ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΓΚΑΝΤΟΥΝΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2020

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

ΦΟΙΤΗΤΗΣ: ΓΚΑΝΤΟΥΝΑΣ Α. ΙΩΑΝΝΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΔΡ. ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ ΨΑΡΡΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

INVESTIGATION OF THE REGULATION OF STEROID HORMONE RECEPTOR ACTIONS BY PLANT-DERIVED COMPOUNDS

STUDENT: GKANTOUNAS A. IOANNIS

SUPERVIVSOR: Dr. ANNA-MARIA PSARRA

LABORATORY OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL BIOCHEMISTRY

Το μυαλό δεν είναι ένα δοχείο που πρέπει να γεμίσει, αλλά μία φωτιά που πρέπει να ανάψει...

Πλούταρχος

Η δίψα μου για μάθηση συνάντησε την αρωγή του Ιδρύματος Μποδοσάκη, με τελικό αποτέλεσμα την παρακολούθηση των μαθημάτων, την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής και εν τέλει την απόκτηση του εν λόγου μεταπτυχιακού τίτλου.

Η ευόδωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το οποίο εδρεύει στη Λάρισα.

ΙΔΡΥΜΑ
ΜΠΟΔΟΣΑΚΗ

My deep desire for knowledge united with Bodossaki Foundation's help to reach courses attention and my thesi's integration of this MSc.

The present thesis has been prepared at the Laboratory of Structural and Functional Biochemistry, Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Health Sciences, University of Thessaly, Larissa, Greece.

<u>Υπεύθυνη καθηγήτρια</u>

Ψαρρά Άννα – Μαρία, *Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ*

<u>Τριμελής επιτροπή</u>

Ψαρρά Άννα – Μαρία, *Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ*

Λεωνίδας Δημήτριος, *Καθηγητής Βιοχημείας ΤΒΒ, ΠΘ*

Σκαμνάκη Βασιλική, *Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας- Μεταβολισμού ΤΒΒ, Π.Θ*

Περίληψη

Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι λαμβάνουν μέρος σε θεμελιώδεις για τον οργανισμό διεργασίες, όπως η ανάπτυξη και η διατήρηση της ομοιόστασης. Όλοι οι πυρηνικοί υποδοχείς παρουσιάζουν την ίδια βασική δομή, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση των πυρηνικών τους λειτουργιών και αποτελείται από έξι δομικές περιοχές (A-F domains). Οι υποδοχείς οιστρογόνων ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στη ρύθμιση πολυάριθμων φυσιολογικών διεργασιών στους ανθρώπους. Κύριος ενδογενής προσδέτης των υποδοχέων αυτών είναι η 17-β οιστραδιόλη (E_2). Χωρίζονται σε δύο κύριους υπότυπους, τον ERα και τον ERβ, κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς και ασκούν διαφορετικές δράσεις. Τα φυτοοιστρογόνα είναι φυτικές πολυφαινόλες ή προέρχονται από πρόδρομες φυτικές ενώσεις. Εμφανίζουν δομικές ομοιότητες με την E_2, και έχουν την ικανότητα να προκαλούν οιστρογονικές ή/και αντιοιστρογονικές δράσεις. Η επεξεργασία του φυτού Pistachia Lentiscus var. Chia (μαστιχόδεντρο) οδηγεί στην απόκτηση δύο κύριων παραγώγων: της ρητίνης της Μαστίχας και του μαστιχέλαιου. Η Μαστίχα Χίου αποτελείται από πληθώρα βιοδραστικών συστατικών, με κυριότερα τα τριτερπένια, ενώ το μαστιχέλαιο αποτελείται κυρίως από πτητικά μονοτερπένια. Η Μαστίχα είναι ευρέως γνωστή για τις θεραπευτικές της ιδιότητες από την αρχαιότητα. Σήμερα έχει ανακαλυφθεί πως ασκεί αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, υπολιπιδαιμικές και πολλές άλλες δράσεις, ενώ έχει γίνει αντικείμενο μελέτης για πληθώρα βιομηχανικών εφαρμογών, στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών κ.α. Επιπρόσθετα τα νανοσωματίδια είναι νανοϋλικά με διάμετρο 1-100 nm, εμφανίζουν μοναδικές φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες και παρουσιάζουν πληθώρα εφαρμογών σε πολλούς τομείς των βιοεπιστημών. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, σε όλες τις πειραματικές προσεγγίσεις χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα εμβρυονικά κύτταρα νεφρού HEK-293. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης με σκοπό να διερευνηθεί αν εκχυλίσματα Μαστίχας Χίου (ρητίνη) μπορούν να επηρεάσουν τη δράση των υποδοχέων οιστρογόνων, και ιδιαίτερα εάν μπορούν να ασκήσουν επιλεκτική δράση έναντι των δύο υποτύπων. Βρέθηκε πως η Μαστίχα Χίου όντως επηρεάζει τη μεταγραφική δραστικότητα των δύο υποτύπων, ERα και ERβ, χωρίς όμως αυτή της η δράση να είναι εκλεκτική για κάποιον τύπο υποδοχέα. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης και ανοσοαποτύπωσης κατά Western, ώστε να διερευνηθεί η πιθανή επίδραση του ημιπολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κB και της προκασπάσης-3 και περαιτέρω να γίνει σύγκριση των επιδράσεων αυτών μεταξύ εκχυλισμάτων φύλλων από το βόρειο και το νότιο τμήμα της νήσου Χίου. Επιπλέον, όσον αφορά τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, απαιτούνται περισσότερα πειράματα για τη λήψη ασφαλών συμπερασμάτων. Τέλος, με σκοπό την κατασκευή νανοσωματιδίων και τον έλεγχο της αποτελεσματικότητάς τους ως φορείς βιοδραστικών μορίων, όπως τα προαναφερθέντα, έλαβαν χώρα πειράματα διαμόλυνσης κυττάρων και μικροσκοπίας φθορισμού για την αξιολόγηση της έντασης φθορισμού νανοσωματιδίων C-dots σε in vitro σύστημα κυττάρων, ώστε σε μετέπειτα στάδιο να διερευνηθεί η πιθανή τους δράση ως διανομείς φαρμάκων. Όσον αφορά τα νανοσωματίδια C-dots, πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού έδειξαν πως η επαναδιαλυτοποίηση του λυοφυλιωμένου δείγματος σε dH_2O, οδήγησε σε τελικό προϊόν με μη επαρκή εγγενή φθορισμό, ενώ το ήδη διαλυτοποιημένο σε dH_2O παρασκεύασμα κουκίδων άνθρακα μετά την επώαση κύτταρων HEK-293 σε τελική αραίωση 1/50, διατηρεί ικανοποιητικό εγγενή φθορισμό, με υποσχόμενη δυνατότητα διαμόλυνσης των κυττάρων αλλά με πολύ μικρό χρόνο διάρκειας φθορισμού.

Λέξεις-κλειδιά: υποδοχείς οιστρογόνων, ERα, ERβ, φυτοοιστρογόνα, Μαστίχα Χίου, νανοσωματίδια, NF-κB, p65, προκασπάση-3

Abstract

Nuclear receptors are a group of ligand-dependent transcription factors, which are crucial for fundamental processes of human physiology, such as development and maintenance of homeostasis. The members of the group share a common six-region structure (A-F domains) that is vital for understanding of their functions. Estrogen receptors belong to the nuclear receptors superfamily and function as transcription factors involved in the regulation of numerous normal processes in humans. The major endogenous ligand of ERs is 17-β estradiol. They are divided into two main subtypes, ERα and ERβ, which are encoded by different genes, expressed in different tissues and have diverse biological actions. Phytoestrogens are plant polyphenols or derived from plant precursors. They are similar to human estrogenic compounds, especially with 17-β-estradiol and can act as estrogen mimics or/and counteract estrogenic effects. Pistachia Lentiscus var. Chia (mastic tree) is grown in Chios Island, Greece. The two main derivatives from mastic tree are mastic resin and mastic oil. Chios Mastiha (CM) consists of bioactive ingredients, mainly triterpenes, while mastic oil consists mainly of volatile monoterpenes. Is a common knowledge that CM exerts a variety of beneficial properties since ancient times. Today, it has been known that CM exhibits antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, anticancer, hypolipidemic and many other effects, while it can be used for plenty of industrial applications, such as food and cosmetics industry. In addition, the nanoparticles are nanomaterials with a diameter of 1-100 nm, which exhibit unique physicochemical and biological properties and can be used in very many bioscience applications. In the present thesis, Human Embryonic Kidney cells, HEK-293, has been used in all experimental procedures that described below. Firstly, luciferase/β-galactosidase experiments were performed to investigate whether Chios Mastiha leaf extracts could selectively modulate the action of estrogen receptors. It was found that Chios Mastiha affects the transcriptional activity of ERα and ERβ, but without any further selectivity. In addition, SDS-PAGE electrophoresis and Western blotting experiments were performed to investigate the possible effect of the semi-polar fraction of mastic tree leaf extracts on the protein levels of the NF-κB subunit p65 and procaspase-3 protein. Furthermore, a comparison about these effects between leaf extracts from the northern and southern part of Chios island has followed. We can conclude that more Western blot experiments are required to reach safe conclusions. Finally, cell transfection and microscopy fluorescence experiments were performed in order to develop nanoparticles, and to test their effectiveness as carriers of bioactive molecules, such as those mentioned above. Those experiments took land to assess the fluorescence intensity of C-dots nanoparticles in vitro. This is the first step of a widely study about their plausible action as drug carriers. Fluorescence microscopy experiments showed that lyophilized sample (dissolved in dH_2O) of C-dots had no inherent fluorescence. On the contrary, dissolved in dH_2O sample at final dilution 1/50 performed inherent fluorescence with a very short fluorescence duration.

Keywords: estrogen receptors, ERα, ERβ, phytoestrogens, Chios, Mastiha, nanoparticles, NF-κB, p65, procaspase-3

Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων πινάκων

Πίνακας περιεχομένων εικόνων

Πίνακας περιεχομένων διαγραμμάτων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς

Οι πυρηνικοί υποδοχείς (Nuclear Receptors, NRs) είναι μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ενεργοποιούνται από κάποιον προσδέτη *(Li & Chiang, 2013)*. Οι NRs αποκρίνονται σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, ελέγχοντας την έκφραση των γονιδίων στόχων πολυκύτταρων οργανισμών και επομένως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης *(Soccio, 2020)*. Οι προσδέτες τους είναι συνήθως μικρά λιπόφιλα μόρια που χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: α) στις ορμόνες που κυκλοφορούν για να επηρεάσουν μακρινά όργανα, β) στα μόρια που παράγονται τοπικά από το φυσιολογικό μεταβολισμό και γ) στις εξωγενείς ενώσεις όπως είναι τα φάρμακα ή τα ξενοβιοτικά *(Li & Chiang, 2013); (Soccio, 2020)*. Με την πρόσδεση και την ενεργοποίηση του προσδέτη, οι πυρηνικοί υποδοχείς ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, σχετιζόμενες με την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και το μεταβολισμό *(Li & Chiang, 2013)*.

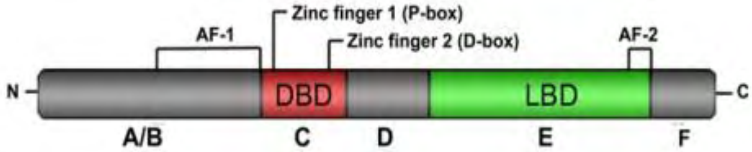
Η υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων αποτελείται από 48 μέλη που χωρίζονται σε διαφορετικές υποοικογένειες, σύμφωνα με την ομολογία της αμινοξικής αλληλουχίας τους, στους ανθρώπους *(Neels et al., 2020); (Caboni & Loyd, 2012)*. Η οικογένεια των NRs περιλαμβάνει τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών, θυρεοειδικών ορμονών, ρετινοϊκού οξέος, λιπόφιλων βιταμινών (βιταμίνη D), λιπαρών οξέων και των μεταβολιτών της χοληστερόλης (οξυστερόλες) *(Burris et al., 2013); (Zhao et al., 2019)*. Περίπου για τους μισούς από αυτούς, οι ενδογενείς προσδέτες είναι καλά χαρακτηρισμένοι *(Caboni & Loyd, 2012)*. Ωστόσο από τα 48 μέλη, 36 υποδοχείς αρχικά περιγράφηκαν ως ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς (Orphan Nuclear Receptors-ONRs) επειδή η ακριβής λειτουργία τους και οι φυσικοί προσδέτες δεν είχαν εξακριβωθεί. Σχετικά πρόσφατες ερευνητικές προσπάθειες όμως, είχαν ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη φυσικών ή συνθετικών προσδετών για 21 από αυτούς τους ONRs *(Rosha-Morini et al., 2014)*.

Οι βασικές διεργασίες που επιτελούνται με τη βοήθεια των NRs, τους καθιστά ιδανικούς στόχους φαρμάκων, για τους οποίους μπορούν να κατασκευαστούν επιλεκτικοί αγωνιστές και ανταγωνιστές *(Caboni & Loyd, 2012); (Sever & Glass, 2013)*. Όλοι οι NRs που έχουν διακριτούς προσδέτες είναι καλά χαρακτηρισμένοι στόχοι για την ανάπτυξη φαρμάκων, για τη θεραπεία πολλών ασθενειών όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, η αθηροσκλήρωση, η φλεγμονή, οι ενδοκρινικές/ αναπαραγωγικές διαταραχές *(Burris et al., 2013)*. Επιπρόσθετα, οι NRs βρίσκονται μεταξύ των τεσσάρων κορυφαίων οικογενειών-στόχων φαρμάκων και αντιπροσωπεύουν περίπου το 13% όλων των φαρμάκων που έχουν εγκριθεί από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α (Food and Drug Administration- FDA) *(Rosha-Morini et al., 2014); (Soccio, 2020)*.

Οι δράσεις των NRs ρυθμίζονται από διάφορους ενδογενείς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν: (1) δέσμευση προσδέτη, (2) μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις κατάλοιπων αμινοξέων (όπως η φωσφορυλίωση, η ουβικουιτίνωση και η σουμοϋλύωση), (3) διμερισμό πρωτεϊνών, (4) πυρηνική μετατόπιση ή μετακίνηση, (5) αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με ενεργοποιητές και καταστολείς και (6) συνεργατική δέσμευση στο DNA με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες *(Rosha-Morini et al., 2014); (Sever & Glass, 2013)*. Γενικά, κάθε NR επιτυγχάνει τις μεταγραφικές του δράσεις επικουρικά με έναν αριθμό πρωτεϊνών συν-ρυθμιστών, είτε συν-ενεργοποιητών (οι οποίοι «στρατολογούνται» στο δεσμευμένο με προσδέτη υποδοχέα, είτε συν- καταστολέων (οι οποίοι «στρατολογούνται» όταν δεν υπάρχει προσδεδεμένος προσδέτης ή μετά την ενεργοποίησή του υποδοχέα από ανταγωνιστές). Οι τρόποι με τους οποίους οι συν-ρυθμιστές επηρεάζουν τη δράση των NRs είναι ποικίλοι και περιλαμβάνουν την προώθηση της στρατολόγησης του μεταγραφικού συμπλόκου, την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, την τροποποίηση των ιστονών ή δρώντας ως συνοδές πρωτεΐνες (chaperones) *(Zhao et al., 2019)*.

1.1.1 Δομή πυρηνικών υποδοχέων

Όλοι οι πυρηνικοί υποδοχείς, ακόμα και αν επιτελούν διαφορετικές διεργασίες, παρουσιάζουν την ίδια βασική δομή *(Levin & Hammes, 2016); (Caboni & Loyd, 2012)*. Οι NRs αποτελούνται από μία αμινοτελική επικράτεια, μία επικράτεια πρόσδεσης στο DNA, μία επικράτεια άρθρωσης και τέλος μία επικράτεια δέσμευσης του προσδέτη (εικόνα 1). Κάθε επικράτεια είναι υπεύθυνη για διακριτές λειτουργίες μέσω της σύνδεσης στο DNA ή σε συγγενείς πρωτεΐνες *(Buzon et al. 2012)*.



Εικόνα 1. *Σχηματική απεικόνιση της δομής των πυρηνικών υποδοχέων (Vogeler et al., 2014).*

Πιο συγκεκριμένα η δομή των NRs περιλαμβάνει έξι διακριτές περιοχές, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως A-F (A-F domains). Αρχικά η αμινοτελική περιοχή είναι εξαιρετικά μεταβλητή και αποτελεί τη λιγότερο συντηρημένη επικράτεια των πυρηνικών υποδοχέων *(Neels et al., 2020)*. Περιλαμβάνει τις περιοχές **A** και **B**, καθώς και μια θέση δέσμευσης για μεταγραφικούς συν-ρυθμιστές με λειτουργία ενεργοποίησης της μεταγραφής, γνωστή ως AF-1 (Activation Function-1 site). Η AF-1 ρυθμίζει τη γονιδιακή μεταγραφή με τρόπο ανεξάρτητο από τη σύνδεση κάποιου προσδέτη *(Levin & Hammes, 2016); (Rosha-Morini et al., 2014); (Caboni & Loyd, 2012)*.

Ακολουθεί η περιοχή **C** γνωστή και ως **DBD** (**DNA Binding Domain**). Η DBD είναι η πλέον συντηρημένη περιοχή της υπεροικογένειας των NRs. Κύρια λειτουργία της αποτελεί η αναγνώριση ρυθμιστικών περιοχών σε γονίδια-στόχους στο DNA και η δέσμευση των NRs σε τέτοιες περιοχές, οι οποίες είναι γνωστές ως στοιχεία απόκρισης (Response Elements, REs) *(Caboni & Loyd, 2012); (Pawlak et al., 2012)*. Η DBD αποτελείται από δύο α-έλικες, κάθετη η μία προς την άλλη, οι οποίες σταθεροποιούνται από δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου πλούσια σε κυστεΐνη. Καθένα από αυτά τα δύο μοτίβα συγκρατεί τετραεδρικά ένα ιόν Zn^{++}. Το πρώτο μοτίβο περιέχει το εξαιρετικά συντηρημένο **P-box**, το οποίο καθορίζει την εξειδίκευση της αλληλουχίας για τη σύνδεση στα στοιχεία απόκρισης. Κάθε μονομερές ενός NR συνδέεται εξειδικευμένα στο DNA μέσω της πρώτης N-τελικής έλικας. Η δεύτερη C-τελική έλικα συμβάλλει στη σταθεροποίηση της δομής της DBD, δημιουργώντας ασθενέστερη, μη ειδική σύνδεση στο DNA. Τέλος, ο δεύτερος δακτύλιος περιέχει το **D-box**, ένα μικρό μοτίβο πέντε αμινοξέων που εμπλέκεται στο διμερισμό του υποδοχέα *(Caboni & Loyd, 2012); (Pawlak et al., 2012)*.

Η **D** είναι μία περιοχή εύκαμπτης άρθρωσης (hinge) που συνδέει τις περιοχές LBD και DBD και συμβάλει στις περιστροφές της DBD, επιτρέποντας την άμεση ή ανεστραμμένη δέσμευση και το διμερισμό των NRs στα REs. Εμφανίζει πολύ χαμηλή συντήρηση σε επίπεδο ακολουθίας μεταξύ των διάφορων πυρηνικών υποδοχέων *(Pawlak et al., 2012)*. Τέτοιες περιοχές έχει αποδειχθεί πως περιέχουν μοτίβα υπεύθυνα για τη ρύθμιση της υποκυτταρικής κατανομής, φιλοξενώντας σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), *(Pawlak et al., 2012); (Caboni & Loyd, 2012)* και χρησιμεύουν ως θέσεις δέσμευσης για συν-κατασταλτικές πρωτεΐνες *(Rosha-Morini et al., 2014)*.

Η περιοχή **E** -γνωστή ως **LBD** (**Ligand Binding Domain**)- βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο των NRs, αποτελούμενη από δώδεκα άλφα έλικες που δημιουργούν έναν υδρόφοβο θύλακα, μέσα στον οποίο δεσμεύονται υδρόφοβοι προσδέτες *(Sladek, 2011); (Vogeler et al., 2014)*. Η LBD παρουσιάζει μέτρια συντήρηση σε επίπεδο αλληλουχίας μεταξύ των NRs, αλλά διαθέτει παρόμοιες τρισδιάστατες δομές *(Rosha-Morini et al., 2014)*. Ακόμα η LBD περιέχει την προσδετοεξαρτώμενη θέση AF-2 (Activation Factor-2) που εμφανίζει λειτουργία ενεργοποίησης της μεταγραφής και συνεργάζεται με την AF-1 για τη σταθεροποίηση της επαγωγικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης *(Vogeler et al., 2014); (Burris et al., 2013)*.

Τέλος η περιοχή **F** βρίσκεται στο C-τελικό άκρο των NR και παρατηρείται σε μερικούς μόνο υποδοχείς. Επιπλέον ποικίλλει σε μήκος μεταξύ διάφορων πυρηνικών υποδοχέων *(Vogeler et al., 2014)* και λόγω της υψηλής μεταβλητότητάς της σε επίπεδο αλληλουχίας, εξακολουθεί να έχει έναν ασαφή ρόλο στη λειτουργία των NRs *(Burris et al., 2013); (Pawlak et al., 2012)*.

1.1.2 Ταξινόμηση

Οι πυρηνικοί υποδοχείς δρουν σε μεγάλα μεταγραφικά σύμπλοκα ως μονομερή, ομοδιμερή ή ετεροδιμερή και αναγνωρίζουν αλληλουχίες DNA που ορίζονται ως στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (Hormone Response Elements, HREs) *(Neels et al., 2020)*. Οι NRs ομαδοποιούνται σε τέσσερις ομάδες με βάση τα στοιχεία απόκρισης στο DNA στα οποία συνδέονται, το διμερισμό και τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό απουσία προσδέτη *(Soccio, 2020)*.

Στους υποδοχείς **τύπου I** ανήκουν οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων ανδρογόνων, οιστρογόνων και προγεστερόνης *(Sever & Glass, 2013)*. Απουσία προσδέτη, οι NRs της ομάδα αυτής βρίσκονται αγκυροβολημένοι στο κυτταρόπλασμα με πρωτεΐνες συνοδούς (π.χ. HSP90). Η δέσμευση προσδέτη έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό του υποδοχέα από τα chaperones, τον ομοδιμερισμό του και τη μετατόπιση του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Εκεί το σύμπλοκο προσδέτη-υποδοχέα συνδέεται στα HREs με απώτερο σκοπό την ενεργοποίηση της μεταγραφής στα γονίδια-στόχους *(Soccio, 2020)*.

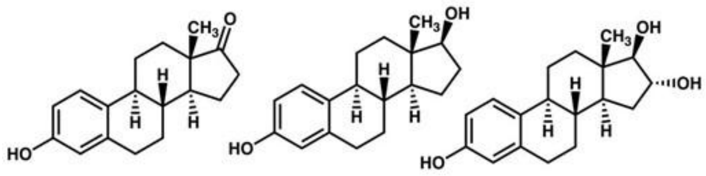
Οι υποδοχείς **τύπου II** αντιθέτως, βρίσκονται στον πυρήνα, συνδεδεμένοι με τα ειδικά στοιχεία απόκρισης στο DNA (DNA response elements, DREs) ακόμη και απουσία προσδέτη. Στην παρούσα κατηγορία ανήκουν ο υποδοχέας θυρεοειδικών ορμονών (THR) και ο υποδοχέας ρετινοϊκού οξέος κ.α. *(Sever & Glass, 2013)*. Οι υποδοχείς αυτοί σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον Retinoid X Receptor (RXR). Απουσία προσδέτη, τα ετεροδιμερή αυτά συνδέονται με πρωτεΐνες-καταστολείς και μειώνουν δραστικά την έκφραση των γονιδίων-στόχων, με αποτέλεσμα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης ακόμα και από το βασικό επίπεδο απουσία υποδοχέα. Η δέσμευση του προσδέτη στην LBD του υποδοχέα οδηγεί σε αλλαγή διαμόρφωσης, απομάκρυνση των καταστολέων και αντικατάστασή τους με σύμπλοκα συν-ενεργοποιητών *(Soccio, 2020)*. Οι υποδοχείς **τύπου III** λειτουργούν παρόμοια με τους υποδοχείς τύπου I, δεδομένου πως και οι δύο κατηγορίες υποδοχέων συνδέονται στο DNA ως ομοδιμερή. Ωστόσο παρουσιάζουν πυρηνικό εντοπισμό και σε αντίθεση με τους υποδοχείς τύπου I δεσμεύονται στα HREs σε άμεσες επαναλήψεις (Direct Repeat, DRs) και όχι σε ανεστραμμένες (Inverted Repeats, IRs) *(Sever & Glass, 2013); (Soccio, 2020)*.

Τέλος, οι υποδοχείς **τύπου IV**, δεσμεύονται στο DNA ως μονομερή σε ημίσειες θέσεις (half sites) HREs και/ή ως διμερή σε άμεσες επαναλήψεις *(Soccio, 2020)*.

1.2 Υποδοχείς οιστρογόνων

Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών συμμετέχουν σε πολλές κρίσιμες βιολογικές διαδικασίες και θεωρείται πως ενεργούν ως μεταγραφικοί ρυθμιστές στον πυρήνα. Εντοπίζονται στον πυρήνα (85%), στην πλασματική μεμβράνη (5%) και τα μιτοχόνδρια (10%) *(Psarra & Sekeris, 2008)*. Τα στεροειδή εισέρχονται στα κύτταρα μέσω της πλασματικής μεμβράνης και συνδέονται με κατάλληλους υποδοχείς (π.χ γλυκοκορτικοειδών ή οιστρογόνων). Στη συνέχεια, το σύμπλοκο αυτό μετατοπίζεται στον πυρήνα και συνδέεται σε συγκεκριμένα στοιχεία απόκρισης πυρηνικού DNA για τη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων *(Levin & Hammes, 2016)*.

Τα οιστρογόνα είναι η κύρια γυναικεία ορμόνη, που συντίθεται στις ωοθήκες. Στα αρσενικά πολύ χαμηλότερες ποσότητες οιστρογόνων παράγονται στους όρχεις *(Soccio, 2020)*. Ρυθμίζουν διάφορες φυσιολογικές διεργασίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη και μπορούν να συντεθούν σε μη αναπαραγωγικούς ιστούς όπως το ήπαρ, η καρδιά, οι μύες, τα οστά και ο εγκέφαλος *(Jia et al., 2015); (Cui et al., 2013)*. Τα οιστρογόνα είναι ένας γενικός όρος που αναφέρεται στις ενδογενείς οιστρογονικές ενώσεις οιστρόνη (E_1), 17β-οιστραδιόλη (E_2) και οιστριόλη (E_3) *(Gupta & Mayer, 2013)*. Τα οιστρογόνα δρουν μέσω δύο τύπων υποδοχέων: τους υποδοχείς οιστρογόνων και τους μεμβρανικούς υποδοχείς GPR30 και ER-X. Οι μεταβολίτες αυτών των οιστρογόνων έχει αποδειχθεί ότι διαμορφώνουν πολλαπλές πτυχές του φυσιολογικού μεταβολισμού των οργάνων *(Levin & Hammes, 2016)*. Η ανισορροπία στα επίπεδα ή τις λειτουργίες των οιστρογόνων σχετίζεται με καρκίνο, μεταβολικές και νευρολογικές παθήσεις *(Desoouza et al., 2020)*.



Οιστρόνη **Οιστραδιόλη** **Οιστριόλη**

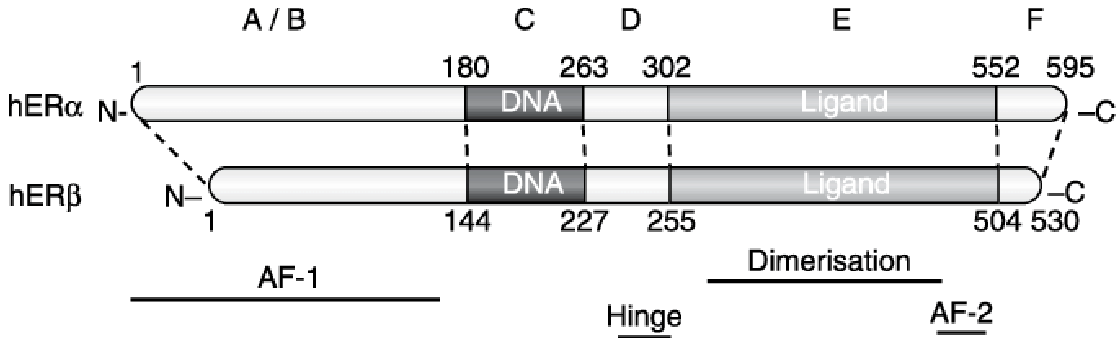
Εικόνα 2. *Οι χημικές δομές των τριών κύριων ενδογενών οιστρογονικών ενώσεων οιστρόνη (Ε1), 17β-οιστραδιόλη (Ε2) και οιστριόλη (Ε3) (Binder et al., 2015).*

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ERs) είναι πυρηνικοί υποδοχείς τύπου I (NR3A). Αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στη ρύθμιση πολύπλοκων φυσιολογικών διεργασιών στους ανθρώπους και εντοπίζονται στους ιστούς της γυναικείας αναπαραγωγικής οδού και του μαστού, στα οστά, στον εγκέφαλο, στο ήπαρ, στο παχύ έντερο, στο δέρμα και στους σιελογόνους αδένες *(Eyster, 2016); (Jia et al., 2015)*. Η δέσμευση οιστρογόνων στους ERs μπορεί να οδηγήσει τόσο σε γονιδιωματικές όσο και σε ταχείες μη-γονιδιωματικές δράσεις, ανάλογα αν το τελικό αποτέλεσμα οδηγεί σε μεταγραφική ρύθμιση *(Neels et al., 2020); (Cui et al., 2013)*. Κύριο ενδογενή προσδέτη των ERs αποτελεί η E_2, η οποία εμφανίζει πολύ υψηλή συγγένεια πρόσδεσης, 12 φορές υψηλότερη από εκείνη της οιστρόνης και 80 φορές υψηλότερη από εκείνη της οιστριόλης *(Kwakowsky et al., 2016); (Burris et al., 2013)*.

1.2.1 Υπότυποι

Οι κυτταρικές επιδράσεις των οιστρογόνων μεσολαβούνται από δύο υπότυπους του υποδοχέα οιστρογόνων, τον ERα και τον ERβ *(Jia et al., 2015)*. Ο ERα ήταν ο πρώτος υποδοχέας που ανακαλύφθηκε, στο εργαστήριο του Elwood Jensen το 1958. Το αντίστοιχο γονίδιο κλωνοποιήθηκε το 1985. Ωστόσο, πολλές φορές παρατηρήθηκαν αντικρουόμενες δράσεις της οιστραδιόλης τα χρόνια που ακολούθησαν *(Burris et al., 2013); (Gustaffson , 2016); (Jia et al., 2015)*. Το 1996 τελικά, ένας δεύτερος υπότυπος ER, ο ERβ (NR3A2), κλωνοποιήθηκε από τον προστάτη και την ωοθήκη αρουραίου στο εργαστήριο του Jan-Ake Gustafsson *(Burris et al., 2013); (Jia et al., 2015)*.

Οι ERα και ERβ δεν είναι ισομορφές, αλλά ξεχωριστοί υποδοχείς που κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια σε διαφορετικά χρωμοσώματα *(Binder et al., 2015)*. Το γονίδιο του ERα, το ESR1, εδράζεται στο χρωμόσωμα 6 (6q25.1), ενώ εκείνο του ERβ, το ESR2, στο χρωμόσωμα 14 (14q23.2) *(Gustaffson , 2016); (Jia et al., 2015)*. Οι δύο υπότυποι μοιράζονται κοινή δομική και λειτουργική οργάνωση, περιέχουν την κλασσική δομή των πυρηνικών υποδοχέων, όπως συζητήθηκε παραπάνω (A-F domains) και μπορούν να λειτουργήσουν ως ομοδιμερή (ERα-ERα, ERβ-ERβ) ή ετεροδιμερή (ERα-ERβ) *(Burris et al., 2013); (Eyster, 2016); (Binder et al., 2015)*.



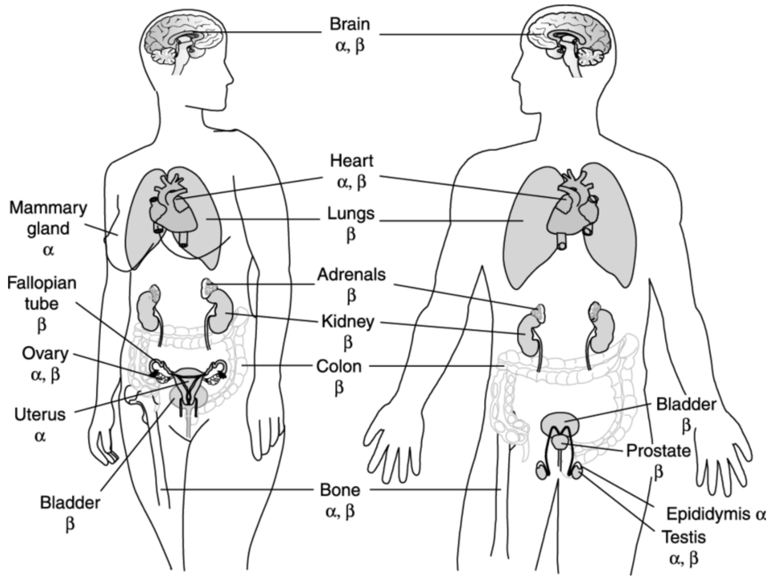
Εικόνα 3. *Σύγκριση της αλληλουχίας σε επίπεδο αμινοξέων των ανθρώπινων υποδοχέων ERα και ERβ (Drummond & Fuller, 2010).*

Η περιοχή A/B των δύο υποδοχέων, η οποία περιέχει τη σημαντική για τη μεταγραφή θέση δέσμευσης AF-1, παρουσιάζει μόλις 18% ομοιότητα. Αντίθετα η DBD διαθέτει υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ των ERα και ERβ με το ποσοστό ομολογίας να αγγίζει το 97%. Οι υποδοχείς προσδένονται στις ίδιες ειδικές αλληλουχίες DNA, γνωστές και ως Estrogen Response Elements (EREs) και αλληλεπιδρούν με τους ίδιους συν-ρυθμιστές *(Jia et al., 2015); (Eyster, 2016)*. Επιπλέον, οι LBDs των δύο υποτύπων, οι οποίες περιέχουν την επίσης σημαντική για τη μεταγραφή θέση δέσμευσης AF-2, εμφανίζουν μόλις 59% αμινοξική ομολογία, παρά το γεγονός πως οι θύλακες πρόσδεσης του προσδέτη, εμφανίζουν μικρές μόνο δομικές διαφορές. *(Jia et al., 2015); (Kwakowsky et al., 2016); (Desoouza et al., 2020)*.

1.2.2 Κατανομή στους ιστούς

Οι δύο υπότυποι, απατούνται σε πολλούς τύπους κυττάρων και ασκούν διακριτά βιολογικά αποτελέσματα. Οι ERα και ERβ εμφανίζουν ένα ξεχωριστό μοτίβο ιστοειδικής κατανομής στο ανθρώπινο σώμα, αν και ακόμα δεν είναι κατανοητό το τί καθορίζει το εν λόγω μοτίβο *(Cui et al., 2013); (Eyster, 2016)*.

Πιο συγκεκριμένα, ο ERα εκφράζεται κυρίως στη μήτρα και στις ωοθήκες, στο μαστικό αδένα, στους νεφρούς, στα οστά, στο λευκό λιπώδη ιστό, στο σκελετικό μυ, στο αγγειακό σύστημα, στην υπόφυση, στους όρχεις, στην επιδιδυμίδα, στα επινεφρίδια και στο ήπαρ (εικόνα 4) *(Jia et al., 2015); (Kwakowsky et al., 2016); (Desoouza et al., 2020); (Zhao et al., 2019)*. Αντίθετα, ο ERβ είναι πιο άφθονος στον υποθάλαμο, στα οστά, στο ενδοθήλιο, στη καρδιά, στο παχύ έντερο, στους νεφρούς, στους πνεύμονες, στον προστάτη, στις ωοθήκες, στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), στο καρδιαγγειακό σύστημα, στα ανδρικά αναπαραγωγικά όργανα, στην ουροδόχο κύστη και στο ανοσοποιητικό σύστημα *(Jia et al., 2015); (Burris et al., 2013); (Kwakowsky et al., 2016)*.



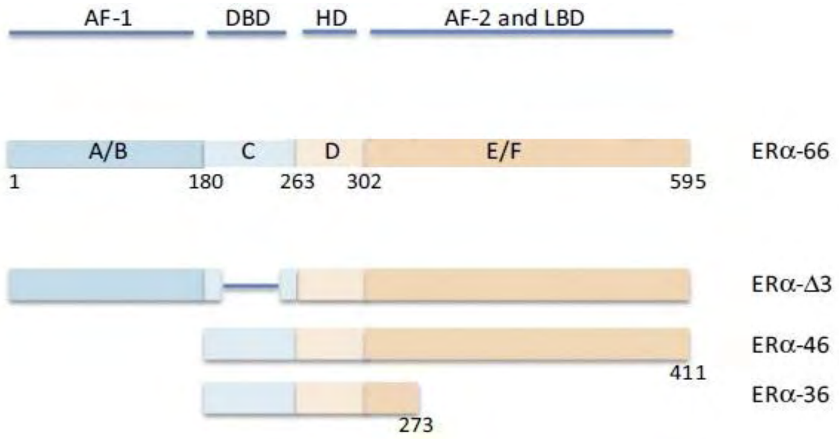
Εικόνα 4. *Η κατανομή των δύο υποτύπων του υποδοχέα οιστρογόνων, ERα και ERβ, στους διάφορους ιστούς (Drummond & Fuller, 2010).*

Ακόμη και στον ίδιο ιστό, η κατανομή των δύο υποτύπων ποικίλλει. Για παράδειγμα, στις ωοθήκες, ο ERα είναι πιο άφθονος στα κύτταρα theca και ο ERβ στα κύτταρα granulosa, ενώ στον προστάτη, ο ERα εκφράζεται κυρίως στο στρώμα και ο ERβ και στα στρωματικά και στα επιθηλιακά κύτταρα. Η διαφορική έκφραση των ERα και ERβ πιθανώς επιτρέπει την αυστηρή ρύθμιση των οιστρογονικών δράσεων με χωρικό τρόπο *(Desoouza et al., 2020)*. Στον εγκέφαλο, τόσο ο ERα όσο και ο ERβ εμφανίζουν ευρεία κατανομή και εκφράζονται σε νευρωνικά και μη νευρωνικά κύτταρα. Αν και η αλληλεπικαλυπτόμενη έκφραση των ERα και ERβ έχει παρατηρηθεί σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου, τα χωροχρονικά πρότυπα κατανομής και τα επίπεδα έκφρασης τους είναι επίσης διακριτά *(Cui et al., 2013)*.

Επιπλέον, οι δύο υποδοχείς έχουν αλληλεπικαλυπτόμενες και μη αλληλεπικαλυπτόμενες λειτουργίες. Οι δράσεις του ERβ σε πολλές περιπτώσεις αντιτίθενται στις δράσεις του ERα. Συνεπώς, ένας συγκεκριμένος προσδέτης οδηγεί σε διαφορετικά λειτουργικά αποτελέσματα ανάλογα με τον υπότυπο στον οποίο συνδέεται. Ο ERα ασκεί πολλαπλασιαστικές δράσεις και προάγει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων του μαστού, ενώ αντίθετα ο ERβ ασκεί αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις και δράσεις που αντιτίθενται στην εισβολή του όγκου κατά την έκφραση της άγριου τύπου πρωτεΐνης ERβ σε καρκινικά κύτταρα του μαστού. Επιπρόσθετα, ο λόγος της έκφρασης των δύο υποτύπων (ERα/ERβ) ποικίλλει από ιστό σε ιστό κατά την ανάπτυξη, τη γήρανση ή την κατάσταση της νόσου. Κατά την πρόοδο καρκίνων του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη φαίνεται πως παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του ERα και μείωση εκείνης του ERβ *(Xin et al., 2010); (Zhao et al., 2019); (Burris et al., 2013); (Thomas & Gustafsson, 2015)*. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης και η υποκυτταρική κατανομή των δύο υποδοχέων μπορούν να αλλάξουν κατά τη γήρανση, και αυτό πιθανότατα βασίζεται στη διαφορική απόκριση στα οιστρογόνα στον γηράσκοντα εγκέφαλο *(Cui et al., 2013)*.

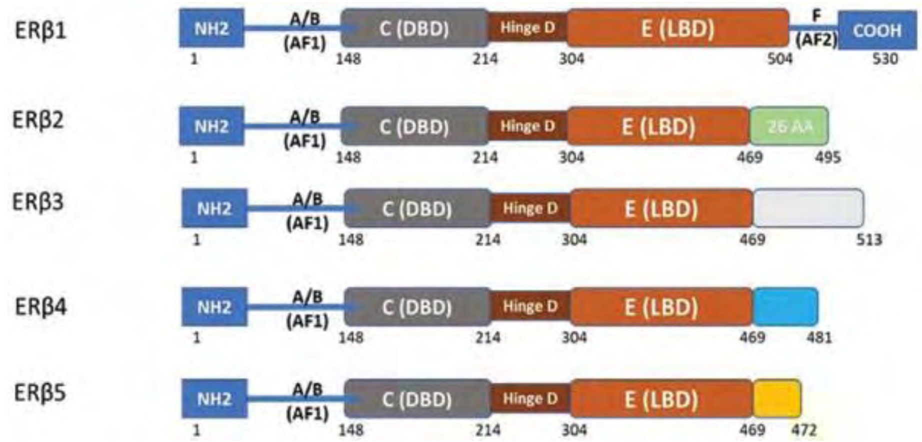
1.2.3 Ισομορφές

Η έκφραση των mRNAs των γονιδίων ESR1 και ESR2 στον άνθρωπο, οδηγεί στην παραγωγή δύο πρωτεϊνών μήκους 595 και 530 αμινοξέων, για τους ERα και ERβ, αντίστοιχα. Η πλήρους μήκους πρωτεΐνη ERα (hERα-66) έχει μοριακό βάρος 66 kDa, ενώ εκείνη του ERβ (ERβ1) 60 kDa *(Kampa et al., 2013); (Binder et al., 2015)*. Εναλλακτικό μάτισμα των mRNAs αυτών, παράγει διάφορες παραλλαγές ματίσματος για τους δύο υποδοχείς, οι οποίες συνεκφράζονται στους διάφορους ιστούς και φαίνεται να είναι βιολογικά ενεργές *(Psarra & Sekeris, 2008)*.



Εικόνα 5. *Τα τρία κύρια εναλλακτικά μετάγραφα του ERα* (Thomas & Gustafsson, 2015).

Ισομορφές του ERα έχουν εντοπιστεί σε διάφορους υγιείς ιστούς (μαστός, ενδομήτριο, υπόφυση), καθώς και σε διάφορους τύπους καρκίνων (μαστού, καρκίνωμα του ενδομητρίου και μηνιγγίωμα) *(Desoouza et al., 2020); (Barone et al., 2010)*. Το εναλλακτικό μετάγραφο **ERαΔ3** δεν διαθέτει το εξόνιο 3, το οποίο κωδικοποιεί μέρος της DBD του υποδοχέα (εικόνα 5) και έχει βρεθεί πως μειώνει τον πολλαπλασιασμό και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Το μετάγραφο **ERα36** δεν διαθέτει το εξόνιο 1 και τα τελευταία 138 αμινοξέα αντικαθίστανται από μια μοναδική ακολουθία, μήκους 22 αμινοξέων. Αυτό σημαίνει πως στερείται τόσο των θέσεων δέσμευσης AF-1 και AF-2, όσο και ενός μεγάλου μέρους της LBD. Έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζεται με την καρκινογένεση, την επιθετικότητα και τη θεραπευτική απόκριση του καρκίνου του μαστού και εντοπίζεται κυρίως στην πλασματική μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα όπου συμμετέχει σε ταχείες μη γονιδιωματικές δράσεις. Το μετάγραφο **ERα46** στερείται των αμινοξέων 1-173 και συνεπώς δεν περιέχει τη θέση δέσμευσης AF-1, ενώ έχει βρεθεί πως ασκεί αγγειακές δράσεις που σχετίζονται με τα οιστρογόνα *(Kampa et al., 2013); (Jia et al., 2015); (Thomas & Gustafsson, 2015)*. Το μετάγραφο αυτό εντοπίζεται επίσης στην πλασματική μεμβράνη σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού. Τέλος, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως όλες αυτές οι ισομορφές μπορούν να ετεροδιμεριστούν με τον hERα-66 *(Kampa et al., 2013)*.



Εικόνα 6. *Τα κύρια εναλλακτικά μετάγραφα του ERβ. (Desoouza et al., 2020)*

Όσον αφορά τον ERβ, έχουν περιγραφεί τουλάχιστον τέσσερις ισομορφές του, που παράγονται μέσω εναλλακτικού ματίσματος του εξονίου 8 *(Jia et al., 2015); (Thomas & Gustafsson, 2015)*. Το εναλλακτικό μετάγραφο **ERβ2 (ERbcx)** (56 kDa) περιέχει μια κολοβωμένη LBD, ενωμένη με ένα μοναδικά ματισμένο εξόνιο (εικόνα 6), με αποτέλεσμα να μην μπορεί να δεσμευτεί σε οιστρογόνα ή στα κλασικά EREs. Η έκφραση του **ERβ3** περιορίζεται στους όρχεις. Τα μετάγραφα **ERβ4** (54 kDa) και **ERβ5** (53 kDa) περιέχουν ένα μέρος του εξονίου 7 και εξόνιο 8 διαφορετικής αλληλουχίας. Λόγω των δομικών αυτών αλλαγών, οι ισομορφές ERβ2, ERβ4 και ERβ5 δεν έχουν μεταγραφική δραστηριότητα στις ομοδιμερείς μορφές τους *(Faria et al., 2018); (Desoouza et al., 2020)*. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν γνωστές λειτουργίες των μεταγράφων αυτών στην κανονική φυσιολογία *(Faria et al., 2018)*, ωστόσο αυτές οι ισομορφές μπορούν να ετεροδιμεριστούν με τον ERβ1 *(Thomas & Gustafsson, 2015)*.

1.3 Υποδοχείς οιστρογόνων και φυτοοιστρογόνα

Για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1940, παρατηρήθηκε πως φυτικά εκχυλίσματα ήταν σε θέση να προκαλέσουν οιστρογονικές δράσεις *(Landete et al., 2016)*. Σήμερα, πολλά φλαβονοειδή (μεγάλη ομάδα φυτιών φαινολικών δευτερογενών μεταβολιτών), είναι γνωστό ότι διαθέτουν βιοδραστικότητες παρόμοιες με εκείνες των οιστρογόνων *(Amer et al., 2010)*.

Τα φυτοοιστρογόνα (Phytoestrogens, PEs) είναι φυτικές πολυφαινόλες ή ενώσεις που προέρχονται από πρόδρομες φυτικές ενώσεις *(Xin et al., 2010)*. Δομικά, είναι όμοια με τη 17-β-οιστραδιόλη. Μηχανικά, έχουν την ικανότητα να συνδέονται και με τους δύο υπότυπους του υποδοχέα οιστρογόνων. Τα PEs συχνά θεωρούνται ως επιλεκτικοί προσδέτες των ERs, σε αντίθεση με τα φυσικά οιστρογόνα, τα οποία δεν εμφανίζουν επιλεκτική δράση για κάποιον υπότυπο και η μακροχρόνια χορήγησή τους μπορεί να επιφέρει παρενέργειες. Ακόμα, έχει αποδειχθεί πως παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια για τον ERβ και σημαντικά χαμηλότερη συγγένεια για τους ERs από την οιστραδιόλη. Λειτουργικά, δρουν ως αγωνιστές ή/και ανταγωνιστές των ERs, ασκώντας τόσο οιστρογονικές όσο και αντι-οιστρογονικές δράσεις ανάλογα με τη βιοδιαθεσιμότητά τους και τα επίπεδα των κυκλοφορούντων ενδογενών οιστρογόνων. Επιπλέον ασκούν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντινεοπλαστικές και αποπτωτικές δράσεις και επομένως φαίνεται πως έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην ανθρώπινη υγεία *(Amer et al., 2010); (Xin et al., 2010); (Cardenas-Trowers et al., 2018); (Peiroten et al., 2019); (Rietjens et al., 2017)*.

Τα PEs υπάρχουν σε κοινές τροφές όπως οι ξηροί καρποί και ο λιναρόσπορος, σε προϊόντα σόγιας, στα δημητριακά, στο ψωμί και στα όσπρια, σε φρούτα και λαχανικά. Οι κύριες ομάδες φυτοοιστρογόνων είναι οι ισοφλαβόνες, οι λιγνάνες, οι ελαγιταννίνες, τα στιλβένια και οι κουμεστάνες *(Cardenas-Trowers et al., 2018); (Peiroten et al., 2019)*. Οι ισοφλαβόνες (ενώσεις με φαινολικούς δακτυλίους) είναι τα πιο γνωστά και μελετημένα φυτοοιστρογόνα *(Landete et al., 2016)*. Τα PEs υφίστανται μεταβολικές τροποποιήσεις από βακτήρια της εντερικής χλωρίδας, οι οποίες επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα και τη δραστικότητα των φυτοοιστρογόνων και οδηγούν στο σχηματισμό ενεργών ενώσεων *(Peiroten et al., 2019); (Sirotkin & Harrath, 2014)*. Για παράδειγμα, οι ισοφλαβόνες στη φύση απαντώνται συνήθως στις γλυκοζυλιωμένες (daidzin, genistin, glycitin, puerarin) και σε μικρότερο βαθμό στις μεθυλιωμένες τους μορφές (φορμονονετίνη, βιοχανίνη Α), οι οποίες εμφανίζουν μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα και δεν απορροφώνται. Έτσι με τη βοήθεια τέτοιων βακτηρίων μετασχηματίζονται σε αγλυκόνες (daidzein, genistein και glycitein) και άλλους βιοενεργούς μεταβολίτες, όπως οι equol και O-desmethylangolensin (O-DMA) *(Peiroten et al., 2019); (Rietjens et al., 2017)*.

Επιπλέον τα φυτοοιστρογόνα μπορούν να δράσουν μέσω και άλλων μηχανισμών. Έχουν ταυτοποιηθεί διάφορες φυσικές βιοδραστικές ενώσεις που επηρεάζουν το επιγένωμα, αλλά κυρίως έχει περιγραφεί η genistein. Έχει προταθεί πως μεταβολές στην έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων, μέσω επιγενετικών αλλαγών που προκαλούνται από την άνωθεν ισοφλαβόνη, οδηγούν σε μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου. Ένας δεύτερος εναλλακτικός μηχανισμός σχετίζεται με τη δράση των φυτοοιστρογόνων ως αναστολέων κινασών *(Rietjens et al., 2017)*.

Ανάμεσα στα οφέλη που αποδίδονται στα PEs είναι η μείωση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης (π.χ. εξάψεις και οστεοπόρωση) και ο μειωμένος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού, του προστάτη, του εντέρου και της μήτρας, καρδιαγγειακών παθήσεων, μεταβολικού συνδρόμου και διαβήτη τύπου 2 *(Peiroten et al., 2019); (Rietjens et al., 2017)*. Ωστόσο, οι αντι-οιστρογονικές ιδιότητες των φυτοοιστρογόνων έχουν επίσης εγείρει ανησυχίες. Πράγματι, είναι πιθανόν τα PEs να δρουν και ως ενδοκρινικοί διαταράκτες, προκαλώντας πιθανότητα δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία, όπως υπογονιμότητα και αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου *(Rietjens et al., 2017)*.

1.4 Μαστίχα Χίου

1.4.1 Γενικές πληροφορίες

Το Pistacia lentiscus L. της οικογένειας Anacardiaceae είναι ένας αειθαλές δέντρο, που αναπτύσσεται σε πολλές μεσογειακές χώρες *(Rigling et al., 2019)*. Έχει έντονο χαρακτηριστικό άρωμα και πράσινα φύλλα και το ύψος του κυμαίνεται από 1 έως 8 μέτρα. Το *Pistachia Lentiscus var. Chia* -γνωστό ως μαστιχόδεντρο- αναπτύσσεται σχεδόν αποκλειστικά στο νότιο τμήμα της Χίου. Το μαστιχόδεντρο είναι αρκετά ανθεκτικό, αναπτύσσεται καλά σε ξηρό, βραχώδες και φτωχό έδαφος, αλλά μπορεί να είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στο κρύο και τον παγετό *(Rigling et al., 2019); (Bampouli et al., 2014)*. Αναπτύσσεται αργά, φτάνοντας σε πλήρη ανάπτυξη μεταξύ του $40^{ου}$ - $50^{ου}$ έτους. Η παραγωγή ρητίνης ξεκινά τον $5^{ο}$ χρόνο, φτάνοντας τη μέγιστη απόδοση ενός κιλού μετά το $12^{ο}$ έτος του δέντρου. Ολόκληρη η παραγωγή προέρχεται από 24 χωριά (Μαστιχοχώρια). Τα περισσότερα δέντρα έχουν κύκλο ζωής 100 ετών, με καταγεγραμμένες περιπτώσεις δέντρων να φτάνουν τα 200 έτη *(Pachi et al., 2020)*. Οι προσπάθειες καλλιέργειας του μαστιχόδεντρου και παραγωγής ρητίνης υψηλής ποιότητας σε άλλες περιοχές του κόσμου ήταν ανεπιτυχείς *(Zografou et al., 2010)*.

Εικόνες 7-8. *Η ρητίνη της Μαστίχας Χίου (αριστερά) και το φυτό Pistachia Lentiscus var. Chia (δεξιά). Οι φωτογραφίες προέρχονται από την επίσημη ιστοσελίδα της Ένωσης Μαστιχοπαραγωγών Χίου (https://gummastic.gr/el/)*

Η επεξεργασία του μαστιχόδεντρου μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή τριών κύριων προϊόντων: της ρητίνης, του μαστιχέλαιου που εξάγεται από καρπούς Μαστίχας και αιθέριου ελαίου από άνθη, φύλλα και κλαδιά. Η Μαστίχα Χίου (Chios Mastiha, CM) είναι μια λευκή, ημιδιαφανής φυσική ρητίνη που λαμβάνεται ως έκκριμα από τον κορμό και τα κλαδιά του μαστιχόδεντρου, υπό τη μορφή δακρύων *(Rigling et al., 2019); (Terpou et al., 2017)*. Απολιθώματα των φύλλων της Μαστίχας που βρέθηκαν στη Χίο υποδεικνύουν την ύπαρξή του φυτού στο νησί πριν από έξι χιλιάδες χρόνια *(Zografou et al., 2010)*.

Το προϊόν ρητίνης είναι ευρέως γνωστό για τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Τα προϊόντα του μαστιχόδεντρου χρησιμοποιήθηκαν από τους αρχαίους Έλληνες 2500 χρόνια πριν, στην παραδοσιακή/λαϊκή ιατρική, κυρίως ως αντιφλεγμονώδεις ή αντισηπτικές ουσίες, καθώς και για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών όπως η γαστραλγία και η δυσπεψία *(Pachi et al., 2020); (Bampouli et al., 2015)*. Τα τελευταία χρόνια, η Μαστίχα Χίου χρησιμοποιείται ευρέως σε φαρμακευτικά προϊόντα, συμπληρώματα διατροφής και καλλυντικά και έχει γίνει αντικείμενο μελέτης στον τομέα της φαρμακοτεχνολογίας *(Pachi et al., 2020)*. Αυτή τη στιγμή χρησιμοποιείται ως καρύκευμα στη μεσογειακή κουζίνα, στην παραγωγή τσίχλας, στην οδοντιατρική, στην παραγωγή καλλυντικών, αρωμάτων και φαρμακευτικών προϊόντων *(Gkogka et al., 2013); (Terpou et al., 2017)*. Ακόμα, τα προϊόντα του P. lentiscus var. Chia έχουν ένα ευρύ φάσμα χρήσεων σε βιομηχανίες τροφίμων, στη θεραπεία του εκζέματος, στις λοιμώξεις του λαιμού, στην παράλυση, στο άσθμα, στους νεφρούς, στον ίκτερο, στη νόσο του Crohn κ.α. *(Bampouli et al., 2014)*.

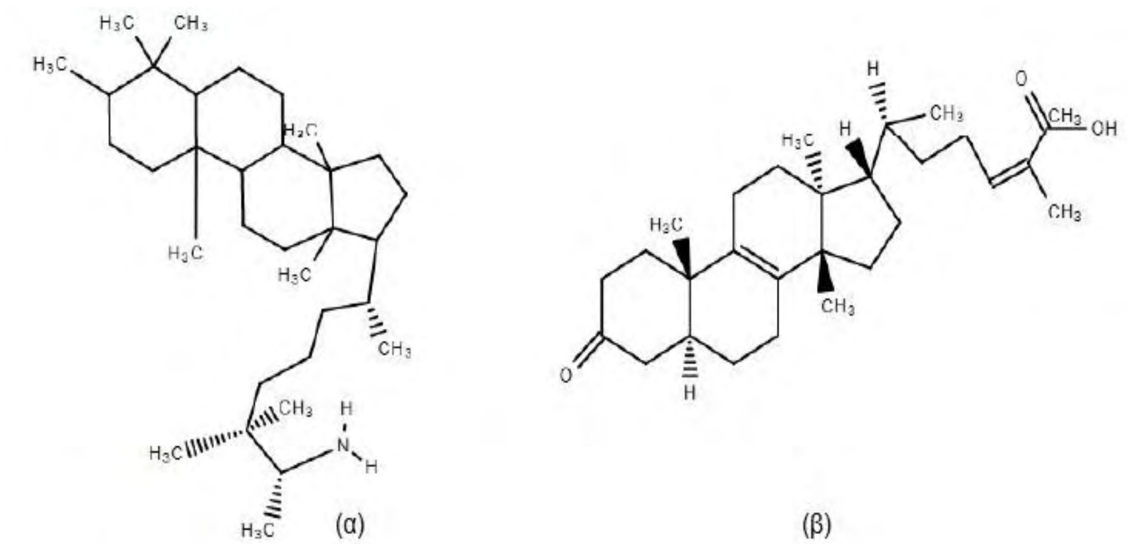
1.4.2 Ιστορική αναδρομή

Η παλαιότερη τεκμηριωμένη ιστορική αναφορά σχετικά με τη χρήση της Μαστίχας είναι πιθανώς εκείνη του Ηροδότου τον 5ο αιώνα π.Χ. *(Pachi et al., 2020)*. Επιπλέον, σπουδαίοι Έλληνες γιατροί της αρχαιότητας (Ιπποκράτης, Διοσκουρίδης, Γαληνός, Θεόφραστος), καθώς και οι αρχαίοι Βαβυλώνιοι, οι Αιγύπτιοι και οι Άραβες, αναφέρθηκαν στις θεραπευτικές της ιδιότητες *(Fukazawa et al., 2018)*. Ο De Candolle ήταν ο πρώτος που ανέφερε το μαστιχόδεντρο, το 1825 ως Pistacia Lentiscus var. Chia. Από το 1997, η Μαστίχα Χίου έχει αναγνωριστεί ως προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) από την Ευρωπαϊκή Ένωση και το 2014 η τεχνογνωσία της καλλιέργειας Μαστίχας στη Χίο καταχωρήθηκε από την UNESCO στον αντιπροσωπευτικό κατάλογο πολιτιστικής κληρονομιάς της ανθρωπότητας. Επιπλέον, το 2015 αναγνωρίστηκε ως φυτικό φαρμακευτικό προϊόν με παραδοσιακή χρήση από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων με διπλή θεραπευτική ένδειξη, τόσο για ήπιες δυσπεπτικές διαταραχές, όσο και για φλεγμονές του δέρματος και επούλωση μικρών πληγών *(Pachi et al., 2020)*.

1.4.3 Χημική σύσταση

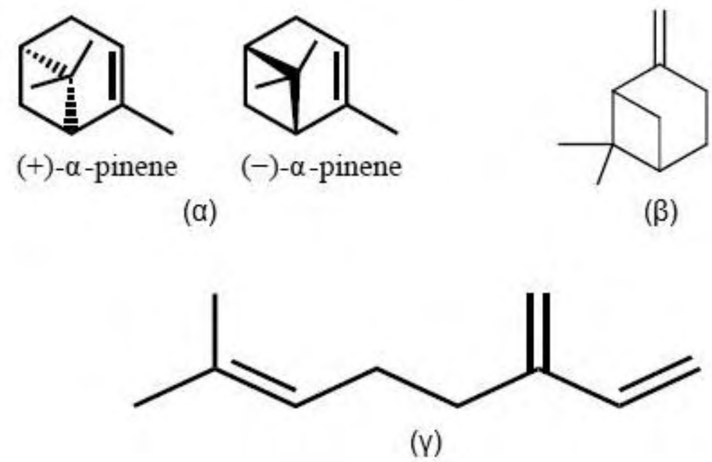
Η Μαστίχα Χίου αποτελείται από πληθώρα βιοδραστικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων φαινολικών ενώσεων, φυτοστερολών κ.α. *(Papada et al., 2019)*. Κατά τη διάρκεια των προσπαθειών προσδιορισμού της χημικής σύστασης της Μαστίχας, περισσότερες από 120 χημικές ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί στη ρητίνη *(Pachi et al., 2020)*. Τα κύρια συστατικά της Μαστίχας είναι ένα αδιάλυτο φυσικό πολυμερές εν ονόματι πολυ-β-μυρσένιο (25% του βάρους της ρητίνης) και ένα τριτερπενικό κλάσμα (67%), το οποίο υποδιαιρείται περαιτέρω σε όξινο (39%) και ουδέτερο (28%) κλάσμα *(Kartalis et al., 2015)*. Πιο συγκεκριμένα, το αδιάλυτο πολυμερές θεωρείται πως τροποποιεί τη βιοδιαθεσιμότητα των δραστικών ενώσεων που υπάρχουν στη ρητίνη και συνεπώς κρίνεται απαραίτητη η απομάκρυνσή του, γεγονός το οποίο τελικά οδηγεί στο διαχωρισμό του εκχυλίσματος της Μαστίχας σε όξινο και ουδέτερο κλάσμα *(Fukazawa et al., 2018); (Georgiadis et al., 2013)*.

Το όξινο κλάσμα φαίνεται να έχει τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δραστικότητα και περιέχει τριτερπενοειδή οξέα όπως το μαστιχαδιενονικό οξύ (30%), το ισομαστιχαδιενονικό οξύ (30%), το ολεανονικό οξύ (15%), το μορονικό οξύ (10%), το μαστιχαδιενολικό οξύ, το ισομαστιχαδιενολικό οξύ και το ολεανολικό οξύ *(Kartalis et al., 2015); (Fukazawa et al., 2018)*. Το ουδέτερο κλάσμα περιέχει ουδέτερες τριτερπενικές ενώσεις όπως η ολεανολική αλδεΰδη, η ολεανονική αλδεΰδη, η 28-νορολεάν-17-εν-3-όνη, η τιρουκαλόλη, η βουτυσπερμόλη, η β-αμυρόνη, η ισομαστιχαδιενολική αλδεϋδη και η δαμαραδιενόνη *(Fukazawa et al., 2018); (Kartalis et al., 2015)*, οι οποίες είναι γνωστό ότι ασκούν αντιφλεγμονώδη δράση *(Loizou et al., 2009)*. Επιπρόσθετα ουδέτερες ενώσεις όπως η βουτυσπερμόλη και η τιρουκαλόλη παρουσιάζουν μια τυπική φυτοστερολική δομή, ενώ ένα άλλο μονοτερπενικό συστατικό της CMG, το καμφένιο, φαίνεται πως διαθέτει πολλά υποσχόμενη υπολιπιδαιμική δράση *(Kartalis et al., 2015)*.



Εικόνα 9. *Τα κύρια τριτερπένια που περιέχονται στη ρητίνη της Μαστίχας Χίου. (α) μαστιχαδιενονικό οξύ, (β) ισομαστιχαδιενονικό οξύ (Papada et al., 2019).*

Το μαστιχέλαιο (Chios Mastic Oil, CMO) αποτελείται κυρίως από πτητικά τερπένια. Από τα συνολικά 69 συστατικά του ελαίου έχουν ταυτοποιηθεί τα 61 *(Dimas et al., 2012)*. Δύο αρωματικά μονοτερπένια, το α-πινένιο (38-80%) και το μυρσένιο (3-20%) αναγνωρίστηκαν ως τα κύρια συστατικά του, τα οποία στις περισσότερες αναλύσεις εμφανίζονται να αποτελούν περισσότερο από το 90% του ελαίου *(Spyridopoulou et al., 2017); (Gkogka et al., 2013)*. Μεταξύ των πιο άφθονων φυτοχημικών στο μαστιχέλαιο ανιχνεύτηκαν επίσης τα μονοτερπένια β-πινένιο (3%), β-καρυοφυλλένιο (1%), λιμονένιο (0,9%) και καμφένιο, μικροποσότητες αλκοολών (λιναλοόλη-0,73%), cis-3-πινεν-2-όλη, trans-πινοκαρβεόλη), αλδεϋδες (α-καμφολενάλη), αιθέρες (ο-μεθυλοανισόλη, ανθόλη), οξείδια (οξείδια α-πινενίου) και φουράνια (περιλένιο) *(Spyridopoulou et al., 2017); (Gkogka et al., 2013)*.



Εικόνα 10. *Τα κύρια μονοτερπένια που περιέχονται στο έλαιο της Μαστίχας Χίου. (α) τα ισομερή του α-πινενίου, (β) β-πινένιο, (γ) β-μυρσένιο (Papada et al., 2019).*

1.4.4 Βιολογικές δράσεις της Μαστίχας Χίου

Η ρητίνη του μαστιχόδεντρου περιέχει ελαιορητίνες με βιοδραστικά τριτερπένια. Πιο συγκεκριμένα, στα τετρα- και πεντα- κυκλικά τριτερπένια που περιέχει, αποδίδονται κατά κύριο λόγο οι βιολογικές της ιδιότητες, αναπυρώνοντας το ήδη μεγάλο ενδιαφέρον παγκοσμίως για τις ιδιότητες αυτές *(Assimopoulou & Papageorgiou, 2005)*. Πρόσφατα έχει σημειωθεί ότι τα τερπενοειδή συμβάλλουν στις αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές δράσεις της Μαστίχας, ενώ οι φυσικές φαινόλες και τα φλαβονοειδή σχετίζονται με πιθανές αντιοξειδωτικές δράσεις. Επιπλέον, η Μαστίχα Χίου θεωρείται εδώ και πολλά χρόνια πιθανός αντικαρκινικός παράγοντας, γεγονός που επιβεβαιώνεται πρόσφατα από επιστημονικά στοιχεία που δείχνουν ότι η Μαστίχα μπορεί να επάγει την απόπτωση και να έχει αντιπολλαπλασιαστική δράση σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου *(Terpou et al., 2017)*. Επιπλέον, έχει αναφερθεί πολλές φορές η in vitro αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος της Μαστίχας κατά βακτηρίων και μυκήτων *(Assimopoulou & Papageorgiou, 2005)*. Συνεπώς παρακάτω θα δούμε τις κυριότερες βιολογικές δράσεις της Μαστίχας Χίου και του μαστιχέλαιου.

1.4.4.1 Αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές δράσεις

Η πρώτη μελέτη που παρουσίασε αποτελέσματα -έπειτα από χορήγηση Μαστίχας ως πιθανού θεραπευτικού παράγοντα- σε ασθενείς με ενεργά συμπτώματα ενδοσκοπικά ανιχνευμένου έλκους δωδεκαδακτύλου, ήταν εκείνη του Mohammad Jamil Al-Habbal και των συνεργατών του, το 1984 *(Paraschos et al., 2012)*. Σύμφωνα με την κλινική αυτή δοκιμή, ανακούφιση από τα συμπτώματα παρουσίασε το 80% των ασθενών που έλαβαν Μαστίχα (ομάδα μελέτης) και το 50% των σθενών που έλαβαν εικονικό φάρμακο (placebo) *(Al- Habbal et al., 1984)*. Επιπλέον, πρώτη μελέτη σχετικά με την επίδραση της Μαστίχας στη λειτουργική δυσπεψία, το 2010, έδειξε πως η χορήγηση Μαστίχας σε τέτοιους ασθενείς για τρεις εβδομάδες προκάλεσε ανακούφιση των συμπτωμάτων στο 77% των ασθενών *(Paraschos et al., 2012)*.

Το 1983, οι Warren και Marshall ανακάλυψαν το βακτήριο Helicobacter pylori, το οποίο και συσχετίστηκε με γαστρικές παθήσεις, όπως το γαστρικό έλκος. Η πρώτη μελέτη που ανέφερε τη βακτηριοκτόνο δράση της Μαστίχας έναντι του H. pylori in vitro, δημοσιεύθηκε στο *New England Journal of Medicine* το 1998. Σε μελέτη του 2001, πειράματα φασματοσκοπίας εκπομπής ηλεκτρονίων αποκάλυψαν δομικές αλλαγές στα βακτήρια *(Paraschos et al., 2012); (Pachi et al., 2020)*. Η Μαστίχα αποδείχθηκε βακτηριοκτόνος έναντι του H. pylori in vitro, σκοτώνοντας το 50% των στελεχών που δοκιμάστηκαν σε συγκέντρωση 125μg/ml και 90% σε συγκέντρωση 500μg/ml, με τις μορφολογικές αλλαγές να είναι εντονότερες στην περιοχή του κυτταρικού τοιχώματος *(Pachi et al., 2020); (Paraschos et al., 2012)*. Η συνέργεια πολλών συστατικών του μαστιχέλαιου φαίνεται να ευθύνεται για την αντιμικροβιακή δράση.

Ακόμα σε μελέτη του 2007, δοκιμάστηκαν τα τριτερπενικά οξέα που εντοπίζονται στη Μαστίχα, για in vitro δραστικότητα έναντι 11 κλινικών στελεχών H. pylori. Το όξινο κλάσμα χαρακτηρίστηκε ως το πιο δραστικό, με το ισομαστιχαδιενονικό οξύ να αποτελεί την πιο δραστική ένωση σε αυτό *(Dimas et al., 2012)*. Το υδατικό εκχύλισμα Μαστίχας, επιδεικνύει αντιμυκητιακή δράση έναντι των Microsporum canis, Trichophyton mentagrophytes και Trichophyton violaceum. Το εκχύλισμα μείωσε την ανάπτυξη των μυκητιακών αυτών αποικιών κατά 36-100%. Το μαστιχέλαιο φαίνεται πως είναι αποτελεσματικό έναντι ορισμένων μικροοργανισμών των τροφίμων, όπως οι Staphylococcus aureus, Lactobacillus plantarum, Pseudomonas fragi και Salmonella enteritidis.

Η προσθήκη του ελαίου ανέστειλε την ανάπτυξη αυτών των βακτηρίων, με τα θετικά κατά Gram βακτήρια να φαίνονται πιο ευαίσθητα από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Επιπλέον το αιθέριο έλαιο της ρητίνης είναι δραστικό έναντι του Gram+ βακτηρίου Staphylococcus epidermidis, των Gram- βακτηρίων Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae και Pseudomonas aeruginosa, καθώς και των μυκήτων Candida albicans, Candida tropicalis και Torulopsis glabrata *(Pachi et al., 2020)*.

1.4.4.2 Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Η φλεγμονή είναι μια θεμελιώδης απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος και περιλαμβάνει ένα εύρος μοριακών αντιδράσεων (π.χ. φαγοκυττάρωση, χημειοταξία και κυτταρική διαφοροποίηση). Κατηγοριοποιείται σε οξεία, η οποία αποτελεί μια σύντομη διαδικασία (λεπτά έως μερικές ημέρες) με κύρια χαρακτηριστικά τη διαρροή πρωτεϊνών πλάσματος ή υγρού και τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων σε μια εξωαγγειακή περιοχή και χρόνια, η οποία συμβαίνει συνήθως απουσία πραγματικού ερεθίσματος. Το ουδέτερο εκχύλισμα της Μαστίχας παρουσιάζει αντιφλεγμονώδες δυναμικό, που πιθανώς οφείλεται στην αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κB, ενός βασικού μορίου στον φλεγμονώδη καταρράκτη *(Papada et al., 2019)*.

Το 2009, ο Zhou και οι συνεργάτες του έδειξαν πως η Μαστίχα αναστέλλει την παραγωγή προφλεγμονωδών ουσιών όπως το οξείδιο του αζώτου (NO) και η προσταγλανδίνη E_2 (PGE_2) σε κύτταρα RAW264.7, που μοιάζουν με μακροφάγα ποντικού και ενεργοποιούνται από λιποπολυσακχαρίδιο (LPS) *(Paraschos et al., 2012)*. Ακόμα αποκαλύφθηκε πως η ρητίνη της Μαστίχας αναστέλλει την έκφραση δύο γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την έκφραση του NO και της PGE_2, της επαγώγιμης συνθάσης του NO (iNOS) και της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX)-2 τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο mRNA *(Paraschos et al., 2012); (Pachi et al., 2020)*. Επιπλέον, η CM αναστέλλει την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), η οποία ελαττώνει την παραγωγή H_2O_2 από NADPH οξειδάσες και από στατιστικά σημαντικό οίδημα προκαλούμενο από καρραγενάνη, υποστηρίζοντας την υπόθεση πως η Μαστίχα χρησιμεύει ως αντιφλεγμονώδης και αντιοξειδωτικός παράγοντας *(Dimas et al., 2012)*. Το 2011, ο Qiao και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν πως η CM αναστέλλει σημαντικά την ηωσινοφιλία, τη μειωμένη υπεραπόκριση των αεραγωγών και την καταστολή της παραγωγής φλεγμονωδών κυτοκινών (IL-5 και IL-13) και χημειοκινών (εοταξίνη, εοταξίνη 2) στο υγρό των βρογχοκυψελίδων (Bronchoalveolar Lavage Fluid- BALF), η οποία οφείλεται πιθανώς στην αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κB *(Papada et al., 2019)*.

Λόγω των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της η CM θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη μετρίαση ή τη βελτίωση των συμπτωμάτων αυτοάνοσων ασθενειών, όπως της νόσου του Crohn (Crohn's Disease- CD) *(Dimas et al., 2012)*. Μελέτη σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια ενεργή νόσο του Crohn, έδειξε πως ο δείκτης δραστικότητας και τα επίπεδα πλάσματος της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP, παράγεται κατά τη διάρκεια οξείας φλεγμονής) μειώθηκαν σε μεγάλο βαθμό, ενώ το συνολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό αυξήθηκε και δεν παρατηρήθηκαν παρενέργειες *(Pachi et al., 2020)*. Ακόμα, η χορήγηση Μαστίχας σε ασθενείς με ενεργή CD, παρείχε ισχυρές ενδείξεις πως η CM μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό ανοσορυθμιστή των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMC). Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση Μαστίχας είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκκρισης του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF-α) και τη σημαντική αύξηση του παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης μακροφάγων (Macrophage Migration Inhibitory Factor, MIF), υποδηλώνοντας ότι η τυχαία μετανάστευση και η χημειοταξία των μονοκυττάρων/μακροφάγων παρεμποδίστηκε *(Dimas et al., 2012); (Paraschos et al., 2012); (Pachi et al., 2020)*.

1.4.4.3 Αντικαρκινικές δράσεις

Η CM ασκεί αντικαρκινικές δράσεις μέσω της αναστολής του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, της αγγειογένεσης και της φλεγμονώδους απόκρισης *(Dimas et al., 2012)*. Ο καρκίνος του προστάτη και του παχέος εντέρου, η λευχαιμία και το καρκίνωμα του πνεύμονα είναι μεταξύ αυτών για τους οποίους η επίδραση της Μαστίχας έχει μελετηθεί εκτενέστερα *(Paraschos et al., 2012)*.

Ο He και οι συνεργάτες του το 2006 έδειξαν πως η Μαστίχα ανέστειλε την επαγόμενη από ανδρογόνα αύξηση των κυττάρων LNCaP (κύτταρα αδενοκαρκινώματος ανθρώπινου προστάτη που είναι ευαίσθητα στα ανδρογόνα) με δοσοεξαρτώμενο τρόπο *(He et al., 2006)*. Βρέθηκε πως η έκφραση του mRNA του υποδοχέα ανδρογόνων, καθώς και τα πρωτεϊνικά του επίπεδα, ελαττώθηκαν μετά από χορήγηση Μαστίχας και η δραστικότητα δέσμευσης του υποδοχέα στα στοιχεία απόκρισης του (Androgen Response Elements, AREs) μειώθηκε in vitro *(He et al., 2006); (Dimas et al., 2012)*. Ακόμα παρατηρήθηκε πως η Μαστίχα έχει μία γενική ανασταλτική επίδραση στα γονίδια που ρυθμίζονται από ανδρογόνα. Έτσι η χορήγηση της είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης των PSA και hK2 γονιδίων σε μεταγραφικό επίπεδο και τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PSA, της NKX3.1, της κυκλίνης D1 (θετικός παράγοντας του κυτταρικού πολλαπλασιαμού) και του $p21^{WAF\text{-}1/CIP1}$ *(He et al., 2006)*.

Ο Balan και οι συνεργάτες του το 2005 έδειξαν ότι η CM αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου HCT116 in vitro, μέσω ενός μηχανισμού που σχετίζεται με τις κασπάσες *(Paraschos et al., 2012)*. Πειραματικές μελέτες αποκάλυψαν πως η χορήγηση Μαστίχας προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα, ενεργοποίηση των προκασπασών 8, 9 και 3 και πολλές μορφολογικές αλλαγές που υποδηλώνουν απόπτωση στα κυτταρικά οργανίδια *(Kottakis et al., 2009)*. Επίσης έχει βρεθεί πως η Μαστίχα αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα PC-3 καρκίνου του προστάτη καταστέλλοντας τη δραστικότητα και τη σηματοδοτική οδό του NF-κB *(Kottakis et al., 2009)*. Πιο συγκεκριμένα, η CM ελαττώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p-AKT και αυξάνει εκείνα της IκBα (αναστολέας του NF-κB) *(Dimas et al., 2012)*.

1.5.4.4 Αντιοξειδωτικές και καρδιοπροστατευτικές δράσεις, επιδράσεις στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων

Η CM μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων. Φαίνεται πως τα τριτερπένια που περιέχονται στη Μαστίχα ασκούν την αντιοξειδωτική/αντιαθηρογόνο δράση τους μέσω της αποκατάστασης της GSH και της μείωσης της έκφρασης του mRNA CD36 *(Kartalis et al., 2015); (Pachi et al., 2020)*. Σε διεγερμένα κύτταρα λείου μυός και ενδοθηλιακά κύτταρα, η Μαστίχα αποδείχθηκε ότι μειώνει την παραγωγή υπεροξειδίου που σχετίζεται με τη μείωση της δραστικότητας της οξειδάσης του NADPH, πιθανότατα λόγω της αναστολής της πρωτεϊνικής κινάσης C. Σε μονοπύρηνα κύτταρα που επωάστηκαν με Μαστίχα αναφέρθηκε αποκατάσταση της γλουταθειόνης και ότι η γλουταθειόνη ανέστειλε την PKC με έναν μη-οξειδοαναγωγικό μηχανισμό, υποδηλώνοντας πως η αντιοξειδωτική δράση της Μαστίχας πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού της PKC *(Papada et al., 2019)*. Επιπλέον η χορήγηση Μαστίχας (5g/ημέρα) σε κλινική δοκιμή οδήγησε σε μείωση της ολικής χοληστερόλης στον ορό, της LDL, του λόγου ολικής χοληστερόλης/HDL, της λιποπρωτεΐνης, της απολιποπρωτεΐνης A-1, της απολιποπρωτεΐνης B (ο λόγος apoB/apoA-1 δεν άλλαξε), των SGOT και SGPT και της γ-τρανσπεπτιδάσης του γλουταμικού, υποδηλώνοντας πως η Μαστίχα Χίου έχει ηπατοπροστατευτικό/καρδιοπροστατευτικό ρόλο in vivo στους ανθρώπους *(Paraschos et al., 2012); (Dimas et al., 2012)*. Είναι ενδιαφέρον ότι η απουσία πολυμερούς οδηγεί στη μείωση της δραστικότητας της CM *(Pachi et al., 2020)*.

Τόσο το ουδέτερο κλάσμα της Μαστίχας όσο και η τιρουκαλόλη του CMO, σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής (Human Aortic Endothelial Cells- HAEC), μπορούν να αναστείλουν την επαγόμενη από TNF-α ενδοθηλιακή ενεργοποίηση και έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1, τα οποία σχετίζονται με την πρώιμη εμφάνιση της αθηροσκλήρωσης. Επιπλέον παρεμποδίζουν τη δέσμευση των κυττάρων U937 με τα διεγερμένα από TNF-α κύτταρα HAEC και ελαττώνουν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της υπομονάδας p65 του NFkB *(Loizou et al., 2009); (Paraschos et al., 2012); (Pachi et al., 2020)*. Επίσης, συστατικά της CM όπως το ολεανονικό και το ολεανολικό οξύ δρουν ως ρυθμιστές των PPARs (Peroxisome Proliferator-activated Receptors). Συγκεκριμένα το ολεανονικό οξύ δρα ως αγωνιστής του PPAR-γ (πιθανώς και του PPAR-α), επηρεάζοντας το μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να είναι ο λόγος για ορισμένες από τις βιολογικές ιδιότητες της Μαστίχας, όπως η αντιοξειδωτική και η αντιφλεγμονώδης δράση *(Pachi et al., 2020); (Georgiadis et al., 2013); (Kartalis et al., 2015)*.

Τέλος, η υπολιπιδαιμική δραστικότητα του μαστιχέλαιου σχετίζεται με ένα από τα συστατικά του, το καμφένιο, παρά το γεγονός πως αυτό συναντάται σε πολύ μικρό ποσοστό (0,83%) στο CMO. Μελέτη σε κύτταρα HepG2 έδειξε πως η υπολιπιδαιμική δράση του γίνεται μέσω ενός μη αναγνωρισμένου μηχανισμού, διαφορετικού από αυτόν που χρησιμοποιείται από τις στατίνες (κατηγορία φαρμάκων για τη μείωση της χοληστερόλης) *(Valianou et al., 2011)*.

1.5 Νανοσωματίδια

Τις τελευταίες δεκαετίες, το πεδίο της νανοτεχνολογίας γνώρισε τεράστια ανάπτυξη. Πολλά νανοϋλικά βρίσκουν εφαρμογή σε πολυάριθμους τομείς των βιοεπιστημών, αφού μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συστήματα βιοϊατρικής απεικόνισης, ανίχνευσης, διανομής φαρμάκων (ως φορείς φαρμάκων) και θεραπείας *(Rampazzo et al., 2018); (Bae et al., 2012); (Wilczewska et al., 2012)*. Σύμφωνα με τον ορισμό του *National Nanotechnology Initiative*, τα νανοσωματίδια (Nanoparticles, NPs) υπάρχουν σε τουλάχιστον μία διάσταση με μέγεθος 1-100nm, το οποίο είναι κρίσιμο για τις μοναδικές ιδιότητές τους *(Rampazzo et al., 2018); (Wilczewska et al., 2012)*. Τα πιο ευρέως διαδεδομένα νανοϋλικά για βιοαπεικόνιση περιλαμβάνουν NPs που κατασκευάζονται από διοξείδιο του πυριτίου και οργανικά τροποποιημένο διοξείδιο του πυριτίου, υδρόφοβα και υδρόφιλα οργανικά πολυμερή, κβαντικές κουκίδες (quantum dots), νανοϋλικά άνθρακα συμπεριλαμβανομένων των κουκίδων άνθρακα (Carbon dots, C-dots), νανοσωλήνων άνθρακα και νανοδιαμαντιών, μεταλλικά σωματίδια, μαγνητικά νανοσωματίδια, μεταλλικά οξείδια κ.α. Ακόμα, υπάρχουν και νανοϋλικά όπως τα φουλερένια (C_{70}, είναι πολύ μικρότερα από τις κουκκίδες άνθρακα), οι κβαντικές κουκίδες γραφενίου (είδος C-dots), τα νανοσωματίδια ευγενών μετάλλων, τα δενδρομερή (πολύ μικρά, μπορούν να είναι υδρόφιλα ή υδρόφοβα και εσωτερικεύονται εύκολα από τα κύτταρα), σταγόνες λιπιδίων (lipid drops) και μικκύλια *(Wolfbeis et al., 2015); (Wilczewska et al., 2012)*.

Λόγω των μικρών τους μεγεθών, αυτές οι νανοδομές εμφανίζουν μοναδικές φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες που τις καθιστούν ιδανικά υλικά για βιοϊατρικές εφαρμογές. Τα νανοϋλικά που χρησιμοποιούνται για ιατρικές εφαρμογές πρέπει να είναι βιοσυμβατά (ικανά να ενσωματωθούν σε ένα βιολογικό σύστημα χωρίς να προκαλέσουν ανοσοαπόκριση ή αρνητικές επιδράσεις) και μη τοξικά (αβλαβή σε ένα δεδομένο βιολογικό σύστημα) *(Wilczewska et al., 2012)*. Επιπλέον έχει καταγραφεί πως τα φθορίζοντα NPs μπορούν να συνδυάσουν ενισχυμένα σήματα φθορισμού και μεγαλύτερη διάρκεια παραμονής στην κυκλοφορία του αίματος σε σχέση με τις οργανικές χρωστικές και παρουσιάζουν αυξημένο ποσοστό πρόσληψης από τα κύτταρα *(Reisch & Klymchenko, 2016); (Bae et al., 2012); (Wang et al., 2011)*.

Οι κουκκίδες άνθρακα (C-dots), πρωτοαναφέρθηκαν το 2004 και αποτελούν συστάδες ατόμων άνθρακα με διάμετρο 2 έως 8nm *(Wolfbeis et al., 2015)*. Τα C-dots μπορούν να παρασκευαστούν με αρκετές τεχνικές, όπως εκτομή λέιζερ, πυρόλυση, υγρή οξείδωση, σύνθεση υποβοηθούμενη από υπερήχους και μικροκύματα, υδροθερμική σύνθεση και ηλεκτροχημική χάραξη *(Qu et al., 2012)*. Τα υλικά παρασκευής των C-dots είναι αφθόνως διαθέσιμα, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα χαμηλού κόστους και μαζικής παραγωγής τους. Οι κουκκίδες άνθρακα μπορούν να παράγουν έντονο φθορισμό και δεν χρειάζεται να επισημανθούν. Το χρώμα εκπομπής τους μπορεί να ρυθμιστεί σε κάποιο βαθμό μεταβάλλοντας τις πειραματικές συνθήκες σύνθεσης. Οι C-dots εμφανίζουν εξαιρετικά υψηλή κβαντική απόδοση, καλή υδατοδιαλυτότητα, χημική σταθερότητα, καλή βιοσυμβατότητα (δεν είναι επιβλαβείς για κύτταρα και ιστούς), χαμηλή τοξικότητα, αντοχή στη φωτοαπόσβεση (photbleaching), υψηλή κυτταρική διαπερατότητα, ενώ αλληλεπιδρούν ασθενώς με πρωτεΐνες και δύσκολα δέχονται επίθεση από το ανοσοποιητικό σύστημα *(Wolfbeis et al., 2015); (Song et al., 2014).* Επιπρόσθετα, η επιφάνεια των C-dots μπορεί να τροποποιηθεί με συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες, ώστε αυτές να αποκτήσουν βελτιωμένες ιδιότητες και διαφορετικές λειτουργίες (π.χ ιστοειδική στόχευση, προγραμματισμένη ενεργοποίηση/απενεργοποίηση του νανοσωματιδίου σε απόκριση εξωτερικών χημικών ή φυσικών ερεθισμάτων) *(Song et al., 2014); (Rampazzo et al., 2018)*.

Τα νανοσωματίδια μπορούν επίσης να μεταφέρουν και να απελευθερώνουν φάρμακα, οδηγώντας στην ανάπτυξη νανοσυστημάτων για θεραπευτικές εφαρμογές, συνδυάζοντας έτσι διαγνωστικούς και θεραπευτικούς στόχους *(Rampazzo et al., 2018)*. Πιο συγκεκριμένα, προστατεύουν τα φάρμακα από την αποικοδόμηση, μπορούν να διασχίσουν τον αιματοεγεφαλικό φραγμό (λόγω μικρού μεγέθους), μπορούν να μειώσουν την τοξικότητα και άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες που προκαλούνται σε φυσιολογικούς ιστούς από τη συσσώρευση κάποιου φαρμάκου και προσφέρουν δυνατότητες στόχευσης και ελεγχόμενης απελευθέρωσης *(Wilczewska et al., 2012)*.

1.6 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η αξιολόγηση της πιθανής επιλεκτικής οιστρογονικής δράσης μορίων βιολογικής προέλευσης και συγκεκριμένα συστατικών που προέρχονται από το μαστιχόδεντρο. Αναλυτικότερα στα πειράματα που παρουσιάζονται στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν τρία κλάσματα (διαφορετικής πολικότητας, μη πολικό, ημιπολικό, πολικό) εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου και μελετήθηκε η επίδρασή τους στους δύο υπότυπους του υποδοχέα οιστρογόνων, ERα και ERβ. Επίσης, διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση του ημιπολικού κλάσματος φύλλων του μαστιχόδεντρου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κB και της προκασπάσης-3, μορίων που συμμετέχουν στους μηχανισμούς της απόπτωσης και της φλεγμονώδους απόκρισης, δράσεις οι οποίες ρυθμίζονται και από τους υποδοχείς οιστρογόνων. Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των επιδράσεων αυτών μεταξύ των φύλλων μαστιχόδεντρου από το βόρειο και το νότιο τμήμα του νησιού της Χίου. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πρωταρχικά πειράματα κατασκευής και ελέγχου της αποτελεσματικότητας νανοσωματιδίων ως εν δυνάμει φορείς βιοδραστικών μορίων. Πιο συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε η ικανότητα πιθανής διαμόλυνσης κυττάρων HEK-293 με νανοσωματιδίων άνθρακα (C-dots), μέσω παρατήρησης του ενδοκυτταρικού αυτοφθορισμού τους, με εφαρμογή μικροσκοπίας φθορισμού.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

2.1.1 Οργανολογία

Πίνακας 1. *Συγκεντρωτικός πίνακας οργάνων και συσκευών*

	Όνομα οργάνου / συσκευής	Εταιρία παραγωγής / Μοντέλο
Όργανα εντός του εργαστηριακού χώρου	Heat blocker	KISKER
	Quick spin	Nippon Genetics Europe GmbH
	Sonicator	Helscher Ultrasound Technologies UP400S
	Vortex	Bio Vortex V1
	Αναδευτήρας	Heidolph Rotamax
	Ζυγός	KERN 440-47 N
	Κασετίνα εμφάνισης Western Blot	FluoChemE/ ProteinSimple
	Σετ εμφάνισης μεμβρανών σε πείραμα Western Blot	Kodak
	Συσκευή ηλεκτροφόρησης	Biorad mini-PROTEAN® tetra cell
	Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών	Biorad mini-trans Blot
	Φυγόκεντρος	Eppendorf 5810R / *Helme Z36HK*
	Φωτόμετρο	*Spectronic® 20 GENESYSTM*
Όργανα εντός του χώρου μικροσκοπίας	Λουμινόμετρο	Berthold Technologies, LuBat 39508
	Μικροσκόπιο φθορισμού	LEICA DM 2000
	Ψυχόμενη κάμερα φθορισμού	OPTIMOS Q IMAGING
Όργανα εντός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών	Ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης	A. Kruss Optronic Germany
	Αυτόματος πιπεταδόρος	SWIFTPET
	Επωαστήρας	Thermo ELECTRON CORPORATION-Forma Series II
	Συσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminar Flow Hood)	Tel Star AV-30/70
	Φυγόκεντρος	Entrofriger- BLII/ PS Selecta®
	Υδατόλουτρο	P SELECTA

2.1.2 Αναλώσιμα

Πίνακας 2. *Συγκεντρωτικός πίνακας αναλωσίμων*

Είδος αναλωσίμου	Εταιρία παραγωγής αναλωσίμου
Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου	Knittel Glass
Βαθμονομημένοι πλαστικοί σωλήνες με καπάκι (falcons) (15 mL και 50 mL)	SPL, DUNC
Γυάλινα σιφώνια	Kimble
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,2 μm	Amersham™ Protran™
Ορολογικές πιπέτες -Serological (2 mL, 5 mL, 10 mL)	Sarstedt
Πιάτα κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) 6 και 24 θέσεων	Sarstedt
Πλάκα Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο) για μέτρηση κυττάρων	Heinz Herenz Hamburg
Πλαστικά σωληνάρια τύπου eppendorf (1.5 mL)	Sarstedt
Ρύγχοι για πιπέτες (0.2-10 μL, 20-200 μL και 100-1000 μL)	Sarstedt
Φιλμ ανίχνευσης σήματος σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κατά τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά Western	FUJI MEDICAL
Χαρτιά Whatman	Sigma

2.1.3 Χημικά

Πίνακας 3. *Συγκεντρωτικός πίνακας χημικών ουσιών*

Χημική ουσία	Εταιρία παραγωγής
Acetic acid	Scharlau
Acrylamide/Bis acrylamide 40%	Bio-Rad
Ammonium Persulfate (APS) / ATP	Sigma
Bradford protein assay	Bio-Rad
Co-enzyme-A	Applichem Panreac
DMSO	Sigma
DTT / EDTA	SERVA
Developer / Fixer	Fuji
ECL A + ECL B	Santa Cruz
FBS	Gibco, biosera / Gibco
Glycine / $MgCl_2$ / $MgSO_4$	SERVA
HCl / KCl / KH_2PO_4	Merck
L-Glutamine	Gibco

	Luciferine	Sigma	
	Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4	Merk / Applichem	
	NaCl	Panreac	
	Na_2CO_3 / NaOH	Merck	
	O-nitrophenyl-β-D-galactoside (ONPG)	Sigma	
	Phenyl Methyl Sulfonyl Floride (PMSF) / Tris-base	SERVA	
	Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma	
	Skimmed milk powder	Regilait	
	TEMED / Triton X-100 / Γλυκερόλη	Applichem	
	Trypsin-EDTA 5% (10×)	Gibco	
	Tween 20 / Ισοπροπανόλη	Sigma	
	Αιθανόλη 100% / Βιοαιθανόλη	Sigma / Kalochem	
	β-μερκαπτοαιθανόλη / Δεξαμεθαζόνη	Riedel-de Haën	
	Μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Pageruler™)	ThermoScientific Fermentas	
	Μείγμα αναστολέων πρωτεασών	Sigma	
	Κυανούν της βρωμοφαινόλης	Fluka	
	Πενικιλλίνη - Στρεπταμυκίνη	Gibco	

2.1.4 Διαλύματα

Παρακάτω περιγράφεται συνοπτικά ο τρόπος παρασκευής των διάφορων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και η θερμοκρασία αποθήκευσής τους.

- ***PMSF 200mM***

Με αραίωση 10% σε 100% ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20mM.

- ***Διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis Buffer)***

Αποτελείται από 20mM Tris pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 250mM NaCl και 3mM EDTA και αποθηκεύεται στους 4°C. Πριν από κάθε χρήση προστίθενται επιπλέον 0,1M PMSF, DTT 1M. Επίσης, γίνεται προσθήκη κατάλληλης ποσότητας μείγματος αναστολέων πρωτεασών.

- ***Διάλυμα Bradford***

Δημιουργείται με την ανάμιξη stock διαλύματος Bradford 5x με ddH_2O σε αναλογία 1:5. Διατηρείται στους 4°C.

- ***Sample Buffer 4x***

Ονομάζεται και διάλυμα επιστοίβαξης. Αποτελείται από Tris-base με pH ίσο με 6.8 και συγκέντρωση 1M, 10% γλυκερόλη, 10% SDS, 4% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% μπλε της βρωμοφαινόλης. Αποθηκεύεται στους -20°C.

- ***Tris 20mM pH 7.5***

Δημιουργείται με την αραίωση stock διαλύματος Tris συγκέντρωσης 1M, pH=7.5 και θερμοκρασίας 4°C με ddH_2O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- ***Tris-HCl 1.5 M pH 8.8***

Για την παρασκευή του διαλύεται κατάλληλη ποσότητα Tris σε dH_2O. Στη συνέχεια είναι απαραίτητη η ρύθμιση του pH του στο 8.8 με προσθήκη πυκνού HCl 12M. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

- ***TEMED***

Χρησιμοποιείται αυτούσιο όπως παραλαμβάνεται από την εταιρία παραγωγής. Αποθηκεύεται στους 4°C.

- ***Υπερθειικό αμμώνιο (APS) 10 % w/v***

Δημιουργείται με την ανάμειξη 10% w/v APS σε ddH_2O. Αποθηκεύεται στους -20°C. Κατά τη διάρκεια χρήσης του παραμένει τοποθετημένο σε πάγο (4°C).

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

Αποτελείται από 250mM Tris-base και 192mM γλυκίνη, τα οποία διαλύονται σε ddH_2O. Δεν είναι απαραίτητη η ρύθμιση του pH του διαλύματος και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

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

Για την παρασκευή του αναμιγνύονται Running Buffer 10x και dH_2O σε αναλογία 1:10. Στη συνέχεια προστίθεται 0,1% SDS. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- ***Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10x***

Για την παρασκευή του αναμιγνύονται 10% SDS, Running Buffer 10x και 100% MeOH σε dH_2O σε τελική αναλογία 0,05:1:2. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- ***Ρυθμιστικό διάλυμα TBS 10x***

Το Tris-Base Saline δημιουργείται με την προσθήκη 24gr Tris-Base και 88gr NaCl για τελικό όγκο 1L. Στη συνέχεια προστίθεται ddH_2O. Τέλος ρυθμίζεται το pH του σε εύρος ίσο με 7,4 - 7,6, με πυκνό HCL συγκέντρωσης 12M και το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- ***Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1x***

Παρασκευάζεται με την προσθήκη διαλύματος TBS 10x και dH_2O σε αναλογία (1:10). Τέλος προστίθεται και 0,1% επί του τελικού όγκου Tween-20. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- ***Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου***

Το διάλυμα είναι συγκέντρωσης 0,2M και pH= 7,5. Αποτελείται από δύο συνιστώσες. Πιο συγκεκριμένα για την παρασκευή του αναμιγνύονται Na_2HPO4 και NaH_2PO4 σε αναλογία 4:1 και στη συνέχεια προστίθεται διπλάσιος όγκος σε ddH_2O. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- ***Διαλύματα για εμφάνιση σήματος μετά από Western blot***

Το πρώτο διάλυμα ονομάζεται Developer και χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη του σήματος, ενώ το δεύτερο ονομάζεται Fixer και χρησιμοποιείται για την σταθεροποίηση του σήματος. Τα δύο διαλύματα παρασκευάζονται με ανάμειξη 1:2,8 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (Developer ή Fixer). Αποθηκεύονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

- ***Αντιδραστήριο λουσιφεράσης***

Σε κατάλληλο όγκο ddH_2O διαλυτοποιούνται 20mM Tris αρχικής συγκέντρωσης 1M, 2,67nM $MgSO_4$, 0,1M EDTA, 33,3mM DTT, 270μM Co-enzyme-A, 470μM λουσιφερίνης (αποτελεί το υπόστρωμα της λουσιφεράσης) και 530μM ATP. Είναι ιδιαίτερα φωτοευαίσθητο, συνίσταται να τοποθετείται σε σκουρόχρωμο δοχείο τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο και διατηρείται στους -20°C.

- ***O-nitrophenyl-β-D-galactoside, (ONPG)***

Αποτελεί το υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης. Η παρασκευή του απαιτεί τη διάλυση κατάλληλης ποσότητας ONPG, σε μορφή σκόνης, σε διάλυμα Na_3PO_4 συγκέντρωσης 0,1M και pH=7,5. Ακολουθεί ανάδευση στους 4^oC και φυλάσσεται στους -20^oC.

2.1.5 Κλάσματα ρητίνης και φύλλων μαστιχόδεντρου Χίου

Η ρητίνη του μαστιχόδεντρου Χίου, καθώς και τα φύλλα αυτού, που χρησιμοποιήθηκαν για την περάτωση των πειραμάτων στην παρούσα πτυχιακή εργασία, ήταν ευγενική χορηγία της Ένωσης Μαστιχοπαραγωγών Χίου. Παρελήφθησαν ρητίνη (Μαστίχα Χίου) και φύλλα από το μαστιχόδεντρο της Νότιας Χίου, καθώς και φύλλα από το μαστιχόδεντρο της Βόρειας Χίου, που δεν παράγει ρητίνη. Στη συνέχεια τόσο η ρητίνη όσο και τα φύλλα εστάλησαν στο Τμήμα Φαρμακευτικής του University of Piedmonte Orientale (UPO), υπό την επίβλεψη του καθηγητή Giovanni Appendino, για εκχύλιση και περαιτέρω κλασμάτωση, από την οποία προέκυψαν τρία κλάσματα από το κάθε φυτικό δείγμα. Χρησιμοποιώντας το διαλύτη πετρελαϊκό αιθέρα απομονώθηκε το μη πολικό κλάσμα (UPO 155a), ενώ με τη χρήση του οξικού αιθυλεστέρα και του τετραϋδροφουρανίου (THF) απομονώθηκαν το ημιπολικό (UPO 155b) και το πολικό κλάσμα (UPO 155c), αντίστοιχα. Τέλος τα κλάσματα διαλυτοποιήθηκαν σε DMSO και αποθηκεύτηκαν στους -80^{o}C.

2.1.6 Κυτταρικές σειρές

Στην εν λόγω μεταπτυχιακή διατριβή, για όλες τις πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HEK-293. Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται κάποιες γενικές πληροφορίες για τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, όπως αυτές παρουσιάζονται στην επίσημη ιστοσελίδα της εταιρίας American Type Culture Collection (ATCC).

Πίνακας 4. *Πληροφορίες για την κυτταρική σειρά HEK-293*

HEK-293 (ATCC® CRL-1573™)	
Οργανισμός	Homo sapiens/ human
Ιστός	Νεφρός
Μορφολογία	Επιθηλιακά κύτταρα
Επίπεδο Βιοασφάλειας	2 (περιέχουν αδενοϊό)

2.1.7 Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιεργειών

Πίνακας 5. *Συγκεντρωτικός πίνακας θρεπτικών υλικών για καλλιέργειες κυττάρων*

Όνομα	Εταιρία παραγωγής	Συγκέντρωση γλυκόζης	L-glutamate	Pyruvate	Phenol red
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Gibco® / Biosera	4,5 g/mol	+	+	+
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Gibco®	4,5 g/mol	+	-	-

2.1.8 Πλασμιδιακοί φορείς

Για την παροδική διαμόλυνση των κυττάρων κατά τη δοκιμασία λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pSG5-ERα, pSG5-ERβ, pMMTV-ERE-luciferase και pSV40-β-gal, όπου **ERE**= **E**strogen **R**esponse **E**lements.

2.1.9 Νανοσωματίδια

Τα νανοσωματίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία, κατασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Χαράλαμπου Σταμάτη. Πιο συγκεκριμένα, τα εν λόγω νανοσωματίδια ονομάζονται κουκίδες άνθρακα (Carbon dots ή C-dots) και παρελήφθησαν τόσο σε διαλυτοποιημένη (υγρή) μορφή σε dH_2O γνωστής συγκέντρωσης, όσο και σε λυοφυλιωμένη (στερεή) μορφή γνωστής μάζας. Το λυοφυλιωμένο δείγμα στη συνέχεια διαλυτοποιήθηκε επίσης σε dH_2O.

2.1.10 Αντισώματα

Πίνακας 6. *Συγκεντρωτικός πίνακας πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western*

<table>
<tr><th></th><th>Αντίσωμα</th><th>Εταιρία παραγωγής</th></tr>
<tr><td rowspan="3">Πρωτογενή αντισώματα</td><td>Anti-β-actin</td><td>Sigma</td></tr>
<tr><td>Anti-p65</td><td>Santa Cruz Biotechnology</td></tr>
<tr><td>Anti-procaspase 3</td><td>Cell Signaling</td></tr>
<tr><td colspan="3">Δευτερογενή αντισώματα</td></tr>
<tr><td colspan="3">Ως δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι mouse IgG-HRP και rabbit IgG-HRP της εταιρίας Pierce Antibodies.</td></tr>
</table>

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Απόψυξη και ψύξη κυττάρων

Όλες οι κυτταρικές σειρές του εργαστηρίου φυλάσσονται σε cryovials του 1ml. Κατά την ψύξη τα κύτταρα διαλυτοποιούνται σε FBS και προστίθενται στο cryovial, στο οποίο επιπλέον προστίθεται σε αναλογία 1:9 100% DMSO, που παρουσιάζει κρυοπροστατευτικές δράσεις. Τέλος αποθηκεύονται σε βαθιά ψύξη σε θερμοκρασίες -80°C και -120^{o}C (υγρό άζωτο).

Κατά την απόψυξη των κυττάρων και την εξαγωγή του cryovial από το χώρο αποθήκευσης, ακολουθεί θέρμανση στους 37^{o}C και μεταφορά του στη συσκευή καθέτου νηματικής ροής. Εκεί το περιεχόμενο του cryovial επαναδιαλυτοποιείται σε θρεπτικό μέσο Dulbecco's DMEM, το οποίο περιέχει το δείκτη phenol red. Τα επόμενα βήματα περιλαμβάνουν φυγοκέντρηση, επαναδιαλυτοποίηση του κυτταρικού ιζήματος στο ίδιο θρεπτικό μέσο, μεταφορά του σε φλάσκα καλλιέργειας Τ-25 και τέλος μεταφορά της φλάσκας στον επωαστικό κλίβανο.

2.2.2 Καλλιέργεια κυττάρων και θρυψινοποίηση

Η κυτταρική σειρά HEK-293 καλλιεργήθηκε σε σταθερές και συνεχείς συνθήκες 37^oC και 5% CO_2, σε κατάλληλο κλίβανο επώασης (βλ. ενότητα 2.1.1). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας των 25cm^2, ευρέως γνωστές ως Τ-25. Κατά την καλλιέργεια και την θρυψινοποίηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Dulbecco's DMEM υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, 4,5 mg/mol, το οποίο περιέχει το δείκτη phenol red. Επιπρόσθετα η καλλιέργεια κυττάρων απαιτεί την προσθήκη 1% επί του τελικού όγκου L-glutamate, 1% επί του τελικού όγκου συνδυαστικό αντιβιοτικό πεννικιλίνης και στρεπταμυκίνης και 10% επί του τελικού όγκου FBS, στο θρεπτικό μέσο.

2.2.3 Καταμέτρηση και στρώσιμο κυττάρων

Για πολλές από τις πειραματικές διαδικασίες που παρουσιάζονται παρακάτω πρώτο και απαραίτητο βήμα αποτελεί η καταμέτρηση και το στρώσιμο κυττάρων σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας (well-plates). Αρχικά τα κύτταρα υφίστανται θρυψινοποίηση, φυγοκέντρηση και επαναδιαλυτοποίηση σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Στη συνέχεια μικρή ποσότητα κυττάρων μεταφέρεται στην πλάκα Neubauer για τον προσδιορισμό του κυτταρικού πληθυσμού. Έπειτα, ο επιθυμητός όγκος κυτταρικού εναιωρήματος διαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου. Κατά το στρώσιμο των κυττάρων χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο Dulbecco's DMEM υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, 4,5 mg/mol, το οποίο δεν περιέχει το δείκτη phenol red. Επιπλέον το θρεπτικό είναι εμπλουτισμένο με 1% επί του τελικού όγκου L-glutamine, 1% Pen/Strep και 10% επί του τελικού όγκου φιλτραρισμένο FBS (FBS cis). Τέλος πραγματοποιείται ισόποση κατανομή του εναιωρήματος κυττάρων στα διάφορα wells και μεταφορά του πιάτου καλλιέργειας στον επωαστικό κλίβανο.

2.2.4 Μικροσκοπία φθορισμού

Αρχικά αποστειρωμένες καλυπτρίδες (coverslips) τοποθετούνται στα πηγαδάκια ενός τρυβλίου/πιάτου 24 θέσεων (24x well plate). Έπειτα, πραγματοποιείται μέτρηση και στρώσιμο του επιθυμητού αριθμού κυττάρων, τα οποία αφήνονται να επωαστούν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς το δείκτη phenol red. Στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα επωάζονται εκ νέου για μισή ώρα με ένα μίγμα κατάλληλου θρεπτικού υλικού και της χρωστικής Hoechst 33342 (μπλε) για την απεικόνιση των κυτταρικών πυρήνων. Την επόμενη μέρα και εφόσον τα κύτταρα έχουν αποκτήσει την αναμενόμενη μορφολογία αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και ακολουθούν εκπλύσεις των καλυπτρίδων με PBS1x. Στη συνέχεια ακολουθούν δύο επωάσεις στους -20^oC, αρχικά σε μεθανόλη για 10 λεπτά και εκ νέου σε ακετόνη, για 45 δευτερόλεπτα, για την μονιμοποίηση των κυττάρων. Έπειτα γίνονται 1-2 εκπλύσεις των καλυπτρίδων επίσης με PBS1x και τέλος οι καλυπτρίδες τοποθετούνται στην επιφάνεια μίας αντικειμενοφόρου πλάκας, με την πλευρά των κυττάρων προς τα κάτω. Για τη σταθεροποίησή των καλυπτρίδων, προστίθεται μικρή ποσότητα PVA (Polyvinyl alcohol) στην επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας. Τέλος, η τελευταία αφήνεται σε ειδική κασετίνα απουσία φωτός στους 4^oC για να στεγνώσει το PVA. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στο μικροσκόπιο ZEISS 2000, και οι εικόνες αποτυπώθηκαν με την ψυχόμενη κάμερα του μικροσκοπίου.

2.2.5 Προσθήκη ουσιών και συλλογή κυττάρων

Κατά την πειραματική διαδικασία των δοκιμών λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης χρησιμοποιήθηκαν τρία κλάσματα της ρητίνης του μαστιχόδεντρου Χίου: ένα πολικό, ένα ημιπολικό κι ένα μη πολικό κλάσμα. Καθένα από τα τρία κλάσματα μελετήθηκε σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, των 10 μg/ml, 30 μg/ml και 60 μg/ml. Επιπλέον η οιστρογονική δράση των εκχυλισμάτων αυτών μελετήθηκε τόσο απουσία όσο και παρουσία της E_2 (η οποία αποτελεί τον προσδέτη με τη μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης στους υποδοχείς οιστρογόνων) σε συγκέντρωση 10^{-6}M. Καθώς τα εκχυλίσματα Μαστίχας είναι διαλυμένα σε DMSO, τα δείγματα αναφοράς/μάρτυρες περιείχαν κι αυτά την αντίστοιχη ποσότητα DMSO. Επιπλέον, καθώς η οιστραδιόλη είναι διαλυμένη σε αιθανόλη, όσα δείγματα δεν περιείχαν E_2 προστέθηκε αιθανόλη, συμπεριλαμβανομένων και των δειγμάτων-μαρτύρων. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τις παραπάνω ουσίες για 6 ώρες. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε πρωτόκολλο για τη συλλογή των κυττάρων. Τέλος το κυτταρικό ίζημα που προέκυψε από το πρωτόκολλο αυτό αποθηκεύτηκε στους -80^oC για τη συνέχεια του πειράματος ή για οποιαδήποτε άλλη μελλοντική χρήση.

2.2.6 Λύση κυττάρων

Για την πραγματοποίηση SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης απαιτείται η λύση του κυτταρικού ιζήματος. Εν προκειμένω, για τη βέλτιστη λύση του κυτταρικού ιζήματος και τον κατακερματισμό του DNA των κυττάρων εφαρμόστηκε ένας συνδυασμός μεθόδων. Αρχικά έλαβε χώρα χημική λύση με την προσθήκη κατάλληλου διαλύματος lysis buffer στο κυτταρικό ίζημα. Το διάλυμα αυτό περιλαμβάνει επίσης αναστολείς πρωτεασών, DTT και PMSF. Τέλος ακολούθησε ελαφρά ανάδευση των κυττάρων και επώαση στους 4^oC για 15 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε η λύση των κυττάρων με τη χρήση υπερήχων, μία διαδικασία γνωστή ως sonication. Κατά τη διαδικασία αυτή το κυτταρικό περιεχόμενο υφίσταται υπερήχους διάρκειας ενός δευτερολέπτου, με τη βοήθεια κατάλληλης συσκευής (βλ. ενότητα 2.1.1). Συνήθως πραγματοποιούνται περίπου 5 επαναλήψεις και μεταξύ δύο επαναλήψεων μεσολαβεί διάστημα 35 δευτερολέπτων.

2.2.7 Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου – Δοκιμή Bradford

Η δοκιμασία Bradford είναι μία απλή χρωματομετρική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό του ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αλλαγή χρώματος, από κόκκινο-καφέ σε μπλε, της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία υπό όξινες συνθήκες προσδένεται σε κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών. Η ένταση της μπλε απόχρωσης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού περιεχομένου του κυτταρικού διαλύματος και η μεταβολή της απορρόφησης μετράται στα 595nm. Το stock του αντιδραστηρίου μας βρίσκεται σε συγκέντρωση 5x και συνεπώς αραιώνεται σε αναλογία 1:5 με ddH_2O (βλ. ενότητα 2.1.4). Τα υπό εξέταση δείγματα αναμειγνύονται με το αντιδραστήριο Bradford σε αναλογία 1:1000. Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται για 20 λεπτά στο σκοτάδι και ακολουθεί φωτομέτρηση. Τέλος, η συγκέντρωση του ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου του δείγματος υπολογίζεται από τον τύπο $y=0{,}0345x+0{,}01$, που προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA.

2.2.8 SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού μορίων DNA, RNA και πρωτεϊνών. Βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός πηκτώματος, από έναν αρνητικό (κάθοδος) προς ένα θετικό πόλο (άνοδος), υπό σταθερό ηλεκτρικό πεδίο.

Κατά την εκπόνηση των πειραματικών διαδικασιών της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, η οποία χρησιμεύει στο διαχωρισμό πρωτεϊνικών μορίων. Όπως υποδηλώνει και το όνομα της μεθόδου, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS), άρα υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Το SDS ως ανιονικό απορρυπαντικό καθώς συνδέεται στις πρωτεΐνες τις φορτίζει αρνητικά (1 μόριο SDS/ 2 αμινοξέα), καθιστώντας το ενδογενές φορτίο των πρωτεϊνών αμελητέο. Για το λόγο αυτό οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου είναι ασυνεχές, δηλαδή αποτελείται από δύο μέρη: τη γέλη συσσώρευσης, γνωστή και ως stacking gel και τη γέλη διαχωρισμού, γνωστή ως separating gel. Το stacking gel χαρακτηρίζεται από χαμηλότερο pH (pH= 6,8) και απουσία διαχωριστικής ικανότητας των πρωτεϊνών, ενώ το separating gel χαρακτηρίζεται από υψηλότερο pH (pH= 8,8) και υψηλή διαχωριστική ικανότητα των πρωτεϊνικών μορίων.

Με τη βοήθεια της μεθόδου Bradford που αναφέρθηκε προηγουμένως, επιτεύχθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση. Σε καθένα από αυτά τα δείγματα προστέθηκε επιπλέον κατάλληλος όγκος Tris 20 mM και sample buffer. Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα υπέστησαν θέρμανση στους $95^{o}C$. Τέλος η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε υπό σταθερή διαφορά δυναμικού ίση με 80V. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε γέλη πολυακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 10%, η σύσταση της οποίας παρουσιάζεται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 7. *Πίνακας σύστασης της γέλης συσσώρευσης και διαχωρισμού*

	Separating gel	**Stacking gel**
Αντιδραστήριο	**$C_{ακρυλαμίδης}$= 10%**	
ddH2O	2,425 ml	2,025 ml
Tris-HCL 1.5M (pH=8,8)	1,25 ml	210 μl
SDS (10%)	50 μl	25 μl
Bis-Acrylamide (40%)	1,25 ml	250 μl
APS	25 μl	12,5 μl
Temed	2,5 μl	2,5 μl

2.2.9 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)

Τα πρωτεϊνικά μόρια που διαχωρίζονται κατά την ηλεκτροφόρηση είναι δυνατόν να μεταφερθούν στην επιφάνεια μίας πολυμερούς μεμβράνης (ηλεκτρομεταφορά), κινούμενα ομοίως με πριν, προς το θετικό πόλο υπό σταθερό ηλεκτρικό πεδίο. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western είναι μία εργαστηριακή μέθοδος που επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια μίας τέτοιας μεμβράνης, με τη βοήθεια μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων ίση με 0,2μm. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιήθηκε υπό σταθερή ένταση ηλεκτρικού ρεύματος ίση με 0,35A για 70 λεπτά στον πάγο, διότι είναι πολύ πιθανό η υψηλή θερμοκρασία που αναπτύσσεται κατά την ηλεκτρομεταφορά να οδηγήσει σε μετουσίωση των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων για τη δέσμευση πιθανών ελεύθερων μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων στην επιφάνεια της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης. Για το σκοπό αυτό η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα TBST 1x με την προσθήκη 10% w/v άπαχου αποξηραμένου γάλακτος σε μορφή σκόνης.

Επόμενο βήμα αποτελεί η επώαση της μεμβράνης με το ειδικό πρωτογενές αντίσωμα στους 4^oC για 16 ώρες (overnight). Μετά από πλύσεις της μεμβράνης με TBST 1x, για την απομάκρυνση του άδετου αντισώματος, ακολούθησε η επώαση της μεμβράνης με δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο βρίσκεται συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (Horseradish Peroxidase, HRP), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε ένα δεύτερος γύρος πλύσεων για τον ίδιο λόγο και κατόπιν η μεμβράνη επωάστηκε με ECL, το υπόστρωμα της HRP. Τελικό βήμα της εν λόγω πειραματικής διαδικασίας αποτελεί η εμφάνιση του πρωτεϊνικού σήματος που βασίζεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας. Για το λόγο αυτό λαμβάνει χώρα έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ ακτίνων X, μέσα σε μία ειδικά διαμορφωμένη κασετίνα έκθεσης. Ο χρόνος έκθεσης διαμορφώνεται από το χρήστη ανάλογα με το προς εμφάνιση πρωτεϊνικό μόριο.

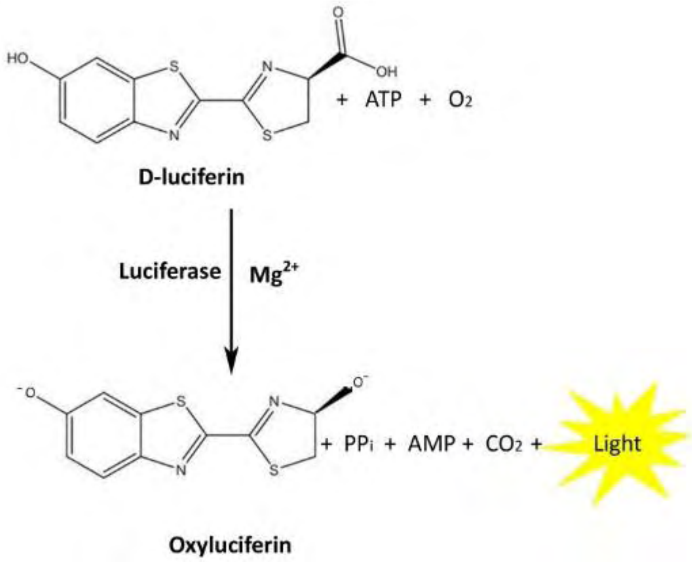
2.2.10 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων

Για τη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών των δοκιμασιών λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης, αρχικά απαιτείται η παροδική διαμόλυνση των κυττάρων κι εν προκειμένω των HEK-293. Τα πλασμίδια pSV40-β-gal και pMMTV-ERE-luciferase χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 0,15μg/well. Οι πλασμιδιακοί φορείς pSG5-ERα και pSG5-ERβ χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 0,75μg/well, καθώς στα παρακάτω πειράματα θεωρούνται πλασμίδια υπερέκφρασης. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία η παροδική διαμόλυνση των HEK-293 συνέβη με τη μέθοδο του $CaCl_2$. Κατά την εν λόγω πειραματική διαδικασία, τα κύτταρα επωάζονται με το διάλυμα διαμόλυνσης για 12-16 ώρες, στη συνέχεια αυτό αφαιρείται και τα κύτταρα επωάζονται σε θρεπτικό μέσο Dulbecco’s DMEM χωρίς το δείκτη phenol red, απουσία δηλαδή στεροειδών ορμονών προς αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

2.2.11 Ενζυμικός προσδιορισμός δραστικότητας- Δοκιμασίες λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης

◻ 2.2.11.1 Δοκιμή λουσιφεράσης

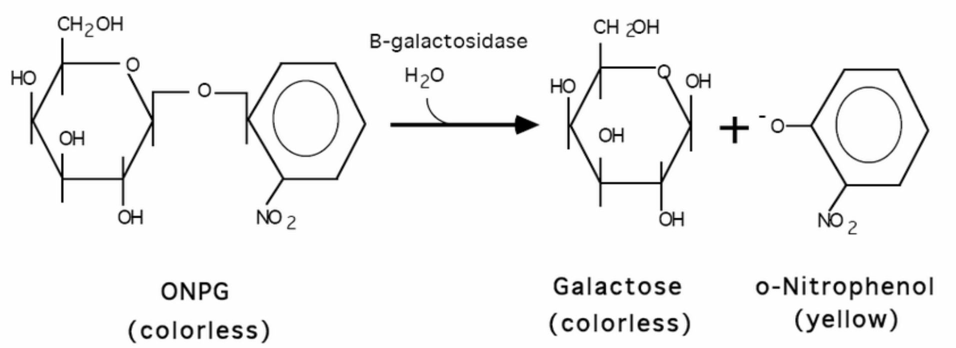
Κατά την εν λόγω πειραματική διαδικασία το γονίδιο αναφοράς, εν προκειμένω το γονίδιο της λουσιφεράσης, βρίσκεται σε χιμαιρικό αναγνωστικό πλαίσιο σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Στα πειράματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας το γονίδιο της λουσιφεράσης είναι συζευγμένο με τα στοιχεία απόκρισης του ER (EREs). Ο πλασμιδιακός φορέας στη συνέχεια μεταφέρεται σε δεκτικά κύτταρα. Η μέθοδος βασίζεται στην παραγωγή φωτός μετά την οξείδωση του υποστρώματος λουσιφερίνη από το ένζυμο λουσιφεράση (εικόνα 11).



Εικόνα 11. *Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης λουσιφεράσης.*

◻ 2.2.11.2 Δοκιμή β-γαλακτοσιδάσης

Η δοκιμή της β-γαλακτοσιδάσης διεξάγεται ως πείραμα αναφοράς σε σχέση με τη δοκιμασία λουσιφεράσης (επιτρέπει την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της), για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της παροδικής διαμόλυνσης. Η μεταγραφική δραστικότητα της β-γαλακτοσιδάσης προσδιορίζεται με τη φωτομετρική μελέτη της υδρόλυσης του χρωμογόνου υποστρώματος o-nitrophenyl-β-D-galactosidase (ONPG) στα 420nm, σύμφωνα με την αντίδραση που παρουσιάζεται στην εικόνα 12.



Εικόνα 12. *Σχηματική αναπαράσταση της υδρόλυσης του χρωμογόνου υποστρώματος ONPG από τη β-γαλακτοσιδάση.*

Η αντίδραση είναι δυνατόν να σταματήσει με την προσθήκη Na_2CO_3, το οποίο αυξάνει το pH της αντίδρασης. Σε pH=11 το μεγαλύτερο μέρος της ο-νιτροφαινόλης μετατρέπεται στην κίτρινη χρωματισμένη ανιονική μορφή και η β-γαλακτοσιδάση αδρανοποιείται. Κατά κανόνα η αντίδραση σταματά εμπειρικά, όταν τα δείγματα εμφανίσουν υποκίτρινο χρώμα. Σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 20μl κυτταρικού εκχυλίσματος. Η σύσταση των διαλυμάτων της αντίδρασης της β-γαλακτοσιδάσης παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 8. *Συγκεντρικός πίνακας αντιδραστηρίων για τη δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης*

Mix_1 για β-gal		mix β-gal (/well)		Λοιπά αντοδραστήρια	
β-μερκαπτοαιθανόλη	31,5 μl	**mix_1**	3 μl	**ONPG**	66 μl
$MgCl_2$	10 μl	**Na_3PO_4**	200 μl	**Na_2CO_3**	500 μl
ddH_2O	58,5 μl				

2.3 Υπολογιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ***Adobe Photoshop CS4***. Κατά την ίδια πειραματική διαδικασία, οι παραληφθείσες εικόνες δεδομένων αναλύθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος ***ImageJ*** για την ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού σήματος. Η ακριβής σύσταση των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση κατά τη δοκιμή Bradford, οι κανονικοποιήσεις όλων των πειραματικών διαδικασιών και η σχεδίαση όλων των σχεδιαγραμμάτων που παρουσιάζονται στην ενότητα των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκαν στο ***Microsoft Office Excel***. Οι μετρήσεις στο λουμινόμετρο κατά τον ενζυμικό προσδιορισμό δραστικότητας λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης, πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού ***ICE***. Οι εικόνες του πειράματος της μικροσκοπίας φθορισμού αποτυπώθηκαν με τη ψυχόμενη κάμερα (ευγενική χορηγία του Ιδρύματος Μποδοσάκη) του μικροσκοπίου φθορισμού του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος ***u Manager v.1.4***. Η επεξεργασία των εικόνων αυτών πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ***Q Capture Pro v.7.05***.

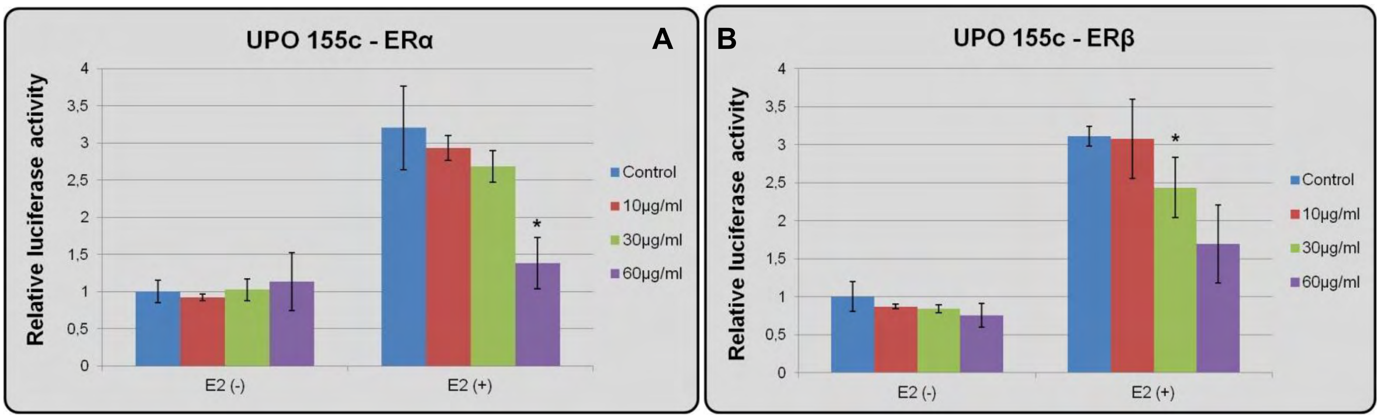
2.4 Στατιστική ανάλυση

Για την ορθότητα των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε T-TEST, στο Microsoft Office Excel. Συγκεκριμένα, στα πειράματα λουσιφεράσης, όσον αφορά τη συνθήκη E_2(-), πραγματοποιήθηκε σύγκριση όλων των τιμών με το control (-). Αντίστοιχη ανάλυση πραγματοποιήθηκε και για τη συνθήκη E_2(+). Στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, πραγματοποιήθηκε σύγκριση όλων των τιμών με τη συνθήκη ελέγχου. Οι στατιστικά σημαντικές τιμές πληρούν το $p<0.05$ (*), $p<0.01$ (**) και $p<0.001$ (***).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

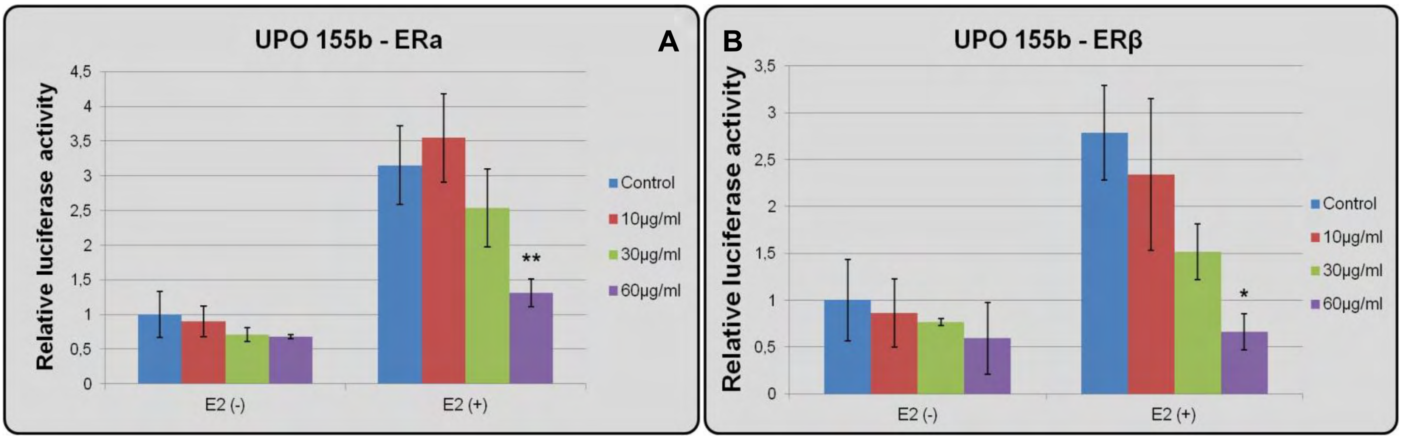
3.1 Διερεύνηση της πιθανής ρύθμισης της μεταγραφικής δραστικότητας των υποδοχέων οιστρογόνων από εκχυλίσματα Μαστίχας Χίου

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, αρχικά, διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση διαφορετικής πολικότητας εκχυλισμάτων της Μαστίχας Χίου, στη μεταγραφική δραστικότητα των υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ, μέσω των δοκιμών της λουσιφεράσης και της β-γαλακτοσιδάσης. Κατά την πραγματοποίηση των άνωθεν πειραματικών προσεγγίσεων, το πρώτο βήμα ήταν το ισόποσο στρώσιμο 35.000 κυττάρων HEK-293 σε θρεπτικό υλικό DMEM high glucose, εμπλουτισμένο με 10% FBS από το οποίο είχαν αφαιρεθεί οι στεροειδείς ορμόνες, με κατάλληλη κατεργασία, και το οποίο δεν περιείχε το δείκτη phenol red, σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 24 θέσεων. Ακολούθως τα κύτταρα επωάστηκαν σε κλίβανο επώασης, υπό σταθερές συνθήκες (37^oC, 5% CO_2). Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με τους πλασμιδιακούς φορείς pSG5-ERα ή pSG5-ERβ, pMMTV-ERE-luciferase και pSV40-β-gal και τα κύτταρα αφέθηκαν για επώαση overnight στον επωαστικό κλίβανο. Έπειτα, έλαβε χώρα η προσθήκη του εκάστοτε εκχυλίσματος της Μαστίχας σε συγκεντρώσεις των 10, 30 και 60μg/ml. Έπειτα από εξάωρη επώαση πραγματοποιήθηκε συλλογή κυττάρων (harvest). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε απουσία και παρουσία της E_2 (σε τελική συγκέντρωση 10^{-6}M), η οποία αποτελεί κύριο ενδογενή προσδέτη των ERs.



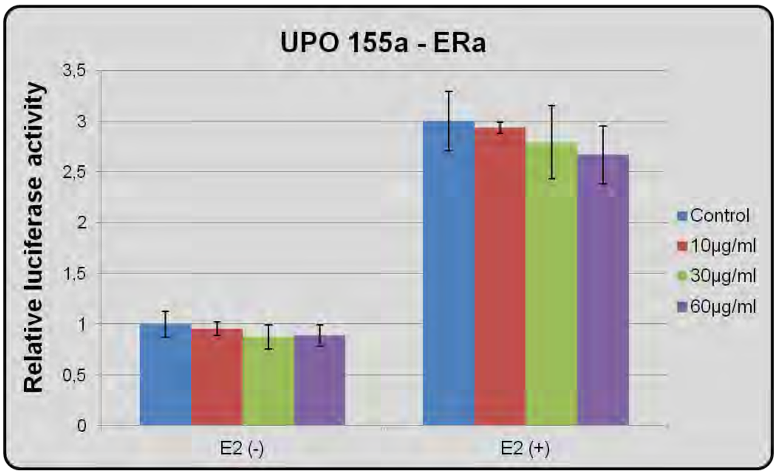
Διάγραμμα 1. *Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης του πολικού κλάσματος της Μαστίχας (UPO 155c) στη μεταγραφική δραστικότητα των (A) ERα και (B) ERβ. Τα κύτταρα HEK-293 επωάστηκαν για 6 ώρες με το πολικό κλάσμα της Μαστίχας σε συγκεντρώσεις των 10μg/ml, 30μg/ml και 60μg/m, απουσία και παρουσία E_2. Οι τιμές αναπαριστούν τον μέσο όρο ± SD, (A) n=3, (B) n=2-3. Στατιστικά σημαντικές διαφορές θεωρούνται εκείνες των οποίων οι τιμές πληρούν το p<0.05 (*) και p<0.01 (**), (A) n=3, (B) n=2-3.*

Σύμφωνα με το διάγραμμα 1A φαίνεται πως παρουσία 17β-οιστραδιόλης η συγκέντρωση των 60μg/ml του πολικού κλάσματος (UPO 155c) της Μαστίχας, οδηγεί σε μείωση της μεταγραφικής δραστικότητας του υποδοχέα ERα. Το αντίστοιχο ποσοστό μείωσης αγγίζει το 56,8%, σε σύγκριση με τη συνθήκη μάρτυρα (control), στην οποία τα κύτταρα έχουν επωαστεί μόνο με τον οργανικό διαλύτη DMSO. Μάλιστα σύμφωνα με την στατιστική επεξεργασία T-TEST, η μείωση αυτή είναι στατιστικά σημαντική (p≈0,016). Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις των 10μg/ml και 30μg/ml φαίνεται πως δεν προκαλούν κάποια στατιστικά σημαντική μείωση (8,52% και 16,22% αντίστοιχα) της μεταγραφικής δραστικότητας του ERα. Αντίστοιχα, παρόμοια επίδραση επιδεικνύει το πολικό κλάσμα στον έτερο υπότυπο, ERβ (διάγραμμα 1Β). Πιο συγκεκριμένα, παρουσία της οιστραδιόλης η συγκέντρωση των 60μg/ml μειώνει κατά 45,6% τη μεταγραφική δραστικότητα του ERβ, σε σύγκριση με τη συνθήκη μάρτυρα (control). Επιπλέον, η συγκέντρωση των 30μg/ml μειώνει κατά 21,67% τη μεταγραφική δραστικότητα του ERβ παρουσία οιστραδιόλης και μάλιστα η μείωση αυτή είναι στατιστικά σημαντική (p≈0,029). Ωστόσο, η συγκέντρωση των 10μg/ml πρακτικά δεν προκαλεί κάποια μείωση. Απουσία οιστραδιόλης, σε κανένα από τα δύο πειράματα δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές μεταβολές.



Διάγραμμα 2. *Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης του ημιπολικού κλάσματος της Μαστίχας (UPO 155b) στη μεταγραφική δραστικότητα των (A) ERα και (B) ERβ. Τα κύτταρα HEK-293 επωάστηκαν για 6 ώρες με το ημιπολικό κλάσμα της Μαστίχας σε συγκεντρώσεις των 10μg/ml, 30μg/ml και 60μg/m, απουσία και παρουσία E_2. Οι τιμές αναπαριστούν τον μέσο όρο ± SD, (A) n=3, (B) n=2-3. Στατιστικά σημαντικές διαφορές θεωρούνται αυτές των οποίων οι τιμές πληρούν το p<0.05 (*) και p<0.01 (**), (A) n=3, (B) n=2-3.*

Το διάγραμμα 2 πραγματεύεται την επίδραση του ημιπολικού κλάσματος (UPO 155b) της Μαστίχας στη μεταγραφική δραστικότητα των δύο υποτύπων των υποδοχέων οιστρογόνων. Παρουσία της E_2, η συγκέντρωση των 60μg/ml μειώνει κατά 58,5% τη μεταγραφική δραστικότητα του ERα, σε σύγκριση με τη συνθήκη μάρτυρα, με στατιστική μάλιστα σημαντικότητα (p≈0,0037). Αντίθετα η συγκέντρωση των 30μg/ml δεν προκαλεί κάποια στατιστικά σημαντική μείωση (19,53%) της μεταγραφικής δραστικότητας του ERα (διάγραμμα 2Α). Όσον αφορά τον ERβ, παρουσία E_2, παρατηρείται σημαντική μείωση της μεταγραφικής δραστικότητας του. Πιο συγκεκριμένα η συγκέντρωση των 60μg/ml μειώνει κατά 76,3% τη μεταγραφική ενεργότητα του ERβ σε σύγκριση με το control και μάλιστα η μείωση αυτή είναι στατιστικά σημαντική (p≈0,018), ενώ η συγκέντρωση των 30μg/ml οδηγεί σε μείωση που αγγίζει το 45,69%, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική. Τέλος, η συγκέντρωση των 10μg/ml προκαλεί μία μικρή μείωση της τάξης του 16% (διάγραμμα 2Β). Απουσία οιστραδιόλης, σε κανένα από τα δύο πειράματα δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

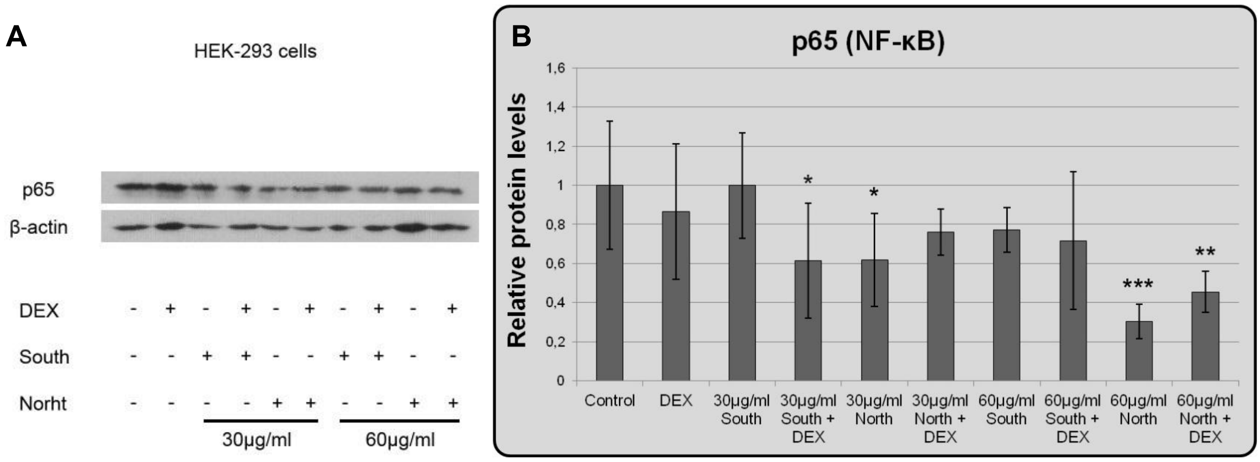


Διάγραμμα 3. *Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης του μη πολικού κλάσματος της Μαστίχας (UPO 155a) στη μεταγραφική δραστικότητα του ERα. Τα κύτταρα HEK-293 επωάστηκαν για 6 ώρες με το μη πολικό κλάσμα της Μαστίχας σε συγκεντρώσεις των 10μg/ml, 30μg/ml και 60μg/m, απουσία και παρουσία E_2. Οι τιμές αναπαριστούν τον μέσο όρο ± SD, n=2-3. Στατιστικά σημαντικές διαφορές θεωρούνται αυτές των οποίων οι τιμές πληρούν το $p<0.05$ (*) και $p<0.01$ (**), n=2-3.*

Στο διάγραμμα 3, φαίνεται ξεκάθαρα πως πρακτικά δεν παρατηρείται επίδραση του μη πολικού κλάσματος της Μαστίχας (UPO 155a) στη μεταγραφική δραστικότητα του ERα. Πιο συγκεκριμένα, στη συνθήκη E_2(+) δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική μείωση, με τα αντίστοιχα ποσοστά για τις συγκεντρώσεις των 10μg/ml, 30μg/ml και 60μg/ml να φτάνουν το 2,23%, 6,97% και 11,13%, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, δε κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η επίδραση του μη πολικού κλάσματος στη μεταγραφική δραστικότητα του ERβ.

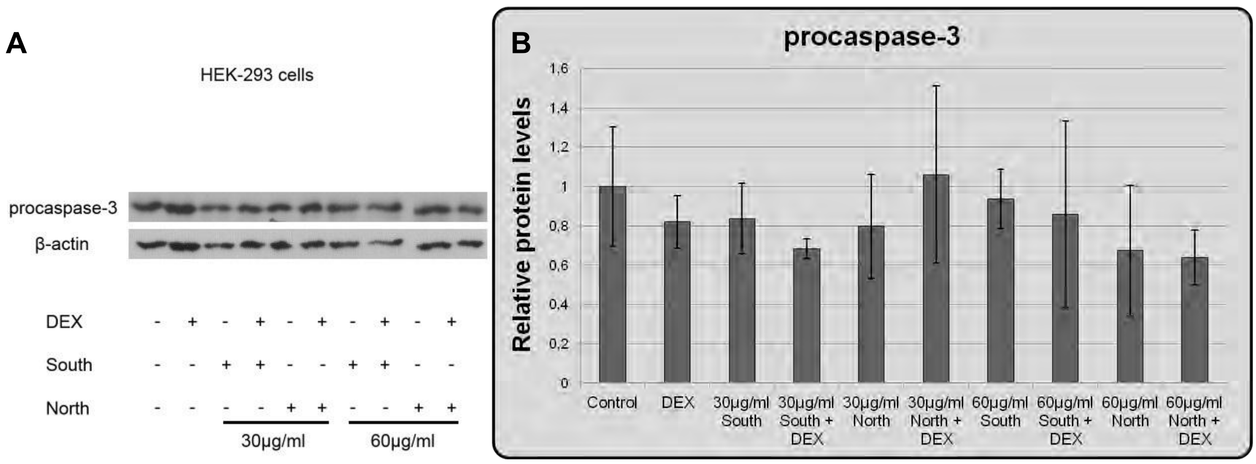
3.2 Διερεύνηση της επίδρασης του ημιπολικού κλάσματος φύλλων του μαστιχόδεντρου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κB και της προκασπάσης-3

Για τη διερεύνηση της επίδρασης του ημιπολικού κλάσματος φύλλων του μαστιχόδεντρου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της p65 και της προκασπάσης-3, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western στην κυτταρική σειρά HEK-293. Οι χειρισμοί των κυττάρων που οδήγησαν στην απόκτηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων, τα οποία με τη σειρά τους χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των παραπάνω πειραμάτων, πραγματοποιήθηκαν από την υποψήφια διδάκτωρ Καλούση Φωτεινή. Ως συνθήκη ελέγχου επιλέχτηκε η επώαση των κυττάρων με τον οργανικό διαλύτη DMSO, στον οποίο είναι διαλυτοποιημένα τα κλάσματα. Συνοπτικά τα κύτταρα επωάστηκαν για 2 ημέρες με το ημιπολικό κλάσμα φύλλων μαστιχόδεντρων, τόσο της νότιας όσο και της βόρειας Χίου. Κάθε κλάσμα χρησιμοποιήθηκε στις συγκεντρώσεις των 30μg/ml και 60μg/ml, απουσία και παρουσία (10^{-8}M) δεξαμεθαζόνης (DEX), η οποία αποτελεί συνθετικό γλυκοκορτικοειδές.



Εικόνα 13. *Α) Απεικόνιση της επίδρασης του ημιπολικού κλάσματος φύλλων του μαστιχόδεντρου, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κB, μορίου που συμμετέχει στο μηχανισμό της απόπτωσης. Β) Διαγραμματική απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της υπομονάδας p65. Κύτταρα HEK-293 επωάστηκαν για 48 ώρες με τα ημιπολικά κλάσματα φύλλων, μαστιχόδεντρων από το νότιο και βόρειο τμήμα της Χίου. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 30μg/ml και 60μg/ml, απουσία και παρουσία DEX (10^{-8}M). Η συνθήκη ελέγχου (control) περιλαμβάνει κύτταρα που επωάστηκαν σε DMSO. Οι τιμές αναπαριστούν τον μέσο όρο ± SD, n=4. Στατιστικά σημαντικές διαφορές, σε σχέση με τη συνθήκη μάρτυρα, θεωρούνται αυτές των οποίων οι τιμές πληρούν το p<0.05 (*) και p<0.01 (**), p<0.001 (***), n=4.*

Σύμφωνα με την εικόνα 13B, φαίνεται πως το ημιπολικό κλάσμα των φύλλων μαστιχόδεντρου της νότιας Χίου, στη συγκέντρωση των 30μg/ml παρουσία DEX, οδηγεί σε στατιστικά σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της υπομονάδας p65 του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB κατά 38,6% (p≈0,042), σε σύγκριση με τη συνθήκη μάρτυρα (control), στην οποία τα κύτταρα έχουν επωαστεί μόνο με τον οργανικό διαλύτη DMSO. Ακόμα στατιστικά σημαντική μείωση παρουσιάζει και το κλάσμα των φύλλων μαστιχόδεντρου της βόρειας Χίου, στη συγκέντρωση των 30μg/ml, προκαλώντας μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της p65 κατά 38% (p≈0,033), ακόμα και απουσία DEX. Όσον αφορά τη συγκέντρωση των 60μg/ml, στατιστικά σημαντική μείωση προκαλεί μόνο το κλάσμα των φύλλων μαστιχόδεντρου της βόρειας Χίου, κατά 69,7% (p≈0,0009) και 54,5% (p≈0,003), απουσία και παρουσία DEX, αντίστοιχα. Ωστόσο το αντίστοιχο κλάσμα του νότιου τμήματος παρουσιάζει μία τάση μείωσης, η οποία υπό τις συνθήκες του πειράματος είναι μη στατιστικά σημαντική και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.



Εικόνα 14. *Α) Απεικόνιση της επίδρασης του ημιπολικού κλάσματος φύλλων του μαστιχόδεντρου, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3, μορίου που συμμετέχει στο μηχανισμό της φλεγμονώδους απόκρισης. Β) Διαγραμματική απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3. Κύτταρα HEK-293 επωάστηκαν για 48 ώρες με τα ημιπολικά κλάσματα φύλλων, μαστιχόδεντρων από το νότιο και βόρειο τμήμα της Χίου. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 30μg/ml και 60μg/ml, απουσία και παρουσία DEX (10-^{8}M). Η συνθήκη ελέγχου (control) περιλαμβάνει κύτταρα που επωάστηκαν σε DMSO. Οι τιμές αναπαριστούν τον μέσο όρο ± SD, n=2. Στατιστικά*

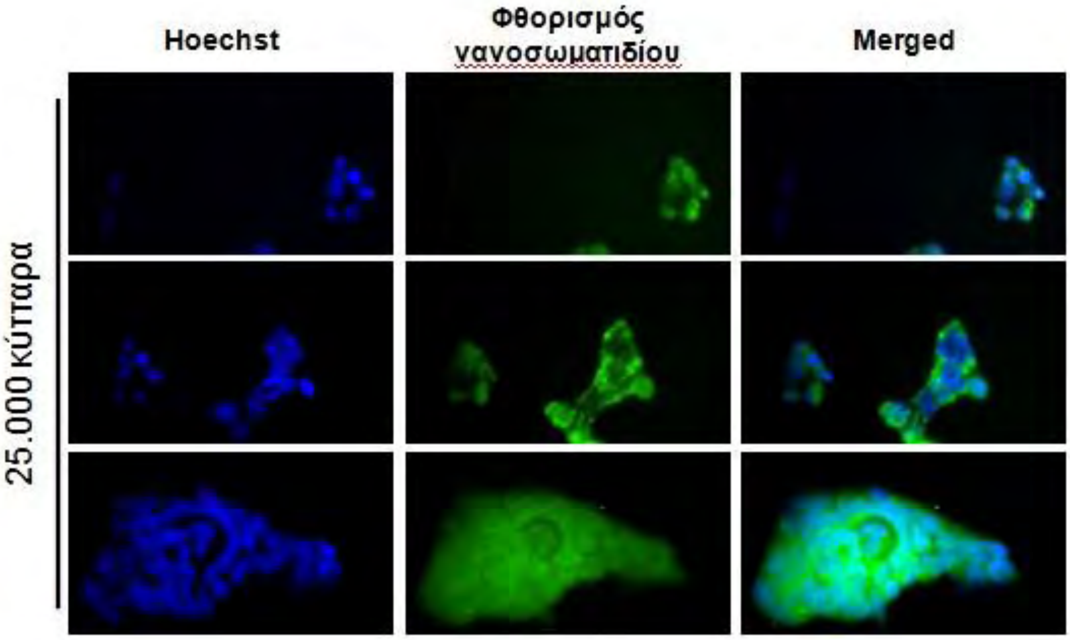
σημαντικές διαφορές, σε σχέση με τη συνθήκη μάρτυρα, θεωρούνται αυτές των οποίων οι τιμές πληρούν το $p<0.05$ (*) και $p<0.01$ (**), $p<0.001$ (***), n=2.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 14Β, φαίνεται πως τα ημιπολικά κλάσματα των φύλλων μαστιχόδεντρου τόσο της βόρειας όσο και της νότιας Χίου, στις συγκεντρώσεις των 30μg/ml και 60μg/ml, παρουσιάζουν μία τάση μείωσης, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα. Μάλιστα, η συγκέντρωση των 60μg/ml του κλάσματος της βόρειας Χίου οδηγεί σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3 κατά 32,6% και 36,1% απουσία και παρουσία DEX, αντίστοιχα. Από την άλλη, η συγκέντρωση των 60μg/ml του κλάσματος της νότιας Χίου, απουσία DEX, προκαλεί τη μικρότερη ελάττωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3, με το αντίστοιχο ποσοστό να αγγίζει μετά βίας το 6,4%, υποδηλώνοντας μικρότερη ή μη κυτταροτοξικότητα των ημιπολικών κλασμάτων από φύλλα μαστιχόδεντρου Νότιας Χίου σε σχέση με τα αντίστοιχα κλάσματα από μαστιχόδεντρο Βόρειας Χίου.

3.3 Αξιολόγηση της έντασης φθορισμού νανοσωματιδίων σε in vitro σύστημα κυττάρων HEK-293

Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας νανοσωματιδίων ως εν δυνάμει φορείς βιοδραστικών μορίων και η αξιολόγηση της έντασης αυτοφθορισμού των νανοσωματιδίων C-dots, προσεγγίστηκε με πειράματα μιικροσκοπίας φθορισμού. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε στρώσιμο 12.000 κυττάρων HEK-293 σε καλυπτρίδες, εντός πιάτου κυτταροκαλλιέργειας 24 θέσεων, και στη συνέχεια τα κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM high glucose (10% FBS) για 48 ώρες σε επωαστικό κλίβανο (37^{o}C, 5% CO_2). Μετά το πέρας των 48 ωρών, στα κύτταρα προστέθηκαν τα νανοσωματίδια και η χρωστική Hoechst 33342 και ακολούθησε νέα επώαση για 2 ώρες. Σε αυτό το πρώτο πείραμα χρησιμοποιήθηκε τόσο το διαλυτοποιημένο δείγμα με αρχική συγκέντρωση 0,3mg/ml, όσο και το λυοφιλιωμένο δείγμα (διαλυτοποιήθηκε σε dH_2O) με αρχική συγκέντρωση 10mg/ml. Με βάση πειράματα κυτταροτοξικότητας που πραγματοποιήθηκαν από τον υποψήφιο διδάκτωρ Τσιάλτα Ιωάννη, τα δύο δείγματα μελετήθηκαν σε τελικές αραιώσεις 1/50, 1/100, 1/200 και 1/500, το καθένα. Κάθε μία από τις παραπάνω συνθήκες εξετάστηκε σε δύο βιολογικές επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα του πειράματος στο μικροσκόπιο φθορισμού έδειξαν πως στο λυοφιλιωμένο δείγμα δεν υπήρχε εγγενής φθορισμός (αυτοφθορισμός) των C-dots, ενώ στο διαλυτοποιημένο δείγμα η αραίωση 1/50 παρουσίασε ικανοποιητική ένταση αυτοφθορισμού, παρότι πολύ μικρής διάρκειας, δεδομένου ότι παρατηρήθηκε έντονα το φαινόμενο της φωτοαπόσβεσης (photobleaching) στις υψηλότερες αραιώσεις (δεν παρουσιάζονται εικόνες).

Για το λόγο αυτό κατά τον επανέλεγχο του αποτελέσματος αυτού στο επόμενο πείραμα χρησιμοποιήθηκε μόνο το διαλυτοποιημένο δείγμα και μόνο σε τελική αραίωση 1/50. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά την πειραματική προσέγγιση ήταν ίδια. Διαφορά αποτελεί πως στο δεύτερο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 25.000 κύτταρα HEK-293. Τα αποτελέσματα του πειράματος παρουσιάζονται στην εικόνα 15. Παρατηρώντας τη 2^{η} στήλη μπορούμε να αποφανθούμε πως τα νανοσωματίδια έχουν εγγενή φθορισμό. Θέτοντας τις δύο πρώτες στήλες σε αντιπαραβολή (στήλη Merged) βλέπουμε πως ο φθορισμός αυτός είναι περιπυρηνικός. Για τη λήψη των εικόνων χρησιμοποιήθηκε ο 63x αντικειμενικός φακός του μικροσκοπίου φθορισμού.



Εικόνα 15. *Απεικόνιση του εγγενή φθορισμού νανοσωματιδίων C-dots. Για το πείραμα στρώθηκαν 25.000 κύτταρα HEK-293. Η πρώτη στήλη αναφέρεται στην απεικόνιση των πυρήνων, ενώ η δεύτερη στην απεικόνιση του εγγενή φθορισμού των τελειών άνθρακα. Η παρατήρηση των εικόνων έγινε με τον 63x αντικειμενικό φακό του μικροσκοπίου φθορισμού.* ***Hoechst 33342****: φθορίζουσα χρωστική μπλε χρώματος για την απεικόνιση των κυτταρικών πυρήνων,* ***Merged:*** *στήλη κατά την οποία παρουσιάζεται η συνδυαστική εικόνα των προηγούμενων στηλών.*

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι πιο γνωστές φυσιολογικές δράσεις της 17β-οιστραδιόλης (E_2) διαμεσολαβούνται από δύο υπότυπους του υποδοχέα οιστρογόνων, τους ERα και ERβ, οι οποίοι αποτελούν μέλη της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων και έχουν παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά. Οι ERα και ERβ κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και εμφανίζουν ξεχωριστά πρότυπα έκφρασης καθώς και διαφορετικές συγγένειες πρόσδεσης. Τα οιστρογόνα δεσμεύονται στους ERs και στη συνέχεια το σύμπλοκο προσδέτη-υποδοδχέα συνδέεται σε αλληλουχίες στοιχείων απόκρισης σε οιστρογόνα (EREs) στις ρυθμιστικές περιοχές των αντίστοιχων γονιδίων που ανταποκρίνονται στα οιστρογόνα και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση αλληλεπιδρώντας άμεσα ή έμμεσα με μεταγραφικούς παράγοντες (γενωμική σηματοδότηση) *(Shibu et al., 2017).*

Ωστόσο, πολλά βότανα και φαρμακευτικά φυτά είναι γνωστό ότι περιέχουν συστατικά παρόμοια με τα οιστρογόνα *(Shibu et al., 2017)*. Τα φυτοοιστρογόνα είναι πολυφαινολικές ενώσεις και αποτελούν κύριους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών. Πλούσιες πηγές φυτοοιστρογόνων είναι τα όσπρια, ιδίως η σόγια και το τριφύλλι *(Hashem & Soltan, 2015)*. Οι επιδράσεις των φυτοοιστρογόνων βασίζονται στη δομική τους ομοιότητα με τη 17β-οιστραδιόλη *(Hashem & Soltan, 2015)*. Συνεπώς έχουν την ικανότητα να συνδέονται στους ERα και ERβ των θηλαστικών και ενεργούν τόσο ως αγωνιστές όσο και ως ανταγωνιστές του υποδοχέα οιστρογόνων *(Shibu et al., 2017); (Hashem & Soltan, 2015)*.

Η Μαστίχα Χίου είναι ο καρπός του Pistacia lentiscus L. var. Chia (μαστιχόδεντρο), της οικογένειας Anacardiaceae, που καλλιεργείται αποκλειστικά στο νότιο κομμάτι της Χίου. Η Μαστίχα υπήρξε γνωστή για τις φαρμακευτικές της ιδιότητες από τα αρχαία χρόνια. Πρόσφατα, έχει αναφερθεί πως διαθέτει αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αφροδισιακή, αντικαρκινική, αντιμυκητιακή, αντιβακτηριακή και υπολιπιδιαμική δράση και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική κατά των γαστρεντερικών διαταραχών όπως η δυσπεψία και το πεπτικό έλκος *(Paraskevopoulou & Kiosseoglou et al, 2016)*.

Ως εκ τούτου, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της πιθανής επίδρασης τριών κλασμάτων (πολικού, ημιπολικού, μη πολικού) της Μαστίχας Χίου στη μεταγραφική δραστικότητα των υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ. Για την υλοποίηση αυτού διενεργήθηκαν πειράματα προσδιορισμού της μεταγραφικής δραστικότητας των δύο υποτύπων, χρησιμοποιώντας τις δοκιμές της λουσιφεράσης και της β-γαλακτοσιδάσης.

Όσον αφορά το πολικό κλάσμα της Μαστίχας (UPO155c), είναι εμφανές πως αυξανομένων συγκεντρώσεων αυτού αναιρείται η από 17β-οιστραδιόλη ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστικότητας των ERα και ERβ. Πιο συγκεκριμένα, στη συγκέντρωση των 60μg/ml, παρουσία E_2 το συγκεκριμένο κλάσμα Μαστίχας μειώνει την από E_2 ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστικότητα και των δύο υποτύπων, με τη μείωση στον ERα να φτάνει στο 56,8%, ενώ στον ERβ να αγγίζει το 45,6%, πάντα σε σύγκριση με τη συνθήκη ελέγχου. Αντίθετα, η συγκέντρωση των 10μg/ml δεν προκαλεί στατιστικά σημαντική αναστολής της ενεργοποίησης της μεταγραφικής δραστικότητας των ERα/ERβ από E_2, ενώ εκείνη των 30μg/ml παρουσιάζει μία σχετική τάση μείωσης, χωρίς ωστόσο αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Έτσι συμπεραίνουμε πως το πολικό κλάσμα της Μαστίχας Χίου ασκεί ανταγωνιστική δράση στην E_2, όμως η επίδραση αυτή δεν είναι επιλεκτική, δεδομένου πως οι δύο υποδοχείς παρουσιάζουν παρόμοιο πρότυπο μείωσης, όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό από τα αντίστοιχα διαγράμματα (διάγραμμα 1Α και 1Β).

Στη συνέχεια εξετάστηκε η δράση του ημιπολικού κλάσματος της Μαστίχας Χίου (UPO155b), πραγματοποιώντας το ίδιο πείραμα, με τις ίδιες συνθήκες. Τόσο στην περίπτωση του ERα όσο και σε εκείνη του ERβ, είναι εμφανές πως το ημιπολικό κλάσμα ασκεί ανταγωνιστική δράση στην E_2, μειώνοντας την από E_2 επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας των δύο υποτύπων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, στη συγκέντρωση των 60μg/ml, το ημιπολικό κλάσμα μειώνει την από E_2 επαγόμενη ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστικότητα του ERα κατά 58,5% ($p<0,01$) και εκείνη του ERβ κατά 76,3% ($p<0,05$), μειώσεις που είναι στατιστικά σημαντικές. Ομοίως με προηγουμένως, η συγκέντρωση των 30μg/ml παρουσιάζει τάση μείωσης της από E_2 επαγόμενης δραστικότητας και των δύο υποτύπων, με το αντίστοιχο ποσοστό για τον ERβ να φτάνει στο 45,7%, ενώ για τον ERα μόλις στο 19,5%, χωρίς ωστόσο κάποια στατιστική σημαντικότητα. Τέλος, η επώαση των κυττάρων HEK-293 με 10μg/ml ημιπολικού κλάσματος, δεν οδήγησε σε καμία ουσιαστική μεταβολή της μεταγραφικής δραστικότητας των δύο υποδοχέων, τόσο απουσία όσο και παρουσία E_2. Συνεπώς και σε αυτήν την περίπτωση συμπεραίνουμε πως το ημιπολικό κλάσμα της Μαστίχας Χίου, μειώνει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την από E_2 επαγόμενη ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστικότητας των ERα/ERβ, αλλά δεν παρουσιάζει επιλεκτική δράση για κάποιον από τους δύο υπότυπους.

Κι αν τα αποτελέσματα εμφανίζουν κάποιο όμοιο μοτίβο για τα δύο πρώτα κλάσματα, όσον αφορά το μη πολικό κλάσμα της Μαστίχας Χίου (UPO155a) τα πράγματα είναι εντελώς διαφορετικά. Σύμφωνα με το διάγραμμα 3 γίνεται εύκολα αντιληπτό πως το μη πολικό κλάσμα δεν παρουσιάζει δράση έναντι της ρύθμισης της δραστικότητας του υποδοχέα ERα, τόσο απουσία όσο και παρουσία E_2, καθώς στη συγκέντρωση των 60μg/ml το ποσοστό μείωσης της από E_2 επαγόμενης ενεργοποίησης της δραστικότητας του ERα φθάνει μέχρι 11%, ενώ στην συγκέντρωση των 10μg/ml φτάνει μόλις στο 2,23%. Ωστόσο, μένει να διερευνηθεί και η επίδραση του μη πολικού κλάσματος στη μεταγραφική δραστικότητα του ERβ. Παρόμοιο μοτίβο είχε παρατηρηθεί και σε μελέτη της επίδρασης της μεταγραφικής δραστικότητας του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR) με την προσθήκη των ίδιων κλασμάτων, η οποία πραγματοποιήθηκε από την υποψήφια διδάκτωρ κα. Καλούση Φωτεινή σε προγενέστερο χρονικό διάστημα.

Παράλληλα, ως συνέχεια των πειραμάτων της υποψήφιας διδάκτωρ Καλούσης Φωτεινής στο πλαίσιο της διδακτορικής της διατριβής, διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση του ημιπολικού κλάσματος φύλλων του μαστιχόδεντρου στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 του NF-κB και της προκασπάσης-3 και στη συνέχεια διενεργήθηκε σύγκριση των επιδράσεων αυτών μεταξύ των φύλλων μαστιχόδεντρου από το βόρειο και το νότιο τμήμα του νησιού της Χίου.

Οι πρωτεΐνες NF-κB είναι μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν τη ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται σε διάφορες διεργασίες, όπως η ανοσοαπόκριση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κυτταρική επιβίωση *(Lecoq etal., 2017)*. Τα πέντε μέλη που συγκροτούν την οικογένεια NF-κB στα θηλαστικά περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες p50, p52, p65 (γνωστή και ως RelA), RelB και c-Rel, οι οποίες σχηματίζουν διαφορετικούς συνδυασμούς ομο- και ετερο-διμερών μεταξύ τους, με το ετεροδιμερές p65-p50 να είναι η πιο συχνή κυτταρική μορφή *(Lecoq etal., 2017)*. Προκειμένου να ενεργοποιηθεί η μεταγραφή γονιδίων-στόχων του NF-κB, η p65 συνδέεται ειδικά σε θέσεις δέσμευσης κB, οι οποίες εντοπίζονται σε περιοχές υποκινητών ή/και ενισχυτών γονιδίων-στόχων *(Lecoq et al., 2017)*. Έχει παρατηρηθεί πως οι δύο υπότυποι του υποδοχέα οιστρογόνων αναστέλλουν τη δραστικότητα του NF-κB σε πολλούς τύπους κυττάρων με E_2-εξαρτώμενο τρόπο. In vivo, ο ERα συνδέεται στις υπομονάδες του NF-κB p65, p50 και c-Rel, ενώ ο ERβ αναστέλλει την ικανότητα σύνδεσης στο DNA των p50, c-Rel και των διμερών p50/p65 *(Xing et al., 2012)*. Η ακριβής φύση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ERs και του NF-κB παραμένει ασαφής. Ωστόσο αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως οι ERs και ο NF-κB αλληλοεξουδετερώνουν τις δραστικότητές τους. Αντίθετα, άλλες μελέτες έχουν δείξει συνέργεια μεταξύ των ERs και του NF-κB, που οδηγεί στη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται σε επιθετική συμπεριφορά κυττάρων όγκου, όπως πρωτεΐνες ανθεκτικότητας σε πολλαπλά φάρμακα και παράγοντες επιβίωσης *(Sas et al., 2012)*. Σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας επιτελούν και οι πρωτεάσες. Συγκεκριμένα, οι πρωτεάσες διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στην κατάλυση σημαντικών βιολογικών διεργασιών στους πολυκύτταρους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης, της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, της πήξης του αίματος και της αναδιαμόρφωσης των ιστών. Μεταξύ αυτών, η κασπάση-3 καταλύει την ειδική διάσπαση περισσότερων των 200 κυτταρικών πρωτεϊνών, οδηγώντας σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Το πρόδρομο μόριο αυτής είναι η προκασπάση-3, η οποία ενεργοποιείται μέσω πρωτεολυτικής ωρίμανσης για να σχηματίσει την κασπάση-3. *(Thomsen et al., 2013).* Η προκασπάση-3 είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της έκκρισης φιμπρονεκτίνης, της μορφολογίας των κυττάρων, της κυτταρικής προσκόλλησης και μετανάστευσης, ενώ φαίνεται πως παίζει κρίσιμο ρόλο στην κατάλληλη διατήρηση της μιτοχονδριακής βιογένεσης. *(Kim et al., 2017)*

Για την επίτευξη της διερεύνησης της δράσης ημιπολικών κλασμάτων από φύλλα Μαστιχόδεντρου στα επίπεδα έκφρασης της p65 υπομονάδας του NF-κB και της προκασπάσης-3 πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western στην κυτταρική σειρά HEK-293. Οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν από την υποψήφια διδάκτωρ Καλούση Φωτεινή, στο πλαίσιο των πειραμάτων της διδακτορικής της διατριβής. Σε προηγούμενα πειράματα της παρατηρήθηκε πως τα ημιπολικά κλάσματα των φύλλων μαστιχόδεντρου της νότιας και βόρειας Χίου, προκαλούν μείωση της μεταγραφικής δραστικότητας του NF-κB, στην κυτταρική σειρά HEK-293. Έτσι, κρίθηκε σκόπιμη και η αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της υπομονάδας p65 του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντικές μειώσεις, προκαλούμενες από τα ημιπολικά κλάσματα φύλλων του μαστιχόδεντρου τόσο της νότιας όσο και της βόρειας Χίου (εικόνα 13B). Συγκεκριμένα, στη συγκέντρωση των 30μg/ml, το ημιπολικό κλάσμα φύλλων μαστιχόδεντρου της νότιας Χίου παρουσία DEX μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p65 κατά 38,6% (p≈0,042), ενώ το κλάσμα φύλλων της βόρειας Χίου απουσία DEX, οδηγεί σε μείωση που αγγίζει το 38% (p≈0,033), συγκριτικά πάντα με τα κύτταρα στη συνθήκη ελέγχου. Αντιθέτως, στη συγκέντρωση των 60μg/ml, στατιστικά σημαντικές μειώσεις προκαλεί μόνο το κλάσμα των φύλλων της βόρειας Χίου, τόσο απουσία όσο και παρουσία DEX κατά 69,7% (p≈0,0009) και 54,5% (p≈0,003), αντίστοιχα (εικόνα 13B).

Όσον αφορά τη διερεύνηση της αποπτωτικής δράσης των παραπάνω κλασμάτων, μέσω ελέγχου των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η προκασπάση-3, σε συγκέντρωση 60μg/ml του ημιπολικού κλάσματος φύλλων μαστιχόδεντρου της βόρειας Χίου προκάλεσε τάση μείωσης των πρωτεϊνικών της επιπέδων κατά 32,6% και 36,1% απουσία και παρουσία DEX, χωρίς όμως κάποια στατιστική σημαντικότητα (εικόνα 14B). Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης κατά Western που παρουσιάζονται στην παρούσα πτυχιακή εργασία είναι πρώιμα και συνεπώς απαιτούνται περισσότερες βιολογικές και τεχνικές επαναλήψεις για τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Τέλος, με σκοπό την κατασκευή νανοσωματιδίων και τον έλεγχο της αποτελεσματικότητάς τους ως φορείς βιοδραστικών μορίων, έγινε αξιολόγηση του εγγενή φθορισμού (αυτοφθορισμού) νανοσωματιδίων σε in vitro σύστημα κυττάρων HEK-293, κατόπιν επώασης τους με αυτά. Στο πλαίσιο συνεργασίας με την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Χαράλαμπου Σταμάτη, παραλάβαμε νανοσωματίδια, τα οποία κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο «microwave-assisted synthesis». Τα νανοσωματίδια βρίσκουν εφαρμογή σε τεχνικές: βιοαπεικόνισης (ως χημικοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες), διάγνωσης, διανομής φαρμάκων (ως drug carriers), ιατρικής θεραπείας κ.α. Μέχρι πρότινος τα περισσότερα νανοσωματίδα που χρησιμοποιούνταν ήταν ανόργανα, όμως εμφάνιζαν υψηλή τοξικότητα καθώς αποτελούνταν από βαρέα μέταλλα όπως για παράδειγμα το κάδμιο *(Ding et al, 2014)*. Πρόσφατα, οι κουκίδες άνθρακα (C-dots), οργανικά νανοϋλικά με διάμετρο <10nm, έχουν προσελκύσει μεγάλη προσοχή λόγω των σταθερών φυσικοχημικών και φωτοχημικών ιδιοτήτων τους. Πιο συγκεκριμένα, οι C-dots προσφέρουν μια εναλλακτική λύση στις οργανικές χρωστικές σε πλειάδα βιοεφαρμογών, λόγω των ρυθμιζόμενων επιφανειακών λειτουργιών τους, της χαμηλής τους τοξικότητας, της εξαιρετικής φωτοσταθερότητας και της ευνοϊκής τους βιοσυμβατότητας *(Shen et al, 2014)*. Προκειμένου η ιδέα των C-dots λοιπόν να περάσει από τη σφαίρα της θεωρίας και των πειραμάτων σε εφαρμογές στον πραγματικό κόσμο, ο προσεκτικός σχεδιασμός τους γίνεται ολοένα και πιο σημαντικός *(Ding et al, 2014)*.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε πείραμα μικροσκοπίας φθορισμού σε κύτταρα HEK-293, για την αξιολόγηση του φθορισμού των C-dots, τόσο στη διαλυτοποιημένη, όσο και στη λυοφυλιωμένη μορφή τους σε τελικές αραιώσεις 1/50, 1/100, 1/200, 1/500. Τα αποτελέσματα για το λυοφιλιωμένο δείγμα έδειξαν πολύ χαμηλές εντάσεις φθορισμού (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Όσον αφορά το διαλυτοποιημένο δείγμα, οι C-dots παρουσίασαν ένταση φθορισμού στην τελική αραίωση των 1/50, ωστόσο τα δείγματα εμφάνισαν έντονη φωτοαπόσβεση (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Τα αποτελέσματα ανιχνεύσιμου αυτοφθορισμού των σωματιδίων από το ήδη διαλυτοποιημένο δείγμα C-dots καθώς και η επαρκής διαμόλυνση κυττάρων HEK293 από αυτά φαίνεται στην εικόνα 15, όπου οι C-dots παρουσιάζουν εγγενή φθορισμό, ο οποίος πιθανότητα είναι περιπυρηνικός. Ωστόσο, δεδομένου πως τα συγκεκριμένα πειράματα ήταν το πρώτο μόνο βήμα μίας ευρύτερης επιστημονικής έρευνας, απαιτούνται περισσότερα πειράματα για την βελτίωση των φωτοχημικών ιδιοτήτων των κουκίδων άνθρακα με απώτερο σκοπό την εμπορική τους χρήση ως διανομείς φαρμάκων με επαρκή χρόνο φθορισμού, που θα επιτρέπει την παρακολούθησή τους.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω πειράματα ενισχύουν την άποψη πως συστατικά φυτικής προέλευσης, πιθανώς επηρεάζουν τη δραστικότητα των υποδοχέων στεροειδών ορμονών (ERs/GR) και κατά συνέπεια τη σύνδεσή τους με γεγονότα της ανθρώπινης φυσιολογίας όπως η φλεγμονή και η απόπτωση. Πιο συγκεκριμένα, το πολικό και το ημιπολικό κλάσμα ρητίνης της Μαστίχας Χίου ασκούν ανταγωνιστική δράση έναντι της E_2. Τα εν λόγω κλάσματα οδηγούν σε δοσοεξαρτώμενη μείωση της E_2-επαγόμενης ενεργοποίησης της μεταγραφικής δραστικότητας των ERα/ERβ, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζουν επιλεκτική δράση για κάποιον από τους δύο υπότυπους. Επιπλέον, τα παραπάνω πειράματα υποδεικνύουν την πιθανή ρύθμιση της δράσης των στεροειδών ορμονών μέσω των πρωτεϊνικών επιπέδων της p65 και της προκασπάσης-3. Αναλυτικότερα, το ημιπολικό κλάσμα φύλλων μαστιχόδεντρου τόσο της βόρειας όσο και της νότιας Χίου προκαλεί κάποιες στατιστικά σημαντικές μειώσεις των πρωτεϊνικών επιπέδων της υπομονάδας p65 του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ενώ το κλάσμα φύλλων μαστιχόδεντρου της βόρειας Χίου παρουσιάζει επιπλέον πιθανή αποπτωτική δραστικότητα, προκαλώντας σημαντικότερη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3, σε σύγκριση με το ημιπολικό κλάσμα φύλλων μαστιχόδεντρου της νότιας Χίου. Όσον αφορά τις C-dots, στο διαλυτοποιημένο δείγμα εντοπίστηκε περιπυρηνικός αυτοφθορισμός των νανοσωματιδίων, ο οποίος ωστόσο παρουσίασε περιορισμένη διάρκεια. Καθώς τα νανοσωματίδια αποτελούν πολλά υποσχόμενα εργαλεία ως μέσα διαμόλυνσης κυττάρων, κατάλληλη τροποποίηση της δομής και των επιφανειακών τους λειτουργιών, μπορεί να οδηγήσει τόσο στην αύξηση του εγγενή φθορισμού τους, όσο και στην εδραίωση της αποτελεσματικότητάς τους, ως φορείς βιοδραστικών μορίων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Al-Habbal MJ, Al-Habbal Z, Huwez FU, (1984), A double-blind controlled clinical trial of mastic and placebo in the treatment of duodenal ulcer. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 11: 541-544.

Amer DAM, Kretzschmara G, Müllera N, Stankeb N, Lindemann D, Vollmera G, (2010), Activation of transgenic estrogen receptor-beta by selected phytoestrogens in a stably transduced rat serotonergic cell line. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 120: 208–217

Assimopoulou AN, Papageorgiou VP, (2005), GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of Pistacia species. Part I. Pistacia lentiscus var. Chia. *Biomedical Chromatography*, 19: 285–311

Bae SW, Tan W, Hong JI, (2012), Fluorescent dye-doped silica nanoparticles: new tools for bioapplications. *Chemical Communications*, 48: 2270–2282

Bampouli A, Kyriakopoulou K, Papaefstathiou G, Louli V, Aligiannis N, Magoulas K, Krokida M, (2015), Evaluation of total antioxidant potential of Pistacia lentiscus var. chia leaves extracts using UHPLC–HRMS. *Journal of Food Engineering*, 167: 25-31

Bampouli A, Kyriakopoulou K, Papaefstathiou G, Louli V, Krokida M, Magoulas K, (2014), 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*, 1(3): 81-91

Barone I, Brusco L, Fuqua SAW, (2010), Estrogen Receptor Mutations and Changes in Downstream Gene Expression and Signaling. *Clinical Cancer Research*, 16(10): 2702-708

Binder AK, Winuthayanon W, Hewitt SC, Couse JF, Korach KS, (2015) in Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Chapter 25 (Eds: Plant TM, Zeleznik AJ), Elsevier Inc.

Burris TP, Solt LA, Wang Y, Crumbley C, Banerjee S, Griffett K, Lundasen T, Hughes T, Kojetin DJ, (2013), Nuclear Receptors and Their Selective Pharmacologic Modulators. *Pharmacological Reviews*, 65:710–778

Buzón V, Carbó LR, Estruch SB, Fletterick RJ, Estébanez-Perpiñá E, (2012), A conserved surface on the ligand binding domain of nuclear receptors for allosteric control. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348, 394-402

Caboni L, Lloyd DG, (2012), Beyond the Ligand-Binding Pocket: Targeting Alternate Sites in Nuclear Receptors. *Medicinal Research Reviews*, 33(5): 1081–1118

Cardenas-Trowers O, Meyer I, Markland A, Richter HE, Addis I, (2018), A Review of Phytoestrogens and Their Association with Pelvic Floor Conditions. *Female Pelvic Medicine & Reconstructive Surgery*, 24(3): 193–202

Cui J, Shen Y, Li R, (2013), Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine*, 19(3): 198-209

Desouza J, Gadkar S, Jagtap D, Sachdeva G, (2020), Size, Site, and Signaling: Three Attributes of Estrogen Receptors. *Biomedical Research Journal*, 6(2): 37-48

Dimas KS, Pantazis P, Ramanujam R, (2012), Chios Mastic Gum: A Plant-produced Resin Exhibiting Numerous Diverse Pharmaceutical and Biomedical Properties. *In vivo*, 26(5):777-85

Ding C, Zhu A, Tian Y, (2014), Functional Surface Engineering of C- Dots for Fluorescent Biosensing and in Vivo Bioimaging. *Accounts of Chemical Reasrch*, 47(1): 20-30

Drummond AE, Fuller PJ, (2010), The importance of ERbeta signaling in the ovary. *Journal of Endicrinology*, 205(1): 15-23

Eyster KM, (2016), The Estrogen Receptors: An Overview from Different Perspectives. *Methods in Molecular Biology*, 1366:1-10

Faria M, Shepherd P, Pan Y, Chatterjee S, Navone N, Gustafsson JÅ, Strom A, (2018), The estrogen receptor variants β2 and β5 induce stem cell characteristics and chemotherapy resistance in prostate cancer through activation of hypoxic signaling. *Oncotarget*, 9(91): 36273-288

Fukazawa T, Smyrnioudis I, Konishi M, Takahashi M, Kim HK, Nishimaki M, Xiang M, Sakamoto S, (2018), 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*, 27(3):773–780

Georgiadis I, Karatzas T, Korou LM, Agrogiannis G, Vlachos IS, Pantopoulou A, Tzanetakou IP, Katsilambros N, Perrea DN, (2013), Evaluation of Chios Mastic Gum on Lipid and Glucose Metabolism in Diabetic Mice. *Journal of Medicinal Food*, 17(3):393-9

Gkogka E, Hazeleger WC, Posthumus MA, Beumer RR, (2013), The Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Pistacia lentiscus var. Chia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(6): 714-729

Gupta N, Mayer D, (2013), Interaction of JAK with steroid receptor function. Jak-Stat, 2(4)

Gustafsson JÅ, (2015), Historical overview of nuclear receptors, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 157: 3-6

Hashem NM, Soltan YA, (2016), Impacts of phytoestrogens on livestock production: A review. Egyptian Journal of Nutrition and Feeds, 19 (1): 81-89

He ML, Yuan HQ, Jiang AL, Gong AY, Chen WW, Zhang PJ, Young CYF, Zhang JY, (2006), Gum Mastic Inhibits the Expression and Function of the Androgen Receptor in Prostate Cancer Cells. *Cancer*, 106(12): 2547–55

Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ, (2015), Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29(4): 557-68

Kampa M,Pelekanou V, Notas G, Stathopoulos EN, Castanas E, (2013), The estrogen receptor: two or more molecules, multiple variants, diverse localizations, signaling and functions. Are we undergoing a paradigm-shift as regards their significance in breast cancer?. *Hormones*, 12(1):69-85

Kartalis A, Didagelos M, Georgiadis I, Benetos G, Smyrnioudis N, Marmaras H, Voutas P, Zotika C, Garoufalis S, Andrikopoulos G, (2015), 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*, 23(7): 722-9

Kim JS, Ha JY, Yang SJ, Son JH, (2017), A novel non-apoptotic role of procaspase-3 in the regulation of mitochondrial biogenesis activators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1): 347-57

Kottakis F, Koliakou KK, Pendasa S, Kountouras J, Choli-Papadopoulou T, (2009), Effects of mastic gum Pistacia lentiscus var. Chia on innate cellular immune effectors. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 21(2):143-9

Kwakowsky A, Milne MR, Waldvogel HJ, Faull RL, (2016), Effect of Estradiol on Neurotrophin Receptors in Basal Forebrain Cholinergic Neurons: Relevance for Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12): 2122

Landete JM, Arqués J, Medina M, Gaya P, De Las Rivas B, Muñoz R, (2016), Bioactivation of Phytoestrogens: Intestinal Bacteria and Health. Critical *Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(11): 1826-43

Lecoq L, Raiola L, Chabot PR, Cyr N, Arseneault G, Legault P, Omichinski JG, (2017), Structural characterization of interactions between transactivation domain 1 of the p65 subunit of NF-Kb and transcription regulatory factors. *Nucleic Acids Research*, 45(9): 5564-76

Levin ER, Hammes SR, (2016), Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Molecular Cell* Biology, 17(12):783-797

Li T, Chiang YL, (2013), Nuclear receptors in bile acid metabolism. *Drug Metabolism Reviews*, 45(1): 145–55

Loizou S, Paraschos S, Mitakou S, Chrousos GP, Lekakis I, Moutsatsou P, (2009), Chios Mastic Gum extract and isolated phytosterol tirucallol exhibit anti-Inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Experimental Biology and Medicine*, 234(5):553-61

Neels JG, Hassen-Khodja R, Chinetti G, (2020), Nuclear receptors in abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*, 297(17): 87-95

Pachi VK, Mikropoulou EV, Gkiouvetidis P, Siafakas K, Argyropoulou A, Angelis A, Mitakou S, Halabalaki M, (2020), Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Chios mastic gum (Pistacia lentiscus var. Chia, Anacardiaceae): A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 1-83

Papada E, Kaliora AC, (2019), Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Mastiha: A Review of Preclinical and Clinical Studies. *Antioxidants*, 8(208): 1-12

Paraschos S, Mitakou S, Skaltsounis AL, (2012), Chios Gum Mastic: A Review of its Biological Activities. *Current Medicinal Chemistry*, 19: 2292-302

Paraskevopoulou A, Kiosseoglou V, (2016) in Functional Properties of Traditional Foods, Chapter 19 (Eds: Kristbergsson K, Ötles S), Springer

Pawlak M, Lefebvre P, Staels B, (2012), General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Current topics in medical chemistry*, 12(6): 486–504.

Peirotén A, Bravo D, Landete JM, (2019), Bacterial metabolism as responsible of beneficial effects of phytoestrogens on human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(11):1922-37

Perkins ND, (2012), The diverse and complex roles of NF-κB subunits in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(2): 121-32

Psarra AM, Sekeris C, (2008), Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria, *IUBMB Life*, 60(4): 210-23

Qu S, Wang X, Lu Q, Liu X, Wang L, (2012), A Biocompatible Fluorescent Ink Based on Water-Soluble Luminescent Carbon Nanodots. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(49): 12215-18

Rampazzo R, Genovese D, Palomba F, Prodi L, Zaccheroni N, (2018), NIR-fluorescent dye doped silica nanoparticles for in vivo imaging, sensing and theranostic. Methods and Applications in Fluorescense, 6

Reisch A, Klymchenko AS, (2016), Fluorescent Polymer Nanoparticles Based on Dyes: Seeking Brighter Tools for Bioimaging. *Small*, 12(15): 1968-92

Rietjens I, Louisse J, Beekmann K, (2017), The potential health effects of dietary phytoestrogens. *British Journal of Pharmacology*, 174(11):1263-80

Rigling M, Fraatz MA, Trögel S, Sun J, Zorn H, Zhang Y, (2019), Aroma Investigation of Chios Mastic Gum (Pistacia lentiscus Variety Chia) Using Headspace Gas Chromatography Combined with Olfactory Detection and Chiral Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (49), 13420-29

Roshan-Moniri M, Hsing M, Butler MS, Cherkasov A, Rennie PS, (2014), Orphan nuclear receptors as drug targets for the treatment of prostate and breast cancers. *Cancer Treatment Reviews*, 40: 1137–52

Sas L, Lardon F, Vermeulen PB, Hauspy J, Van Dam P, Pauwels P, Dirix LY, Van Laere SJ, (2012), The interaction between ER and NFκB in resistance to endocrine therapy. *Breast Cancer Research*, 14(4):212

Sever R, Glass C, (2013), Signaling by Nuclear Receptors, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3): 1-4

Shen LM, Chen Q, Sun ZY, Chen XW, Wang JH, (2014), Assay of Biothiols by Regulating the Growth of Silver Nanoparticleswith C- Dots as Reducing Agent. *Analytical Chemistry*. 86(10):5002-8

Shibu MA, Kuo WW, Kuo CH, Day CH, Shen CY, Chung LC, Lai CH, Pan LF, Padma VV, Huang CY, (2017), Potential phytoestrogen alternatives exert cardio-protective mechanisms via estrogen receptors. *BioMedicine*, 7(2): 25-30

Sirotkin AV, Harrath AH, (2014), Phytoestrogens and their effects. *European Journal of Pharmacology*, 741: 230-6

Sladek MF, (2011), What are nuclear receptor ligands? Molecular and Cellular Endocrinology, 334: 3-13

Soccio RE, (2020) in The Liver: Biology and Pathobiology, Sixth Edition. (Eds: Arias IM, Alter HJ, Boyer JL, Cohen DE, Shafritz DA, Thorgeirsson S, Wolkoff AW), John WILEY Blackwell, Oxford

Song Y, Zhu S, Yang B, Bioimaging based on fluorescent carbon dots. *RSC Advances*, 4, 27184-200

Spyridopoulou K, Tiptiri-Kourpeti A, Lampri E, Fitsiou E, Vasileiadis S, Vamvakias M, Bardouki H, Goussia A, Malamou-Mitsi V, Panayiotidis MI, Galanis A, Pappa A, Chlichlia K, (2017), Dietary mastic oil extracted from Pistacia lentiscus var. Chia suppresses tumor growth in experimental colon cancer models. *Scientific Reports*, 7(1):3782

Terpou A, Bosnea L, Kanellaki M, (2017), Effect of Mastic Gum (Pistacia Lentiscus Via Chia) as a Probiotic Cell Encapsulation Carrier for Functional Whey Beverage Production. *SCIOL Biomedicine*, 1(1): 1-10

Thomas C, Gustafsson JÅ, (2015), Estrogen receptor mutations and functional consequences for breast cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 26(9): 467-76

Thomsen ND, Koerbera JT, Wellsa JA, (2013), Structural snapshots reveal distinct mechanisms of procaspase-3 and -7 activation. *PNAS*, 110(21): 8477-82

Vallianou I, Peroulis N, Pantazis P, Hadzopoulou-Cladaras M, (2011), Camphene, a Plant-Derived Monoterpene, Reduces Plasma Cholesterol and Triglycerides in Hyperlipidemic Rats Independently of HMG-CoA Reductase Activity. *PLoS ONE*, 6(11): 1-11

Vogeler S, Galloway TS, Lyons BP, Bean TP, (2014), The nuclear receptor gene family in the Pacific oyster, Crassostrea gigas, contains a novel subfamily group. *BMC Genomics*, 15(369): 1-15

Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR, Wang SL, (2011), Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*, 6: 765-74

Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H, (2012), Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological reports*, 64(5):1020-37

Wolfbeis OS, (2015), An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chemical Society Reviews*, 44(14): 4743-68

Xin D, Wang H, Yang J, Su YF, Fan GW, Wang YF, Zhu Y, Gao XM, (2010), Phytoestrogens from Psoralea corylifolia reveal estrogen receptor-subtype selectivity. *Phytomedicine*, 17(2):126-31

Xing D, Oparil S, Yu H, Gong K, Feng W, Black J, Chen YF, Nozell S, (2012),Estrogen Modulates NF-κB Signaling by Enhancing IkBa Levels and Blocking p65 Binding at the Promoters of Inflammatory Genes via Estrogen Receptor-b. *PLoS ONE*, 7(6): e36890

Zhao L, Zhou S, Gustafsson JA, (2019), Nuclear Receptors: Recent Drug Discovery for Cancer Therapies. *Endocrine Reviews*, 40(5):1207–249

Zografou P, Linos A, Hagidimitriou M, (2010), Genetic diversity among different genotypes of Pistacia lentiscus var. chia (mastic tree). *Options Méditerranéennes*, 94: 159-163

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατά το διάστημα διεκπεραίωσης της πτυχιακής μου εργασίας η ανθρωπότητα δοκιμάστηκε σκληρά από μία πρωτοεμφανιζόμενη πανδημία, γνωστή ως Covid-19. Η ασθένεια αυτή προκαλείται από τον κορωναϊό SARS-CoV-2 και φαίνεται πως ξεκίνησε στην πόλη Wuhan (επαρχία Hubei, Κίνα) στα τέλη του προηγούμενου έτους. Η ανθρωπότητα μέτρησε περισσότερα από 12.000.000 κρούσματα της ασθένειας παγκοσμίως, ενώ ο συνολικός αριθμός των θανόντων άγγιξε τον αστρονομικό (για την εποχή που ζούμε) αριθμό των 550.000 ανθρώπων. Νιώθω ευλογημένος που τόσο εγώ όσο και τα αγαπημένα μου πρόσωπα βγήκαμε αλώβητοι από την ασθένεια. Ελπίζω όλοι μας να βγήκαμε δυνατότεροι, σοφότεροι, πιο υπομονετικοί και σκεπτόμενοι πάντα σε συλλογικό ορίζοντα από το τραγικό πλαίσιο των τελευταίων μηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το ***Ίδρυμα Μποδοσάκη*** για τη συμμετοχή του στην ολοκλήρωση του παρόντος μεταπτυχιακού προγράμματος, τόσο με την οικονομική του στήριξη, όσο και με την αρωγή και την άψογη επικοινωνία με τους εργαζόμενους του. Από τις ευχαριστίες δεν θα μπορούσε να λείπει η κυρία Δέτση Ελένη, γραμματέας του Ιδρύματος, η οποία με την γλυκύτητα της ψυχής της διευκολύνει τη ζωή εκατοντάδων υποτρόφων καθημερινά.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του ΤΒΒ, που με καλωσόρισε στην ερευνητική της ομάδα και με καθοδήγησε επιστημονικά τα τελευταία 3 χρόνια. Πολύ σημαντικός για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας ήταν και ο ρόλος των συναδέλφων μου στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, οι οποίοι δημιούργησαν ένα όμορφο εργασιακό κλίμα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα πρέπει να πιστωθεί στα μέλη της ερευνητικής ομάδας της κα. Ψαρράς, για όλη τη βοήθεια και τις συμβουλές τους κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μου.

Δε θα μπορούσα ωστόσο να μην κάνω ειδική αναφορά στην υποψήφια διδάκτορα, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, κα. ***Καλούση Φωτεινή*** για τη σημαντική της συνεισφορά στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Φωτεινή σε ευχαριστώ πάρα πολύ για την άρτια συνεργασία που είχαμε, για την καθοδήγηση τους τελευταίους μήνες, για τις επιστημονικές μας συζητήσεις, για τη βοήθεια και τις συμβουλές που τόσο απλόχερα μου έδωσες, για την υποστήριξη σου κάθε φορά που απογοητευόμουν, για τις στιγμές που πίστευες πιο πολύ στον εαυτό μου από ότι εγώ.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου, το θαυμασμό και την ευγνωμοσύνη μου σε τρία πολύ ξεχωριστά πρόσωπα για μένα: στους ***γονείς*** και στον ***αδερφό*** μου. Υπήρξατε δίπλα μου σε κάθε στάδιο της ζωής μου, σε κάθε μου απόφαση -μικρή ή μεγάλη-. Στο πλαίσιο της οικογένειας αυτής γεννήθηκαν τα πρώτα μου όνειρα, τοποθετήθηκαν οι πρώτοι μου στόχοι και ολοκληρώθηκαν τα πρώτα μου επιτεύγματα. Σας ευχαριστώ όλους που πιστεύετε σε μένα και σας δίνω μια υπόσχεση. Δεν θα πάψω ποτέ να ονειρεύομαι, δεν θα πάψω ποτέ να είμαι ονειροπόλος και αθεράπευτα ρομαντικός στους δύσκολους καιρούς που διανύουμε, δεν θα πάψω ποτέ να μάχομαι για τα πιστεύω μου.

Όταν όλα φαίνονται να είναι εναντίον σου, να θυμάσαι πως το αεροπλάνο απογειώνεται κόντρα στον άνεμο…

Χένρυ Φορντ