

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 αντιμικροβιακές, 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 δοσο-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 δοσο-εξαρτώμενη καταστολή της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB, 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-κB. 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-κB, 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 αντιφλεγμονώδη 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 συγκριμένα, τα μη πολικά, ημι-πολικά και πολικά κλάσματα των φύλλων και της ρητίνης μείωσαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων HEK293, με δοσο-εξαρτώμενο και χρόνο-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 μιτοχονδριακό 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. Εξάιρεση αποτέλεσε το ουδέτερο υποκλάσμα 5A, το οποίο προκάλεσε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9.