ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΝΤΟΜΟΑΠΩΘΗΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ ΦΥΤΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ (*ASTERACAE*) ΚΑΙ ΤΩΝ ΧΕΙΛΑΝΘΩΝ (*LAMIACEAE*): ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΒΑΣΕΙ ΧΗΜΕΙΟΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΣΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΟΥΣ ΧΗΜΕΙΟΫΠΟΔΟΧΕΙΣ (OBP) ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΕΡΕΥΝΩΝ, ΣΠΥΡΙΔΩΝ Ε. ΖΩΓΡΑΦΟΣ

ΣΤΑΜΑΤΗ ΕΥΓΕΝΙΑ

00064

ΑΘΗΝΑ, 2020

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

UNIVERSITY OF THESSALY

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION

INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

INTERISTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES

IN

BIOENTREPRENEURSHIP

MASTER THESIS

DEVELOPMENT OF PLANT BASED INSECT REPPELENTS BASED ON THE ESSENTIAL OILS OF THE PLANT'S FAMILIES *ASTERACAE* AND *LAMIACEAE:* SELECTION OF PLANT SPECIES BASED ON THE CHEMOTYPE AND BIOCHEMICAL BINDING STUDIES OF ESSENTIAL OILS ON SELECTED CHEMORECEPTORS (OBPs) OF MOSQUITOES

SUPERVISOR: RESEARCHE DIRECTOR, SPYROS E. ZOGRAPHOS

STAMATI EVGENIA

00064

ATHENS, 2020

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Εγκρίθηκε την …….. από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	**ΒΑΘΜΙΔΑ**	**ΥΠΟΓΡΑΦΗ**
Σπυρίδων Ε. Ζωγράφος	Ερευνητής Α’	
Δημήτριος Δ. Λεωνίδας	Καθηγητής	
Βασιλική Σκαμνάκη	Επίκουρος Καθηγήτρια	

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών από το Σεπτέμβριο του 2019 έως τον Ιούνιο του 2020, υπό την επίβλεψη του Ερευνητή Δρ. Σπυρίδων Ε. Ζωγράφου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον ερευνητή Δρ. Σπυρίδων Ε. Ζωγράφο που με δέχτηκε στην ερευνητική του ομάδα και μου έδωσε ην ευκαιρία να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή του. Μου έδωσε τη δυνατότητα να βελτιώσω και να επεκτείνω το επιστημονικό μου υπόβαθρο καθώς ήταν δίπλα μου δίνοντάς μου τη βοήθεια του σε κάθε πρόβλημα που παρουσιαζόταν. Κάθε μέρα βρισκόταν εκεί με υπομονή, καλή διάθεση και πάντα με το χαμόγελο να δίνει τις συμβουλές του, τόσο για επιστημονικά θέματα όσο και για τα προσωπικά. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους καθηγητές της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου Δρ. Δημήτριο Λεωνίδα και Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική για τη συνεργασία και για την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφεραν.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής Βιολογίας και Χημείας για τη βοήθεια και το ευχάριστο κλίμα που αναπτύχθηκε κατά τη διάρκεια της «συγκατοίκησής» μας στο χώρο του εργαστηρίου. Συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Αικατερίνη Τσιτσάνου για την απεριόριστη βοήθεια και στήριξη που μου παρείχε, αλλά και για τη διάθεση και την προθυμία της να με καθοδηγήσει. Την υποψήφια διδάκτωρ Παναγιώτα Λίγγρη (για τους φίλους Μπέτυ), η οποία με υποδέχτηκε στο εργαστήριο από την πρώτη στιγμή με καλή διάθεση, προθυμία αλλά και πολλή υπομονή για να με βοηθήσει. Τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ελεάννα Χριστοδούλου για τη στήριξή της στις δύσκολες στιγμές αλλά και για την πολύτιμη βοήθειά της.

Δεν θα μπορούσαν να λείπουν από το κομμάτι των ευχαριστιών οι φίλοι μου, οι άνθρωποι που πάντα είναι δίπλα μου και με στηρίζουν σε οτιδήποτε και αν κάνω. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ηλία Βλάχο για την απεριόριστη στήριξη και την υπομονή του. Πάντοτε ήταν δίπλα μου, στα δύσκολα να προσπαθεί να με ηρεμήσει και να μου δώσει κίνητρο να συνεχίσω και στις όμορφες στιγμές να χαίρεται μαζί μου. Στη συνέχεια το φίλο μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Γεώργιο Στραβοδήμο που από την πρώτη στιγμή που γνωριστήκαμε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας ήταν δίπλα μου αρχικά ως φίλος και έπειτα ως επιστήμονας για να με συμβουλεύει σε κάθε λογής θέματα, επιστημονικά και μη. Τους φίλους Θωμά Μπάρκα, Γιώργο και Μπάμπη Μπόμπα που αν και βρισκόμαστε χιλιόμετρα μακριά το ενδιαφέρον και η στήριξή τους δεν χάθηκε ούτε στιγμή.

Τέλος το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου. Τον πατέρα μου Χρήστο, τη μητέρα μου Βάγια, τον αδερφό μου Βαγγέλη και τους παππούδες μου (Τάσο, Ευγενία και Βαγγέλη, Στέλλα). Πάντα προσπαθούσαν και στερήθηκαν αρκετά πράγματα για να με σπουδάσουν. Όλα αυτά τα χρόνια μου χάριζαν απλόχερα την υποστήριξη, τη βοήθεια, την ηθική στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές τους. Χωρίς τη βοήθεια τους δεν θα είχα καταφέρει τίποτα από όλα αυτά σήμερα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 8
1.1. Κουνούπια 8
1.1.1. Είδη κουνουπιών στην Ελλάδα 8
1.2 Ασθένειες που προκαλούνται από κουνούπια 10
1.2.1 Ελονοσία 10
1.2.1.1 Ελονοσία στην Ελλάδα 11
1.2.1.2 Κύκλος ζωής παράσιτου 11
1.2.2 Ιός του Δυτικού Νείλου 12
1.2.3 Δάγκειος πυρετός 13
1.2.4 Chikungunya 13
1.2.5 Ιός Ζίκα 14
1.2.6 Κίτρινος Πυρετός 14
1.3 Απωθητικά – Εντομοκτόνα 14
1.3.1 Εισαγωγή 14
1.3.2 Ιστορική αναδρομή 15
1.3.3 Συνθετικά Χημικά 16
1.3.4 Φυτικά Έλαια 19
1.3.5 Σύγκριση Αποτελεσματικότητας μεταξύ Χημικών και Φυτικών απωθητικών 21
1.4 Οσφρητικό σύστημα εντόμων 22
1.4.1 Εισαγωγή 22
1.4.2 Αναγνώριση οσμών 22
1.4.3 Οσφρητικοί υποδοχείς 23
1.5 Κουνούπια του γένους *Anopheles* 24
1.6 Οσφρητικές πρωτεΐνες δέσμευσης 25
1.6.1 Εισαγωγή 25
1.6.2 Τρόπος δράσης 25
1.6.3 Έκφραση 26
1.6.4 Δομή 27
1.6.5 *Anopheles gambiae* OBP 28
2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ 29
2.1 Αντιδραστήρια 29
2.2 Βακτηριακά Στελέχη και Πλασμίδια 31
2.3 Οργανολογία 31
2.4 Στήλες υγρής χρωματογραφίας 31
2.5 Επιλογή φυτικών ειδών που περιέχουν μόρια με εντομοαπωθητικές ιδιότητες 32
2.6 Προσδιορισμός τελικής συγκέντρωσης σε προϊόντα δέρματος για συμμόρφωση με τους Ευρωπαϊκούς κανονισμούς ασφαλείας 35

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

2.7 Βακτηριακά στελέχη *E.coli* 38
2.8 Χρωματογραφία 38
2.8.1 Υγρή Χρωματογραφία 38
2.9 Ηλεκτροφόρηση Πηκτής πολύ-ακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) 41
2.10 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών 45
2.10.1 Μέθοδος Bradford 45
2.10.2 Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280nm 46
2.11 Απομόνωση και καθαρισμός των πρωτεϊνών AgamOBP1 και AgamOBP5 47
2.11.1 Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα 47
2.11.2 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης με επαγωγή 47
2.11.3 Λύση βακτηριακών κυττάρων 47
2.11.4 Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής 48
2.11.5 Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφία μοριακής διήθησης 52
2.11.6 Απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης AgamOBP1 53
2.11.7 Απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης AgamOBP5 55
2.12 Φθορισμομετρικός προσδιορισμός 56
2.12.1 Υπολογισμός σταθεράς πρόσδεσης K_D και IC_{50} του 1-NPN για τις πρωτεΐνες AgamOBP1 και AgamOBP5 57
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 59
3.1 Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών 59
3.1.1 Καθαρισμός και απομόνωση της πρωτεΐνης AgamOBP1 59
3.1.2 Απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης AgamOBP5 63
3.2 Φθορισμομετρικές μελέτες 66
3.2.1 Υπολογισμός σταθεράς πρόσδεσης K_D του 1-NPN 66
3.2.2 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} των αιθέριων ελαίων για την πρωτεΐνη AgamOBP1 69
3.2.3 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} των αιθέριων ελαίων για την πρωτεΐνη AgamOBP5 73
4. Συζήτηση 77
5. Βιβλιογραφία 81

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί η αναζωπύρωση ασθενειών που μεταδίδονται από αιματοφάγα έντομα, όπως η ελονοσία, ο δάγκειος πυρετός και ο ιός του Δυτικού Νείλου.

Η παγκοσμιοποίηση του εμπορίου και των μετακινήσεων και η κλιματική αλλαγή έχει συμβάλει στην επανεμφάνιση ασθενειών που μεταδίδονται από έντομα διβιβαστες σε περιοχές όπου ειχαν προηγουμένως εξαλειφθεί, περιλαμβανομένων της ΕΕ και της Αμερικής.

Τα εντομοαπωθητικά αποτελούν σημαντικό κομμάτι μιας ολκληρωμένης στρατηγικής πρόληψης της μετάδοσης ασθενειών από έντομα και αποτελούν ένα μέτρο προσωπικής προστασίας που δεν εξαρτάται από την διαχείριση του προβλήματος σε επίπεδο κοινότητας και αρμοδίων φορέων υγείας. Έτσι είναι σημαντική η ανάπτυξη νέων εντομοαπωθητικών με βελτιωμένα χαρακτηριστικά ως προς την αποτελεσματικότητα, την ασφάλεια και τις καλλυντικές ιδιότητες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε αναζήτηση σε βάση δεδομένων Ελληνικών αρωματικών φυτών για την επιλογή ειδών με πιθανές εντομοαπωθητικές ιδιότητες. Στη συνέχεια με βάση τον χημειότυπο, των επιλεγμένων αιθέριων ελαίων προσδιορίστηκαν τα επιτρεπτά επίπεδα συγκέντρωσης σε δερματικά προϊόντα σύμφωνα με τους Ερωπαϊκούς κανονισμούς ασφάλειας. Εν συνεχέια, παρήχθησαν οι πρωτεΐνες δεύσμευσης οσφρητικών μορίων OBP1 και OBP5 του κουνουπιού *Anophles gambiae* από βακηριακές καλλιέργειες και ακολούθησε καθαρισμός τους με ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών. Η πρόσδεση των επιλεγμένων αιθέριων ελαίων στις πρωτεΐνες AgamOBP1 και AgamOBP5 προσδιορίστηκε με φθορισμομετρικές δοκιμές. Με βάση τα δεδομένα πρόσδεσης στις OBPs και των επιτρεπτών συγκεντρώσεων για χρήση τους σε προϊόντα, προτάθηκαν δύο αιθέρια έλαια Ελληνικής καλλιέργειας για περαιτέρω *in vivo* δοκιμές της εντομοαπωθητικης τους δράσης.

ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ:

Ελονοσία, *Anopheles gambiae*, πρωτεΐνες δέσμευσης οσφρητικών μορίων (OBPs), Ελληνικά αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, αιθέρια έλαια

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εύρεση αιθέριων ελαίων από ελληνικά αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά με πιθανές εντομοαπωθητικές ιδιότητες και ο προσδιορισμός με βάση το χημειότυπο των επιτρεπτών επιπέδων συγκέντρωσης σε δερματικά προϊόντα σύμφωνα με τους Ευρωπαϊκούς κανονισμούς ασφαλείας. Επίσης περιλαμβάνεται βιοχημική μελέτη των αιθέριων ελαίων στους χημειοϋποδοχείς OBP1 και OBP5 του κουνουπιού *Anopheles* gambiae, για την επιλογή των αιθέριων ελαίων που διαθέτουν πολλαπλή επίδραση, ώστε να πραγματοποιηθούν περεταίρω *in vivo* μελέτες σε κουνούπια.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Κουνούπια

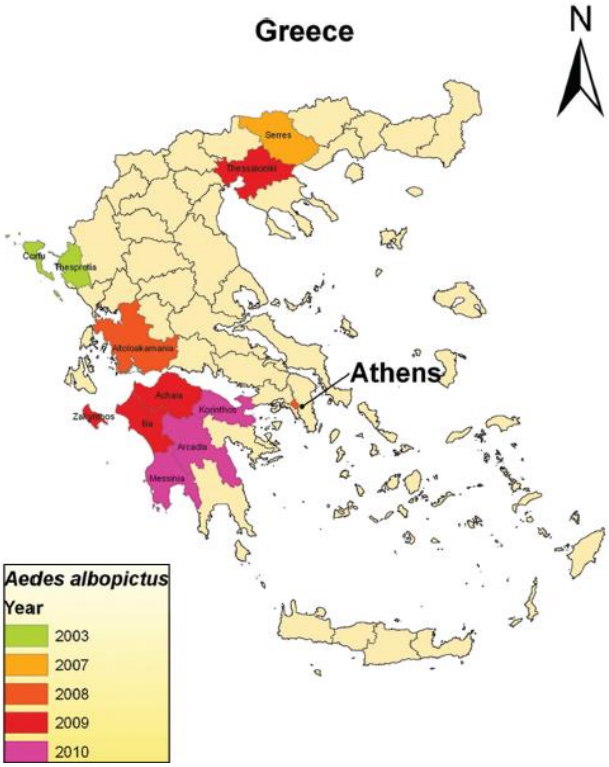
Τα κουνούπια είναι ένα από τα πιο θανατηφόρα ζώα στον κόσμο καθώς έχουν τη δυνατότητα να μεταδίδουν ασθένειες στον άνθρωπο, προκαλώντας εκατομμύρια θανάτους κάθε χρόνο. Υπάρχουν πάνω από 3000 είδη κουνουπιών σε όλο τον κόσμο, εκ των οποίων τρεις οικογένειες ξεχωρίζουν για την επικινδυνότητα τους, καθώς αποτελούν τους πιο κοινούς φορείς ασθενειών. Συγκεκριμένα τα γένη που είναι υπεύθυνα για τη μετάδοση των περισσότερων ασθενειών στον άνθρωπο είναι το *Aedes*, κύριος φορέας για το Δάγκειο και τον κίτρινο πυρετό, καθώς και τη μετάδοση του ιού Ζίκα, το *Anopheles* που είναι ο κύριος φορέας της ελονοσίας και το *Culex* που είναι υπεύθυνο για τη λεισμανίαση [1].

1.1.1. Είδη κουνουπιών στην Ελλάδα

Το Ασιατικό κουνούπι τίγρης *Aedes albopictus* έχει χαρακτηριστεί ως χωροκατακτητικό είδος, καθώς έχει τη δυνατότητα να εισβάλει σε νέες περιοχές, με μεγαλύτερη συχνότητα από τα υπόλοιπα είδη κουνουπιών, και να προκαλεί διαταραχές τόσο στη βιοποικιλότητα των συγκεκριμένων περιοχών, όσο και στην υγεία των ανθρώπων. Έχει δοθεί η ονομασία Ασιατικό διότι η προέλευσή του είναι από τη Νοτιοανατολική Ασία και την Ωκεανία. Τα τελευταία 40 περίπου χρόνια ξεκίνησε η εξάπλωσή του. Η ευκολία του να εισέρχεται σε νέες περιοχές, οφείλεται στο γεγονός ότι τα αυγά του είναι αρκετά ανθεκτικά στην αφυδάτωση, με αποτέλεσμα την επιτυχή μεταφορά τους από τόπο σε τόπο και μεταξύ Ηπείρων. Η εισαγωγή τους θεωρείται πως γίνεται κυρίως μέσω της μεταφοράς μεταχειρισμένων ελαστικών. Ένας ακόμη δημοφιλής τρόπος μεταφοράς των αυγών είναι μέσω του εμπορίου των φυτών του γένους *Dracaena*, τα οποία συσκευάζονται σε περιοχές με στάσιμα νερά (Εικόνα 1). Η πρώτη εμφάνισή του στην Ευρώπη εντοπίζεται στις Βόρειες ακτές της Αλβανίας, ενώ στη συνέχεια και στην περιοχή της Γένοβας στην Ιταλία. Το Ασιατικό κουνούπι τίγρης *Aedes albopictus* εντοπίστηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα την περίοδο 2003-2004 . Πιθανώς η εισαγωγή του έγινε είτε από την Ιταλία, είτε από την πόλη Χειμάρρα της Αλβανίας [2] (Εικόνα 2).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

Εικόνα 1: *Συνηθισμένοι τρόποι μεταφοράς αυγών του* Aedes albopictus.



Εικόνα 2: Χρονολογική εμφάνιση του κουνουπιού *Aedes albopictus* σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Έπειτα από μελέτες διαπιστώθηκε πως η δραστηριότητα του κουνουπιού εντοπίζεται από τα μέσα Απριλίου έως και το τέλος του έτους. Εμφανίζει υψηλό αριθμό πληθυσμού κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και του φθινοπώρου, με μέγιστη πληθυσμιακή πυκνότητα το μήνα Οκτώβριο [3]. Το συγκεκριμένο κουνούπι μπορεί να μεταδώσει αρκετές σοβαρές ασθένειες στον άνθρωπο, με σημαντικότερη τον ιό του Δάγκειου πυρετού. Πιο συγκεκριμένα, έπειτα από εργαστηριακές μελέτες βρέθηκε πως το *Ae. albopictus* είναι δυνητικός φορέας τουλάχιστον 22 αρμποϊών. Εκτός από τη μετάδοση ασθενειών, προκαλεί έντονη ενόχληση στους κάτοικους των

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

περιοχών που υπάρχουν μεγάλες εστίες πληθυσμών του, καθώς το τσίμπημά του προκαλεί συχνά έντονους ερεθισμούς και κνησμό.

Οι περιοχές που εντοπίζεται το Ασιατικό κουνούπι τίγρης είναι συνήθως περιοχές με στάσιμα νερά στο οικιακό και περιοικιακό περιβάλλον. Είναι γνωστό πως τα συγκεκριμένα κουνούπια δεν μπορούν να μετακινηθούν σε μεγάλες αποστάσεις, επομένως για την αντιμετώπισή τους είναι πολύ σημαντικό να πραγματοποιηθεί ένας έλεγχος για την εύρεση των εστιών ανάπτυξής τους. Αρχικά συστήνεται η χρήση μέτρων ατομικής προστασίας στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα εντομοαπωθητικά σώματος και χώρου. Επιπλέον υπάρχουν αρκετά εγκεκριμένα εντομοκτόνα-βιοκτόνα σκευάσματα τα οποία χρησιμοποιούνται κυρίως έναντι των προνυμφών. Έναντι των ενήλικων κουνουπιών εφαρμόζονται μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις, όπως μετά την εμφάνιση ασθένειας, με σκοπό να αποφευχθεί η διαταραχή του περιβάλλοντος και η υγεία του ανθρώπου. Η εφαρμογή των χημικών μέσων αντιμετώπισης, θα πρέπει να γίνεται από ειδικευμένο προσωπικό, σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσεως, σε συγκεκριμένες δόσεις και με όλα τα μέτρα προστασίας. Το πρόβλημα που προκύπτει στην καταπολέμηση του Ασιατικού κουνουπιού τίγρης είναι το γεγονός ότι οι χημικοί τρόποι αντιμετώπισης των περισσότερων κουνουπιών, δεν έχουν ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα έναντι των κουνουπιών *Aedes albopictus.* Για αυτό το λόγο θα πρέπει για την αντιμετώπιση να γίνεται αρχικά μία μελέτη της παρουσίας του στην περιοχή και στη συνέχεια να σχεδιαστεί το πρόγραμμα αντιμετώπισης. Συνήθως τέτοια προγράμματα είναι συνετό να ξεκινούν κατά τους μήνες Μάρτιο-Απρίλιο, όποτε οι πληθυσμοί των κουνουπιών είναι σχετικά μικροί [4].

Το κυρίαρχο είδος κώνωπα στην Ελλάδα είναι το κοινό κουνούπι, *Culex pipiens*, το οποίο είναι ιδιαίτερο ανθρωπόφιλο και αστικό, καθώς αναπαράγεται κυρίως σε εστίες του αστικού συστήματος. Κατά τη διάρκεια της ημέρας βρίσκεται σε σκοτεινά μέρη, ενώ κατά τη διάρκεια της νύχτας εμφανίζει τη δραστηριότητά του. Σε αντίθεση με το Ασιατικό κουνούπι τίγρης, το κουνούπι *Culex pipiens* δραστηριοποιείται καθόλη τη διάρκεια του έτους. Είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στην Ελλάδα, εξαιτίας της ευκολίας στην ανάπτυξή του, καθώς έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται σε οποιαδήποτε περιοχή που διαθέτει έστω και ελάχιστες ποσότητες νερού. Έχει βρεθεί πως το *Culex pipiens* είναι υπεύθυνο για τη μετάδοση αρμποϊών και κυρίως για τη μετάδοση του ιού του Δυτικού Νείλου, για την οποία έχει χαρακτηριστεί ως κύριος διαβιβαστής [5].

1.2 Ασθένειες που προκαλούνται από κουνούπια

1.2.1 Ελονοσία

Η ελονοσία είναι μία ασθένεια που πλήττει την ανθρωπότητα εδώ και χιλιάδες χρόνια και παραμένει μέχρι και σήμερα μεγάλη απειλή για την ανθρώπινη ζωή. Η εκδήλωση της νόσου μπορεί εμφανιστεί στην οξεία της μορφή, ωστόσο η σοβαρότητά μπορεί να διαφέρει και σχετίζεται με το ιατρικό ιστορικό κάθε ατόμου. Υπάρχουν κάποιες πληθυσμιακές ομάδες που είναι περισσότερο ευπαθείς στην εκδήλωση της νόσου, καθώς εμφανίζουν πιο έντονα συμπτώματα. Σε αυτές τις ευπαθείς ομάδες ανήκουν οι εγκυμονούσες, άτομα που πάσχουν από AIDS και γενικά άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτή η ασθένεια προκαλείται από 5 είδη του παθογόνου πρωτόζωου του γένους *Plasmodium*, από τα οποία το

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

Plasmodium falciparum και το *Plasmodium vivax* είναι τα πιο κοινά παθογόνα πρωτόζωα που μεταδίδονται στα σπονδυλωτά, προκαλώντας τη νόσο. Η ελονοσία μεταδίδεται στον άνθρωπο από θηλυκά κουνούπια του γένους *Anopheles* τα οποία έχουν προσβληθεί από το πρωτόζωο *Plasmodium,* κατά τη διάρκεια λήψης αίματος, *[6]*.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 2018 καταγράφηκαν παγκοσμίως 228 εκατομμύρια περιστατικά ελονοσίας εκ των οποίων το μεγαλύτερο ποσοστό (~85%) αφορά τις χώρες της υποσαχάριας Αφρικής και την Ινδία. Επιπλέον την ίδια χρονιά υπολογίστηκαν 405.000 θάνατοι παγκοσμίως, εκ των οποίων το μεγαλύτερο ποσοστό (94%) εντοπίζεται στις χώρες της Αφρικής, επίσης το 67% των θανάτων αφορούν παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών [7].

1.2.1.1 Ελονοσία στην Ελλάδα

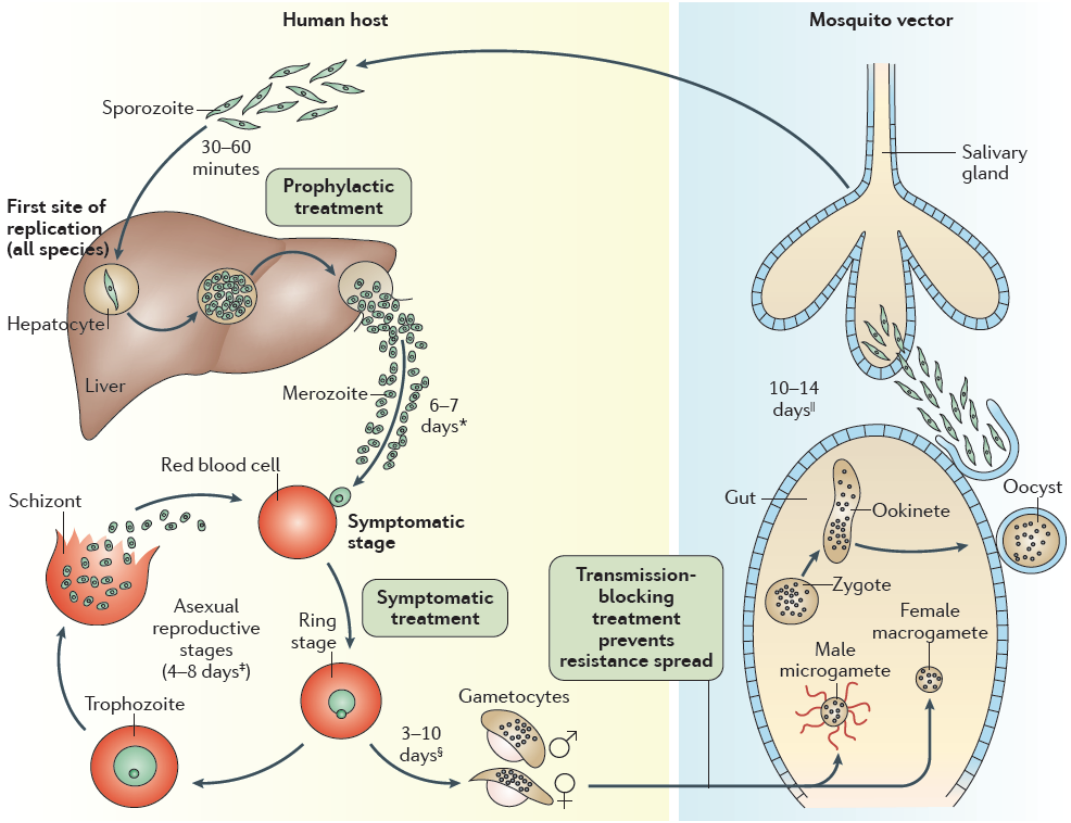
Η ελονοσία στην Ελλάδα αποτελούσε πολύ έντονο υγειονομικό πρόβλημα έως και το 1974, οπότε εκριζώθηκε, ύστερα από εντατικές προσπάθειες κατά τη διάρκεια των ετών 1946-1960. Ωστόσο, ο κίνδυνος επανεμφάνισης της νόσου σε μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες παραμένει μέχρι και σήμερα και για αυτό το λόγο τα κρούσματα και η μετάδοσή της παρακολουθούνται συστηματικά. Κάθε χρόνο καταγράφονται όλα τα κρούσματα ελονοσίας πανελλαδικά, και εξετάζονται για να βρεθεί εάν είναι εισαγόμενα, δηλαδή άτομα που προσβλήθηκαν σε χώρα του εξωτερικού, ή εάν έχουν προκύψει από εγχώρια μετάδοση. Σύμφωνα με την ετήσια καταγραφή, τα εισαγόμενα κρούσματα είναι σχετικά σταθερά από το 2009 έως το 2014 και κυμαίνονται μεταξύ 20-40 ατόμων ετησίως. Το 2015 υπήρξε μία αύξηση των συγκεκριμένων κρουσμάτων, της τάξης των 100 περίπου κρουσμάτων ετησίως, η οποία διήρκησε έως το 2017, ενώ το 2018 ελαττώθηκαν και πάλι στα συνήθη νούμερα των παλαιότερων ετών. Όσον αφορά τα κρούσματα εγχώριας μετάδοσης, κάθε χρόνο εμφανίζονταν λίγα άτομα με ελονοσία, τα οποία δεν είχαν κανένα ιστορικό ταξιδιού σε χώρα του εξωτερικού. Ωστόσο μεταξύ των ετών 2011 και 2012 υπήρξε μία αύξηση της εγχώριας μετάδοσης που όμως δεν διήρκησε παραπάνω. Η πτωτική πορεία των αυξημένων κρουσμάτων συνέβη έπειτα από αρκετές δράσεις δημόσιας υγείας και πρόληψης με τη συνεργασία πολλών φορέων. Βασικές δράσεις, τόσο για την καταπολέμηση όσο και την πρόληψη εμφάνισης της νόσου, είναι η έγκαιρη εύρεση των ασθενών, η προσφορά της κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής, και η υλοποίηση προγραμμάτων για την καταπολέμηση των κουνουπιών φορέων [8].

1.2.1.2 Κύκλος ζωής παράσιτου

Το θηλυκό κουνούπι φορέας, κατά τη διάρκεια ενός γεύματος αίματος μεταδίδει στον ξενιστή μαζί με το αντιπηκτικό του σάλιο, το παράσιτο *Plasmodium* spp. στο στάδιο του σποροζωίτη. Στο διάστημα μεταξύ 30-60 λεπτών, οι σποροζωίτες μεταφέρονται από το δέρμα στα λεμφικά κύτταρα και από εκεί στα ηπατοκύτταρα, όπου αντιγράφονται και διαιρούνται ως μεροζωίτες. Τα μολυσμένα ηπατικά κύτταρα διαλύονται, απελευθερώνοντας τους μεροζωίτες στην κυκλοφορία του αίματος, όπου εισβάλλουν στα ερυθρά αιμοσφαίρια και ξεκινούν το στάδιο της αναπαραγωγής, το οποίο είναι το συμπτωματικό στάδιο της νόσου. Τα συμπτώματα αναπτύσσονται 4-8 ημέρες μετά την αρχική προσβολή των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ο κύκλος αντιγραφής των μεροζωϊτών εντός των ερυθρών αιμοσφαιρίων διαρκεί 36-

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

72 ώρες (από την εισβολή τους στα ερυθρά αιμοσφαίρια έως την αιμόλυση). Τα μεροζωϊδια που απελευθερώνονται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, είτε εισβάλλουν σε άλλα ερυθρά αιμοσφαίρια και συνεχίζουν να αναπαράγονται, είτε σε μερικές περιπτώσεις διαφοροποιούνται σε αρσενικά ή θηλυκά γαμετοκύτταρα. Τα γαμετοκύτταρα συγκεντρώνονται σε τριχοειδή αγγεία και στη συνέχεια, σε επόμενο γεύμα αίματος μεταφέρονται σε ένα κουνούπι φορέα. Στο έντερο του φορέα, κάθε αρσενικό γαμετοκύτταρο παράγει οκτώ μικρογαμέτες μετά από τρεις κύκλους μίτωσης. Το θηλυκό γαμετοκύτταρο ωριμάζει σε ένα μακρογαμέτη. Οι αρσενικοί μικρογαμέτες είναι κινητά κύτταρα με μαστίγια τα οποία αναζητούν το θηλυκό μακρογαμέτη. Όταν ένας αρσενικός μικρογαμέτης και ένας θηλυκός μακρογαμέτης συντήκονται, σχηματίζουν ένα διπλοειδές ζυγωτό, το οποίο επιμηκύνεται σε μία δομή που ονομάζεται ωοκινέτης. Στη συνέχεια εξέρχεται από το έντερο διαμέσου του επιθηλίου ως ωοκύστη. Ο πυρήνας της ωοκύστης υφίσταται πολλαπλούς κύκλους αντιγραφής σχηματίζοντας σποροζωίτες. Μετά τη ρήξη της ωοκύστης, οι σποροζωίτες κινούνται προς τους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού, έτοιμοι να εισέλθουν στην κυκλοφορία αίματος του επόμενου ξενιστή που θα δεχθεί δήγμα, ξεκινώντας ένα νέο κύκλο ζωής [6].



Εικόνα 3: Κύκλος ζωής του παράσιτου *Plasmodium spp. [6]*

1.2.2 Ιός του Δυτικού Νείλου

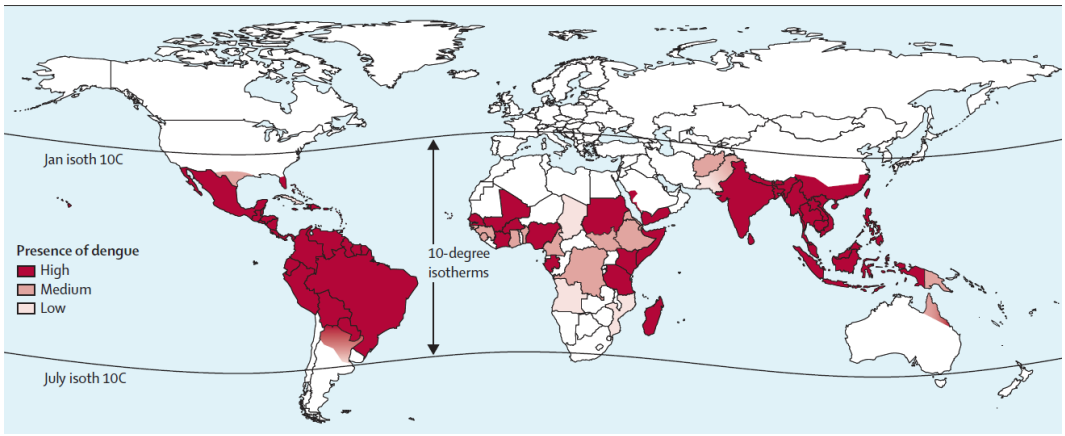
Ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι ένας φλαβοϊός που μεταδίδεται στον άνθρωπο μέσω των κουνουπιών, προκαλώντας διάφορα είδη εγκεφαλίτιδας. Ο ιός εντοπίστηκε για πρώτη φορά στην Ουγκάντα το 1937, προκαλώντας αργότερα επιδημίες στην Ασία, την Ευρώπη, την Αυστραλία και την Αμερική, όπου εντοπίστηκε το 1999. Μεταδίδεται μεταξύ κουνουπιών του γένους *Culex* και διάφορων ειδών από πτηνά. Πιο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

συγκεκριμένα, ο ιός του Δυτικού Νείλου μεταδίδεται στα κουνούπια από μολυσμένα πτηνά και στη συνέχεια μεταφέρεται στον άνθρωπο με το τσίμπημα. Ο άνθρωπος δεν μπορεί να μολύνει εκ νέου ένα κουνούπι, οπότε δεν μεταδίδει τον ιό σε άλλους ανθρώπους. Σοβαρή εκδήλωση της νόσου εμφανίζεται κυρίως σε μεγάλης ηλικίας άτομα, σε ασθενής με χαμηλό ανοσοποιητικό σύστημα και σε άτομα με χρόνιες παθήσεις. Άλλοι τρόποι μετάδοσης στον άνθρωπο είναι με μετάγγιση αίματος, με μεταμόσχευση οργάνου και με το θηλασμό. Ο κύριος φορέα του ιού στην δυτική Αμερική είναι το κουνούπι *Culex tarsalis,* στην Ανατολική Αμερική το *Culex quinquefasciatus* και *Culex nigripalpus,* ενώ στην Ελλάδα, κύριος διαβιβαστής της νόσου είναι το κοινό κουνούπι *Culex pipiens*. Τα κρούσματα της ασθένειας στην Ελλάδα αυξήθηκαν κατά τα έτη 2010-2011 και 2017-2019. Σύμφωνα με την ετήσια καταγραφή κρουσμάτων της ασθένειας το 2010 καταγράφηκαν 262 κρούσματα και 35 θάνατοι, τα οποία σταδιακά μειωθήκαν και κατά τα έτη 2015-2016 δεν καταγράφηκε κανένα κρούσμα. Από το 2017 επανεμφανίστηκε η νόσος, με αποκορύφωμα το έτος 2017, οπότε καταγράφηκαν 317 κρούσματα και 51 θάνατοι. Τα δεδομένα υποδηλώνουν πως ο ιός του Δυτικού Νείλου έχει εγκατασταθεί στην Ελλάδα και είναι πιθανή η εμφάνισή του κατά τις περιόδους μετάδοσης, τόσο σε νέες όσο και σε γνωστές περιοχές [9-11].

1.2.3 Δάγκειος πυρετός

Ο Δάγκειος Πυρετός είναι η πιο κοινή νόσος που προκαλείται από τα κουνούπια και χαρακτηρίζεται από ταχεία εξάπλωση. Φορείς αυτής της νόσου είναι κυρίως τα κουνούπια *Aedes aegypti* και *Aedes albopictus* σε χώρες της Ασίας, της Αφρικής, του Ειρηνικού, της Αμερικής και της Καραϊβικής [12].



Εικόνα 4: : Παγκόσμιος χάρτης ο οποίος περιγράφει τις χώρες στις οποίες εμφανίζεται η ασθένεια του Δάγκειου πυρετού [13].

1.2.4 Chikungunya

Η νόσος Chikungunya προκαλείται από έναν ιό, ο οποίος ανήκει στο γένος *Alphaviridae*. Η πρώτη εμφάνιση της νόσου έγινε μεταξύ του 1952 και 1953 στη σημερινή Τανζανία. Το 2004 ξέσπασε μια επιδημία μεγάλης κλίμακας στα νησιά του Ινδικού Ωκεανού, την Ινδία, τη Νοτιοανατολική Ασία και την Κίνα. Κατά τη διάρκεια

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

της επιδημίας στην Κένυα προσβλήθηκε περισσότερο από το 70% του πληθυσμού της, ενώ στο νησί Κομορών καταγράφηκαν 225.000 κρούσματα. Οι πιο πρόσφατες επιδημίες σημειώθηκαν το 2005 σε νησιά του Ινδικού Ωκεανού, όπου προσβλήθηκαν περισσότεροι από 300.000 άνθρωποι και το 2007 στην Ινδία με περίπου 2 εκατομμύρια κρούσματα. Το 2007 εμφανίστηκε για πρώτη φορά στην Ιταλία, το 2009 στη Γαλλία, ενώ το Δεκέμβριο του 2013 καταγράφηκε περιστατικό της νόσου στην Αμερική. Μέχρι τον Ιανουάριο του 2015 η ασθένεια εντοπίστηκε σε 42 χώρες της Καραϊβικής και της Κεντρικής, Νότιας και Βόρειας Αμερικής. Η μετάδοση της νόσου γίνεται κυρίως με κουνούπια του γένους *Aedes* και κυρίως από το *Aedes aegypti.* Σπάνια προκαλεί θάνατο, ενώ προκαλεί χρόνια αρθραλγία στο 87-95% των ανθρώπων που προσβάλει. Οι κυριότεροι φορείς της νόσου είναι τα κουνούπια *Aedes aegypti* και *Aedes albopictus*. Στην Ελλάδα, δεν έχουν καταγραφεί γηγενή κρούσματα της νόσου παρόλο που η παρουσία του σημαντικού διαβιβαστή *Aedes albopictus* είναι έντονη [12, 14].

1.2.5 Ιός Ζίκα

Ο ιός Ζίκα ανήκει στην οικογένεια *Flaviviridae* και το γένος *Flavivirus* και μεταδίδεται κυρίως με το δάγκωμα ενός μολυσμένου κουνουπιού. Για πρώτη φορά ο ιός εντοπίστηκε το 1947 σε μαϊμού, ενώ στον άνθρωπο εντοπίστηκε το 1954 στη Νιγηρία της Αφρικής. Ο ιός μπορεί να μεταδοθεί μεταξύ των σπονδυλωτών από τη μητέρα στο παιδί, μέσα σε ένα νοσοκομείο, με μετάγγιση, με μεταμόσχευση μυελού των οστών ή οργάνων και σεξουαλικά. Η ασθένεια του ιού Ζίκα μεταδίδεται από μολυσμένα κουνούπια του γένου *Aedes*, με κύριο διαβιβαστή το κουνούπι *Aedes aegypti* [15, 16].

1.2.6 Κίτρινος Πυρετός

Ο κίτρινος πυρετός προκαλείται από ιούς του γένους *Flavivirus* και μεταδίδεται από αρθρόποδα (κουνούπια και τσιμπούρια). Η ασθένεια είναι ενδημική σε τροπικές περιοχές της Αφρικής και της Νότιας Αμερικής. Τα κουνούπια που είναι φορείς της νόσου ανήκουν στα γένη *Haemagogus* και *Aedes* με κύριο φορέα μετάδοσης το κουνούπι *Aedes aegypti* [17].

1.3 Απωθητικά – Εντομοκτόνα

1.3.1 Εισαγωγή

Ως εντομοαπωθητικά ορίζονται οι χημικοί ή οργανικοί παράγοντες, οι οποίοι δημιουργούν το περιβάλλον του ανθρώπινου δέρματος τόσο τοξικό στα έντομα ώστε να αποθαρρύνουν την επαφή και το τσίμπημά τους στον άνθρωπο. Ως εντομοκτόνα ορίζονται οι χημικοί ή οργανικοί παράγοντες οι οποίοι σκοτώνουν τα έντομα, συνήθως με νευροτοξίνες [18].

Οι επιθυμητές ιδιότητες ενός εντομοαπωθητικού είναι οι εξής [19]:

i. Να είναι αποτελεσματικό έναντι πολλών εντόμων, όπως μύγες, ψύλλοι, κουνούπια, σκνίπες και τσιμπούρια.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

ii. Να μην έχει τοξικότητα.
iii. Να μπορεί να εφαρμοστεί στο ανθρώπινο δέρμα, χωρίς να προκαλεί αλλεργία, φωτοευαισθησία κ.λπ.
iv. Να έχει μεγάλη διάρκεια δράσης.
v. Να είναι χημικά σταθερό.
vi. Να είναι οικονομικά προσιτό στους καταναλωτές.
vii. Να μην προκαλεί αλλοιώσεις στα ρούχα και τα πλαστικά .
viii. Να μην έχει δυσάρεστη οσμή.
ix. Να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με αντιηλιακό.
x. Να μην αφήνει λιπαρότητα.
xi. Να μην απομακρύνεται εύκολα με την εφίδρωση, το σκούπισμα ή το πλύσιμο.

1.3.2 Ιστορική αναδρομή

Η χρήση απωθητικών έναντι αρθροπόδων, υπολογίζεται πως άρχισε να αναπτύσσεται πριν από χιλιάδες χρόνια. Η πρώτη καταγεγραμμένη αναφορά για τη χρήση εντομοαπωθητικών βρίσκεται στα χειρόγραφα του Ηροδότου, ο οποίος αναφέρει, πως οι Αιγύπτιοι που κατοικούσαν σε έλη, χρησιμοποιούσαν καστορέλαιο στις λάμπες τους, παρόλο που είχε δυσάρεστη οσμή. Θεωρήθηκε πως το συγκεκριμένο έλαιο δρούσε ως απωθητικό, διότι στις ελώδης περιοχές υπήρχαν μεγάλοι πληθυσμοί από κουνούπια. Επίσης αναφέρει πως τα κρεβάτια τους, διέθεταν δίχτυα ώστε να τους παρέχουν προστασία από τα έντομα [20].

Υπάρχουν κείμενα, του 4^{ου} αιώνα, όπου περιγράφονται διάφορες μέθοδοι απώθησης ιπτάμενων εντόμων, τις οποίες χρησιμοποιούσαν οι Ρωμαίοι. Συγκεκριμένα, έτριβαν αρωματικό ξύδι και μαζί με έλαιο και μάννα άλειφαν το σώμα, το κεφάλι και τα πόδια για να προστατευθούν από τις σκνίπες. Αυτό το παρασκεύασμα διαθέτει ήπια αντιβακτηριδιακή δράση, καθώς περιέχει μεγάλες συγκεντρώσεις σε οξικό οξύ και μικρότερες ποσότητες τρυγικού και κιτρικού οξέος, με αποτέλεσμα να προκαλεί μείωση της παραγωγής των βακτηριακών μεταβολιτών που τα κουνούπια χρησιμοποιούν για να εντοπίσουν τον άνθρωπο-ξενιστή τους [21].

Μέχρι και σήμερα, ο καπνός αποτελεί έναν αρκετά δημοφιλή τρόπο απώθησης των κουνουπιών στις τροπικές αγροτικές περιοχές. Στη Σρι Λάνκα, η κυβέρνηση πραγματοποιεί ψεκασμούς εδώ και πολλά χρόνια, ωστόσο οι κάτοικοί της συνεχίζουν καίνε τμήματα φυτών για την προστασία τους από τα κουνούπια. Παρόλο που η χρήση του καπνού έχει αποτελεσματικότητα στην απώθηση διαφόρων εντόμων, υπάρχουν αρκετά μειονεκτήματα. Πιο συγκεκριμένα, χρειάζεται διαρκής παραγωγή καπνού για να απωθεί αποτελεσματικά τα έντομα. Επιπλέον η παραγωγή καπνού σε εσωτερικό χώρο είναι ανθυγιεινή. Για αυτούς τους λόγους είναι επιθυμητό να χρησιμοποιούνται άλλες μέθοδοι, περισσότερο ασφαλείς και σύγχρονοι [20].

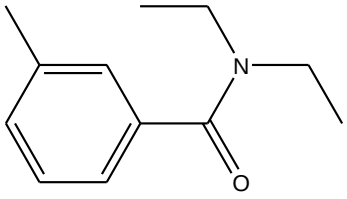
Τα απωθητικά εντόμων διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες ως προς την προέλευση, α) τα συνθετικά χημικά και β) τα φυτικά έλαια [18].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

1.3.3 Συνθετικά Χημικά

1.3.3.1 DEET

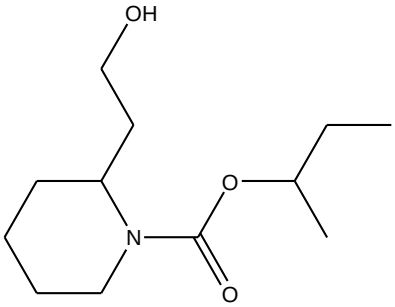
Το DEET βγήκε στην αγορά το 1956, πλέον είναι ευρέως διαθέσιμο σε ποικίλες μορφές (αεροζόλ, κρέμες, λοσιόν κλπ), όπου οι συγκεντρώσεις ποικίλουν από 5% έως 100%. Τα περισσότερα προϊόντα έχουν συγκέντρωση DEET 30% - 40% και μελέτες έδειξαν πως η απωθητική του δράση φτάνει σε κορεσμό σε συγκέντρωση 50%. Σε δοκιμές που έγιναν σε εθελοντές διαπιστώθηκε πως άτομα που τοποθετούσαν συγκεντρώσεις DEET μεταξύ 50%-70% παρουσίασαν ερεθισμούς. Επαρκή απωθητική προστασία παρέχουν οι συγκεντρώσεις μεταξύ 10%-35%, ενώ για τα παιδιά συνίσταται χρήση DEET συγκέντρωσης μικρότερης από 30%. Μεταξύ του 1956 και 2008 έχουν καταγραφεί 43 επιβεβαιωμένες υποθέσεις που σχετίζονται με τοξικότητα σε DEET [18].



Εικόνα 5: Η χημική δομή τουDEET.

1.3.3.2 Ικαριδίνη

Η ικαριδίνη αναπτύχθηκε στην Ευρώπη τη δεκαετία του 1990 προσφέροντας αρκετά πλεονεκτήματα έναντι του DEET, όπως η οσμή και η αίσθηση που αφήνει. Επιπλέον δεν αλλοιώνει ρούχα και πλαστικά. Είναι δραστικό στα κουνούπια, τις μύγες, τα τσιμπούρια και διατίθεται σε μορφή λοσιόν, σπρέι σε συγκεντρώσεις μεταξύ 7%-20%. Σε δοκιμές διαπιστώθηκε πως συγκεντρώσεις μεταξύ 10%-20% ικαριδίνης προσφέρουν απωθητική προστασία έως και 12 ώρες από το τσιμπούρι. Η χρήση του δεν συνίσταται για χρήση σε παιδιά κάτω των 2 ετών [18].



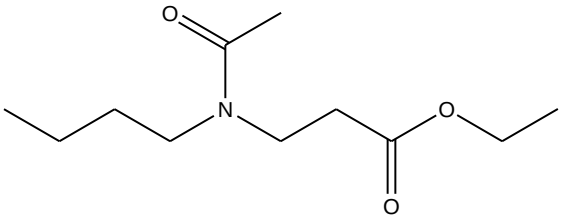
Εικόνα 6: Η χημική δομή της ικαριδίνης.

1.3.3.3 IR3535

Αρχικά κυκλοφόρησε ως καλλυντικό προϊόν στην αγορά των Ηνωμένων Πολιτειών, στη συνέχεια όμως ανακαλύφθηκε η εντομοαπωθητική του δράση. Παρέχει καλύτερη και μεγαλύτερης διάρκειας προστασία έναντι της μαύρης μύγας, που προκαλεί ογκοκερκίαση και της σκνίπας, που προκαλεί λεϊσμανίαση, από το DEET.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

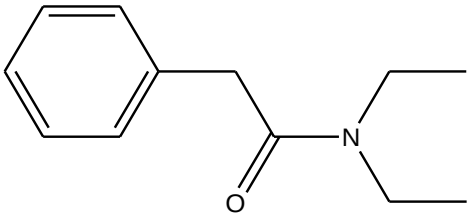
Μελέτες που έχουν γίνει έχουν αποδείξει ότι δεν προκαλεί τοξικότητα στα ζώα. Το προϊόν που κυκλοφορεί στην αγορά είναι της εταιρείας Merc, με την ονομασία «IR3535®». Η συγκεκριμένη ένωση είναι παράγωγο του αμινοξέος β-αλανίνη και για αυτό το λόγο θεωρείται πως είναι εμπνευσμένο από τη φύση [18].



Εικόνα 7: Η χημική δομή του IR3535.

1.3.3.4 DEPA

Η DEPA είναι μία ένωση που αναπτύχθηκε περίπου την ίδια περίοδο με το DEET και διαθέτει παρόμοιες ιδιότητές. Πιο συγκεκριμένα, έχουν παραπλήσιες καλλυντικές ιδιότητες, εμφανίζουν παρόμοια δερματική απορρόφηση και απέκκριση και επιπλέον προκαλούν όμοια συμπτώματα οξείας δηλητηρίασης. Σε κλινικές μελέτες, όπου πραγματοποιήθηκε *in vitro* εφαρμογή της DEPA σε κουνούπια *Aedes aegypti*, διαπιστώθηκε πως δύο ανάλογα της – το DM156 και το DM34- εμφανίζουν ικανοποιητικά επίπεδα απώθησης και χαμηλή τοξικότητα. Η DEPA είναι αρκετά φθηνότερο εντομοαπωθητικό εν συγκρίσει με το DEET -25.40$/kg και 48,40$/kg, αντίστοιχα- με αποτέλεσμα να αυξάνει τις πιθανότητες να αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη ένωση στους πληθυσμούς των αναπτυσσόμενων χωρών, όπου το κόστος αγοράς ενός προϊόντος είναι το κύριο κριτήριο των καταναλωτών [20].



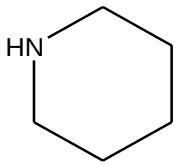
Εικόνα 8: Η χημική δομή του DEPA.

1.3.3.5 Ενώσεις πιπεριδίνης

Η πιπεριδίνη είναι μια χημική ένωση, η οποία ανήκει στην κατηγορία των κυκλικών αμινών. Ο ίδιος δομικός σκελετός, παρουσιάζεται και στην πιπερίνη, που αποτελεί το βασικό ενεργό χημικό συστατικό του πιπεριού. Το ενδιαφέρον των επιστημόνων είχε στραφεί προς τη σύνθεση ενώσεων με βάση την πιπεριδίνη, με αποτέλεσμα στη δεκαετία του 1970 να δημιουργηθούν περίπου 600 ενώσεις, των οποίων η δομή βασιζόταν σε εκείνη της πιπεριδίνης. Από αυτές τις ενώσεις, η AI3-35765 εμφάνισε την ίδια αποτελεσματικότητα με το DEET σε αρκετά είδη κουνουπιών. Η ένωση, παρόλο που εμφάνιζε αποτελεσματικότητα στην απώθηση κουνουπιών, απορρίφθηκε από την έρευνα του Αμερικανικού στρατού διότι σε ορισμένα άτομα προκαλούσε μια δυσάρεστη και έντονη αίσθηση καύσου. Για αυτό το λόγο το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε στην ένωση AI3-37220, η οποία αποτελείται

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

από ένα ρακεμικό μίγμα τεσσάρων ισομερών και αποδείχθηκε πως εμφανίζει υψηλή αποτελεσματικότητα στην απώθηση αρκετών αιματοφάγων αρθρόποδων. Τα δεδομένα που υπάρχουν και αφορούν την τοξικότητα της ένωσης δείχνουν πως είναι ασφαλής, ωστόσο δεν έχει κυκλοφορήσει κάποιο προϊόν στην αγορά [20].



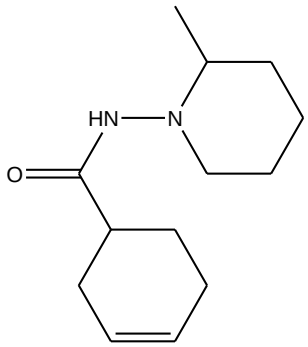
Εικόνα 9: Η χημική δομή της πιπεριδίνης.

1.3.3.6 SS220

Μια από τις πιο πρόσφατες εξελίξεις στα συνθετικά εντομοαπωθητικά που εφαρμόζονται στο δέρμα, είναι η ένωση SS220, η οποία ανακαλύφθηκε από το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών (USDA). Προέρχεται από την ένωση AI3-37220, που αναφέρθηκε παραπάνω, και αποτελεί το πιο ενεργό από τα τέσσερα συστατικά του ρακεμικού μίγματός της. Έναντι των κουνουπιών *Aedes aegypti* εμφανίζει 2,5 φορές μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, εν συγκρίσει με το ρακεμικό μίγμα. Εργαστηριακές μελέτες έδειξαν πως η ένωση SS220 έχει παρόμοια δραστικότητα με το DEET στην απώθηση των κουνουπιών *Anopheles stephensi* και *Aedes aegypti*, και καλύτερη δραστικότητα από την ικαριδίνη στο κουνούπι *Aedes aegypti.* Εμφανίζει μεγαλύτερη δραστικότητα από το DEET στο τσιμπούρι *Ixodes scapularis*, ενώ στο *Amblyomma americanum* εμφανίζουν ίδια δράση. Αντίθετα, δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στο κουνούπι *Anopheles albimanus* έδειξαν πως η SS220 είναι λιγότερο αποτελεσματική από το DEET.

Ύστερα από τοξικολογικές μελέτες αποδείχθηκε πως εμφανίζει χαμηλά επίπεδα ερεθισμού και τοξικότητας. Η ένωση SS220 έχει χαμηλό ρυθμό εξάτμισης, γεγονός που αυξάνει το χρόνο ζωής και κατά συνέπεια τη διάρκεια δράσης. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η ποσότητα που θα τοποθετηθεί στο δέρμα, κάνοντας το προϊόν πιο ασφαλές καθώς μειώνεται η απορρόφησή του από την επιδερμίδα. Ένα ακόμα πλεονέκτημα είναι η ευχάριστη αίσθηση που αφήνει στο χρήστη, καθώς διαθέτει ευχάριστη φρουτώδη οσμή και δεν αφήνει αίσθηση λιπαρότητας στο δέρμα. Το κύριο μειονέκτημα του SS220 προκύπτει από το γεγονός ότι πρόκειται για ένα μόνο στεροϊσομερές και όχι ένα ρακεμικό μίγμα, γεγονός που το καθιστά πιο ακριβό στην παραγωγή του [20].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



Εικόνα 10: Η χημική δομή της ένωσης SS220.

1.3.4 Φυτικά Έλαια

1.3.4.1 Έλαιο λεμονώδη (ή κιτρώδη) ευκάλυπτου

Το έλαιο του ευκάλυπτου λεμονιού είναι ένα εκχύλισμα από τα φύλλα του φυτού *Eucalyptus citriodora* ή *Corymbia citriodora* (lemon *Eucalyptus*) το κύριο συστατικό του οποίου είναι το p-menthane- 3,8-diol (PMD), ένα μόριο που η σύνθεσή του μπορεί να επιτευχθεί και στο εργαστήριο. Το PMD έχει απωθητική δραστικότητα έναντι των κουνουπιών ισάξια με αυτή του DEET και χρησιμοποιείται ως σπρέι με συγκέντρωση μεταξύ 10% - 40%. Ο Οργανισμός Φαρμάκων της Αμερικής (FDA) προτείνει πως δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σε παιδιά κάτω των τριών ετών [18].

1.3.4.2 Citronella

Είναι ένα φυσικό φυτικό έλαιο το οποίο παράγεται από διάφορα φυτά του είδους *Cymbopogon lemongrasses*. Διατίθεται ως λοσιόν, έλαιο, εμποτισμένο σε κεριά και φλεγόμενα δοχεία σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0,5% - 20%. Το προϊόντα που περιέχουν citronella δεν έχουν έγκριση για δερματική χρήση και ως εκ τούτου απαγορεύεται η κυκλοφορία τους στο εμπόριο στην μορφή δερματικών λοσιόν. Λόγω της μεγάλης πτητικότητάς η διάρκεια δράσης είναι μικρή [18].

1.3.4.3 Permethrin

Πρωτοεμφανίστηκε στην αγορά το 1973 και προέρχεται από ξερά άνθη του φυτού *Chrysanthemum cinerarifolium*. Για να έχει αποτελεσματικότητα πρέπει να έρθει σε άμεση επαφή με το έντομο. Ο μηχανισμός δράσης του σχετίζεται με την αρχική διέγερση του νευρικού συστήματος του εντόμου μέσω δράσης σε κανάλια νατρίου και ακολούθως από αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης, προκαλώντας θανάσιμη παράλυση. Δεν εφαρμόζεται ως δερματικό απωθητικό, αλλά ψεκάζεται στα ρούχα και στο χώρο. Προσφέρει ακόμα πιο ισχυρή προστασία όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την εφαρμογή τοπικών εντομοαπωθητικών. Η περμεθρίνη είναι πολύ πιο αποτελεσματική στην προστασία από το τσιμπούρι, έναντι του DEET και της ικαριδίνης, καθώς σκοτώνει τα τσιμπούρια με τα οποία έρχεται σε επαφή. Σε μελέτες που έγιναν από τον FDA σε ζώα δεν εμφανίστηκε κάποια τοξικότητα, παρόλα αυτά

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

συνίσταται να μην χρησιμοποιείται από άτομα που εμφανίζουν αλλεργία στα χρυσάνθεμα [18].

1.3.4.4 Φυτά του γένους Ocimum

Τα αιθέρια έλαια των φυτών που ανήκουν στο γένος *Ocimum* περιέχουν αρκετές χημικές ενώσεις -όπως linalool, p-cymene, citral, thujone κλπ.- οι οποίες είναι αποτελεσματικές στην απώθηση εντόμων. Στην Τανζανία, οι κάτοικοι παραδοσιακά καίνε φρέσκα φυτά *Ocimum spp.* και τοποθετούν σε γωνίες φρεσκοκομμένα κλαδιά από τα φυτά *O. suave* και *O. Canum*, ώστε να αποτρέψουν την είσοδο των κουνουπιών στο εσωτερικό του σπιτιού. Η μέθοδος αυτή μελετήθηκε και βρέθηκε πως το φρέσκο φυτό *O. canum* παρέχει 63,6% προστασία από το τσίμπημα των κουνουπιών για δύο ώρες. Στη Ζιμπάμπουε, οι κάτοικοι τρίβουν με φύλα από φυτά *Ocimum spp.* το δέρμα τους για την απώθηση των κουνουπιών. Σε μελέτη, όπου οι εθελοντές άλειφαν τα πόδια τους με χυμό από τα φύλλα των φυτών *O. suave* και *O. canum*, αποδείχθηκε πως το ποσοστό των θηλυκών κουνουπιών *Anopheles gambiae* που είχαν τραφεί με αίμα, μειωνόταν κατά 50% [20].

1.3.4.5 Φυτά του γένους Hyptis

Οι κάτοικοι του Αμαζονίου στη Βραζιλία, παραδοσιακά καίνε φυτά του είδους *Hyptis* και τρίβουν την επιδερμίδα τους με φύλλα των συγκεκριμένων φυτών, ώστε να απωθήσουν τα κουνούπια. Επίσης στη δυτική Αφρική, καίνε το φυτό *H. suveolens* για την απώθηση των εντόμων. Τέλος, στην Τανζανία, κρεμάνε φρεσκοκομμένο το συγκεκριμένο φυτό στα σπίτια τους ως μέθοδο απομάκρυνσης των κουνουπιών. Σε έρευνες που διεξάχθηκαν, βρέθηκε πως το φρέσκο φυτό, έχει την ικανότητα να παρέχει έως και 70% προστασία, για έως και 2 ώρες. Το αργό κάψιμο των φυτών, προσφέρει μεγαλύτερη προστασία [20].

1.3.4.6 Φυτά του γένους Mentha

Υπάρχουν λίγες αναφορές για την εντομοαπωθητική δράση των φυτών του γένους *Mentha.* Δοκιμές του αιθέριου ελαίου από το φυτό *M. piperita* , που διεξάχθηκαν στην Ινδία, έδειξαν πως μπορεί να προσφέρει 85% προστασία έως 11 ώρες έναντι διάφορων κουνουπιών του γένους *Anopheles.* Το φυτό που ξεχωρίζει σε αυτό το γένος είναι η μέντα, καθώς τα φύλλα της περιέχουν έως και 80% menthol που διαθέτει εντομοκτόνο δράση. Επίσης η μέντα περιέχει και αρκετές εντομοαπωθητικές ενώσεις, όπως οι limonene, linalool, b-pinene [20].

1.3.4.7 Φυτά του γένους Thymus

Το έλαιο από θυμάρι σε συγκέντρωση 100% μπορεί να παρέχει προστασία έναντι των κουνουπιών για τουλάχιστον μισή ώρα. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως η εφαρμογή στα ρούχα, ελαίου σε συγκέντωση 100% έχει εντομοαπωθητική δράση για 105 με 135 λεπτά, έναντι των κουνουπιών *Aedes aegypti* και *An. albimanus.* Σε στγκέντρωση 25% η δράση του διαρκεί για 45 λεπτά και στα δύο είδη κουνουπιών [20] .

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

1.3.4.8 Φυτό Daniellia oliveri

Το φυτό *Daniellia oliveri* χρησιμοποιείται στη δυτική Αφρική για να αποτραπεί η είσοδος των κουνουπιών στο εσωτερικό των κατοικιών κατά τη διάρκεια της νύχτας. Έπειτα από διάφορες δοκιμές, αποδείχθηκε πως αποτελεί μία αποτελεσματική, ασφαλή και φθηνή μέθοδο προσωπικής προστασίας από τα κουνούπια. Βρέθηκε πως ο καπνός που παράγεται από την καύση του φυτού μπορεί να μειώσει την επαφή των κουνουπιών με τους ξενιστές τους σε ποσοστό έως και 78% [20].

1.3.4.9 Φυτά του γένους Artemisia

Τα μέλη του συγκεκριμένου γένους βρίσκονται σε όλο τον κόσμο, από την τροπική Ινδία έως τη Σιβηρία. Είναι αρωματικά φυτά, που μπορούν να αντέξουν τις αντίξοες συνθήκες και χρησιμοποιούνται ως εντομοαπωθητικά για αιώνες. Στην Κίνα, καίνε αποξηραμένα φυτά *Artemisia vulgaris* για να προστατευτούν από τα έντομα. Με την καύση του φυτού απελευθερώνονται χημικές ενώσεις, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν, που προκαλούν απώθηση των κουνουπιών,. Εντομοκτόνο δράση εμφανίζει το φυτό *A. absinnthium* το οποίο φύεται στην Ευρώπη, την κεντρική Ασία και την Αφρική. Παρόλο που έχει εντομοκτόνο δράση, αναφέρεται ως εντομοαπωθητικό χωρίς να έχει τεκμηριωθεί η δράση του έναντι των κουνουπιών [20].

1.3.4.10 Σκόρδο

Από την αρχαιότητα έως και σήμερα, υπάρχει η πεποίθηση πως η κατάποση σκόρδου -*Allium sativum*- αποτρέπει τα κουνούπια να πλησιάσουν στο δέρμα. Το σκόρδο χρησιμοποιείται ως εντομοαπωθητικό στη νότια Αμερική, όπου το κρεμάνε γύρω από το λαιμό, και στην Κίνα, όπου το τρώνε. Έπειτα από δοκιμές, αποδείχθηκε πως η κατάποση σκόρδου δεν απωθεί τα κουνούπια. Στην πραγματικότητα διαθέτει εντομοκτόνες ιδιότητες καθώς περιέχει τη χημική ένωση allicin, και ενώσεις που έχουν αποδειχθεί ότι προσδίδουν απωθητική δράση έναντι των εντόμων. Η σύσταση εντομοκτόνων και απωθητικών σκευασμάτων, που βρίσκονται διαθέσιμα στην αγορά, είναι βασισμένη στο σκόρδο και χρησιμοποιούνται έναντι των ακάρεων και των κουνουπιών που βρίσκονται στα στάδιο της προνύμφης [20].

1.3.5 Σύγκριση Αποτελεσματικότητας μεταξύ Χημικών και Φυτικών απωθητικών

Το IR3535 φαίνεται να έχει μεγαλύτερη δράση σε σύγκριση με το DEET στην απώθηση της σκνίπας και της μύγας. Παρόμοια δράση στην απώθηση των κουνουπιών έχουν το PMD και το DEET. Το PMD και η ικαριδίνη, έχουν μεγαλύτερη δράση για τα τσιμπούρια σε σχέση με το DEET. Επίσης δεδομένου ότι η permethrin σκοτώνει τα τσιμπούρια που έρχονται σε επαφή μαζί της, έχει μεγαλύτερη δραστικότητα από το DEET και την ικαριδίνη. Για καλύτερη και μεγαλύτερης διάρκειας απώθηση συνίσταται η εφαρμογή στο δέρμα μια στρώσης τοπικού απωθητικού, όπως το DEET ή ικαριδίνη και στη συνέχεια ρούχα εμποτισμένα με κάποιο από τα συνθετικά πυρεθροϊδή, τα οποία δρουν ως εντομοκτόνα [18].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

1.4 Οσφρητικό σύστημα εντόμων

1.4.1 Εισαγωγή

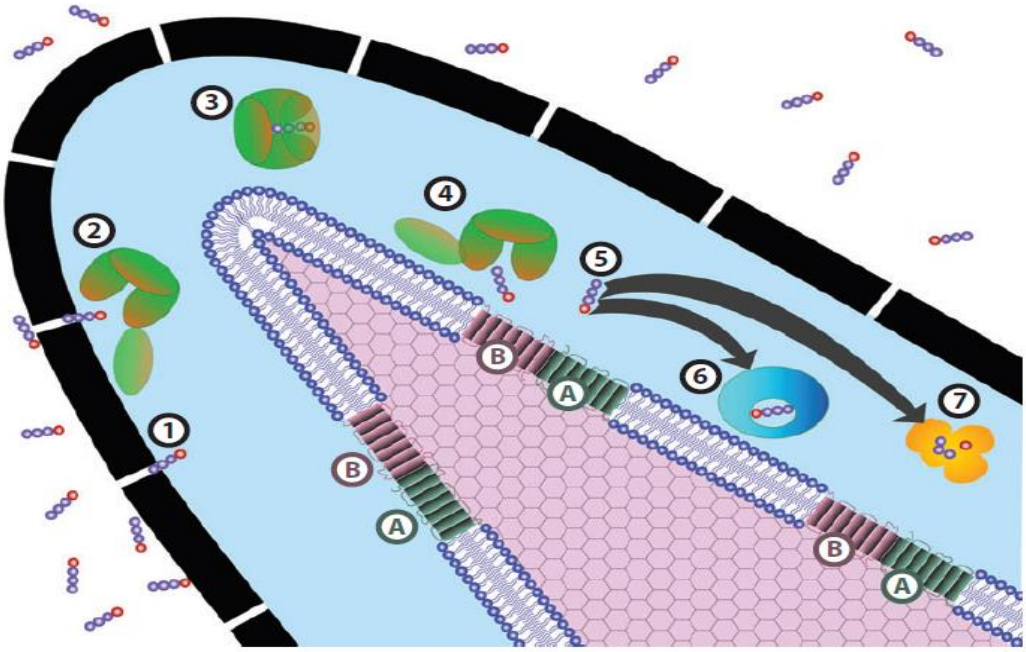
Τα έντομα αγροτικού και υγειονομικού ενδιαφέροντος μπορούν να επηρεάζουν αρνητικά την κοινωνία καθώς ως παράσιτα μπορούν να καταστρέφουν τις σοδιές και τα προϊόντα, ή να είναι φορείς σοβαρών και πολλές φορές θανατηφόρων ασθενειών, όπως η ελονοσία, αντίστοιχα [22]. Για να μπορέσουν να εντοπίσουν τον κατάλληλο ξενιστή, χρησιμοποιούν τα μόρια οσμών που βρίσκονται στο περιβάλλον. Ως εκ τούτου τα οσμητικά μόρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά των εντόμων. Στα περισσότερα έντομα το ερέθισμα της οσμής, που προέρχεται από διάφορες πηγές, είναι υπεύθυνο για τη συμπεριφορά τους [23]. Το οσφρητικό σύστημα στα έντομα σχετίζεται με την διαδικασία εύρεσης τροφής και την αναπαραγωγή τους (ζευγάρωμα και την εύρεση κατάλληλης τοποθεσίας για την εκκόλαψη των αυγών τους) [24]. Διαθέτουν ιδιαίτερα ευαίσθητα χημειοαισθητικά συστήματα, που μπορούν να εντοπίσουν και διαχωρίσουν τις χημικές ουσίες των οσμών [25]. Η επιρροή των μορίων των οσμών στον έλεγχο της συμπεριφοράς των εντόμων, καθώς και οι καταρράχτες αντιδράσεων που προκαλούνται δεν έχουν αποσαφηνιστεί ακόμα [26]. Το οσφρητικό σύστημα των εντόμων οργανώνεται σε πολλά διαφορετικά επίπεδα, ξεκινώντας από την πρόσδεση σημειοχημικών στους υποδοχείς, την μεταφορά των σημάτων, την τελική τους επεξεργασία στον εγκέφαλο και τέλος τη μετάφρασή του σε συμπεριφορά [22] .

1.4.2 Αναγνώριση οσμών

Ένα μεγάλο κομμάτι του αισθητήριου συστήματος των εντόμων αποτελείται από μεγάλο αριθμό μικρών αισθητήριων οργάνων (sensillum), των οποίων οι επιφάνειες καλύπτονται από τριχοειδής αισθητήρες (sensilla), και βρίσκονται κυρίως σε μέρη του στόματος και στις κεραίες, αλλά και στα πόδια, τα φτερά και τα γεννητικά όργανα. Διαθέτουν αρκετούς πόρους στα τοιχώματά τους και μπορεί να περιέχουν έναν ή και περισσότερους οσφρητικούς νευρώνες (ORN: Olfactory Receptor Neuron) [24, 25]. Για να φτάσουν τα μόρια των οσμών στη μεμβράνη των δενδριτών, πρέπει να περάσουν από τους πόρους των τοιχωμάτων των αισθητικών οργάνων και στη συνέχεια να διασχίσουν την υδατική λέμφο που περιβάλει τους δενδρίτες, η οποία είναι πλούσια σε υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες λειτουργούν ως μεταφορείς, μεταφέροντας τα μόρια των οσμών στους υποδοχείς οσμογόνων μορίων (ORs) διεγείροντάς τους. Δύο είδη πρωτεϊνών μεταφορέων βρέθηκαν στη λέμφο, οι οσφρητικές πρωτεΐνες πρόσδεσης (OBPs) και οι χημειοαισθητήριες πρωτεΐνες (CSPs) [24]. Συγκεκριμένα τα οσφρητικά μόρια (προσδέτες) εισέρχονται μέσω των πόρων και προσδένονται επιλεκτικά από τις μεταφορικές πρωτεΐνες (OBPs) με αναστρέψιμο τρόπο. Το σύμπλοκο OBP-προσδέτη μεταφέρεται μέσω της λέμφου και φτάνει στη δενδριτική μεμβράνη των ORNs όπου βρίσκονται οι ORs. Εκεί προκαλείται μία αλληλουχία γεγονότων που έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταγωγή σήματος στον εγκέφαλο. Υπάρχουν δύο υποθέσεις για την τύχη του ελεύθερου προσδέτη μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Αποικοδομείται, είτε από τα ένζυμα αποικοδόμησης (ODEs), είτε από μοριακές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

παγίδες. Με αυτόν τον τρόπο η πρωτεΐνη μεταφορέας γίνεται διαθέσιμη για να δεσμεύσει το επόμενο οσφρητικό μόριο (**ΕΙΚΟΝΑ**) [24].



Εικόνα 11: Τα μόρια οσμών (μωβ-κόκκινα) διασχίζουν τους πόρους των αισθητικών τριχοειδών οργάνων (sensilla) **ΒΗΜΑ 1,** και εισέρχονται στην υδατική λέμφο. Στη συνέχεια δένονται στις OBPs **ΒΗΜΑ 2**, και μεταφέρονται μέσω της λέμφου **ΒΗΜΑ 3,** στους ORNs ώστε να τους ενεργοποιήσουν **ΒΗΜΑ 4**. Οι υποδοχείς λειτουργούν ως ετεροδιμερή που διαθέτουν μία περιοχή πρόσδεσης (B) και μια συντηρημένη περιοχή συν-υποδοχέα (ORco) (A). μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων τα ελεύθερα μόρια των οσμών απενεργοποιούνται είτε μέσω μιας μοριακής παγίδας **ΒΗΜΑ 6,** είτε μέσω της άμεσης δράσης των ODEs **ΒΗΜΑ 7** [22].

1.4.3 Οσφρητικοί υποδοχείς

1.4.3.1 ORs

Οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs) είναι πρωτεΐνες που διαθέτουν επτά διαμεμβρανικές υπομονάδες. Είναι ετερομερή σύμπλοκα που αποτελούνται από δύο υπομονάδες. Η μία υπομονάδα ονομάζεται (ORx) και είναι αυτή που αλληλεπιδρά με το μόριο του προσδέτη. Η δεύτερη υπομονάδα, που είναι συντηρημένη μεταξύ όλων των ειδών εντόμων, ονομάζεται συν-υποδοχέας του οσφρητικού υποδοχέα (Odorant Receptor co-receptor; ORco) και δεν αλληλεπιδρά με τον προσδέτη του ORx [24]. Νεότερες μελέτες έδειξαν ότι ο ORco είναι στόχος για αγωνιστές και ανταγωνιστές και ως εκ τούτου αποτελεί μοριακό στόχο για ανάπτυξη εντομοαπωθητικών. [27, 28]

1.4.3.2 IRs

Έχει βρεθεί ότι οι οσφρητικοί νευρώνες κάποιων αισθητικών τροχοειδών δεν εκφράζουν τους οσφρητικούς υποδοχείς (ORx ή/και ORCO). Φαίνεται πως σε αυτούς τους νευρώνες εκφράζεται μία διαφορετική οικογένεια υποδοχέων, οι ιοντοτροπικοί

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

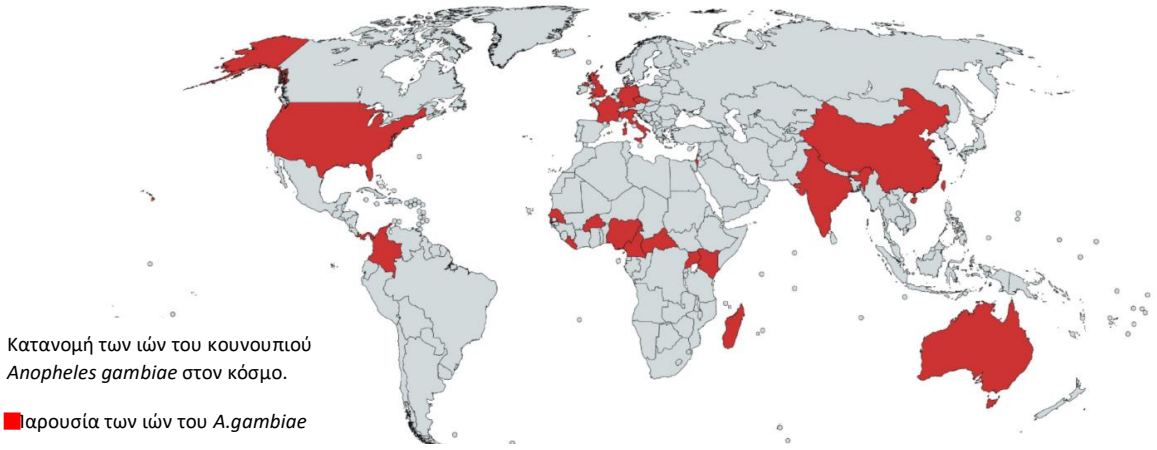
υποδοχείς (IRs). Αυτοί είναι ιοντικά κανάλια που ενεργοποιούνται με την πρόσδεση οσφρητικών μορίων. Χαρακτηριστικά αυτών των υποδοχέων είναι οι τρείς διαμεμβρανικές του υπομονάδες, μια περιοχή πόρου και 2 περιοχές πρόσδεσης οσφρητικών μορίων (S1 και S2). Επίσης σε ορισμένους οσφρητικούς νευρώνες φαίνεται πως εκφράζονται και οι δύο οικογένειες οσφρητικών υποδοχέων OR και IR και υπάρχει πιθανότητα συνεργασίας μεταξύ τους για την μεταγωγή του σήματος στον εγκέφαλο και επομένως τον καθορισμό της συμπεριφοράς των εντόμων [24] .

1.4.3.3 GRs

Το CO_2 είναι μία πτητική ένωση που εκκρίνεται από τα θηλαστικά και είναι ιδιαίτερα σημαντικό οσφρητικό μόρια για τα αιματοφάγα έντομα, καθώς είναι υπεύθυνο για την καθοδήγησή τους στους ξενιστές. Οι υποδοχείς που είναι υπεύθυνοι για την πρόσδεση μορίων CO2 είναι οι γευστικοί υποδοχείς (GRs) [24].

1.5 Κουνούπια του γένους *Anopheles*

Έχουν περιγραφεί περισσότερα από 480 είδη κουνουπιών του γένους *Anopheles* παγκοσμίως. Περίπου 70 είδη του ίδιου γένους είναι υπεύθυνα για τη μετάδοση της ασθένειας της ελονοσίας και περίπου 40 είδη θεωρούνται ως κυρίαρχοι φορείς της νόσου. Επιπλέον, τα κουνούπια *Anopheles* μπορούν να είναι και φορείς ιών, όπως ο Δάγκειος ιός, ο ιός του κίτρινου πυρετού, ο ιός chikungunya, RNA ιοί και άλλοι [29].



Εικόνα 12: Παγκόσμιος χάρτης με αναφορές (κόκκινο) σε ιούς από κουνούπια του γένους Anopheles [29].

Τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά κουνούπια *Anopheles gambiae* ανταποκρίνονται σε οσμητικά μόρια που προέρχονται από φυτά, καθώς τρέφονται από το νέκταρ για κάλυψη των ενεργειακών αναγκών τους. Επιπλέον, τα θηλυκά κουνούπια στηρίζονται στην όσφρηση τους προκειμένου να βρουν κατάλληλη τοποθεσία ωοθεσίας και ξενιστές για τη λήψη αίματος. Μόνο τα θηλυκά κουνούπια λαμβάνουν γεύματα αίματος, διότι με αυτόν τον τρόπο λαμβάνουν ορισμένες πρωτεΐνες, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των αυγών τους [30] .

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

1.6 Οσφρητικές πρωτεΐνες δέσμευσης

1.6.1 Εισαγωγή

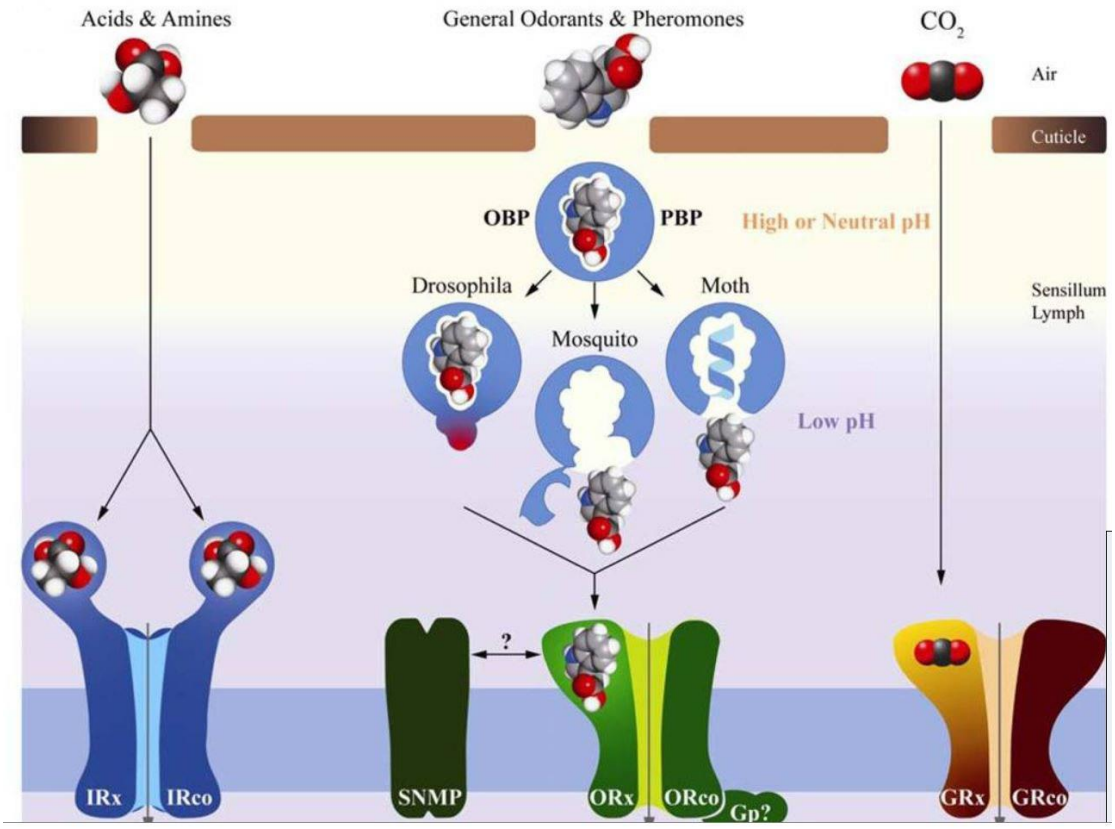
Ο όρος «Οσφρητικές Πρωτεΐνες Δέσμευσης» (OBPs) αναφέρεται σε μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών των εντόμων. Το όνομά τους προέρχεται από το γεγονός ότι πολλά από τα μέλη αυτής της οικογένειας εκφράζονται στο οσφρητικό σύστημα και δεσμεύουν μόρια οσμών. Η πρώτη OBP ανακαλύφθηκε το 1981 στον αρσενικό σκώρο *Antheraea Polyphemus.* Τα θηλαστικά διαθέτουν επίσης OBPs, των οποίων όμως η δομή είναι πολύ διαφορετική από αυτή των εντόμων [31]. Οι OBPs αποτελούν τη σύνδεση μεταξύ των χημικών σημάτων και των οσφρητικών υποδοχέων. Έχουν μικρό μέγεθος, συνήθως χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο, παρουσιάζουν συγγένεια σύνδεσης για μικρούς προσδέτες και μεγάλη συγκέντρωση στην υδατική αισθητική λέμφο που περιβάλει τους χημοαισθητικούς νευρώνες [32].

1.6.2 Τρόπος δράσης

Τα σημειοχημικά που αναγνωρίζονται μέσω της όσφρησης, μεταφέρονται ως ένα οσφρητικό σήμα στον εγκέφαλο και ορίζουν τη συμπεριφορά των εντόμων, που είναι μείζονος σημασίας για την επιβίωση και την αναπαραγωγή των εντόμων. Για να ξεκινήσει η μεταγώγή του σήματος, τα υδρόφοβα μόρια πρέπει να μεταφερθούν στους οσφρητικούς υποδοχείς (ORs), που βρίσκονται στους δενδρίτες των αισθητικών νευρώνων, διασχίζοντας την υδατική λέμφο [33, 34]. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, η υδατική λέμφος είναι πλούσια σε υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων είναι οι οσφρητικές πρωτεΐνες δέσμευσης (OBPs), οι οποίες απαντώνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις της τάξης των mM [35]. Μόλις τα οσφρητικά μόρια περάσουν από τους μεμβρανικούς πόρους της επιδερμίδας του τριχοειδούς αισθητήρα, προσδένονται από τις OBP και μεταφέρονται τους μεμβρανικούς ORs για να τους ενεργοποιήσουν. Υπάρχουν δύο υποθέσεις για τη δράση των OBP. Η πρώτη και επικρατούσα υποστηρίζει πως δρουν ως μεταφορείς για τον προσδέτη και τον ελευθερώνουν ώστε να ενεργοποιήσει τους ORs, ενώ η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

δεύτερη υποστηρίζει πως η ενεργοποίηση των ORs πραγματοποιείται από το σύμπλοκο OBP-προσδέτη [35].



Εικόνα 13: Διακριτές κατηγορίες οσμών ενεργοποιούν συγκεκριμένες ομάδες χημειοϋποδοχέων. Απεικονίζονται διαφορετικά προτεινόμενα μηχανιστικά μοντέλα της δράσης των OBPs για τη μεταφορά των προσδετών στους οσφρητικούς υποδοχείς [36].

1.6.3 Έκφραση

Παρόλο που ο βασικός ρόλος των OBP στην όσφρηση έχει υποστηριχθεί από πολλές μελέτες, αποδεικνύοντας πως η πλειοψηφία των πρωτεϊνών εκφράζονται στις κεραίες, πλέον έχει αποδειχθεί ότι ορισμένες πρωτεΐνες δεν σχετίζονται με τα αισθητικά όργανα και επομένως διαθέτουν και άλλες λειτουργίες. Για παράδειγμα στη μαύρη μύγα, *Phormia regina,* έχει βρεθεί μια OBP που είναι υπεύθυνη για τη διαλυτοποίηση των λιπαρών οξέων. Επίσης, αιματοφάγα έντομα όπως το *Culex negripalpus* και το *Rhodnius prolixus*, διαθέτουν OBP που εκφράζονται στο έντερο και πιθανώς να σχετίζονται με τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών και άλλων μορίων συμβάλλοντας στην εντερική λειτουργία. Επιπλέον στο κουνούπι *An. aegypti* επιβεβαιώθηκε η παρουσία αρκετών OBPs στις ωοθήκες και στα κελύφη των αυγών όπου θεωρείται ότι συμμετέχουν στο σχηματισμό του κελύφους. Πρόσφατα προτάθηκε ένας επιπλέον μηχανισμός δράσης. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε πως η έκφραση ορισμένων χημειοαισθητήριων πρωτεϊνών (CSPs) αυξάνεται στο έντερο των εντόμων έπειτα από την έκθεσή τους σε θανατηφόρες δόσεις εντομοκτόνων. Συνεπώς φαίνεται πως πιθανώς να συμμετέχουν σε ένα μηχανισμό προστασίας των εντόμων από τη δράση εντομοκτόνων. [35, 37].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

Οι Biesmann et al. (2005), ανακάλυψαν ένα υποσύνολο των OBPs που εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στα θηλυκά κουνούπια, έναντι των αρσενικών. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες είναι πολύ πιθανό να σχετίζονται στον εντοπισμό ξενιστών για τη λήψη αίματος, ανιχνεύοντας οσμητικά μόρια που εκκρίνονται από τον άνθρωπο. Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε πως οι OBP 17, 48, 4, 1, 20 και 12 εκφράζονται 2-3 φορές περισσότερο στις κεραίες των θηλυκών, εν συγκρίσει με τις κεραίες των αρσενικών κουνουπιών. Επίσης οι OBP 5 και 13 εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στο κεφάλι των θηλυκών. Τέλος η μέτρηση των επίπεδων των πρωτεϊνών έπειτα από τη λήψη αίματος, έδειξε ότι πιθανώς το οσφρητικό σύστημα των θηλυκών, ρυθμίζει τη λειτουργία του μετά την λήψη αίματος. Συγκεκριμένα τα επίπεδα όλων των OBP, συμπεριλαμβανομένων και των 5 και 13, μειώνονται περίπου 2 φορές. Υπάρχουν ωστόσο τρείς OBPs (9, 24 και 28) οι οποίες υπερεκφράζονται στα αρσενικά κουνούπια και των οποίων τα επίπεδα αυξήθηκαν περίπου 9 φορές μετά τη λήψη αίματος [30].

1.6.4 Δομή

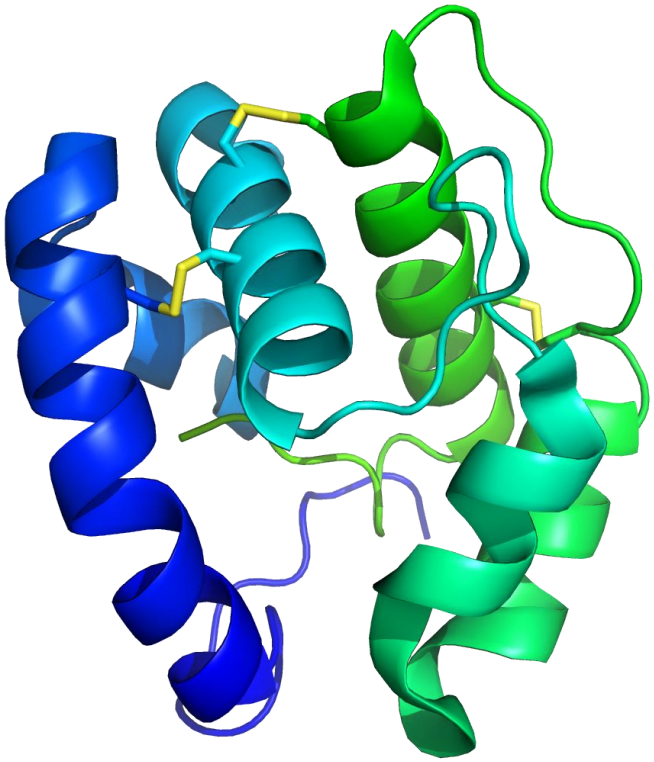
Οι OBP των εντόμων είναι μικρές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες (13-17 kDa), που διαθέτουν αλυσίδες με 130-150 αμινοξέων [38, 39]. Εκφράζονται μαζί με ένα πεπτίδιο οδηγό, το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται και δεν υπάρχει στην ώριμη μορφή. Παρόλο που συνήθως εμφανίζουν όξινα χαρακτηριστικά, έχει αποδειχθεί πως στα δίπτερα το ισοηλεκτρικό τους σημείο έχει μεγάλο εύρος, επομένως στις κεραίες, σε φυσιολογικό pH μπορεί να είναι είτε θετικά είτε αρνητικά φορτισμένες [40].

Οι OBP συνήθως αποτελούνται από έξι α-έλικες αναδιπλωμένες σε συμπαγείς και σταθερές σφαιρικές δομές [41] [42]. Χαρακτηριστικό των κλασικών OBP είναι ένα μοτίβο από έξι κυστεΐνες, η θέση των οποίων είναι αρκετά συντηρημένη σε όλα τα έντομα. Αυτές συμμετέχουν σε τρείς δισουλφιδικούς δεσμούς οι οποίοι προσφέρουν μεγάλη σταθερότητα στη τρισδιάστατη δομή [43].

Με βάση το μοτίβο κυστεϊνών οι OBP έχουν κατηγοριοποιηθεί στις εξής κατηγορίες:

i. Τις κλασσικές OBPs (Classical OBPs), που εμφανίζουν στην αλληλουχία τους το συντηρημένο μοτίβο των έξι κυστεϊνών.
ii. Τις C-Minus OBPs, που διαθέτουν τέσσερα ή πέντε κατάλοιπα κυστεΐνης.
iii. Τις Plus-C OBPs, που στην αλληλουχία τους διαθέτουν δύο επιπλέον κατάλοιπα κυστεΐνης και μια συντηρημένη προλίνη μετά το μοτίβο των έξι κυστεϊνών.
iv. Τις διμερείς OBPs (Dimer OBPs), που σχηματίζουν από την συγχώνευση δύο κλασικών μοτίβων των έξι κυστεϊνών.
v. Τις μη τυπικές OBPs (Atypical OBPs), που διαθέτουν μία επιμηκυμένη C-τελική περιοχή [39].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



Εικόνα 14: Η τρισδιάστατη δομή της κλασικής AgamOBP1. Οι τρείς συντηρημένοι δισουλφιδικοί δεσμοί απεικονίζονται με κίτρινο χρώμα.

1.6.5 *Anopheles gambiae* OBP

Το κουνούπι *Anopheles gambiae* διαθέτει 69 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί ως OBPs, βάσει της ομοιότητας των αλληλουχιών. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει πως αρκετές από αυτές τις πρωτεΐνες μπορεί να μην βρίσκονται σε αισθητήρια όργανα και να σχετίζονται με άλλες δομές, όπως τα κελύφη των αυγών τους. Μία πρωτεομική έρευνα διαλυτών οσφρητικών πρωτεϊνών έδειξε πως στις κεραίες των θηλυκών κουνουπιών εκφράζεται μεγαλύτερος αριθμός και ποσότητες OBP σε σχέση με τις κεραίες των αρσενικών κουνουπιών. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν 24 OBP στις κεραίες των θηλυκών, έναντι 19 στις κεραίες των αρσενικών [35].

1.6.5.1 AgamOBP1

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μόνο τα θηλυκά κουνούπια έχουν ανάγκη για λήψη αίματος και επομένως έλκονται από ανθρώπους-ξενιστές μέσω οσμητικών μορίων. Η OBP1 του κουνουπιού *Anopheles gambiae* βρέθηκε πως εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στις κεραίες του θηλυκού κουνουπιού σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης στο αρσενικό. Για αυτό το λόγο θεωρείται πως είναι ένα από τα μόρια που παίζουν καθοριστικό ρόλο στη συμπεριφορά σε σχέση με την εύρεση ξενιστή για τη λήψη αίματος [22].

Η τρισδιάστατη δομή της AgamOBP1 επιλύθηκε με τη βοήθεια πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ σε ευκρίνεια 1,5 Å (Εικόνα 14). Η πρωτεΐνη κρυσταλλώθηκε ως διμερές και το υδρόφοβο κέντρο σύνδεσης βρέθηκε να επεκτείνεται και στα δύο μόρια. Επίσης στο κέντρο σύνδεσης εντοπίστηκε ένας προσδέτης, ο οποίος αργότερα αναγνωρίστηκε ως ένα μόριο PEG και βρισκόταν σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

μεγάλες συγκεντρώσεις στη συνθήκη κρυστάλλωσης. Εξαιτίας περιορισμένου αριθμού υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στη μεσεπιφάνεια, θεωρείται πως η πρωτεΐνη υφίσταται κυρίως ως μονομερές *in vivo*. Πιθανώς, όταν βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στη λέμφο να υφίσταται σε ισορροπία διμερούς και μονομερούς. Υπάρχει μία υπόθεση, η οποία υποστηρίζει ότι στην πρωτεΐνη μπορεί να συνδέονται περισσότεροι από ένας προσδέτης. Αυτό το συμπέρασμα προκύπτει λόγω του μεγέθους του κέντρου σύνδεσης. Έχει προταθεί ένα μοντέλο απελευθέρωσης του προσδέτη, το οποίο προτείνει πως η διαμόρφωση της πρωτεΐνης εξαρτάται από το pH [44].

1.6.5.2 AgamOBP5

Η πρωτεΐνη OBP5 του κουνουπιού *Anopheles gambiae* (AgamOBP5), είναι μία νέα πρωτεΐνη και αποτελεί στόχο μονοτερπενίων, γνωστών φυσικών εντομοαπωθητικών. Η αμινοξική αλληλουχία της OBP5, εμφανίζει μεγάλη ομολογία με την αλληλουχία της πρωτεΐνης OBP4, του κουνουπιού *Anopheles gambiae,* σε ποσοστό 53% [45, 46]. Τα επίπεδα έκφρασης αρκετών OBP, συμπεριλαμβανομένης και της AgamOBP5, μελετήθηκαν από τους Biesmann et al. 2005. Βρέθηκε πως στις κεραίες των αρσενικών κουνουπιών, η OBP5, εκφράζεται περίπου 2,5 φορές περισσότερο σε σχέση με τις κεραίες των θηλυκών. Όταν, όμως, εξετάστηκε η έκφραση της πρωτεΐνης στο κεφάλι βρέθηκε πως ήταν μεγαλύτερη στο κεφάλι των θηλυκών κουνουπιών. Επίσης ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης στα θηλυκά κουνούπια, 24 ώρες μετά τη λήψη γεύματος αίματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως, η έκφραση μειώνεται περίπου 2 φορές [30]. Επίσης η έκφραση της πρωτεΐνης έχει βρεθεί πως εξαρτάται από τις συνθήκες φωτισμού. Πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα έκφρασής της αυξάνονται κατά την εναλλαγή ημέρας και νύχτας. Το μέγιστο επίπεδο έκφρασης εμφανίζεται αρχικά 3 περίπου ώρες πριν νυχτώσει και επανεμφανίζεται την ώρα που ξημερώνει [47].

2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αντιδραστήρια

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Tryptone enzymatic digest from casein	Fluka
Yeast extract	Fluka
Agar bacteriological	Oxoid Ltd.
IPTG	Sigma
L-Glutathione reduced (GSH)	Sigma
L-Glutathione oxidized (GSSG)	Sigma
Tetracycline (Tet)	Sigma
Ampicillin Sodium Salt (Amp)	Sigma
Carbenicilline (Crb)	Sigma
Kanamycine (Kan)	Sigma
Phenylmethylsulfonyl-fluoride (PMSF)	Serva
Protease inhibitors cocktail tablets	Roche
30% (w/v) Acrylamide/Bis Solution 29:1	Bio-Rad

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

Ammonium persulfate for electrophoresis (APS)	Bio-Rad
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma
Glycine for electrophoresis	Sigma
TEMED	Sigma
Βουτανόλη	Sigma
Brilliant blue R	Sigma
Glycerol	Serva
Benzonase Nuclease	Sigma
Tris(hydroxymethyl)-aminomethane	Sigma
EDTA	Serva
Χλωριούχο Νάτριο (NaCl)	Sigma
Υδροχλωρική γουανιδίνη (GdnHCl)	Serva
L-Arginine	Serva
Triton X-100	Sigma
Sodium Acetate	Serva
Ethanol Absolute	Sigma
Acetic acid	Sigma
Hydrochloric Acid (HCl)	Sigma
Sodium hydroxide (NaOH)	Sigma
1-NPN	Sigma

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

2.2 Βακτηριακά Στελέχη και Πλασμίδια

ΚΥΤΤΑΡΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Κύτταρα *E. coli* Origami B **(**DE**3)**	Novagen

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Πλασμίδιο pET22b(+)	Novagen

2.3 Οργανολογία

ΟΡΓΑΝΟ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Πιπέτες ακριβείας	Gilson
Αναδευόμενος επωαστήρας ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας	JFL 3033
Αναδευόμενος επωαστήρας ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας	Labtech
Φυγόκεντρος K280R	Centurion Scientific Ltd.
Φυγόκεντρος Kubota 7780	
Υπερφυγόκεντρος Oprima LE-80K	Beckman-Couler
Ομογενοποιητής	Heidolph
Συσκευή υπερήχων	
Πεχάμετρο	MetrOhm
Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών	Bio-Rad
Φασματοφωτόμετρο Novaspec II	Pharmacia Biotech
Θερμοστατούμενο φασματοφωτόμετρο Cary 100 Conc UV/Vis	Varian
Θερμοστατούμενο φθορισμόμετρο VarioScan UV/Vis	Thermo Scientific
Σύστημα χρωματογραφίας Acta purifier	GE Healthcare
Κασέτα συμπύκνωσης Pellicon XL	Millipore
Μικροπλάκες 384 θέσεων	Thermo Scientific
Φίλτρα διήθησης 0,22μm	Millipore
Φίλτρα συμπίκνωσης 10MWCO	Sartorius-Stedim
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma
Αποστειρωμένα Eppendorf	Corning
Αποστειρωμένα falcon	Corning
Αποστειρωμένα τριβλία	Corning
Αποστειρωμένα σιφώνια	Corning
Δοκιμαστικοί σωλήνες (10mL)	
Κωνικές φιάλες για κυτταροκαλλιέργειες (250 mL, 2 L)	

2.4 Στήλες υγρής χρωματογραφίας

ΣΤΗΛΕΣ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
HiTrap Q FF 5mL	GE Healthcare

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

Resource Q (1mL, 6mL)	GE Healthcare
Resource S (1mL)	GE Healthcare

ΣΤΗΛΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Superdex 75	GE Healthcare

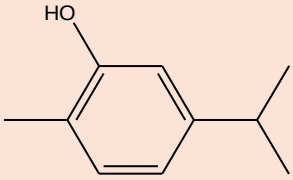
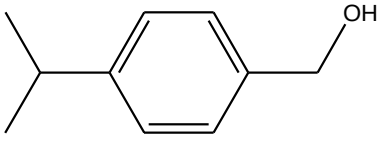
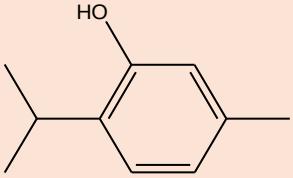
2.5 Επιλογή φυτικών ειδών που περιέχουν μόρια με εντομοαπωθητικές ιδιότητες

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε έρευνα βάσης Ελληνικών Αρωματικών Φυτών, με σκοπό την επιλογή φυτικών ειδών για περαιτέρω μελέτη.

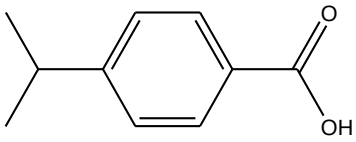
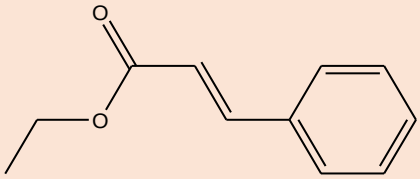
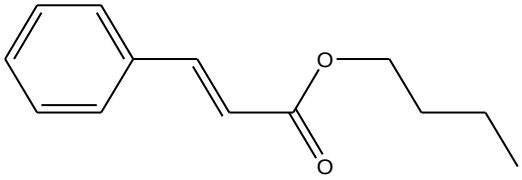
Ως όρος αναζήτησης (Query) χρησιμοποιήθηκε ένας αριθμός ενώσεων που σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες διαθέτουν εντομοαπωθητική δράση ή/και αλληλεπίδραση με OBPs του κώνωπα *A. gambiae*. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Krober et al.,2018 και Thireou et al., 2018, τα αιθέρια έλαια ορισμένων αρωματικών φυτών έχουν τη δυνατότητα να απωθούν τα θηλυκά κουνούπια *Anopheles gambiae*. Η συγκεκριμένη ικανότητα αποδίδεται στη σύστασή τους, καθώς βρέθηκε πως περιλαμβάνουν χημικές ενώσεις οι οποίες έχουν εντομοαπωθητική δράση. Στον Πίνακα 1 εμφανίζονται έξι από τις δραστικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως όρος αναζήτησης.[48, 49]

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν ως όρος αναζήτησης τέσσερις ενώσεις που έχουν αναφερθεί προηγουμένως να αλληλοεπιδρούν με OBPs του *A. gambie* (Διπλωματική Εργασία Ε. Δήμα, ΕΚΠΑ 2014). [50]. (Πίνακας 2)

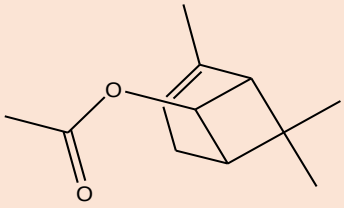
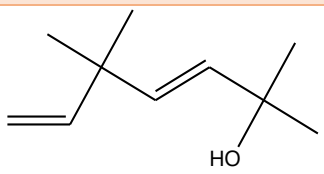
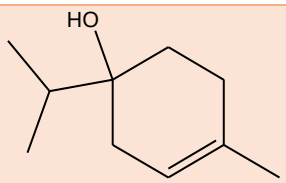
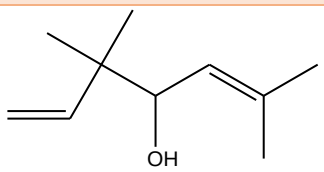
Πίνακας 1: Ονομασία και δομή χημικών ενώσεων *[48, 49]*.

Χημική Ουσία	Δομή
Carvacrol	
Cumin alcohol	
Thymol	

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

Cuminic acid	
Ethyl cinnamate	
Butyl cinnamate	

Πίνακας 2: Ονομασία και δομή χημικών ενώσεων [50].

Χημική Ουσία	Δομή
Chrysanthenyl acetate	
Yomogi alcohol	
Terpinen-4-ol	
Artemisia alcohol	

Η αναζήτηση πραγματοποιήθηκε στη βάση δεδομένων AromaBase _20140625 των Kantsa et al.,2013 , η οποία περιλαμβάνει τη χημική σύσταση των πτητικών μιγμάτων από φυτά που συλλέχθηκαν στην Ελλάδα κατά τη διάρκεια των ετών 1988-2013, καθώς και την οικογένεια, το είδος, τον γεωγραφικό προσδιορισμό και την αντίστοιχη βιβλιογραφία [51]. Βρέθηκε αριθμός φυτών τα οποία περιλάμβαναν τουλάχιστον μία

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

ή περισσότερες από τις παραπάνω ενώσεις, εκ των οποίων επιλέχθηκαν έξι για περαιτέρω μελέτη με βάση το πλήθος και την περιεκτικότητα των επιλεγμένων δραστικών (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Παρουσιάζεται η οικογένεια, το είδος και η κοινή ονομασία των επιλεγμένων φυτών [51].

Οικογένεια	Είδος	Κοινή Ονομασία
Asterceae	*QFytoTera-Ken761*[1]	-
Lamiaceae	*Mentha spicata*	Δυόσμος
Lamiaceae	*Origanum vulgare*	Ρίγανη
Lamiaceae	*Melissa officinalis*	Μελισσόχορτο
Lamiaceae	*Lavandula angustifolia*	Λεβάντα
Lamiaceae	*Hybrid Lavandula intermedia*	Λεβαντίνη

[1] το αιθέριο έλαιο του φυτού βρίσκεται σε διαδικασία κατοχύρωσης ευρεσιτεχνίας για την χρήση του

Σύμφωνα με την χημική ανάλυση του αιθέριου ελαίου του φυτού της οικογένειας *Asterceae (QFytoTera-Ken761)*, με προέλευση από την περιοχή του Ολύμπου, αυτό περιλαμβάνει αρκετές δραστικές ουσίες με εντομοαπωθητική δράση. Πιο συγκεκριμένα μεταξύ άλλων βρίσκονται και οι ενώσεις chrysanthenyl acetate, 4-terpineol, artemisia alcohol, carvacrol, linalool, p-cymene, thymol, γ-terpinene. Επίσης, το φυτό *Mentha spicata* ή δυόσμος, από την περιοχή της Ρητίνης Πιερίας και μεταξύ άλλων ενώσεων περιλαμβάνει τις ενώσεις methyl cinnamate, 4-terpineol, linalool, carvacrol, p-cymene, γ-terpinene. Μεταξύ των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στο φυτό *Melissa officinalis* ή μελισσόχορτο από την περιοχή Αμπελάκια Λάρισας περιλαμβάνονται οι methyl cinnamate, carvacrol, linalool, p-cymene και γ-terpinene [52]. Το αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare,* από την Θεσσαλία, περιλαμβάνει ως κύρια συστατικά carvacrol, p-cymene, thymol και γ-terpinene. Επιπλέον το αιθέριο έλαιο από το φυτό *Lavandula angustifolia* ή λεβάντα, από την περιοχή της Θεσσαλίας, περιέχει ως κύρια συστατικά linalyl-acetate, terpinen-4-ol, lavandulyl acetate. Τέλος το αιθέριο έλαιο της λεβαντίνης (*Hybrid Lavandula intermedia*), επίσης από καλλιέργειες της Θεσσαλίας, περιλαμβάνεις τις χημικές ενώσεις linalyl acetate, 1,8 cineol, limonene, p-cymene.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αναζήτηση αιθέριων ελαίων Ελληνικής καλλιέργειας από τα παραπάνω φυτά με προαπαιτούμενο την διαθεσιμότητα της πλήρους χημικής ανάλυσης ώστε να είναι δυνατή (α) η εγγυημένη σύσταση (χημειότυπος) σε ένα τελικό εντομοαπωθητικό προϊόν (β) η προσδιορισμός της περιεκτικότητας αλλεργιογόνων, τοξικών και εν γένει ενώσεων που περιορίζονται από τις Ευρωπαϊκές Οδηγίες ασφαλείας για την χρήση τους στο δέρμα και (γ) η ταυτοποίηση σε επόμενο στάδιο των ενώσεων που αλληλοεπιδρούν με τις OBPs.

Με εξαίρεση το αιθέριο έλαιο του δυόσμου (*Mentha Spicata*) το οποίο είναι Κινεζικής προέλευσης, καθώς δεν κατέστη δυνατή η προμήθεια Ελληνικού δείγματος

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

που να συνοδεύεται από εγγυημένο χημειότυπο, τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, παράχθηκαν από φυτά που φύονται σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Συγκεκριμένα, τα αιθέρια έλαια μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*), λεβάντα (Lavender essential oil), ρίγανη (Oregano essential oil) και λεβαντίνη (Lavandin essential oil) παρασκευάζονται από βιολογικές καλλιέργειες στη Θεσσαλία. Το αιθέριο έλαιο QFytoTera-Ken761 (Organic essential oil) παρασκευάζεται από καλλιέργειες φυτών στο Πήλιο.

2.6 Προσδιορισμός τελικής συγκέντρωσης σε προϊόντα δέρματος για συμμόρφωση με τους Ευρωπαϊκούς κανονισμούς ασφαλείας

Έπειτα από την προμήθεια των παραπάνω αιθέριων ελαίων πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της σύστασης των αιθέριων ελαίων ως προς την συμμόρφωση τους κατά IFRA (International Fragrance Association). Τα πρότυπα IFRA για το τελικό σημείο ευαισθητοποίησης δέρματος περιλαμβάνουν 12 κατηγορίες IFRA [https://ifrafragrance.org/safe-use/code-of-practice-new]. Οι κατηγορίες που βασίζονται στα πρότυπα συστημικής τοξικότητας έχουν περαιτέρω οδηγήσει σε υποκατηγοριοποίηση των κατηγοριών 5 και 10, οδηγώντας σε συνολικά 16 Κατηγορίες IFRA για συστημική τοξικότητα. Επίσης, τα επιτρεπτά όρια εξαρτώνται από τον τρόπο χρήσης και διακρίνονται σε προϊόντα Έκπλυσης (Rinse-off) και Απορροφώμενα (Leave-on). Οι κατηγορίες που ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία και αφορούν δερματική ευαισθητοποίηση και συστηματική τοξικότητα είναι οι παρακάτω :

- Κατηγορία 4: Προϊόντα που σχετίζονται με το άρωμα
- Κατηγορία 5: Προϊόντα που εφαρμόζονται στο πρόσωπο και το σώμα χρησιμοποιώντας τα χέρια (παλάμες), κυρίως απορροφώμενα
  - ✓ Υποκατηγορία 5a: Προϊόντα λοσιόν σώματος που εφαρμόζονται στο σώμα χρησιμοποιώντας τα χέρια (παλάμες), κυρίως απορροφώμενα
  - ✓ Υποκατηγορία 5b : Προϊόντα ενυδάτωσης προσώπου που εφαρμόζονται στο πρόσωπο χρησιμοποιώντας τα χέρια (παλάμες), κυρίως απορροφώμενα
  - ✓ Υποκατηγορία 5c: Προϊόντα κρέμας χεριών που εφαρμόζονται στα χέρια χρησιμοποιώντας τις παλάμες, κυρίως απορροφώμενα
  - ✓ Υποκατηγορία 5d: Κρέμες για βρέφη, λιπαντικά για μωρά και ταλκ για μωρά

Επιπλέον ελέγχθηκε η ύπαρξη συχνά απαντώμενων σε αιθέρια έλαια αλλεργιογόνων ενώσεων (Πίνακας 4).

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αναζήτηση των αλλεργιογόνων του πίνακα 4 στη σύσταση των υπό εξέταση αιθέριων ελαίων. Εν συνέχεια ακολούθησε αναζήτηση των υπόλοιπων συστατικών τους, με σκοπό την εύρεση των ανωτέρων επιτρεπτών ορίων τους σε απορροφούμενα δερματικά προϊόντα (Leave-on). Η συγκεκριμένη αναζήτηση πραγματοποιήθηκε (α) με βάση το συνοδευτικό φύλλο συμμόρφωσης κατά IFRA (αιθέριο έλαιο του δυόσμου) και (β) τη βάση δεδομένων «The Good Scents Company

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

Information System» (http://www.thegoodscentscompany.com/index.html). Με βάση τα επιτρεπτά όρια κάθε συστατικού υπολογίστηκε η ανώτερη % περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου που μπορεί να προστεθεί σε ένα απορροφούμενο δερματικό προϊόν, ώστε κανένα από τα επιμέρους συστατικά να μην υπερβαίνει τα επιτρεπτά όρια (Πίνακας 5).

Πίνακας 4: *Λίστα αλλεργιογόνων χημικών ενώσεων*

Χημική Ένωση
Linalool
Limonene
Citral
Eugenol
Geraniol
Benzyl Benzonate
Coumarine
Benzaldehyde
Carvone
1-octen-3yl-acetate
Trans-2-hexenal
7-methoxycoumarin
Citronellol
Farnesol
Methyl eugenol
Furfural

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

***Πίνακας 5*: Υπολογισμός της επιτρεπόμενης ποσότητας αιθέριων ελαίων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί, με βάση τους Ευρωπαϊκούς κανόνες ασφαλείας.**

Αιθέριο Έλαιο	Επιτρεπτά όρια (% v/v)				Σύσταση Περιοριστικού Παράγοντα σε Έλαιο 100%	Επιτρεπτά όρια Περιοριστικού Παράγοντα σε προϊόντα κατηγορίας 4 και 5			
Ρίγανη (*Origanum vulgare* essential oil)	≤ 2,1				**Carvacrol** 76,6%	4% Για χρήση σε αρώματα			
Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis* essential oil)	≤ 3,3 Κατηγορία 4		≤ 1,6 Κατηγορία 5		**Geranial** 18,4%	0,6% Κατηγορία 4		0,3% Κατηγορία 5	
Λεβάντα (*Lavandula angustifolia* essential oil)	≤ 0,6				**Terpinen-4-ol** 6,76%	0,043% Για χρήση σε καλλυντικά προϊόντα			
Λεβαντίνη (*Hybrid Lavandula intermedia* essential oil)	≤ 2,3				**Terpinen-4-ol** 1,94%	0,043% Για χρήση σε καλλυντικά προϊόντα			
Sample: **QFytoTera-Ken761**[1] (Organic essential oil)	≤13,2 Κατ. 5_A	≤ 4,44 Κατ. 5_B	≤2,22 Κατ. 5_C	≤ 0,74 Κατ. 5_D	**β-thujone** 0,72%	0,095% Κατ. 5_A	0,032% Κατ. 5_B	0,016% Κατ. 5_C	0,0053% Κατ. 5_D
Δυόσμος[2] (*Mentha spicata* essential oil)	≤ 1,85 Κατηγορία 4		≤ 0,92 Κατηγορία 5		**Limonene** ≤18% **Carvone** ≤65%	1,85% Κατηγορία 4		0,92% Κατηγορία 5	

[1]**Το αιθέριο έλαιο βρίσκεται σε διαδικασία κατοχύρωσης διπλώματος ευρεσιτεχνίας για την χρήση του**

[21]**Αιθέριο έλαιο Δυόσμου Κινεζικής προέλευσης. Τα ανώτερα ποσοστά ορίζονται στο συνοδευτικό φύλλο συμμόρφωσης κατά IFRA48**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

2.7 Βακτηριακά στελέχη *E.coli*

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli (E.coli)* Origami B (DE3). Τα συγκεκριμένα στελέχη προέρχονται από μία μετάλλαξη του γονιδίου lacZY των κυττάρων BL21 που δίνει τη δυνατότητα ακριβή ελέγχου των επιπέδων έκφρασης των κυττάρων με τη χρήση της επαγωγικής ένωσης IPTG. Τα συγκεκριμένα στελέχη εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά καναμυκίνη και τετρακυκλίνη. Επιπλέον διαθέτουν μεταλλάξεις στα γονίδια trxB και gor, οι οποίες συνεισφέρουν στη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών στο κυτταρόπλασμα. Τέλος διαθέτουν μετάλλαξη στα γονίδια lon και ompT, αυξάνοντας τη σταθερότητα των παραγόμενων πρωτεϊνών [53].

Τα στελέχη είναι μετασχηματισμένα με τον πλασμιδιακό φορέα pET-22b(+), το οποίο περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλλίνη [54].

2.8 Χρωματογραφία

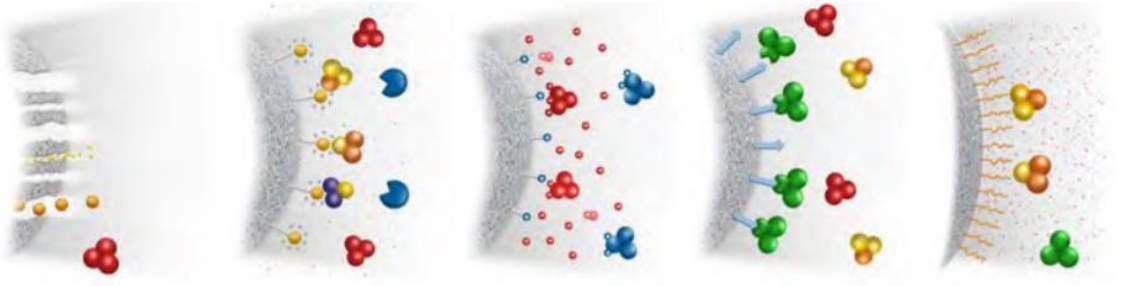
Η χρωματογραφία είναι μία μέθοδος διαχωρισμού μορίων. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη κατανομή των ενώσεων, που βρίσκονται στο υπό μελέτη δείγμα, ανάλογα των ιδιοτήτων τους μεταξύ δύο φάσεων, μιας κινητής και μιας στατικής. Η στατική φάση μπορεί να βρίσκεται είτε σε στερεή, είτε σε υγρή μορφή ακινητοποιημένη σε ένα στερεό υπόστρωμα. Η κινητή φάση, μπορεί να βρίσκεται είτε σε υγρή, είτε σε αέρια μορφή και κινείται κατά μήκος της στατικής φάσης. Ο διαχωρισμός των ενώσεων στηρίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με τη στατική φάση. Συνήθως χρησιμοποιούνται μόρια τα οποία συνδέονται στη στατική φάση και προσδένουν με εκλεκτικό και αναστρέψιμο τρόπο συγκεκριμένες ενώσεις [55].

Υπάρχουν διάφορα είδη χρωματογραφίας, τα οποία διακρίνονται με βάση τη μορφή της στατικής και της κινούμενης φάσης και με βάση των ιδιοτήτων που έχουν τα μόρια των δειγμάτων. Με αυτόν τον τρόπο διακρίνεται σε υγρή ή αέρια χρωματογραφία, με βάση τη φύση της κινούμενης και της στατικής φάσης, και σε χρωματογραφία στήλης, λεπτής στιβάδας και χαρτοχρωματογραφία, ανάλογα με το υλικό συγκράτησης της στατικής φάσης [55].

2.8.1 Υγρή Χρωματογραφία

Η πιο κοινά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών, είναι η υγρή χρωματογραφία στήλης. Ο διαχωρισμός των ενώσεων με τη χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου, επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση του δείγματος σε μία στήλη, στην οποία το πληρωτικό υλικό είναι μία στερεή στατική φάση, που διαπερνάται από μία υγρή κινητή φάση ύστερα από άσκηση πίεσης (FPLC). Η υγρή χρωματογραφία στήλης διαθέτει ποικίλες μεθόδους, ανάλογα με το πληρωτικό υλικό και την αρχή διαχωρισμού. Οι κυριότερες από αυτές είναι η χρωματογραφία μοριακής διήθησης, η χρωματογραφία υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων, η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, η χρωματογραφία συγγένειας και η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης [56].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

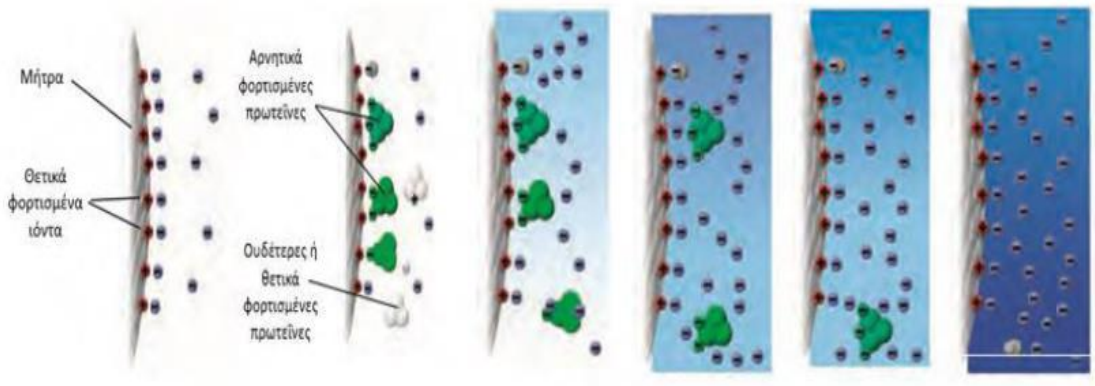


Εικόνα 15: Κύρια είδη υγρής χρωματογραφίας [57].

2.8.1.1 Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής

Η μέθοδος της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής βασίζεται στην έλξη μεταξύ αντίθετα φορτισμένων σωματιδίων. Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν με τη συγκεκριμένη χρωματογραφική μέθοδο, καθώς είναι μόρια που μπορούν να ιονίζονται [55]. Πιο συγκεκριμένα είναι αμφοτερικά μόρια, δηλαδή όταν η τιμή του pH είναι ίση με το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI), τότε είναι ουδέτερα φορτισμένες. Σε τιμή pH μεγαλύτερη από το pI είναι αρνητικά φορτισμένες και μπορούν να συνδεθούν σε υλικό που είναι θετικά φορτισμένο (ανιοανταλλάκτης), ενώ σε μικρότερη τιμή είναι θετικά φορτισμένες και προσδένονται σε αρνητικά φορτισμένα σφαιρίδια (κατιοανταλλάκτης). Αφού πραγματοποιηθεί εξισορρόπηση της στήλης, με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα γίνεται εισαγωγή του δείγματος, όπου ανάλογα με την τιμή του pH του ρυθμιστικού διαλύματος η πρωτεΐνη επιλογής είναι κατάλληλα φορτισμένη ώστε να προσδεθεί στο υλικό της στατικής φάσης. Στη συνέχεια γίνεται πλύση της στήλης για την απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων μορίων. Η πρωτεΐνη εκλούεται με την αύξηση της αλατότητας, καθώς τα μόρια του άλατος συναγωνίζονται τα πρωτεϊνικά μόρια για τη σύνδεση στη στήλη. Ακολουθεί καθαρισμός της στήλης με διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος και τέλος γίνεται εξισορρόπηση στο αρχικό διάλυμα για εκ νέου χρήση [57].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



Εικόνα 16: Παράδειγμα απομόνωσης μιας αρνητικά φορτισμένης πρωτεΐνης.[57]

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι στήλες HiTrap Q FF, Resource Q και Resource S.

Η HiTrap Q διαθέτει θετικά φορτισμένη στατική φάση και συγκαταλέγεται στους ισχυρούς ανιοανταλλάκτες. Το εύρος pH είναι μεταξύ 2-12 και το όριο δέσμευσης της στήλης των 5 mL, είναι για μεγάλα μόρια 15 mg (thyroglobulin), για μεσαίου μεγέθους μόρια 600 mg (HSA) και για μικρά μόρια 550 mg (a-lactalbumin).

Η Resource Q διαθέτει στη στατική της φάση θετικά φορτισμένο υλικό και είναι ισχυρά ανιοανταλλακτική στήλη. Το όριο δέσμευσης είναι 45 mg (BSA) για τη στήλη του 1 mL και 270 mg (BSA) για τη στήλη των 6 mL, ενώ το εύρος του pH είναι 2-12. Η Resource S διαθέτει αρνητικά φορτισμένο υλικό και ανήκει στην κατηγορία των ισχυρών κατιοανταλλακτών. Το όριο δέσμευσης είναι 45 mg (BSA) για τη στήλη του 1 mL και 270 mg (BSA) για τη στήλη των 6 mL, ενώ το εύρος του pH είναι 2-12. Οι στήλες Resource Q και Resource S διαθέτουν σωματίδια μικρότερου μεγέθους εν συγκρίσει με τα σωματίδια της στήλης HiTrap (15μm έναντι 90μm), με αποτέλεσμα να προσφέρουν μεγαλύτερη ευκρίνεια στον καθαρισμό των πρωτεϊνών [57].

2.8.1.2 Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης

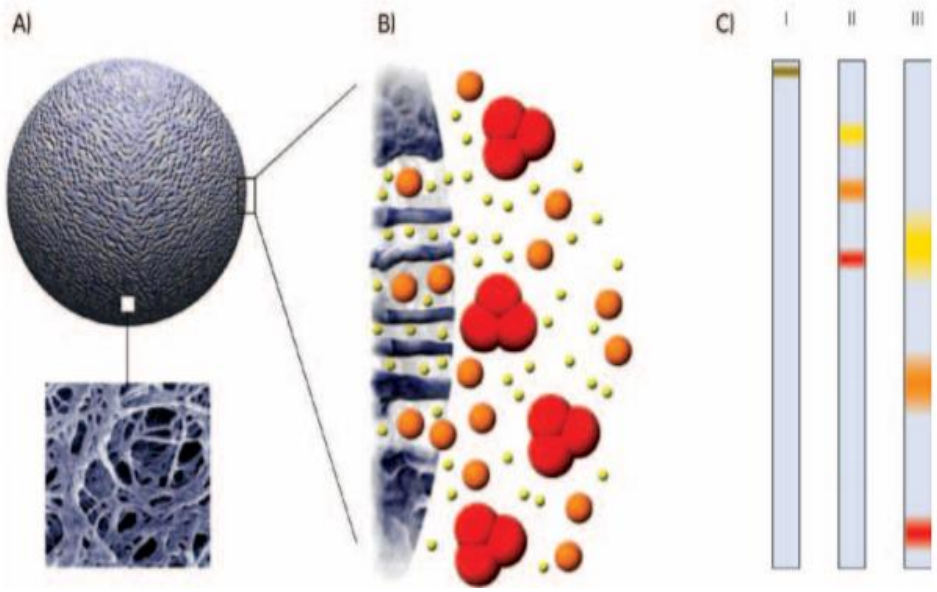
Ο διαχωρισμός των ενώσεων με τη χρήση χρωματογραφίας μοριακής διήθησης στηρίζεται στο μέγεθος των αναλυόμενων μορίων, οπότε ο διαχωρισμός λαμβάνει χώρα με βάση το μοριακό τους βάρος. Το υλικό πλήρωσης αποτελείται από κόκκους με οπές συγκεκριμένου μεγέθους, οι οποίες δημιουργούν μία δαιδαλώδη διαδρομή μέσα από τον οποίο πρέπει να διέρθουν όλα τα συστατικά του υπό εξέταση δείγματος. Τα μόρια εκλούονται κατά τάξεις μεγέθους ως εξής:

- Τα μεγάλα μόρια δεν μπορούν να εισέλθουν στους πόρους της πηκτής και εκλούονται πρώτα
- Τα μικρότερα μόρια εισέρχονται σε διαφορετικά ποσοστά στους πόρους, δηλαδή κατανέμονται μεταξύ του όγκου του υγρού εντός και εκτός των πόρων και εκλούονται κατά τάξεις μεγέθους

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

- Τα πολύ μικρά μόρια εισέρχονται εξ ολοκλήρου μέσα στους πόρους και εκλούονται με μεγάλες ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος.

Η διαδικασία ξεκινά με την εξισορρόπηση της στήλης, η οποία πραγματοποιείται με το διάλυμα έκλουσης. Ακολουθεί η εφαρμογή του πρωτεϊνικού δείγματος και έκλουση των κλασμάτων με τουλάχιστον έναν όγκο στήλης (CV). Στο τέλος της διαδικασίας γίνεται επανα-εξισορρόπηση της στήλης, σε κατάλληλο διάλυμα αποθήκευσης μέχρι την επόμενη χρήση [58].



Εικόνα 17: Α) Σχηματική απεικόνιση της δομής των κόκκων που βρίσκονται στο υλικό πλήρωσης της στήλης. Β) Φαίνεται ο τρόπος με τον οποίο το δείγμα θα διασχίσει τη στήλη. Τα μεγάλα μόρια δεν περνάνε μέσα από το υλικό πλήρωσης, τα μεσαία μόρια διέρχονται εν μέρη από το υλικό ανάλογα με το μέγεθος, ενώ τα μικρά διασχίζουν όλη τη διαδρομή της στήλης. C) I. Γίνεται η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη. II. Τα μικρότερα μόρια (κίτρινο) καθυστερούν περισσότερο εν συγκρίσει με τα μεγάλα (κόκκινα). II. Όσο μεγαλύτερη απόσταση διανύσουν τα μόρια (μήκος στήλης), τόσο καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται μεταξύ των πρωτεϊνικών ζωνών [58].

2.9 Ηλεκτροφόρηση Πηκτής πολύ-ακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

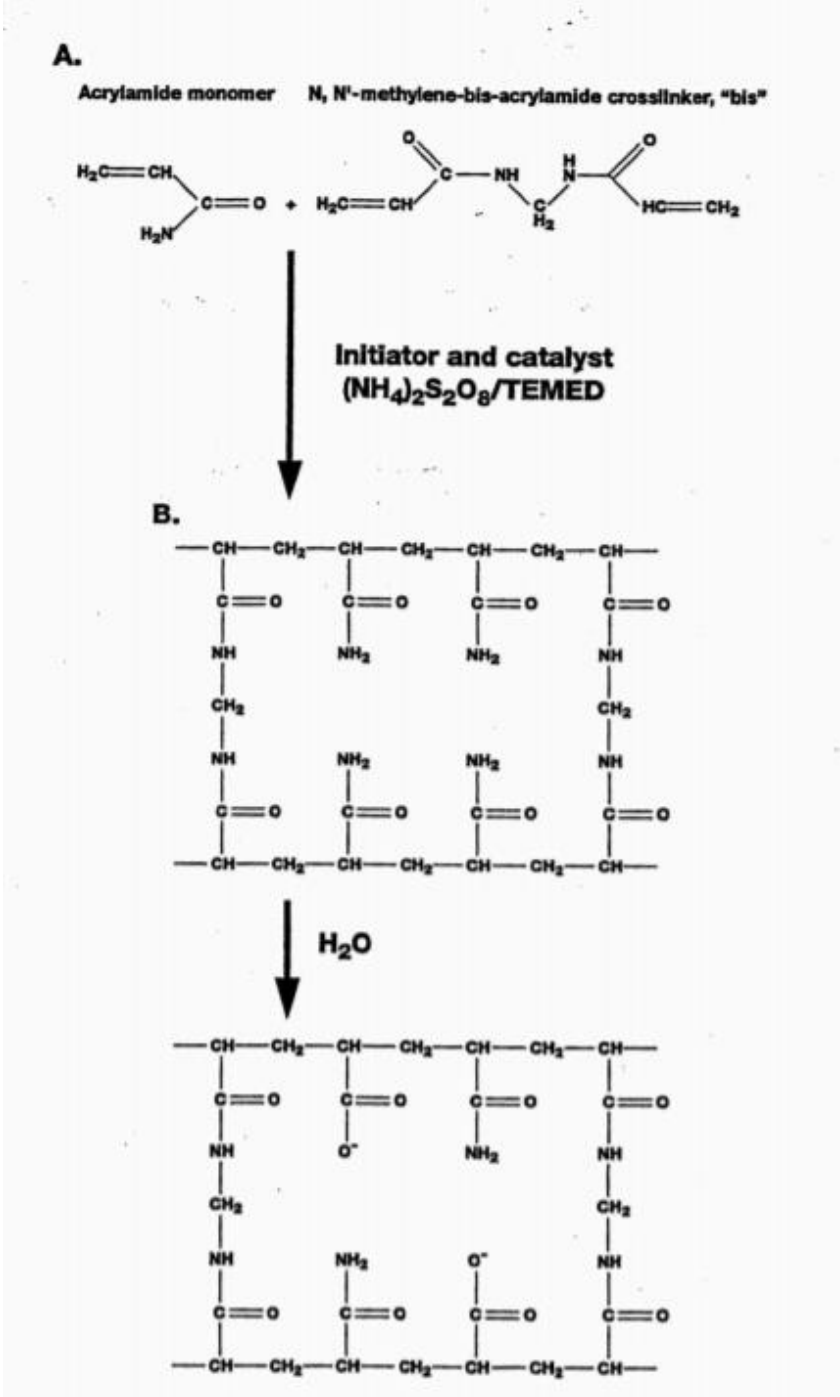
Ηλεκτροφόρηση ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο με καθαρό φορτίο μπορεί να μετακινηθεί διαμέσου ενός ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πηκτή, η οποία λειτουργεί ως μοριακός ηθμός για την επίτευξη του διαχωρισμού. Η ταχύτητα με την οποία μετακινείται η πρωτεΐνη στην πηκτή, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης και το συντελεστή τριβής. Τα μόρια που έχουν μεγάλο μοριακό βάρος δεν μπορούν να μετακινηθούν εύκολα διαμέσου των πόρων της πηκτής, με αποτέλεσμα να παραμένουν σχεδόν ακίνητα. Τα μεσαίου μοριακού βάρους μόρια μετακινούνται με

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

διάφορες ταχύτητες ανάλογα του μεγέθους τους , ενώ τα μικρά μόρια διασχίζουν εύκολα τους πόρους.

Η ηλεκτροφόρηση, πραγματοποιείται επί λεπτού στρώματος πολυακρυλαμιδίου, το οποίο σχηματίζεται με την αντίδραση συμπολιμερισμού ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζονται μακριές αλυσίδες ακρυλαμιδίου, οι οποίες συνδέονται με εγκάρσιες γέφυρες μορίων δις-ακρυλαμιδίου, σχηματίζοντας ένα πήκτωμα με πόρους. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από την αναλογία στην οποία βρίσκονται τα δύο μόρια και από την τελική τους συγκέντρωση. Κατά συνέπεια, η αύξηση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους των πόρων, ενώ η μείωση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου την αύξησή τους. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου που θα χρησιμοποιηθεί, ορίζεται από το μοριακό βάρος των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Στην αντίδραση του συμπολιμερισμού, συμμετέχει το υπερθειϊκό αμμώνιο (APS), το οποίο παρέχει τις απαραίτητες ελεύθερες ρίζες, και το N,N,N',N'-τετραμεθυλο-αιθυλενοδιαμίνη (TEMED), το οποίο καταλύει το σχηματισμό των ελεύθερων ριζών. Η αντίδραση του πολυμερισμού θα πρέπει να γίνεται απουσία O_2, διότι το O_2 δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες που είναι απαραίτητες για την κατάλυση της αντίδρασης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



Εικόνα 18: (Α) Δομή των ενώσεων ακρυλαμίδιο και N,N'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου, τα οποία συμπολιμερίζονται με την προσθήκη των καταλυτών APS και TEMED. (Β) Απεικονίζονται τα πολυμερή που αποτελούν την πηκτή της ηλεκτροφόρησης. Με υδρόλυση του ακρυλαμιδίου, οι ουδέτερες καρβοξυαμιδικές ομάδες υδρολύονται σε φορτισμένα καρβοξύλια.[59]

Στο δείγμα των πρωτεϊνών, που θα πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση, προστίθενται ανιόντα δωδεκάκυλο-θειϊκό νάτριο (SDS), τα οποία προσδίδουν στις πρωτεΐνες αρνητικό φορτίο, καθώς δημιουργούνται σύμπλοκα SDS-πρωτεΐνης. Η ποσότητα SDS που συνδέεται στην πρωτεΐνη είναι σταθερή (ένα μόριο SDS/δύο αμινοξέα) με αποτέλεσμα το συνολικό αρνητικό φορτίο που αποκτά το σύμπλοκο, να είναι ανάλογο με τη μοριακή μάζα της πρωτεΐνης. Το σύμπλοκο κατευθύνεται προς

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

τον θετικά φορτισμένο πόλο και η ταχύτητα, όπως αναφέρθηκε, είναι ανάλογη του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης. Συνήθως για να πραγματοποιηθεί πλήρης αποδιάταξη εκτός από την προσθήκη SDS, γίνεται χρήση αντιδραστηρίων που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως η 2-μερκαπτοαιθανόλη, και πραγματοποιείται θέρμανση στους 100°C.

Η πιο δημοφιλής μέθοδος SDS-PAGE, είναι μια μη συνεχή ηλεκτροφόρηση, στην οποία η πηκτή αποτελείται από δύο μέρη, την πηκτή επιστοίβαξης και την πηκτή διαχωρισμού, τα οποία διαφέρουν ως προς το μέγεθος των πόρων, το pH και την ιοντική ισχύ. Η πηκτή επιστοίβαξης, διαθέτει μεγαλύτερους πόρους και μικρότερο pH. Ο ρόλος της είναι να συσσωρεύει τις πρωτεΐνες σε μία περιοχή ώστε να εισέρχονται στην πηκτή διαχωρισμού ως μια λεπτή ζώνη (μέτωπο), για να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός. Οι πηκτές επιστοίβαξης (stacking gel) και διαχωρισμού (running gel) παρασκευάζονται σε επίπεδη μορφή, με πάχος 0,7 – 2 mm και με διάφορες διαστάσεις. Για την παρασκευή τους, χρησιμοποιούνται γυάλινες πλάκες και ειδικές διαχωριστικές ταινίες. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, παρουσιάζονται στον Πίνακα, και εξαρτώνται από τον αριθμό των πηκτών που θα παρασκευασθούν και από τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πηκτή με συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 15%.

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια για την Παρασκευή πηκτών διαχωρισμού (10 mL) και πηκτών επιστοίβαξης (5 mL)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΗΚΤΗ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ 15%	ΠΗΚΤΗ ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΞΗΣ 5%
H_2O	2,3 mL	3,4 mL
30% Ακρυλαμίδιο	5 mL	0,83 mL
1,5M Tris-HCl (pH: 8,8)	2,5 mL	-
1 M Tris-HCl (pH: 6,8)	-	0,63 mL
10% SDS	100 μL	50 μL
10% APS	100 μL	50 μL
TEMED	4 μL	5 μL

Τα αντιδραστήρια APS και TEMED προστίθενται στο τέλος, πριν τη μεταφορά των διαλυμάτων μεταξύ γυάλινων πλακών, καθώς δίνουν το έναυσμα για τον πολυμερισμό. Πρώτη παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού, τοποθετείται μεταξύ των πλακών, έτσι ώστε να καλύπτει περίπου το 75% και καλύπτεται με βουτανόλη, η οποία δεν επιτρέπει την επαφή της με το O_2. Η βουτανόλη αφαιρείται μόλις ολοκληρωθεί η αντίδραση του πολυμερισμού και τοποθετείται το διάλυμα της πηκτής επιστοίβαξης. Στη συνέχεια εφαρμόζεται πάνω από το διάλυμα επιστοίβαξης μια κατάλληλη πλαστική χτένα για το σχηματισμό των φρεατίων, στα οποία θα γίνει η εισαγωγή των δειγμάτων. Το σύστημα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

περίπου 20 λεπτά, μέχρι να ολοκληρωθεί και ο πολυμερισμός της πηκτής επιστοίβαξης.

Πριν την ηλεκτροφόρηση, τα δείγματα αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα 5X (Sample loading buffer: 0,25 M Tris—HCl (pH:6,8), 10% w/v SDS, 0,25% w/v Brilliant Blue, 0,5M DTT και 50% v/v γλυκερόλη) με αναλογία δείγμα/sample loading buffer ίση με 4/1. Η γλυκερόλη αυξάνει το ειδικό βάρος του δείγματος με σκοπό να παραμένει στο φρεάτιο και η χρωστική Brilliant Blue χρωματίζει το δείγμα για να φαίνεται το μέτωπό κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Έπειτα τα δείγματα θερμαίνονται για 10 λεπτά στους 95°C. Πριν την ηλεκτροφόρηση αφαιρείται το χτενάκι, γίνεται η συναρμολόγηση της συσκευής και τοποθετείται ρυθμιστικό διάλυμα (SDS Running Buffer) με σύσταση 25mM Tris, 250mM γλυκίνη, 0,1% w/v SDS και pH: 8,3. Η χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος γίνεται για να διαβρέχονται οι ελεύθερες επιφάνειες της πηκτής μεταξύ των πλακών και για να σχηματίζεται κλειστό κύκλωμα μετά την εφαρμογή των ηλεκτροδίων. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στα φρεάτια, συνδέονται τα ηλεκτρόδια και εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού 100V. Μόλις τα δείγματα εισέρθουν στην πηκτή διαχωρισμού, τότε η τάση αυξάνεται σε 150V και η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται όταν το μέτωπο των δειγμάτων φτάσει στο τέλος της πηκτής διαχωρισμού.

Για τη εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών στο πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης είναι απαραίτητο το στάδιο της χρώσης του πηκτώματος. Αρχικά το πήκτωμα τοποθετείται σε διάλυμα χρώσης (staining solution) με σύσταση 0,1% w/v Brilliant Blue R-250, 50% μεθανόλη και 5% οξικό οξύ, υπό ήπια ανάδευση για περίπου 20 λεπτά. Στη συνέχεια, μεταφέρεται στο διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining solution) με σύσταση 5% μεθανόλη και 5% οξικό οξύ, υπό ήπια ανάδευση, μέχρι να απομακρυνθεί η μη ειδικά συνδεδεμένη με τις πρωτεΐνες χρωστική. [59]

2.10 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

2.10.1 Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford, αποτελεί μία σύντομη μέθοδο για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων. Ο προσδιορισμός βασίζεται στη χρήση της χρωστικής Coomasie Brilliant Blue R και συγκεκριμένα στο εύρος τιμών της απορρόφησής της. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο έχει ερυθρό χρώμα, το οποίο όταν προσδένεται με πρωτεΐνη αποκτά μπλε χρώμα. Η μεταβολή του χρώματος, οφείλεται σε μία αντίδραση που πραγματοποιείται κατά το σχηματισμό του συμπλόκου χρωστική-πρωτεΐνη. Πιο συγκεκριμένα, η χρωστική αντιδρά με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, μεταφέροντας στις ιονίζουσες ομάδες ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο, προκαλώντας την αποδιάταξη της πρωτεΐνης και ως εκ τούτου την έκθεση των υδρόφοβων ομάδων της στον διαλύτη . Οι εκτεθειμένες υδρόφοβες ομάδες, συνδέονται με δεσμούς van der Waals με τα μόρια της χρωστικής, σχηματίζοντας το σύμπλοκο, το οποίο δίνει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm. Οι τιμές τις απορρόφησης, είναι ανάλογες με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα. Απαραίτητο βήμα πριν την εκτέλεση της μεθόδου είναι η εύρεση του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

συντελεστή απορρόφησης (ΣΑ). Ο συντελεστής απορρόφησης προκύπτει από μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η δημιουργία της οποίας γίνεται με τη χρήση πρωτεϊνικών δειγμάτων με γνωστή συγκέντρωση. Συνήθως χρησιμοποιούνται πρωτεϊνικά δείγματα περιέχουν BSA ή λυσοζύμη. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίζεται από την εξής εξίσωση [60]:

$$C\ (\frac{mg}{mL}) = A595\ \cdot \Sigma A\ \cdot \frac{1}{Όγκος\ Δείγματος\ (L)}$$

Για την προετοιμασία των δειγμάτων τοποθετούνται 200μL αντιδραστηρίου Bradford 5X, 780μL H_2O και 20μL δείγματος. Στη συνέχεια γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10 λεπτά και φωτομετρούνται.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι αποτελεί μία ταχεία και ευαίσθητη τεχνική και επιπλέον απαιτεί μικρές ποσότητες πρωτεΐνης. Το βασικό μειονέκτημά της είναι το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες που προέρχονται από διαφορετικές απομονώσεις εμφανίζουν διαφορές στην αντίδραση με τη χρωστική, καθώς μπορεί να υπάρχουν μικρές διαφορές στην αναδίπλωσή τους [55].

2.10.2 Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280nm

Τα αρωματικά αμινοξέα, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη, ιστιδίνη και τυροσίνη, διεγείρονται σε μήκος κύματος 280nm, με αποτέλεσμα να δίνουν απορρόφηση στη συγκεκριμένη περιοχή του υπεριώδους φωτός. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης δίνεται από τον τύπο Beer-Lambert και είναι ανάλογη με την απορρόφηση [56].

$$A280 = e\ \cdot b\ \cdot C$$

Όπου:

A_{280}: η απορρόφηση στα 280nm,
e: ο συντελεστής απορρόφησης (M^{-1} cm^{-1})
b: η οπτική διαδρομή της κυψελίδας (cm)
C: η συγκέντρωση της πρωτεΐνης.

Η μέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιείται σε κυψελίδα χαλαζία, κατάλληλη για μέτρηση σε υπεριώδες φως. Το φασματοφωτόμετρο μηδενίζεται με τη χρήση διαλύματος τυφλού μάρτυρα, το οποίο αποτελείται από το ρυθμιστικό διάλυμα της πρωτεΐνης. Έπειτα προστίθεται 1μL δείγματος το οποίο αραιώνεται με το ρυθμιστικό διάλυμα, σε τελικό όγκο ίσο με τον όγκο χωρητικότητας της κυψελίδας. Τέλος προσδιορίζεται η τιμή απορρόφησης στα 280nm και υπολογίζεται η συγκέντρωση του δείγματος με τη χρήση της εξίσωσης Beer-Lambert.

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, μετά την ολοκλήρωση του καθαρισμού. Τα βασικά πλεονεκτήματα είναι ότι απαιτείται ελάχιστος χρόνος για την προετοιμασία του δείγματος και επίσης δεν καταστρέφεται η πρωτεΐνη. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι δεν είναι αυστηρά ποσοτική μέθοδος, καθώς βασίζεται στην πιθανή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

απορρόφηση των αρωματικών καταλοίπων της πρωτεΐνης. Επίσης οι συντελεστές απορρόφησης των πρωτεϊνών ποικίλουν, και σε περίπτωση που μια πρωτεΐνη δεν περιέχει αρωματικά αμινοξέα απορροφά ασθενώς. Τέλος μπορεί η τιμή της απορρόφησης να υπερεκτιμηθεί λόγω απορρόφησης από μόρια νουκλεϊκών οξέων.[55]

2.11 Απομόνωση και καθαρισμός των πρωτεϊνών AgamOBP1 και AgamOBP5

2.11.1 Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα

Η έκφραση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών σε βακτήρια *Escherichia coli (E.coli)*, είναι η πιο διαδεδομένη και φθηνή μέθοδος παραγωγής πρωτεϊνών. Για την επιτυχή έκφραση πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένοι παράγοντες, οι οποίοι ποικίλουν ανάλογα με την πρωτεΐνη της επιλογής. Σε αυτούς τους παράγοντες συμπεριλαμβάνεται η επιλογή του κατάλληλου φορέα κλωνοποίησης, οι συνθήκες έκφρασης και καθαρισμού και ο τρόπος αποθήκευσης. Πολύ συχνά παρουσιάζονται προβλήματα κατά την έκφραση. Ένα από τα πιο συνηθισμένα προβλήματα είναι η έκφραση των πρωτεϊνών σε σωμάτια εγκλεισμού (Inclusion Bodies, IB). Η πιο πιθανή αιτία δημιουργίας των IB, είναι ότι το περιβάλλον του κυτταροπλάσματος δεν επιτρέπει τη δημιουργία των δισουλφιδικών δεσμών. Ένας τρόπος αντιμετώπισης του προβλήματος αυτού είναι να εκκριθεί η πρωτεΐνη στην περιπλασματική περιοχή, γεγονός όμως που συνοδεύεται από μείωση της παραγωγής [61]. Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα *E.coli* Origami B (DE3), τα οποία μετασχηματίστηκαν με πλασμίδια pET22b(+)-AgammOBP1 και pET22b(+)-AgamOBP5.

2.11.2 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης με επαγωγή

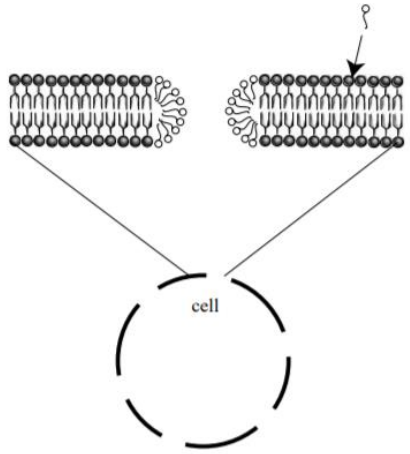
Στο οπερόνιο της λακτόζης ο καταστολέας βρίσκεται συνδεδεμένος στη θέση χειριστή του υποκινητή, παρεμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την μεταγραφή των γονιδίων του οπερονίου. Η αλλολακτόζη, προσδένεται στον καταστολέα, απομακρύνοντάς τον από τον χειριστή και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων. Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκε ο επαγωγέας IPTG, το οποίο είναι ένα ανάλογο της λακτόζης και η λειτουργία του είναι αντίστοιχη με εκείνη της αλλολακτόζης [62].

2.11.3 Λύση βακτηριακών κυττάρων

Με τη λύση των βακτηριακών κυττάρων επιτυγχάνεται η απελευθέρωση των συστατικών που βρίσκονται εντός της κυτταρικής μεμβράνης. Αποτελεί ένα πολύ σημαντικό στάδιο καθαρισμού και επιτυγχάνεται μέσω πολλών διαφορετικών μεθόδων. Κρίσιμο στάδιο είναι η επιλογή μιας ή περισσοτέρων κατάλληλων μεθόδων κυτταρικής λύσης, διότι η επιλογή μιας ακατάλληλης μεθόδου μπορεί να επηρεάσει τόσο τη λειτουργικότητα, όσο και τη δομή των πρωτεϊνών. Οι μέθοδοι βακτηριακής λύσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, είναι οι εξής:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

- Χημική λύση, η οποία περιλαμβάνει τη χρήση ενός διαλύματος που περιέχει ήπια απορρυπαντικά. Το απορρυπαντικό ενσωματώνεται στην κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα να καταστρέφει τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες που τη συγκρατούν, δημιουργώντας πόρους στην επιφάνειά της [63].



Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση της ενσωμάτωσης απορρυπαντικού στην κυτταρική μεμβράνη και τη διάνοιξη των πόρων που προκαλεί [63].

- Ενζυμική λύση, η οποία επιτυγχάνεται με τη χρήση ενζύμων που μπορούν να σπάσουν την κυτταρική μεμβράνη, όπως είναι η λυσοζύμη. Στην παρούσα εργασία έγινε επιπλεόν χρήση της νουκλεάσης βενζονάσης, η οποία αποικοδομεί τα νουκλεϊκά οξέα συμμετέχοντας στη μείωση του ιξώδους του δείγματος[64].
- Ακουστική σπηλαίωση και διάτμηση, με χρήση υπερήχων. Ένας βασικός περιορισμός της συγκεκριμένης τεχνικής είναι ο χρόνος χρήσης των υπέρηχων. Η μεγάλη διάρκεια, προκαλεί έντονη αύξηση της θερμοκρασίας και μπορεί να οδηγήσει σε μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η προτεινόμενη χρήση είναι για 30 δευτερόλεπτα και σε συνδυασμό με την παρουσία μικρής συγκέντρωσης ήπιου απορρυπαντικού [63].

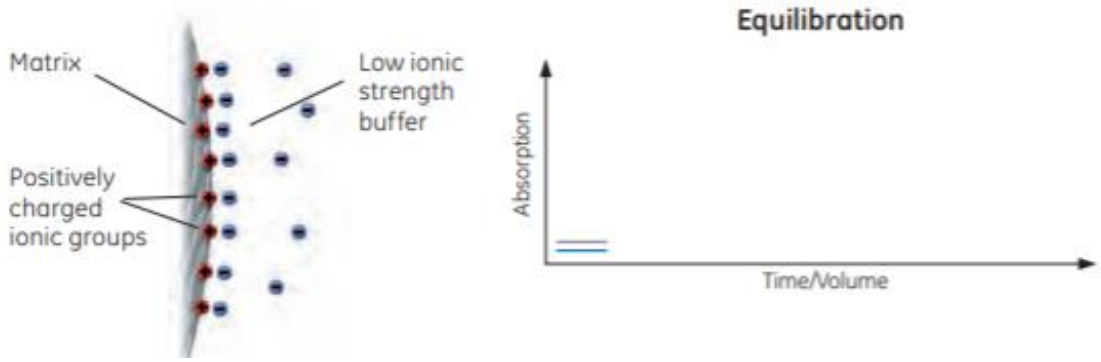
2.11.4 Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Οι στήλες ιοντοανταλλαγής, διαθέτουν σφαιρικά σωματίδια που φέρουν ακινητοποιημένες ιοντικές ομάδες, οι οποίες φορτίζουν τα σωματίδια είτε θετικά είτε αρνητικά. Το εσωτερικό της στήλης είναι πορώδες, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η εσωτερική επιφάνεια. Τα βήματα που ακολουθούνται κατά τη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, είναι τα εξής:

Εξισορρόπηση (Equilibration): Η εξισορρόπηση επιτυγχάνεται με τη χρήση του διαλύματος εξισορρόπησης (equilibration buffer), το οποίο είναι ίδιο με το διάλυμα έκπλυσης (wash buffer) και περιέχει μηδενική ή, συνήθως, μικρή συγκέντρωση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

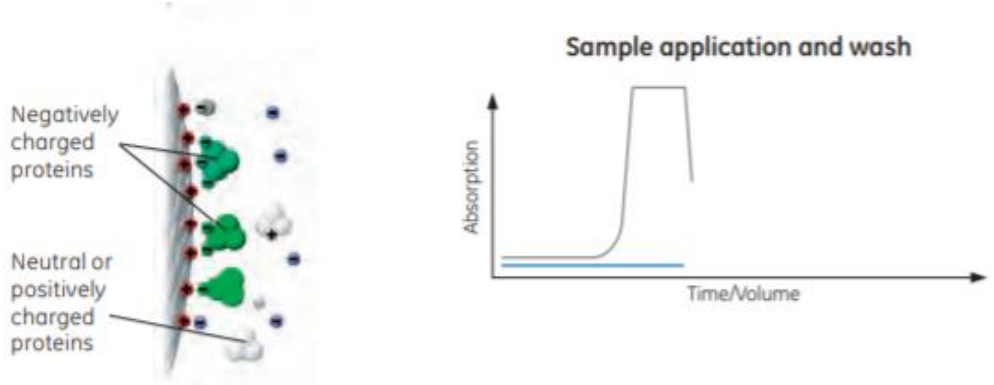
άλατος. Η εισαγωγή του διαλύματος στη στήλη απομακρύνει το διάλυμα αιθανόλης, το οποίο χρησιμοποιείται για την αποθήκευσή της. Το πρωτεϊνικό δείγμα βρίσκεται συνήθως στο ίδιο ή σε παρόμοιο διάλυμα, με σκοπό να υπάρχει ομοιογένεια και να μην πραγματοποιούνται έντονες αλλαγές της ιονικής ισχύος. Κατά το στάδιο της εξισορρόπησης παρατηρείται σταθερή, μικρή τιμή UV, καθώς δεν υπάρχει προσδεμένη πρωτεΐνη στα σφαιρίδια της στήλης [57].



Εικόνα 20: Παράδειγμα εξισορρόπησης ανιοανταλλακτικής στήλης. ΑΡΙΣΤΕΡΑ: Απεικονίζεται το εσωτερικό της στήλης, όπου βρίσκονται τα θετικά φορτισμένα σφαιρίδια και τα μόρια του διαλύματος εξισορρόπησης τα οποία δεν είναι αρκετά ιονισμένα ώστε να προσδεθούν. ΔΕΞΙΑ: Απεικονίζεται το χρωματογράφημα (όγκος ρυθμιστικού/συγκέντρωση άλατος απεικονίζεται με μπλε χρώμα) κατά το συγκεκριμένο στάδιο, όπου η τιμή του UV παραμένει σταθερή (απεικονίζεται ως γκρι γραμμή) [57].

Ένεση δείγματος και έκπλυση (injection and wash): Το δεύτερο στάδιο είναι η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη. Στόχος είναι να συνδεθούν τα επιθυμητά μόρια στα σφαιρίδια, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά να απομακρυνθούν. Για να επιτευχθεί η σύνδεση είναι απαραίτητο το διάλυμα του δείγματος να έχει το ίδιο pH και την ίδια ιοντική ισχύ με το διάλυμα εξισορρόπησης. Με αυτόν τον τρόπο, οι πρωτεΐνες που διαθέτουν αντίθετο φορτίο με εκείνο των σφαιριδίων, προσδένονται με αντιστρεπτό τρόπο στη στήλη. Στη συνέχεια ακολουθεί η έκπλυση της στήλης, με το διάλυμα έκπλυσης (wash buffer), το οποίο ταυτίζεται με το διάλυμα εξισορρόπησης. Σε αυτό το στάδιο όλα τα μη συνδεδεμένα μόρια απομακρύνονται από τη στήλη, με αποτέλεσμα να υπάρχει μια αύξηση της απορρόφησης του UV (Flow through) [57].

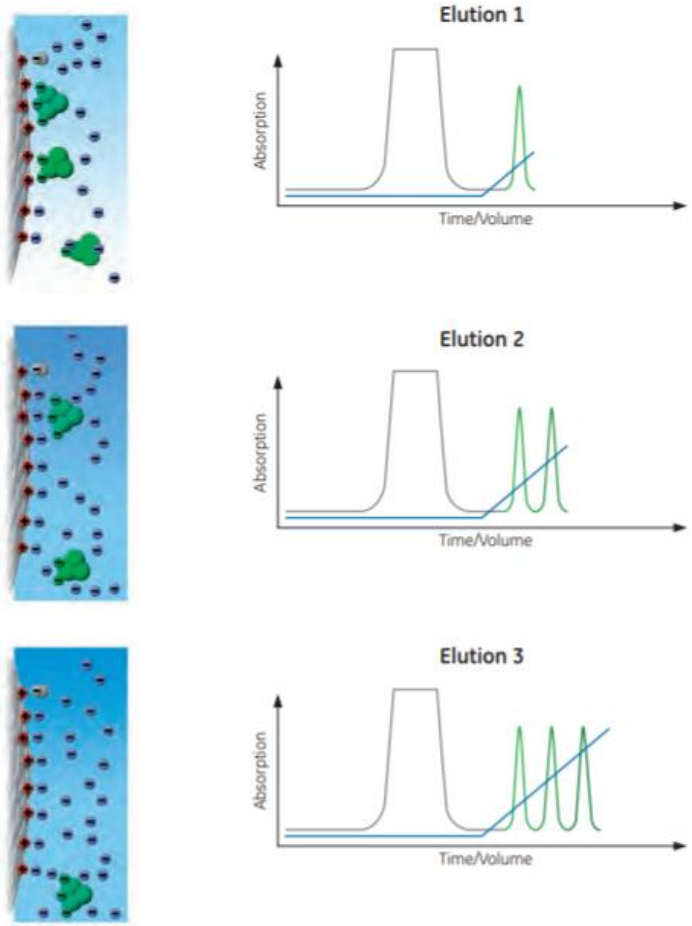
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



Εικόνα 21: *Παράδειγμα εισαγωγής δείγματος και έκπλυσης μιας ανιοανταλλακτικής στήλης. ΑΡΙΣΤΕΡΑ: Απεικονίζεται το εσωτερικό της στήλης, όπου τα αρνητικά φορτισμένα μόρια (πράσινα) προσδένονται στα θετικά φορτισμένα σφαιρίδια (κόκκινα), ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες (λευκά) δεν συνδέονται και απομακρύνονται κατά την έκπλυση. ΔΕΞΙΑ: Απεικονίζεται το χρωματογράφημα στο συγκεκριμένο στάδιο, όπου παρατηρείται αύξηση του UV λόγω της απομάκρυνσης των μη συνδεδεμένων μορίων [57].*

Έκλουση (Elution): Αφού ολοκληρωθεί το στάδιο της έκπλυσης και απομακρυνθούν τα μη ειδικά συνδεδεμένα μόρια, ακολουθεί η έκλουση της στήλης με χρήση του διαλύματος έκλουσης (Elution buffer), το οποίο περιέχει αυξημένη συγκέντρωση άλατος (συνήθως NaCl). Η αύξηση της αλατότητας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος και την απελευθέρωση των συνδεδεμένων μορίων από τη στήλη, καθώς τα μόρια του άλατος ανταγωνίζονται τα συνδεδεμένα μόρια πρωτεϊνών για τη σύνδεση στη στήλη. Τα μόρια με μικρότερο φορτίο εκλούονται πρώτα και ακολουθούν τα μόρια κατά αυξανόμενο φορτίο. Το συγκεκριμένο στάδιο μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους: α) με εφαρμογή διαλύματος έκλουσης με συγκεκριμένη συγκέντρωση άλατος (step elution) ή β) με βαθμιδωτή αύξηση συγκέντρωσης του διαλύματος (Gradient). Το τελικό αποτέλεσμα είναι η έκλουση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών σε κλάσματα αυξανόμενης αλατότητας και προσδιορισμός του κλάσματος που είναι εμπλουτισμένο στη πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος με SDS-PAGE [57].

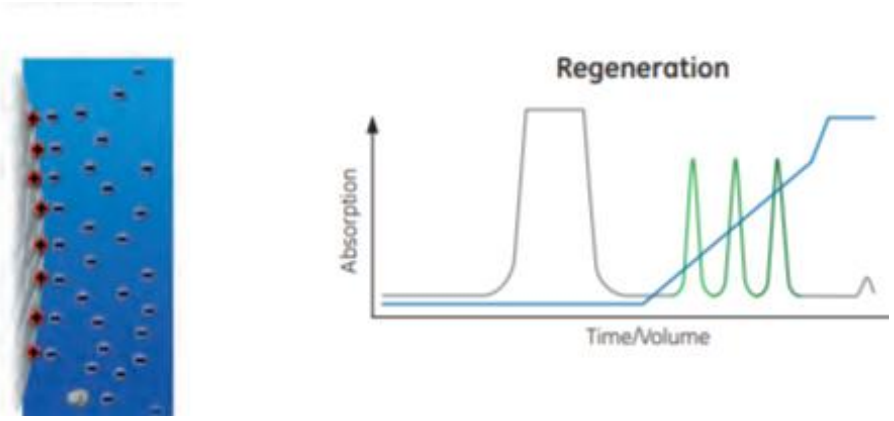
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



Εικόνα 22: Παράδειγμα βαθμιδωτής έκλουσης (gradient) μιας ανιοανταλλακτικής στήλης. ΑΡΙΣΤΕΡΑ: Απεικονίζεται ο τρόπος με τον οποίο τα ιόντα του άλλατος ανταγωνίζονται τα συνδεδεμένα μόρια, με αποτέλεσμα την απομάκρυνσή τους από τη στήλη. ΔΕΞΙΑ: Απεικονίζονται τα χρωματογραφήματα του κάθε σταδίου της βαθμιδωτής έκλουσης, όπου εμφανίζονται κορυφές απορρόφησης UV (πράσινο χρώμα), που αντιστοιχουν στην έκλουση πρωτεϊνών. Η αύξηση της αλατότητας αναπαριστάνεται ως μπλε γραμμή *[57]*.

Αναγέννηση (Regeneration): Τελευταίο στάδιο είναι η αναγέννηση της στήλης, όπου χρησιμοποιείται διάλυμα έκλουσης με πολύ υψηλή συγκέντρωση άλατος (1-2 M). Στο συγκεκριμένο βήμα επιτυγχάνεται η απομάκρυνση οποιοδήποτε μορίου από τη στήλη, είτε είναι ειδικά, είτε μη ειδικά συνδεδεμένο. Τέλος η στήλη επανα-εξισορροπείται για εκ νέου χρήση, ή αποθηκεύεται στο διάλυμα αποθήκευσης [57].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



Εικόνα 23: Παράδειγμα αναγέννησης μιας ανιοανταλλακτικής στήλης. ΑΡΙΣΤΕΡΑ: Απεικονίζεται το εσωτερικό της στήλης, όπου προστίθεται το διάλυμα έκλουσης σε μεγάλη συγκέντρωσή (1-2 M), με αποτέλεσμα την απομάκρυνση όλων των προσδεδεμένων μορίων. ΔΕΞΙΑ: Απεικονίζεται το χρωματοφράφημα, όπου φαίνεται η αύξηση της αλατότητας (μπλε γραμμή) και μια μικρή αύξηση στην απορρόφηση του UV, οποία υποδηλώνει την απομάκρυνση μικρής ποσότητας εναπομείνουσας πρωτεΐνης [57].

2.11.5 Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Η στήλη μοριακής διήθησης (Gel filtration) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους μέγεθος. Το εσωτερικό της στήλης αποτελείται από μία πορώδη μήτρα, την οποία συνθέτουν σφαιρικά σωματίδια. Τα συγκεκριμένα σφαιρίδια εμφανίζουν χημική και φυσική σταθερότητα και επιπλέον, είναι αδρανή. Τα βήματα που ακολουθούνται κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, είναι τα εξής:

Εξισορρόπηση (Equilibration): Το πρώτο στάδιο και σε αυτό το είδος χρωματογραφίας είναι η εξισορρόπηση της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης, το οποίο εισχωρεί στους πόρους της μήτρας, καλύπτοντας το κενό μεταξύ των σφαιριδίων και των πόρων. Το διάλυμα εξισορρόπησης, θα πρέπει να είναι ίδιο με το διάλυμα της κινητής φάσης, δηλαδή το διάλυμα έκπλυσης. Σε αυτό το στάδιο η απορρόφηση του UV είναι σταθερή.

Εισαγωγή δείγματος και έκλουση (Injection and Wash): Το δεύτερο στάδιο είναι η ένεση του δείγματος και ακολουθεί η έκλουση. Η έκλουση πραγματοποιείται με το ίδιο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο της εξισορρόπησης. Σε αυτό το στάδιο, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα πρωτεϊνικά μόρια διαχωρίζονται στο εσωτερικό της στήλης ανάλογα με το μέγεθος. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην πορώδη μήτρα και στις διαφορετικές αποστάσεις που διανύουν τα μόρια. Όσο πιο μεγάλο μοριακό βάρος διαθέτουν, τόσο πιο γρήγορα θα διασχίσουν τη στήλη, καθώς δεν θα μπορέσουν να εισχωρήσουν μέσα στο πορώδες υλικό. Αντίθετα τα μικρότερου μοριακού μεγέθους μόρια, εισέρχονται στην πορώδη μήτρα, με αποτέλεσμα να διασχίζουν τη στήλη με πολύ μικρότερη ταχύτητα. Οι πρωτεΐνες που θα εκλουστούν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

πρώτες, είναι εκείνες με τη μεγαλύτερη ταχύτητα και επομένως με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Επομένως η έκλουση των πρωτεϊνών ακολουθεί φθίνουσα σειρά, όσον αφορά το μοριακό μέγεθός τους [58].

2.11.6 Απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης AgamOBP1

Το γονίδιο της οσφρητικής πρωτεΐνης δέσμευσης 1 του κουνουπιού *Anopheles gambiae* (AgamOBP1) βρίσκεται κλωνοποιημένο στον φορέα έκφρασης pET22b(+). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα *E.coli* Origami B (DE3), τα οποία μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο pET22b(+)-AgamOBP1. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι 14662 Da και το pI: 5,53.

Ο καθαρισμός έλαβε χώρα σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από την Tsitsanou K. et al (2012) [65].

ΠΡΩΤΗ ΜΕΡΑ

Αρχικά γίνεται προετοιμασία του τρυβλίου με 30mL LB-άγαρ και με προσθήκη των αντιβιοτικών καρμπενικιλλίνη 50μg/mL, τετρακυκλίνη 12,5μg/mL και καναμυκίνη 15μg/mL και τοποθετείται για προθέρμανση στους 37°C. Στη συνέχεια στο τρυβλίο διασπείρονται μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα, υπό στείρες συνθήκες, και αφήνεται για επώαση στους 37°C για περίπου 48 ώρες.

ΔΕΥΤΕΡΗ ΜΕΡΑ

Από το τρυβλίο που επιστρώθηκε γίνεται επιλογή δύο μοναδικών αποικιών, η καθεμία από τις οποίες εμβολιάζεται σε 50mL θρεπτικού υλικού LB, το οποίο περιέχει τα αντιβιοτικά αμπικιλλίνη 75μg/mL, τετρακυκλίνη 12,5μg/mL και καναμυκίνη 15μg/mL. Για την ανάπτυξη των κυττάρων, οι υγρές καλλιέργειες τοποθετούνται σε αναδευόμενο επωαστήρα στα 200rpm,στους 37°C, για 18 ώρες.

ΤΡΙΤΗ ΜΕΡΑ

Από κάθε μικρή καλλιέργεια συλλέγονται 2X20mL, ώστε να γίνει εμβολιασμός σε μεγάλες αποστειρωμένες φλάσκες με θρεπτικό LB. Οι φλάσκες περιείχαν τα αντιβιοτικά αμπικιλλίνη 75μg/mL, τετρακυκλίνη 12,5μg/mL και καναμυκίνη 15μg/mL. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 4 φλάσκες, η καθεμία από τις οποίες περιείχε 500mL LB. Πριν πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός, απομακρύνθηκε 1mL θρεπτικού υλικού, για να χρησιμοποιηθεί ως τυφλός μάρτυρας στη μετέπειτα μετρήσεις με το φωτόμετρο, όπου παρακολουθείται η ανάπτυξη των κυττάρων. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για ανάπτυξη σε αναδευόμενο επωαστήρα, στα 220rpm, στους 37°C, έως η οπτική πυκνότητα σε μήκος κύματος 600nm, φτάσει κοντά στην τιμή 0,6. Η συγκεκριμένη τιμή υποδηλώνει πως τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους. Έπειτα προστίθενται στις καλλιέργειες 5mL του επαγωγέα υπερέκφραση IPTG 1mM και επανατοποθετούνται στον επωαστήρα για 4 ώρες. Με το πέρας των 4 ωρών, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των καλλιεργειών σε 4.000g, στους 4°C, για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, ενώ το ίζημα (pellet) που προκύπτει από τη φυγοκέντρηση, φυλάσσεται στους -22°C.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

ΤΕΤΑΡΤΗ ΜΕΡΑ

Έγινε προετοιμασία 50mL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης pH:8 (Lysis buffer), με σύσταση 10mM Tris/HCl, 2mM EDTA, 0,1% Triton, 1X Roche Complete, 1mM PMSF. Το ίζημα τοποθετείται στον πάγο μέχρι να ξεπαγώσει και διαλυτοποιείται με το διάλυμα λύσης. Χρησιμοποιούνται 20mL ανά 1Lt καλλιέργειας. Επίσης προστίθεται 1μL βενζονάσης και το δείγμα επωάζεται υπό ήπια ανάδευση στους 4°C, για 15 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με τη χρήση υπερήχων με τον εξής τρόπο: 15 δευτερόλεπτα εφαρμογή υπερήχων/15 δευτερόλεπτα παύση για 8 κύκλους. Τέλος γίνεται υπερφυγοκέντρηση του δείγματος σε 42.000 rpm, στους 4°C, για 30 λεπτά. Η απομόνωση της AgamOBP1 πραγματοποιείται σε τρία στάδια, με το αυτοματοποιημένο σύστημα ÄCTA-FPLC. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση, είναι φιλτραρισμένα, με φίλτρο πόρων διαμέτρου 0,22μm και απαερωμένα.

1^{ο} Βήμα: Χρησιμοποιείται η ανιοανταλλακτική στήλη Hi-Trap Q FF (5mL), η οποία είναι προπληρωμένη με 6% διασταυρούμενης αγαρόζης και διαθέτει υψηλή ροή. Η εξισορρόπηση της στήλης γίνεται με το διάλυμα έκπλυσης (Wash Buffer A) pH:8, το οποίο έχει σύσταση 10mM Tris(HCl). Στη συνέχεια εισάγεται το δείγμα και ακολουθεί το στάδιο της έκπλυσης, το οποίο διαρκεί έως η απορρόφηση του UV να πάρει την τιμή 0. Έπειτα πραγματοποιείται το στάδιο της έκλουσης, κατά το οποίο χρησιμοποιείται το διάλυμα έκλουσης (Elution Buffer B) με pH:8 και σύσταση 10mM Tris(HCl) και 1M NaCl. Στο συγκεκριμένο στάδιο η έκλουση πραγματοποιείται με βαθμιδωτή αύξηση της αλατότητας από 0-500mM. Συλλέγοντα τα κλάσματα που περιέχουν πρωτεΐνη και πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15%, με σκοπό τη συλλογή μόνο των κλασμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη AgamOBP1. Τέλος πραγματοποιείται διαπίδυση των επιλεγμένων κλασμάτων έναντι διαλύματος Tris(HCl) 10mM, για να απομακρυνθεί το αλάτι από το δείγμα και να μπορέσει να προσδεθεί στην επόμενη στήλη.

ΠΕΜΠΤΗ ΜΕΡΑ

2^{ο} Βήμα: Χρησιμοποιείται η ανιοανταλλακτική στήλη Resourse Q (6mL), η οποία είναι προπληρωμένη με πολυ-αιθερ-αιθερ-κετόνη (PEEK) και διαθέτει υψηλή ροή. Η εξισορρόπηση της στήλης γίνεται με το διάλυμα έκπλυσης (Wash Buffer A) με pH:8, το οποίο έχει σύσταση 10mM Tris(HCl). Στη συνέχεια εισάγεται το δείγμα και ακολουθεί το στάδιο της έκπλυσης, το οποίο διαρκεί έως η απορρόφηση του UV να λάβει την τιμή 0. Έπειτα γίνεται το στάδιο της έκλουσης, όπου χρησιμοποιείται το διάλυμα έκλουσης (Elution Buffer B) με pH:8 και σύσταση 10mM Tris(HCl) και 1M NaCl. Στο συγκεκριμένο στάδιο η έκλουση πραγματοποιείται με βαθμιδωτή αύξηση της αλατότητας από 0-300mM. Συλλέγοντα τα κλάσματα που περιέχουν πρωτεΐνη και πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15%, με σκοπό τη επιλογή και συλλογή των κλασμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη AgamOBP1.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

ΕΚΤΗ ΜΕΡΑ

3ο Βήμα: Τα επιλεγμένα κλάσματα ενώνονται και συμπυκνώνονται με φίλτρα συμπύκνωσης 10MWCO, σε τελικό όγκο 0,5mL. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται η στήλη μοριακής διήθησης Superdex 75, της οποία το πληρωτικό υλικό αποτελείται από μίγμα δεξτράνης και αγαρόζης και μπορεί να διαχωρίσει πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 3.000-70.000 Da. Η εξισορρόπηση της στήλης πραγματοποιείται με το διάλυμα εξισορρόπησης (Buffer C) με pH:8 και σύσταση 10mM Tris(HCl) και 200mM NaCl. Ακολουθούν η εισαγωγή του δείγματος και η έκλουση της πρωτεΐνης με το ίδιο διάλυμα. Έπειτα συλλέγονται όλα τα κλάσματα που περιέχουν πρωτεΐνη και πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση για την εύρεση της OBP1. Τέλος ύστερα από την επιλογή των κλασμάτων με την επιθυμητή πρωτεΐνη το συνολικό πρωτεϊνικό δείγμα υφίσταται συμπύκνωση, σε τελική συγκέντρωση 15mg/mL, με τη χρήση φίλτρου συμπύκνωσης 10KD MWCO, με φυγοκέντρηση σε 3.500 g, στους 4°C. [65]

2.11.7 Απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης AgamOBP5

Το γονίδιο της οσφρητικής πρωτεΐνης δέσμευσης 5 (OBP5) του κουνουπιού *Anopheles gambiae* βρίσκεται κλωνοποιημένο στον φορέα έκφρασης pET22b(+). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα *E.coli* Origami B (DE3), τα οποία μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο pET22b(+)-AgamOBP5. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι 14380,85 Da και το pI: 8,53.

Η πρωτεΐνη απομονώθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της Διδακτορικής Διατριβής της κας. Παναγιώτα Λίγγρη [45, 46].

Εν συντομία η υπερέκφραση της πρωτεΐνης περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

A. Στερεή καλλιέργεια μετασχηματισμένων βακτηρίων
B. Καλλιέργειες μικρού όγκου
C. Εμβολιασμός καλλιεργειών μεγάλου όγκου και επαγωγή με IPTG
D. Συλλογή κυττάρων με φυγοκέντρηση και λύση των κυττάρων

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια

E. Απομόνωση και καθαρισμός σωματίων εγκλεισμού σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει περιγράφει προηγουμένως από τους Tsitsanou KE at al για τον καθαρισμό της AgamOBP48 [66] μετά από τροποποίηση [45, 46].
F. Η αναδιαταγμένη πρωτεΐνη από το προηγούμενο στάδιο καθαρίστηκε με την εφαρμογή σταδίου ανιοανταλλάκτικής χρωματογραφίας με βαθμιδωτή αύξηση της αλατότητας NaCl ακολουθούμενη από κατιονανταλλακτική χρωματογραφία και ένα τελικό στάδιο χρωματογραφίας μοριακής διήθησης.

Το τελικό δείγμα φυγοκεντρείται, για να γίνει διαύγαση, σε 15.000g, για 10 λεπτά, στους 4°C. Έπειτα συμπυκνώνεται, σε τελική συγκέντρωση 15mg/mL, με τη χρήση φίλτρου συμπύκνωσης 10KD MWCO, με φυγοκέντρηση σε 3.500 g, στους 4°C και αποθηκεύεται.

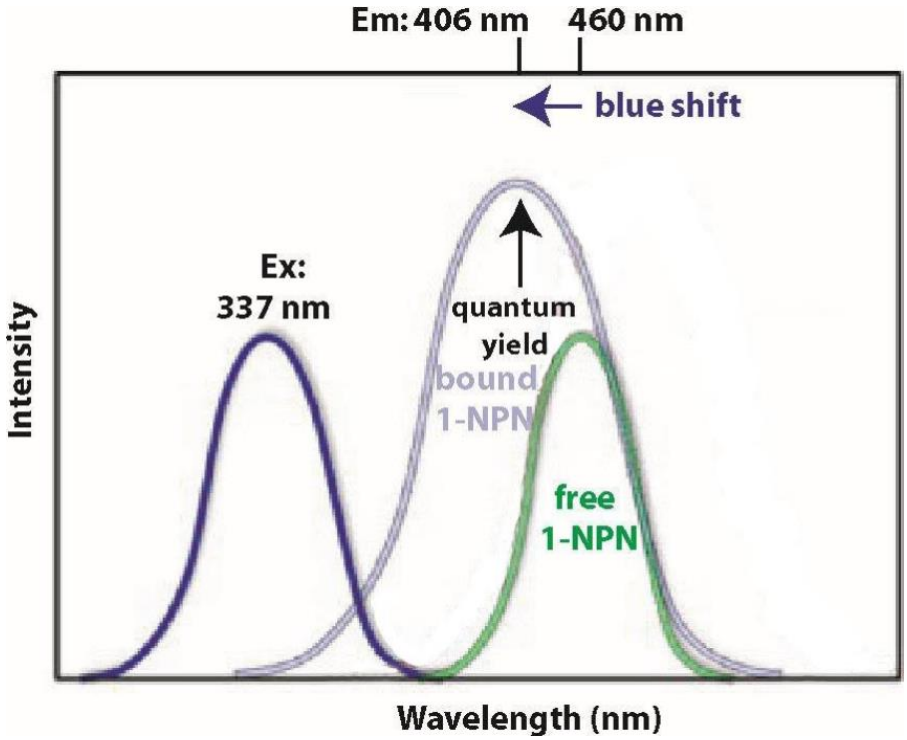
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

2.12 Φθορισμομετρικός προσδιορισμός

Οι Φθορίζοντες ιχνηθέτες πολικότητας (fluorescent polarity probes) ορίζονται ως οργανικά μόρια, τα οποία διαθέτουν την ικανότητα να φθορίζουν ανάλογα με την πολικότητα τους περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται. Η πρόσδεση ενός ιχνηθέτη πολικότητας σε ένα μακρομόριο και η ανάλυση της συμπεριφοράς του φθορισμού μπορεί να δώσει πολλές σημαντικές πληροφορίες όπως για την πολικότητα, την προσπελασιμότητα από τον διαλύτη, την ευκαμψία και τη διαθεσιμότητα των κέντρων πρόσδεσης. Όταν ένας ιχνηθέτης πολικότητας βρίσκεται σε υδατικό περιβάλλον ο φθορισμός που εκπέμπει είναι αρκετά ασθενής, ενώ σε μη πολικό περιβάλλον ο φθορισμός είναι έντονος [67]. Επιπλέον, η αύξηση της έντασης του φθορισμού συνοδεύεται από μετατόπιση του φάσματος εκπομπής του μορίου σε μικρότερο μήκος κύματος (μπλε μετατόπιση). Οι λόγοι για τους οποίους οι ιχνηθέτες πολικότητας υφίστανται μεγάλες διακυμάνσεις φθορισμού ανάλογα με την πολικότητα του διαλύτη υπήρξε αντικείμενο πολλών ερευνών. Ως λόγοι έχουν προταθεί η ενδομοριακή μεταφορά φορτίου, συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις διαλύτη-διαλυμένης ουσίας, περιλαμβανομένων των δεσμών υδρογόνου, μεταβολή της μοριακής διαμόρφωσης, ενδο-συστημική μετάβαση στην τριπλή κατάσταση (triplet state) και μονοφωτονικός φωτοϊονισμός. Αρκετές από αυτές τις διαδικασίες μπορεί να είναι ανταγωνιστικές και είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ποιο είναι το κυρίαρχο [68].

Το 1-NPN (N-phenyl-1-naphthylamine), που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία είναι ένα ουδέτερο μόριο, το οποίο φθορίζει ύστερα από την πρόσδεσή του σε ένα υδρόφοβο κέντρο. Η διέγερσή λαμβάνει χώρα σε μήκος κύματος 337nm, ενώ η μέγιστη εκπομπή του εμφανίζεται στα 460nm. Όταν βρίσκεται συνδεδεμένο στο κέντρο σύνδεσης μιας πρωτεΐνης, το μήκος κύματος της μέγιστης εκπομπής εμφανίζεται στα 406-410nm (Εικόνα 24) [69].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



Εικόνα 24: Φάσμα φθορισμού του 1-NPN σε ελεύθερη (πράσινη καμπύλη) και δεσμευμένη μορφή (Ιώδης καμπύλη). Προσαρμογή από [70]

2.12.1 Υπολογισμός σταθεράς πρόσδεσης K_D και IC_{50} του 1-NPN για τις πρωτεΐνες AgamOBP1 και AgamOBP5

Τα δεδομένα των πειραμάτων συλλέχθηκαν από το μετρητή μικροπλακών VarioScan Flash UV/Vis φθορισμού με τη χρήση μικροπλακών 384 φρεατίων με πυθμένα μαύρου χρώματος και η ανάλυσή τους πραγματοποιήθηκαν από το πρόγραμμα ανάλυσης κινητικών δεδομένων Prism [71, 72]. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, σε θερμοκρασία 27°C. Ως ιχνηθέτης φθορισμού χρησιμοποιήθηκε η ένωση 1-NPN, σε διαλύτη μεθανόλη (MeOH). Αντίστοιχα, τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονταν διαλυμένα σε MeOH. Η τελική συγκέντρωση της MeOH στο πρωτεϊνικό διάλυμα έφτασε έως 2%. Ο τελικός όγκος ήταν 100μL και το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε είχε σύσταση 20mM Tris(HCl), pH 8.0 και 100mM NaCl (Ρυθμιστικό διάλυμα F).

2.12.1.1 Υπολογισμός K_D του 1-NPN για την πρωτεΐνη AgamOBP1

Ο υπολογισμός της σταθεράς πρόσδεσης K_D για την πρωτεΐνη AgamOBP1 πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα που περιείχε 2μM AgamOBP1 σε ρυθμιστικό διάλυμα F. Η καταγραφή του φάσματος εκπομπής πραγματοποιήθηκε μεταξύ των μηκών κύματος 350-500nm και συλλέχθηκαν οι τιμές απορρόφησης που καταγράφηκαν σε μήκος κύματος 406nm, όπου παρατηρείται η μέγιστη ένταση του φθορισμού. Το πείραμα διεξάχθηκε εις τριπλούν, με τιτλοδότηση της ένωσης 1-NPN, με σκοπό τη σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσής της στο πρωτεϊνικό διάλυμα. Οι τελικές συγκεντρώσεις του 1-NPN φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

$C_{τελική}$ (μM)	$V_{προσθήκης}$ (μL)	$C_{αρχική}$
0	0	0
0,58	0,2	293μM
1,7	0,2	586μM
3,6	0,2	1mM
5,5	0,2	1mM
7,4	0,2	1mM
9,4	0,2	1mM
11,4	0,2	1mM
13,3	0,2	1mM
15,2	0,2	1mM
17,1	0,2	1mM
19	0,2	1mM
20,9	0,2	1mM
22,8	0,2	1mM
24,7	0,2	1mM
26,6	0,2	1mM
28,5	0,2	1mM

2.12.1.2 Υπολογισμός IC_{50} των αιθέριων ελαίων για την πρωτεΐνη AgamOBP1

Ο υπολογισμός της IC_{50} των αιθέριων ελαίων διεξάχθηκε σε πρωτεϊνικό διάλυμα, το οποίο περιείχε 2μM AgamOBP1 και 10μM 1-NPN σε ρυθμιστικό διάλυμα. Τα διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions) των αιθέριων ελαίων παρασκευάζονται φρέσκα σε 100% MeOH. Έγινε καταγραφή του φάσματος εκπομπής μεταξύ των μηκών κύματος 350-500nm και συλλέχθηκαν οι τιμές απορρόφησης που καταγράφηκαν σε μήκος κύματος 406nm, όπου παρατηρείται η μέγιστη ένταση του φθορισμού. Τα πειράματα διεξάχθηκαν εις τριπλούν, με τιτλοδότηση των αιθέριων ελαίων, με σκοπό τη σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσής τους στο πρωτεϊνικό διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκαν 7 διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθέριων ελαίων, όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

$C_{τελική}$ (% v/v)	$V_{προσθήκης}$ (μL)	$C_{αρχική}$ (% v/v)
0	0	0
0,001	0,2	0,496
0,0013	0,2	0,1501
0,002	0,2	0,3499
0,004	0,2	1
0,01	0,2	3,004
0,02	0,2	5,02
0,1	0,2	40,18

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

2.12.1.3 Υπολογισμός K_D του 1-NPN για την πρωτεΐνη AgamOBP5

Για τον προσδιορισμό της σταθεράς πρόσδεσης K_D για την πρωτεΐνη AgamOBP5 χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε 5μM AgamOBP5 και το ρυθμιστικό διάλυμα F. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε για τον προσδιορισμό K_D του 1-NPN της πρωτεΐνης AgamOBP1.

2.12.1.4 Υπολογισμός IC_{50} των αιθέριων ελαίων για την πρωτεΐνη AgamOBP5

Για τον προσδιορισμό της IC_{50} των αιθέριων ελαίων στην πρωτεΐνη AgamOBP5 χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνικό διάλυμα, το οποίο περιείχε 5μM AgamOBP1 και 10μM 1-NPN σε ρυθμιστικό διάλυμα F. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε στον υπολογισμό της IC_{50} των αιθέριων ελαίων στην πρωτεΐνη AgamOBP1.

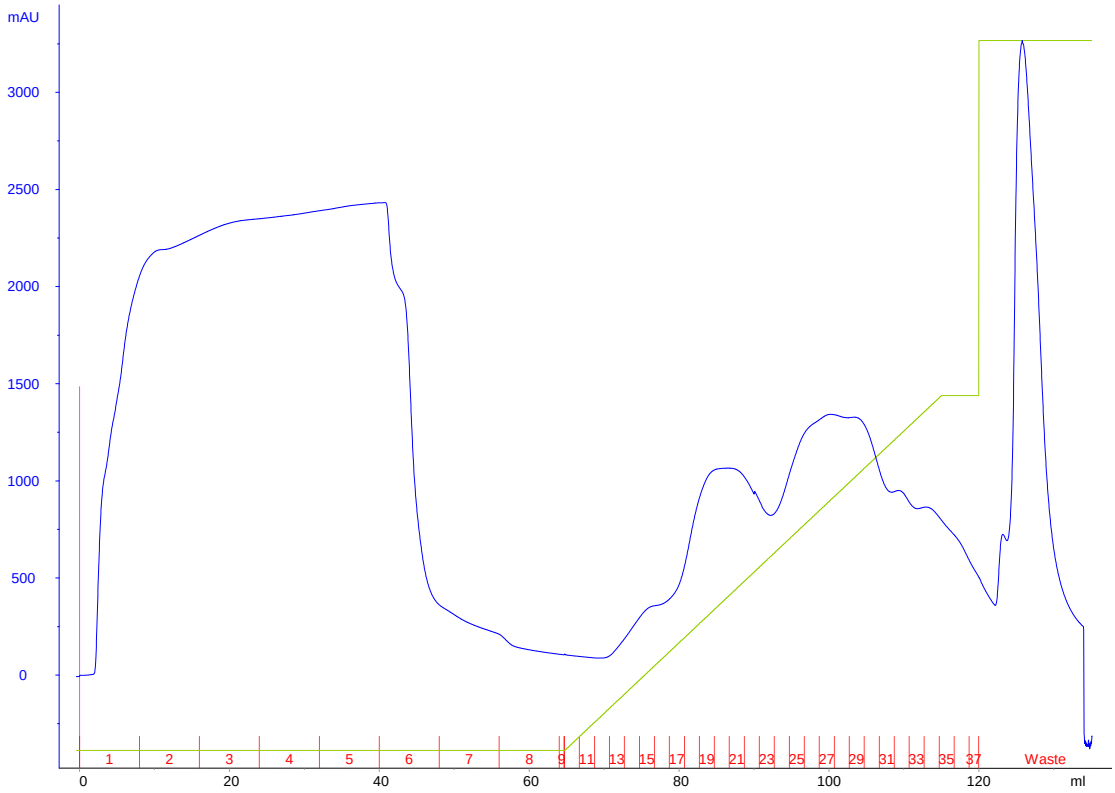
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών

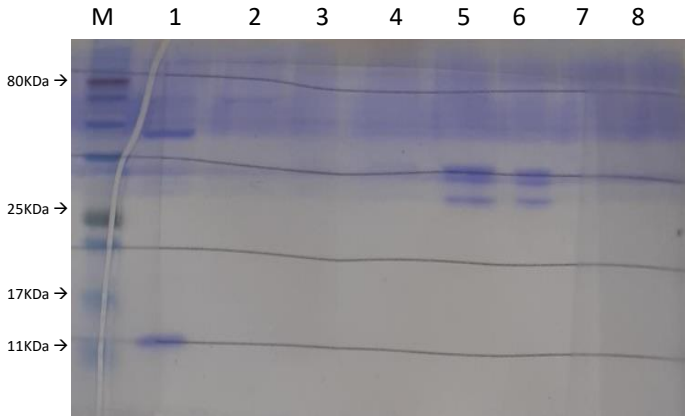
3.1.1 Καθαρισμός και απομόνωση της πρωτεΐνης AgamOBP1

Στο πρώτο στάδιο καθαρισμού της πρωτεΐνης AgamOBP1 χρησιμοποιείται η ανιοανταλλακτική στήλη HiTrap Q FF. Το διάλυμα εξισορρόπησης καθώς και το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται το πρωτεϊνικό δείγμα, έχουν pH 8. Το pI της πρωτεΐνης, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι 5,53, επομένως η πρωτεΐνη μέσα στη στήλη διαθέτει ένα ισχυρό αρνητικό φορτίο, το οποίο της δίνει τη δυνατότητα να προσδένεται στα θετικά φορτισμένα ιόντα του πληρωτικού υλικού. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με το Wash Buffer A που περιείχε 10mM Tris, pH 8. Για την έκλουση χρησιμοποιήθηκε το Elution Buffer B, το οποίο περιείχε 10mM Tris και 1M NaCl και βαθμιδωτή αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος με τη χρήση toy αυτοματοποιημένου μεικτή του συστήματος ÄKTApurifier UPC 10. Η βαθμιδωτή αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl είχε ως αποτέλεσμα την κλασματοποίηση των πρωτεϊνών κατά τάξη φορτίου. Στη συνέχεια παρατίθεται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα της πηκτής SDS-PAGE. Στα χρωματογραφήματα στον άξονα X βρίσκονται ο όγκος (mL) και η αρίθμηση των κλασμάτων που συλλέχθηκαν, ενώ στον άξονα Y βρίσκεται η απορρόφηση (mAU) του δείγματος που εξέρχεται από τη στήλη σε μήκος κύματος 280nm.

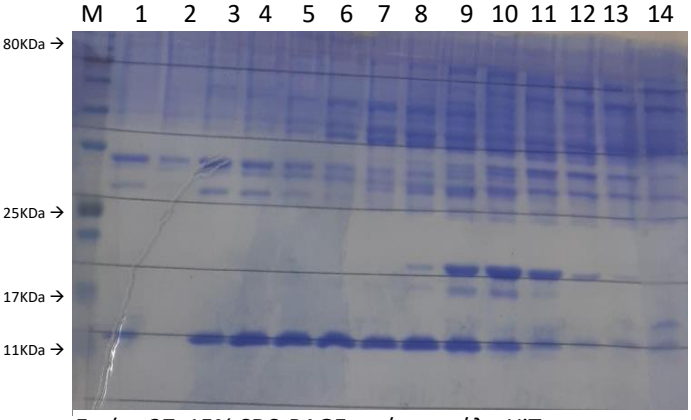
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



Εικόνα 25: Χρωματογράφημα πρώτου σταδίου καθαρισμού (HiTrap) της AgamOBP1. Τα κλάσματα 1-6 περιείχαν πρωτεΐνες που δεν συνδέθηκαν στη στήλη (Flow Through), τα κλάσματα 7-9 την έκπλυση της στήλης (Wash) και τα υπόλοιπα την έκλουση των συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών (Elution).



Εικόνα 2626: 15% SDS-PAGE από τη στήλη HiTrap της απομόνωσης της AgamOBP1. Διαδρομή M: Μάρτυρες πρωτεϊνικών μοριακών βαρών. Διαδρομή 1: Αρχικό δείγμα. Διαδρομή 2-5: πρωτεΐνες που δεν προσδένονται στη στήλη (Flow through). Διαδρομή 6-8: κλάσματα έκπλυσης (Wash).

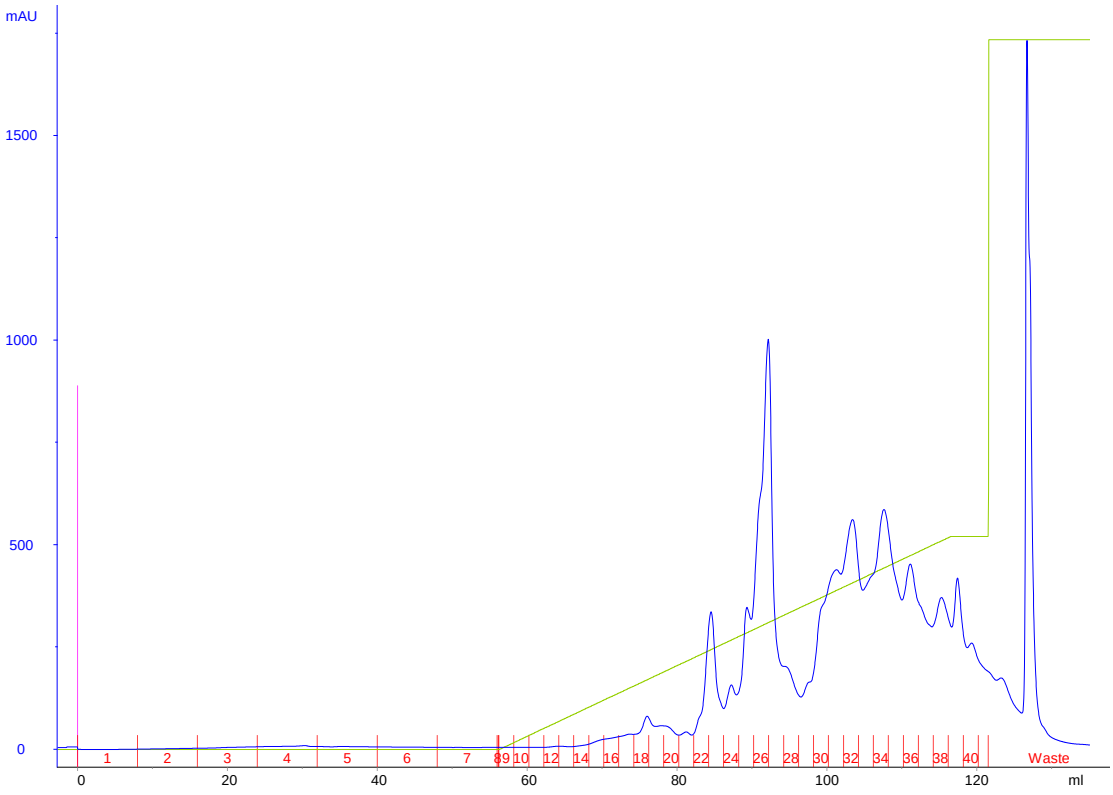


Εικόνα27: 15% SDS-PAGE από τη στήλη HiTrap της απομόνωσης της AgamOBP1 . Διαδρομή M: μάρτυρας πρωτεϊνικών μοριακών βαρών. Διαδρομή 1-14: τα κλάσματα 18-31 από το στάδιο έκλουσης (Elution)

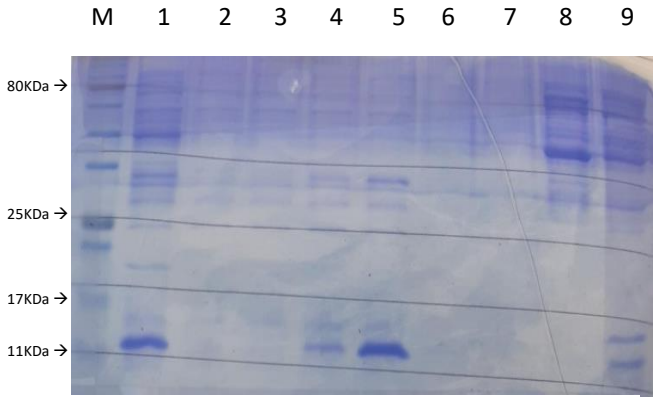
Στο δεύτερο στάδιο χρησιμοποιείται η ανιοανταλλακτική στήλη Resourse Q. Τα πρωτεϊνικά κλάσματα που συλλέχθηκαν στο προηγούμενο στάδιο εισήχθησαν στη στήλη, αφού πρώτα έγινε διαπίδυση έναντι διαλύματος 10mM Tris και , 10mM NaCl με pH 8, προκειμένου να μειωθεί η συγκέντρωση άλατος. Η αυξημένη συγκέντρωση άλατος δεν αφήνει την πρωτεΐνη να συνδεθεί στη στήλη, χρειάζεται όμως μια μικρή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

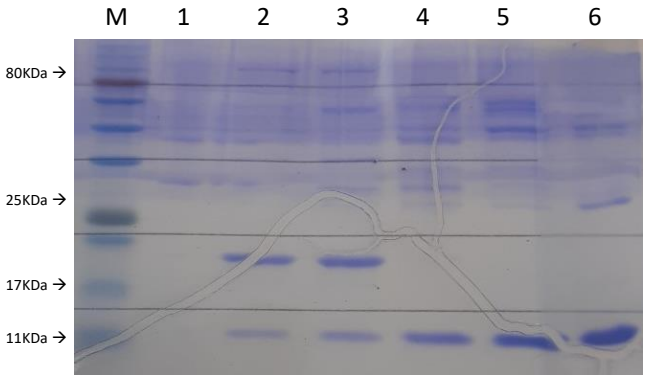
ποσότητα, προκειμένου να αποφευχθεί η μη ειδική σύνδεση και να αυξηθεί η διλυτότητα της πρωτεΐνης. Επομένως η πρωτεΐνη συνδέεται στη στήλη λόγω του αρνητικού της φορτίου σε pH 8 και στη συνέχεια εκλούεται με βαθμιδωτή αύξηση της αλατότητας του διαλύματος έκπλυσης.



Εικόνα 27: Χρωματογράφημα 2^{ου} σταδίου καθαρισμού (Resource Q) της AgamOBP1. Τα κλάσματα 9-41 περιείχαν το έκλουσμα των συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών.



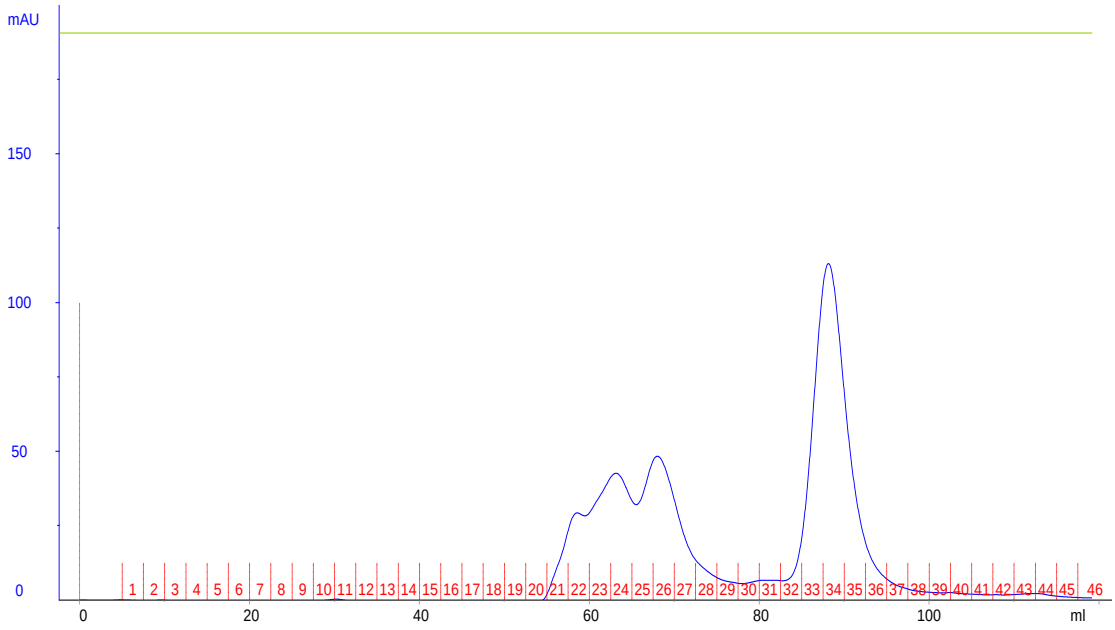
Εικόνα 29: 15% SDS-PAGE από τη στήλη Resource Q της απομόνωσης της AgamOBP1. Διαδρομή M: μάρτυρες πρωτεϊνικών μοριακών βαρών. Διαδρομή 9-1: τα κλάσματα της έκλουσης 22-30.



Εικόνα 28: 15% SDS-PAGE από τη στήλη Resource Q της απομόνωσης της AgamOBP1. Διαδρομή M: μάρτυρες πρωτεϊνικών μοριακών βαρών. Διαδρομή 6-1: τα κλάσματα 31-36 της έκλουσης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

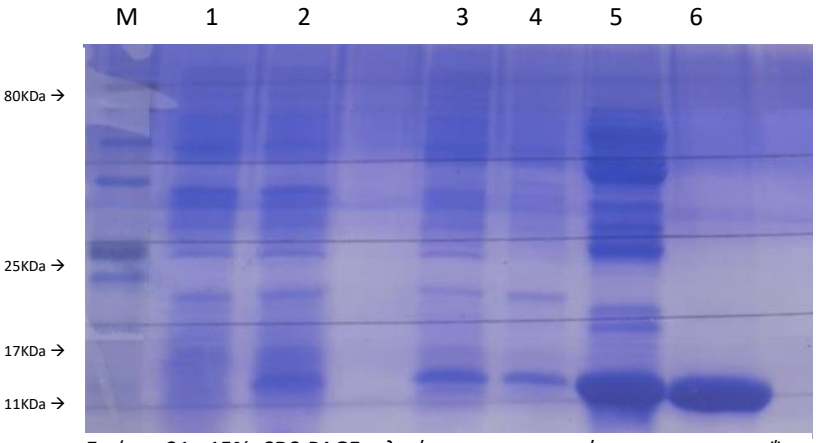
Στο τρίτο στάδιο καθαρισμού χρησιμοποιείται η στήλη μοριακής διήθησης Superdex 75. Αυτό το στάδιο καθαρισμού βασίζεται στο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης. Τα πρωτεϊνικά κλάσματα (30-33) που συλλέχθηκαν από το προηγούμενο στάδιο και περιέχουν την πρωτεΐνη εισάγονται στη στήλη αφού πρώτα γίνει συμπύκνωση σε τελικό όγκο 0,5μL. Λόγω του μικρού μοριακού της βάρους η πρωτεΐνη εκλούεται περίπου στα 90mL.



Εικόνα 30: Χρωματογράφημα 3^{ου} σταδίου καθαρισμού (Superdex 75) της AgamOBP1. Οι πρωτεΐνες εκλούονται ανάλογα με το μοριακό βάρος τους.

Μετά το πέρας του χρωματογραφικού καθαρισμού η πρωτεΐνη συμπυκνώθηκε με φίλτρο συμπύκνωσης 10KD MWCO σε τελική συγκέντρωση 15mg/mL. Η συγκέντρωση προσδιορίστηκε με τη βοήθεια της εξίσωσης Beer-Lambert σε μήκος κύματος 280nm, με ε=1,183$M^{-1}cm^{-1}$ και b=1cm Η απόδοση καθαρισμού είναι 2-5mg/mL καλλιέργειας.

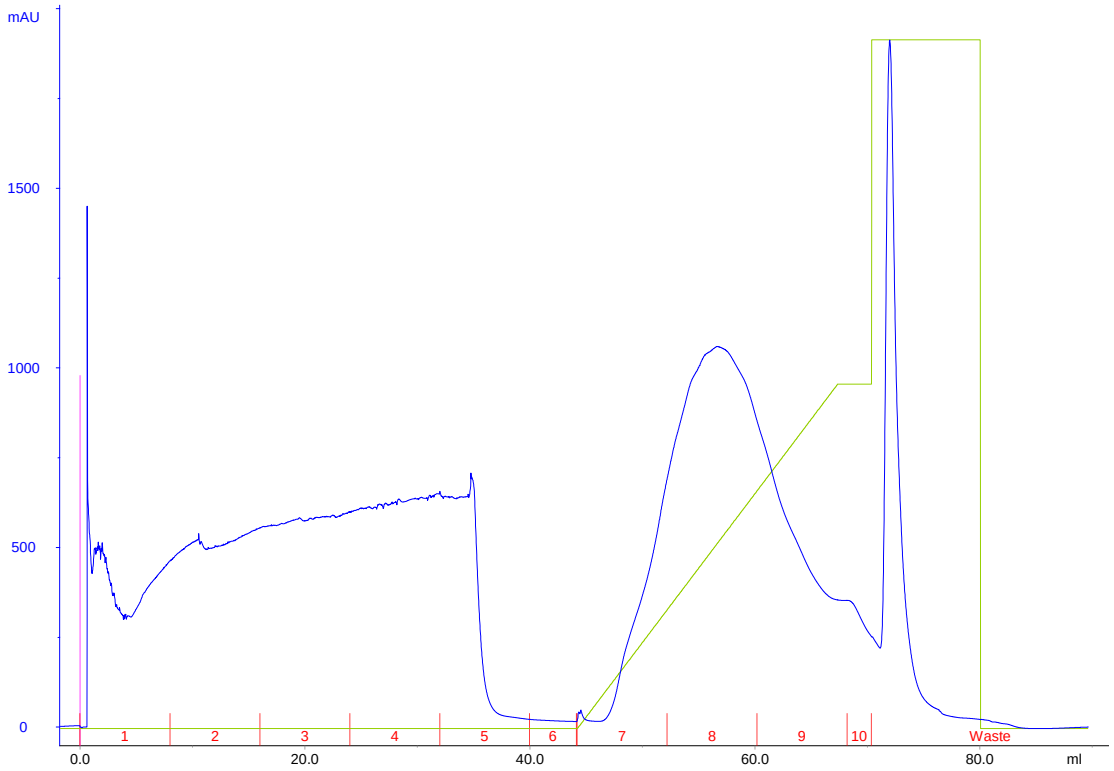
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



Εικόνα 31: 15% SDS-PAGE ολικό για την απομόνωση της πρωτεΐνης AgamOBP1. Διαδρομή M: μάρτυρες πρωτεϊνικών μοριακών βαρών. Διαδρομή 1-2: το κυτταρικό δείγμα πριν και μετά την επαγωγή IPTG. Διαδρομή 3: Lysate. Διαδρομή 4: στήλη στήλη HiTrap. Διαδρομή 5: στήλη ResourceQ. Διαδρομή 6: Superdex75.

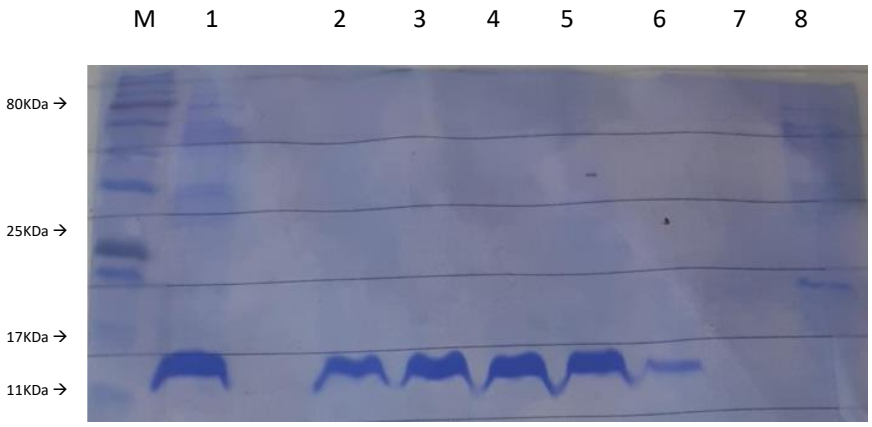
3.1.2 Απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης AgamOBP5

Η AgamOBP5 καθαρίστηκε με ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών σύμφωνα με πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους [45]. Στη συνέχεια παρατίθονται το χρωματογραφήματα των διάφορων σταδίων καθαρισμού και η ανάλυση SDS-PAGE.

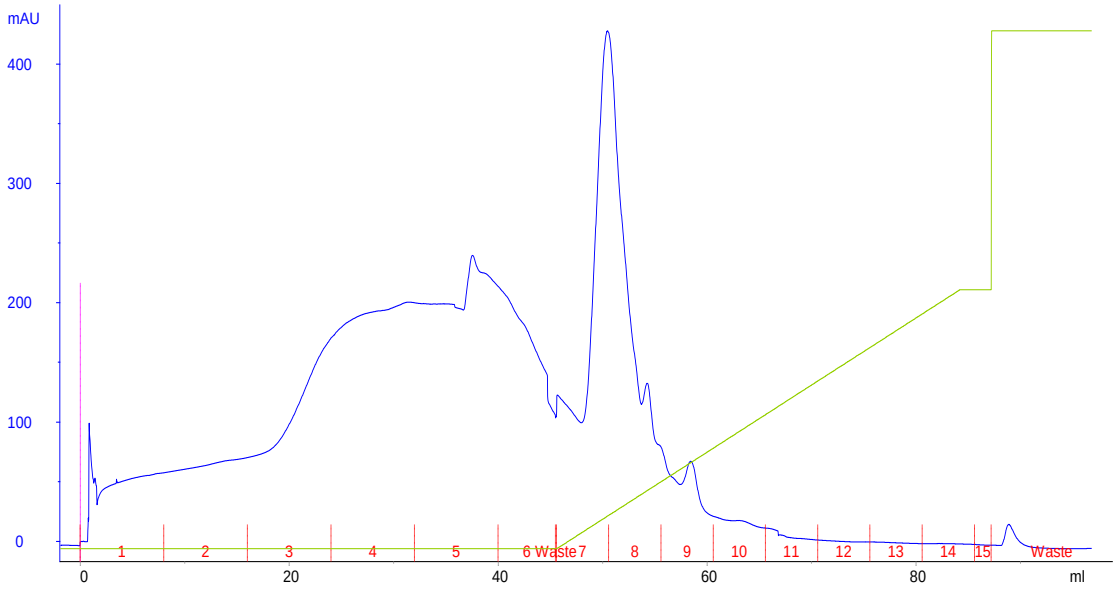


Εικόνα 32: Χρωματογράφημα πρώτου σταδίου καθαρισμού (Resource Q) της AgamOBP5. Τα κλάσματα 1-5 περιείχαν πρωτεΐνες που δεν συνδέθηκαν στη στήλη (Flow Through), τα κλάσματα 5-6 την έκπλυση της στήλης (Wash) και τα υπόλοιπα την έκλουση των συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών (Elution).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

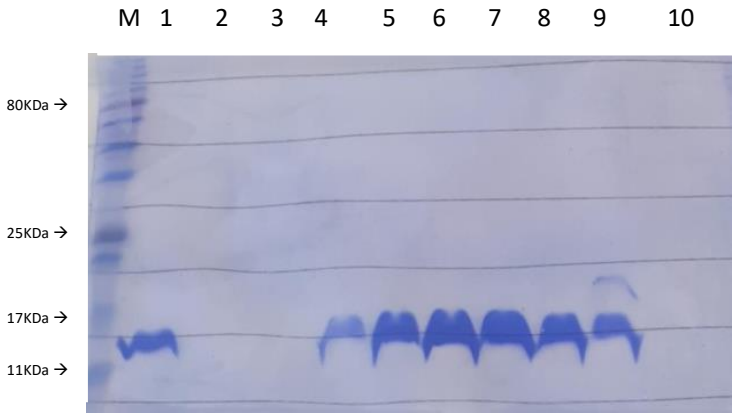


Εικόνα 33: 15% SDS-PAGE από τη στήλη ResourceQ της απομόνωσης της AgamOBP5. Διαδρομή M: μάρτυρες πρωτεϊνικών μοριακών βαρών. Διαδρομή 1: Αρχικό δείγμα. Διαδρομή 2-6: όλες οι πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στη στήλη (Flow through). Διαδρομή 7-8: τα κλάσματα 7-8 της έκλουσης (Elution).



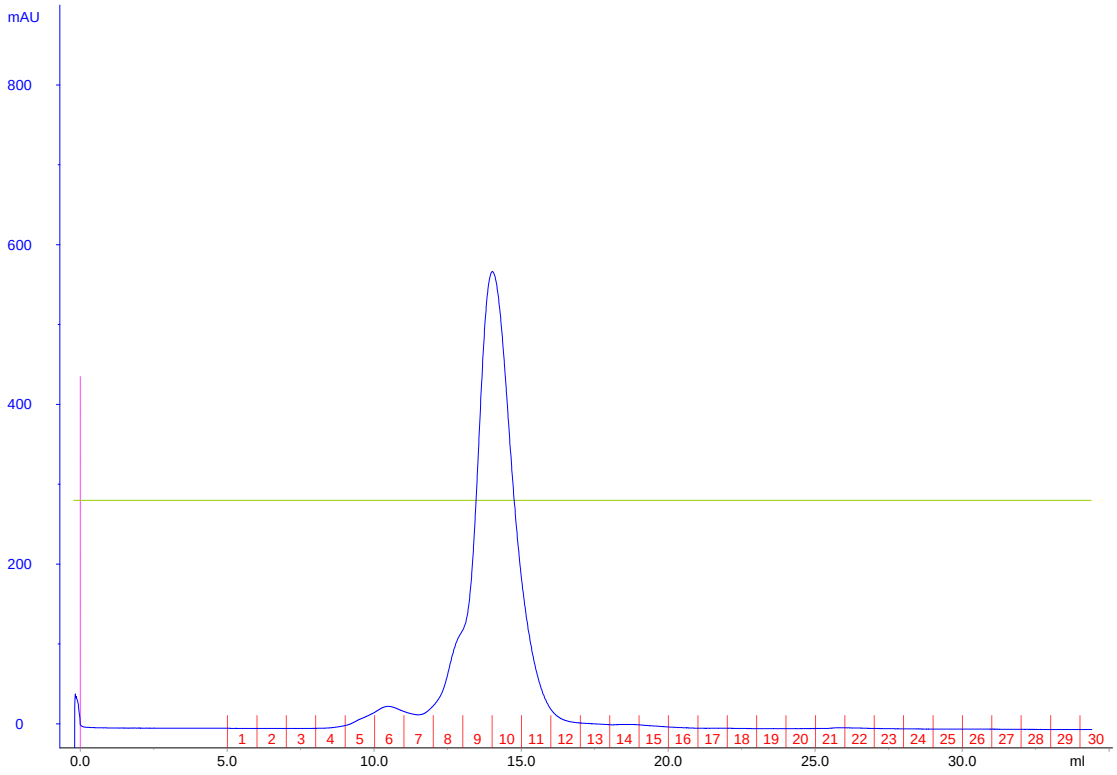
Εικόνα 34: Χρωματογράφημα 2ου σταδίου καθαρισμού (Resourse S) της AgamOBP5. Τα κλάσματα 1-6 περιείχαν πρωτεΐνες που δεν συνδέθηκαν στη στήλη (Flow Through) και την έκπλυση της στήλης (Wash). Τα υπόλοιπα 7-15 περιείχαν την έκλουση των συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών (Elution).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



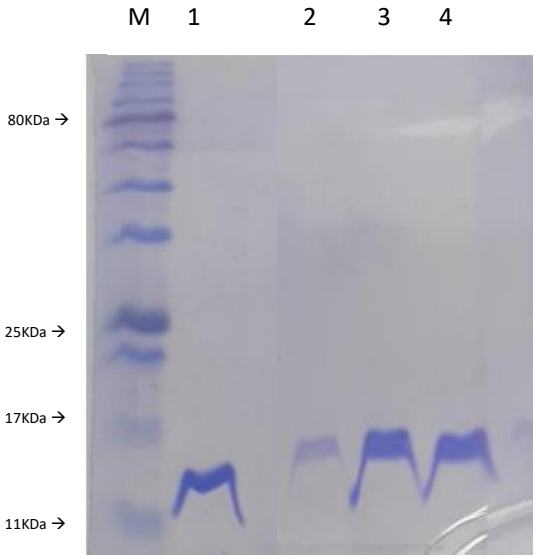
Εικόνα 35: 15% SDS-PAGE από τη στήλη ResourceS της απομόνωσης της AgamOBP5. Διαδρομή M: μάρτυρας πρωτεϊνικών μοριακών βαρών. Διαδρομή 1: Αρχικό δείγμα. Διαδρομή 2-7: όλες οι πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στη στήλη (Flow through). Διαδρομή 8-10: τα κλάσματα 7-9 της έκλουσης (Elution).

Στο τρίτο στάδιο καθαρισμού χρησιμοποιείται η στήλη μοριακής διήθησης Superdex 75, 28mL. Η πρωτεΐνη εκλούστηκε περίπου στα 10mL.



Εικόνα 36: Χρωματογράφημα 3ου σταδίου καθαρισμού (Superdex 75, 28mL) της AgamOBP5. Οι πρωτεΐνες εκλούονται ανάλογα με το μοριακό βάρος τους.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



Εικόνα 37: 15% SDS-PAGE από τη στήλη ResourceQ της απομόνωσης της AgamOBP5. Διαδρομή M: μάρτυρες πρωτεϊνικών μοριακών βαρών. Διαδρομή 1: Αρχικό δείγμα. Διαδρομή 2-4: τα κλάσματα 8-10.

Τέλος η πρωτεΐνη συμπυκνώθηκε με φίλτρο συμπύκνωσης 10KD MWCO σε τελική συγκέντρωση 15mg/mL. Η συγκέντρωση προσδιορίστηκε με τη βοήθεια της εξίσωσης Beer-Lambert σε μήκος κύματος 280nm, με ε=0,446$M^{-1}cm^{-1}$ και b=1cm.

3.2 Φθορισμομετρικές μελέτες

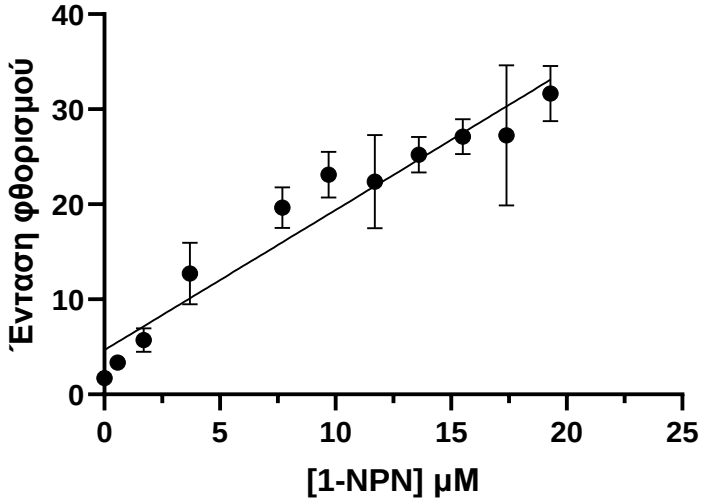
3.2.1 Υπολογισμός σταθεράς πρόσδεσης K_D του 1-NPN

3.2.1.1 Υπολογισμός σταθεράς πρόσδεσης K_D του 1-NPN για την πρωτεΐνη AgamOBP1

Τα πειράματα για τον υπολογισμό της σταθεράς πρόσδεσης K_D της ένωσης 1-NPN για την πρωτεΐνη AgamOBP1 πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, με τιτλοδότηση της ένωσης 1-NPN και συγκέντρωση AgamOBP1 2μM. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 17 διαφορετικές συγκεντρώσεις 1-NPN (0, 0,58, 1,7, 3,7, 5,7, 7,7, 9,7, 11,7, 13,6, 15,5, 17,4, 19,3, 21,2, 23,1, 25, 27 και 28,9 μM).

Αρχικά δημιουργήθηκε μία πρότυπη καμπύλη έντασης φθορισμού με χρήση του διαλύματος μάρτυρα (control), το οποίο δεν περιείχε την πρωτεΐνη AgamOBP1. Με αυτόν τον τρόπο υπολογίστηκε η ένταση φθορισμού της ελεύθερης ένωσης 1-NPN απουσία πρωτεΐνης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

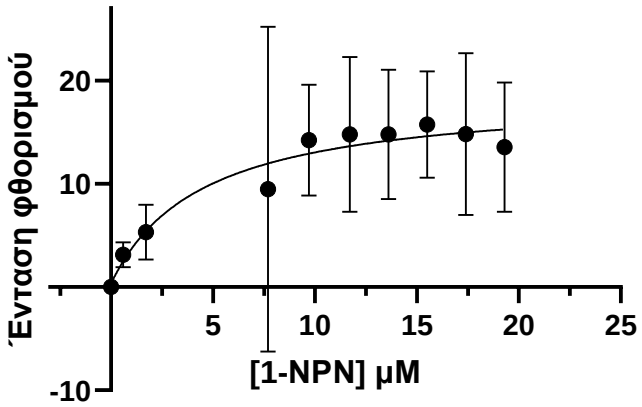


Από το παραπάνω διάγραμμα, υπολογίστηκε η κλίση της ευθείας (a) η οποία ισούται με 1,4469. Η κλίση χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του φθορισμού του ελεύθερου 1-NPN σε απουσία πρωτεΐνης (background).

Η K_D του 1-NPN για την AgamOBP1 βρέθηκε να είναι 4,50 ± 1,63 μM. Ο υπολογισμός της πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μη γραμμικής παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων, προσαρμοσμένη σε καμπύλη κορεσμού με την εξής εξίσωση:

$$y = Bmax \cdot \frac{X}{Kd + X} + Background$$

όπου Bmax: η μέγιστη τιμή φθορισμού και X: οι συγκεντρώσεις του 1-NPN. Από τις τιμές που λήφθηκαν αφαιρέθηκε η ένταση φθορισμού του background, η οποία υπολογίστηκε με βάση την πρότυπη καμπύλη που αναφέρθηκε παραπάνω.

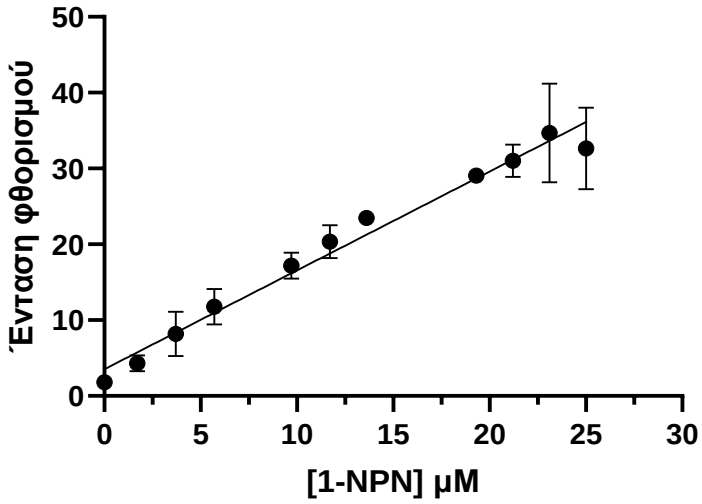


Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

3.2.1.2 Υπολογισμός σταθεράς πρόσδεσης K_D του 1-NPN για την πρωτεΐνη AgamOBP5

Τα πειράματα για τον υπολογισμό της σταθεράς πρόσδεσης K_D της ένωσης 1-NPN για την πρωτεΐνη AgamOBP5 πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, με τιτλοδότηση της ένωσης 1-NPN και συγκέντρωση AgamOBP5 5μM. Συνολικά μελετήθηκαν 17 διαφορετικές συγκεντρώσεις 1-NPN (0, 0,58, 1,7, 3,7, 5,7, 7,7, 9,7, 11,7, 13,6, 15,5, 17,4, 19,3, 21,2, 23,1, 25, 27 και 28,9 μM).

Αρχικά δημιουργήθηκε μία πρότυπη καμπύλη έντασης φθορισμού με χρήση του διαλύματος μάρτυρα (control), το οποίο δεν περιείχε την πρωτεΐνη AgamOBP5. Με αυτόν τον τρόπο υπολογίστηκε η ένταση φθορισμού της ελεύθερης ένωσης 1-NPN απουσία πρωτεΐνης.



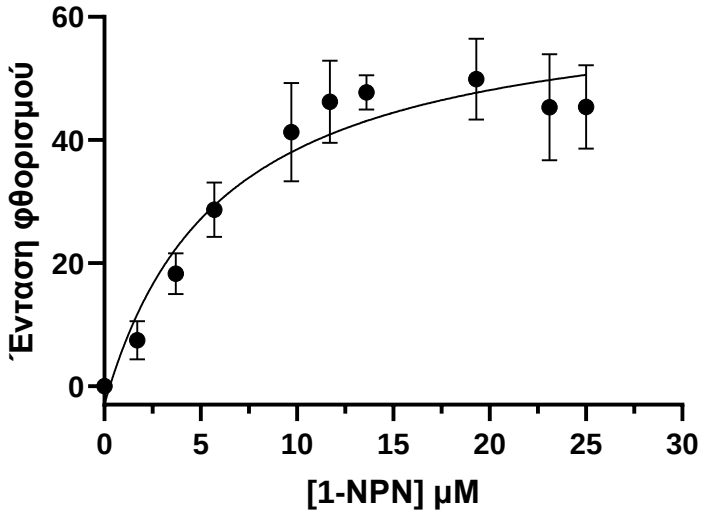
Από το παραπάνω διάγραμμα, υπολογίστηκε η κλίση της ευθείας (a) η οποία ισούται με 1,3653. Η κλίση χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του φθορισμού του ελεύθερου 1-NPN σε απουσία πρωτεΐνης (background).

Η K_D του 1-NPN για την AgamOBP5 βρέθηκε να είναι 6,031 ± 1,095 μM Ο υπολογισμός της πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μη γραμμικής παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων, προσαρμοσμένη σε καμπύλη κορεσμού με την εξής εξίσωση:

$$y = Bmax \cdot \frac{X}{Kd + X} + Background$$

όπου Bmax: η μέγιστη τιμή φθορισμού και X: οι συγκεντρώσεις του 1-NPN.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



3.2.2 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} των αιθέριων ελαίων για την πρωτεΐνη AgamOBP1

Οι σταθερές IC_{50} των αιθέριων ελαίων, προσδιορίστηκαν σε διαλύματα που περιείχαν 2μM AgamOBP1, σταθερή συγκέντρωση της ένωσης 1-NPN 10μM και ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris, 100mM NaCl. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, με τιτλοδότηση αιθέριου ελαίου. Συνολικά μελετήθηκαν 7 διαφορετικές περιεκτικότητες αιθέριων ελαίων (0,001, 0,0013, 0,002, 0,004, 0,01, 0,02 και 0,1 % v/v). Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα Prism [73]. Η σταθερά IC_{50} προσδιορίστηκε με τη χρήση της μη γραμμικής παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων, προσαρμοσμένη στο μοντέλο ενός σημείου (one-site model) σε ανταγωνιστικές συνθήκες. Ο υπολογισμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της εξής εξίσωσης:

$$y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{X - LogIC50}}$$

όπου *Bottom* είναι η τιμή φθορισμού του συμπλόκου AgamOBP1-1NPN απουσία αιθέριου ελαίου και *Top* είναι η ένταση φθορισμού στη μέγιστη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου. Επίσης έγινε η μετατροπή της έντασης φθορισμού σε %φθορισμό με τη χρήση του τύπου:

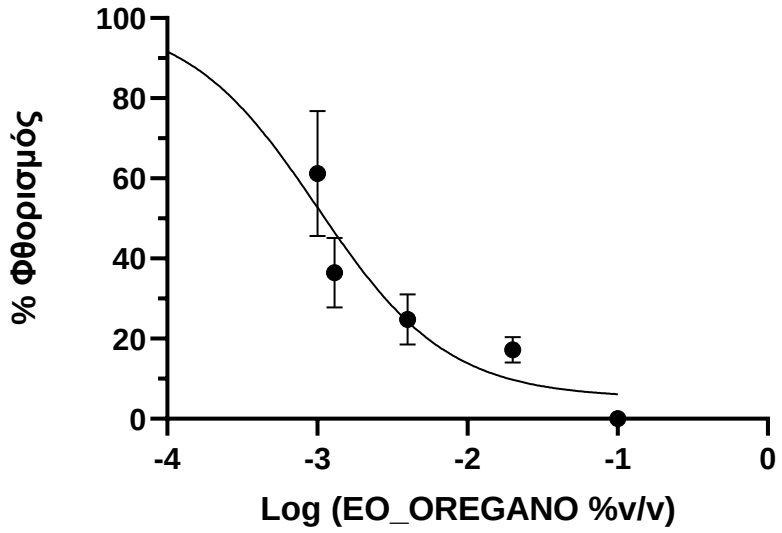
$$\%Fluorescence = \frac{Ix - Imin}{Imax - Imin} \cdot 100$$

όπου I_x είναι η ένταση φθορισμού σε κάθε μέτρηση, I_{max} είναι η ένταση φθορισμού του συμπλόκου AgamOBP1-1NPN χωρίς την παρουσία αιθέριου ελαίου και I_{min} είναι η ένταση φθορισμού στη μέγιστη συγκέντρωση αιθέριου ελαίου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

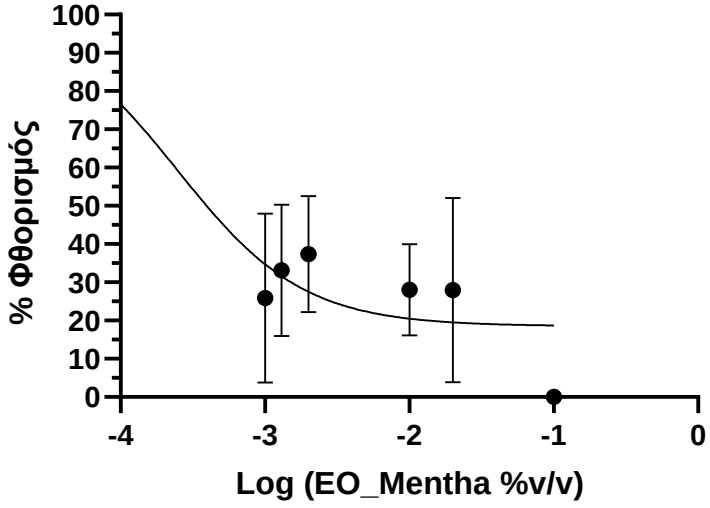
3.2.2.1 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} του αιθέριου ελαίου της ρίγανης για την AgamOBP1

Η σταθερά IC_{50} του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (Oregano Essential Oil) για την AgamOBP1 βρέθηκε να είναι ίση με 0,001 ± 0,0003 %v/v.



3.2.2.2 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} του αιθέριου ελαίου δυόσμου για την AgamOBP1

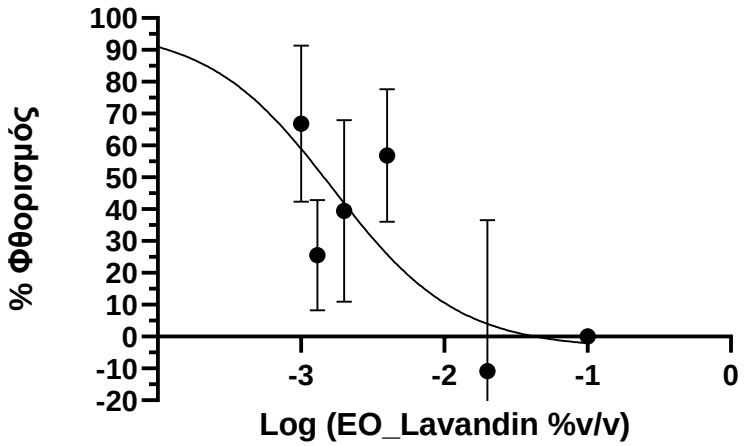
Η σταθερά IC_{50} του αιθέριου ελαίου δυόσμου (*Mentha spicata* Essential Oil) για την AgamOBP1 δεν κατέστη δυνατόν να προσδιοριστεί καθώς τα δεδομένα φθορισμού συσσωρεύονται περί της μια μέσης τιμής 30,48 RFU για τις συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου από 0,001 έως 0,1 %v/v που δοκιμάστηκαν. Πιθανόν τα συστατικά του εν λόγω αιθέριου ελαίου δεν προσδένονται ειδικά στο κέντρο σύνδεσης του 1-NPN στην AgamOBP1.



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

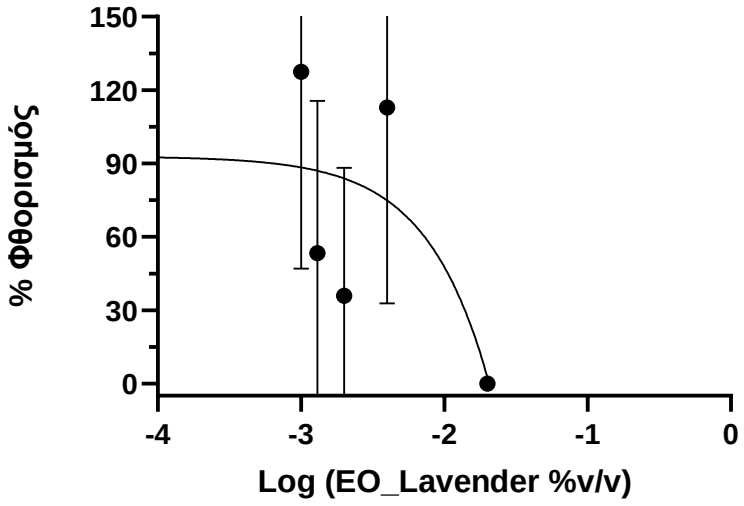
3.2.2.3 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} του αιθέριου ελαίου λεβαντίνης για την AgamOBP1

Η σταθερά IC_{50} του αιθέριου ελαίου λεβαντίνης (Lavandin Essential Oil) για την AgamOBP1 βρέθηκε να είναι ίση με 0,0013 ± 0,0007 % v/v.



3.2.2.4 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} του αιθέριου ελαίου λεβάντας για την AgamOBP1

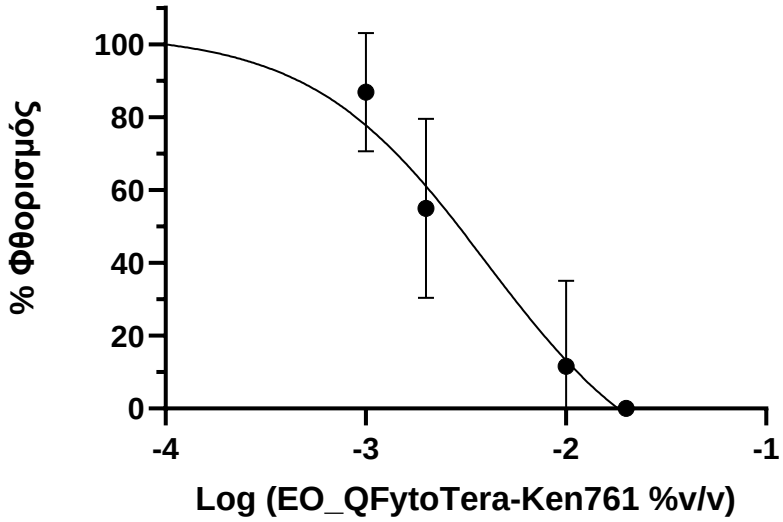
Η σταθερά IC_{50} του αιθέριου ελαίου λεβάντας (Lavander Essential Oil) για την AgamOBP1) για την AgamOBP1 δεν κατέστη δυνατόν να προσδιοριστεί καθώς τα δεδομένα φθορισμού παρουσιάζουν ανώμαλη συμπεριφορά στο εύρος των συγκεντρώσεων αιθέριου ελαίου από 0,001 έως 0,1 %v/v που δοκιμάστηκαν. Πιθανόν τα συστατικά του εν λόγω αιθέριου ελαίου δεν προσδένονται ειδικά στο κέντρο σύνδεσης του 1-NPN στην AgamOBP1 όπως υποδεικνύεται και την ύπαρξη τιμών φθορισμού που υπερβαίνον το 100% της έντασης του φθορισμού.



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

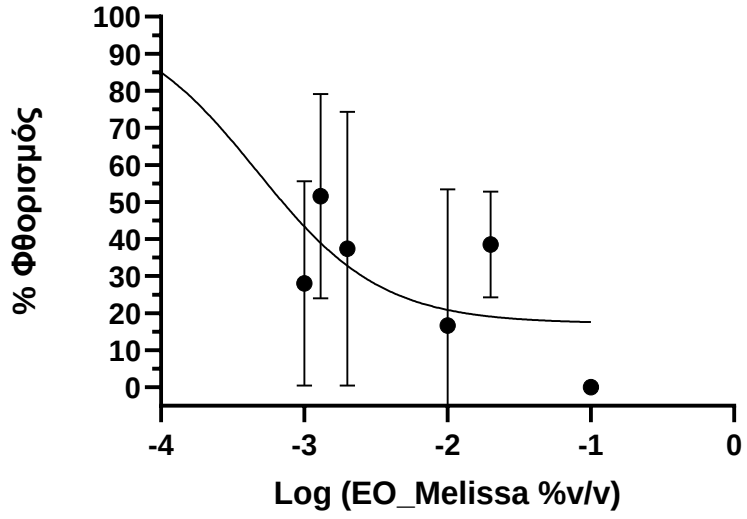
3.2.2.5 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} του αιθέριου ελαίου QFytoTera-Ken761 για την AgamOBP1

Η σταθερά IC_{50} του αιθέριου ελαίου QFytoTera-Ken761 (Organic Essential Oil) για την AgamOBP1 βρέθηκε να είναι ίση με 0,003975 ± 0,00033 %v/v.



3.2.2.6 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} του αιθέριου ελαίου μελισσόχορτου για την AgamOBP1

Η σταθερά IC_{50} του αιθέριου ελαίου μελισσόχορτου (*Melissa officinalis* Essential Oil) για την AgamOBP1 δεν κατέστη δυνατόν να προσδιοριστεί καθώς τα δεδομένα φθορισμού συσσωρεύονται περί της μια μέσης τιμής 34,45 RFU για τις συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου από 0,001 έως 0,1 %v/v που δοκιμάστηκαν. Πιθανόν τα συστατικά του εν λόγω αιθέριου ελαίου δεν προσδένονται ειδικά στο κέντρο σύνδεσης του 1-NPN στην AgamOBP1.



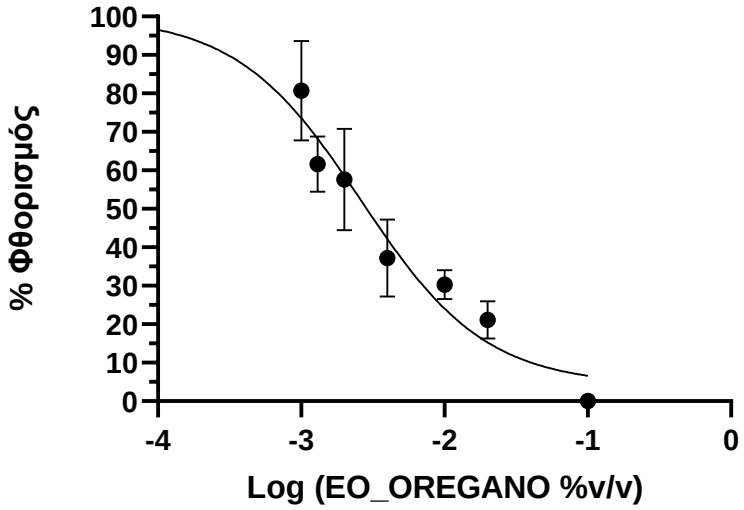
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

3.2.3 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} των αιθέριων ελαίων για την πρωτεΐνη AgamOBP5

Για τον προσδιορισμό της σταθεράς IC_{50} των αιθέριων ελαίων για την AgamOBP5 ακολουθήθηκε η ίδια μεθοδολογία για τον προσδιορισμό της IC_{50} των ελαίων για την AgamOBP1, που περιεγράφηκε στην παράγραφο 3.3.

3.2.3.1 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} του αιθέριου ελαίου της ρίγανης για την AgamOBP5

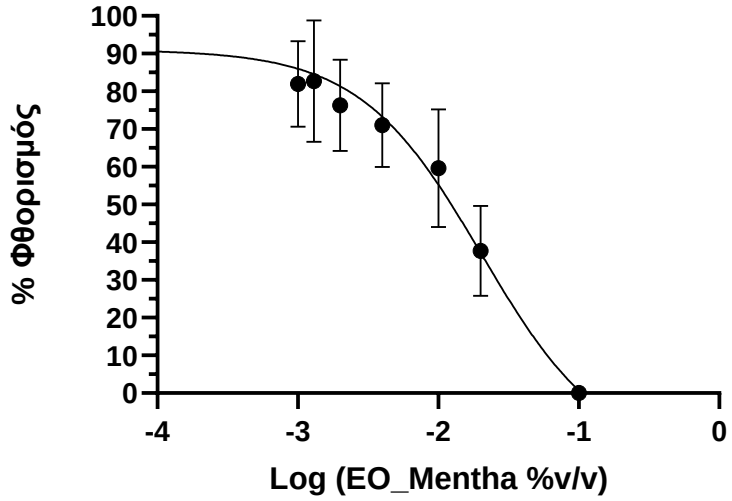
Η σταθερά IC_{50} του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (Oregano Essential Oil) για την AgamOBP5 βρέθηκε να είναι ίση με 0,0026 ± 0,0004 %v/v.



3.2.3.2 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} του αιθέριου ελαίου δυόσμου για την AgamOBP5

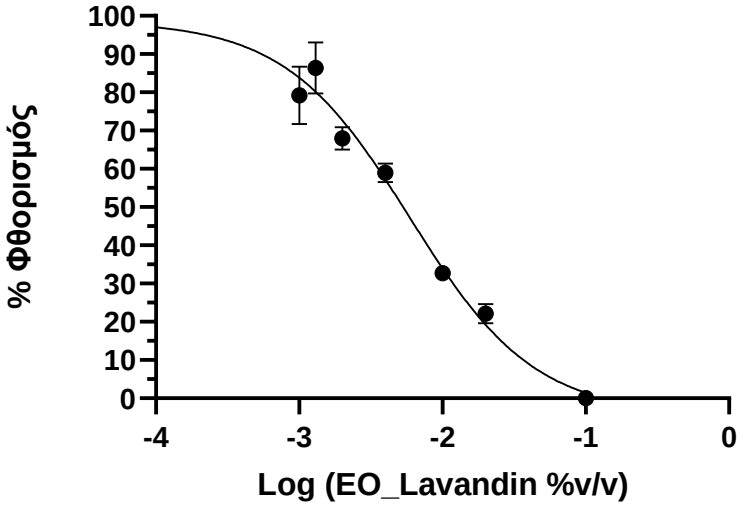
Η σταθερά IC_{50} του αιθέριου ελαίου δυόσμου (*Mentha spicata* Essential Oil) για την AgamOBP5 βρέθηκε να είναι ίση με 0,0204 ± 0,0019 %v/v.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



3.2.3.3 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} του αιθέριου ελαίου λεβαντίνης για την AgamOBP5

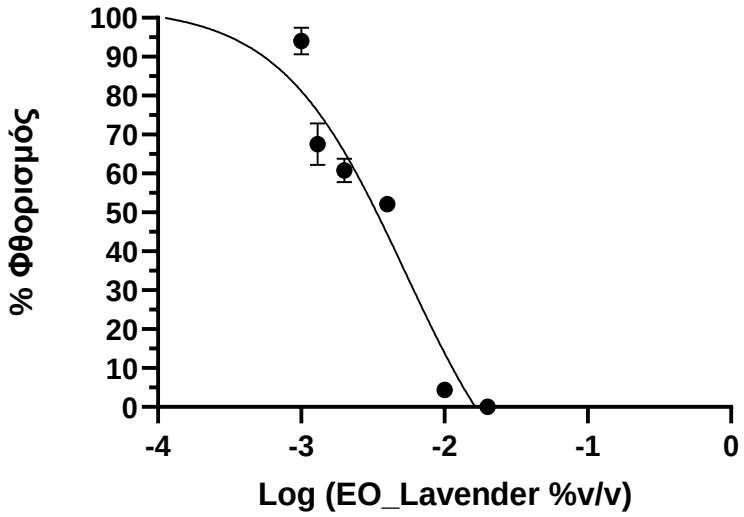
Η σταθερά IC_{50} του αιθέριου ελαίου λεβαντίνης (Lavandin Essential Oil) για την AgamOBP5 βρέθηκε να είναι ίση με 0,0051 ± 0,0005 %v/v.



3.2.3.4 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} του αιθέριου ελαίου λεβάντας για την AgamOBP5

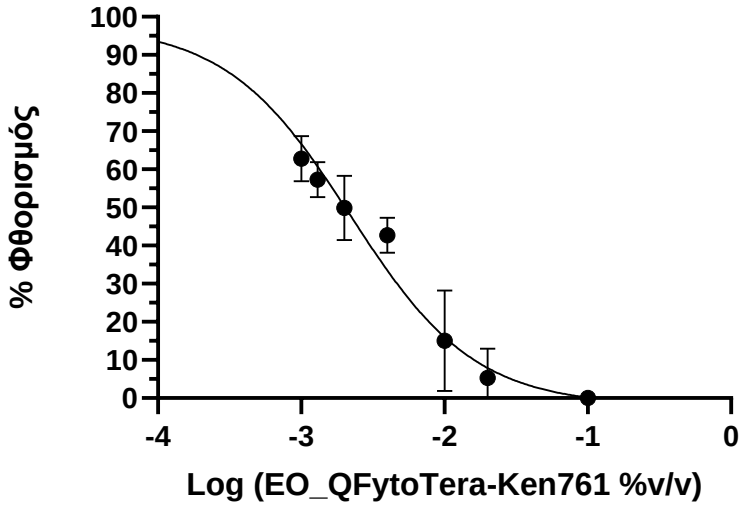
Η σταθερά IC_{50} του αιθέριου ελαίου λεβάντας (Lavander Essential Oil) για την AgamOBP5 βρέθηκε να είναι ίση με 0,0016 ± 0,0003 %v/v.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



3.2.3.5 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} του αιθέριου ελαίου QfytoTera-Ken761 για την AgamOBP5

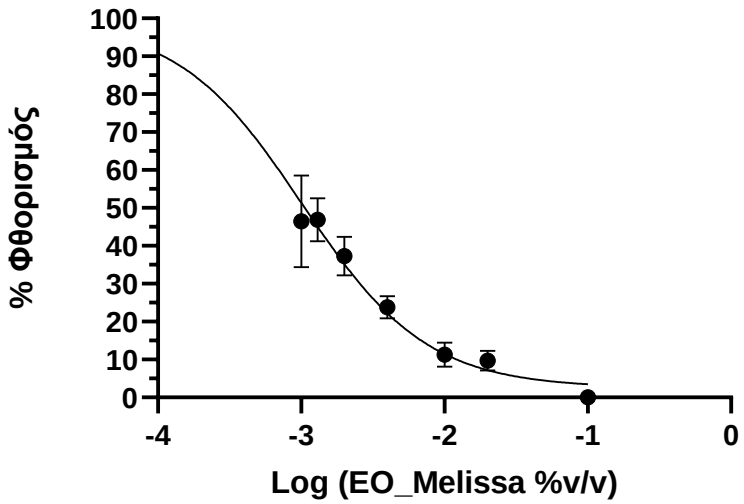
Η σταθερά IC_{50} του αιθέριου ελαίου QfytoTera-Ken761 (Organic Essential Oil) για την AgamOBP5 βρέθηκε να είναι ίση με 0,0020 ± 0,0002 %v/v.



3.2.3.6 Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} του αιθέριου ελαίου μελισσόχορτου για την AgamOBP5

Η σταθερά IC_{50} του αιθέριου ελαίου μελισσόχορτου (*Melissa officinalis* Essential Oil) για την AgamOBP5 βρέθηκε να είναι ίση με 0,0010 ± 0,000076 %v/v.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89



Τα αποτελέσματα πρόσδεσης των αιθέριων ελαίων υπό εξέταση για την AgamOBP1 και την AgamOBP5 συνοψίζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: IC50 των αιθέριων ελαίων σε ποσοστό επί τοις μυριάδας ‱ και % τελική περιεκτικότητα σε τελικό προϊόν.

Αιθέριο Έλαιο	OBP1 IC50 EO ‱ v/v ± SD	OBP5 IC50 EO ‱ v/v	Μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση σε τελικό προϊόν
QFytoTera-Ken761	0,3975±0,033	0,2±0,02	13,2-0,74%
Origanum vulgare	0,1±0,03	0,26±0,04	2,1%
Mentha spicata	N/A	2,04±0,19	0,92%
Hybrid Lavandula intermedia	0,13±0,07	0,51±0,05	2,3%
Lavandula angustifolia	N/A	0,16±0,03	0,6%
Melissa officinalis	N/A	0,1±0,0076	1,6%

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

4. Συζήτηση

Υπάρχουν ποικίλες ασθένειες, οι οποίες μεταδίδονται με το τσίμπημα αιματοφάγων εντόμων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και τα κουνούπια. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μία αυξηση της εμφάνισης ασθενειών, όπως η ελονοσία, ο ιός του δυτικού Νείλου, ο Δάγκειος πυρετός και ο ιός Ζίκα, ακόμα και στις ανεπτυγμένες χώρες. Για αυτό το λόγο παρατηρείται εκτεταμένη χρήση εντομοαπωθητικών, με σκοπό την μείωση της επαφής με τον ανθρώπινο ξενιστή. Τα κυριότερα εντομοαπωθητικά με έγκριση για δερματική χρήση στην κατηγορία των συνθετικών εντομοπωθητικών είναι το DEET, η ικαριδίνη και η ένωση IR3535. Στην κατηγορία των φυτικών εντομοαπωθητικών έγκριση διαθέτει μόνο το αιθέριο έλαιο του φυτού *Corymbia citriodora* (Citriodiol^{TM}) με δραστική ουσία το PMD.

Σήμερα η εκτεταμένη χρήση εντομκτόνων έχει οδηγησει τα κουνούπια στην ανάπτυξη αντίστασης. Επιπλεόν η παγκοσμιοποίηση του εμπορίου και των μετακινήσεων έχει συμβάλει στην επανεμφάνιση ασθενειών που μεταδίδονται από έντομα διβιβαστες σε περιοχές όπου ειχαν προηγουμένως εξαλειφθεί, περιλαμβανομένων της ΕΕ και της Αμερικής. Επιπλεόν η αύξηση της θερμοκρασίας λόγω της κλιματικής αλλαγής επιτρέπει την εγκατάσταση ξένων ειδών κώνωπα σε βορειότερα γεωγραφικά πλάτη, σε μεγαλύτερα υψόμετρα και με παρουσία τον χειμώνα. Στην Ελλάδα παράδειγμα αποτελεί το κουνούπι τίγρης *Aedes albopictus* ένα ασιατικό χωροκατακτητικό είδος που προτοεμφανίστηκε στο Ιόνιο το 2003 και το 2008 στην Αθήνα.

Τα εντομοαπωθητικά αποτελούν σημαντικό κομμάτι μιας ολοκληρωμένης στρατηγικής πρόληψης της μετάδοσης ασθενειών από έντομα και αποτελούν ένα μέτρο προσωπικής προστασίας που δεν εξαρτάται από την διαχείριση του προβλήματος σε επίπεδο κοινότητας και αρμοδίων φορέων υγείας.

Τα τελευταία χρόνια οι καταναλωτές δείχνουν ολοένα και μεγαλύτερη προτίμηση στα φυσικά προϊόντα. Το γεγονός αυτό οφείλεται τόσο στην αντίληψη ότι τα φυσικά προϊόντα είναι περισσότερο ασφαλή εν συγκρίσει με τα χημικά όσο και στο γεγονός ότι είναι περισσότερο φιλικά προς το περιβάλλον. Το κύριο πρόβλημα των φυσικών εντομοαπωθητικών είναι ότι οι χημικές ουσίες που τα συνθέτουν είναι πτητικές, προσφέροντας μικρή διάρκεια ζωής στο προϊόν. Επιπλέον, στο μίγμα των δραστικών ουσίων που περιέχονται σε ένα αιθέριο έλαιο αρωματικού φυτού, είναι σχεδόν βέβαιο πως περιλαμβάνονται και αλλεργιογόνες ή εν δυνάμει τοξικές χημικές ενώσεις. Επομένως είναι απαραίτητος ο έλεγχος της σύστασης και ο προσδιορισμός της κατάλληλης δόσης, για την αποφυγή εμφάνισης αλλεργικών αντιδράσεων και τοξικότητας έπειτα από τη χρήση τους. Για αυτό το λόγο στην Ευρώπη δημιουργήθηκε μία λίστα η οποία περιλαμβάνει 57 αρωματικές ουσίες, που χαρακτηρίζονται ως δερματικά αλλεργιογόνα και πρέπει να περιέχονται σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις για την αποφυγή ερεθισμών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

Για την παραγωγή φυτικών εντομοαπωθητικών είναι απαραίτητη η καλλιέργεια των αντίστοιχων φυτικών ειδών. Στην Ελλάδα είναι γνωστό πως φύονται αρκετά αρωματικά φαρμακευτικά φυτά, περισσότερα από 150 είδη, τα οποία όμως παραμένουν αναξιοποίητα καθώς η συστηματική καλλιέργεια Ελληνικών αρωματικών φυτών περιορίζεται σε μονοψήφιο αριθμό ειδών (https://www.ypaithros.gr/ekdoseis/aromatika-farmakeutika-fita-stin-ellada/), ενώ περίπου το μισό των καλλιεργούμενων εκτάσεων (11.000 στρέματα) μονοπολείται από ένα είδος, την ρίγανη. Συνήθως η προμήθεια των συγκεκριμένων φυτών γίνεται από φυτώρια, τα οποία χρησιμοποιούν σπόρους που προμηθεύονται από το εξωτερικό, είτε χρησιμοποιούν φυτά που πολλαπλασιάζονται με αγενή αναπαραγωγή. Σε κάθε περίπτωση συνήθως δεν πραγματοποιούνται διαδικασίες δοκιμής και επιλογής των φυτών, με αποτέλεσμα οι σπόροι και τα φυτά που βρίσκονται στην αγορά να μην διαθέτουν κανένα ιστορικό και καμία ταυτότητα. Επομένως υπάρχει σοβαρός κίνδυνος διάβρωσης των ενδημικών φυτών από μεταφορά γενετικού υλικού από εισαγόμενα είδη.

Ένα επιτυχημένο παράδειγμα ωφέλειας της οικονομίας από την αξιοποίηση μιας καλλιέργειας φυτού για χρήση σε εντομοαπωθητικά προιόντα αποτελεί το φυτό *Eucalyptus citriodora*. Παρόλο που η χώρα προέλευσης του φυτού είναι η Αυστραλία, οι δύο μεγαλύτερες χώρες παραγωγής και εξαγωγής του αιθέριου έλαιου του φυτού είναι η Βραζιλία και η Κίνα. Στη Βραζιλία υπολογίζεται πως στην παραγωγή του *E.citriodora* συμμετέχουν περίπου 11.000 οικογένειες, ενώ στην Κίνα περίπου 2.000-3.000 άνθρωποι. Με αυτόν τον τρόπο η καλλιέργεια του φυτού συμβάλλει στην οικονομία των χωρών παραγωγής και επιπλέον συμβάλλει ιδιαίτερα στο περιβάλλον καθώς αυξάνει τον αριθμό δέντροφύτευσης της περιοχής και προστατεύει το έδαφος από πιθανές διαβρώσεις [74]. Το eucalyptus citriodora oil, hydrated, cyclized (ec oil (h/c)) είναι σήμερα η μόνη εγκεκριμένη από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης δραστική ουσία φυτικής προέλευσης για δερματική χρήση στον άνθρωπό. Άλλες ονομασίες που υπάρχουν για το παραπάνω φυτικό έλαιο είναι eucalyptus citiodora Oil ή Έλαιο Κιτρώδη Ευκαλύπτου ή Λεμονώδη Ευκαλύπτου. Όπως φαίνεται από τον πίνακα του υπουργείου για τα εγκεκριμένα της κατηγορίας TP-19 (Απωθητικά-Ελκυστικά Βιοκτόνα) αυτή τη στιγμή δεν χρησιμοποιείται οτιδήποτε ελληνικής παραγωγής. [75].

Το αιθέριο έλαιο ενός αρωματικού φυτού είναι το συστατικό που θα τοποθετηθεί σε ένα τελικό προϊόν. Η ανάπτυξη του κλάδου καλλιέργειας αρωματικών φυτών, πέρα από την αξιοποίηση της πλούσιας Ελληνικής χλωρίδας, θα συμβάλλει και στην βελτίωση της οικονομίας, με τη δημιουργία νέων θέσεων εργασίας. Η αξιοποίηση των αρωματικών φυτών σηματοδοτεί τη δημιουργία νέων καλλιεργειών, όπου τα φυτά θα καλλιεργούνται με τη συνεχή επιτήρηση ειδικού επιστημονικού προσωπικού για την εξασφάλιση της σωστής και ασφαλής διαχείρισης τους. Επίσης ακολουθεί η μεταποίηση των αρωματικών φυτών, η οποία περιλαμβάνει την παραγωγή του αιθέριου ελαίου, με εγγυημένη χημική σύσταση. Επιπλέον, ακολουθούν η παρασκευή, ο έλεγχος, η τυποποίηση, η διανομή και ποικίλα στάδια τα οποία μεσολαβούν έως το προϊόν να φτάσει στα χέρια του καταναλωτή.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο *Δομική Βιολογίας και Χημείας* του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών ως προς την επίδραση αιθέριων ελαίων αρωματικών φυτών, σε επιλεγμένους χημειοϋποδοχείς (OBP) των κουνουπιών. Η βιοχημική μελέτη των OBPs στοχεύει στην κατανόηση του τρόπου αναγνώρισης προσδετών και στην εύρεση νέων φυσικών εντομοαπωθητικών προϊόντων έναντι των κουνουπιών. Ουσίες που αλληλεπιδρούν με τις OBPs έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να έχουν εντομοαπωθητικές ιδιότητες, μειώνοντας έτσι τον αριθμό των δειγμάτων για *in vivo* βιοδοκιμές.

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες για την πρόσδεση αιθέριων ελαίων από έξι αρωματικά φυτά, του ***Origanum vulgare***, του ***Mentha spicata***, του ***Hybrid Lavandula intermedia***, του ***Lavandula angustifolia***, του ***Melissa officinalis*** και του φυτού με κωδικό ***QFytoTera-Ken761*** έναντι των πρωτεϊνών δέσμευσης οσφρητικών μορίων AgamOBP1 και AgamOBP5. Κατά τον προσδιορισμό του φθορισμού του 1-NPN μετά από την σύνδεση του στην πρωτεΐνη AgamOBP1, παρατηρήθηκαν γενικά χαμηλές τιμές έντασης φθορισμού παρουσία 1-NPN, πλησίον των τιμών υποβάθρου του ελεύθερου 1-NPN(background). Κατά συνέπεια ο προσδιορισμός της Kd του 1-NPN και των IC50 των αιθέριων ελαίων συνοδεύεται από μεγάλο σφάλμα. Επίσης, ο προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} για την πρωτεΐνη AgamOBP1 δεν κατέστη εφικτός για όλα τα αιθέρια έλαια. Πιο συγκεκριμένα δεν επιτευχθεί ο προσδιορισμός της IC_{50} των αιθέριων ελαίων *M.spicata*, *L.angustifolia* και *M.officinalis.*. Το γεγονός αυτό, πιθανώς να οφείλεται στην ύπαρξη μη ειδικής σύνδεσης. Ενδεχομένως το μεγάλο μήκος του καναλιού του κέντρου σύνδεσης της AgamOBP1 να επιτρέπει την ταυτόχρονη σύνδεση του 1-NPN και του προσδέτη ή/και ο προσδέτης να συνδέεται σε εξωτερικές υδρόφοβες κοιλότητες της πρωτεΐνης. Η δραστικότητα των προσδετών έχει συνδεθεί σε προηγούμενες μελέτες με τον εξειδικευμένο τρόπο σύνδεσης στο κέντρο πρόσδεσης του DEET ή της ικαριδίνης (Binding mode) [76-78]. Συνεπώς οι προσδέτες που περιέχονται στα συγκεκριμένα αιθέρια έλαια φαίνεται να μην δρούν μέσω της πρωτεΐνης AgamOBP1, και η όποια αυξομείωση του φθορισμού κατά την τιτλοδότηση να οφείλεται σε μη ειδική σύνδεση.

Το αιθέριο έλαιο *QFytoTera-Ken761* φαίνεται να προσδένεται και στις δύο πρωτεΐνες με ισοδύναμο τρόπο, αφού οι τιμές των σταθερών IC_{50} είναι παραπλήσιες. Το ίδιο παρατηρείται και στα αιθέρια έλαια *Origanum vulgare* και *Hybrid Lavandula intermedia*.

Στόχος είναι η εύρεση προσδετών που προσδένονται σε όσο το δυνατόν περισσότερους στόχους (OBPs) και συνεπώς σε περισσότερους ετερομερείς υποδοχείς ORx-ORco. Επίσης σημαντικό κριτήριο για την επιλογή ενός αιθέριου ελαίου είναι το επιτρεπτό όριο χρήσης του, ώστε να μην προκαλεί αλλεργίες και δερματικό ερεθισμό. Τέλος για ένα τελικό προϊόν έχει σημασία το ευχάριστο άρωμα. Για παράδειγμα παρόλο που το αιθέριο έλαιο *Origanum vulgare* φαίνεται να δρα και στις δύο πρωτεΐνες με υψηλή συγγένεια, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε τελικό προϊόν, εξαιτίας της δυσάρεστης οσμής που έχει. Επομένως τα επικρατέστερα αιθέρια έλαια τα οποία συνδυάζουν τη δράση σε περισσότερες από μία πρωτεΐνες,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

υψηλό επιτρεπόμενο ορίο χρήσης και επίσης διαθέτουν ευχάριστο άρωμα είναι το *QFytoTera-Ken761* και το *Hybrid Lavandula intermedia*. Μελλοντικές βιοδοκιμές είναι εν εξελίξει ώστε να προσδιορισθεί η βέλτιστη συγκέντρωση αυτών των αιθέριων ελαίων μεμονωμένα και σε συνδυασμούς τους.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

5. Βιβλιογραφία

1. Painter, J. and E.A. Merritt, *TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models.* Journal of Applied Crystallography, 2006. **39**: p. 109-111.
2. Γιατρόπουλος, Α. *Η παρουσία του Ασιατικού κουνουπιού τίγρης στον κόσμο*. 2013; Available from: https://www.conops.gr/tiger-distribution/#prettyPhoto.
3. Γιατρόπουλος, Α. *Η Παρουσία του Ασιατικού κουνουπιού τίγρης (Aedes albopictus) στην Ελλάδα*. 2013; Available from: https://www.conops.gr/asian-tiger-greece/.
4. Γιατρόπουλος, Α. *Αντιμετώπιση του Ασιατικού κουνουπιού τίγρης*. 2013; Available from: https://www.conops.gr/control-asian-tiger/.
5. Conops, L. *Culex (Culex) pipiens Linnaeus 1758*. 2014.
6. Phillips, M.A., et al., *Malaria.* Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17050.
7. *WHO, Malaria Report* 2019; Available from: https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/world-malaria-report-2019.
8. (ΕΟΔΥ), Ε.Ο.Δ.Υ. *Ελονοσία*. 2019; Available from: https://eody.gov.gr/disease/elonosia/.
9. Saxena, V., B.G. Bolling, and T. Wang, *West Nile Virus.* Clin Lab Med, 2017. **37**(2): p. 243-252.
10. (ΕΟΔΥ), Ε.Ο.Δ.Υ. *Ιός του Δυτικού Νείλου*. 2020; Available from: https://eody.gov.gr/disease/ios-toy-dytikoy-neiloy/.
11. (ΕΟΔΥ), Ε.Ο.Δ.Υ. *Ετήσια έκθεση επιδημιολογικής επιτήρησης της λοίμωξης από ιό του Δυτικού Νείλου σε ανθρώπους*. 2019; Available from: https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/Annual_Report_WNV_2019_GR-1.pdf.
12. Lee, H., S. Halverson, and N. Ezinwa, *Mosquito-Borne Diseases.* Prim Care, 2018. **45**(3): p. 393-407.
13. Guzman, M.G. and E. Harris, *Dengue.* The Lancet, 2015. **385**(9966): p. 453-465.
14. Αθανάσιος Γιατρόπουλος, Μ.Ν. *Η επιδημιολογία του ιού Chikungunya και η σχέση του με τα κουνούπια του γένους Aedes*. 2014; Available from: https://www.conops.gr/epidimiologia-chikungunya/.
15. Musso, D. and D.J. Gubler, *Zika Virus.* Clin Microbiol Rev, 2016. **29**(3): p. 487-524.
16. Conops, L. *Πυρετός Zika*. Available from: https://eody.gov.gr/disease/pyretos-zika/.
17. Monath, T.P. and P.F. Vasconcelos, *Yellow fever.* J Clin Virol, 2015. **64**: p. 160-73.
18. Diaz, J.H., *Chemical and Plant-Based Insect Repellents: Efficacy, Safety, and Toxicity*. Wilderness Environ Med, 2016. **27**(1): p. 153-63.
19. Katz, T.M., J.H. Miller, and A.A. Hebert, *Insect repellents: historical perspectives and new developments.* J Am Acad Dermatol, 2008. **58**(5): p. 865-71.
20. Mustapha Debboun, D.S., Stephen P. Frances, *Insect Repellents: Principles, Methods, and Uses*. 2006, Boca Raton: CRC Press. 495.
21. M. A. Braks, R.A.A., and B. G. Knols, *Infochemicals in mosquito host selection: Human skin microflora and Plasmodium parasites.* Parasitology Today, 1999. **15**: p. 409.
22. Leal, W.S., *Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes.* Annu Rev Entomol, 2013. **58**: p. 373-91.
23. Anton, S., *Central olfactory pathways in mosquitoes and other insects.* Ciba Foundation Symp, 1996. **200**: p. 184-92.
24. Guidobaldi, F., I.J. May-Concha, and P.G. Guerenstein, *Morphology and physiology of the olfactory system of blood-feeding insects.* J Physiol Paris, 2014. **108**(2-3): p. 96-111.
25. Hallem, E.A., A. Dahanukar, and J.R. Carlson, *Insect odor and taste receptors.* Annu Rev Entomol, 2006. **51**: p. 113-35.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

26. Ray, A., *Reception of odors and repellents in mosquitoes.* Curr Opin Neurobiol, 2015. **34**: p. 158-164.
27. Sisi Chen, C.W.L., *Identification of New Agonists and Antagonists of the Insect Odorant Receptor Co-Receptor Subunit.* PLOS ONE, 2012. **7**(5): p. e36784.
28. Panagiota Tsitoura, K.I., *Positive Allosteric Modulation of Insect Olfactory Receptor Function by ORco Agonists.* Front Cell Neurosci, 2016. **10**: p. 275.
29. Nanfack Minkeu, F. and K.D. Vernick, *A Systematic Review of the Natural Virome of Anopheles Mosquitoes.* Viruses, 2018. **10**(5).
30. Biessmann, H., et al., *Microarray-based survey of a subset of putative olfactory genes in the mosquito Anopheles gambiae.* Insect Mol Biol, 2005. **14**(6): p. 575-89.
31. Sun, J.S., S. Xiao, and J.R. Carlson, *The diverse small proteins called odorant-binding proteins.* Open Biol, 2018. **8**(12): p. 180208.
32. Leite, N.R., et al., *Structure of an odorant-binding protein from the mosquito Aedes aegypti suggests a binding pocket covered by a pH-sensitive "Lid".* PLoS One, 2009. **4**(11): p. e8006.
33. Fan, J., et al., *An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception.* Genet Mol Res, 2011. **10**(4): p. 3056-69.
34. Breer, H., *Olfactory receptors: molecular basis for recognition and discrimination of odors.* Anal Bioanal Chem, 2003. **377**(3): p. 427-33.
35. Brito, N.F., M.F. Moreira, and A.C. Melo, *A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception.* J Insect Physiol, 2016. **95**: p. 51-65.
36. Suh E, e.a., *Peripheral olfactory signaling in insects.* Current Opinion in Insect Science 2014. **6**: p. 86-92.
37. Paolo Pelosi, I.I., Jiao Zhu, Guirong Wang, Francesca R. Dani, *Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects.* Biological Reviews, 2018. **93**: p. 184-200.
38. Leal, W.S., *Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes.* Annual Review of Entomology, Vol 58, 2013. **58**: p. 373-391.
39. Vieira, F.G. and J. Rozas, *Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the Arthropoda: origin and evolutionary history of the chemosensory system.* Genome Biol Evol, 2011. **3**: p. 476-90.
40. Zhou, J.J., et al., *Identification of odorant-binding proteins of the yellow fever mosquito Aedes aegypti: genome annotation and comparative analyses.* Insect Mol Biol, 2008. **17**(2): p. 147-63.
41. Sandler, B.H., et al., *Sexual attraction in the silkworm moth: structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex.* Chem Biol, 2000. **7**(2): p. 143-51.
42. Tegoni, M., V. Campanacci, and C. Cambillau, *Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects.* Trends Biochem Sci, 2004. **29**(5): p. 257-64.
43. Pelosi, P., et al., *Soluble proteins in insect chemical communication.* Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(14): p. 1658-76.
44. Wogulis, M., et al., *The crystal structure of an odorant binding protein from Anopheles gambiae: evidence for a common ligand release mechanism.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(1): p. 157-64.
45. Liggri PGV, e.a., *The structure of AgamOBP5 in complex with the natural insect repellents Carvacrol and Thymol: Crystallographic, fluorescence and thermodynamic binding studies.* Unpublished work.
46. Λίγγρη, Π., *Δομική και βιοχημική μελέτη πρωτεϊνών δέσμευσης οσφρητικών μορίων από έντομα.* Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, υπό προετοιμασία.
47. Rund SSC, e.a., *Extensive circadian and light regulation of the transcriptome in the malaria mosquito Anopheles gambiae.* Bmc Genomics, 2013. **14**: p. 218.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

48. Krober, T., et al., *Odorant-binding protein-based identification of natural spatial repellents for the African malaria mosquito Anopheles gambiae.* Insect Biochem Mol Biol, 2018. **96**: p. 36-50.
49. Trias Thireou, G.K., Katerina E. Tsitsanou, Konstantinos Koussis, Christina E. Drakou, Julie Kinnersley, Thomas Kröber, Patrick M. Guerin, Jing-Jiang Zhou, Kostas Iatrou, Elias Eliopoulos and Spyros E. Zographos, *Identification of novel bioinspired synthetic mosquito repellents by combined ligand-based screening and OBP-structure-based molecular docking.* Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2018. **98**: p. 48-61.
50. Δήμα, Ε., *Απομόνωση πτητικών μεταβολιτών με πιθανή εντομοαπωθητική δράση και μελέτη της πρόσδεσής τους στις πρωτεΐνες πρόσδεσης οσμογόνων των κουνουπιών. .* Διπλωματική Εργασία, ΕΚΠΑ, 2014.
51. Aphrodite Kantsa, S.S., Michail Vaitis, Theodora Petanidou, *Plant Volatilome in Greece: a Review on the Properties, Prospects, and Chemogeography.* CHEMISTRY & BIODIVERSITY, 2015. **12**: p. 1466-1480.
52. Nikitas Karagiannidis, H.P.-F., Diamando Lazari, Ioannis Ipsilantis, Christina Karagiannidou, *Essential Oil Content and Composition, Nutrient and Mycorrhizal Status of Some Aromatic and Medicinal Plants of Northern Greece.* Natural Product Communications, 2010. **5**: p. 823-830.
53. Chuang, D.M., C. Hough, and V.V. Senatorov, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 269-90.
54. Novagen. Available from: https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/pET-22b+-DNA-Novagen,EMD_BIO-69744?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F.
55. Πουλάς Κ, Σ.Σ., *Εργαστηριακές μέθοδοι ανάλυσης πρωτεϊνών*. 2015, Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών.
56. John M, C.J., Robertt L Switzer, *Πειραματική Βιοχημεία*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
57. GE, H., *Ion Exchange Chromatography. Principles and Methods.* GE HealthCare, 2010.
58. GE, h., *Gel filtration Principles and Methods.* HealthCare GE, 2010.
59. Garfin, D.E., *Gel electrophoresis of proteins.* Essential Cell Biology, 2003. **1**: p. 197-268.
60. MM, B., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Analytical Biochemistry, 1976. **72**.
61. Lebendiker M, D.T., *Produstion of prone-to-aggregate proteins.* FEBS letters, 2014. **588**(2): p. 236-46.
62. Bell CE, L.M., *A closer view of the comformation of the Lac repressor bound to operator.* Nature structural biology, 2000. **7**: p. 209-14.
63. Robert B. Brown, J.A., *Current techniques for single-cell lysis.* Journal of the Royal Society, 2008. **5**: p. 131-8.
64. Jayaranjan R. Kar, R.S.S., *Investigations on ideal mode of cell disruption in extremely halophilic Actinopolyspora halophila (MTCC 263) for efficient release of glycine betaine and trehalose.* Biotechnology Reports, 2015. **5**: p. 89-97.
65. K. E. Tsitsanou, T.T., C. E. Drakou, K. Koussis, M. V. Keramioti, D. D. Leonidas, E. Eliopoulos, K. Iatrou, S. E. Zographos, *Anopheles gambiae odorant binding protein crystal complex with the synthetic repellent DEET: implications for structure-based design of novel mosquito repellents.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2012. **68**: p. 283-297.
66. Tsitsanou, K.E., et al., *Crystal and Solution Studies of the "Plus-C" Odorant-binding Protein 48 from Anopheles gambiae CONTROL OF BINDING SPECIFICITY THROUGH*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89

THREE-DIMENSIONAL DOMAIN SWAPPING. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(46): p. 33427-33438.
67. R.C. Nairn, J.M.R., *Fluorescent probes to detect lymphocyte activation.* Clin. exp. Immunology, 1980. **39**: p. 1-13.
68. Valeur, B., *Effect of polarity on fluorescence emission. Polarity probes, in Molecular Fluorescence: Principles and Applications.* Wiley-VCH Verlag GmbH ISBNs, 2001. **3**: p. 527-299119-X.
69. E.D. Matayoshi, A.M.K., *Emission-wavelength-dependent decay of the fluorescent probe N-phenyl-1-naphthylamine.* Biochimica et Biophysica Acta, 1981. **644**: p. 233-243.
70. Deshayes, S. and G. Divita, *Fluorescence technologies for monitoring interactions between biological molecules in vitro.* Prog Mol Biol Transl Sci, 2013. **113**: p. 109-43.
71. *One site-specific binding was performed using GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com".*
72. Alexacou, K.M., et al., *Crystallographic and computational studies on 4-phenyl-N-(beta-D-glucopyranosyl)-1H-1,2,3-triazole-1-acetamide, an inhibitor of glycogen phosphorylase: comparison with alpha-D-glucose, N-acetyl-beta-D-glucopyranosylamine and N-benzoyl-N'-beta-D-glucopyranosyl urea binding.* Proteins, 2008. **71**(3): p. 1307-23.
73. *One site-Fit logIC50 was performed using GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com".*
74. *ESSENTIAL OILS AND OLEORESINS MARKET INSIDER.* International Trade Centre, Έκθεση 2016.
75. *Απωθητικά και προσελκυστικά (ΤΠ-19)*. Available from: http://wwww.minagric.gr/syspest/syspest_bycat_byactive.aspx.
76. Thireou, T., et al., *Identification of novel bioinspired synthetic mosquito repellents by combined ligand-based screening and OBP-structure-based molecular docking.* Insect Biochem Mol Biol, 2018. **98**: p. 48-61.
77. Drakou, C.E., et al., *The crystal structure of the AgamOBP1*Icaridin complex reveals alternative binding modes and stereo-selective repellent recognition.* Cell Mol Life Sci, 2017. **74**(2): p. 319-338.
78. Zographos, S.E., et al., *OBP-structure-aided repellent discovery: An emerging tool towards the prevention of mosquito-borne diseases*, in *Computational design of chemicals for the control of mosquitoes and their diseases*, J. Devillers, Editor. 2018, CRC press book series "QSAR in Environmental and Health Sciences" p. 65-105.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 12:39:38 EEST - 3.139.236.89