεταβολισμό των λιπιδίων, επιβεβαιώνοντας την εμπλοκή των συστατικών της Μαστίχας στη σηματοδότηση του GR. Επομένως, η καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR καθώς και τα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCCK από τη Μαστίχα Χίου, υποδεικνύουν ότι πιθανόν να οφείλονται στην παρουσία των τριτερπενίων που ταυτοποιήθηκαν στο μη πολικό και ημι-πολικό κλάσμα. Αντίθετα, η αντι-υπερλιπιδαιμική δράση που παρουσιάζουν το μη πολικό και πολικό κλάσμα είναι αποτέλεσμα τόσο των τριτερπενίων όσο και των φαινολικών

συστατικών [231] και αναδεικνύουν μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση αξιοποίησης των ιδιοτήτων της Μαστίχας Χίου σε μεταγευματικές περιόδους, που χρήζει περαιτέρω διερεύνηση.

Παράλληλα, στην παρούσα μελέτη δείχθηκε ότι το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα της Μαστίχας Χίου προκάλεσαν αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της φωσφορυλιωμένης AMPKα, ενώ τα πρωτεϊνικά επίπεδα της AMPK παρέμειναν αμετάβλητα [231]. Η AMPK αποτελεί αισθητήρα των ενεργειακών επιπέδων του κυττάρου, ρυθμίζοντας την παραγωγή ATP. Πιο συγκεκριμένα, όταν η AMPK φωσφορυλιώνεται ενεργοποιείται και επάγει καταβολικά μονοπάτια που οδηγούν σε παραγωγή ATP, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει τις αναβολικές διαδικασίες [180, 181]. Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή, όπως η δεξαμεθαζόνη και η κορτιζόνη, έχει δείχθει ότι επάγουν την ενεργοποίηση της AMPK σε κύτταρα HepG2 και σε ήπαρ αρουραίου [247]. Τα αποτελέσματά μας στην παρούσα έρευνα επιβεβαίωσαν την επαγόμενη από τη DEX φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της AMPK στην ανθρώπινη νεφρική κυτταρική HEK293 και ταυτόχρονα ανέδειξαν την ενεργοποίηση της AMPK από το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα της Μαστίχας Χίου. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τόσο το ήπαρ όσο και οι νεφροί αποτελούν γλυκονογενετικούς ιστούς, η Μαστίχα Χίου πιθανόν εμπλέκεται στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης [231]. Έχει επίσης προταθεί ότι η φωσφορυλιωμένη και ενεργοποιημένη AMPK επάγει τη φωσφορυλίωση του GR με έμμεσο τρόπο, έχοντας ως αποτέλεσμα τη ρύθμιση της μεταγραφικής του δραστηριότητας [185]. Επομένως, η προκαλούμενη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της AMPK από τα κλάσματα της Μαστίχας Χίου, μπορεί τουλάχιστον εν μέρει να είναι υπεύθυνη για την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR και την ακόλουθη μείωση των πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK. Επίσης, η ενεργοποίηση της AMPK και τα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK που προκαλούνται κυρίως από το ημι-πολικό κλάσμα της ρητίνης, αποτελεί ένδειξη ότι τα τριτερπένια επάγουν καταβολικά μονοπάτια με σκοπό την αύξηση της παραγωγής ATP, αναστέλλοντας παράλληλα αναβολικές διαδικασίες [231].

Το ημι-πολικό κλάσμα της ρητίνης προκάλεσε επίσης τη μεγαλύτερη καταστολή της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB, με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση, ενώ παράλληλα μείωσε και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κB. Η παρατηρούμενη αντι-φλεγμονώδης δράση πιθανόν οφείλεται στην παρουσία στο ημι-πολικό κλάσμα των τριτερπενίων λουπεόλη, μεθυλεστέρας του 24Z-μαστιχαδιενονικού οξέος και μεθυλεστέρας του 24Z-ισομαστιχαδιενονικού οξέος [231]. Μέσα από *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν αναδειχθεί οι αντι-φλεγμονώδεις δράσεις της λουπεόλης. Ειδικότερα, η λουπεόλη έχει παρατηρηθεί να μειώνει τα επίπεδα διαφόρων προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως των ιντερλευκινών IL-4, IL-5 και IL-13, καθώς και του TNFα. Μάλιστα, μελέτες έχουν αναφέρει ότι η αντι-φλεγμονώδης δράση της λουπεόλης είναι ανάλογη των επιπέδων της αντι-φλεγμονώδους δράσης που ασκεί η δεξαμεθαζόνη [240]. Ακόμη, το luteol έχει δείχθει ότι παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση και πρωτεόλυση του αναστολέα του NF-κB, IκBα, σε ανθρώπινα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, παρεμποδίζοντας την είσοδο του NF-κB στον πυρήνα και την επαγωγή της έκφρασης προ-φλεγμονωδών γονιδίων [239]. Επομένως, η ισχυρή αντι-φλεγμονώδης δράση του ημι-πολικού κλάσματος της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, μέσω της ρύθμισης της σηματοδότησης του NF-κB, φανερώνει επίσης την αντι-φλεγμονώδη δράση που ασκούν τα

κυρίαρχα τριτερπένια λουπεόλη, μεθυλεστέρας του 24Z-μαστιχαδιενονικού οξέος και μεθυλεστέρας του 24Z-ισομαστιχαδιενονικού οξέος [231].

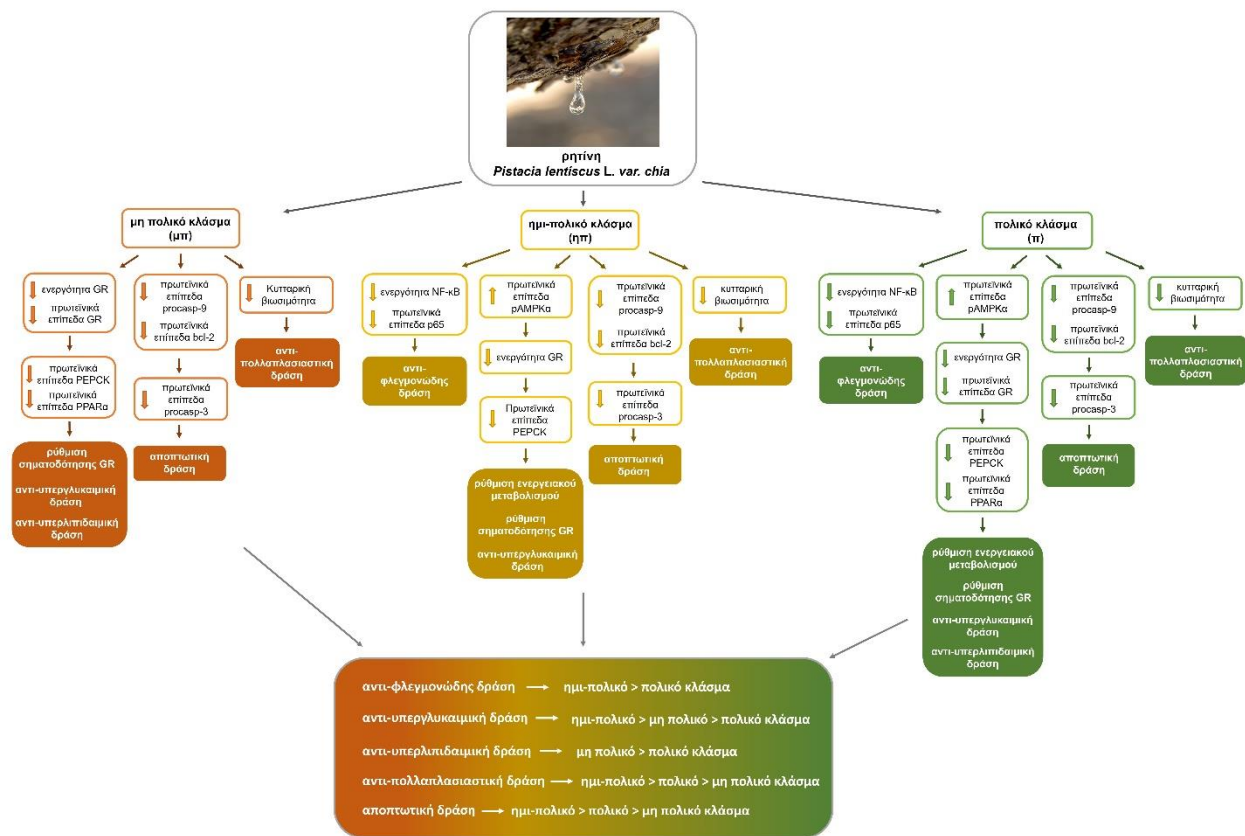
Μείωση της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB προκλήθηκε επίσης και από το μη πολικό κλάσμα, αλλά σε μικρότερο βαθμό συγκριτικά με το ημι-πολικό, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην παρουσία του κολλώδους πολυμερούς 1,4-poly-β-myrcene ή/και στην διαφορετική σύσταση τριτερπενίων [231]. Προηγούμενες μελέτες είχαν αναδείξει τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις ολόκληρου του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου. Ειδικότερα, σε αρουραίους με γαστρική φλεγμονή, η χορήγηση Μαστίχας Χίου μείωσε τα επίπεδα του TNFα στον ορό [58]. Ακόμη, σε ενεργοποιημένα από τον TNFα ανθρώπινα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα, το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου ανέστειλε τη φωσφορυλίωση της υπομονάδας p65 του NF-κB, ασκώντας αντι-φλεγμονώδη δράση [59]. Επίσης, έχει προταθεί ότι η φωσφορυλιωμένη και ενεργοποιημένη AMPK αναστέλλει τη σηματοδότηση του STAT-1 και του NF-κB [248, 249]. Επομένως, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όσο αφορά τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της Μαστίχας Χίου επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες. Ωστόσο, για πρώτη φορά, αναδεικνύεται ότι τα βιοδραστικά συστατικά για τις παραπάνω δράσεις είναι τα τριτερπένια που κυριαρχούν στο ημι-πολικό κλάσμα, τα οποία ασκούν τις δράσεις τους μέσω εμπλοκής τους στη σηματοδότηση του GR και της AMPK [231].

Παράλληλα, τα αυξανόμενης πολικότητας κλάσματα της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* στην παρούσα μελέτη ανέστειλαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων HEK293, με τρόπο που εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση όσο και από το χρόνο, με το ημι-πολικό κλάσμα να προκαλεί τη μεγαλύτερη μείωση, ενώ το μη πολικό τη μικρότερη. Ακόμη, καταγράφηκε επαγωγή της απόπτωση μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού, από τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3, προκασπάσης-9 και bcl-2 παρουσία των κλασμάτων της ρητίνης, επίσης με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9 υποδεικνύει την επαγωγή απόπτωσης μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού [231]. Προηγούμενες μελέτες είχαν επίσης αναφέρει αντι-πολλαπλασιαστικές και αποπτωτικές δράσεις της Μαστίχας Χίου. Πιο συγκεκριμένα, στα ανθρώπινα κύτταρα του παχέος εντέρου HCT116, η Μαστίχα Χίου ανέστειλε την κυτταρική βιωσιμότητα, με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση [80]. Ακόμη, στην ίδια κυτταρική σειρά, η Μαστίχα Χίου αύξησε την ενεργότητα των κασπασών-3, -8 και -9, οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση [84]. Επιπλέον, στα ανθρώπινα παγκρεατικά κύτταρα BxPC-3 και COLO357, παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προ-αποπτωτικής bax και μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της αντι-αποπτωτικής bcl-2, παρουσία της Μαστίχας Χίου [89].

Το ημι-πολικό κλάσμα στην παρούσα μελέτη καταγράφηκε να είναι το πιο δραστικό όσο αφορά την επαγωγή της απόπτωσης στα κύτταρα HEK293 [231]. Το γεγονός αυτό ίσως οφείλεται στην παρουσία του τριτερπενίου λουπεόλη, το οποίο από προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί ότι μειώνει την έκφραση κυκλινών και κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs), σταματώντας των κυτταρικό κύκλο και αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [239, 240]. Ακόμη, έχει προταθεί ότι το luteol επάγει την μιτοχονδριακά-εξαρτώμενη απόπτωση, μέσω αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της προ-αποπτωτικής bax και μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της

αντι-αποπτωτικής bcl-2 [239]. Επίσης, το τριτερπένιο μαστιχαδιενονικό οξύ που εντοπίστηκε σε αφθονία στο ημι-πολικό κλάσμα της ρητίνης, είχε δειχθεί ότι αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και προκαλεί απόπτωση σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη [250]. Τα κλάσματα των φύλλων του Μαστιχόδεντρου Χίου επίσης επάγουν τη μιτοχονδριακά-εξαρτώμενη απόπτωση στα κύτταρα HEK293, μέσω μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3, προκασπάσης-9 και bcl-2, επιβεβαιώνοντας τα παραπάνω ευρήματα [224]. Επομένως, βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων για πρώτη φορά αναδεικνύεται ότι τα διαφορετικής πολικότητας κλάσματα της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου επάγουν την απόπτωση μέσω διαμεσολάβησης του μιτοχονδριακού μονοπατιού [231].

Συνοψίζοντας (Εικόνα 46), τα τρία αυξανόμενης πολικότητας κλάσματα της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* (Μαστίχας Χίου) ανέστειλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων HEK293, με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση και το χρόνο, ενώ προκάλεσαν επαγωγή της μιτοχονδριακά-εξαρτώμενης απόπτωσης. Ακόμη, το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα της ρητίνης εμφάνισαν αντι-υπεργλυκαιμική και αντιφλεγμονώδη δράση. Πιο συγκεκριμένα, τα παραπάνω κλάσματα κατέστειλαν τη μεταγραφική δραστηριότητα τόσο του GR όσο και του NF-κΒ, με επακόλουθη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK και της p65 υπομονάδας του NF-κΒ. Οι παραπάνω δράσεις πιθανόν οφείλονται στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της AMPK που προκαλούν το ημι-πολικό και πολικό κλάσμα, επάγοντας έπειτα τη ρύθμιση της σηματοδότησης του GR, είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο. Τα τριτερπένια λουπεόλη, μεθυλεστέρας του 24Z-μαστιχαδιενονικού οξέος και μεθυλεστέρας του 24Z-ισομαστιχαδιενονικού οξέος που ανιχνεύτηκαν στο ημι-πολικό κλάσμα και έχουν παρόμοια δομή με τα γλυκοκορτικοειδή φαίνεται ότι είναι τα βιοδραστικά συστατικά που είναι υπεύθυνα για την εμπλοκή των κλασμάτων της ρητίνης στη σηματοδότηση του GR και την επακόλουθη αντι-υπεργλυκαιμική και αντι-φλεγμονώδη δράση. Ακόμη, η καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από το πολικό κλάσμα της ρητίνης πιθανόν οφείλεται στη μείωση που προκαλεί στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR. Η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR από το πολικό κλάσμα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK και του PPARα, ασκώντας αντι-υπεργλυκαιμική και ρυθμιστική δράση στο μεταβολισμό των λιπιδίων, αντίστοιχα. Το μη πολικό κλάσμα της ρητίνης στην παρούσα μελέτη ήταν το λιγότερο δραστικό όσο αφορά τη μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR και του NF-κΒ, πιθανόν λόγω της παρουσίας του κολλώδους πολυμερούς 1,4-poly-β-μυρσενίου, το οποίο συγκρατεί τα βιοδραστικά συστατικά της Μαστίχας Χίου, περιορίζοντας τις βιολογικές τους δράσεις ή/και λόγω διαφορετικής σύστασης τριτερπενοειδών συστατικών. Στο σύνολό τους τα αποτελέσματα της ενότητας αυτής υποδεικνύουν ότι τα τριτερπένια λουπεόλη, μεθυλεστέρας του 24Z-μαστιχαδιενονικού οξέος και μεθυλεστέρας του 24Z-ισομαστιχαδιενονικού οξέος αποτελούν τα βιοδραστικά συστατικά της Μαστίχας Χίου, που είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της σηματοδότησης του GR, του NF-κΒ και της AMPK. Αποτέλεσμα αυτών είναι η ανάδειξη των αντι-υπεργλυκαιμικών και αντι-φλεγμονωδών δράσεων της Μαστίχας Χίου, καθώς και των ρυθμιστικών τους επιδράσεων στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, με πιθανές εφαρμογές στον τομέα της φαρμακευτικής, της βιομηχανίας τροφίμων και της κοσμετολογίας [231].



**Εικόνα 46:** Οι βιολογικές δράσεις και οι βιοχημικοί μηχανισμοί των κλασμάτων της ρητίνης του *Pistacia lentiscus L. var. chia*. μπ: μη πολικό κλάσμα, ηπ: ημι-πολικό κλάσμα, π: πολικό κλάσμα [231].

### 4.3. Συμπεράσματα βιολογικών δράσεων των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος από τη ρητίνη του *Pistacia lentiscus L. var. chia*

Στην τρίτη και τελευταία ενότητα της παρούσας διδακτορικής διατριβής εξετάστηκαν οι αντι-παραπλασμαστικές, αντι-φλεγμονώδεις και αποπτωτικές δράσεις του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης του *Pistacia lentiscus L. var. chia*. Λόγω του εμπλουτισμού της ρητίνης με τριτερπένια [231], και των δομικών ομοιοτήτων τους με τις στεροειδείς ορμόνες [204], εξετάστηκε επίσης η πιθανή ρύθμιση της σηματοδότησης των γλυκοκορτικοειδών από το ουδέτερο κλάσμα της ρητίνης. Μετά την απομόνωση του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω κλασμάτωση αυτού από την οποία προέκυψαν 5 αρχικά κλάσματα (K1-K5). Με εξαίρεση το κλάσμα 1 (K1), τα υπόλοιπα κλάσματα κλασματώθηκαν περαιτέρω δίνοντας τα υποκλάσματα 2A (YK2A), 2B (YK2B), 3A (YK3A), 3B (YK3B), 3Γ (YK3Γ), 4A (YK4A) και 5A (YK5A) (Εικόνα 14).

Η φυτοχημική ανάλυση των παραπάνω υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης ταυτοποίησε τα κυρίαρχα τριτερπένια, και συγκεκριμένα, τα keto-ολεανολική αλδεΰδη, β-αμυρίνη και λουπεόλη (Kalousi FD et al, υπό συγγραφή). Τόσο δικές μας μελέτες όσο και άλλων ερευνητών είχαν επίσης ταυτοποιήσει τα παραπάνω τριτερπένια στο ουδέτερο, μη πολικό και ημι-πολικό κλάσμα της ρητίνης του *Pistacia lentiscus L. var. chia* [4, 8, 231]. Όπως προαναφέρθηκε, λόγω της ομοιότητας των τριτερπενίων με τη δομή των γλυκοκορτικοειδών

αρχικά διερευνήθηκε η πιθανή εμπλοκή των υποκλασμάτων στη σηματοδότηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τόσο το κλάσμα 1 (K1), όσο και τα υποκλάσματα 2B (YK2B), 3B (YK3B) και 5A (YK5A), προκάλεσαν στατιστικά σημαντική καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR. Η παρουσία των τριτερπενίων που ανέδειξε η φυτοχημική ανάλυση επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της ενότητας 3.2.1, υποδεικνύοντας ότι η παρουσία των τριτερπενίων σχετίζεται με την παρατηρούμενη καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, παρουσία των υποκλασμάτων. Ωστόσο, η καταστολή της επαγόμενης από τη DEX μεταγραφικής δραστηριότητας του GR δε συνοδεύτηκε και από μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα ούτε της PEPCK (Kalouisi F.D. et al, υπό συγγραφή), που αποτελεί άμεσο γονίδιο στόχο της σηματοδότησής του [225]. Αντίθετα, η προηγούμενη μελέτη των βιολογικών δράσεων του ημι-πολικού και πολικού κλάσματος της ρητίνης του Μαστιχόδεντρου Χίου ανέδειξε την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, και τη συνοδευόμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του, καθώς και της PEPCK. Οι δράσεις αυτές συσχετίστηκαν με την παρουσία των τριτερπενίων ολεανολικής αλδεΐδης, λουπεόλης, μεθυλεστέρα του 24Z-μαστιχαδιενονικού οξέος και μεθυλεστέρα του 24Z-ισομαστιχαδιενονικού οξέος στο ημι-πολικό κλάσμα της ρητίνης [231]. Τα τριτερπένια μαστιχαδιενονικό και ισομαστιχαδιενονικό οξύ επίσης είχε δειχθεί ότι αναστέλλουν την 11β-υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση 1, το ένζυμο δηλαδή που μετατρέπει την ανενεργή κορτιζόνη σε ενεργή κορτιζόλη, γεγονός που φανερώνει την εμπλοκή τους στη σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών [76]. Επομένως, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η παρουσία του μεθυλεστέρα του 24Z-μαστιχαδιενονικού οξέος, του μεθυλεστέρα του 24Z-ισομαστιχαδιενονικού οξέος ή/και άλλων μη ταυτοποιηθέντων τριτερπενίων στο ημι-πολικό κλάσμα της ρητίνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, και η απουσία τους από το ουδέτερο κλάσμα ελαχιστοποιεί την καταστολή σε αυτή την περίπτωση (Kalouisi FD, υπό συγγραφή).

Ακόμη στην παρούσα μελέτη, τα υποκλάσματα του ουδέτερου κλάσματος στην παρούσα μελέτη μείωσαν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα, εκτός από τα YK3B και YK4A (Kalouisi F.D. et al, υπό συγγραφή). Ο PPARα ρυθμίζει τον μεταβολισμό των λιπιδίων και αποτελεί επίσης στόχο της σηματοδότησης του GR, όπως προαναφέρθηκε [190]. Σε κατάσταση έλλειψης ενέργειας επάγει τον καταβολισμό των λιπαρών οξέων, ενώ σε συνθήκες πρόσληψης θρεπτικών οδηγεί σε λιπογένεση [245, 246]. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν προηγούμενες μελέτες που έχουν αναδείξει τις αντι-υπερλιπιδαιμικές δράσεις της Μαστίχας Χίου [69, 71, 231]. Συγκεκριμένα, η μελέτη των βιολογικών δράσεων του μη πολικού και πολικού κλάσματος της ρητίνης έδειξε ότι αυτά επίσης μειώνουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα, υποδεικνύοντας ότι αυτή η μείωση πιθανόν διαμεσολαβείται από την παρουσία τριτερπενίων και φαινολικών συστατικών [231]. Επομένως, και σε αυτή την περίπτωση η παρουσία των τριτερπενίων keto-ολεανολικής αλδεΐδης, β-αμυρίνης και λουπεόλης στα υποκλάσματα του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης ίσως είναι υπεύθυνη για την παρατηρούμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα και της επακόλουθης ρυθμιστικής τους δράσης στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων (Kalouisi F.D. et al, υπό συγγραφή).

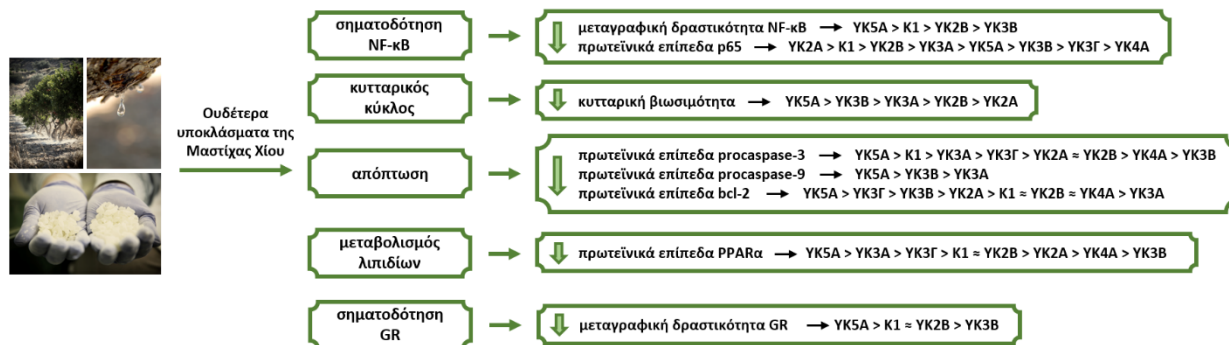
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας στην παρούσα ενότητα ανέδειξαν επίσης τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης. Ειδικότερα, τα υποκλάσματα του ουδέτερου κλάσματος οδήγησαν σε δοσο-εξαρτώμενη μείωση της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB, με εξαίρεση το υποκλάσμα 2A, το οποίο δεν προκάλεσε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή (Kalousi F.D. et al, υπό συγγραφή). Προηγούμενες μελέτες είχαν επίσης δείξει ότι το ουδέτερο κλάσμα της Μαστίχας Χίου ρυθμίζει τη σηματοδότηση του NF-κB μέσω αναστολής της φωσφορυλίωσης της υπομονάδας p65 [59]. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας επιβεβαιώνουν την αντιφλεγμονώδη δράση του ουδέτερου κλάσματος, η οποία επιτελείται μέσω καταστολής της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, στην παρούσα μελέτη αποδεικνύεται ότι, η καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB συνοδεύεται επίσης και από μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της υπομονάδας p65 από τα υποκλάσματα του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης, ρίχνοντας περισσότερο φως στον βιοχημικό μηχανισμό με τον οποίο επιτελείται η αντιφλεγμονώδης δράση. Μεταξύ όλων των υποκλασμάτων, το υποκλάσμα 5A (YK5A) είχε τη μεγαλύτερη δράση όσο αφορά την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB (Kalousi F.D. et al, υπό συγγραφή). Το τριτερπένιο λουπεόλη που εντοπίστηκε στα υποκλάσματα 3B, 3Γ και 5A, από την φυτοχημική ανάλυση στην παρούσα μελέτη, έχει προταθεί ότι διαθέτει ισχυρή αντι-φλεγμονώδη δράση, καθώς μειώνει τα επίπεδα της προσταγλαδίνης E2, του TNFα, καθώς και πολλών ιντερλευκινών [240]. Προηγούμενη έρευνα είχε επίσης φέρει στο φως ότι το luteol καταστέλλει τη φωσφορυλίωση και αποικοδόμηση του αναστολέα του NF-κB, IκBα, παρεμποδίζοντας την απελευθέρωση και μετακίνηση του NF-κB στον πυρήνα του κυττάρου [251]. Παράλληλα, η β-αμυρίνη που εντοπίστηκε σε αφθονία στα υποκλάσματα 2B και 5A, έχει βρεθεί ότι μειώνει τα επίπεδα του TNFα [252, 253] και παρεμποδίζει την πυρηνική μετακίνηση του NF-κB [254]. Μελέτες άλλων ερευνητικών ομάδων υποστηρίζουν την άποψη ότι τα τριτερπένια λουπεόλη και β-αμυρίνη είναι τα βιοδραστικά συστατικά που είναι υπεύθυνα για την αντι-φλεγμονώδη δράση της Μαστίχας Χίου, μέσω εμπλοκής στη σηματοδότηση του NF-κB, ελέγχοντας τόσο τα επίπεδα και τη δραστηριότητα του παράγοντα φλεγμονής όσο και των ενεργοποιητών και απενεργοποιητών αυτού [239]. Ακόμη, από την παρούσα μελέτη φάνηκε ότι η συνύπαρξη της λουπεόλης και της β-αμυρίνης στο ουδέτερο κλάσμα της ρητίνης έχει συνεργιστική επίδραση όσο αφορά την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB (Kalousi F.D. et al, υπό συγγραφή).

Τέλος, τα υποκλάσματα 2A (YK2A), 2B (YK2B), 3A (YK3A), 3B (YK3B) και 5A (YK5A) του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης στην παρούσα ενότητα προκάλεσαν μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων HEK293, με το υποκλάσμα 5A να είναι το περισσότερο κυτταροτοξικό. Επίσης, το υποκλάσμα 5A προκάλεσε και τη μεγαλύτερη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3, προκασπάσης-9 και bcl-2, όντας παράλληλα το περισσότερο αποπτωτικό. Η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9, υποδεικνύει ότι η παρατηρούμενη αποπτωτική δράση του υποκλάσματος 5A, διαμεσολαβείται από το μιτοχονδριακό μονοπάτι (Kalousi FD et al, υπό συγγραφή). Το τριτερπένιο λουπεόλη που έχει εντοπιστεί άφθονο στα υποκλάσματα έχει δειχθεί από προηγούμενες μελέτες ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων κυττάρων καρκίνου του προστάτη καθώς και την ανάπτυξη ανθρώπινου



μελανώματος, παρουσιάζοντας ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες [240]. Ακόμη, η λουπεόλη ενεργοποιεί το μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης σε πολλά καρκινικά κύτταρα [239]. Επίσης, στο παρελθόν έχει αναφερθεί και η αποπτωτική και αντι-πολλαπλασιαστική δράση της β-αμυρίνης, καθώς έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, προκαλεί κυτταροτοξικότητα και επάγει απόπτωση σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος HepG2, λευχαιμικά HL-60, καρκίνου παχέος εντέρου CaCo-2 και ανθρώπινα εμβρυϊκά HEK293 [255-257]. Στην παρούσα μελέτη αναδεικνύεται ότι, το υποκλάσμα 2B που διαθέτει μόνο β-αμυρίνη μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HEK293, αλλά σε μικρότερο βαθμό απ' ό,τι το υποκλάσμα 5A, στο οποίο έχουν εντοπιστεί τόσο η β-αμυρίνη όσο και η λουπεόλη, υποδηλώνοντας για πρώτη φορά μια συνεργιστική επίδραση των δύο τριτερπενίων όσο αφορά τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την επαγωγή της απόπτωσης (Kalousi F.D. et al., υπό συγγραφή).

Συνοψίζοντας (Εικόνα 47), τα υποκλάσματα που προήλθαν από το ουδέτερο κλάσμα της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, κατέστειλαν την επαγόμενη από τον TNFα μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κΒ και παράλληλα μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κΒ. Ακόμη, τα υποκλάσματα του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3 και bcl-2, ενώ ορισμένα μείωσαν και τη βιωσιμότητα των κυττάρων HEK293 (YK2A, YK2B, YK3A, YK3B και YK5A). Ακόμη, όλα τα υπό μελέτη υποκλάσματα του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης, εκτός από τα YK3B και YK4A, μείωσαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα, αναδεικνύοντας την εμπλοκή τους στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων. Η παρατηρούμενη αντιφλεγμονώδης, αποπτωτική και πιθανή αντι-υπερλιπιδαιμική δράση πιθανόν οφείλεται στα τριτερπένια λουπεόλη και β-αμυρίνη που εντοπίστηκαν σε αυτά από την φυτοχημική ανάλυση. Το υποκλάσμα 5A εμφάνισε την ισχυρότερη αντιφλεγμονώδη, αποπτωτική και αντι-υπερλιπιδαιμική δράση, υποδεικνύοντας ότι η κοινή παρουσία των παραπάνω τριτερπενίων σε αυτό έχει συνεργιστική δράση. Ωστόσο, η καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR και η επακόλουθη αντι-υπεργλυκαιμική δράση που προκλήθηκε από τα ημιπολικά και πολικά κλάσματα της ρητίνης και των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* [224, 231], δεν παρατηρήθηκε και παρουσία των υποκλασμάτων που προήλθαν από το ουδέτερο κλάσμα της ρητίνης. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην παρουσία κι άλλων τριτερπενίων που απουσιάζουν από τα υποκλάσματα του ουδέτερου κλάσματος, όπως για παράδειγμα του μεθυλεστέρα του 24Z-μαστιχαδιενονικού οξέος και του μεθυλεστέρα του 24Z-ισομαστιχαδιενονικού οξέος, τα οποία συνεισφέρουν στην καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR. Επομένως, γίνεται σαφές ότι η συνύπαρξη πολλών τριτερπενίων ή/και άλλων συστατικών μεγιστοποιεί τις βιολογικές δράσεις της Μαστίχας Χίου, και αποτελεί προϋπόθεση για την καταστολή της trans-ενεργοποίησης του GR και την επακόλουθη αντι-υπεργλυκαιμική δράση. Τα παραπάνω αποτελέσματα θέτουν τις βάσεις για την ανάδειξη των αντι-φλεγμονωδών, αντι-πολλαπλασιαστικών, αποπτωτικών και αντι-υπερλιπιδαιμικών δράσεων της Μαστίχας Χίου, καθώς και για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων (Kalousi F.D. et al, υπό συγγραφή).



**Εικόνα 47:** Οι βιολογικές δράσεις των υποκλασμάτων του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης του *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*. (Kalousi F.D. et al., υπό συγγραφή)

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Paraschos, S.; Mitakou, S.; Skaltsounis, A. L., Chios gum mastic: A review of its biological activities. *Current medicinal chemistry* **2012**, 19, (14), 2292-302. 10.2174/092986712800229014
2. Pachi, V. K.; Mikropoulou, E. V.; Gkiouvetidis, P.; Siafakas, K.; Argyropoulou, A.; Angelis, A.; Mitakou, S.; Halabalaki, M., Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Chios mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*, Anacardiaceae): A review. *Journal of ethnopharmacology* **2020**, 254, 112485. 10.1016/j.jep.2019.112485
3. Gioxari, A.; Kaliora, A. C.; Papalois, A.; Agrogiannis, G.; Triantafillidis, J. K.; Andrikopoulos, N. K., *Pistacia lentiscus* resin regulates intestinal damage and inflammation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Journal of medicinal food* **2011**, 14, (11), 1403-11. 10.1089/jmf.2010.0240
4. Assimopoulou, A. N.; Papageorgiou, V. P., GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. *Chia*. *Biomedical chromatography : BMC* **2005**, 19, (4), 285-311. 10.1002/bmc.454
5. 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. *Journal of medicinal food* **2015**, 18, (1), 1-10. 10.1089/jmf.2014.0021
6. Papageorgiou V.P. , B.-C. N. M., Apazidou K.K., Psarros E.E., Gas chromatographic–mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *Journal of Chromatography A* **1997**, 769, (2), 263-273. 10.1016/S0021-9673(96)01032-1
7. Brieudef, V.; Mikropoulou, E. V.; Kallergis, E.; Kaliora, A. C.; Papada, E.; Gkiouvetidis, P.; Angelis, A.; Halabalaki, M., Development, Validation and Application of a UHPLC-MS Method for the Quantification of Chios Mastic Gum Triterpenoids in Human Plasma. *Planta medica* **2021**, 87, (12-13), 1101-1109. 10.1055/a-1408-9338
8. Paraschos, S.; Magiatis, P.; Mitakou, S.; Petraki, K.; Kalliaropoulos, A.; Maragkoudakis, P.; Mentis, A.; Sgouras, D.; Skaltsounis, A. L., In vitro and in vivo activities of Chios mastic gum extracts and constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2007**, 51, (2), 551-9. 10.1128/AAC.00642-06
9. Xynos, N.; Termentzi, A.; Fokialakis, N.; Skaltsounis, L. A.; Aligiannis, N., Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of mastic gum and chemical characterization of bioactive fractions using LC-HRMS/MS and GC-MS. *The Journal of Supercritical Fluids* **2018**, 133, 349-356. 10.1016/j.supflu.2017.10.011
10. Kaliora, A. C.; Mylona, A.; Chiou, A.; Petsios, D. G.; Andrikopoulos, N. K., Detection and Identification of Simple Phenolics in *Pistacia lentiscus* Resin. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2007**, 27, (2), 289-300. 10.1081/jlc-120027100
11. Kottakis, F.; Lamari, F.; Matragkou, C.; Zachariadis, G.; Karamanos, N.; Choli-Papadopoulou, T., Arabino-galactan proteins from *Pistacia lentiscus* var. *chia*: isolation, characterization and biological function. *Amino acids* **2008**, 34, (3), 413-20. 10.1007/s00726-007-0554-8

12. Xanthis, V.; Fitsiou, E.; Voulgaridou, G. P.; Bogadakis, A.; Chlichlia, K.; Galanis, A.; Pappa, A., Antioxidant and Cytoprotective Potential of the Essential Oil Pistacia lentiscus var. chia and Its Major Components Myrcene and alpha-Pinene. *Antioxidants* **2021**, *10*, (1). 10.3390/antiox10010127
13. Papanicolaou D., M. M., Katsaboxakis K., Changes in chemical composition of the essential oil of Chios "mastic resin" from Pistacia lentiscus var. Chia tree during solidification and storage. *Developments in Food Science* **1995**, *37*, 303-310. 10.1016/S0167-4501(06)80163-9
14. Daferera D., P. C., Tarantilis P.A., Polissiou M., Quantitative analysis of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -myrcene in mastic gum oil using FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry* **2002**, *77*, (4), 511–515. 10.1016/S0308-8146(01)00382-X
15. Koutsoudaki, C.; Krsek, M.; Rodger, A., Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of Pistacia lentiscus Var. chia. *Journal of agricultural and food chemistry* **2005**, *53*, (20), 7681-5. 10.1021/jf050639s
16. Magiatis, P.; Melliou, E.; Skaltsounis, A. L.; Chinou, I. B.; Mitaku, S., Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Pistacia lentiscus var. chia. *Planta medica* **1999**, *65*, (8), 749-52. 10.1055/s-2006-960856
17. 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., Dietary mastic oil extracted from Pistacia lentiscus var. chia suppresses tumor growth in experimental colon cancer models. *Scientific reports* **2017**, *7*, (1), 3782. 10.1038/s41598-017-03971-8
18. Bampouli, A.; Kyriakopoulou, K.; Papaefstathiou, G.; Louli, V.; Krokida, M.; Magoulas, K., Comparison of different extraction methods of Pistacia lentiscus var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **2014**, *1*, (3), 81-91. 10.1016/j.jarmap.2014.07.001
19. Kivcak, 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**, *76*, (1), 62-6. 10.1016/j.fitote.2004.09.021
20. Bampouli, A.; Kyriakopoulou, K.; Papaefstathiou, G.; Louli, V.; Aligiannis, N.; Magoulas, K.; Krokida, M., Evaluation of total antioxidant potential of Pistacia lentiscus var. chia leaves extracts using UHPLC–HRMS. *Journal of Food Engineering* **2015**, *167*, 25-31. 10.1016/j.jfoodeng.2014.10.021
21. Detti, C.; Dos Santos Nascimento, L. B.; Brunetti, C.; Ferrini, F.; Gori, A., Optimization of a Green Ultrasound-Assisted Extraction of Different Polyphenols from Pistacia lentiscus L. Leaves Using a Response Surface Methodology. *Plants* **2020**, *9*, (11). 10.3390/plants9111482
22. Elez Garofulic, I.; Kruk, V.; Martic, A.; Martic, I.; Zoric, Z.; Pedisic, S.; Dragovic, S.; Dragovic-Uzelac, V., Evaluation of Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of Pistacia lentiscus L. Leaves and Fruit Extract Obtained by Optimized Microwave-Assisted Extraction. *Foods* **2020**, *9*, (11). 10.3390/foods9111556
23. Romani, A.; Pinelli, P.; Galardi, C.; Mulinacci, N.; Tattini, M., Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of Pistacia lentiscus L. *Phytochemical analysis : PCA* **2002**, *13*, (2), 79-86. 10.1002/pca.627
24. Vaya, J.; Mahmood, S., Flavonoid content in leaf extracts of the fig (Ficus carica L.), carob (Ceratonia siliqua L.) and pistachio (Pistacia lentiscus L.). *BioFactors* **2006**, *28*, (3-4), 169-75. 10.1002/biof.5520280303
25. Barra, A.; Coroneo, V.; Dessi, S.; Cabras, P.; Angioni, A., Characterization of the volatile constituents in the essential oil of Pistacia lentiscus L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry* **2007**, *55*, (17), 7093-8. 10.1021/jf071129w
26. Douissa, F. B.; Hayder, N.; Chekir-Ghedira, L.; Hammami, M.; Ghedira, K.; Mariotte, A.-M.; Dijoux-Franca, M.-G., New study of the essential oil from leaves of Pistacia lentiscus L. (Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour and Fragrance Journal* **2005**, *20*, (4), 410-414. 10.1002/ffj.1445

27. Milia, E.; Usai, M.; Szotakova, B.; Elstnerova, M.; Kralova, V.; D'Hallewin, G.; Spissu, Y.; Barberis, A.; Marchetti, M.; Bortone, A.; Campanella, V.; Mastandrea, G.; Langhansova, L.; Eick, S., The Pharmaceutical Ability of Pistacia lentiscus L. Leaves Essential Oil Against Periodontal Bacteria and Candida sp. and Its Anti-Inflammatory Potential. *Antibiotics* **2020**, *9*, (6). 10.3390/antibiotics9060281
28. Said, S. A.; Fernandez, C.; Greff, S.; Torre, F.; Derridj, A.; Gauquelin, T.; Mevy, J. P., Inter-population variability of terpenoid composition in leaves of Pistacia lentiscus L. from Algeria: a chemoeological approach. *Molecules* **2011**, *16*, (3), 2646-57. 10.3390/molecules16032646
29. Dimas, K. S.; Pantazis, P.; Ramanujam, R., Review: Chios mastic gum: a plant-produced resin exhibiting numerous diverse pharmaceutical and biomedical properties. *In vivo* **2012**, *26*, (5), 777-85.
30. Papada, E.; Kaliora, A. C., Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Mastiha: A Review of Preclinical and Clinical Studies. *Antioxidants* **2019**, *8*, (7). 10.3390/antiox8070208
31. Gortzi, O.; Rovoli, M.; Katsoulis, K.; Graikou, K.; Karagkini, D. A.; Stagos, D.; Kouretas, D.; Tsaknis, J.; Chinou, I., Study of Stability, Cytotoxic and Antimicrobial Activity of Chios Mastic Gum Fractions (Neutral, Acidic) after Encapsulation in Liposomes. *Foods* **2022**, *11*, (3). 10.3390/foods11030271
32. Gkogka, E.; Hazeleger, W. C.; Posthumus, M. A.; Beumer, R. R., The Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Pistacia lentiscus var. Chia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **2013**, *16*, (6), 714-729. 10.1080/0972060x.2013.862074
33. Fu, H. W., Helicobacter pylori neutrophil-activating protein: from molecular pathogenesis to clinical applications. *World journal of gastroenterology* **2014**, *20*, (18), 5294-301. 10.3748/wjg.v20.i18.5294
34. Kottakis, F.; Kouzi-Koliakou, K.; Pendas, S.; Kountouras, J.; Choli-Papadopoulou, T., Effects of mastic gum Pistacia lentiscus var. Chia on innate cellular immune effectors. *European journal of gastroenterology & hepatology* **2009**, *21*, (2), 143-9. 10.1097/MEG.0b013e32831c50c9
35. Dabos, K. J.; Sfika, E.; Vlatka, L. J.; Giannikopoulos, G., The effect of mastic gum on Helicobacter pylori: a randomized pilot study. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **2010**, *17*, (3-4), 296-9. 10.1016/j.phymed.2009.09.010
36. Andrikopoulos, N. K.; Kaliora, A. C.; Assimopoulou, A. N.; Papapeorgiou, V. P., Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. *Phytotherapy research : PTR* **2003**, *17*, (5), 501-7. 10.1002/ptr.1185
37. Papada, E.; Forbes, A.; Amerikanou, C.; Torovic, L.; Kalogeropoulos, N.; Tzavara, C.; Triantafyllidis, J. K.; Kaliora, A. C., 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**, *10*, (11). 10.3390/nu10111779
38. Salvayre, R.; Auge, N.; Benoist, H.; Negre-Salvayre, A., Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* **2002**, *1585*, (2-3), 213-21. 10.1016/s1388-1981(02)00343-8
39. Jay, A. G.; Chen, A. N.; Paz, M. A.; Hung, J. P.; Hamilton, J. A., CD36 binds oxidized low density lipoprotein (LDL) in a mechanism dependent upon fatty acid binding. *The Journal of biological chemistry* **2015**, *290*, (8), 4590-4603. 10.1074/jbc.M114.627026
40. Dedoussis, G. V.; Kaliora, A. C.; Psarras, S.; Chiou, A.; Mylona, A.; Papadopoulos, N. G.; Andrikopoulos, N. K., Antiatherogenic effect of Pistacia lentiscus via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis* **2004**, *174*, (2), 293-303. 10.1016/j.atherosclerosis.2004.02.011
41. Gaucher, C.; Boudier, A.; Bonetti, J.; Clarot, I.; Leroy, P.; Parent, M., Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants* **2018**, *7*, (5). 10.3390/antiox7050062
42. Ghani, M. A.; Barril, C.; Bedgood, D. R., Jr.; Prenzler, P. D., Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chem* **2017**, *230*, 195-207. 10.1016/j.foodchem.2017.02.127

43. 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. *Nutrition journal* **2011**, 10, 64. 10.1186/1475-2891-10-64
44. Panday, A.; Sahoo, M. K.; Osorio, D.; Batra, S., NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular & molecular immunology* **2015**, 12, (1), 5-23. 10.1038/cmi.2014.89
45. Chen, X.; Andresen, B. T.; Hill, M.; Zhang, J.; Booth, F.; Zhang, C., Role of Reactive Oxygen Species in Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Endothelial Dysfunction. *Current hypertension reviews* **2008**, 4, (4), 245-255. 10.2174/157340208786241336
46. Fontayne, A.; Dang, P. M.; Gougerot-Pocidallo, M. A.; El-Benna, J., Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* **2002**, 41, (24), 7743-50. 10.1021/bi011953s
47. Aiello, E. A.; Cingolani, H. E., Angiotensin II stimulates cardiac L-type Ca(2+) current by a Ca(2+)- and protein kinase C-dependent mechanism. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **2001**, 280, (4), H1528-36. 10.1152/ajpheart.2001.280.4.H1528
48. Zhou, L.; Satoh, K.; Takahashi, K.; Watanabe, S.; Nakamura, W.; Maki, J.; Hatano, H.; Takekawa, F.; Shimada, C.; Sakagami, H., Re-evaluation of anti-inflammatory activity of mastic using activated macrophages. *In vivo* **2009**, 23, (4), 583-9.
49. Hatwalne, M. S., Free radical scavengers in anaesthesiology and critical care. *Indian journal of anaesthesia* **2012**, 56, (3), 227-33. 10.4103/0019-5049.98760
50. Luiking, Y. C.; Engelen, M. P.; Deutz, N. E., Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **2010**, 13, (1), 97-104. 10.1097/MCO.0b013e328332f99d
51. Norregaard, R.; Kwon, T. H.; Frokiaer, J., Physiology and pathophysiology of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in the kidney. *Kidney research and clinical practice* **2015**, 34, (4), 194-200. 10.1016/j.krcp.2015.10.004
52. Kaliora, A. C.; Stathopoulou, M. G.; Triantafillidis, J. K.; Dedoussis, G. V.; Andrikopoulos, N. K., Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. *World journal of gastroenterology* **2007**, 13, (5), 748-53. 10.3748/wjg.v13.i5.748
53. Guan, Q., A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of immunology research* **2019**, 2019, 7247238. 10.1155/2019/7247238
54. Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T., IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2014**, 6, (10), a016295. 10.1101/cshperspect.a016295
55. Sproston, N. R.; Ashworth, J. J., Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in immunology* **2018**, 9, 754. 10.3389/fimmu.2018.00754
56. Kaliora, A. C.; Stathopoulou, M. G.; Triantafillidis, J. K.; Dedoussis, G. V.; Andrikopoulos, N. K., Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn's disease treated with mastic. *World journal of gastroenterology* **2007**, 13, (45), 6031-6. 10.3748/wjg.v13.45.6031
57. Papalois, A.; Gioxari, A.; Kaliora, A. C.; Lymperopoulou, A.; Agrogiannis, G.; Papada, E.; Andrikopoulos, N. K., Chios mastic fractions in experimental colitis: implication of the nuclear factor kappaB pathway in cultured HT29 cells. *Journal of medicinal food* **2012**, 15, (11), 974-83. 10.1089/jmf.2012.0018
58. Kakagia, D.; Papalois, A.; Lambropoulou, M.; Papachristou, F.; Trypsiannis, G.; Anagnostopoulos, C.; Pitiakoudis, M.; Tsaroucha, A., The Use of Pistacia Lentiscus Chia Resin Versus Omeprazole in Protecting Male Rats Peptic Mucosa Against Cold Restraint Stress. *Journal of critical care medicine* **2020**, 6, (2), 100-110. 10.2478/jccm-2020-0018
59. Loizou, S.; Paraschos, S.; Mitakou, S.; Chrousos, G. P.; Lekakis, I.; Moutsatsou, P., Chios mastic gum extract and isolated phytosterol tirucallol exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Experimental biology and medicine* **2009**, 234, (5), 553-61. 10.3181/0811-RM-338

60. Cook-Mills, J. M.; Marchese, M. E.; Abdala-Valencia, H., Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxidants & redox signaling* **2011**, 15, (6), 1607-38. 10.1089/ars.2010.3522
61. Hua, S., Targeting sites of inflammation: intercellular adhesion molecule-1 as a target for novel inflammatory therapies. *Frontiers in pharmacology* **2013**, 4, 127. 10.3389/fphar.2013.00127
62. Volanti, C.; Gloire, G.; Vanderplasschen, A.; Jacobs, N.; Habraken, Y.; Piette, J., Downregulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression in endothelial cells treated by photodynamic therapy. *Oncogene* **2004**, 23, (53), 8649-58. 10.1038/sj.onc.1207871
63. Amerikanou, C.; Papada, E.; Gioxari, A.; Smyrnioudis, I.; Kleftaki, S. A.; Valsamidou, E.; Bruns, V.; Banerjee, R.; Trivella, M. G.; Milic, N.; Medic-Stojanoska, M.; Gastaldelli, A.; Kannt, A.; Mast4Health; Dedoussis, G. V.; Kaliora, A. C., Mastiha has efficacy in immune-mediated inflammatory diseases through a microRNA-155 Th17 dependent action. *Pharmacological research* **2021**, 171, 105753. 10.1016/j.phrs.2021.105753
64. Qiao, J.; Li, A.; Jin, X.; Wang, J., Mastic alleviates allergic inflammation in asthmatic model mice by inhibiting recruitment of eosinophils. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **2011**, 45, (1), 95-100. 10.1165/rcmb.2010-0212OC
65. Corrigan, C. J., Eotaxin and asthma: some answers, more questions. *Clinical and experimental immunology* **1999**, 116, (1), 1-3. 10.1046/j.1365-2249.1999.00740.x
66. Tzani, A. I.; Doulamis, I. P.; Konstantopoulos, P. S.; Pasiou, E. D.; Daskalopoulou, A.; Iliopoulos, D. C.; Georgiadis, I. V.; Kavantzias, N.; Kourkoulis, S. K.; Perrea, D. N., Chios mastic gum decreases renin levels and ameliorates vascular remodeling in renovascular hypertensive rats. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **2018**, 105, 899-906. 10.1016/j.biopha.2018.06.067
67. Weir, M. R.; Dzau, V. J., The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *American journal of hypertension* **1999**, 12, (12 Pt 3), 205S-213S. 10.1016/s0895-7061(99)00103-x
68. Kontogiannis, C.; Georgiopoulos, G.; Loukas, K.; Papanagnou, E. D.; Pachi, V. K.; Bakogianni, I.; Laina, A.; Kouzoupis, A.; Karatzi, K.; Trougakos, I. P.; Stamatelopoulos, K., Chios mastic improves blood pressure haemodynamics in patients with arterial hypertension: Implications for regulation of proteostatic pathways. *European journal of preventive cardiology* **2019**, 26, (3), 328-331. 10.1177/2047487318796985
69. Triantafyllou, A.; Chaviaras, N.; Sergentanis, T. N.; Protopapa, E.; Tsaknis, J., Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *Journal of ethnopharmacology* **2007**, 111, (1), 43-9. 10.1016/j.jep.2006.10.031
70. Fukazawa, T.; Smyrnioudis, I.; Konishi, M.; Takahashi, M.; Kim, H. K.; Nishimaki, M.; Xiang, M.; Sakamoto, S., Effects of Chios mastic gum and exercise on physical characteristics, blood lipid markers, insulin resistance, and hepatic function in healthy Japanese men. *Food science and biotechnology* **2018**, 27, (3), 773-780. 10.1007/s10068-018-0307-3
71. Kartalis, A.; Didagelos, M.; Georgiadis, I.; Benetos, G.; Smyrnioudis, N.; Marmaras, H.; Voutas, P.; Zotika, C.; Garoufalis, S.; Andrikopoulos, G., Effects of Chios mastic gum on cholesterol and glucose levels of healthy volunteers: A prospective, randomized, placebo-controlled, pilot study (CHIOS-MASTIHA). *European journal of preventive cardiology* **2016**, 23, (7), 722-9. 10.1177/2047487315603186
72. Andreadou, I.; Mitakou, S.; Paraschos, S.; Efentakis, P.; Magiatis, P.; Kaklamanis, L.; Halabalaki, M.; Skaltsounis, L.; Iliodromitis, E. K., "Pistacia lentiscus L." reduces the infarct size in normal fed anesthetized rabbits and possess antiatheromatic and hypolipidemic activity in cholesterol fed rabbits. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **2016**, 23, (11), 1220-6. 10.1016/j.phymed.2016.06.002
73. Georgiadis, I.; Karatzas, T.; Korou, L. M.; Agrogiannis, G.; Vlachos, I. S.; Pantopoulou, A.; Tzanetakou, I. P.; Katsilambros, N.; Perrea, D. N., Evaluation of Chios mastic gum on lipid and glucose metabolism in diabetic mice. *Journal of medicinal food* **2014**, 17, (3), 393-9. 10.1089/jmf.2013.0069

74. Tzani A., B. E., Doulamis I.P., Korou M.L., Konstantopoulos P., Vlachos I.S., Georgiadis I., Perrea D.N., Hypolipidemic, hepatoprotective and anti-inflammatory role of Chios Mastic gum in Streptozotocin-induced diabetic mice with fatty liver disease. *Hellenic Atherosclerosis Society* **2016**, 7, (4), 161 - 173.
75. Vallianou, I.; Peroulis, N.; Pantazis, P.; Hadzopoulou-Cladaras, M., Camphene, a plant-derived monoterpene, reduces plasma cholesterol and triglycerides in hyperlipidemic rats independently of HMG-CoA reductase activity. *PLoS one* **2011**, 6, (11), e20516. 10.1371/journal.pone.0020516
76. Vuorinen, A.; Seibert, J.; Papageorgiou, V. P.; Rollinger, J. M.; Odermatt, A.; Schuster, D.; Assimopoulou, A. N., Pistacia lentiscus Oleoresin: Virtual Screening and Identification of Masticadienonic and Isomasticadienonic Acids as Inhibitors of 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 1. *Planta medica* **2015**, 81, (6), 525-32. 10.1055/s-0035-1545720
77. Cain, D. W.; Cidlowski, J. A., Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **2015**, 29, (4), 545-56. 10.1016/j.beem.2015.04.007
78. Chapman, K.; Holmes, M.; Seckl, J., 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gatekeepers of tissue glucocorticoid action. *Physiological reviews* **2013**, 93, (3), 1139-206. 10.1152/physrev.00020.2012
79. Nassir, F.; Rector, R. S.; Hammoud, G. M.; Ibdah, J. A., Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. *Gastroenterology & hepatology* **2015**, 11, (3), 167-75.
80. Balan, K. V.; Prince, J.; Han, Z.; Dimas, K.; Cladaras, M.; Wyche, J. H.; Sitaras, N. M.; Pantazis, P., Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from Pistacia lentiscus L. var. chia. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **2007**, 14, (4), 263-72. 10.1016/j.phymed.2006.03.009
81. Brady, C. A.; Attardi, L. D., p53 at a glance. *Journal of cell science* **2010**, 123, (Pt 15), 2527-32. 10.1242/jcs.064501
82. Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **2007**, 35, (4), 495-516. 10.1080/01926230701320337
83. Virag, L., Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Current vascular pharmacology* **2005**, 3, (3), 209-14. 10.2174/1570161054368625
84. Balan, K. V.; Demetzos, C.; Prince, J.; Dimas, K.; Cladaras, M.; Han, Z.; Wyche, J. H.; Pantazis, P., Induction of apoptosis in human colon cancer HCT116 cells treated with an extract of the plant product, Chios mastic gum. *In vivo* **2005**, 19, (1), 93-102.
85. Frisch, S. M.; Francis, H., Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of cell biology* **1994**, 124, (4), 619-26. 10.1083/jcb.124.4.619
86. Dimas, K.; Hatziantoniou, S.; Wyche, J. H.; Pantazis, P., A mastic gum extract induces suppression of growth of human colorectal tumor xenografts in immunodeficient mice. *In vivo* **2009**, 23, (1), 63-8.
87. Sakagami, H.; Kishino, K.; Kobayashi, M.; Hashimoto, K.; Iida, S.; Shimetani, A.; Nakamura, Y.; Takahashi, K.; Ikarashi, T.; Fukamachi, H.; Satoh, K.; Nakashima, H.; Shimizu, T.; Takeda, K.; Watanabe, S.; Nakamura, W., Selective antibacterial and apoptosis-modulating activities of mastic. *In vivo* **2009**, 23, (2), 215-23.
88. Li, S.; Cha, I. H.; Nam, W., Chios mastic gum extracts as a potent antitumor agent that inhibits growth and induces apoptosis of oral cancer cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **2011**, 12, (7), 1877-80.
89. Huang, X. Y.; Wang, H. C.; Yuan, Z.; Li, A.; He, M. L.; Ai, K. X.; Zheng, Q.; Qin, H. L., Gemcitabine combined with gum mastic causes potent growth inhibition and apoptosis of pancreatic cancer cells. *Acta pharmacologica Sinica* **2010**, 31, (6), 741-5. 10.1038/aps.2010.54
90. Bai, D.; Ueno, L.; Vogt, P. K., Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *International journal of cancer* **2009**, 125, (12), 2863-70. 10.1002/ijc.24748

91. Prabhu, L.; Mundade, R.; Korc, M.; Loehrer, P. J.; Lu, T., Critical role of NF-kappaB in pancreatic cancer. *Oncotarget* **2014**, 5, (22), 10969-75. 10.18632/oncotarget.2624
92. He, M. L.; Li, A.; Xu, C. S.; Wang, S. L.; Zhang, M. J.; Gu, H.; Yang, Y. Q.; Tao, H. H., Mechanisms of antiprostata cancer by gum mastic: NF-kappaB signal as target. *Acta pharmacologica Sinica* **2007**, 28, (3), 446-52. 10.1111/j.1745-7254.2007.00536.x
93. He, M. L.; Yuan, H. Q.; Jiang, A. L.; Gong, A. Y.; Chen, W. W.; Zhang, P. J.; Young, C. Y.; Zhang, J. Y., Gum mastic inhibits the expression and function of the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer* **2006**, 106, (12), 2547-55. 10.1002/cncr.21935
94. Fujita, K.; Nonomura, N., Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *The world journal of men's health* **2019**, 37, (3), 288-295. 10.5534/wjmh.180040
95. He, M. L.; Chen, W. W.; Zhang, P. J.; Jiang, A. L.; Fan, W.; Yuan, H. Q.; Liu, W. W.; Zhang, J. Y., Gum mastic increases maspin expression in prostate cancer cells. *Acta pharmacologica Sinica* **2007**, 28, (4), 567-72. 10.1111/j.1745-7254.2007.00535.x
96. Loutrari, H.; Magkouta, S.; Pyriochou, A.; Koika, V.; Kolisis, F. N.; Papapetropoulos, A.; Roussos, C., Mastic oil from Pistacia lentiscus var. chia inhibits growth and survival of human K562 leukemia cells and attenuates angiogenesis. *Nutrition and cancer* **2006**, 55, (1), 86-93. 10.1207/s15327914nc5501\_11
97. Shibuya, M., Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & cancer* **2011**, 2, (12), 1097-105. 10.1177/1947601911423031
98. Mebratu, Y.; Tesfaigzi, Y., How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell cycle* **2009**, 8, (8), 1168-75. 10.4161/cc.8.8.8147
99. Magkouta, S.; Stathopoulos, G. T.; Psallidas, I.; Papapetropoulos, A.; Kolisis, F. N.; Roussos, C.; Loutrari, H., Protective effects of mastic oil from Pistacia lentiscus variation chia against experimental growth of lewis lung carcinoma. *Nutrition and cancer* **2009**, 61, (5), 640-8. 10.1080/01635580902825647
100. Qin, C. C.; Liu, Y. N.; Hu, Y.; Yang, Y.; Chen, Z., Macrophage inflammatory protein-2 as mediator of inflammation in acute liver injury. *World journal of gastroenterology* **2017**, 23, (17), 3043-3052. 10.3748/wjg.v23.i17.3043
101. Simanshu, D. K.; Nissley, D. V.; McCormick, F., RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell* **2017**, 170, (1), 17-33. 10.1016/j.cell.2017.06.009
102. Zhou, X.; Zheng, Y., Cell type-specific signaling function of RhoA GTPase: lessons from mouse gene targeting. *The Journal of biological chemistry* **2013**, 288, (51), 36179-88. 10.1074/jbc.R113.515486
103. Moulos, P.; Papadodima, O.; Chatziioannou, A.; Loutrari, H.; Roussos, C.; Kolisis, F. N., A transcriptomic computational analysis of mastic oil-treated Lewis lung carcinomas reveals molecular mechanisms targeting tumor cell growth and survival. *BMC medical genomics* **2009**, 2, 68. 10.1186/1755-8794-2-68
104. Hayder, N.; Ben Ammar, R.; Abdelwahed, A.; Kilani, S.; Mahmoud, A.; Ben Chibani, J.; Mariotte, A.-M.; Ghedira, K.; Dijoux-Franca, M.-G.; Chekir-Ghedira, L., Antibacterial and antimutagenic activitiy of extracts and essential oil from (Tunisian)Pistacia lentiscus. *Toxicological & Environmental Chemistry* **2005**, 87, (4), 567-573. 10.1080/02772240500399823
105. Benhammou N., B. F. A., Panovska T.K., , Antioxidant and antimicrobial activities of the Pistacia lentiscus and Pistacia atlantica extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2008**, 2, (2), 022-028. 10.5897/AJPP.9000056
106. Baratto, M. C.; Tattini, M.; Galardi, C.; Pinelli, P.; Romani, A.; Visioli, F.; Basosi, R.; Pogni, R., Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from P. lentiscus leaves. *Free radical research* **2003**, 37, (4), 405-12. 10.1080/1071576031000068618
107. Pacifico, S.; Piccolella, S.; Marciano, S.; Galasso, S.; Nocera, P.; Piscopo, V.; Fiorentino, A.; Monaco, P., LC-MS/MS profiling of a mastic leaf phenol enriched extract and its effects on H2O2 and Abeta(25-35) oxidative injury in SK-B-NE(C)-2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry* **2014**, 62, (49), 11957-66. 10.1021/jf504544x



108. Atmani, D.; Chaher, N.; Berboucha, M.; Ayouni, K.; Lounis, H.; Boudaoud, H.; Debbache, N.; Atmani, D., Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry* **2009**, *112*, (2), 303-309. 10.1016/j.foodchem.2008.05.077
109. Dellai, A.; Souissi, H.; Borgi, W.; Bouraoui, A.; Chouchane, N., Antiinflammatory and antiulcerogenic activities of Pistacia lentiscus L. leaves extracts. *Industrial Crops and Products* **2013**, *49*, 879-882. 10.1016/j.indcrop.2013.07.010
110. Mehenni, C.; Atmani-Kilani, D.; Dumarcay, S.; Perrin, D.; Gerardin, P.; Atmani, D., Hepatoprotective and antidiabetic effects of Pistacia lentiscus leaf and fruit extracts. *Journal of food and drug analysis* **2016**, *24*, (3), 653-669. 10.1016/j.jfda.2016.03.002
111. Date, K.; Satoh, A.; Iida, K.; Ogawa, H., Pancreatic alpha-Amylase Controls Glucose Assimilation by Duodenal Retrieval through N-Glycan-specific Binding, Endocytosis, and Degradation. *The Journal of biological chemistry* **2015**, *290*, (28), 17439-50. 10.1074/jbc.M114.594937
112. Piccoella, S.; Nocera, P.; Carillo, P.; Woodrow, P.; Greco, V.; Manti, L.; Fiorentino, A.; Pacifico, S., An apolar Pistacia lentiscus L. leaf extract: GC-MS metabolic profiling and evaluation of cytotoxicity and apoptosis inducing effects on SH-SY5Y and SK-N-BE(2)C cell lines. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **2016**, *95*, 64-74. 10.1016/j.fct.2016.06.028
113. Benamar, H.; Rached, W.; Derdour, A.; Marouf, A., Screening of Algerian Medicinal Plants for Acetylcholinesterase Inhibitory Activity. *Journal of Biological Sciences* **2009**, *10*, (1), 1-9. 10.3923/jbs.2010.1.9
114. Lionetto, M. G.; Caricato, R.; Calisi, A.; Giordano, M. E.; Schettino, T., Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed research international* **2013**, *2013*, 321213. 10.1155/2013/321213
115. Dos Santos, T. C.; Gomes, T. M.; Pinto, B. A. S.; Camara, A. L.; Paes, A. M. A., Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy. *Frontiers in pharmacology* **2018**, *9*, 1192. 10.3389/fphar.2018.01192
116. Murphy, M. P.; LeVine, H., 3rd, Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **2010**, *19*, (1), 311-23. 10.3233/JAD-2010-1221
117. Lukiw, W. J.; Bazan, N. G., Docosahexaenoic acid and the aging brain. *The Journal of nutrition* **2008**, *138*, (12), 2510-4. 10.3945/jn.108.096016
118. Vandewalle, J.; Luybaert, A.; De Bosscher, K.; Libert, C., Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **2018**, *29*, (1), 42-54. 10.1016/j.tem.2017.10.010
119. Gruver-Yates, A. L.; Cidlowski, J. A., Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. *Cells* **2013**, *2*, (2), 202-23. 10.3390/cells2020202
120. Cole, T. J.; Short, K. L.; Hooper, S. B., The science of steroids. *Seminars in fetal & neonatal medicine* **2019**, *24*, (3), 170-175. 10.1016/j.siny.2019.05.005
121. Timmermans, S.; Souffriau, J.; Libert, C., A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Frontiers in immunology* **2019**, *10*, 1545. 10.3389/fimmu.2019.01545
122. Ahmed, A.; Schmidt, C.; Brunner, T., Extra-Adrenal Glucocorticoid Synthesis in the Intestinal Mucosa: Between Immune Homeostasis and Immune Escape. *Frontiers in immunology* **2019**, *10*, 1438. 10.3389/fimmu.2019.01438
123. Lapp, H. E.; Bartlett, A. A.; Hunter, R. G., Stress and glucocorticoid receptor regulation of mitochondrial gene expression. *Journal of molecular endocrinology* **2019**, *62*, (2), R121-R128. 10.1530/JME-18-0152
124. Tsigos, C.; Chrousos, G. P., Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of psychosomatic research* **2002**, *53*, (4), 865-71. 10.1016/s0022-3999(02)00429-4
125. Slominski, R. M.; Tuckey, R. C.; Manna, P. R.; Jetten, A. M.; Postlethwaite, A.; Raman, C.; Slominski, A. T., Extra-adrenal glucocorticoid biosynthesis: implications for autoimmune and inflammatory disorders. *Genes and immunity* **2020**, *21*, (3), 150-168. 10.1038/s41435-020-0096-6

126. Gjerstad, J. K.; Lightman, S. L.; Spiga, F., Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress* **2018**, 21, (5), 403-416. 10.1080/10253890.2018.1470238
127. Mohd Azmi, N. A. S.; Juliana, N.; Azmani, S.; Mohd Effendy, N.; Abu, I. F.; Mohd Fahmi Teng, N. I.; Das, S., Cortisol on Circadian Rhythm and Its Effect on Cardiovascular System. *International journal of environmental research and public health* **2021**, 18, (2). 10.3390/ijerph18020676
128. Oster, H.; Challet, E.; Ott, V.; Arvat, E.; de Kloet, E. R.; Dijk, D. J.; Lightman, S.; Vgontzas, A.; Van Cauter, E., The Functional and Clinical Significance of the 24-Hour Rhythm of Circulating Glucocorticoids. *Endocrine reviews* **2017**, 38, (1), 3-45. 10.1210/er.2015-1080
129. Shimba, A.; Ikuta, K., Glucocorticoids Regulate Circadian Rhythm of Innate and Adaptive Immunity. *Frontiers in immunology* **2020**, 11, 2143. 10.3389/fimmu.2020.02143
130. Herman, J. P.; McKlveen, J. M.; Ghosal, S.; Kopp, B.; Wulsin, A.; Makinson, R.; Scheimann, J.; Myers, B., Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Comprehensive Physiology* **2016**, 6, (2), 603-21. 10.1002/cphy.c150015
131. Kadmiel, M.; Cidlowski, J. A., Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in pharmacological sciences* **2013**, 34, (9), 518-30. 10.1016/j.tips.2013.07.003
132. Bae, Y. J.; Kratzsch, J., Corticosteroid-binding globulin: modulating mechanisms of bioavailability of cortisol and its clinical implications. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **2015**, 29, (5), 761-72. 10.1016/j.beem.2015.09.001
133. Gross, K. L.; Cidlowski, J. A., Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **2008**, 19, (9), 331-9. 10.1016/j.tem.2008.07.009
134. Ramamoorthy, S.; Cidlowski, J. A., Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic diseases clinics of North America* **2016**, 42, (1), 15-31, vii. 10.1016/j.rdc.2015.08.002
135. Iyer, A. K.; Zhang, Y. H.; McCabe, E. R., Dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1 (DAX1) (NROB1) and small heterodimer partner (SHP) (NROB2) form homodimers individually, as well as DAX1-SHP heterodimers. *Molecular endocrinology* **2006**, 20, (10), 2326-42. 10.1210/me.2005-0383
136. Weikum, E. R.; Liu, X.; Ortlund, E. A., The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2018**, 27, (11), 1876-1892. 10.1002/pro.3496
137. Vandevyver, S.; Dejager, L.; Libert, C., Comprehensive overview of the structure and regulation of the glucocorticoid receptor. *Endocrine reviews* **2014**, 35, (4), 671-93. 10.1210/er.2014-1010
138. Turner, J. D.; Alt, S. R.; Cao, L.; Vernocchi, S.; Trifonova, S.; Battello, N.; Muller, C. P., Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more. *Biochemical pharmacology* **2010**, 80, (12), 1860-8. 10.1016/j.bcp.2010.06.037
139. Duma, D.; Jewell, C. M.; Cidlowski, J. A., Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **2006**, 102, (1-5), 11-21. 10.1016/j.jsbmb.2006.09.009
140. Kassi, E.; Moutsatsou, P., Glucocorticoid receptor signaling and prostate cancer. *Cancer letters* **2011**, 302, (1), 1-10. 10.1016/j.canlet.2010.10.020
141. Lu, N. Z.; Cidlowski, J. A., Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends in cell biology* **2006**, 16, (6), 301-7. 10.1016/j.tcb.2006.04.005
142. Oakley, R. H.; Cidlowski, J. A., Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *The Journal of biological chemistry* **2011**, 286, (5), 3177-84. 10.1074/jbc.R110.179325
143. Oakley, R. H.; Cidlowski, J. A., The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* **2013**, 132, (5), 1033-44. 10.1016/j.jaci.2013.09.007
144. Yudt, M. R.; Cidlowski, J. A., Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Molecular endocrinology* **2001**, 15, (7), 1093-103. 10.1210/mend.15.7.0667
145. Kino, T.; Su, Y. A.; Chrousos, G. P., Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2009**, 66, (21), 3435-48. 10.1007/s00018-009-0098-z

146. Bledsoe, R. K.; Montana, V. G.; Stanley, T. B.; Delves, C. J.; Apolito, C. J.; McKee, D. D.; Consler, T. G.; Parks, D. J.; Stewart, E. L.; Willson, T. M.; Lambert, M. H.; Moore, J. T.; Pearce, K. H.; Xu, H. E., Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* **2002**, 110, (1), 93-105. 10.1016/S0092-8674(02)00817-6
147. Bledsoe, R. K.; Stewart, E. L.; Pearce, K. H., Structure and function of the glucocorticoid receptor ligand binding domain. *Vitamins and hormones* **2004**, 68, 49-91. 10.1016/S0083-6729(04)68002-2
148. Kumar, R.; Thompson, E. B., Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **2005**, 94, (5), 383-94. 10.1016/j.jsbmb.2004.12.046
149. Lu, N. Z.; Cidlowski, J. A., The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2004**, 1024, 102-23. 10.1196/annals.1321.008
150. Webster, J. C.; Jewell, C. M.; Bodwell, J. E.; Munck, A.; Sar, M.; Cidlowski, J. A., Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *The Journal of biological chemistry* **1997**, 272, (14), 9287-93. 10.1074/jbc.272.14.9287
151. Liberman, A. C.; Antunica-Noguerol, M.; Arzt, E., Modulation of the Glucocorticoid Receptor Activity by Post-Translational Modifications. *Nuclear Receptor Research* **2014**, 1, 1-15. 10.11131/2014/101086
152. Weikum, E. R.; Knuesel, M. T.; Ortlund, E. A.; Yamamoto, K. R., Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2017**, 18, (3), 159-174. 10.1038/nrm.2016.152
153. Wallace, A. D.; Cao, Y.; Chandramouleeswaran, S.; Cidlowski, J. A., Lysine 419 targets human glucocorticoid receptor for proteasomal degradation. *Steroids* **2010**, 75, (12), 1016-23. 10.1016/j.steroids.2010.06.015
154. Wallace, A. D.; Cidlowski, J. A., Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *The Journal of biological chemistry* **2001**, 276, (46), 42714-21. 10.1074/jbc.M106033200
155. Deroo, B. J.; Rentsch, C.; Sampath, S.; Young, J.; DeFranco, D. B.; Archer, T. K., Proteasomal inhibition enhances glucocorticoid receptor transactivation and alters its subnuclear trafficking. *Molecular and cellular biology* **2002**, 22, (12), 4113-23. 10.1128/MCB.22.12.4113-4123.2002
156. Petrillo, M. G.; Oakley, R. H.; Cidlowski, J. A., beta-Arrestin-1 inhibits glucocorticoid receptor turnover and alters glucocorticoid signaling. *The Journal of biological chemistry* **2019**, 294, (29), 11225-11239. 10.1074/jbc.RA118.007150
157. Heitzer, M. D.; Wolf, I. M.; Sanchez, E. R.; Witchel, S. F.; DeFranco, D. B., Glucocorticoid receptor physiology. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* **2007**, 8, (4), 321-30. 10.1007/s11154-007-9059-8
158. Liu, B.; Zhang, T. N.; Knight, J. K.; Goodwin, J. E., The Glucocorticoid Receptor in Cardiovascular Health and Disease. *Cells* **2019**, 8, (10). 10.3390/cells8101227
159. Revollo, J. R.; Cidlowski, J. A., Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2009**, 1179, 167-78. 10.1111/j.1749-6632.2009.04986.x
160. Samarasinghe, R. A.; Witchell, S. F.; DeFranco, D. B., Cooperativity and complementarity: synergies in non-classical and classical glucocorticoid signaling. *Cell cycle* **2012**, 11, (15), 2819-27. 10.4161/cc.21018
161. Psarra, A. M.; Bochaton-Piallat, M. L.; Gabbiani, G.; Sekeris, C. E.; Tsacopoulos, M., Mitochondrial localization of glucocorticoid receptor in glial (Muller) cells in the salamander retina. *Glia* **2003**, 41, (1), 38-49. 10.1002/glia.10130
162. Moutsatsou, P.; Psarra, A. M.; Tsiapara, A.; Paraskevaku, H.; Davaris, P.; Sekeris, C. E., Localization of the glucocorticoid receptor in rat brain mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* **2001**, 386, (1), 69-78. 10.1006/abbi.2000.2162

163. Psarra, A. M.; Solakidi, S.; Sekeris, C. E., The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Molecular and cellular endocrinology* **2006**, 246, (1-2), 21-33. 10.1016/j.mce.2005.11.025
164. Psarra, A. M.; Solakidi, S.; Sekeris, C. E., The mitochondrion as a primary site of action of regulatory agents involved in neuroimmunomodulation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2006**, 1088, 12-22. 10.1196/annals.1366.019
165. Psarra, A. M.; Solakidi, S.; Trougakos, I. P.; Margaritis, L. H.; Spyrou, G.; Sekeris, C. E., 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. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2005**, 37, (12), 2544-58. 10.1016/j.biocel.2005.06.015
166. Psarra, A. M.; Sekeris, C. E., Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB life* **2008**, 60, (4), 210-23. 10.1002/iub.37
167. Karra, A. G.; Tsialtas, I.; Kalousi, F. D.; Georgantopoulos, A.; Sereti, E.; Dimas, K.; Psarra, A. G., Increased Expression of the Mitochondrial Glucocorticoid Receptor Enhances Tumor Aggressiveness in a Mouse Xenograft Model. *International journal of molecular sciences* **2023**, 24, (4). 10.3390/ijms24043740
168. Psarra, A. M.; Sekeris, C. E., Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. *Biochimica et biophysica acta* **2011**, 1813, (10), 1814-21. 10.1016/j.bbamcr.2011.05.014
169. Psarra, A. M.; Sekeris, C. E., Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochimica et biophysica acta* **2008**, 1783, (1), 1-11. 10.1016/j.bbamcr.2007.10.021
170. Psarra, A. M.; Sekeris, C. E., Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochimica et biophysica acta* **2009**, 1787, (5), 431-6. 10.1016/j.bbmbio.2008.11.011
171. Kokkinopoulou, I.; Diakoumi, A.; Moutsatsou, P., Glucocorticoid Receptor Signaling in Diabetes. *International journal of molecular sciences* **2021**, 22, (20). 10.3390/ijms222011173
172. Huang, S.; Czech, M. P., The GLUT4 glucose transporter. *Cell metabolism* **2007**, 5, (4), 237-52. 10.1016/j.cmet.2007.03.006
173. Zhang, S.; Hulver, M. W.; McMillan, R. P.; Cline, M. A.; Gilbert, E. R., The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutrition & metabolism* **2014**, 11, (1), 10. 10.1186/1743-7075-11-10
174. Cain, D. W.; Cidlowski, J. A., Immune regulation by glucocorticoids. *Nature reviews. Immunology* **2017**, 17, (4), 233-247. 10.1038/nri.2017.1
175. Smoak, K. A.; Cidlowski, J. A., Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mechanisms of ageing and development* **2004**, 125, (10-11), 697-706. 10.1016/j.mad.2004.06.010
176. Balka, K. R.; De Nardo, D., Understanding early TLR signaling through the Myddosome. *Journal of leukocyte biology* **2019**, 105, (2), 339-351. 10.1002/JLB.MR0318-096R
177. Mitchell, S.; Vargas, J.; Hoffmann, A., Signaling via the NFkappaB system. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* **2016**, 8, (3), 227-41. 10.1002/wsbm.1331
178. Van Bogaert, T.; De Bosscher, K.; Libert, C., Crosstalk between TNF and glucocorticoid receptor signaling pathways. *Cytokine & growth factor reviews* **2010**, 21, (4), 275-86. 10.1016/j.cytogfr.2010.04.003
179. Rhen, T.; Cidlowski, J. A., Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *The New England journal of medicine* **2005**, 353, (16), 1711-23. 10.1056/NEJMra050541
180. Carling, D., AMPK signalling in health and disease. *Current opinion in cell biology* **2017**, 45, 31-37. 10.1016/j.ceb.2017.01.005
181. Mihaylova, M. M.; Shaw, R. J., The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature cell biology* **2011**, 13, (9), 1016-23. 10.1038/ncb2329

182. Herzig, S.; Shaw, R. J., AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2018**, 19, (2), 121-135. 10.1038/nrm.2017.95
183. Lim, C. T.; Kola, B.; Korbonits, M., AMPK as a mediator of hormonal signalling. *Journal of molecular endocrinology* **2010**, 44, (2), 87-97. 10.1677/JME-09-0063
184. Nader, N.; Ng, S. S.; Lambrou, G. I.; Pervanidou, P.; Wang, Y.; Chrousos, G. P.; Kino, T., AMPK regulates metabolic actions of glucocorticoids by phosphorylating the glucocorticoid receptor through p38 MAPK. *Molecular endocrinology* **2010**, 24, (9), 1748-64. 10.1210/me.2010-0192
185. Yuan, S. Y.; Liu, J.; Zhou, J.; Lu, W.; Zhou, H. Y.; Long, L. H.; Hu, Z. L.; Ni, L.; Wang, Y.; Chen, J. G.; Wang, F., AMPK Mediates Glucocorticoids Stress-Induced Downregulation of the Glucocorticoid Receptor in Cultured Rat Prefrontal Cortical Astrocytes. *PLoS one* **2016**, 11, (8), e0159513. 10.1371/journal.pone.0159513
186. Tyagi, S.; Gupta, P.; Saini, A. S.; Kaushal, C.; Sharma, S., The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research* **2011**, 2, (4), 236-40. 10.4103/2231-4040.90879
187. Rakhshandehroo, M.; Knoch, B.; Muller, M.; Kersten, S., Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR research* **2010**, 2010. 10.1155/2010/612089
188. Bougarne, N.; Weyers, B.; Desmet, S. J.; Deckers, J.; Ray, D. W.; Staels, B.; De Bosscher, K., Molecular Actions of PPARalpha in Lipid Metabolism and Inflammation. *Endocrine reviews* **2018**, 39, (5), 760-802. 10.1210/er.2018-00064
189. Christofides, A.; Konstantinidou, E.; Jani, C.; Boussiotis, V. A., The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism: clinical and experimental* **2021**, 114, 154338. 10.1016/j.metabol.2020.154338
190. Lemberger, T.; Staels, B.; Saladin, R.; Desvergne, B.; Auwerx, J.; Wahli, W., Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene by glucocorticoids. *The Journal of biological chemistry* **1994**, 269, (40), 24527-30.
191. Bougarne, N.; Paumelle, R.; Caron, S.; Hennuyer, N.; Mansouri, R.; Gervois, P.; Staels, B.; Haegeman, G.; De Bosscher, K., PPARalpha blocks glucocorticoid receptor alpha-mediated transactivation but cooperates with the activated glucocorticoid receptor alpha for transrepression on NF-kappaB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, 106, (18), 7397-402. 10.1073/pnas.0806742106
192. Lee, H. Y.; Gao, X.; Barrasa, M. I.; Li, H.; Elmes, R. R.; Peters, L. L.; Lodish, H. F., PPAR-alpha and glucocorticoid receptor synergize to promote erythroid progenitor self-renewal. *Nature* **2015**, 522, (7557), 474-7. 10.1038/nature14326
193. Ratman, D.; Mylka, V.; Bougarne, N.; Pawlak, M.; Caron, S.; Hennuyer, N.; Paumelle, R.; De Cauwer, L.; Thommis, J.; Rider, M. H.; Libert, C.; Lievens, S.; Tavernier, J.; Staels, B.; De Bosscher, K., Chromatin recruitment of activated AMPK drives fasting response genes co-controlled by GR and PPARalpha. *Nucleic acids research* **2016**, 44, (22), 10539-10553. 10.1093/nar/gkw742
194. McMaster, A.; Ray, D. W., Drug insight: selective agonists and antagonists of the glucocorticoid receptor. *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism* **2008**, 4, (2), 91-101. 10.1038/ncpendmet0745
195. Stahn, C.; Lowenberg, M.; Hommes, D. W.; Buttgereit, F., Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Molecular and cellular endocrinology* **2007**, 275, (1-2), 71-8. 10.1016/j.mce.2007.05.019
196. Schacke, H.; Berger, M.; Rehwinkel, H.; Asadullah, K., Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index. *Molecular and cellular endocrinology* **2007**, 275, (1-2), 109-17. 10.1016/j.mce.2007.05.014
197. Oray, M.; Abu Samra, K.; Ebrahimiadib, N.; Meese, H.; Foster, C. S., Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert opinion on drug safety* **2016**, 15, (4), 457-65. 10.1517/14740338.2016.1140743
198. Sundahl, N.; Bridelance, J.; Libert, C.; De Bosscher, K.; Beck, I. M., Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds. *Pharmacology & therapeutics* **2015**, 152, 28-41. 10.1016/j.pharmthera.2015.05.001

199. De Bosscher, K.; Haegeman, G.; Elewaut, D., Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators. *Current opinion in pharmacology* **2010**, 10, (4), 497-504. 10.1016/j.coph.2010.04.007
200. De Bosscher, K.; Vanden Berghe, W.; Beck, I. M.; Van Molle, W.; Hennuyer, N.; Hapgood, J.; Libert, C.; Staels, B.; Louw, A.; Haegeman, G., A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, (44), 15827-32. 10.1073/pnas.0505554102
201. Lesovaya, E.; Yemelyanov, A.; Swart, A. C.; Swart, P.; Haegeman, G.; Budunova, I., Discovery of Compound A--a selective activator of the glucocorticoid receptor with anti-inflammatory and anti-cancer activity. *Oncotarget* **2015**, 6, (31), 30730-44. 10.18632/oncotarget.5078
202. Miettinen, K.; Inigo, S.; Kreft, L.; Pollier, J.; De Bo, C.; Botzki, A.; Coppens, F.; Bak, S.; Goossens, A., The TriForC database: a comprehensive up-to-date resource of plant triterpene biosynthesis. *Nucleic acids research* **2018**, 46, (D1), D586-D594. 10.1093/nar/gkx925
203. Thimmappa, R.; Geisler, K.; Louveau, T.; O'Maille, P.; Osbourn, A., Triterpene biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology* **2014**, 65, 225-57. 10.1146/annurev-arplant-050312-120229
204. Georgatza, D.; Gorgogietas, V. A.; Kylindri, P.; Charalambous, M. C.; Papadopoulou, K. K.; Hayes, J. M.; Psarra, A. G., 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* **2016**, 79, 277-287. 10.1016/j.biocel.2016.08.028
205. Haridas, V.; Xu, Z. X.; Kitchen, D.; Jiang, A.; Michels, P.; Gutterman, J. U., The anticancer plant triterpenoid, avicin D, regulates glucocorticoid receptor signaling: implications for cellular metabolism. *PloS one* **2011**, 6, (11), e28037. 10.1371/journal.pone.0028037
206. Karra, A. G.; Konstantinou, M.; Tzortziou, M.; Tsialtas, I.; Kalousi, F. D.; Garagounis, C.; Hayes, J. M.; Psarra, A. G., Potential Dissociative Glucocorticoid Receptor Activity for Protopanaxadiol and Protopanaxatriol. *International journal of molecular sciences* **2018**, 20, (1). 10.3390/ijms20010094
207. Karra, A. G.; Tziortziou, M.; Kylindri, P.; Georgatza, D.; Gorgogietas, V. A.; Makiou, A.; Krokida, A.; Tsialtas, I.; Kalousi, F. D.; Papadopoulos, G. E.; Papadopoulou, K.; Psarra, A. G., Boswellic acids and their derivatives as potent regulators of glucocorticoid receptor actions. *Archives of biochemistry and biophysics* **2020**, 695, 108656. 10.1016/j.abb.2020.108656
208. Leung, K. W.; Leung, F. P.; Mak, N. K.; Tombran-Tink, J.; Huang, Y.; Wong, R. N., Protopanaxadiol and protopanaxatriol bind to glucocorticoid and oestrogen receptors in endothelial cells. *British journal of pharmacology* **2009**, 156, (4), 626-37. 10.1111/j.1476-5381.2008.00066.x
209. Hu, J.; Han, J.; Li, H.; Zhang, X.; Liu, L. L.; Chen, F.; Zeng, B., Human Embryonic Kidney 293 Cells: A Vehicle for Biopharmaceutical Manufacturing, Structural Biology, and Electrophysiology. *Cells, tissues, organs* **2018**, 205, (1), 1-8. 10.1159/000485501
210. Carvalho M.G., V. J. R., Oliveira L.F., Bezerra F.B., Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). *Química Nova* **1998**, 21, (6), 740-743. 10.1590/S0100-40421998000600014
211. Fotie, J.; Bohle, D. S.; Leimanis, M. L.; Georges, E.; Rukunga, G.; Nkengfack, A. E., Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda*. *Journal of natural products* **2006**, 69, (1), 62-7. 10.1021/np050315y
212. Cayme J.-M. C., R. C. Y., Structure elucidation of  $\beta$ -stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from *Sesbania grandiflora* [Linn.] Pers. and  $\beta$ -carotene from *Heliotropium indicum* Linn. by NMR spectroscopy. *The Journal of the Kapisanang Kimika ng Pilipinas (Chemical Society of the Philippines)* **2004**, 20, 5-12. 10.26534/kimika.v20i1.5-12
213. Kumar N., R. B., Seshadri T.R., Terpenoids of *Pterocarpus santalinus* heartwood. *Phytochemistry* **1974**, 13, (3), 633-636. 10.1016/S0031-9422(00)91365-7
214. Newmark R.A., M. R. N., <sup>13</sup>C-NMR spectra of cis-polymyrcene and cis-polyfarnesene. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **1988**, 26, 71-77. 10.1002/pola.1988.080260107

215. Barton, D. H. R.; Seoane, E., 801. Triterpenoids. Part XXII. The constitution and stereochemistry of masticadienonic acid. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1956**, 4150. 10.1039/jr9560004150
216. Lawali, Y.; Mehmet, A.; Tuba, A.; Ahmet, C., Antidiabetic and Anticholinesterase Properties of Extracts and Pure Metabolites of Fruit Stems of Pistachio (*Pistacia vera* L.). *Current Organic Chemistry* **2020**, *24*, 785-797. 10.2174/1385272824666200401111036
217. Mulholland D.A., N. J. J., Triterpenoids from *Dysoxylum pettigrewianum*. *Phytochemistry* **1994**, *37*, (5), 1409-1411. 10.1016/S0031-9422(00)90421-7
218. Sholichin M., Y. K., Kasai R., Tanaka O., <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance of Lupane-Type Triterpenes, Lupeol, Betulin and Betulinic Acid. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1980**, *28*, (3), 1006-1008. 10.1248/cpb.28.1006
219. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **1976**, *72*, 248-54. 10.1006/abio.1976.9999
220. Azad, T.; Tashakor, A.; Hosseinkhani, S., Split-luciferase complementary assay: applications, recent developments, and future perspectives. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2014**, *406*, (23), 5541-60. 10.1007/s00216-014-7980-8
221. Labus, K., Effective detection of biocatalysts with specified activity by using a hydrogel-based colourimetric assay - beta-galactosidase case study. *PloS one* **2018**, *13*, (10), e0205532. 10.1371/journal.pone.0205532
222. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **1983**, *65*, (1-2), 55-63. 10.1016/0022-1759(83)90303-4
223. Livak, K. J.; Schmittgen, T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, (4), 402-8. 10.1006/meth.2001.1262
224. Kalousi, F. D.; Pollastro, F.; Christodoulou, E. C.; Karra, A. G.; Tsialtas, I.; Georgantopoulos, A.; Salamone, S.; Psarra, A. G., Apoptotic, Anti-Inflammatory Activities and Interference with the Glucocorticoid Receptor Signaling of Fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia* Leaves. *Plants* **2022**, *11*, (7). 10.3390/plants11070934
225. Friedman, J. E.; Yun, J. S.; Patel, Y. M.; McGrane, M. M.; Hanson, R. W., Glucocorticoids regulate the induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes. *The Journal of biological chemistry* **1993**, *268*, (17), 12952-7.
226. Olkku, A.; Bodine, P. V.; Linnala-Kankkunen, A.; Mahonen, A., Glucocorticoids induce glutamine synthetase expression in human osteoblastic cells: a novel observation in bone. *Bone* **2004**, *34*, (2), 320-9. 10.1016/j.bone.2003.09.010
227. Chianese, G.; Golin-Pacheco, S. D.; Tagliatela-Scafati, O.; Collado, J. A.; Munoz, E.; Appendino, G.; Pollastro, F., Bioactive triterpenoids from the caffeine-rich plants *guayusa* and *mate*. *Food research international* **2019**, *115*, 504-510. 10.1016/j.foodres.2018.10.005
228. Yadav, P.; Yadav, R.; Jain, S.; Vaidya, A., Caspase-3: A primary target for natural and synthetic compounds for cancer therapy. *Chemical biology & drug design* **2021**, *98*, (1), 144-165. 10.1111/cbdd.13860
229. Avrutsky, M. I.; Troy, C. M., Caspase-9: A Multimodal Therapeutic Target With Diverse Cellular Expression in Human Disease. *Frontiers in pharmacology* **2021**, *12*, 701301. 10.3389/fphar.2021.701301
230. Alam, M.; Ali, S.; Mohammad, T.; Hasan, G. M.; Yadav, D. K.; Hassan, M. I., B Cell Lymphoma 2: A Potential Therapeutic Target for Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences* **2021**, *22*, (19). 10.3390/ijms221910442
231. Kalousi, F.; Pollastro, F.; Karra, A.; Tsialtas, I.; Georgantopoulos, A.; Salamone, S.; Psarra, A.-M., Regulation of Energy Metabolism and Anti-Inflammatory Activities of *Mastiha* Fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*. *Foods* **2023**, *12*, (7), 1390. 10.3390/foods12071390

232. Kraemer, W. J.; Ratamess, N. A.; Hymer, W. C.; Nindl, B. C.; Fragala, M. S., Growth Hormone(s), Testosterone, Insulin-Like Growth Factors, and Cortisol: Roles and Integration for Cellular Development and Growth With Exercise. *Frontiers in endocrinology* **2020**, *11*, 33. 10.3389/fendo.2020.00033
233. Milia, E.; Bullitta, S. M.; Mastandrea, G.; Szotakova, B.; Schoubben, A.; Langhansova, L.; Quartu, M.; Bortone, A.; Eick, S., Leaves and Fruits Preparations of Pistacia lentiscus L.: A Review on the Ethnopharmacological Uses and Implications in Inflammation and Infection. *Antibiotics* **2021**, *10*, (4). 10.3390/antibiotics10040425
234. Xue, H.; Jiang, Y.; Zhao, H.; Kollner, T. G.; Chen, S.; Chen, F.; Chen, F., Characterization of Composition and Antifungal Properties of Leaf Secondary Metabolites from Thirteen Cultivars of Chrysanthemum morifolium Ramat. *Molecules* **2019**, *24*, (23). 10.3390/molecules24234202
235. Yu, S.; Meng, S.; Xiang, M.; Ma, H., Phosphoenolpyruvate carboxykinase in cell metabolism: Roles and mechanisms beyond gluconeogenesis. *Molecular metabolism* **2021**, *53*, 101257. 10.1016/j.molmet.2021.101257
236. Ferreira, R. G.; Silva Junior, W. F.; Veiga Junior, V. F.; Lima, A. A.; Lima, E. S., Physicochemical Characterization and Biological Activities of the Triterpenic Mixture alpha,beta-Amyrenone. *Molecules* **2017**, *22*, (2). 10.3390/molecules22020298
237. Gupta, R.; Sharma, A. K.; Sharma, M. C.; Dobhal, M. P.; Gupta, R. S., Evaluation of antidiabetic and antioxidant potential of lupeol in experimental hyperglycaemia. *Natural product research* **2012**, *26*, (12), 1125-9. 10.1080/14786419.2011.560845
238. Malik, A.; Jamil, U.; Butt, T. T.; Waquar, S.; Gan, S. H.; Shafique, H.; Jafar, T. H., In silico and in vitro studies of lupeol and iso-orientin as potential antidiabetic agents in a rat model. *Drug design, development and therapy* **2019**, *13*, 1501-1513. 10.2147/DDDT.S176698
239. Liu, K.; Zhang, X.; Xie, L.; Deng, M.; Chen, H.; Song, J.; Long, J.; Li, X.; Luo, J., Lupeol and its derivatives as anticancer and anti-inflammatory agents: Molecular mechanisms and therapeutic efficacy. *Pharmacological research* **2021**, *164*, 105373. 10.1016/j.phrs.2020.105373
240. Saleem, M., Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer letters* **2009**, *285*, (2), 109-15. 10.1016/j.canlet.2009.04.033
241. Zeng, K.; Thompson, K. E.; Yates, C. R.; Miller, D. D., Synthesis and biological evaluation of quinic acid derivatives as anti-inflammatory agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2009**, *19*, (18), 5458-60. 10.1016/j.bmcl.2009.07.096
242. Qabaha, K.; Ras, S. A.; Abbadi, J.; Al-Rimawi, F., Anti-Inflammatory Activity of Eucalyptus Spp. And Pistacia Lentiscus Leaf Extracts. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM* **2016**, *13*, (5), 1-6. 10.21010/ajtcam.v13i5.1
243. Wang, J.; Fang, X.; Ge, L.; Cao, F.; Zhao, L.; Wang, Z.; Xiao, W., Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. *PloS one* **2018**, *13*, (5), e0197563. 10.1371/journal.pone.0197563
244. Wang, L.; Cai, Y.; Jian, L.; Cheung, C. W.; Zhang, L.; Xia, Z., Impact of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha on diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular diabetology* **2021**, *20*, (1), 2. 10.1186/s12933-020-01188-0
245. Dubois, V.; Eeckhoutte, J.; Lefebvre, P.; Staels, B., Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *The Journal of clinical investigation* **2017**, *127*, (4), 1202-1214. 10.1172/JCI88894
246. Hong, F.; Pan, S.; Guo, Y.; Xu, P.; Zhai, Y., PPARs as Nuclear Receptors for Nutrient and Energy Metabolism. *Molecules* **2019**, *24*, (14). 10.3390/molecules24142545
247. Christ-Crain, M.; Kola, B.; Lolli, F.; Fekete, C.; Seboek, D.; Wittmann, G.; Feltrin, D.; Igreja, S. C.; Ajodha, S.; Harvey-White, J.; Kunos, G.; Muller, B.; Pralong, F.; Aubert, G.; Arnaldi, G.; Giacchetti, G.; Boscaro, M.; Grossman, A. B.; Korbonits, M., AMP-activated protein kinase mediates glucocorticoid-induced metabolic changes: a novel mechanism in Cushing's syndrome. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2008**, *22*, (6), 1672-83. 10.1096/fj.07-094144



248. Chen, X.; Li, X.; Zhang, W.; He, J.; Xu, B.; Lei, B.; Wang, Z.; Cates, C.; Rousselle, T.; Li, J., Activation of AMPK inhibits inflammatory response during hypoxia and reoxygenation through modulating JNK-mediated NF-kappaB pathway. *Metabolism: clinical and experimental* **2018**, *83*, 256-270. 10.1016/j.metabol.2018.03.004
249. He, C.; Li, H.; Viollet, B.; Zou, M. H.; Xie, Z., AMPK Suppresses Vascular Inflammation In Vivo by Inhibiting Signal Transducer and Activator of Transcription-1. *Diabetes* **2015**, *64*, (12), 4285-97. 10.2337/db15-0107
250. Sanchez-Monroy, M. B.; Jacobo-Herrera, N. J.; Zentella-Dehesa, A.; Hernandez-Tellez, B.; Martinez-Vazquez, M., Masticadienonic and 3&#945;-OH Masticadienoic Acids Induce Apoptosis and Inhibit Cell Proliferation and Tumor Growth in Prostate Cancer Xenografts in Vivo. *Molecules* **2017**, *22*, (9). 10.3390/molecules22091479
251. Lee, C.; Lee, J. W.; Seo, J. Y.; Hwang, S. W.; Im, J. P.; Kim, J. S., Lupeol inhibits LPS-induced NF-kappa B signaling in intestinal epithelial cells and macrophages, and attenuates acute and chronic murine colitis. *Life sciences* **2016**, *146*, 100-8. 10.1016/j.lfs.2016.01.001
252. Holanda Pinto, S. A.; Pinto, L. M.; Cunha, G. M.; Chaves, M. H.; Santos, F. A.; Rao, V. S., Anti-inflammatory effect of alpha, beta-Amyrin, a pentacyclic triterpene from Protium heptaphyllum in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology* **2008**, *16*, (1), 48-52. 10.1007/s10787-007-1609-x
253. Thirupathi, A.; Silveira, P. C.; Nesi, R. T.; Pinho, R. A., beta-Amyrin, a pentacyclic triterpene, exhibits anti-fibrotic, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects on dimethyl nitrosamine-induced hepatic fibrosis in male rats. *Human & experimental toxicology* **2017**, *36*, (2), 113-122. 10.1177/0960327116638727
254. Krishnan, K.; Mathew, L. E.; Vijayalakshmi, N. R.; Helen, A., Anti-inflammatory potential of beta-amyrin, a triterpenoid isolated from Costus igneus. *Inflammopharmacology* **2014**, *22*, (6), 373-85. 10.1007/s10787-014-0218-8
255. Barros, F. W.; Bandeira, P. N.; Lima, D. J.; Meira, A. S.; de Farias, S. S.; Albuquerque, M. R.; dos Santos, H. S.; Lemos, T. L.; de Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; Pessoa Cdo, O., Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2011**, *19*, (3), 1268-76. 10.1016/j.bmc.2010.12.016
256. Maiyo, F.; Moodley, R.; Singh, M., PHYTOCHEMISTRY, CYTOTOXICITY AND APOPTOSIS STUDIES OF B-SITOSTEROL-3-O-GLUCOSIDE AND Beta -AMYRIN FROM PRUNUS AFRICANA. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM* **2016**, *13*, (4), 105-112. 10.21010/ajtcam.v13i4.15
257. Wen, S.; Gu, D.; Zeng, H., Antitumor effects of beta-amyrin in Hep-G2 liver carcinoma cells are mediated via apoptosis induction, cell cycle disruption and activation of JNK and P38 signalling pathways. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology* **2018**, *23*, (4), 965-970.

## ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Η ερευνητική εργασία υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. Υποψηφίων Διδασκτόρων» (Αριθμός Υποτροφίας: 466)



Επιπλέον, μέρος της παρούσας έρευνας χρηματοδοτήθηκε από την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (The Chios Gum Mastic Growers Association) και το mastihashop®.



**mastihashop**®  
THE GREEK SUPERFOOD