

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Φλαμπούρη Α. Ευαγγελία

Μελέτη της επίδρασης ουσιών
με μυκητοκτόνο-κυτταροτοξική δράση
σε κυτταρικούς πληθυσμούς με εξειδικευμένα
χαρακτηριστικά μέσω μετά-μεταγραφικής
τροποποίησης αυτών για χρήση
σε βιοαισθητήρες

Επιβλέπων Καθηγητής: Σπυρίδων Κίντζιος



ΑΘΗΝΑ 2015

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ
ΔΙΑΤΡΙΒΗ



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**«Μελέτη της επίδρασης ουσιών με μυκητοκτόνο-κυτταροτοξική δράση
σε κυτταρικούς πληθυσμούς με εξειδικευμένα
χαρακτηριστικά μέσω μετά-μεταγραφικής τροποποίησης αυτών
για χρήση σε βιοαισθητήρες»**

**ΦΛΑΜΠΟΥΡΗ Α. ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Επιβλέπων Καθηγητής: Σπυρίδων Κίντζιος

ΑΘΗΝΑ

2015

Η αποδοχή για την εκπόνηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύθεσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (ΓΣΕΣ, 10^η/19-3-2009). Ο ορισμός της τριμελούς επιτροπής και η ανάθεση του θέματος έγιναν με αποφάσεις των ΓΣΕΣ (11^η/7-4-2009) και (81^η/12-7-2009), αντίστοιχα. Η τροποποίηση του θέματος εγκρίθηκε με απόφαση της (9^η/11-04-14) ΓΣΕΣ, ενώ η επταμελής εξεταστική επιτροπή ορίστηκε κατά την (4^η/12-11-2014) ΓΣΕΣ.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Σ. Κίντζιος (επιβλέπων): Καθηγητής Κυτταρο-/Ιστοκαλλιέργειας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ι. Κλώνης: Καθηγητής Ενζυμικής Τεχνολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ν. Λάμπρου: Καθηγητής Ενζυμικής Τεχνολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Σ. Κίντζιος (επιβλέπων): Καθηγητής Κυτταρο-/Ιστοκαλλιέργειας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ι. Κλώνης: Καθηγητής Ενζυμικής Τεχνολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Η. Ηλιόπουλος: Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ν. Λάμπρου: Καθηγητής Ενζυμικής Τεχνολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ε. Φλεμετάκης: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ε. Ντούνη: Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Π. Σκανδάμης: Επίκουρος Καθηγητής Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα. (Ν. 5343/1932 άρθρο 202).

Από την παρούσα διδακτορική διατριβή προέκυψαν οι εξής δημοσιεύσεις:

1. Nafion and Polylysine treated PEDOT mammalian cell biosensor, E. Flampouri and S. Kintzios. Proc. Eurosensors XXV, Σεπτέμβριος 4-7, 2011, Αθήνα, Ελλάδα.
2. Nafion and Polylysine Treated PEDOT Mammalian Cell Biosensor. E. Flampouri, S. Kintzios. Procedia Engineering, Τεύχος 25, 2011, Σελ. 976–979
3. Biochemical effects of complex III Qo site respiratory chain inhibitor kresoxim-methyl on mammalian cell lines, Flampouri E, Mavrikou S, Kintzios S., 2ο Συνέδριο Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Οκτώβριος 4-5, 2012, Αθήνα, Ελλάδα.
4. Study of a cell based electrochemical Biosensor for Fungicide Cytotoxicity Evaluation on Mammalian Cell Lines, E. Flampouri, S. Mavrikou, S. Kintzios, 2nd International Conference on Bio-Medical Instrumentation and related Engineering and Physical Sciences, Ιούνιος 21-22, 2013, Αθήνα, Ελλάδα.

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοτεχνολογίας στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, το οποίο οδηγεί στην απονομή Διδακτορικού Διπλώματος, με επιβλέποντα τον Καθηγητή Κίντζιο Σπυρίδωνα. Η σχετική ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του Τμήματος Βιοτεχνολογίας της Σχολής Τροφίμων Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή και Κοσμήτορα της Σχολής κ. Σπυρίδωνα Κίντζιο για την ευκαιρία που μου έδωσε καθώς και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Οι παρατηρήσεις και υποδείξεις του ήταν πάντα καίριες για τη δουλειά μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Κλώνη Ιωάννη και τον Καθηγητή κ. Λάμπρου Νικόλαο για την προθυμία τους να συμμετέχουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή της διατριβής μου. Θερμές ευχαριστίες και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή Ηλιόπουλο Ηλία, Πρόεδρο του Τμήματος Βιοτεχνολογίας, τον Επίκουρο Καθηγητή Φλεμετάκη Εμμανουήλ, την Επίκουρη Καθηγήτρια Ντούνη Ελένη και τον Επίκουρο Καθηγητή Σκανδάμη Παναγιώτη, οι οποίοι δέχτηκαν να διαβάσουν και να κρίνουν την παρούσα διδακτορική διατριβή.

Παράλληλα θα ήθελα να αναφέρω τη σημαντική συμβολή του εκλιπόντος Επίκουρου Καθηγητή Αναστάσιου Μαρκόγλου και να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας για τη βοήθεια που μου προσέφεραν στον πειραματισμό Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης.

Η παρούσα διατριβή δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την επιστημονική αλλά και ηθική συμπαράσταση της Μεταδιδακτορικής ερευνήτριας Μαυρίκου Σοφίας, των Υποψηφίων Διδασκόντων Παξινοπούλου-Μουζάκη Χαράς και Μασέλου Νάντιας και της Χριστοπούλου Βασιλικής, οι οποίες υπήρξαν συνάδελφοι και φίλες. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μοσχοπούλου Γεωργία για την απρόσκοπτη λειτουργία και οργάνωση του εργαστηρίου χωρίς την οποία δεν θα ήταν εύκολη η πραγματοποίηση της διατριβής. Ευχαριστώ ακόμα την Μεταδιδακτορική ερευνήτρια Teresa Valero για τις τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας που μου δίδαξε καθώς και τον Υποψήφιο Διδάκτορα Αποστόλου Θεοφύλακτο και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και το φιλικό περιβάλλον που μου προσέφεραν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς και τα αδέρφια μου για την οικονομική και ηθική συμπαράστασή τους. Κυρίως όμως τους ευχαριστώ για την κατανόησή τους καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Λίστα Συντημήσεων

ROS: (Reactive Oxygen Species) Δραστικές μορφές οξυγόνου
O^{2•-}: (Superoxide radicals) Ρίζες σουπεροξειδικού ανιόντος
OH[•]: (Hydroxyl radicals) Ρίζες υδροξυλίου
RO[•]: (Alkoxy radicals) Ρίζες αλκοξυλίου
HO₂[•]: (Hydroperoxy radicals) Ρίζες υδρουπεροξυλίου
H₂O₂: (Hydrogen peroxide) Υπεροξείδιο του υδρογόνου
COCl: (Hydrochlorous acid) Υποχλωριώδες οξύ
RNS: (Reactive nitrogen species) Δραστικές μορφές αζώτου
NO[•]: (Nitrogen monoxide) Μονοξείδιο του αζώτου
NO₂[•]: (Nitrogen dioxide) Διοξείδιο του αζώτου
HNO₂: (Nitrous oxide) Νιτρώδες οξύ
ONOO[•]: (Peroxynitrite) Υπεροξεινιτρικό
¹O₂: (Singlet oxygen) Μονήρες οξυγόνο
CoQ: (Coenzyme Q) Συνένζυμο Q
XO: (Xanthine oxidase) Οξειδάση της ξανθίνης
NADPH: Φωσφορικό νικοτιναμινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
LOO[•]: (Lipid peroxy radical) Ρίζα λιπιδικού υπεροξυλίου
LOOH: (Lipid hydroperoxides) Λιπιδικά υδροϋπεροξείδια
SOD: (Superoxide dismutase) Υπεροξειδική δισμουτάση
CAT: (Catalase) Καταλάση
GPx: (Glutathione peroxidase) Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GR: (Glutathione reductase) Αναγωγάση της γλουταθειόνης
GSH: (reduced form of glutathione) ανηγμένη γλουταθειόνη
GSSG: (oxidized form of glutathione) οξειδωμένη γλουταθειόνη
MDA: (Malondialdehyde) Μηλονική διαλδεΐδη
TBARS: (Thiobarbituric Reactive Substances) ουσίες που αντιδρούν με το TBA
TBA: (Thiobarbituric acid) θειοβαρβιτουρικό οξύ
TAC: (Total Antioxidant Capacity) ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
BSA: (Bovine serum albumin) Αλβουμίνη ορού βοοειδών
DPPH: (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 1,1 διφαινυλ-2-πυκριδραζύλιο
EDTA: (Ethylenediaminetetraacetic acid) Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
TCA: (Trichloroacetic acid) τριχλωροοξικό οξύ
DTNB: (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) 5,5' δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ
DNPB: (2,4-dinitrophenylhydrazine) 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη
TBA: (2-thiobarbituric acid) 2-θειοβαβιτουρικό οξύ
GSH: (reduced form of glutathione) ανηγμένη γλουταθειόνη
GSSG: (oxidized form of glutathione) οξειδωμένη γλουταθειόνη
HRP: horseradish peroxidase
NBT: (Nitro Blue Tetrazolium) Νιτροκυανό του τετραζολίου
DMEM: (Dulbecco's modified Eagle's medium) Θρεπτικό μέσο κυτ/ργείας ζωικών κυττάρων
PBS: (phosphate buffered saline) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
FBS: (Fetal bovine serum) Ορός εμβρύου μόσχου
DCF-DA: (2,7-dichlorofluorescein diacetate) 2,7-διχλωροφθορεσκεΐνη διοξικού
NaOH: (Sodium hydroxide) Υδροξείδιο του νατρίου
Nrf2: (Nuclear factor (erythroid-derived 2))
Keap¹: (kelch-like ECH-associated protein 1)
GST: (Glutathione-S-transferase) Τρανσφεράση της γλουταθειόνης
HEPES: 4-(2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπερ- αζινο-αιθανοσουλφονικό οξύ
CDNB: (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο
MgCl₂: (Magnesium chloride) Χλωριούχο μαγνήσιο

Λίστα Εικόνων

Εικόνα 1.1: Σχηματική παρουσίαση της απορρόφησης, κατανομής και απέκκρισης τοξικών ουσιών, (προσαρμογή από Robson et al., 2007, σελ.58).

Εικόνα 1.2: Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος του Nrf2, προσαρμογή από Lakhan et al., 2009.

Εικόνα 1.3: Χημικές δομές μυκητοκτόνων της ομάδας των βενζιμιδαζολικών (benomyl, carbendazim), των καρβαμιδικών (diethofencarb), των δικαρβοξιμιδίων (iprodione), των φαινυκοπυρρολίων (fludioxonil) και των ανιλνοπυριμιδινών (cyprodinil).

Εικόνα 1.4: Χημικές δομές μυκητοκτόνων της ομάδας των υδροξυανιλιδίων (fenhexamid), των αρυλοσουλφαμιδίων (captan), των ανιλιδίων (boscalid) και των διθειοκαρβαμιδικών (mancozeb).

Εικόνα 1.5: Χημικές δομές φυσικών ενώσεων της ομάδας των β-μεθόξυ-ακρυλικών (στρομπιλουρίνη A, oudemansin A και myxothiazol) και χημικές δομές των πρώτων συνθετικών μυκητοκτόνων της ομάδας των στρομπιλουρινών (azoxystrobin και kresoxim-methyl).

Εικόνα 1.6: *Strobilurus tenacellus* (Pers.:Fr.) (1962). Καρποφορίες του βασιδιομύκητα από τον οποίο απομονώθηκαν οι β-μεθόξυ-ακρυλικές ενώσεις: στρομπιλουρίνη A, oudemansin A και myxothiazol.

Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση της δομής του κυτοχρώματος b, διακρίνεται η θέση πρόσδεσης των στρομπιλουρινών Qo και η ροή ηλεκτρονίων από την ουμπικινόλη QH₂ προς το κυτόχρωμα c. (προσαρμογή από http://www.life.illinois.edu/crofts/bioph354/bc-complex_summary.html).

Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση της δομής του βιοαισθητήρα, προσαρμογή από Martins et al., 2013.

Εικόνα 1.9: α: διάγραμμα τριγωνικής μεταβολής δυναμικού του ηλεκτροδίου εργασίας με το χρόνο στην κυκλική βολταμετρία και β: κυκλικό βολταμογράφημα για μια αντιστρεπτή δράση, προσαρμογή από Andrade, et al., 2011.

Εικόνα 1.10: Οι χημικές δομές του PEDOT και του PSS καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση μέσω της δημιουργίας ιοντικού δεσμού, προσαρμογή από Meen et al., 2013.

Εικόνα 3.1: Φωτογραφίες αντίθετης φάσης μονοστοιβάδας ζωντανών κυτάρων N2a και Vero καλλιεργημένων σε DMEM/10% FBS, από ανάστροφο μικροσκόπιο A. Krüss-MBL3200.

Εικόνα 3.2: Αιμοκυτταρόμετρο – πλάκα Neubauer. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που καλύπτει την επιφάνεια μέτρησης είναι 0.1mm³ ή 1×10⁻⁴ ml. Τα νεκρά κύτταρα χρωματίζονται μπλέ.

Εικόνα 3.3: Μεταβολισμός του MTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα. Μικροσκοπική παρατήρηση των κρυστάλλων της φορμαζάνης στο εσωτερικό των κυττάρων N2a και Vero.

Εικόνα 3.4: Πρόσληψη της χρωστικής NR από ζωντανά κύτταρα. Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων N2a και Vero.

Εικόνα 3.5: (A) Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου προσομοίωσης τραύματος δια αμυχής (Scratch-Wound Healing Assay), προσαρμογή από Yarrow et.al. 2004. (B) Μέτρηση της επιφάνειας μέτρησης με την χρήση του λογισμικού ImageJ.

Εικόνα 3.6: Clonogenic Assay σε πλακίδιο έξι βοθρίων, διακρίνονται οι αποικίες που προέρχονται από ένα μεμονωμένο κύτταρο.

Εικόνα 3.7: Μέτρηση κυτταρικών αποικιών με την χρήση του λογισμικού ImageJ. Α. Βοθρίο κυτταροκαλλιέργειας με ορατές αποικίες κυτάρων Vero μετά από χρώση με Commasie Brilliant Blue. Β. Ψηφιοποίηση και αφαίρεση θορύβου της εικόνας Α. Γ. Καταμέτρηση των αποικιών με τη βοήθεια του λογισμικού.

Εικόνα 3.8: Μη-φθορίζων ιχνηθέτης monochlorobimane, ο οποίος όταν ενώνεται με θειόλες, κυρίως η γλουταθειόνη (GSH) φθορίζει ισχυρά.

Εικόνα 3.9: Αντίδραση της MDA με TBA στην οποία βασίζεται η μέθοδος προσδιορισμού TBARS.

Εικόνα 3.10: Μετατροπή του Amplex[®] Red στο φθορίζον μόριο resorufin, παρουσία HPR και H₂O₂.

Εικόνα 3.11: Ηλεκτρόδια μεταξοτυπίας (DropSens-P10). Τα ηλεκτρόδια εργασίας αποτελούνται από το ηλεκτρικά αγωγίμο και διαφανές πολυμερές PEDOT, τα βοηθητικά ηλεκτρόδια (καταγραφής) από γραφίτη, ενώ το ηλεκτρόδιο αναφοράς από άργυρο. Εξαιτίας της βιοσυμβατότητας του PEDOT, μπορεί να πραγματοποιηθεί προσκόλληση κυτάρων στην επιφάνειά του.

Εικόνα 3.12: Τυπικό βολταμογράφημα ηλεκτροδίων PEDOT (DRP-P10), εφαρμοζόμενο δυναμικό: -1V έως +1V, ρυθμός σάρωσης: 100mV s⁻¹, αριθμός κύκλων: 10, διάλυμα PBS.

Εικόνα 3.13: Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας παροδικής διαμόλυνσης (Torpedo^{sirNA}) κυτάρων με παρεμβαλλόμενο RNA, προσαρμοσμένη από Ibidi GmbH.

Εικόνα 3.14: Τυπικό χρωματογράφημα του kresoxim-methyl, υπό συνθήκες μέτρησης όπως αναφέρονται παραπάνω, χρόνος έκλουσης RT=14.57min.

Εικόνα 4.1: Παρατήρηση σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης κυτάρων N2a και Vero, μετά από 24h έκθεση τους στο kresoxim-methyl (συγκέντρωση διαλύτη/φορέα DMSO: 0,05%), κλίμακα 100μm.

Εικόνα 4.2: Επίδραση του kresoxim-methyl στην κυτταρική μετανάστευση μετά από έκθεση 24h σε N2a και Vero, μέσω βιοδοκιμής προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχής (Wound healing assay). Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική από πέντε ανεξάρτητα πειράματα, κλίμακα 100μm.

Εικόνα 4.3: Επίδραση 24h έκθεσης kresoxim-methyl στην ικανότητα δημιουργίας αποικιών κυτάρων N2a και Vero, μέσω βιοδοκιμής κλωνογονικότητας (clonogenic assay, 7 ημερών). Αντιπροσωπευτικές εικόνες τρυβλίων μετά από ψηφιοποίηση και αφαίρεση θορύβου (ImageJ).

Εικόνα 4.4: Μικροσκοπική παρατήρηση κυτάρων N2a και Vero μετά από επίστρωσή τους στο πολυμερές PEDOT και 3h ή 24h επώαση. Τα βέλη υποδεικνύουν τα όρια του βοθρίου, το οποίο περιορίζει την εξάπλωση της κυτταρικής μονοστοιβάδας μόνο στο ηλεκτρόδιο μέτρησης από PEDOT.

Εικόνα 5.1: Διαφοροποιήσεις στη ροή ηλεκτρονίων και ένταση ρεύματος κενών και επικαλυμμένων με κύτταρα ηλεκτροδίων, προσαρμογή από Jeong et al., 2013.

Λίστα Γραφημάτων

Γράφημα 3.1: Τυπική πρότυπη καμπύλη BSA μέσω αντιδραστηρίου Bradford.

Γράφημα 3.2: Τυπική πρότυπη καμπύλη μηλονικής διαλδεΐδης μέσω αντιδραστηρίου TBARS.

Γράφημα 3.3: Τυπική πρότυπη καμπύλη νιτρωδών μέσω αντιδραστηρίου Griess.

Γράφημα 4.1: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=16$, one-way ANOVA, Dunnett's test, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ έναντι μάρτυρα N2a και $\#p \leq 0.05$, $###p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα Vero).

Γράφημα 4.2: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στη σταθερότητα της λυσοσωμικής μεμβράνης κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=16$, one-way ANOVA, Dunnett's test, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ & $***p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα N2a και $###p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα Vero).

Γράφημα 4.3: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στη κινητικότητα κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=6$, one-way ANOVA, Dunnett's test, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα N2a και $###p \leq 0.01$ έναντι μάρτυρα Vero).

Γράφημα 4.4: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στη ικανότητα δημιουργίας αποικιών (clonogenic assay) κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % μέσω των αποδόσεων τρυβλίων (plating efficiencies, PE).

Γράφημα 4.5: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στην ειδική δραστηριότητα GST κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=4$, one-way ANOVA, Dunnett's test, $*p \leq 0.05$ έναντι μάρτυρα N2a, $###p \leq 0.01$ έναντι μάρτυρα Vero).

Γράφημα 4.6: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στην ειδική δραστηριότητα CAT κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=3$, one-way ANOVA, Dunnett's test, $###p \leq 0.01$ και $####p \leq 0.01$ έναντι μάρτυρα Vero).

Γράφημα 4.7: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στην ειδική δραστηριότητα GPx κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=3$, one-way ANOVA, Dunnett's test, $*p \leq 0.05$ έναντι μάρτυρα N2a, $###p \leq 0.01$ και $####p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα Vero).

Γράφημα 4.8: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στην ειδική δραστηριότητα SOD κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=5$, one-way ANOVA, Dunnett's test, $***p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα N2a, $\#p \leq 0.05$ και $###p \leq 0.01$ έναντι μάρτυρα Vero).

Γράφημα 4.9: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου *kresoxim-methyl* στα επίπεδα ενδοκυττάριας γλουταθειόνης κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=10, one-way ANOVA, Dunnett's test, *p \leq 0.5 έναντι μάρτυρα N2a και ####p \leq 0.001 έναντι μάρτυρα Vero).

Γράφημα 4.10: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου *kresoxim-methyl* στα επίπεδα οξειδωσης λιπιδίων (TBARS) κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=3, one-way ANOVA, Dunnett's test, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001 έναντι μάρτυρα N2a και ####p \leq 0.001 έναντι μάρτυρα Vero).

Γράφημα 4.11: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου *kresoxim-methyl* στα επίπεδα ενδοκυτταρικού H₂O₂ κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=4, one-way ANOVA, Dunnett's test, *p \leq 0.05 έναντι μάρτυρα N2a και #p \leq 0.05 έναντι μάρτυρα Vero).

Γράφημα 4.12: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου *kresoxim-methyl* στα επίπεδα εξωκυτταρικού H₂O₂ κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=4, one-way ANOVA, Dunnett's test, **p \leq 0.01 έναντι μάρτυρα N2a και ##p \leq 0.001, ####p \leq 0.001 έναντι μάρτυρα Vero).

Γράφημα 4.13: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου *kresoxim-methyl* στα επίπεδα μιτοχονδριακού O₂- (MitoSOX™ Red) κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=4, one-way ANOVA, Dunnett's test, ***p \leq 0.001 έναντι μάρτυρα N2a και #p \leq 0.05, ####p \leq 0.001 έναντι μάρτυρα Vero).

Γράφημα 4.14: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου *kresoxim-methyl* στα επίπεδα κατακερματισμένου DNA κυττάρων N2a και Vero, μέσω μεθόδου DPA, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό % κατακερματισμού (θραυσματοποιημένο/ολικό DNA). Ένθετο: ηλεκτροφόρηση (DNA ladder) σε πήκτη αγαρόζης DNA κυττάρων N2a και Vero.

Γράφημα 4.15: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου *kresoxim-methyl* στα επίπεδα κασπάσης-3 κυττάρων N2a και Vero, μέσω μεθόδου DPA, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό % σε σχέση με το μάρτυρα.

Γράφημα 4.16: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου *kresoxim-methyl* στα επίπεδα ενδοκυτταρικού ασβεστίου [Ca²⁺] κυττάρων N2a και Vero, μέσω μεθόδου DPA, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=4, one-way ANOVA, Dunnett's test, ##p \leq 0.01, ####p \leq 0.001 έναντι μάρτυρα Vero).

Γράφημα 4.17: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου *kresoxim-methyl* στα επίπεδα νιτρωδών ιόντων (έμμεση εκτίμηση NO) στο μέσο καλλιέργειας κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=4, one-way ANOVA, Dunnett's test, #p \leq 0.05 έναντι μάρτυρα Vero).

Γράφημα 4.18: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου *kresoxim-methyl* στα επίπεδα μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού κυττάρων N2a και Vero, μέσω ιχνηθέτη

TMRE και κανονικοποίηση με MitoTracker® Green FM, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=3$, one-way ANOVA, Dunnett's test, $^{##}p \leq 0.01$, $^{####}p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα Vero).

Γράφημα 4.19: Κυτταρική προσκόλληση και βιωσιμότητα N2a και Vero στο πολυμερές PEDOT μετά από 3h και 24h επώαση. Ο αρχικός αριθμός επίστρωσης ($T=0h$) είναι 4×10^4 κύτταρα ανά cm^2 επιφάνειας πολυμερούς και για τις δύο κυτταρικές σειρές. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν συμβατικά πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας (TCP).

Γράφημα 4.20: α) Χαρακτηριστικά κυκλικά βολταμογραφήματα ηλεκτροδίων PEDOT για διαφορετικούς ρυθμούς σάρωσης δυναμικού, σε περιοχή σάρωσης $-1V \rightarrow +1V$, διάλυμα PBS και ένα κύκλο επεξεργασίας, β) ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα ηλεκτροδίου ανά ρυθμό σάρωσης.

Γράφημα 4.21: Χαρακτηριστικά κυκλικά βολταμογραφήματα ηλεκτροδίων PEDOT σε διάλυμα PBS, περιοχή σάρωσης δυναμικού $-1V \rightarrow +1V$ για 10 κύκλους επεξεργασίας και ρυθμό σάρωσης δυναμικού $100mV s^{-1}$.

Γράφημα 4.22: Χαρακτηριστικά κυκλικά βολταμογραφήματα ηλεκτροδίων PEDOT επιστρωμένα με κύτταρα N2a σε διάλυμα PBS, περιοχή σάρωσης δυναμικού $-1V \rightarrow +1V$ για 10 κύκλους επεξεργασίας και ρυθμό σάρωσης δυναμικού $100mV s^{-1}$.

Γράφημα 4.23: Χαρακτηριστικά κυκλικά βολταμογραφήματα ηλεκτροδίων PEDOT επιστρωμένα με κύτταρα Vero σε διάλυμα PBS, περιοχή σάρωσης δυναμικού $-1V \rightarrow +1V$ για 10 κύκλους επεξεργασίας και ρυθμό σάρωσης δυναμικού $100mV s^{-1}$.

Γράφημα 4.24: Κυκλικά βολταμογραφήματα ανεξάρτητων ηλεκτροδίων PEDOT υπό τις ίδιες συνθήκες μέτρησης, με περιοχή σάρωσης δυναμικού $-1V \rightarrow +1V$ για έναν κύκλο επεξεργασίας και ρυθμό σάρωσης δυναμικού $100mV s^{-1}$.

Γράφημα 4.25: Κυκλικά βολταμογραφήματα ανεξάρτητων ηλεκτροδίων PEDOT επιστρωμένων με κύτταρα N2a, υπό τις ίδιες συνθήκες μέτρησης, με περιοχή σάρωσης δυναμικού $-1V \rightarrow +1V$ για έναν κύκλο επεξεργασίας και ρυθμό σάρωσης δυναμικού $100mV s^{-1}$.

Γράφημα 4.26: Κυκλικά βολταμογραφήματα ανεξάρτητων ηλεκτροδίων PEDOT επιστρωμένων με κύτταρα Vero, υπό τις ίδιες συνθήκες μέτρησης, με περιοχή σάρωσης δυναμικού $-1V \rightarrow +1V$ για έναν κύκλο επεξεργασίας και ρυθμό σάρωσης δυναμικού $100mV s^{-1}$.

Γράφημα 4.27: Ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα κενών και επιστρωμένων με κύτταρα ηλεκτροδίων PEDOT και εσωτερικό γράφημα με τα αντίστοιχα κυκλικά βολταμογραφήματα τους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=3$, one-way ANOVA, Tukey's test, $^{***}p \leq 0.001$ έναντι PEDOT.

Λίστα πινάκων

Πίνακας 1.1: Δραστικές μορφές οξυγόνου, αζώτου και θείου που απαντώνται σε υγιείς και παθογενείς ιστούς, (προσαρμογή από Nordberg et al., 2001).

Πίνακας 1.2: Μέγιστα επιτρεπτά ορία υπολειμμάτων (MRLs) επιλεγμένων αγροτικών προϊόντων (πηγή: Codex Alimentarius, <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html>).

Πίνακας 1.3: Αντιπροσωπευτικές χρήσης ζωικών κυττάρων σε εφαρμογές βιοαισθητήρων στην ασφάλεια τροφίμων, προσαρμογή από Kintzios & Banerjee, 2015.

Πίνακας 3.1: Κύρια συστατικά θρεπτικού μέσου καλλιέργειας DMEM.

Πίνακας 3.2: Τοξικολογικά στοιχεία του kresoxim-methyl, MRLs και επιλεχθείσες συγκεντρώσεις (EFSA, 2010).

Πίνακας 3.3: Ενδεικνυόμενες συνθήκες για τη διαμόλυνση κυττάρων με την χρήση του αντιδραστηρίου Torpedo^{siRNA} της Ibbidi.

Πίνακας 4.1: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στον πολλαπλασιασμό κυττάρων N2a και Vero, (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=6, one-way ANOVA, Dunnett's test, ####p≤0.001 έναντι μάρτυρα Vero).

Πίνακας 5.1: Στατιστικά σημαντικές μεταβολές και συσχετίσεις ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών αποκρίσεων κυττάρων N2a και Vero στο kresoxim-methyl (†, †: p≤0.05, ††, ††: p≤0.01, †††, †††: p≤0.001).

Πίνακας 5.2: Συγκριτικές βιωσιμότητες Vero με ή χωρίς μετά-μεταγραφική σίγηση του Nrf2, έναντι του kresoxim-methyl.

Περίληψη

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται στην κατάσταση, κατά την οποία η ισορροπία ανάμεσα στους οξειδωτικούς παράγοντες και την αντιοξειδωτική άμυνα ενός οργανισμού διαταράσσεται σημαντικά υπέρ των πρώτων, οδηγώντας έτσι στη βλάβη των κυτταρικών συστατικών. Οι ελεύθερες ρίζες και οι ενεργές μορφές οξυγόνου είναι δραστικές ενώσεις που παράγονται φυσικά και μπορούν να ασκήσουν τόσο θετικές όσο και αρνητικές επιπτώσεις στα βιολογικά συστήματα. Για τον περιορισμό των επιβλαβών επιπτώσεων, οι οργανισμοί διαθέτουν πολύπλοκα συστήματα προστασίας, τα αντιοξειδωτικά συστήματα. Αυτά τα συστήματα αποτελούνται από αντιοξειδωτικά ένζυμα (CAT, GPx, SOD) και από μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Η διαταραχή μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας οδηγεί σε μία οξειδωτική κατάσταση, που εμπλέκεται στη διαδικασία της γήρανσης και σε παθολογικές καταστάσεις (π.χ. καρκίνος, ασθένεια Parkinson).

Τα τελευταία χρόνια το ξеноβιοτικά-επαγώμενο οξειδωτικό στρες, ως μηχανισμός τοξικότητας, έχει γίνει αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης. Η παρούσα εργασία εστίασε σε μια σχετικά νέα κατηγορία ξеноβιοτικών ουσιών, τις στρομπιλουρίνες, οι οποίες δρουν ως παρεμποδιστές της κυτταρικής αναπνοής, διαταράσσοντας την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Ο μηχανισμός δράσης των στρομπιλουρινών, ο οποίος συνδέεται άμεσα με την παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια, καθιστά απαραίτητη τη μελέτη της επίδρασης τους στην οξειδωτική ισορροπία των κυττάρων. Για το σκοπό αυτό εκτιμήθηκε η επίδραση του kresoxim-methyl, μιας από τις πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες στρομπιλουρίνες παγκοσμίως, στην οξειδωτική ομοιόσταση κυττάρων θηλαστικών. Η έκθεση του μυκητοκτόνο πραγματοποιήθηκε σε μη θανατηφόρες δόσεις, οι οποίες συμπίπτουν και με τα μέγιστα επιτρεπτά όρια (MRLs) που έχουν θεσπιστεί για την υπολειμματικότητα του σε αγροτικά προϊόντα. Οι κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν ήταν τα κύτταρα νευροβλαστώματος N2a και οι νεφρικοί ινοβλαστες Vero, ενώ διενεργήθηκαν πειράματα κυτταρικής βιωσιμότητας και μετρήθηκαν μια σειρά από ενζυμικοί και μη-ενζυμικοί μηχανισμοί, που εμπλέκονται στις αντιδράσεις οξειδωτικού στρες και απόπτωσης. Οι δύο κυτταρικές σειρές αν και εμφάνισαν παρόμοια αποτελέσματα βιωσιμότητας έναντι του μυκητοκτόνου, έδωσαν διαφορετικές αντιδράσεις σε ότι αφορά την οξειδοαναγωγική τους ισορροπία.

Επιπλέον κατασκευάστηκε κυτταρικός βιοαισθητήρας που βασίστηκε στην καλλιέργεια κυττάρων στην επιφάνεια του βιοσυμβατού και αγώγιμου πολυμερούς PEDOT. Αρχικά εξετάστηκε η κυτταρική προσκόλληση και βιωσιμότητα των δύο

κυτταρικών σειρών στο πολυμερές και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη ηλεκτροδίων PEDOT/κυττάρων μέσω ηλεκτροχημικών μεθόδων. Τέλος έγινε προσπάθεια βελτίωσης της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα μέσω ελέγχου της έκφρασης αποτοξινωτικών και αντιοξειδωτικών γονιδίων των κυττάρων Vero. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μετα-μεταγραφική σίγηση του παράγοντα Nrf2 μέσω παροδικής διαμόλυνσης και χρήση των τροποποιημένων κυττάρων ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης του αισθητήρα. Ο κυτταρικός βιοαισθητήρας εμφάνισε υψηλή συσχέτιση με τον αριθμό κυττάρων, αλλά και με την συγκέντρωση μυκητοκτόνου και αύξησε την ευαισθησία του μετά την εφαρμογή της μετα-μεταγραφικής σίγησης, καταδεικνύοντας τη σημασία του τροποποιημένου στοιχείου βιοαναγνώρισης.

Επιστημονικό πεδίο: Βιολογικές Επιστήμες

Λέξεις - κλειδιά: Τοξικολογία; Ξενοβιοτικά; Οξειδωτικό στρες; Βιοαισθητήρες

Abstract

Oxidative stress is defined as a disturbance in the balance between the production of reactive oxygen species (free radicals) and antioxidant defenses. Free radicals and reactive oxygen species are naturally occurring reactive compounds that exert both positive and negative effects. To counteract the harmful effects, organisms have developed complex defense mechanisms that constitute the antioxidant response mechanisms. These mechanisms include antioxidant enzymes (CAT, GPx, SOD) and non-enzymatic antioxidants (vitamin C, GSH). The imbalance between free radical production and antioxidant defenses leads an oxidative state, which is associated with the process of aging and with pathological conditions such as cancer and Parkinson's disease.

In recent years, xenobiotics-induced oxidative stress as a mechanism of toxicity has been the subject of extensive research. The present study is focused on a relatively new class of xenobiotics, strobilurins, which act as inhibitors of cellular respiration, disrupting the electron transport chain in mitochondria. Their mode of action, which is directly linked to ROS production in mitochondria, makes it necessary to study their effect on the oxidative imbalance of mammalian cells. For this purpose, we studied the effect of kresoxim-methyl, one of the most widely used strobilurin fungicides, on the oxidative homeostasis in mammalian cells. Cells were exposed to non-lethal doses of the fungicide, which coincide with the maximum residue levels (MRLs) established for kresoxim-methyl in agricultural commodities. The cell lines used in our study, were N2a neuroblastoma cells and Vero renal fibroblasts. The effects of the fungicide were assessed through cell viability tests and a series of enzymatic and non-enzymatic markers of oxidative stress response and apoptosis. Both cell lines showed similar viability results against the fungicide, but responded differently in terms of redox status.

Furthermore, a cell-based biosensor was constructed, through the culture of mammalian cells on the surface of the biocompatible and conductive polymer PEDOT. Cellular adhesion and viability of both cell lines on PEDOT were examined, followed by electrochemical studies of the electrode-cell configuration. Finally, Vero cells were subjected to post translational modifications by silencing transcription factor Nrf2. This attempt aimed to improve the sensitivity of the biosensor by controlling the expression of the detoxifying and antioxidant genes of Vero cells, which acted as the biorecognition element. The response of the cell biosensor was highly correlated with the number of cells and with the fungicide concentration. The modified biosensor also exhibited increased sensitivity after application of post-transcriptional silencing to the biorecognition element.

Academic discipline: Biological Sciences

Keywords: Toxicology; Xenobiotics; Oxidative stress; Biosensors

Περιεχόμενα

<i>Πρόλογος-Ευχαριστίες</i>	7
Λίστα Συντημήσεων	8
Λίστα Εικόνων	9
Λίστα Γραφημάτων	11
Λίστα πινάκων	14
Περίληψη	15
Abstract	17
Περιεχόμενα	18
1. Εισαγωγή	24
1.1. Ξενοβιοτικές ουσίες σε βιολογικά συστήματα	24
1.2. Τοξικολογικές βλάβες ξενοβιοτικών ουσιών με έμφαση στο οξειδωτικό στρες 27	
1.2.1. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες	27
1.3. Αμυντικά συστήματα του οργανισμού	31
1.3.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα	31
1.3.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα	33
1.3.3. Μεταγραφικός παράγοντας Nrf2	34
1.4. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα	36
1.4.1. Μυκητοκτόνα με έμφαση στους παρεμποδιστές του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας	37
1.4.2. Παρεμποδιστές του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας (QoI's)	41
1.4.3. Μηχανισμός δράσης των στρομπιλουρινών	43
1.5. Βιοαισθητήρες	46
1.5.1. Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες	48
1.5.2. Κυτταρικοί βιοαισθητήρες	51

2. Σκοπός της μελέτης.....	60
3. Πειραματικό Μέρος.....	62
3.1. Υλικά και Αντιδραστήρια	62
3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια.....	62
3.1.2. Διαλύτες.....	62
3.1.3. Θρεπτικά υλικά	62
3.1.4. Φθορισμομετρικοί ιχνηθέτες.....	63
3.2. Μέθοδοι.....	63
3.2.1. Καλλιέργεια και χειρισμοί κυτταρικών σειρών N2a και Vero.....	63
3.2.1.1. Κυτταροκαλλιέργεια σειρών N2a και Vero.....	63
3.2.1.2. Κατάψυξη και απόψυξη κυτταρικών σειρών	64
3.2.1.3. Ανακαλλιέργεια κυττάρων	65
3.2.1.4. Μέτρηση αριθμού κυττάρων και κυτταρικής επιβίωσης μέσω της χρωστικής Κυανό του Τρυπανίου (Trypan Blue).....	65
3.2.1.5. Επιλογή συγκεντρώσεων μυκητοκτόνου και έκθεση αυτών στις κυτταρικές σειρές N2a και Vero	66
3.2.2. Επίδραση του μυκητοκτόνου στις in vitro διεργασίες κυττάρων N2a και Vero .	67
3.2.2.1. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του kresoxim-methyl με τη μέθοδο MTT.....	67
3.2.2.2. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του kresoxim-methyl με τη μέθοδο NRU	69
3.2.2.3. Προσδιορισμός δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού N2a και Vero υπό την επίδραση του kresoxim-methyl	70
3.2.2.4. Μελέτη της μαζικής μεταναστευτικότητας των κυττάρων (Scratch-Wound Healing Assay)	71
3.2.2.5. Μελέτη της ικανότητας δημιουργίας αποικιών (Clonogenic assay)	73
3.2.3. Εκτίμηση βιοχημικών χαρακτηριστικών οξειδωτικού στρες κυττάρων N2a και Vero μετά από έκθεση τους στο kresoxim-methyl	76
3.2.3.1. Επίδραση του μυκητοκτόνου στη δράση αποτοξινωτικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων	76
3.2.3.1.i. Προετοιμασία ολικού κυτταρολύματος και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικού περιεχομένου (μέθοδος Bradford)	76
3.2.3.1.ii. Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της μεταφοράσης της γλουταθειόνης (GST)	77

3.2.3.1.iii.	Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της καταλάσης (CAT).....	77
3.2.3.1.iv.	Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx).....	78
3.2.3.1.v.	Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD).....	79
3.2.3.2.	Επίδραση του μυκητοκτόνου σε μη ενζυμικούς δείκτες οξειδωτικού στρες.....	80
3.2.3.2.i.	Φθορισμομετρικός προσδιορισμός των επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) .	80
3.2.3.2.ii.	Προσδιορισμός των αλδεϋδικών παραγώγων της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (TBARS)	81
3.2.3.2.iii.	Εκτίμηση επιπέδων ROS μέσω έμμεσης μέτρησης φθορισμομετρικών ιχνηθετών.....	82
3.2.4.	Εκτίμηση βιοχημικών χαρακτηριστικών απόπτωσης κυττάρων N2a και Vero μετά από έκθεση τους στο kresoxim-methyl	86
3.2.4.1.	Ανίχνευση κατακερματισμένου DNA (DNA fragmentation).....	86
3.2.4.2.	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός κασπάσης-3	87
3.2.4.3.	Μελέτη μεταβολών ενδοκυτταρικών ιόντων Ca^{+2}	89
3.2.4.4.	Προσδιορισμός μονοξειδίου του αζώτου (NO) στο μέσο καλλιέργειας με τη μέθοδο Griess (νιτρώδη ιόντα).....	89
3.2.4.5.	Μελέτη μεταβολών μιτοχονδριακού μεμβανικού δυναμικού	90
3.2.5.	Κατασκευή βιοαισθητήρα	92
3.2.5.1.	Εκτίμηση βιοσυμβατότητας πολυμερούς PEDOT με κύτταρα N2a και Vero μέσω μελέτης κυτταρικής προσκόλλησης και βιωσιμότητας	92
3.2.5.2.	Προκαταρκτικά πειράματα κυκλικής βολταμετρίας	93
3.2.5.3.	Εφαρμογή κυκλικής βολταμετρίας σε διαφορετικούς αριθμούς κυττάρων N2a και Vero.....	94
3.2.5.4.	Μελέτη της απόκρισης του βιοαισθητήρα στο μυκητοκτόνο kresoxim-methyl .	95
3.2.5.5.	Παροδική διαμόλυση κυττάρων Vero με παρεμβαλλόμενο RNA (μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων).....	95
3.2.5.6.	Μελέτη της απόκρισης βιοαισθητήρα μετα-μεταγραφικά τροποποιημένων κυττάρων Vero στο μυκητοκτόνο kresoxim-methyl.....	96
3.2.5.7.	Προσδιορισμός του kresoxim-methyl μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).....	97
4.	Αποτελέσματα.....	100
4.1.	Επίδραση του kresoxim-methyl κυτταρικές διεργασίες νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero	100

4.1.1.	Επίδραση του kresoxim-methyl στην βιωσιμότητα κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h	100
4.1.2.	Επίδραση του kresoxim-methyl στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h.	102
4.1.3.	Επίδραση του kresoxim-methyl στα μορφολογικά χαρακτηριστικά κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero	102
4.1.4.	Επίδραση του kresoxim-methyl στην κυτταρική κινητικότητα νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero.	104
4.1.5.	Μελέτη της αναπαραγωγικής ακεραιότητας μέσω ικανότητας δημιουργίας αποικιών.....	105
4.2.	Βιοχημικά χαρακτηριστικά οξειδωτικού στρες κυττάρων N2a και Vero μετά από έκθεση τους στο kresoxim-methyl	108
4.2.1.	Δραστηκότητες αποτοξινωτικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων κυττάρων N2a και Vero μετά από έκθεση τους στο kresoxim-methyl.....	108
4.2.1.1.	Επίδραση του kresoxim-methyl στην ενζυμική δραστηκότητα της μεταφοράσης της γλουταθειόνης (GST) κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h.	108
4.2.1.2.	Επίδραση του kresoxim-methyl στην ενζυμική δραστηκότητα της καταλάσης (CAT) κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h.	109
4.2.1.3.	Επίδραση του kresoxim-methyl στην ενζυμική δραστηκότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h.	110
4.2.1.4.	Επίδραση του kresoxim-methyl στην ενζυμική δραστηκότητα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h.	111
4.2.2.	Μη ενζυμικοί δείκτες οξειδωτικού στρες κυττάρων N2a και Vero μετά από έκθεση τους στο kresoxim-methyl	112
4.2.2.1.	Επίδραση του kresoxim-methyl στα επίπεδα ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης (GSH) κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h	112
4.2.2.2.	Επίδραση του kresoxim-methyl στα επίπεδα οξείδωσης λιπιδίων κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h..	113
4.2.2.3.	Επίδραση του kresoxim-methyl στα επίπεδα ROS νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μέσω έμμεσης μέτρησης φθορισμομετρικών ιχνηθετών.....	114
4.3.	Βιοχημικά χαρακτηριστικά απόπτωσης κυττάρων N2a και Vero μετά από έκθεση τους στο kresoxim-methyl	117
4.3.1.	Επίδραση του kresoxim-methyl στα επίπεδα κατακερματισμού του DNA σε κύτταρα νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h	117
4.3.2.	Επίδραση του kresoxim-methyl στα επίπεδα κασπάσης-3 κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h	118

4.3.3. Επίδραση του kresoxim-methyl στα επίπεδα ενδοκυτταρικού ασβεστίου [Ca ²⁺] κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h	119
4.3.4. Επίδραση του kresoxim-methyl στα επίπεδα νιτρωδών ιόντων στο μέσο καλλιέργειας κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h.	119
4.3.5. Επίδραση του kresoxim-methyl στο μιτοχονδριακό μεμβρανικό δυναμικό κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h	120
4.4. Κατασκευή πρότυπου κυτταρικού βιοαισθητήρα με χρήση ηλεκτροδίων PEDOT	122
4.4.1. Βιοσυμβατότητα PEDOT με τις κυτταρικές σειρές N2a και Vero μέσω μελέτης κυτταρικής προσκόλλησης και βιωσιμότητας	122
4.4.2. Επίδραση της προσκόλλησης κυττάρων N2a και Vero στην σταθερότητα και επαναληψιμότητα ηλεκτροδίων PEDOT μέσω κυκλικής βολταμετρίας	124
4.4.3. Επίδραση του αριθμού κυττάρων στην ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα ηλεκτροδίων PEDOT	130
4.4.4. Επίδραση του μυκητοκτόνου στην ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα ηλεκτροδίων PEDOT επιστρωμένων με κύτταρα N2a και Vero	131
4.4.5. Μετα-μεταγραφική τροποποίηση κυττάρων Vero μέσω παροδικής διαμόλυνσης siRNA	132
4.4.5.1. Βιωσιμότητα κυττάρων Vero έναντι του kresoxim-methyl μετά από παροδική μείωση της έκφρασης του Nrf2 με χρήση siRNA	132
4.4.5.2. Επίδραση του μυκητοκτόνου στην ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα ηλεκτροδίων PEDOT επιστρωμένων με κύτταρα Vero μετά από Nrf2 σίγαση	133
4.4.6. Σύγκριση βιοαισθητήρα PEDOT-Vero/Nrf2-siRNA με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	134
5. Συζήτηση	136
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	156

1. Εισαγωγή

1. Εισαγωγή

1.1. Ξενοβιοτικές ουσίες σε βιολογικά συστήματα

Τα βιολογικά συστήματα έρχονται συνεχώς σε επαφή με πληθώρα χημικών ουσιών στο άμεσο περιβάλλον τους. Οι χημικές ουσίες, ανάλογα με το βαθμό τοξικότητάς τους, σε χαμηλές συγκεντρώσεις προκαλούν μικρής έκτασης βλάβες, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις και για παρατεταμένη έκθεση μπορούν να προκαλέσουν οξείες βλάβες. Η πλειοψηφία των χημικών ουσιών σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι μη τοξικές και μετά από μικρό διάστημα από την απορρόφησή τους μεταβολίζονται και απεκκρίνονται. Η τοξική επίδραση μιας χημικής ουσίας σε ένα ζωντανό οργανισμό είναι αποτέλεσμα της δόσης και της διάρκειας της έκθεσης. Σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση παίζουν και οι βιομετασχηματισμοί των μεταβολιτών που σχηματίζονται σε κυτταρικό επίπεδο (Lu, 1996). Η βιοσυσσώρευση τοξικών μεταβολιτών σε συγκεκριμένα όργανα ή ιστούς μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες συνέπειες. Οι τοξικές δράσεις αφορούν συνήθως βασικά βιομόρια (λιπίδια μεμβρανών κυττάρων, υδατάνθρακες, ένζυμα, πρωτεΐνες, πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA), καθώς και τη δημιουργία οξυγονούχων και αζωτούχων ελευθέρων ριζών που προκαλούν οξειδωτικές βλάβες στα βιομόρια και οξειδωτικό stress (Amdur et al., 1993)

Η τοξικοκινητική μελέτη των ξενοβιοτικών χημικών ουσιών σε ζωντανούς οργανισμούς αφορά τις διεργασίες με τις οποίες γίνεται η πρόσληψη, η απορρόφηση, η κατανομή και ο βιομεταβολισμός των μεταβολιτών στους ιστούς και τα όργανα, και τέλος την απέκκριση από τον οργανισμό (Welling, 1995). Ο βιομετασχηματισμός μιας τοξικής ουσίας είναι αποτέλεσμα της δόσης και της συσσωρεύσεως των μεταβολιτών της στο όργανο-στόχος. Ο βιομετασχηματισμός μιας τοξικής ουσίας γίνεται κυρίως μέσω σειράς ενζύμων, τα οποία για παράδειγμα μπορούν να μετασχηματίσουν μία λιποδιαλυτή ουσία σε υδατοδιαλυτό μεταβολίτη. Οι βιομετασχηματισμοί αφορούν δύο τύπους αντιδράσεων: τις αντιδράσεις της Φάσης I, που περιλαμβάνουν οξειδώσεις, αναγωγές, υδρολύσεις, αφαιολόγωση και πρωτόλυση και τις αντιδράσεις της Φάσης II, που περιλαμβάνουν συζεύξεις (σύζευξη γλουταθειόνης, σύζευξη αμινοξέων με καρβοξυλικά οξέα, και αντιδράσεις σύνθεσης παραγώγων (ακετυλίωση, μεθυλίωση κλπ) (Omiecinski et al., 2001).

Για να περάσει μία ξενοβιοτική ουσία στα φυσιολογικά υγρά του σώματος και να δράσει συστηματικά, πρέπει να διαχυθεί μέσα από τις λιποπρωτεϊνικές προστατευτικές επιφάνειες των μεμβρανών των κυττάρων στο δέρμα, τους

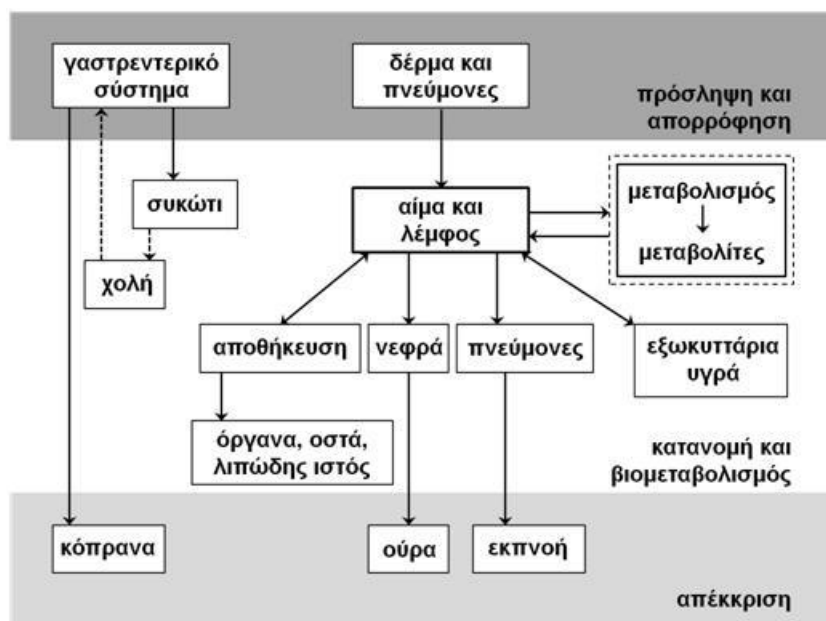
πνεύμονες και το πεπτικό σύστημα. Εκτός από τις περιπτώσεις με ουσίες υψηλής οξύτητας ή διαβρωτικής ικανότητας, οι οποίες προκαλούν τοπικές βλάβες και εγκαύματα, οι περισσότερες τοξικές ουσίες διαχέονται στο εσωτερικό του οργανισμού μετά την αρχική έκθεση. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διάχυση ενός μορίου μέσω των μεμβρανών είναι ανάλογοι του μεγέθους του, της υδατο- και λιποδιαλυτότητας (συντελεστή κατανομής n-οκτανόλης/ύδατος (POW)), του φορτίου του και άλλων παραγόντων. Εκτός από τη διάχυση, υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί δειξιδυσης μέσω μεμβρανών, όπως η διήθηση μικρών μορίων μέσω των πόρων των πρωτεϊνικών μεμβρανών και της ενεργητικής μεταφοράς που γίνεται με ειδικό φορέα μεταφοράς μέσω της μεμβράνης (Grace et al., 2008).

Η πορεία των ξενοβιοτικών ουσιών, ιδιαίτερα κατά τη κατάποση που περιέχει τοξικά συστατικά, γίνεται αρχικά μέσω του πεπτικού συστήματος και η πρώτη αντίδραση του οργανισμού για να αποφύγει τις τοξικές συνέπειες είναι η προώθηση των ουσιών στο ήπαρ για αποτοξίνωση μέσω βιομετασχηματισμών με σκοπό την διευκόλυνση της απέκκρισης. Το ήπαρ δέχεται όλο το αίμα από την κυκλοφορία της περιοχής του στομάχου και των εντέρων, που περιέχει τα θρεπτικά συστατικά και τις ξενοβιοτικές ουσίες (Robson et al., 2007). Εκεί διεξάγεται διεργασία εκχύλισης των ξενοβιοτικών ουσιών από το αίμα με τη βοήθεια ενζύμων ή ενζυμικών συστημάτων και βιομετατρέπονται είτε σε χρήσιμα συστατικά, είτε εξουδετερώνονται με ταχεία απέκκριση μέσω των νεφρών ή της χολής. Εκτός από το ήπαρ, και άλλα όργανα ή ομάδες κυττάρων μπορούν να βιομετασχηματίσουν ξενοβιοτικές ουσίες. Τα παρεγχυματικά κύτταρα στο ήπαρ, τα σωληνοειδή κύτταρα των νεφρών, τα επιθηλιακά κύτταρα στο δέρμα, τα κύτταρα του βλεννογόνου των εντέρων και άλλα, βιομετατρέπουν ξενοβιοτικές ουσίες με τα ένζυμα που περιέχουν (Williams et al., 2003; Robson et al., 2007).

Η τοξικότητα των ξενοβιοτικών ουσιών εξαρτάται και από άλλες αντιδράσεις που μπορούν να συμβούν κατά τη μεταφορά τους μέσα στο σώμα και τα όργανα του οργανισμού. Η δέσμευση ξενοβιοτικών από τις πρωτεΐνες του πλάσματος του αίματος τις καθιστά περισσότερο τοξικές. Η δέσμευση γίνεται κυρίως με την αλβουμίνη και η δεσμευόμενη ουσία καθίσταται ογκώδης με αποτέλεσμα να μην μπορεί να διηθηθεί μέσω των νεφρών, ενώ συγχρόνως μειώνεται η ταχύτητα απέκκρισης. Όταν η πρωτεΐνη που δεσμεύει ξενοβιοτικές ουσίες κορεσθεί, τότε κάθε περαιτέρω προσθήκη ουσίας αυξάνει δραματικά την τοξικότητα στον οργανισμό (Banker et al., 2008; Gülden et al., 2006). Η κατανομή των ξενοβιοτικών στο σώμα του βιολογικού οργανισμού εξαρτάται κυρίως από τη σχετική συγγένεια με το αίμα ή το πλάσμα του αίματος καθώς μεταφέρονται με την κυκλοφορία στα διάφορα όργανα. Οι υδατοδιαλυτές-υδρόφιλες ενώσεις που δεν μπορούν να διαπεράσουν εύκολα τις

κυτταρικές μεμβράνες περιορίζονται στα εξωκυτταρικά υγρά του σώματος. Ορισμένες όμως υδατοδιαλυτές ουσίες, όπως η καφεΐνη και η αιθυλική αλκοόλη μπορούν να διαπεράσουν τις μεμβράνες και κατανέμονται σε πολλούς βιολογικού ιστούς. Οι λιποδιαλυτές ενώσεις διαπερνούν τις μεμβράνες πιο εύκολα, διακινούνται μέσω του αίματος στους διάφορους ιστούς και μπορούν να παρουσιασθούν στα λιπίδια κυτταρικών μεμβρανών, στον λιπώδη ιστό και τα λιπιδόκυτταρα, το κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS), κ.α. (Boelsterli et al., 2007).

Μετά τη διάχυση και κατανομή των ξеноβιοτικών ουσιών, οι τοξικοκινητικές διεργασίες διακρίνονται σε αποθήκευση, βιομετασχηματισμούς και απέκκριση. Η αποθήκευση των τοξικών μεταβολιτών στον βιολογικό οργανισμό γίνεται είτε στα όργανα είτε στο πλάσμα του αίματος. Η μεταφορά μεταβολιτών είναι αποτέλεσμα του όγκου του αίματος που κυκλοφορεί στα όργανα. Το ήπαρ στον άνθρωπο δέχεται το 28% και τα νεφρά το 23% του κυκλοφορόντος αίματος από την καρδιακή λειτουργία. Το ήπαρ, σε σχέση με τη μάζα, του είναι το όργανο που δέχεται το 1/3 του κυκλοφορόντος αίματος και τα ηπατοκύτταρα που περιέχουν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τοξικές ουσίες και μεταβολίτες τους. Στο ήπαρ γίνονται οι κυριότερες αντιδράσεις βιομετασχηματισμού τοξικών ουσιών. Τα νεφρά δέχονται επίσης αρκετή ποσότητα κυκλοφορόντος αίματος με αποτέλεσμα να αποθηκεύουν στους μαλακούς ιστούς του νεφρού τοξικές ουσίες και μεταβολίτες. Τέλος, σημαντικές ποσότητες λιποδιαλυτών ουσιών και μεταβολιτών συσσωρεύονται στον λιπώδη ιστό που βρίσκεται σε διάφορα σημεία του σώματος (Robson et al., 2007).



Εικόνα 1.1: Σχηματική παρουσίαση της απορρόφησης, κατανομής και απέκκρισης τοξικών ουσιών, (προσαρμογή από Robson et al., 2007, σελ.58).

Ο βιομετασχηματισμός και ο μεταβολισμός τοξικών ουσιών στους βιολογικούς οργανισμούς είναι όλες οι βιοχημικές διεργασίες με τις οποίες μετασχηματίζονται σε υδατοδιαλυτές ή σε μεταβολίτες που απεκκρίνονται εύκολα από τον οργανισμό. Ο μεταβολισμός είναι το σύνολο των βιοχημικών αλλαγών που συμβαίνουν στις ξενοβιοτικές ουσίες μέσα στο σώμα και διακρίνεται σε αναβολισμό, όπου πραγματοποιείται αύξηση μοριακού βάρους με τον σχηματισμό σύμπλοκων ενώσεων και σε καταβολισμό με τη βιοχημική διάσπαση σε μικρότερες ουσίες, π.χ. διάσπαση γλυκόζης. Οι μεταβολικές διεργασίες μπορούν να λάβουν χώρα στο κυτταρόπλασμα ή σε ειδικά οργανίδια μέσα στο κύτταρο. Βιομετασχηματισμός είναι το σύνολο των ενζυμικών βιοχημικών δράσεων για ενδογενείς ουσίες και εξωγενείς ξενοβιοτικές ουσίες με σκοπό την μετατροπή τους σε υδρόφιλες και ταυτόχρονη μείωση της ικανότητας να διαπερνούν μεμβράνες και μείωση της επαναρρόφησης των μεταβολιτών από τα κύτταρα για διευκόλυνση της απέκκρισης από το σώμα (Timbrell & Marrs, 2009). Η αποτελεσματικότητα των βιομετασχηματισμών στην αποτοξίνωση των τοξικών ουσιών στο ανθρώπινο σώμα, αλλά και σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η ηλικία, το φύλο, η διατροφή και οι ασθένειες (Parkinson, 2001).

1.2. Τοξικολογικές βλάβες ξενοβιοτικών ουσιών με έμφαση στο οξειδωτικό στρες

1.2.1. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες

Η παρουσία των ελεύθερων ριζών στα βιολογικά συστήματα περιγράφηκε για πρώτη φορά πριν από περίπου εξήντα χρόνια (Gerschman et al., 1954) και λίγο αργότερα, το 1956, ο Denham Harman υπέθεσε ότι οι ρίζες οξυγόνου σχηματίζονται ως υπό-προϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων *in vivo* (Harman, 1956). Κατόπιν ακολούθησαν πολυάριθμες μελέτες, από την ανακάλυψη του αντιοξειδωτικού ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) από τους McCord & Fridovich το 1969 (McCord and Fridovich, 1969) που "άνοιξε" το δρόμο για περαιτέρω έρευνα, έως και τις πρώτες αναφορές για την ωφέλιμη δράση των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα (Mittal & Murard, 1977; Finkel, 1998).

Ως ελεύθερες ρίζες ορίζονται μόρια ή άτομα που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα, μονήρη ηλεκτρόνια (Gutteridge and Halliwell, 1989). Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο καλείται αυτό που καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό και παριστάνεται συνήθως με μία τελεία πάνω και δεξιά ή αριστερά από το χημικό τύπο της ελεύθερης ρίζας. Τα ασύζευκτα αυτά ηλεκτρόνια είναι συνήθως

ιδιαίτερα δραστικά και εξαιτίας αυτού, οι ρίζες συμμετέχουν συχνά σε χημικές αντιδράσεις. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου (H^{\bullet}).

Ο χρόνος ημιζωής των ελευθέρων ριζών είναι πολύ μικρός και κυμαίνεται από νανοδευτερόλεπτα έως χιλιοστά του δευτερολέπτου. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από μια μεταφορά ηλεκτρονίου που απαιτεί υψηλή κατανάλωση ενέργειας (Cheeseman & Slater, 1993). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell & Gutteridge, 1998; Halliwell, 2001).

Για τις ελεύθερες ρίζες συχνά χρησιμοποιείται γενικά ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS), ο οποίος εκτός από ελεύθερες ρίζες, περιγράφει και άλλες μορφές οξυγόνου (μόρια και ιόντα) με υψηλή δραστηριότητα. Τα κυριότερα ROS είναι το σουπεροξειδικό ανιόν $O_2^{\bullet-}$, η ρίζα υδροξυλίου OH^{\bullet} και το υπεροξειδίο του υδρογόνου H_2O_2 . Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και οι δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο, όπως το μονοξειδίο του αζώτου NO^{\bullet} και το διοξειδίο του αζώτου NO_2^{\bullet} καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες, όπως το νιτρώδες οξύ HNO_2 και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου $ONOO^-$ (Halliwell & Gutteridge, 1998; Halliwell, 2001; Fang et al., 2002).

Πίνακας 1.1: Δραστικές μορφές οξυγόνου, αζώτου και θείου που απαντώνται σε υγιείς και παθολογικές ιστούς, (προσαρμογή από Nordberg et al., 2001).

Ελεύθερες ρίζες				Μη ελεύθερες ρίζες			
Μοριακός τύπος	Όνομα	Μοριακός τύπος	Όνομα	Μοριακός τύπος	Όνομα	Μοριακός τύπος	Όνομα
$O_2^{\bullet-}$	ανιόν σουπεροξειδίου	ROO^{\bullet}	ρίζα υπεροξυλίου	H_2O_2	υπεροξειδίο του υδρογόνου	$HOCl$	υπο-χλωριώδες οξύ
HO_2^{\bullet}	υδρούπεροξειδική ρίζα	NO^{\bullet}	μονοξειδίο αζώτου	$ROOH$	οργανικά υδρο-υπεροξειδία	$ONOO^-$	νιτρικό υπεροξειδίο
OH^{\bullet}	ρίζα υδροξυλίου	NO_2^{\bullet}	διοξειδίο αζώτου	1O_2	μονήρες οξυγόνο	HNO_2	νιτρώδες οξύ
RO^{\bullet}	ρίζα αλκοξυλίου	RS^{\bullet}	ρίζα θείου	O_3	όζον	N_2O_3	τριοξειδίο του αζώτου

Κύρια Δραστικά Είδη Ελευθέρων Ριζών

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου εξισορροπείται κατά κανόνα στους αερόβιους οργανισμούς από τη δράση των ενδοκυττάρων αντιοξειδωτικών συστημάτων. Η ισορροπία αυτή είναι δυναμική με δυνατότητα αλλαγής προς την μία ή την άλλη πλευρά. Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται στην κατάσταση κατά την οποία η ισορροπία ανάμεσα στους οξειδωτικούς παράγοντες και την αντιοξειδωτική άμυνα διαταράσσεται σημαντικά υπέρ των πρώτων, οδηγώντας έτσι στη βλάβη των κυτταρικών συστατικών.

Κυτταρικοί στόχοι των ελευθέρων ριζών

Τα κυριότερα συστήματα που υπόκεινται βλάβες από τοξικές ξеноβιοτικές ουσίες είναι τα ένζυμα, οι λιπιδικές μεμβράνες των κυττάρων, τα συστήματα αναπνοής και ενέργειας (μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες), τα συστήματα πρωτεϊνικής σύνθεσης (ενδοπλασματικό δίκτυο) και τα ενδοκυτταρικά οργανίδια του πυρήνα. Η δράση των ξеноβιοτικών μπορεί να είναι άμεση στα συστατικά του κυττάρου με την είσοδο του στον βιολογικό οργανισμό ή έμμεσα μέσω μεταβολιτών που είναι πιο τοξικοί ή έχουν την ικανότητα αντίδρασης με τα κυτταρικά συστατικά.

Τις τελευταίες δεκαετίες ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στην πρόκληση βλαβών σε διάφορους ιστούς και βασικά βιομόρια (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια μεμβρανών, βάσεις του DNA) έχει τεκμηριωθεί με πολυάριθμες έρευνες. Οι οξυγονούχες και αζωτούχες ελεύθερες ρίζες παίζουν βασικό ρόλο στους διάφορους βιολογικούς μεταβολισμούς και αντιδράσεις ενεργειακής μεταβίβασης. Λόγω της δραστικότητας των ελευθέρων ριζών, οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει πολυάριθμους αμυντικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (ενζυμικούς και μη ενζυμικούς) για την ρύθμιση του οξειδωτικού stress και της ομοιοστασίας των βιολογικών λειτουργιών (Rahal et al, 2014).

Παρόλα αυτά, οι οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες διαφεύγουν των αμυντικών συστημάτων και σε περιπτώσεις υψηλών εκθέσεων σε ξеноβιοτικές ουσίες προκαλούν σημαντικές βλάβες. Αρχικά οι βλάβες έχουν τη μορφή φλεγμονών, βλαβών σε ενζυμικά συστήματα, εξουδετέρωση αντιοξειδωτικών βιταμινών, υπεροξείδωση λιπιδίων μεμβρανών, βλάβες στο DNA, κ.λπ. Το οξειδωτικό stress που αναπτύσσεται με παρατεταμένη έκθεση σε ελεύθερες ρίζες οδηγεί σε διάφορες ασθένειες και κακοήθειες νεοπλασίες (Reuter et al., 2010).

Μηχανισμοί δράσης των ελευθέρων ριζών

Οι μηχανισμοί δράσης των ελευθέρων ριζών σε διάφορες ασθένειες και κακοήθειες όγκους επιβεβαιώνονται με την αναστολή ή επιβράδυνση των καταστάσεων αυτών

με αντιοξειδωτικά συμπληρώματα, διατροφή πλούσια σε αντιοξειδωτικές ουσίες, αντιγηραντικές πρακτικές (όπως μειωμένη θερμιδική πρόσληψη με διατροφή) και ενίσχυση αντιοξειδωτικών ενζυμικών συστημάτων (υπεροξειδική δισμουτάση, γλουταθειόνη). Οι ξενοβιοτικές ουσίες μπορούν επίσης να προκαλέσουν τοξικές βλάβες σε βιολογικούς οργανισμούς με την αναστολή ενζυμικών συστημάτων. Μερικά παραδείγματα ενζύμων είναι η εστεράση της ακετυλοχολίνης (παρεμπόδιση από καρβαμίδικά και οργανοφωσφορικά), δ-αμινολεβουλινική δεϋδρατάση (παρεμπόδιση από ιόντα μολύβδου), κυτοχρωμική οξειδάση (παρεμπόδιση από υδροκυάνιο), Ακονιτάση (φθοροξικός εστέρας που μεταβολίζεται στον αναστολέα φθοροκιτρικό εστέρα) (Matés, 2000).

Υπάρχει ακόμα ένας σημαντικός αριθμός ξενοβιοτικών ουσιών που αντιδρούν με τμήματα των μιτοχονδρίων και μειώνουν τη σύνθεση του ATP (αδενοσινωτριφωσφορικό οξύ, πηγή κυτταρικής ενέργειας). Συνήθως οι βλάβες που προκαλούν χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες: α) αναστολή την πρόσληψης υδρογόνου στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων με την επίδραση σε ενζυμικά συστήματα (ιωδοοξικός εστέρας, ρ-βενζοκινόνη, αιθανόλη, κλπ), β) αναστολή της μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω παρεμπόδισης συμπλόκων και ηλεκτρονο-υποδοχέων (ροτενόνη, κυανικά άλατα, υδρόθειο, τετραχλωράνθρακας, δοξορουβισίνη), γ) αναστολή πρόσληψης οξυγόνου από την ηλεκτρονική αλυσίδα μεταφοράς (αλκαλοειδή, κοκαΐνη, μονοξειδίο του άνθρακα), δ) αναστολή της ADP φωσφορυλίωσης (DDT, ρ-βενζοκινόνη, δινιτροφαινόλη, κλπ (Finkel & Holbrook, 2000)

Οι βλάβες που προκαλούνται στο υπόστρωμα των κυτταρικών μεμβρανών από ξενοβιοτικές ουσίες δημιουργούν αναστολές στην λειτουργία και την παραγωγή ενέργειας και χωρίζονται σε: α) παρεμπόδιση της κανονικής λειτουργίας υποδοχέων (νευροδιαβίβαση, υποδοχή ορμονών, μεταφορά πρωτεϊνών), β) αναστολή λειτουργιών των μεμβρανών (εισροή ιόντων, μεμβρανική ρευστότητα, λειτουργία λυσοσωματικών μεμβρανών και μιτοχονδριακών μεμβρανών), γ) παρεμβάσεις στην παραγωγή ενέργειας (αιμοσφαιρίνη, αποσύζευξη οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, παρεμπόδιση μεταφοράς ηλεκτρονίων) και γ) άμεση αντίδραση ξενοβιοτικών στις μεμβράνες με ομοιοπολικούς δεσμούς (όζον, γλουταθειόνη, θειόλες πρωτεϊνών, ακεταμινοφαινόνη). Οι ξενοβιοτικές ουσίες παρεμβαίνουν επίσης και στις ρυθμίσεις και λειτουργίες του κυττάρου που πραγματοποιούνται μέσω ενεργοποιημένων κυτταρικών υποδοχέων που συνδέονται μέσω σημάτων νευροδιαβίβασης και ρυθμίζονται από ειδικές περιοχές γονιδίων και/ή λειτουργικές πρωτεΐνες. Οι βλάβες που μπορούν να προκληθούν είναι δυσλειτουργία της έκφρασης των γονιδίων (μεταγραφή γενετικής πληροφορίας από το DNA σε mRNA μέσω ειδικών παραγόντων μεταγραφής, transcription factors) καθώς οι ξενοβιοτικές ουσίες

μπορούν να αναστείλουν τη λειτουργία των παραγόντων αυτών, να την ενεργοποιήσουν ή να μιμηθούν τη δράση τους (Sies, 1997).

1.3. Αμυντικά συστήματα του οργανισμού

Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες ο ανθρώπινος οργανισμός έχει την ικανότητα να συνθέτει και να συσσωρεύει εξειδικευμένα μόρια τα οποία είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην καταπολέμηση των προ-οξειδωτικών παραγόντων. Τα μόρια αυτά ονομάζονται αντιοξειδωτικά και μπορούν να αντιδράσουν και να εξολοθρεύσουν τις ROS πριν αυτές προλάβουν να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη σε σημαντικά βιολογικά μόρια (McCord, 2000).

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται οποιοδήποτε μόριο είναι αποτελεσματικό στο να μετριάζει ή να εμποδίζει σε σημαντικό βαθμό την οξείδωση διάφορων υποστρωμάτων (πχ πρωτεΐνες, λιπίδια κλπ) (Kohen et al., 2002). Για να θεωρηθεί μία ένωση ως αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό θα πρέπει να ασκεί την προστατευτική της δράση ενώ βρίσκεται σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση από το υπόστρωμα το οποίο προστατεύει (Maritim et al., 2003). Συνολικά, τα αντιοξειδωτικά κινητοποιούνται μέσα στα κύτταρα, στις μεμβράνες και στα εξωκυττάρια υγρά προκειμένου να εξουδετερώσουν τον υπερβολικό σχηματισμό ROS.

Ορισμένοι από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων δρουν τα αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν: την απομάκρυνση του O_2 , την απομάκρυνση καταλυτικών ιόντων μετάλλων, την εκκαθάριση ROS όπως το $O_2^{\cdot-}$ και το H_2O_2 , την εκκαθάριση ελεύθερων ριζών που λειτουργούν ως μόρια εκκινητές αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης όπως τα HO^{\cdot} , RO^{\cdot} και RO_2^{\cdot} , την εξουδετέρωση ή την εκκαθάριση του 1O , την ενίσχυση των ενδογενών αντιοξειδωτικών αμυνών μέσω της αύξησης της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα καθώς και την επιδιόρθωση της οξειδωτικής καταστροφής που προκαλείται από ROS. Τα πιο αποτελεσματικά είναι εκείνα που ασκούν μία ή παραπάνω από αυτές τις δράσεις χωρίς να παράγουν τοξικά ή δραστικά τελικά προϊόντα (Rahal et al., 2014).

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε ενζυμικά και μη ενζυμικά, ενώ τα μη ενζυμικά με τη σειρά τους διακρίνονται σε ενδογενή και εξωγενή (Mates, 2000).

1.3.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ένζυμα που είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας σε καταστάσεις αυξημένου οξειδωτικού στρες και συνολικά καλούνται ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα (Matés et al., 1999). Τα κυριότερα από αυτά είναι η SOD (υπεροξειδική δισμουτάση), η GPx (υπεροξειδάση

γλουταθειόνης), η CAT (καταλάση), η GR (αναγωγάση γλουταθειόνης) και οι GST (S-τρανσφεράσες γλουταθειόνης).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι η κύρια άμυνα απέναντι στις ρίζες σουπεροξειδίου και είναι η πρώτη γραμμή άμυνας απέναντι στο οξειδωτικό στρες. Η SOD καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 . Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές SOD (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, EC-SOD) και όλες απαιτούν ένα οξειδοαναγωγικό δραστικό μέταλλο μεταπτώσεως στην ενεργή θέση για να πραγματοποιηθεί η καταλυτική διάσπαση του ανιόντος σουπεροξειδίου (Culotta et al., 2006; Suzuki et al., 2000). Δύο από τις ισομορφές SOD βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου ενώ η τρίτη βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο (Suzuki et al., 2000). Η Cu/Zn-SOD απαιτεί χαλκό-ψευδάργυρο ως συμπαραγόνα και κατά κύριο λόγο βρίσκεται στο κυτοσόλιο και στον μιτοχονδριακό ενδιάμεσο χώρο. Η Mn-SOD χρησιμοποιεί μαγνήσιο σαν συμπαραγόνα και βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Τέλος, η EC-SOD απαιτεί χαλκό-ψευδάργυρο σαν συμπαραγόνα και βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο.

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση (CAT) είναι παρούσα σε κάθε κυτταρικό τύπο και ιδιαίτερα στα υπεροξειδιοσωμάτια, κυτταρικές δομές που χρησιμοποιούν οξυγόνο με σκοπό να αποτοξικοποιήσουν τοξικές ουσίες και παράγουν H_2O_2 . Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει μία ομάδα αίμης στην ενεργό περιοχή τους. Κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH, το οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου. Καταλύει την μετατροπή του H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο (Antunes et al., 2002).

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Στα θηλαστικά έχουν εντοπιστεί πέντε είδη υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx1-GPx5) (Brigelius-Flohe, 2006; Drevet, 2006). Η GPx καταλύει την αναγωγή του H_2O_2 ή του οργανικού υδροϋπεροξειδίου (ROOH) σε νερό (H_2O) και αλκοόλη, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας την GSH ή σε κάποιες περιπτώσεις τηνθειορεδοξίνη ή την γλουταρεδοξίνη ως δότη ηλεκτρονίων (Battin et al., 2009). Όταν η GSH είναι ο δότης ηλεκτρονίων, οξειδώνεται σε δισουλφίδιο της γλουταθειόνης. Αν και οι αντιδράσεις που καταλύονται από όλα τα είδη της GPx είναι οι ίδιες, η κάθε μορφή GPx διαφέρει ως προς την ειδικότητα του υποστρώματος και την κυτταρική θέση (Brigelius-Flohe, 1999). Η ποικιλία στην ειδικότητα των υποστρωμάτων και την

κυτταρική θέση καθιστούν την GPx πολύτιμη ως ένα ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό ένζυμο. Το γεγονός ότι πολλά ισoenζυμα GPx ανάγουν μια μεγάλη ποικιλία υδροϋπεροξειδίων, κάνει την GPx ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό για την προστασία των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων από βλάβες προερχόμενες από ROS.

Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνη για την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε GSH και συνεπώς για τη διατήρηση της φυσιολογικής αναλογίας GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Αποτελείται από δύο υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH (Williams, 1992).

1.3.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα

Εκτός από τα ενδογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά ο ανθρώπινος οργανισμός συνθέτει και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Πρόκειται για συστατικά τα οποία δρουν είτε εκκαθαρίζοντας ROS, είτε απομακρύνοντας δραστικά μεταλλικά ιόντα (Fe^{+3} και Cu^{+2}) τα οποία θα μπορούσαν να ενισχύσουν αντιδράσεις οξειδωσης (Rahal et al., 2014).

Γλουταθειόνη (GSH)

Η GSH είναι η πιο άφθονη μη πρωτεϊνική ενδοκυτταρική πηγή θειόλης στο κύτταρο. Οι συγκεντρώσεις της στους περισσότερους ιστούς είναι στην κλίμακα των millimole και έχει αναγνωριστεί ως το σημαντικότερο ενδοκυττάριο υδρόφιλο αντιοξειδωτικό. Σε οξειδωτικό περιβάλλον, η ανηγμένη GSH οξειδώνεται αντιστρεπτά σε GSSG. Εμφανίζει ποικιλία βιολογικών λειτουργιών, μεταξύ των οποίων ο μεταβολισμός θρεπτικών συστατικών, η ρύθμιση κυτταρικών δράσεων όπως γονιδιακή έκφραση, σύνθεση DNA και πρωτεϊνών, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση, η μεσολάβηση οδών μεταγωγής σήματος, η παραγωγή κυταροκινών και η ανοσολογική απόκριση. Επιπλέον, συμμετέχει στη διατήρηση των ομάδων θειόλης των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στην ανηγμένη τους μορφή, η οξειδωση των οποίων μπορεί να τροποποιήσει την κυτταρική δομή και λειτουργία (Dickinson et al., 2002). Όλες αυτές οι βιολογικές δράσεις της GSH εμφανίζονται υπό την προϋπόθεση ότι αυτή βρίσκεται στην ανηγμένη της μορφή. Έτσι, σε ένα γενικό

πλαίσιο θα μπορούσε να ειπωθεί ότι η ανηγμένη GSH παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής κατάστασης όλων των κυττάρων. Το σημαντικότερο όφελος της GSH ως μόριο που συμμετέχει στη ρύθμιση της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής κατάστασης, έγκειται στην προστασία των κυττάρων από τις ROS. Συγκεκριμένα, λειτουργεί ως εκκαθαριστής ROS ενώ παράλληλα συμμετέχει και στην αποκατάσταση οξειδωτικών βλαβών που έχουν προκληθεί από αυτές. Έχει προταθεί μάλιστα ότι η ανοχή πολλών κυττάρων στο οξειδωτικό στρες συνδέεται με υψηλά ενδοκυτταρικά επίπεδα GSH. Επιπλέον, αποτελεί υπόστρωμα ή/και συμπαράγοντα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η GPx και η GST (Griffith, 1999).

Μεταξύ των πιο γνωστών μη ενζυμικών ενδογενών αντιοξειδωτικών είναι και το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη καθώς και πρωτεΐνες του πλάσματος, όπως η αλβουμίνη κ.α.

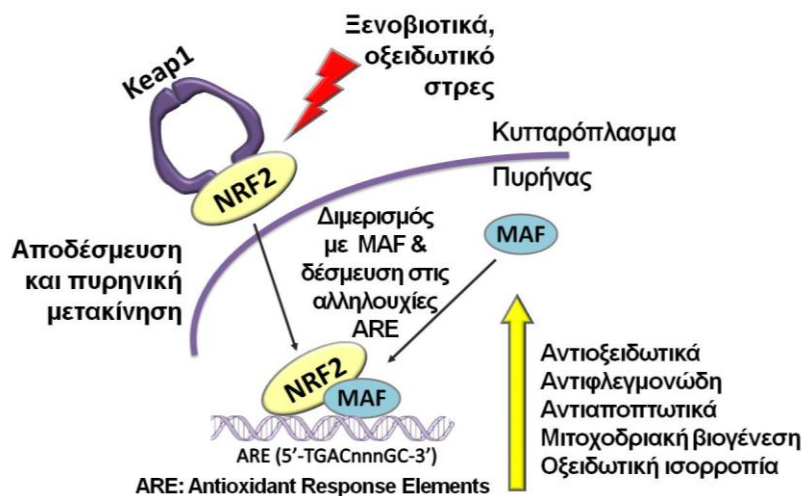
1.3.3. Μεταγραφικός παράγοντας Nrf2

Ένας από τους κύριους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων είναι η μεταγραφή γονιδίων που προστατεύουν το κύτταρο σε συνθήκες οξειδωτικού στρες μέσω ενεργοποίησης της μεταγραφικής οδού του πυρηνικού παράγοντα Nrf2 [Nuclear factor (erythroid- derived 2)-like 2, (Nrf2)]. Ο Nrf2 ελέγχει ένα γενετικό πρόγραμμα, το οποίο παρέχει προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες και διατηρεί την κυτταρική ομοιότητα, ελέγχοντας την έκφραση αποτοξινωτικών και αντιοξειδωτικών γονιδίων.

Ο Nrf2 κλωνοποιήθηκε το 1994 από τους Moi et al. και ανήκει στην υποοικογένεια "cap n'collar" (CNC) των μεταγραφικών παραγόντων. Τα μέλη αυτής της οικογένειας παρουσιάζουν αρκετές δομικές ομοιότητες και χαρακτηρίζονται από την παρουσία του μοτίβου "φερμουαρ λευκίνης", το οποίο ευθύνεται για τη σύνδεση με το DNA μέσω διμερισμού με μικρές Maf πρωτεΐνες, όπως οι MafF, MafG και MafK (Alam et al., 1999).

Στον άνθρωπο έχουν προσδιοριστεί έξι μέλη της οικογένειας CNC και σύμφωνα με μελέτες, ο Nrf2 είναι ο πιο σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας στην έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων. Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 ελέγχει τη μεταγραφή γονιδίων μέσω της σύνδεσης του σε συγκεκριμένες αλληλουχίες που ονομάζονται "αλληλουχίες απόκρισης σε αντιοξειδωτικά", (Antioxidant Response Elements, ARE). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο Nrf2 είναι δεσμευμένος στην πρωτεΐνη Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) στο κυτταρόπλασμα εξαιτίας αλληλεπίδρασης του με την Keap1 (Tong et al., 2006). Η πρωτεΐνη Keap1 δρα σαν σύνδεσμος για την αλληλεπίδραση του συμπλέγματος λιγάσης της E3-ουβικιτίνης με τον Nrf2

οδηγώντας στην ουβικιτινίωση (ubiquitination) του Nrf2 και στη συνέχεια στην αποδόμησή του από το πρωτεάσωμα (Cullinan et al., 2004).



Εικόνα 1.2: Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος του Nrf2, προσαρμογή από Lakhan et al., 2009.

Έκθεση του κυτάρου σε οξειδωτικό στρες ή ηλεκτροφιλικά ξενοβιοτικά οδηγεί στην «αποσύνδεση» του Nrf2 από την Keap1 διασώζοντας το Nrf2 από την αποδόμηση από το πρωτεάσωμα και συνεπώς επιτρέποντάς του την είσοδο στον πυρήνα και επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του (Εικόνα 1.2).

Ο Nrf2 συμμετέχει στην ενεργοποίηση των ενζύμων φάσης II κατά την αντίδραση των κυτάρων σε ξενοβιοτικά ερεθίσματα. Η αντίδραση τύπου I μεσολαβείται από τα συστήματα μονοξυγενάσης του κυτοχρώματος P450 όπως είναι τα CYP1A1 και CYP1A2 τα οποία τροποποιούν τα ξενοβιοτικά μέσω οξειδοαναγωγής. Τα προϊόντα της φάσης I είναι ηλεκτροφιλικά και πολύ αντιδραστικά οδηγώντας στην επιβλαβή τροποποίηση DNA και πρωτεϊνών. Τα ένζυμα της φάσης II, τα οποία ελέγχονται από τον Nrf2, προωθούν τη σύζευξη των προϊόντων της φάσης I με υδρόφιλα στοιχεία όπως είναι η γλουταθειόνη και το γλυκουρονικό οξύ. Τέτοια ένζυμα της φάσης II είναι η NADPH κινόνη οξειδοαναγωγή (NQO-1), οι GST's (γλουταθειόνη S τρανσφεράσες), οι UDP γλυκουρονοσυλ-τρανσφεράσες (UGT's) και φέρουν στον υποκινητή τους αλληλουχίες ARE τις οποίες αναγνωρίζει ο Nrf2 και επάγει την έκφρασή τους. Άλλα γονίδια των οποίων η έκφραση επάγεται από τον Nrf2 είναι η οξυγενάση-1 της αίμης (HO-1), η γ-γλουταμυλ-κυστεΐνη συνθάση (γ-GCS) και η γλουταθειόνη υπεροξειδάση-2 (GPX-2) τα οποία φέρουν πολλαπλές αλληλουχίες ARE στις ρυθμιστικές τους αλληλουχίες (Kobayashi & Yamamoto, 2006). Οι τάξεις των πρωτεϊνών που επάγονται από τον Nrf2 μπορούν να ταξινομηθούν σε ένζυμα που δεσμεύουν ηλεκτροφιλικές ουσίες, σε αντιοξειδωτικά ένζυμα, σε πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την ομοιοστάση της γλουταθειόνης στο κύτταρο και σε παραγωγή αναγωγικών ισοδυνάμων (Osburn & Kensler, 2008).

1.4. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Κατά το νόμο 721/1977 - άρθρο 1, «περί εγκρίσεως κυκλοφορίας και ελέγχου των γεωργικών φαρμάκων και ρυθμίσεις συναφών θεμάτων», γεωργικό φάρμακο (pesticide) ορίζονται κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών, συμπεριλαμβανομένων και επεξεργασμένων ή μη φυτικών προϊόντων, δυνάμενη να χρησιμοποιηθεί ως μέσο καταπολέμησης των εχθρών και ασθενειών των φυτών ή να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα των εν λόγω ουσιών. Με βάση τον παραπάνω ορισμό τα γεωργικά φάρμακα ή φυτοφάρμακα διακρίνονται στις εξής βασικές ομάδες: εντομοκτόνα, ακαρεοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα, βακτηριοκτόνα, νηματοδωκτόνα, τρωκτικοκτόνα, ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών κ.τ.λ. (Νόμος 712/1977; Μουρκίδου, 1991).

Σήμερα, ο όρος γεωργικό φάρμακο ή φυτοφάρμακο έχει πλέον αντικατασταθεί από όρο φυτοπροστατευτικό προϊόν ή φυτοπροστατευτική ουσία (plant protection product) (Μενκίσογλου, 1998; European Commission, 2009). Έτσι, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου σχετικά με τη διάθεση στην αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων, καθώς και σύμφωνα με το Ελληνικό Προεδρικό Διάταγμα υπ' αριθμ. 115 του 1997, περί έγκρισης, διάθεσης στην αγορά και ελέγχου φυτοπροστατευτικών προϊόντων, το οποίο θεσπίστηκε σε συμμόρφωση της παραπάνω οδηγίας, ορίζεται πως φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι οι δραστικές ουσίες και τα σκευάσματα, τα οποία περιέχουν μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες, προσφέρονται με τη μορφή με την οποία παραδίδονται στον χρήστη και προορίζονται: α) να προστατεύουν τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα από κάθε είδους επιβλαβείς οργανισμούς ή να προλαμβάνουν τη δράση τους, β) να επηρεάζουν τις βιολογικές διεργασίες των φυτών, (π.χ. ρυθμιστές ανάπτυξης), γ) να διατηρούν τα φυτικά προϊόντα και δ) να καταστρέφουν τα ανεπιθύμητα φυτά ή να καταστρέφουν μέρη των φυτών, να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίζουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξη των φυτών.

Συνεπώς, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία είναι γνωστά ακόμη και σήμερα ως γεωργικά φάρμακα ή φυτοφάρμακα, είναι προϊόντα που χρησιμοποιούνται με σκοπό να προστατεύουν τις γεωργικές καλλιέργειες, να διατηρούν την υγεία των φυτών και να εξασφαλίζουν με αυτό τον τρόπο ένα υψηλό επίπεδο ποιότητας φυτικών τροφίμων. Είναι προϊόντα ισοδύναμα με τα ανθρώπινα φάρμακα, αλλά για χρήση σε φυτά, τα οποία προστατεύουν από εχθρούς και ασθένειες. Χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο στη γεωργία και στην κηπουρική και εφαρμόζονται συνήθως με ψεκασμούς στο φύλλωμα των καλλιεργούμενων φυτών ή στο καλλιεργούμενο έδαφος ή στους σπόρους των φυτών που πρόκειται να

φυτευτούν. Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα διαχωρίζονται σήμερα σε 4 βασικές κατηγορίες:

- Εντομοκτόνα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των εντόμων-εχθρών των καλλιεργούμενων φυτών.
- Μυκητοκτόνα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των μυκητολογικών ασθενειών των φυτών και την καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων.
- Ζιζανιοκτόνα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση και τον έλεγχο των ζιζανίων. Τα ζιζάνια είναι αυτοφυή φυτά που ανταγωνίζονται τα καλλιεργούμενα φυτά σε νερό, θρεπτικά στοιχεία, έδαφος-χώρο και φως.

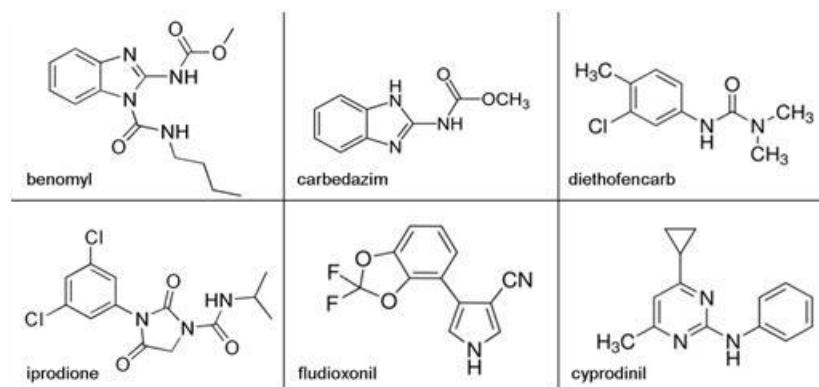
Όλα τα υπόλοιπα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, όπως τους ρυθμιστές ανάπτυξης, που επιβραδύνουν ή παρεμποδίζουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξη των καλλιεργούμενων φυτών, καθώς και τα απολυμαντικά εδάφους (Harris, 2002)

1.4.1. Μυκητοκτόνα με έμφαση στους παρεμποδιστές του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας

Ο χημικός έλεγχος παραμένει μέχρι και σήμερα ο κυριότερος τρόπος για την αντιμετώπιση των μυκήτων στις περισσότερες καλλιέργειες. Η πιο κοινή επέμβαση περιλαμβάνει ψεκασμούς των εναέριων τμημάτων των φυτών με τον αριθμό των επεμβάσεων κατά τη διάρκεια μιας καλλιεργητικής περιόδου να κυμαίνεται από μια έως και είκοσι. Επεμβάσεις με μυκητοκτόνα πραγματοποιούνται και μετασυσπλεκτικά σε βολβούς και σπόρους (Leroux, 2004). Οι μυκητοκτόνες ουσίες μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με το βιοχημικό τρόπο δράσης τους σε πέντε κατηγορίες: 1) μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στη μίτωση και κυτταροδιάριση, 2) ενώσεις που επηρεάζουν την ωσμωρύθμιση, 3) μυκητοκτόνα αναστολής της βιοσύνθεσης αμινοξέων, 4) μυκητοκτόνα αναστολής της βιοσύνθεσης στερολών και 5) μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στην αλυσίδα της αναπνοής.

Τη δεκαετία τον 1960 αναπτύχθηκαν τα πρώτα διασυστηματικά μυκητοκτόνα όπως είναι τα βενζιμιδαζολικά (benomyl, thiabendazole, carbendazim) (Εικόνα 1.3) και οι εστέρες τον θειοφανικού οξέος (thiophonate-methyl). Οι ουσίες αυτές είναι ευρέως φάσματος προστατευτικές και θεραπευτικές και εμφανίζουν εξαιρετική μυκητοκτόνο δράση (Leroux, 2004). Τα βενζιμιδαζολικά όπως και τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας αυτής θεωρούνται αναστολείς της μίτωσης καθώς παρεμβαίνουν στον πολυμερισμό της τουμπουλίνης αναστέλλοντας τη συνδεσμολογία των μικροσωληνίσκων προσδενόμενα στη β-τουμπουλίνη (β-tubulin) (Davidse and Flach, 1978). Συνεπώς εμποδίζουν το σχηματισμό λειτουργικής πυρηνικής ατράκτου.

Μια άλλη κατηγορία περιλαμβάνει τα μυκητοκτόνα που επηρεάζουν την ωσμωρύθμιση. Τα δικαρβοξαμίδια (chlorzolinate, iprodione, procymidone, vinclozolin), τα φαινυλοπυρρόλια (fludioxonil και fenpiclonil) και οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες (dicloran, quintozone κλπ) είναι ομάδες μυκητοκτόνων της κατηγορίας αυτής (Εικόνα 1.3), (Leroux, 2004). Τα δικαρβοξαμίδια αντικατέστησαν τα βενζιμιδαζολικά στα τέλη της δεκαετίας των 1970 και έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση μυκητολογικών ασθενειών για περισσότερο από δύο δεκαετίες (Sun et al., 2010). Τα φαινυλοπυρρόλια είναι συνθετικά ανάλογα τον αντιβιοτικού pyrgrolnitrin και χρησιμοποιούνται σαν μυκητοκτόνα φυλλώματος. Είναι μη διασυστηματικά μυκητοκτόνα τα οποία διατίθενται στο εμπόριο και ως μίγματα με το cyprodinil (Rosslenbroich and Stuebler, 2000). Τέλος, από τα αρωματικά μυκητοκτόνα, τα οποία αντιπροσωπεύουν μια παλιά ετερογενή ομάδα, το πιο αποτελεσματικό είναι το διασυστηματικό dicloran το οποίο κυκλοφόρησε στο εμπόριο το 1959. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των μυκητοκτόνων αυτής της ομάδας δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί παρόλο που οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια. Υποστηρίζεται ότι οι ουσίες αυτές παρεμβαίνουν στο μονοπάτι μεταφοράς σημάτων ωσμωρύθμισης το οποίο αποτελείται από τη κινάση της ιστοδίνης (histidine kinase) και τις διαδοχικές κινάσες MAP (MAP kinase cascades) διεγείροντας μια μη φυσιολογική συσσώρευση γλυκερόλης (Yamaguchi and Fujimura, 2005; Pillonel and Meyer, 1997). Και τα τρία μέλη της κατηγορίας αυτής (δικαρβοξαμιδικά, φαινυλοπυρρόλια και αρωματικά μυκητοκτόνα) αναστέλλουν τόσο τη βλάστηση των κονιδίων των μυκήτων, όσο και την μυκηλιακή ανάπτυξη.



Εικόνα 1.3: Χημικές δομές μυκητοκτόνων της ομάδας των βενζιμιδαζολικών (*benomyl*, *carbendazim*), των καρβαμιδικών (*diethofencarb*), των δικαρβοξαμιδικών (*iprodione*), των φαινυλοπυρρόλιων (*fludioxonil*) και των ανιλινοπυριμιδινών (*cyprodinil*)

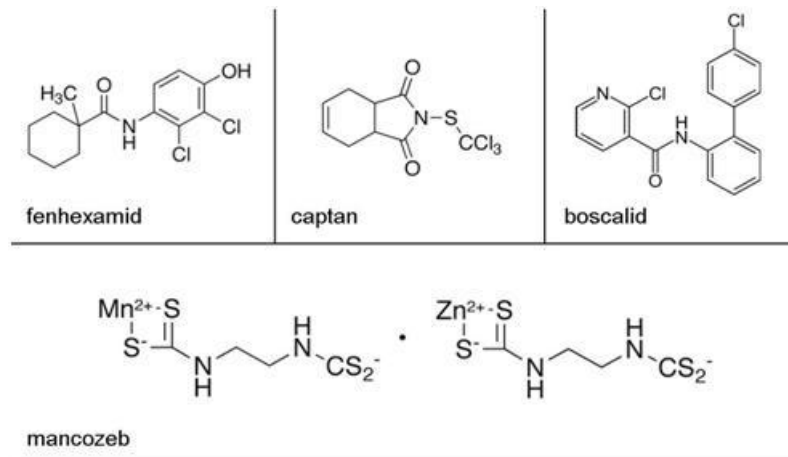
Μια σχετικά νέα ομάδα μυκητοκτόνων η οποία εισήχθει σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες στα μέσα της δεκαετίας του 1990 είναι οι ανιλινοπυριμιδίνες. Οι ομάδα των ανιλινοπυριμιδινών αντιπροσωπεύεται από τρεις δραστικές ουσίες, το cyprodinil

(Εικόνα 1.3) το mepanipyrim και το pyrimethanil. Τα μυκητοκτόνα της ομάδας αυτής ελέγχουν ικανοποιητικά τους πληθυσμούς μυκήτων ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά και δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα (Leroux et al., 1999). Οι ανιλνοπυριμιδίνες θεωρούνται αναστολείς της βιοσύνθεσης διαφόρων αμινοξέων και ιδιαίτερα της μεθειονίνης. Επίσης, οι ανιλνοπυριμιδίνες αναστέλλουν την έκκριση εξωκυτταρικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων υδρολυτικών ενζύμων που σχετίζονται με τη παθογένεση μυκήτων (Heye et al., 1994; Milling and Richardson, 1995). Οι ουσίες αυτές είναι διασυστηματικά μυκητοκτόνα με κατεξοχήν προστατευτική και μερικώς θεραπευτική δράση (Rosslenbroich and Stuebler, 2000). Όλα τα μυκητοκτόνα της ομάδας έχουν τον ίδιο τρόπο δράσης και συνεπώς παρατηρείται διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ των μυκητοκτόνων της ομάδας (Hilber and Schüerpp, 1996 a.b)

Η επόμενη ομάδα μυκητοκτόνων περιλαμβάνει τους αναστολείς της βιοσύνθεσης των στερολών (SBIs, Sterol Biosynthesis Inhibitors). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι αναστολείς της απομεθυλίωσης τον άνθρακα 14 της λανοστερόλης ή DMIs (C14 demethylase inhibitors) και η νεότερη ομάδα των υδροξυανιλιδίων που παρεμβαίνουν στην απομεθυλίωση τον τέταρτου άνθρακα (C-4 demethylation) στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της εργοστερόλης αναστέλλοντας τη δράση της 3-κετο-ρεδουκτάσης (Debieu et al., 2001; Leroux, 2004). Η ομάδα των υδροξυανιλιδίων αντιπροσωπεύεται από το μυκητοκτόνο fenhexamid (Εικόνα 1.4) το οποίο παρουσιάζει προστατευτική δράση κατά πολλών ειδών μυκήτων. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι το fenhexamid ήταν ένα νέο μυκητοκτόνο, εν τούτοις στελέχη ανθεκτικά σε αυτήν την πολλά υποσχόμενη ουσία ήταν εύκολα ανιχνεύσιμα στους πληθυσμούς αρκετών ειδών μυκήτων πριν ακόμα εισαχθεί στη γεωργική πράξη (Leroux, 2004). Τα μυκητοκτόνα της ομάδας των SBIs δεν παρεμποδίζουν τη βλάστηση των κονιδίων αλλά σε χαμηλές συγκεντρώσεις αναστέλλουν την επιμήκυνση των βλαστικών σωλήνων και την μυκηλιακή ανάπτυξη (Leroux et al., 1999).

Στην τελευταία ομάδα μυκητοκτόνων περιλαμβάνονται δραστικές ουσίες οι οποίες έχουν στόχο την αλυσίδα της αναπνοής. Τα μυκητοκτόνα αυτά διαταράσσουν τον εφοδιασμό ενέργειας διακόπτοντας την σύνθεση ATP. Τέτοιες ενώσεις είναι ισχυροί αναστολείς της βλάστησης κονιδίων. Στην ομάδα αυτή ανήκουν: α) πολυθεσικά μυκητοκτόνα, β) παρεμποδιστές της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και γ) αναστολείς των συμπλόκων II και III της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Από την κατηγορία των πολυθεσικών μυκητοκτόνων χρησιμοποιήθηκαν για αρκετά χρόνια τα διθειοκαρβαμιδικά (thiram, mancozeb και maneb), τα φθαλιμίδια και τα αρυλοσουλφαμίδια (captan, folpet, dichlofluanid και tolylfluanid) και το chlorathalonil (Εικόνα 1.4), (Leroux, 2004). Όλα τα μέλη της κατηγορίας των πολυθεσικών μυκητοκτόνων παρουσιάζουν προστατευτική δράση και χρειάζονται συχνές

εφαρμογές σε ψηλές δόσεις (μεταξύ 1000 και 2000 gr δραστικής ουσίας ανά εκτάριο) (Leroux, 2004). Ο ουσιαστικός κίνδυνος για ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε τέτοια μυκητοκτόνα θεωρείται χαμηλός, ωστόσο, υπάρχουν διάφορες αναφορές για αποτυχία ελέγχου ορισμένων μυκήτων. Το fluazinam είναι μια αρυλαμινοπυριδίνη, ένας από τους ισχυρότερους γνωστούς παρεμποδιστές της σύνθεσης του ATP. Το fluazinam έχει χρησιμοποιηθεί κατά του *Botrytis cinerea* αρχικά στην Ιαπωνία το 1990 και από τα τέλη της δεκαετίας του 1990 και στην Ευρώπη.

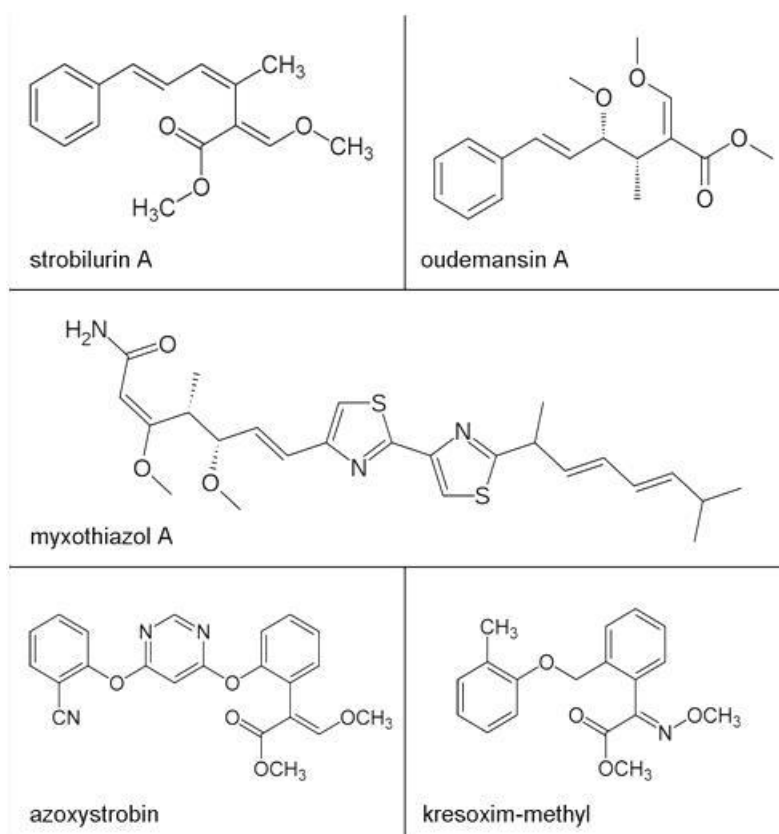


Εικόνα 1.4: Χημικές δομές μυκητοκτόνων της ομάδας των υδροξυανιλιδίων (*fenhexamid*), των αρυλοσουλφαμιδίων (*captan*), των ανιλιδίων (*boscalid*) και των διθειοκαρβαμιδικών (*mancozeb*).

Οι παρεμποδιστές του συμπλόκου II της αναπνοής, γνωστοί αλλιώς και ως αναστολείς της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (Succinate Dehydrogenase Inhibitors, SDHIs) είναι μια παλιά ομάδα μυκητοκτόνων που περιλαμβάνει δραστικές ουσίες διαφόρων χημικών δομών όπως τα καρβοξαμίδια και συγγενικά ανιλιδία. Τα μυκητοκτόνα αυτά εισήχθησαν στη γεωργική πράξη στα τέλη της δεκαετίας του 1960 ως διαφυλλικά και επενδυτικά σπόρων λόγω της διασυστηματικής τους δράσης κυρίως έναντι βασιδιομυκήτων (Leroux, 2004). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται σε αυτή την ομάδα μυκητοκτόνων και έτσι εισήχθησαν πρόσφατα νέες δραστικές ουσίες στη γεωργική πράξη. Στη νεότερη γενιά των ανιλιδίων εμπίπτει το μυκητοκτόνο *boscalid* το οποίο παρουσιάζει ένα πολύ ευρύ φάσμα δράσης. Η πρωτεΐνη-στόχος του *boscalid* όπως και των υπολοίπων μυκητοκτόνων αυτής της ομάδας είναι η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος, η οποία συμμετέχει σε δύο σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες, στο κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος και στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (αναπνευστική αλυσίδα) στα μιτοχόνδρια. Με τον τρόπο αυτό οι SDHIs εμποδίζουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το ηλεκτρικό οξύ στην ουμπικινόνη (Stammli et al., 2007; Leroux, 2004).

1.4.2. Παρεμποδιστές του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας (QoI's)

Οι στρομπιλουρίνες ή QoI's (Quinone Outside Inhibitors) όπως συνήθως αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία, αποτελούν μια σημαντική ομάδα μυκητοκτόνων με ένα σχετικά νέο τρόπο δράσης. Η ανακάλυψη αυτής της ομάδας μυκητοκτόνων προέκυψε από τη μελέτη μιας ομάδας φυσικών β-μεθόξυ-ακρυλικών ενώσεων (β-methoxyacrylates), οι απλούστερες από τις οποίες είναι οι στρομπιλουρίνη A, oudemansin A και myxothiazol (Bartlett et al., 2002).



Εικόνα 1.5: Χημικές δομές φυσικών ενώσεων της ομάδας των β-μεθόξυ-ακρυλικών (στρομπιλουρίνη A, oudemansin A και myxothiazol) και χημικές δομές των πρώτων συνθετικών μυκητοκτόνων της ομάδας των στρομπιλουρινών (azoxystrobin και kresoxim-methyl)

Οι φυσικές αυτές ουσίες, οι οποίες απομονώθηκαν από βασιδιομύκητες, συμπεριλαμβανομένου και του *Strobilurus tenacellus* (Vincelli, 2002), παρά την υψηλή δραστηριότητά τους *in vitro* έναντι πολλών φυτοπαθογόνων μυκήτων κρίθηκαν ακατάλληλες για γεωργική χρήση λόγω της φωτοχημικής τους αστάθειας και πτητικότητας (Bartlett et al., 2002). Η γνώση όμως της δομής και των ιδιοτήτων τους ήταν το εφαλτήριο για την έναρξη ερευνητικών προσπαθειών και το 1992, 15 χρόνια μετά την ανακάλυψη των στρομπιλουρινών από Γερμανούς ερευνητές, οι εταιρείες αγροχημικών ICI και BASF ανήγγειλαν την ανάπτυξη των πρώτων στρομπιλουρινών, του azoxystrobin και του kresoxim-methyl, αντίστοιχα. Αυτά τα προϊόντα

κυκλοφόρησαν στο εμπόριο για πρώτη φορά το 1996, για τον έλεγχο ασθενειών στα σιτηρά (Bartlett et al., 2002). Σήμερα στη διεθνή αγορά κυκλοφορούν 13 διαφορετικές ενώσεις που ανήκουν στην ομάδα των στρομπιλουρινών (Fernandez-Ortuno et al., 2008a).

Οι στρομπιλουρίνες, ως ομάδα μυκητοκτόνων, δίνουν υψηλά επίπεδα αποτελεσματικότητας σε ένα ευρύ φάσμα μυκητολογικών ασθενειών σε διάφορες καλλιέργειες όπως σιτηρά, βιομηχανικά φυτά, οπωροφόρα, λαχανικά, χλοοτάπητες και καλλωπιστικά (Vincelli, 2002). Παρουσιάζουν πολύ καλή προστατευτική αλλά και θεραπευτική δράση παρεμποδίζοντας τη βλάστηση των σπορίων των μυκήτων. Χαρακτηρίζονται από υψηλή διασυστηματική κίνηση, αν και η ικανότητα διασυστηματικής και διελεσματικής κίνησης ποικίλει στα διάφορα μέλη της ομάδας.

Το azoxystrobin είναι ένα ευρέως φάσματος μυκητοκτόνο με δράση κατά των τεσσάρων κυριότερων ομάδων φυτοπαθογόνων, μυκήτων και ωομυκήτων (Ασκομύκητες, Βασιδιομύκητες, Δευτερομύκητες και Ωομύκητες) (Clough & Godfrey, 1996). Παρόμοιο εύρος δράσης έχει και το pyraclostrobin το οποίο εφαρμόζεται σε ένα μεγάλο εύρος καλλιεργειών.

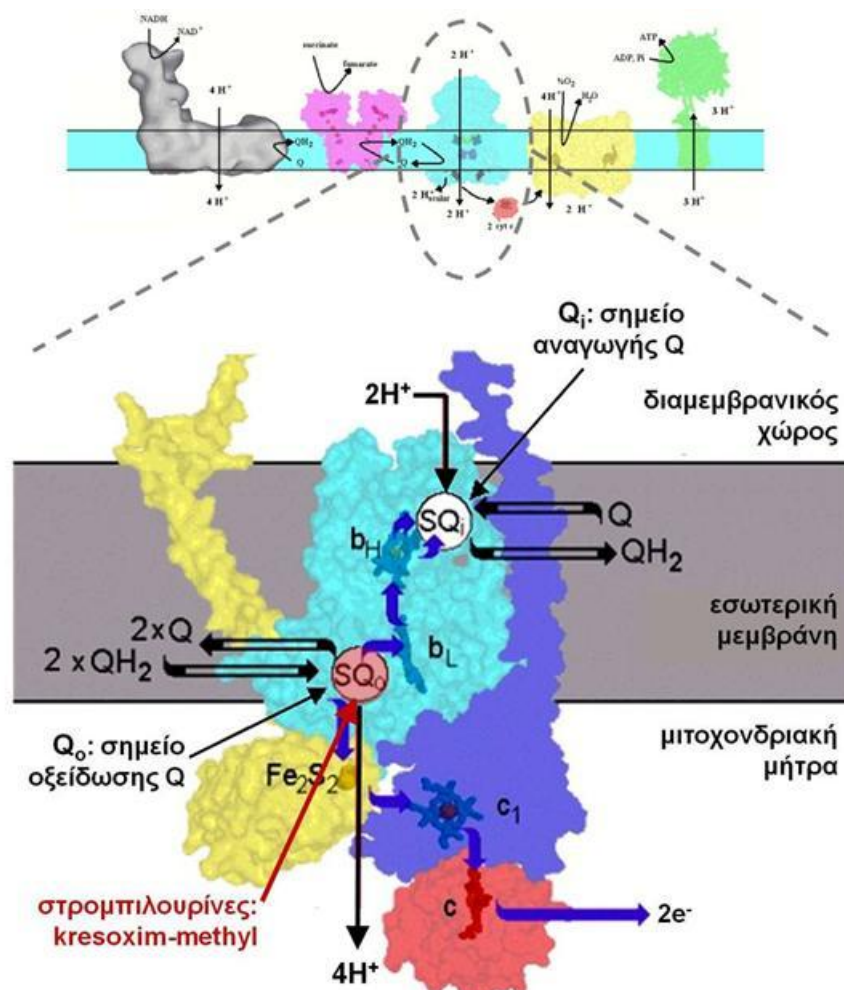


Εικόνα 1.6: *Strobilurus tenacellus* (Pers.:Fr.) (1962). Καρποφορίες του βασιδιομύκητα από τον οποίο απομονώθηκαν οι β-μεθόξυ-ακρυλικές ενώσεις: στρομπιλουρίνη A, oudemansin A και myxothiazol.

Ωστόσο, δεν προσφέρουν όλες οι στρομπιλουρίνες υψηλά επίπεδα ελέγχου και στις τέσσερις κλάσεις φυτοπαθογόνων μυκήτων. Για παράδειγμα, το kresoxim - methyl και το trifloxystrobin παρουσιάζουν μέτρια δράση κατά των Ωομυκήτων, όπως για παράδειγμα τον *Plasmopara viticola* παθογόνου αιτίου του περονοσπόρου της αμπέλου, ενώ σε ασθένειες που προκαλούνται από Βασιδιομύκητες, όπως για παράδειγμα στις σκωριάσεις των σιτηρών, παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα αποτελεσματικότητας. Επίσης, στρομπιλουρίνες όπως το metominostrobin και το riceoxystrobin έχουν αναπτυχθεί για χρήση αποκλειστικά στο ρύζι και στα σιτηρά, αντίστοιχα (Bartlett et al., 2002).

1.4.3. Μηχανισμός δράσης των στρομπιλουρινών

Το κυτόχρωμα b είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία σχηματίζει τον πυρήνα του ενζυμικού συμπλέγματος των κυτοχρωμάτων bc (σύμπλοκο III) στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων η οποία βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Brandt and Trumpower, 1994; Sauter et al., 1995). Η πρωτεϊνική αυτή υπομονάδα του συμπλόκου III, κωδικοποιείται από το γονίδιο του κυτοχρώματος b (*cytb*) το οποίο βρίσκεται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Grasso et al., 2006b).



Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση της δομής του κυτοχρώματος b, διακρίνεται η θέση πρόσδεσης των στρομπιλουρινών Q_o και η ροή ηλεκτρονίων από την ουμπικινόλη QH_2 προς το κυτόχρωμα c. (προσαρμογή από http://www.life.illinois.edu/crofts/bioph354/bc-complex_summary.html).

Τα μυκητοκτόνα της ομάδας των στρομπιλουρινών δεσμεύονται στη θέση Q_o , προς την εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων όπου η ουμπικινόλη οξειδώνεται προς ουμπικινόνη στο κυτόχρωμα b, εμποδίζοντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ κυτοχρώματος b και κυτοχρώματος c_1 (Εικόνα 1.7). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη παρεμπόδιση της μιτοχονδριακής αναπνοής και της παραγωγής τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) με συνέπεια την διαταραχή των

ενεργειακού κύκλου τον μύκητα (Bartl et al., 2002). Η μιτοχονδριακή αναπνοή παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την βλάστηση των σπορίων και συνεπώς, αρχικά επηρεάζεται η βλάστηση και άλλες διαδικασίες με ενεργειακές απαιτήσεις (Lesemann et al., 2006).

Μια ακόμη σημαντική συνέπεια της δράσης των στρομπιλουρινών, ως αναστολέων της ροής ηλεκτρονίων, αποτελούν οι αυξημένες συγκεντρώσεις ενδιάμεσων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Intermediates, ROI's). Σε αυτή την αυξημένη παραγωγή ROI's πιστεύεται ότι οφείλεται η ανάπτυξη ανθεκτικότητας πληθυσμών παθογόνων, στους οποίους οι ρυθμοί μετάλλαξης τον σημείου στόχου στα μιτοχόνδρια αυξάνονται εξειδικευμένα. Το κυτόχρωμα b αποτελεί την πρωτεΐνη-στόχο των Qoi's και κωδικοποιείται από το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), το οποίο παρουσιάζει ρυθμούς μετάλλαξης περίπου 10% περισσότερο απ' ότι το γενωμικό DNA. Αυτό πιστεύεται ότι οφείλεται στην παραγωγή υψηλότερων συγκεντρώσεων ενδιάμεσων ριζών οξυγόνου στα μιτοχόνδρια, (Taylor et al., 2002; Avila- Adame and Koller, 2003).

Η στρομπιλουρίνη kresoxim-methyl

Το kresoxim-methyl [C₁₈H₁₉NO₄, (Methyl (E)-methoxyimino-2-(o-tolylloxymethyl)-phenyl acetate), (οξικό (E)-μεθοξυ-ιμινο-2-(ο-τολυλοξυ)-ο-τολυλο) μεθύλιο], CAS: 143.390-89-0, CIPAC: 568] είναι ένα ημι-διασυστηματικό μυκητοκτόνο με διελασματική κίνηση δια μέσου της αέριας φάσης. Δρα προληπτικά και θεραπευτικά, χαρακτηρίζεται από μεγάλη υπολειμματική διάρκεια και παρεμποδίζει την βλάστηση κονιδίων (Balba et al., 2007). Μετά την επαφή του kresoxim-methyl με το φυτό, οι ατμοί της δραστικής ουσίας διαχέονται και διεισδύουν στους μεσοκυττάριους χώρους του φύλλου από τα στομάτια. Αυτή η συμπεριφορά του kresoxim-methyl (βραδεία αποδέσμευση) δικαιολογεί τη μεγάλη διάρκεια δράσης του. Χρησιμοποιείται σε ένα μεγάλο ευρós καλλιέργειών μεταξύ των οποίων: ελιές, μηλοειδή, εσπεριδοειδή, σολανώδη, επιταπέζια και οινοποιήσιμα σταφύλια, φράουλες, στελεχώδη λαχανικά κ.α. Εμφανίζει υψηλή αποτελεσματικότητα στον Ασκομύκητα *Uncinula necator*, μέτρια αποτελεσματικότητα στους Ασκομύκητες *Helminthosporium teres*, *Mycosphaerella graminicola*, στο Βασιδιομύκητα *Rhizoctonia solani*, στον Αδηλομύκητα *Alternaria solani* και στους Ωμομύκητες *Plasmopara viticola* και *Pythium aphanidermatum*. Αντίθετα, εμφανίζει χαμηλή αποτελεσματικότητα στους Βασιδιομύκητες *Puccinia recondita* και *Puccinia hordei*, ενώ δεν είναι καθόλου αποτελεσματικό στον *Mycosphaerella fijiensis*, (Bartlett et al., 2002).

Πίνακας 1.2: Μέγιστα επιτρεπτά ορία υπολειμμάτων (MRLs) επιλεγμένων αγροτικών προϊόντων (πηγή: Codex Alimentarius, <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html>)

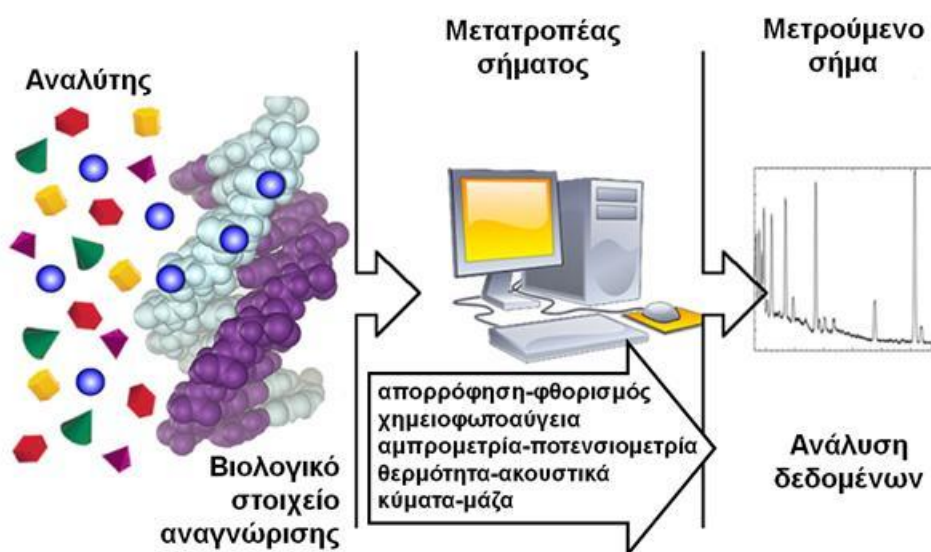
Προϊόν	MRL	Χρονιά Έγκρισης
Σταφύλια	1 mg/Kg	2001
σταφίδες (κορινθιακή, ξανθή και σουλτανίνα)	2 mg/Kg	2001
Γκρέιπφρουτ	0.5 mg/Kg	2003
πορτοκάλια, γλυκό, ξινό (υβρίδια και ποικιλίες)	0.5 mg/Kg	2003
Μηλοειδή	0.2 mg/Kg	2003
ελιές	0.2 mg/Kg	2003
Κριθάρι	0.1 mg/Kg	2003
ελαιόλαδο (παρθένο)	0.7 mg/Kg	2003

1.5. Βιοαισθητήρες

Εισαγωγή

Ιστορικά οι βιοαισθητήρες αναπτύχθηκαν κατά το δεύτερο μισό του 20ου αιώνα. Το 1956 ο Καθηγητής Leland Clark ανακάλυψε το πρώτο ηλεκτρόδιο οξυγόνου και στη συνέχεια, το 1962 παρουσίασε τον πρώτο βιοαισθητήρα, ο οποίος ήταν ένας ηλεκτροχημικός (ενζυμικά ηλεκτρόδια) αισθητήρας γλυκόζης. Παράλληλα οι Guilbault και Montalvo κατασκεύασαν το 1969 τον πρώτο ποτενσιομετρικό βιοαισθητήρα, ενώ το δεκαετία του 1980, έκαναν την εμφάνισή τους οι αισθητήρες οπτικών ινών, για την ανίχνευση *in vivo* αερίων στο αίμα (Peterson). Το 1983, κατασκευάζεται ο πρώτος ανοσοαισθητήρας συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR), ενώ ακολούθησε, το 1984, ο πρώτος αμπερομετρικός βιοαισθητήρας με μεσολαβητή: τη φεροκίνη (ferrocene), η οποία χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την οξειδάση της γλυκόζης για την ανίχνευση της γλυκόζης στο αίμα (Newman & Turner, 2005).

Από τότε έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες μελέτες που αφορούν το σχεδιασμό βιοαισθητήρων για πληθώρα εφαρμογών μεταξύ των οποίων ανάπτυξη ιατρικών διαγνωστικών συσκευών, περιβαλλοντικές αναλύσεις και ποιοτικό έλεγχο τροφίμων. Ο βιοαισθητήρας είναι μια αυτόνομη συσκευή που παρέχει εξειδικευμένες ποσοτικές ή ημιποσοτικές πληροφορίες για έναν αναλύτη χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό αναγνωριστικό στοιχείο που διατηρείται σε άμεση επαφή με έναν μεταλλάκτη σήματος. Ο βιοαισθητήρας είναι ευαίσθητος σε ένα φυσικό ή χημικό ερέθισμα (φως, πίεση, ηλεκτρικό φορτίο κ.λπ.) και μετατρέπει την βιολογική απόκριση σε ένα μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα.



Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση της δομής του βιοαισθητήρα, προσαρμογή από Martins et al., 2013.

Οι βιοαισθητήρες αποτελούνται από δύο κύρια μέρη: α) έναν υποδοχέα, ένα εξειδικευμένο βιομόριο (πρωτεΐνη, αντίσωμα, DNA, κύτταρα) που αντιδρά εξειδικευμένα με έναν αναλύτη (μόριο - ουσία που προστίθεται για ανίχνευση και μπορεί να είναι μια πρωτεΐνη, ένα σάκχαρο, ένα αντίσωμα ή αντιγόνο, ιόντα, βαρέα μέταλλα, αέρια κ.λπ.). Το βιομόριο είναι ικανό να αναγνωρίζει την παρουσία, την ενεργότητα ή τη συγκέντρωση ενός συγκεκριμένου αναλύτη σε διάλυμα και β) την διεπιφάνεια ακινητοποίησης-μετατροπέα σήματος (Transducer), που μετατρέπει τη βιολογική ή βιοχημική απόκριση (οφειλόμενη στην ανίχνευση του αναλύτη) σε μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα (εικόνα 1.9). Το μέγεθος του παραγόμενου ηλεκτρικού σήματος είναι αντίστοιχο της συγκέντρωσης του αναλύτη που ανιχνεύθηκε (Mohanty & Kougianos, 2006).

Τύποι Βιοαισθητήρων

Η ταξινόμηση των βιοαισθητήρων γίνεται με βάση τον μετατροπέα σήματος που χρησιμοποιείται, τη φύση και τον τρόπο δράσης του βιομορίου αναγνώρισης και την μέθοδο ακινητοποίησης. Με βάση τον μετατροπέα του σήματος οι βιοαισθητήρες διακρίνονται σε οπτικούς (μέτρηση απορρόφησης, φθορισμού, χημειοφωτοαύγειας), ηλεκτροχημικούς (αμπερομετρικοί, ποτενσιομετρικοί), θερμικούς (μέτρηση έκλυσης και την απορρόφησης θερμότητας) και βαρυμετρικούς (αλλαγές στη μάζα), (Eggins, 1996).

Οι οπτικοί βιοαισθητήρες είναι αρκετά διαδεδομένοι και βασίζονται στην αλλαγή των οπτικών ιδιοτήτων (στην απορρόφηση ή στον φθορισμό) του βιομορίου αναγνώρισης κατά την ανίχνευση του αναλύτη ή και του ίδιου του αναλύτη.

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες είναι οι πλέον διαδεδομένοι και συχνά χρησιμοποιούμενοι βιοαισθητήρες παγκοσμίως. Ο μετατροπέας σήματος είναι ηλεκτροχημικός και συνήθως είναι ένα ηλεκτρόδιο. Η μετατροπή του σήματος από ηλεκτροχημικό σε μετρήσιμο ηλεκτρικό είναι εύκολη και χαμηλού κόστους. Οι ηλεκτροχημικοί μετατροπείς σήματος διακρίνονται σε ποτενσιομετρικούς και αμπερομετρικούς. Οι ποτενσιομετρικοί βιοαισθητήρες υπολογίζουν το οξειδωτικό/αναγωγικό δυναμικό μιας ηλεκτροχημικής αντίδρασης, καταγράφοντας το δυναμικό που διαρρέει ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος. Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην ακινητοποίηση του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης στην επιφάνεια ηλεκτροδίου στερεάς κατάστασης (λευκόχρυσου, γραφίτη, άνθρακα, οξειδίων μετάλλων, πολυμερών εκτυπωμένων ηλεκτροδίων) που αποτελεί τον μετατροπέα του βιοαισθητήρα. Υπό μια σταθερά εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού το ηλεκτρόδιο μετρά το ρεύμα που παράγεται κατά τη διάρκεια μιας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης. Κατά την αντίδραση του

βιολογικού στοιχείου παράγεται ρεύμα ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη. Επιπλέον, υπάρχουν και οι βαρυμετρικοί βιοαισθητήρες που διακρίνονται σε πιεζοηλεκτρικούς και σε ακουστικούς επιφανειακών κυμάτων. Και οι δύο είναι αισθητήρες μάζας, αφού παρουσιάζουν γραμμική σχέση ανάμεσα στην αλλαγή της μάζας στην επιφάνεια του κρυστάλλου και στη συχνότητα ταλάντωσής του. Οι θερμικοί βιοαισθητήρες λειτουργούν μέσω μέτρησης της θερμοκρασίας από τη θερμότητα που εκλύεται ή απορροφάται κατά την αναγνώριση του αναλύτη από το βιομόριο, (Gorton, 2005).

Τέλος, με βάση το είδος του βιομορίου αναγνώρισης οι βιοαισθητήρες διακρίνονται σε ενζυμικούς (ακίνητοποιημένα ένζυμα και πρωτεΐνες), DNA βιοαισθητήρες (νουκλεϊκά οξέα), κυτταρικούς βιοαισθητήρες (ακίνητοποιημένα κύτταρα ή ιστοί), ανοσοαισθητήρες (ακίνητοποιημένο αντίσωμα ή αντιγόνο συζευγμένο με ένζυμο ή χρωστική) και βιοαισθητήρες μικροοργανισμών.

1.5.1. Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες συνήθως βασίζονται σε μια αντίδραση που παράγει ή καταναλώνει ηλεκτρόνια. Αυτού του τύπου οι αισθητήρες απαρτίζονται συνήθως από τρία ηλεκτρόδια: ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς, ένα ηλεκτρόδιο εργασίας και ένα βοηθητικό ηλεκτρόδιο. Η ηλεκτροχημική μεταγωγή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη λόγω της απλότητας, του χαμηλού εξοπλιστικού κόστους και της υψηλής ευαισθησίας που είναι συγκρίσιμη με τις τεχνικές φθορισμού (D'Orazio, 2003).

Η ηλεκτροχημική ανίχνευση βιολογικών γεγονότων συνήθως συνοδεύεται από την καταγραφή αλλαγών στην ένταση του ρεύματος κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες τάσης. Η αύξηση της έντασης μπορεί να προκληθεί μέσω της αλληλεπίδρασης ηλεκτροενεργών μορίων-δεικτών, όπως για παράδειγμα οργανικές ενώσεις που μπορούν να ενσωματωθούν στη διπλή έλικα ενός μορίου DNA. Βιολογικά γεγονότα μπορούν επίσης να παρατηρηθούν μέσω αλλαγών σε ηλεκτροχημικές παραμέτρους όπως η αγωγιμότητα (conductivity) και η χωρητικότητα (capacitance), ενώ η χρήση ενζύμων ως υποδοχέων για την ηλεκτροχημική ανίχνευση βιομοριακών αλληλεπιδράσεων αποτελεί ίσως τη συνηθέστερη μέθοδο επιλογής (Wang, 2000).

Κυκλική Βολταμετρία

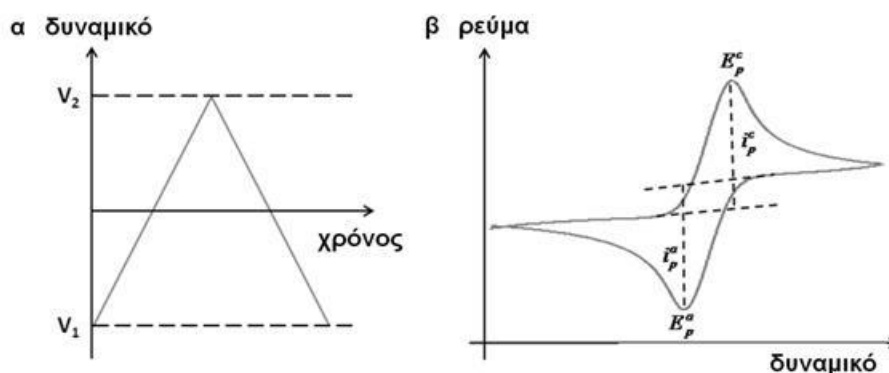
Ανάμεσα στις ηλεκτροχημικές τεχνικές, η κυκλική βολταμετρία κατέχει εξέχουσα θέση στην μελέτη των ηλεκτροχημικών αντιδράσεων. Η ιδιαίτερη σημασία της κυκλικής βολταμετρίας με γραμμική σάρωση (cyclic linear sweep voltammetry), εκτός του ότι λαμβάνεται γρήγορα, έγκειται στο γεγονός ότι προσφέρεται για μια πρώτη μελέτη μιας ηλεκτροχημικής αντίδρασης, παρέχοντας τόσο ποιοτικά όσο και

ημιποσοτικά χαρακτηριστικά. Θα μπορούσε κανείς να πει ότι παρόλο που η κυκλική βολταμετρία δεν ανήκει στις αναλυτικές ηλεκτροχημικές τεχνικές, παρόλα αυτά, αποτελεί μια διαγνωστική μέθοδο για τη μελέτη του μηχανισμού των ηλεκτροχημικών αντιδράσεων. Με την μέθοδο αυτή μπορεί να διαπιστωθεί η ηλεκτροχημική συμπεριφορά του ηλεκτροδραστικού συστατικού, η αντιστρεπτότητα ή μη μιας ηλεκτροχημικής αντίδρασης, η πιθανή παραγωγή ενδιάμεσων προϊόντων, αν στο ηλεκτρόδιο συμβαίνουν φαινόμενα προσρόφησης ή εκρόφησης ή αν λαμβάνουν χώρα φαινόμενα κατάλυσης ή παρεμπόδσης κ.λ.π.

Για τους παραπάνω λόγους, η κυκλική βολταμετρία αποτελεί την καταλληλότερη ηλεκτροχημική τεχνική για την μελέτη πολύπλοκων ηλεκτροχημικών αντιδράσεων ιδιαίτερα όταν συνδυάζεται με οπτικές τεχνικές, όπως η φασματοσκοπία απορρόφησης οπότε μπορεί να ανιχνευθούν ασταθή ενδιάμεσα προϊόντα της ηλεκτροχημικής αντίδρασης (Kouyoun et al., 2012)

Αρχή της Κυκλοβολταμετρικής Μεθόδου

Στην κυκλική βολταμετρία χρησιμοποιείται μια ηλεκτροχημική κυψέλη (σύστημα δυο ή τριών ηλεκτροδίων) για την κινητική μελέτη των ηλεκτροχημικών αντιδράσεων. Βασικό χαρακτηριστικό της μεθόδου αποτελεί η γραμμική μεταβολή του δυναμικού του ηλεκτροδίου και η καταγραφή της αντίστοιχης τιμής του ρεύματος με αποτέλεσμα τη λήψη διαγραμμάτων τάσης-έντασης (Nicholson, 1965). Η γραμμική σάρωση του δυναμικού γίνεται ανάμεσα σε δυο ακραίες τιμές, οι οποίες τις πιο πολλές φορές ορίζονται από τα δυναμικά ανοδικής έκλυσης του O_2 και καθοδικής έκλυσης του H_2 σε υδατικά τουλάχιστον διαλύματα. Η σάρωση είναι συνεχής και κάθε φορά που το δυναμικό του ηλεκτροδίου φθάνει στα οριακά αυτά σημεία, η σάρωση αλλάζει φορά (Εικόνα 1.10). Κατά τις ανοδικές σαρώσεις, στο ηλεκτρόδιο συμβαίνουν οξειδωτικές αντιδράσεις, ενώ οι καθοδικές σαρώσεις συνοδεύονται από αναγωγικές αντιδράσεις.



Εικόνα 1.9: α: διάγραμμα τριγωνικής μεταβολής δυναμικού του ηλεκτροδίου εργασίας με το χρόνο στην κυκλική βολταμετρία και β: κυκλικό βολταμογράφημα για μια αντιστρεπτή δράση, προσαρμογή από Andrade, et al., 2011.

Η πυκνότητα ρεύματος (ένταση ρεύματος ανά μονάδα επιφάνειας) που διέρχεται από τη μονάδα επιφάνειας του ηλεκτροδίου είναι συνάρτηση της ταχύτητας σάρωσης ή του χρόνου. Αυτό συμβαίνει επειδή η ταχύτητα σάρωσης δυναμικού (potential scanning ή sweep rate) απαιτείται να είναι σταθερή. Οι καμπύλες τάσης - έντασης που καταγράφονται με τη διάταξη της Εικόνα 1.10 λέγονται κυκλικά βολταμογραφήματα. Αυτά παρέχουν την απόκριση του ηλεκτροχημικού συστήματος στη συνεχή, χρονική γραμμική αύξηση του δυναμικού του ηλεκτροδίου. Στο διάστημα αυτό λαμβάνουν χώρα ηλεκτροχημικές αντιδράσεις που έχουν ως συνέπεια την αύξηση της έντασης του ρεύματος. Συγκεκριμένα κάθε ανοδική ή καθοδική κορυφή στο βολταμογράφημα μπορεί να αντιστοιχηθεί σε μια ηλεκτροχημική οξειδωτική ή αναγωγική αντίδραση. Η ένταση του ρεύματος είναι ενδεικτική για το ρυθμό της αντίδρασης (αύξηση του ρυθμού οδηγεί σε αύξηση της έντασης του ρεύματος) (Andrade et al., 2011)

Ηλεκτρόδια ηλεκτροχημικών μετρήσεων

Η επιλογή του ηλεκτροδίου εργασίας επηρεάζει το μετέπειτα βολταμετρικό προσδιορισμό και εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική συμπεριφορά του προσδιοριζόμενου συστατικού, το ρεύμα υποβάθρου, την περιοχή δυναμικών, την επαναληψιμότητα της ηλεκτροδιακής επιφάνειας καθώς και τη γεωμετρία του ηλεκτροδίου. Ένα ιδανικό ηλεκτρόδιο δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα, έχει υψηλό λόγο σήματος προς θόρυβο και ανανεώσιμη επιφάνεια. Επίσης θα πρέπει να παράγει χαμηλό ρεύμα υποβάθρου σε μεγάλο εύρος δυναμικών. Κάθε ηλεκτρόδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συγκεκριμένη περιοχή δυναμικών, η οποία εξαρτάται όχι μόνο από το υλικό του ηλεκτροδίου, αλλά και από τη σύσταση των διαλυμάτων στα οποία εμβάπτιζεται. Γενικά όμως ο περιορισμός του δυναμικού προς τις θετικές τιμές οφείλεται στα μεγάλα ρεύματα κατά την οξείδωση του ύδατος προς μοριακό οξυγόνο, ενώ προς τα αρνητικά οφείλεται στην αναγωγή του ύδατος προς υδρογόνο (Swain, 2007).

Στις περισσότερες ηλεκτροχημικές εφαρμογές απαιτείται το δυναμικό του ενός ημιστοιχείου να είναι γνωστό, σταθερό και ανεξάρτητο από τη σύσταση του εξεταζόμενου διαλύματος. Αυτό το ηλεκτρόδιο καλείται ηλεκτρόδιο αναφοράς. Τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς είναι: α) να είναι αντιστρεπτό και να ακολουθεί την εξίσωση του Nernst, β) να αναπτύσσει δυναμικό που δε μεταβάλλεται με το χρόνο, γ) να επανέρχεται στο αρχικό δυναμικό του μετά τη διέλευση χαμηλής έντασης ηλεκτρικού ρεύματος, δ) να παρουσιάζει μικρή υστέρηση κατά την εφαρμογή ενός θερμοκρασιακού κύκλου (Wang et al., 2012).

1.5.2. Κυτταρικοί βιοαισθητήρες

Εισαγωγή

Οι συνεχείς επιστημονικές εξελίξεις σε κυτταρική βιολογία, χημεία, νανοτεχνολογία και αυτοματισμό επιπέτουν τη χρήση κυτάρων θηλαστικών σε ένα μεγάλο εύρος ιατρικών και βιομηχανικών εφαρμογών. Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες είναι εξειδικευμένα εργαλεία που χρησιμοποιούν ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης ζωντανά, άθικτα κύτταρα ή σε ορισμένες περιπτώσεις τμήματα ιστών και όργανα σε συνδυασμό με αισθητήρες ή μεταγωγείς σήματος, για την αναγνώριση συνθηκών του ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού περιβάλλοντος και φυσιολογικών παραμέτρων, καθώς και για την επαγωγή αποκρίσεων των κυτάρων μετά από αλληλεπίδρασή τους με κάποιο ερέθισμα (Kintzios, 2007; Wang & Liu, 2009).

Το κύριο χαρακτηριστικό των κυτταρικών βιοαισθητήρων είναι ότι χρησιμοποιούν ζώντα και άθικτα κύτταρα ως υποδοχείς, και όχι υποκυτταρικά υλικά ή οργανίδια σε αντίθεση με τους υπόλοιπους τύπους βιοαισθητήρων. Μέσω των ζωντανών και ακέραιων κυτάρων, οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη πολλαπλών θέσεων βιοκατάλυσης, στοιχείο ιδιαίτερα σημαντικό για περιπτώσεις όπου η βιολογική αναγνώριση απαιτεί την ταυτόχρονη συμμετοχή πολλών κυτταρικών διεργασιών, όπως π.χ. σύνθετων ενζυμικών συστημάτων.

Ο συγκεκριμένος τύπος βιοαισθητήρων αποτελείται από: α) τα ζωντανά κύτταρα, το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης που δρουν και ως πρωτεύον στοιχείο μεταγωγής σήματος, καθώς χρησιμοποιούνται ως αρχικό στοιχείο πρόσληψης και αναμετάδοσης σημάτων, και β) τους δευτερεύοντες μεταγωγείς, που εξυπηρετούν την μετατροπή των φυσιολογικών σημάτων σε ηλεκτρικά. Όταν τα κύτταρα αλληλεπιδράσουν σε κάποιο ερέθισμα αποκρίνονται παράγοντας μεταβολές σε μόρια ή ιόντα, μεταβολές δυναμικού ή μεταβολές στην εμπέδηση λόγω μεταβολισμού των κυτάρων κλπ. Οι δευτερεύοντες μεταγωγείς, όπως μπορούν να ανιχνεύσουν αυτές τις αποκρίσεις και να τις μετατρέψουν σε ηλεκτρικά σήματα.

Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες μπορούν να εμφανίσουν αυξημένη σταθερότητα και υψηλή βιοκαταλυτική δραστηριότητα με χαμηλό κόστος, ενώ μπορούν να παρέχουν δεδομένα για τις φυσιολογικές αποκρίσεις κυτάρων έναντι ενός αναλύτη αλλά και στοιχεία για την βιοδιαθεσιμότητα του (Daunert et al., 2000). Παρόλα αυτά, όπως και με άλλους βιοαισθητήρες, η ευαισθησία και η αξιοπιστία αυτών των αισθητήρων είναι συχνά περιορισμένη λόγω μη εξειδικευμένων παρεμβάσεων που προκύπτουν από το δείγμα αλλά και εξωτερικών, περιβαλλοντικών μεταβολών (όπως pH και θερμοκρασία). Παρουσιάζουν επίσης φτωχή επιλεκτικότητα επειδή οι ιστοί περιέχουν πληθώρα ενεργών βιοκαταλυτικών θέσεων, με πολλά διαφορετικά ένζυμα και

υποδοχείς με αποτέλεσμα ο βιοαισθητήρας να μπορεί να αποκρίνεται και σε άλλες ουσίες που ενδεχομένως να περιέχονται στο δείγμα, εκτός του αναλυτή στόχου.

Βιοαισθητήρες βασιζόμενοι σε κύτταρα θηλαστικών

Η χρησιμοποίηση ζωικών κυττάρων σε βιοαισθητήρες έγινε για πρώτη φορά το 1993 από τους Giaever και Keese, σε ένα σύστημα μέτρησης ηλεκτρικής κυτταρικής εμπέδησης (ECIS) για την ανίχνευση τους αλλαγών στην κυτταρική μορφολογία. Η χρήση ζωικών κυττάρων σε βιοαισθητήρες έχει βρει εφαρμογή κυρίως σε τοξικολογικές/περιβαλλοντικές αναλύσεις, και στον έλεγχο τροφίμων. Στον Πίνακα 1.4. παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι πρόσφατες εξελίξεις σε αυτόν το τομέα, κατηγοριοποιημένες βάση κυτταρικής σειράς και τεχνολογίας μέτρησης (Kintzios & Banerjee, 2015).

Πίνακας 1.3: Αντιπροσωπευτικές χρήσης ζωικών κυττάρων σε εφαρμογές βιοαισθητήρων στην ασφάλεια τροφίμων, προσαρμογή από Kintzios & Banerjee, 2015.

Κυτταρικό Υλικό	Τεχνολογία μέτρησης	Στόχος	Όριο Ανίχνευσης	Ποσοτικός Προσ/μός	Βιβλιογραφική Αναφορά
Καρδιακά Κύτταρα	Ηλεκτροφυσιολογία	Πυρεθροϊδή Εντομοκτόνα	δ.κ.	όχι	Natarajan et al., 2006
Νεφροκύτταρα - N2a Νευροβλάστωμα	Ηλεκτροφυσιολογία (BERA)	Οργανο-φωσφορικά & Καρβαμιδικά Εντομοκτόνα	ppt	ναι	Flampouri et al., 2010 Mavrikou et al., 2008)
B Λεμφοκύτταρα	Φωτομέτρηση	Παθογόνα τροφίμων & οι τοξίνες τους	10 ³ CFU/ml (listeria), 10-40 ng τοξίνης	ναι	Banerjee & Bhunia, 2009
Ηπατοκύτταρα ανθρώπου και Κρκινικά κύτταρα μαστού	Βιοφωταύγεια	Πολυαλογονωμένοι Αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs)	fM	ναι	Murk et al., 1996

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν περιορισμένα εμπορικά συστήματα βιοαισθητήρων που βασίζονται σε ζωικά κύτταρα, η τεχνολογία αυτή αναφέρεται συχνά στην διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία και αντιστοιχεί σε έως 8 % των τεχνολογιών που βασίζονται σε κύτταρα. Από την άλλη πλευρά, η τεχνολογία κυτταρικών βιοαισθητήρων φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ελκυστική σε θέματα προστασία πνευματικής ιδιοκτησίας και ανίχνευσης υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών και άλλων χημικών υπολειμμάτων, ενώ και οι πατενταρισμένες εφαρμογές στη μικροβιολογία τροφίμων δεν μπορούν να θεωρηθούν αμελητέες. Επιπλέον, το 8% των Ευρωπαϊκών κοινωτικών κονδυλίων που χρηματοδότησαν έργα για την ασφάλεια τροφίμων από το 2000 έχουν επικεντρωθεί στη χρήση κυττάρων θηλαστικών ως στοιχεία βιολογικής αναγνώρισης,

και αντιστοιχούν στο ένα τέταρτο των χρηματοδοτούμενων έργων με βάση βιοαισθητήρων κυττάρων (Kintzios & Banerjee, 2015).

Μέθοδος Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης

Την τελευταία δεκαπενταετία αναπτύχθηκε ένα σύστημα μέτρησης της μεταβολής του ηλεκτρικού δυναμικού (ή άλλων ηλεκτρικών παραμέτρων) σε επίπεδο ιστού και όχι ενός μεμονωμένου τμήματος της κυτταρικής μεμβράνης ή ενός μόνο κυττάρου, (Kintzios et al. 2001). Η μέθοδος Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης (BERA) είναι μια μέθοδος ανίχνευσης ιών και άλλων βιοενεργών ουσιών, η οποία βασίζεται στη μέτρηση μεταβολών των ηλεκτρικών ιδιοτήτων ομάδας κυττάρων κατάλληλα ακινητοποιημένων εντός πηγάδας, έτσι ώστε να διατηρούνται φυσιολογικές οι κυτταρικές λειτουργίες κατά την αλληλεπίδραση τους με τα υπό ανίχνευση μόρια. Η μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση ανθρώπινων και φυτικών ιών με τρόπο εξειδικευμένο, γρήγορο (1-2 min), αναπαραγωγίμο και οικονομικό. Η ευαισθησία της ανίχνευσης με BERA (0,001-0,1ng) είναι ανάλογη με προηγούμενες ανοσολογικές, κυτταρολογικές και μοριακές τεχνικές.

Έως σήμερα έχουν αναπτυχθεί έξι γενιές κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA. Η πρώτη γενιά περιελάμβανε ακινητοποιημένα κύτταρα σε 0,8% αгарόζη και είχε τη μορφή σωλήνα 15 mL (Kintzios et al. 2001). Η 2η γενιά ήταν παρόμοια με την πρώτη, με τη διαφορά ότι είχε πολύ μικρότερο όγκο (1 mL), οπότε απαιτείτο μικρότερη ποσότητα υλικών (Kintzios et al. 2004). Η 3η και 4η γενιά κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA είχαν τη μορφή επίπεδης στοιβάδας και στη 3η γενιά τα κύτταρα ήταν ακινητοποιημένα σε «φλούδα» αλγινικού ασβεστίου, στη δε 4η γενιά δημιουργήθηκε ένα αγωγίμο πλέγμα αλγινικού ασβεστίου με πηγαδάκια στον πυθμένα των οποίων υπήρχαν τα ηλεκτρόδια και γινόταν εφαρμογή των κυττάρων μέσα σε αυτά τα πηγαδάκια. Οι βιοαισθητήρες BERA 3ης γενιάς είναι κατάλληλοι για τη μελέτη της κυτταροδιαίρεσης (Kintzios et al. 2006) και της 4ης γενιάς για τη μελέτη επικοινωνίας των κυττάρων και αλληλεπίδρασης με διάφορες ουσίες. Τέλος, οι βιοαισθητήρες BERA 5ης και 6ης γενιάς είχαν τη μορφή σφαιριδίων, ακινητοποιημένα κύτταρα σε αλγινικό ασβέστιο (Moschoroulou and Kintzios 2006). Η διαφορά μεταξύ αυτών των δύο γενεών είναι ότι στους βιοαισθητήρες 6ης γενιάς τα ακινητοποιημένα κύτταρα είναι μεμβρανικώς τροποποιημένα (MIME) χρησιμοποιώντας τη τεχνική της μεμβρανικής μηχανικής μέσω της ηλεκτροεισαγωγής μορίων στις κυτταρικές μεμβράνες, με σκοπό την εκλεκτικότητα του συστήματος.

Κύτταρα θηλαστικών και δευτερεύοντες μεταγωγείς σήματος

Η καλλιέργεια ζωικών κυττάρων σε συστοιχίες μεταγωγών σήματος μπορεί να επηρεάζουν καθοριστικά την απόδοση των κυτταρικών βιοαισθητήρων, καθώς προσδίδει σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των περιπτώσεων όπου τα κύτταρα καλλιεργούνται απευθείας σε ένα τριβλίο Petri, μια καλυπτρίδα ή κάποια άλλη πλάκα καλλιέργειας κυττάρων. Εξαιτίας της καλής υδροφιλικότητας και του αρνητικά φορτισμένου υλικού των πλακών κυτταροκαλλιέργειας, πολλοί τύποι ζωικών κυττάρων (καρδιακά μυοκύτταρα, νευρώνες, γλοία, επιθηλιακά, εμβρυονικά) μπορούν να προσκολληθούν σε αυτές. Η καλλιέργεια κυττάρων σε chip που έχουν κατασκευαστεί από πυρίτιο ή κάποιο άλλο αγώγιμο υλικό και η δημιουργία επαφής μεταξύ του υποστρώματος και της κυτταρικής μεμβράνης αποτελεί πρόκληση στον τομέα των κυτταρικών αισθητήρων. Το κύριο πρόβλημα είναι ότι τα υλικά τους δεν είναι συμβατά με τα κύτταρα λόγω τραχύτητας, υδροφιλικότητας ή λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια τους και κατά συνέπεια απαιτείται σημαντική έρευνα για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών της επιφάνειας των μεταγωγέων. Για να βελτιωθεί η σύζευξη και η μετάδοση του σήματος των ζωντανών κυττάρων, θα πρέπει να μελετηθούν οι μηχανισμοί και τα μοντέλα προσκόλλησης κυττάρων και μεταγωγέων. Επιπλέον, η ανάπτυξη νέων chip μεταγωγέων, απαιτεί σημαντική έρευνα σε τεχνικές ανίχνευσης, μετρήσεις μεταβολισμού, διαφορών δυναμικού, εμπέδησης κ.λπ. (Wang & Liu, 2009).

Τα πολυμερή ως ημιαγωγοί

Κάθε στερεό σώμα αποτελείται από άτομα. Κάθε άτομο περιλαμβάνει έναν πυρήνα και έναν αριθμό ηλεκτρονίων, που περιφέρονται γύρω από αυτόν. Ο πυρήνας φέρει θετικό ηλεκτρικό φορτίο και τα ηλεκτρόνια αρνητικό. Τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στοιβάδας ονομάζονται ειδικότερα ηλεκτρόνια σθένους. Κάθε ηλεκτρόνιο σθένους έχει μια συγκεκριμένη ενέργεια, δηλαδή, βρίσκεται σε μια συγκεκριμένη στάθμη ενέργειας. Ηλεκτρική αγωγιμότητα ονομάζεται η κίνηση των ηλεκτρονίων μέσα σε ένα σώμα. Οι κατηγορίες των φυσικών υλικών σύμφωνα με τα ηλεκτρικά χαρακτηριστικά τους είναι οι αγωγοί του ηλεκτρισμού, οι μονωτές και οι ημιαγωγοί. Η διαφορετικότητα ενός ημιαγωγού έγκειται στον αριθμό των ηλεκτρονίων ενός ατόμου που βρίσκεται στην εξωτερική του στοιβάδα (Scrosati, 1993).

Η λέξη πολυμερές είναι σύνθετη και προκύπτει από τις λέξεις πολύ και μέρος. Τα πολυμερή προκύπτουν από τη χημική ένωση πολλών όμοιων μικρών μορίων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολύπλοκων μορίων ή μακρομορίων. Τα γνωστά πλαστικά που χρησιμοποιούνται στην καθημερινότητα είναι πολυμερή μόρια. Πολλά ελαστικά υλικά είναι επίσης πολυμερή. Στα θηλαστικά, οι μαλακοί ιστοί και τα κόκαλα αποτελούνται από κολαγόνο που είναι πολυμερές. Τα φυτά περιέχουν σε μεγάλο

ποσοστό κυτταρίνη, ενώ ορισμένοι από τους καρπούς περιέχουν κυτταρίνη και άμυλο, δύο διαφορετικά φυσικά πολυμερή (πολυσακχαρίτες). Τα περιβλήματα θαλάσσιων αρθροπόδων (γαρίδες) αλλά και των μυρμηγκιών αποτελούνται από ένα άλλο φυσικό πολυμερές, τη χιτίνη. Τα πολυμερή χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, από τρόφιμα και καλλυντικά ως και υποκατάστατα ιστών (Yang, 2011).

Τα πολυμερή χαρακτηρίζονται από υψηλό μοριακό βάρος και ως εκ τούτου είναι στερεά σε συνήθεις συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Μορφολογικά διακρίνονται σε άμορφα, κρυσταλλικά ή ημικρυσταλλικά, ενώ μέσω προέλευσης διακρίνονται σε φυσικά ή συνθετικά. Βιοσυμβατά πολυμερή μπορεί να είναι και τα φυσικά και τα συνθετικά (Souza et al., 2012). Ετυμολογικά, ο όρος βιοσυμβατότητα ερμηνεύεται ως «συμβατότητα ή αρμονία με τα ζωντανά συστήματα». Η βιοσυμβατότητα των βιοϋλικών αξιολογείται γενικά με τρεις τρόπους: δοκιμασίες *in vitro*, δοκιμασίες σε πειραματόζωα και δοκιμασίες χρήσης σε εθελοντές. Στις δοκιμασίες *in vitro* χρησιμοποιούνται συστήματα προκαρυωτικών ή ευκαρυωτικών κυττάρων στο εργαστήριο, προκειμένου να ελεγχθούν παράμετροι, όπως η κυτταρική προσκόλληση, η κυτταροτοξικότητα, η μεταβολική δραστηριότητα, και διάφορες άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Το βασικό πλεονέκτημα αυτών των δοκιμασιών είναι ότι μπορούν να καθοριστούν με ακρίβεια οι πειραματικές συνθήκες, είναι επαναλήψιμες και σχετικά γρήγορες και οικονομικές.

Κατά την επαφή ενός υλικού με ένα βιολογικό σύστημα, σχηματίζεται ταχύτατα (σε διάστημα msec) στην επιφάνεια του ένα μη κυτταρικό βιολογικό υμένιο (φιλμ), με τυχαία προσρόφηση εξωκυττάρων μακρομορίων, κυρίως γλυκοπρωτεϊνών και πρωτεογλυκανών από τα βιολογικά υγρά (σάλιο και αίμα) (Baier, 1977; Nimeri et al., 1994; Eliades, 2003). Ο σχηματισμός αυτού του «τροποποιητικού υμενίου» (conditioning film), καθορίζεται τόσο από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες της επιφάνειας του βιοϋλικού, όσο και από τις ιδιότητες των προσκολλούμενων βιομορίων (Dee et al., 2002). Η δημιουργία και στη συνέχεια ωρίμανση του υμενίου θα παίξουν καθοριστικό ρόλο στην επακόλουθη κυτταρική και βακτηριακή προσκόλληση, πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και εν' τέλει φαινοτυπική έκφραση των προσκολλημένων κυττάρων (Shakenraad et al 1986, Edgerton et al 1996, Sardin et al 2004, Lin et al 2004).

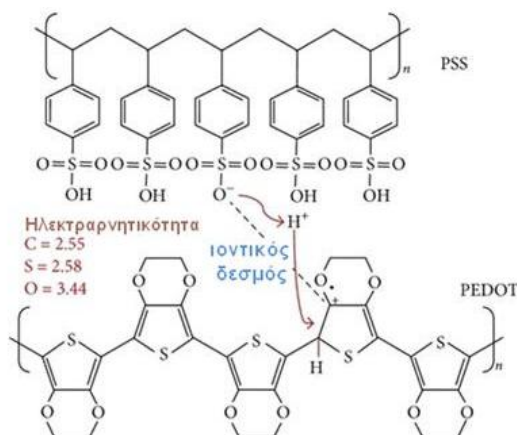
Η κατανόηση και η αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων κυττάρου/βιοϋλικού είναι σημαντικό στάδιο της μελέτης βιοσυμβατότητας ενός υλικού. Η προσκόλληση των κυττάρων, η πρόσφυση τους όπως και η επέκτασή τους στην επιφάνεια του υλικού είναι βασικές παράμετροι που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Θεωρείται ότι η αρχική επαφή των κυττάρων με την επιφάνεια του υλικού επηρεάζει την ικανότητα των

κυτάρων αυτών να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν (Yang et al., 2002 a).

Μια δοκιμή για την εκτίμηση των βιολογικών αποκρίσεων υλικών είναι η *in vitro* δοκιμή της κυτταροτοξικότητας. Πολλές ερευνητικές ομάδες χαρακτηρίζουν την κυτταροτοξική εκτίμηση, όπως και την κυτταρική προσκόλληση, ως τα αρχικά στάδια για την επίτευξη της βιοσυμβατότητας ενός υλικού (Marques et al., 2002). Η *in vitro* κυτταροτοξικότητα σχετίζεται άμεσα είτε με τον θάνατο των κυτάρων που επάγεται από μειωμένη βιοσυνθετική δράση ή/και με την έκκριση κυτταροπλασματικών μεταβολιτών ή με μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυτάρων (Marques et al., 2005). Οι μορφολογικές αλλαγές που προκύπτουν, οι επιπτώσεις στις πρωτεϊνικές δομές και η τροποποιημένη έκφραση των πρωτεϊνών είναι μερικά από τα φαινόμενα που παρατηρούνται όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε τοξικό περιβάλλον.

Το συνθετικό πολυμερές PEDOT [Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)]

Το πόλυ(3,4-αιθυλενο-διοξυθειοφαίνιο), (PEDOT), poly(3,4-ethylenedioxythiophene) είναι ένα π-συζυγές πολυμερές, το οποίο δομικά βασίζεται στο πολυθειοφένιο. Παρασκευάστηκε για πρώτη φορά το 1988 από την BAYER AG. Αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων ομοίων μορίων (μονομερή EDOT) που συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς διαμορφώνοντας τις αλυσίδες PEDOT. Ένα κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ των αγώγιμων πολυμερών είναι η εναλλαγή απλών και διπλών δεσμών κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας. Τα τροχιακά των π ηλεκτρονίων από διαφορετικά άτομα άνθρακα επικαλύπτονται, χαμηλώνουν την ενέργεια του συστήματος και σχηματίζουν μια π εντοπισμένη ηλεκτρονική δομή κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας. Με μια τέτοια ηλεκτρονική δομή σχηματίζεται μια ταινία όπως στους ημιαγωγούς και το ενεργειακό χάσμα εξαρτάται από την έκταση της συζυγίας και όσο μακρύτερες είναι οι συζυγιακές αλυσίδες τόσο χαμηλότερο είναι το ενεργειακό χάσμα, με αποτέλεσμα την αύξηση της κινητικότητας των ηλεκτρονίων του πολυμερούς.



Εικόνα 1.10: Οι χημικές δομές του PEDOT και του PSS καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση μέσω της δημιουργίας ιοντικού δεσμού, προσαρμογή από Meen et al., 2013.

Το PEDOT θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα πολυμερή στον τομέα των οργανικών ηλεκτρονικών αφού χρησιμοποιείται ευρύτατα σε φωτοβολταϊκά στοιχεία (Dhanabalan et al., 2001; Ko et al., 2007) αντιστατικά επιστρώματα (Sun et al., 2009), ηλεκτρονικές μνήμες (Verbakel et al., 2006), αισθητήρες (Meskers et al., 2006), σε οργανικές φωτοεκπομπούς διόδους (OLEDs) (De Kok et al., 2004) κ.λ.π.

Παρά τις καλές χημικές και ηλεκτροχημικές ιδιότητες που βρέθηκε να έχει αρχικά, παρουσίαζε ένα σημαντικό μειονέκτημα, όντας αδιάλυτο στο νερό. Η χαμηλή διαλυτότητα και η επακόλουθη δυσκολία στη μορφοποίηση και επεξεργασία αποτελούσε ένα σοβαρό πρόβλημα, ωστόσο η καλή ηλεκτρική αγωγιμότητα, οπτική διαφάνεια και χημική σταθερότητα, κράτησαν το ενδιαφέρον για το πολυμερές αμείωτο (Groenendaal et al., 2000).

Το πρόβλημα της χαμηλής διαλυτότητας λύθηκε το 1991, με την προσθήκη του πολυηλεκτρολύτη polystyrene sulfonate (PSS). Ο συνδυασμός του PEDOT με τον υδατοδιαλυτό PSS έδωσε ένα συμπολυμερές διαλυτό πλέον στο νερό, το PEDOT:PSS, η δομή του οποίου φαίνεται στο σχήμα Α. Η σύνθεση του PEDOT:PSS πραγματοποιείται συνήθως με οξειδωτικό πολυμερισμό του μονομερούς EDOT σε υδατικό διάλυμα του πολυηλεκτρολύτη PSS. Η αντίδραση αυτή σε θερμοκρασία δωματίου, δίνει ένα σκούρο μπλε sol-gel συμπολυμερούς PEDOT:PSS. Με εξάτμιση του νερού, τα υμένια που σχηματίζονται, παραμένουν αγωγίμα, διαφανή, μηχανικά ανθεκτικά και αδιάλυτα σε οποιοδήποτε κοινό διαλύτη (Groenendaal et al., 2000).

Το PEDOT:PSS αποτελεί ένα sol-gel, στο οποίο σωματίδια διαστάσεων 20–70 nm απαρτίζονται από μακρομόρια PSS που συνδέονται μεταξύ τους με αλυσίδες PEDOT. Ο όρος sol-gel αφορά τη μέθοδο μετατροπής κolloειδούς διαλύματος σε πήκτωμα (gel), τεχνική η οποία μπορεί να οδηγήσει στην παρασκευή πηκτωμάτων υάλων καθώς και κεραμικών υλικών. Η τεχνική συνίσταται στην παρασκευή ενός λύματος (sol) το οποίο με την πάροδο του χρόνου μετασχηματίζεται σε πήκτωμα μέσω διαφόρων αντιδράσεων, μεταξύ πρόδρομων οργανικών ή ανόργανων ουσιών, των οξειδίων και οργανικών διαλυτών/νερό (Scherer et al., 1990).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι καθένα από τα σωματίδια περιβάλλεται από ένα πολύ λεπτό (~3-4 nm) επιφανειακό στρώμα, αποτελούμενο από αλυσίδες PSS σε υψηλά ποσοστά, τα οποία δρουν σαν φραγμός δυναμικής ενέργειας για τους φορείς ηλεκτρικού φορτίου (De Kok et al., 2004; Crispin et al., 2003). Η ηλεκτρική αγωγιμότητα των υμενίων PEDOT:PSS εξαρτάται έντονα από το μέγεθος των σωματιδίων, το 90 με 95% της σύστασης των οποίων είναι νερό ενώ το ποσοστό της στερεάς φάσης, είναι γενικά της τάξης του 5 με 10% ή και λιγότερο. Το ποσοστό αυτό εξαρτάται από την αναλογία μεταξύ PEDOT και PSS και αυξάνει με αύξηση της συγκέντρωσης του PSS. Τα τμήματα PEDOT που διαμορφώνονται κατά την διάρκεια

του πολυμερισμού, είναι μάλλον ολιγομερή παρά πολυμερή. Αυτό έχουν δείξει φασματοσκοπικές μετρήσεις, με βάση τις οποίες πιστεύεται ότι οι αλυσίδες PEDOT αποτελούνται από 6 έως 18 επαναλαμβανόμενες μονάδες (Pererichka & Pererichka, 2009).

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες δείχνουν βιοσυμβατότητα του PEDOT με μεγάλο αριθμό βιολογικών μορίων και κυτταρικών τύπων, μεταξύ των οποίων νευρικά (Asplund et al., 2012), ηπατικά, ινοβλάστες (Luo et al., 2008) και κερατινοκύτταρα (Stewart et al., 2013) γεγονός που βρίσκει εφαρμογές και στους κυτταρικούς βιοαισθητήρες, καθώς το PEDOT έχει ξεκινήσει να ερευνάται η χρήση του ως δευτερεύων μετατροπέα σήματος (Killerich-Pedersen et al., 2011).

2. Σκοπός της Μελέτης

2. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης υποθανατηφόρων δόσεων (sub-lethal doses) του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl, Qo παρεμποδιστή του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας, στην οξειδοαναγωγική ομοιοστάση κυττάρων θηλαστικών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν, ως πρότυπα συστήματα μελέτης, καλλιέργειες δύο σταθερών κυτταρικών σειρών προερχόμενων από ανεξάρτητους ιστούς με διαφορετικά κυτταρικά χαρακτηριστικά. Στα πλαίσια αυτά, εξετάστηκε η κυτταροτοξικότητα του παρεμποδιστή μέσω δεικτών βιωσιμότητας και κυτταρικών λειτουργιών και κατόπιν μελετήθηκε μια σειρά ενζυμικών και μη-ενζυμικών μηχανισμών, που εμπλέκονται στις αντιδράσεις οξειδωτικού στρες και απόπτωσης, κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και νεφρικών ινοβλαστών Vero, μετά από έκθεσή τους στο μυκητοκτόνο.

Επιπρόσθετα επιχειρήθηκε κατασκευή κυτταρικού βιοαισθητήρα, με σκοπό την ανίχνευση κυτταροτοξικότητας, βασιζόμενου σε καλλιέργεια κυττάρων στην επιφάνεια του βιοσυμβατού και αγώγιμου πολυμερούς PEDOT. Ως προς αυτή την πειραματική πτυχή, εξετάστηκε η κυτταρική προσκόλληση και βιωσιμότητα των δύο κυτταρικών σειρών στο πολυμερές. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε μελέτη ηλεκτροδίων PEDOT/κυττάρων μέσω ηλεκτροχημικών μεθόδων για την αξιολόγηση τους ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης του αισθητήρα έναντι του μυκητοκτόνου. Επιπλέον έγινε προσπάθεια βελτίωσης της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα μέσω ελέγχου της έκφρασης αποτοξινωτικών και αντιοξειδωτικών γονιδίων των κυττάρων Vero. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μετα-μεταγραφική σίγηση του παράγοντα Nrf2 μέσω παροδικής διαμόλυνσης και χρήση των τροποποιημένων κυττάρων ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης του αισθητήρα.

3. Πειραματικό Μέρος

3. Πειραματικό Μέρος

3.1. Υλικά και Αντιδραστήρια

3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια: 2,4-δινιτροφαινυλαδραζίνη (2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH), 5,5'δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid, DTNB), 1,1-διφαινυλ-2-πικρυδραζίλιο (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), νικοτινάμιδο φωσφορικό δινουκλεοτιδίου αδερίνης (NADPH), τα ένζυμα: αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), υπεροξειδάση αγριοραπανίδα (horseradish peroxidase, HPR), το υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου (CuOOH), το Coomassie Brilliant Blue G-250, το kresoxim-methyl/PESTANAL® analytical standard και το MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) αποκτήθηκαν από Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Το τριχλωροξικό οξύ (trichloroacetic acid, TCA), το υπεροξειδίο του υδρογόνου H₂O₂, το υδροξειδίο του νατρίου (NaOH) και το 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (2-thiobarbituric acid, TBA) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Merck (Darmstadt, Germany). Το Torpedo^{siRNA} αγοράστηκε από Ividi GmbH (Planegg, Germany) και τα RNAi από Qiagen. Η ριβοφλαβίνη και της οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) ήταν της εταιρείας SERVA (Heidelberg, Germany). Η γλουταθειόνη (GSH) και το 1,1,3,3-τετραεθοξυ-προπάνιο (TEP) αποκτήθηκαν από Fluka (Basel, Switzerland) και το DEVD-pNA αποκτήθηκε από Cayman Chemical, Michigan, USA.

3.1.2. Διαλύτες

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν: διμεθυλοσουλφοξείδιο DMSO (Carlo Erba, Milan, Italy), οξικό οξύ (Merck, Darmstadt, Germany), υδροχλωρικό οξύ, χλωροφόρμιο, ισοπροπανόλη, αιθανόλη, μεθανόλη (Fisher Chemical, Loughborough, UK) και φωσφορικό οξύ από Chem-Lab (Zedelgem, Belgium).

3.1.3. Θρεπτικά υλικά

Για το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκαν: άλατα Earle's (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) παρουσία ή απουσία Phenol Red, διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης, διάλυμα L- γλουταμίνης και διάλυμα πυρουβικού οξέως (Biochrom AG). Ο ορός εμβρύου μόσχου (FBS) αποκτήθηκε από την εταιρεία Invitrogen (Massachusetts, USA) και το διάλυμα θρυψίνης/EDTA ήταν της εταιρείας Biochrom AG (Berlin, Germany).

3.1.4. Φθορισμομετρικοί ιχνηθέτες

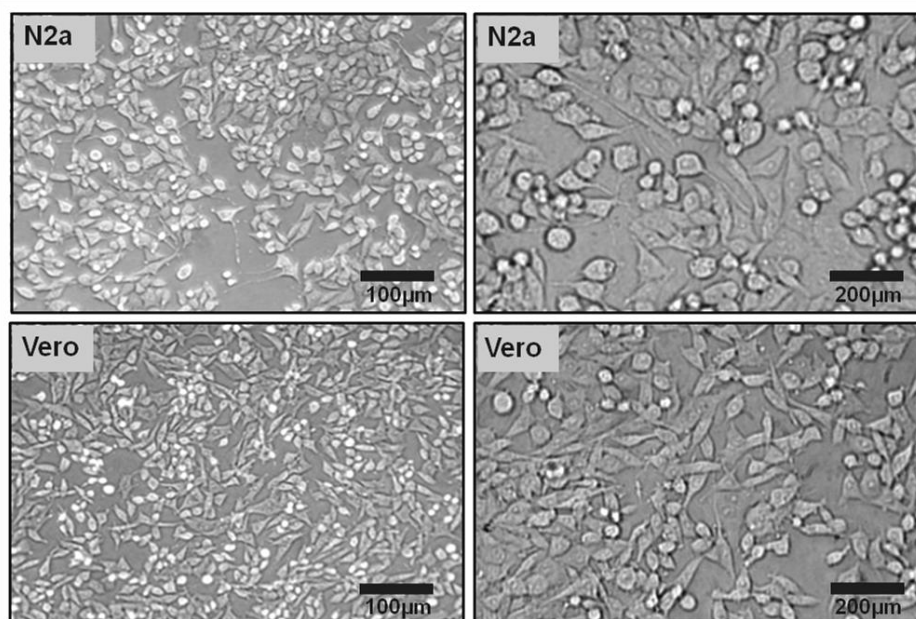
Για τις φθορισμομετρικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν οι ιχνηθέτες: H₂DCFDA MitoSOX™ Red, MitoTracker® Green FM, mBCI, TMRE και Amplex® Red ήταν της εταιρείας Invitrogen (Massachusetts, USA).

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Καλλιέργεια και χειρισμοί κυτταρικών σειρών N2a και Vero

3.2.1.1. Κυτταροκαλλιέργεια σειρών N2a και Vero

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν οι καρκινικοί νευροβλάστες N2a (νευροβλάστωμα από εγκέφαλο ποντικού/Mus musculus, Neuro-2a, ATCC® CCL-131™) και οι αθανатоποιημένοι φυσιολογικοί ινοβλάστες Vero (από νεφρό αφρικανικού πράσινου πιθήκου/Cercopithecus aethiops, Vero, ATCC® CCL-81™).



Εικόνα 3.1: Φωτογραφίες αντίθετης φάσης μονοστοιβάδας ζωντανών κυτάρων N2a και Vero καλλιεργημένων σε DMEM/10% FBS, από ανάστροφο μικροσκόπιο A. Krüss-MBL3200.

Οι κυτταρικές σειρές αναπτύσσονταν και διατηρούνταν σε μονοστοιβαδικές καλλιέργειες σε φλάσκες καλλιέργειας κυτάρων 75cm² (OrFlask, Orange Scientific) σε θρεπτικό υλικό DMEM (20 mL) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα αντιβιοτικών σε κατάλληλο επωαστικό κλίβανο (Heal Force® Model HF90) σε συνθήκες 37°C και σε κορεσμένη με υδρατμούς ατμόσφαιρα με συνεχή παροχή 5% CO₂.

Πίνακας 3.1: Κύρια συστατικά θρεπτικού μέσου καλλιέργειας DMEM.

Συστατικό	(mg/L)	Συστατικό	(mg/L)	Συστατικό	(mg/L)
NaCl	6400	L- methionine	30	Myo-inositol	7.2
KCl	400	L-phenylalanine	66	Nicotinamide	4
CaCl ₂	200	L-threonine	95	L-arginine·HCl	84
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200	L-tryptophane	16	L-cystine	48
NaH ₂ PO ₄	124	L-tyrosine	72	L-glutamine	580
D-glucose	1000	L-valine	94	L-histidine·HCl·H ₂ O	42
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.1	L-Glycine	30	L-isoleucine	105
Na-pyruvate	110	L-serine	42	L-leucine	105
Phenol red	15	Cholin chloride	4	L-lysine·HCl	146
NaHCO ₃	3700	Folic acid	4	D-Ca-pantothenate	4
Riboflavin	0.4	Thiamine·HCl	4	Pyridoxal·HCl	4

3.2.1.2. Κατάψυξη και απόψυξη κυτταρικών σειρών

Η διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα επιτυγχάνεται με την αποθήκευσή στους -80°C. Η κατάψυξη γίνεται σταδιακά ώστε τα κύτταρα να μην υποστούν σοκ από τη διαφορά θερμοκρασίας. Έπειτα από την αποκόλληση και συλλογή των κυττάρων από τη φλάσκα, πραγματοποιείται μέτρηση του αριθμού και με κατάλληλη αναγωγή προσαρμόζεται ο αριθμός τους. Κατόπιν μεταφέρονται σε κατάλληλα κρύο-φιαλίδια με θερμικά απενεργοποιημένο FBS (56°C/30min) παρουσία 10% DMSO. Το DMSO αποτρέπει το σχηματισμό κρυστάλλων νερού στο εσωτερικό των κυττάρων κατά την ψύξη. Με την προσθήκη DMSO ξεκινά άμεσα η διαδικασία της κατάψυξης ώστε να μην προκληθεί τοξικότητα στα κύτταρα στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η κατάψυξη γίνεται σταδιακά, αρχικά τα φιαλίδια εισάγονται σε πάγο (4°C) όπου και παραμένουν για 1h. Στη συνέχεια τοποθετούνται στους -20°C για ακόμα 1h και τέλος μεταφέρονται στους -80°C όπου μπορούν να παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα και μετά από απόψυξη να επανακαλλιεργηθούν.

Η διαδικασία απόψυξης κυτταρικών σειρών πραγματοποιείται κάτω από άσηπτικές συνθήκες και όσο το δυνατόν ταχύτερα, προκειμένου τα κύτταρα να μην εκτεθούν στο DMSO, το οποίο πιθανώς να δράσει τοξικά. Μετά την εξαγωγή τους από τους -80°C, τα κρύο-φιαλίδια τοποθετούνται άμεσα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C ώσπου να αποψυχθούν. Κατόπιν το διάλυμα των κυττάρων που προκύπτει μετά την απόψυξη αραιώνεται σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM/10% FBS και εισάγεται σε φλάσκα των 75cm² όπου και κατανέμεται σε όλη την επιφάνειά της για την καλύτερη και ομοιόμορφη ανάπτυξη των κυττάρων. Ο όγκος του διαλύματος στο σύνολό του ανέρχεται στα 20ml. Τέλος η φλάσκα τοποθετείται στον επωαστικό θάλαμο (37°C, 5%CO₂) όπου και πραγματοποιείται η επώαση των κυττάρων.

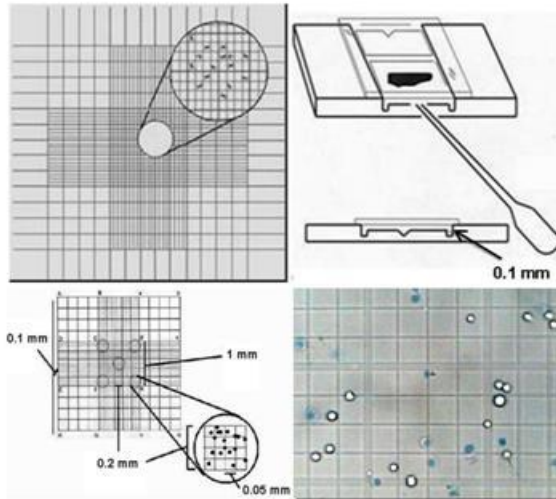
3.2.1.3. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα καλλιεργούνται έως ότου η μονοστοιβάδα τους να καλύψει το 90%-100% της επιφάνειας της φλάσκας. Η κατάσταση αυτή ελέγχεται με απευθείας παρατήρηση της φλάσκας με χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται με αποκόλληση των κυττάρων με διάλυμα θρυψίνης/EDTA. Η επώαση στην θρυψίνη διαρκεί 5 min στους 37°C και ακολουθεί επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FBS. Κατόπιν τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται με σκοπό την απομάκρυνση της θρυψίνης, επαναιωρούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και μεταφέρονται σε νέες φλάσκες καλλιέργειας. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα στρωτής ροής (Laminar air flow cabinet).

3.2.1.4. Μέτρηση αριθμού κυττάρων και κυτταρικής επιβίωσης μέσω της χρωστικής Κυανό του Τρυπανίου (Trypan Blue)

Για την μέτρηση του αριθμού των κυττάρων και προκειμένου να εκτιμηθεί η επιβίωση τους μετά από την διαδικασία ανακαλλιέργειας χρησιμοποιείται η πλάκα μέτρησης Neubauer ή αιμοκυτταρόμετρο και η χρωστική Κυανό του Τρυπανίου (Trypan Blue). Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα με δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Σε κάθε μια από αυτές έχει χαραχτεί ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm (Εικόνα 3.2). Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2.5 μm και χρησιμοποιούνται για την οριοθέτηση των τετραγώνων. Επιπλέον κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει και εσωτερικές διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0.1 mm χαμηλότερα από τις δύο «ράχες» στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα, υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια.

Ο όγκος του κυτταρικού αιωρήματος που καλύπτει ένα από τα εννέα τετράγωνα είναι 0.1 mm^3 ($1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm}$) ή $1 \times 10^{-4} \text{ ml}$. Έτσι, η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό αιώρημα (κύτταρα/ml) είναι: αριθμός κυττάρων στο ένα από τα κύρια τετράγωνα $\times 10.000$.



Εικόνα 3.2: Αιμοκυτταρόμετρο – πλάκα Neubauer. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που καλύπτει την επιφάνεια μέτρησης είναι 0.1mm^3 ή 1×10^{-4} ml. Τα νεκρά κύτταρα χρωματίζονται μπλέ.

Η χρωστική Trypan Blue έχει την ιδιότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη μόνο νεκρών κυττάρων και να τα χρωματίζει (μπλε-καφέ χρώμα). Ζωντανά και κύτταρα σε πρώιμο στάδιο απόπτωσης παραμένουν αχρωμάτιστα, αφού η χρωστική δεν εισέρχεται σε αυτά. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει ανάμιξη εναιωρήματος κυττάρων με ισότονο διάλυμα Trypan Blue και αναλογία 1:1 έτσι ώστε τελική συγκέντρωση της χρωστικής να είναι 0.2%. Ο αριθμός κυττάρων σε κάθε δείγμα, μετράται σε δύο διαφορετικά, ανεξάρτητα οπτικά πεδία. Από τις δύο τιμές υπολογίζεται ο μέσος όρος και κατόπιν η συγκέντρωση των κυττάρων (ζωντανών και νεκρών), λαμβάνοντας υπόψη κάθε φορά την αραιώση που χρησιμοποιήθηκε με το διάλυμα της χρωστικής. Η βιωσιμότητα των κυττάρων εκφραζόταν σε ποσοστό ζωντανών επί του συνόλου, ως ο λόγος του ολικού αριθμού ζώντων κυττάρων προς τον συνολικό αριθμός κυττάρων $\times 100\%$.

3.2.1.5. Επιλογή συγκεντρώσεων μυκητοκτόνου και έκθεση αυτών στις κυτταρικές σειρές N2a και Vero

Η επιλογή των συγκεντρώσεων έγινε λαμβάνοντας υπόψη την τιμή αποδεκτής ημερήσιας πρόσληψης (ADI, Acceptable Daily Intake), την τιμή αποδεκτού επιπέδου έκθεσης χρήστη (AOEL, Acceptable Operator Exposure Limit), την οξεία δόση αναφοράς (ARfD, Acute Reference Dose, δεν ορίζεται για το kresoxim-methyl) καθώς και το εύρος των μέγιστων επιτρεπτών ορίων υπολειμμάτων (MRL, Maximum Residue Levels) για το μυκητοκτόνο kresoxim-methyl, όπως αυτά έχουν θεσπιστεί από τον Ευρωπαϊκό Φορέα Ασφάλειας Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA), (EFSA, 2010). Επιπλέον, καθώς η μέγιστη διαλυτότητα του μυκητοκτόνου στο νερό είναι 2μg/ml και το θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας DMEM είναι υδατικό

δεν επιλέχθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από 2μg/ml. Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Τοξικολογικά στοιχεία του *kresoxim-methyl*, MRLs και επιλεχθείσες συγκεντρώσεις (EFSA, 2010)

kresoxim-methyl				
ADI (mg/kg b.w./day)	AOEL (mg/kg b.w./day)		ARfD (mg/kg b.w.)	
0.4	0.9		n.s.	
MRLs (mg/kg)				
EU, Codex Alimentarius: 0.05 – 5				
επιλεχθείσες συγκεντρώσεις (μg/ml)				
0.1	0.2	0.5	1	2

Η έκθεση των κυττάρων στο μυκητοκτόνο πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικά πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας ανάλογα με τον πειραματικό χειρισμό (μικροπλακίδια 96-, 24-, 6- βοθρίων, τρυβλία 10mm και φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας), άλλα σε κάθε περίπτωση ο αριθμός κυττάρων ανά επιφάνεια επίστρωσης ήταν $6 \times 10^4/\text{cm}^2$ για τα κύτταρα N2a και $5.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ για τα Vero. Για την παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης του *kresoxim-methyl* επιλέχτηκε το DMSO, ένας ευρέως διαδεδομένος διαλύτης σε πειράματα κυτταροκαλλιέργειών, καθώς εμφανίζει χαμηλή τοξικότητα σε επίπεδα κάτω του 0.1% (Chirpendale et al., 2012). Αρχικά κατασκευάστηκε πυκνό διάλυμα συγκέντρωσης 4mg/ml, από την στερεή κρυσταλλική μορφή του μυκητοκτόνου, λαμβάνοντας υπόψη την καθαρότητα του. Για την παρασκευή των επιλεγμένων συγκεντρώσεων (Πίνακας 3.2) σε θρεπτικό υλικό DMEM πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύτη να είναι 0.05% και συνεπώς ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό που περιείχε 0.05% DMSO.

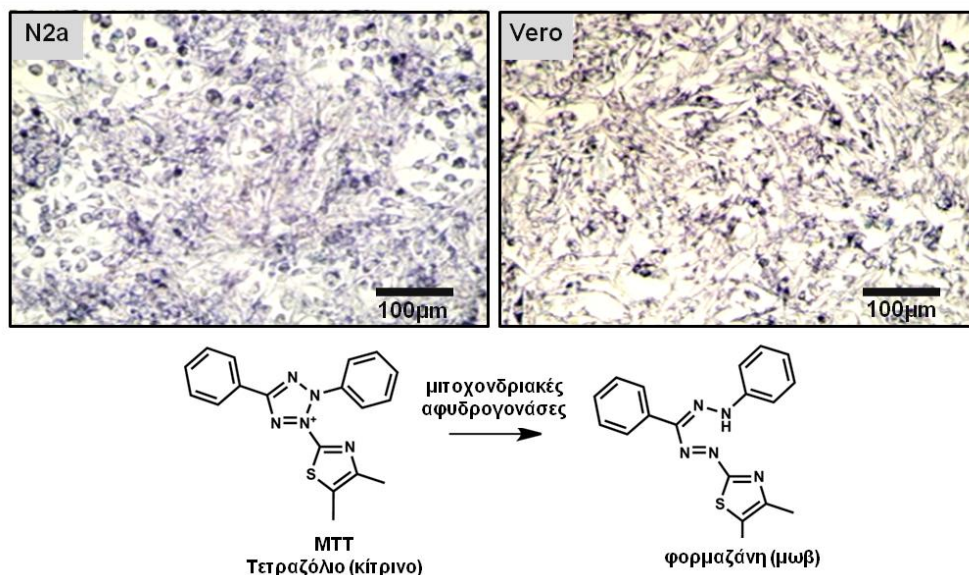
3.2.2. Επίδραση του μυκητοκτόνου στις *in vitro* διεργασίες κυττάρων N2a και Vero

3.2.2.1. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του *kresoxim-methyl* με τη μέθοδο MTT

Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης του μυκητοκτόνου με κριτήριο την μεταβολική τους δραστηριότητα στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, τόσο στα N2a όσο και στα κύτταρα Vero, χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος MTT. Η μέθοδος του βρωμιούχου διμεθυλθιαζολ-διφαινυλτετραζολίου (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον

Mosmann το 1983 και βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να μετατρέπουν το διαλυτό κίτρινο άλας τετραζολίου (MTT) σε αδιάλυτους πορφυρούς κρυστάλλους φορμαζάνης (Εικόνα 3.3). Συγκεκριμένα ο δακτύλιος του τετραζολίου μεταβολίζεται στα ενεργά μιτοχόνδρια από τη δραστικότητα διαφόρων αφυδρογονασών και το απαλό κίτρινο χρώμα του υποστρώματος μετατρέπεται σε πορφυρούς κρυστάλλους φορμαζάνης, οι οποίοι μετά τη διάλυσή τους με ισοπροπανόλη δίνουν ένα σκούρο μπλε/μωβ χρώμα που απορροφά στα 570nm. Η συγκέντρωση των κρυστάλλων στα μιτοχόνδρια των κυττάρων είναι ευθέως ανάλογη της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων.

Το πρώτο τμήμα της μεθόδου αποτελεί η διαδικασία της ανακαλλιέργειας των κυττάρων, όπως περιγράφεται παραπάνω. Μετά την μέτρηση των κυττάρων με την χρήση αιμοκυττόμετρου, καθορίζονται οι αραιώσεις του διαλύματος των κυττάρων, ώστε σε μικροπλακίδιο 96 μικροκυβελίδων/βοθρίων να γίνει επίστρωση 10^4 κυττάρων ανά βοθρίο σε τελικό όγκο 200μl DMEM/10%FBS και ακολουθεί επώαση για 24h στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS συνολικού όγκου 200μl. Κατόπιν τα πλακίδια τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο, όπου επωάζονται για 24h σε θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα 5% CO₂.



Εικόνα 3.3: Μεταβολισμός του MTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα. Μικροσκοπική παρατήρηση των κρυστάλλων της φορμαζάνης στο εσωτερικό των κυττάρων N2a και Vero.

Μετά τη συμπλήρωση 24h πραγματοποιείται προσθήκη 1/10 του όγκου του θρεπτικού μέσου ανά βοθρίο (20μl) διαλύματος MTT συγκέντρωσης 5mg/ml. Τα

πλακίδια επανατοποθετούνται στον επωαστή, στους 37°C και σε 5% CO₂. Μετά από πάροδο δυο ωρών, τα πλακίδια αφαιρούνται από τον επωαστή και παρατηρούνται στο μικροσκόπιο. Ως δείκτης του ικανοποιητικού μεταβολισμού του MTT στις μικροκυψελίδες αποτελεί ο σχηματισμός κρυστάλλων φορμαζάνης στο εσωτερικό των κυττάρων (Εικόνα 3.3). Ακολουθεί αφαίρεση του θρεπτικού μέσου που βρίσκεται στα βοθρία με πιπέτα, ξέπλυμα των κυττάρων (πυθμένες των βοθρίων) με PBS και προσθήκη 200μl DMSO ανά βοθρίο. Κατόπιν εφαρμόζεται ήπια ανακίνηση, ώστε να μην υπάρχουν κρύσταλλοι φορμαζάνης οι οποίοι δεν έχουν διαλυθεί και πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 570nm με φασματοφωτόμετρο μικροπλακών (BioTek™ PowerWave™ Microplate Spectrophotometer 340) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek).

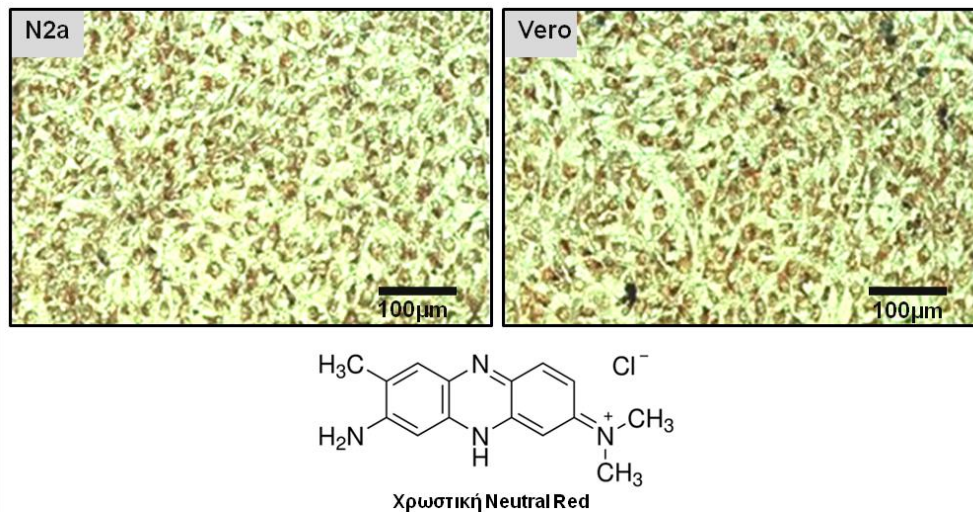
Η % αναστολή %_{MTT} του μυκητοκτόνου στην κυτταρική βιωσιμότητα των σειρών N2a και Vero υπολογίστηκε από τον τύπο: %_{MTT} = [(O.D._{MTT} κυττάρων με διαλύτη/φορέα – O.D._{MTT} κυττάρων με μυκητοκτόνο)/O.D._{MTT} μάρτυρα κυττάρων με διαλύτη/φορέα]×100%.

3.2.2.2. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του kresoxim-methyl με τη μέθοδο NRU

Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης του μυκητοκτόνου, με κριτήριο την σταθερότητα των λυσοσωμικών μεμβρανών, τόσο στα N2a όσο και στα κύτταρα Vero, χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος NRU. Η μέθοδος πρόσληψης της χρωστικής ουδέτερο ερυθρό (Neutral Red Uptake, NRU) βασίζεται στην ικανότητα ζωντανών κυττάρων να προσλαμβάνουν και να ενσωματώνουν μόρια της χρωστικής NR (2-methyl-3-amino-7-dimethylamino-phenazine) στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων τους (Zhang et al., 1990). Η αποσταθεροποίησή τους σε κατάσταση στρες προκαλεί συγχώνευση των λυσοσωμάτων και διαμόρφωση μεγαλύτερων δομών και στη συνέχεια διαρροή της χρωστικής από το λυσοσώμα στο κυτταρόπλασμα (Repetto et al., 2008).

Πρώτο τμήμα της μεθόδου αποτελεί η διαδικασία της ανακαλλιέργειας των κυττάρων, όπως περιγράφεται παραπάνω. Μετά την μέτρηση των κυττάρων με την χρήση αιμοκυττόμετρου, καθορίζονται οι αραιώσεις του διαλύματος των κυττάρων, ώστε σε μικροπλακίδιο 96 μικροκυψελίδων/βοθρίων να γίνει επίστρωση 10⁴ κυττάρων ανά βοθρίο σε τελικό όγκο 200μl DMEM/10%FBS και ακολουθεί επώαση για 24h στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS συνολικού όγκου 200 μl. Κατόπιν τα

πλακίδια τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο, όπου επωάζονται για 24h σε θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα 5% CO₂.



Εικόνα 3.4: Πρόσληψη της χρωστικής NR από ζωντανά κύτταρα. Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων N2a και Vero.

Μετά τη συμπλήρωση 24h πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προσθήκη νέου που περιέχει 40μg/ml NR. Τα πλακίδια επανατοποθετούνται στον επωαστή, στους 37°C και σε 5% CO₂ για 3 ώρες, ώστε να πραγματοποιηθεί η διάχυση της βαφής. Μετά από πάροδο 3h, τα πλακίδια αφαιρούνται από τον επωαστή και ξεπλένονται με PBS. Ακολουθεί προσθήκη 200 μl διαλύματος 1% οξικού οξέος - 50% αιθανόλης ανά βοθρίο, ώστε να σπάσουν τα κύτταρα και να απελευθερωθεί η χρωστική στο εναιώρημα και επώαση των μικροπλακιδίων για 10 λεπτά σε σκοτάδι. Τέλος πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 540nm, για να προσδιοριστεί η ένταση της χρωστικής με φασματοφωτόμετρο μικροπλακών (BioTek™ PowerWave™ Microplate Spectrophotometer 340) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η % αναστολή του μυκητοκτόνου στην κυτταρική βιωσιμότητα των σειρών N2a και Vero υπολογίστηκε από τον τύπο: %_{NRU} αναστολή = [(O.D._{NRU} κυττάρων με διαλύτη/φορέα - O.D._{NRU} κυττάρων με μυκητοκτόνο)/O.D._{NRU} μάρτυρα κυττάρων με διαλύτη/φορέα] x 100%.

3.2.2.3. Προσδιορισμός δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού N2a και Vero υπό την επίδραση του kresoxim-methyl

Η επίδραση του μυκητοκτόνου στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των δύο κυτταρικών σειρών εκτιμήθηκε με την χρήση των δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού: μ (ειδικός ρυθμός αύξησης, specific growth rate) και *PDT* (χρόνος διπλασιασμού κυττάρων, Population Doubling Time). Ο ειδικός ρυθμός

αύξησης ορίζεται ως η αύξηση στην συγκέντρωση των κυττάρων ανά μονάδα χρόνου ανά κύτταρο, ενώ ο χρόνος που απαιτείται για να διπλασιαστεί το μέγεθος του πληθυσμού ονομάζεται χρόνος διπλασιασμού της καλλιέργειας.

Μετά την διαδικασία ανακαλλιέργειας τα κύτταρα επιστρώθηκαν πλακίδιο σε 96 μικροκυψελίδων/βοθρίων και μετά τον πέρασ 24h για την προσκόλληση τους εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου για χρονικό διάστημα 7 ημερών. Οι μετρήσεις των συγκεντρώσεων των κυττάρων έγιναν με χρήση αιμοκυττόμετρου Neubauer. Για τις μαθηματικές σχέσεις που εκφράζουν τους παραπάνω δείκτες χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εξισώσεις (Scheirer and Merten, 1991):

$$\mu = \frac{\ln X_n - \ln X_0}{t_n - t_{n0}} \quad \& \quad PDT = \frac{\ln 2}{\mu}$$

όπου μ : ειδικός ρυθμός αύξησης (h^{-1}), X_n : η συγκέντρωση των κυττάρων μετά το τέλος του πειραματικού χειρισμού, X_{n0} : η συγκέντρωση των κυττάρων στην αρχή του πειράματος, t_n , t_{n0} : οι χρόνοι στο τέλος και την αρχή του πειραματικού χειρισμού (h) και PDT: ο χρόνος διπλασιασμού της καλλιέργειας.

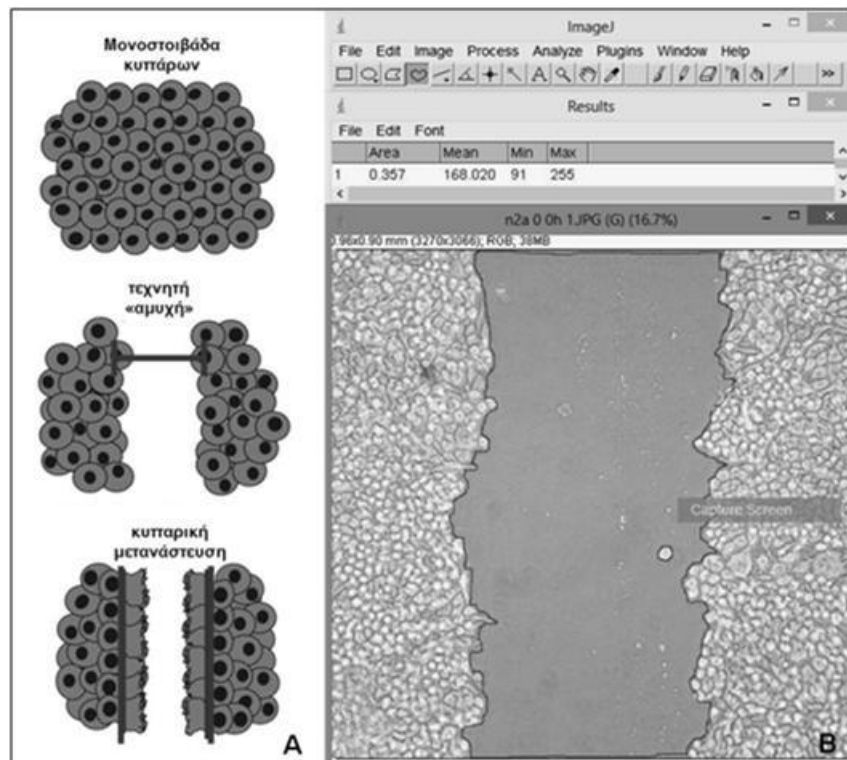
3.2.2.4. Μελέτη της μαζικής μεταναστευτικότητας των κυττάρων (Scratch-Wound Healing Assay)

Η μαζική μετανάστευση των κυττάρων μελετήθηκε εφαρμόζοντας τη μέθοδο προσομοίωσης τραύματος δια αμυχής (Scratch-Wound Healing Assay). Το πείραμα ελέγχει την ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται και ταυτόχρονα να μεταναστεύουν. Συγκεκριμένα δημιουργώντας μια τεχνητή πληγή (χαραγή) στην επιφάνεια της μονοστοιβαδας της κυτταροκαλλιέργειας και αφήνοντας τα κύτταρα με τον υπό μελέτη παράγοντα για 24h μπορεί να διαπιστωθεί η ικανότητα επούλωσης πληγών των κυττάρων. Η δοκιμή επούλωσης πληγής είναι μια σχετικά απλή και ταχεία μέθοδος, η οποία επιτρέπει την οπτική καταγραφή της κινητικότητας των κυττάρων σε διάφορες χρονικές περιόδους και για διάφορες συγκεντρώσεις με μια σειρά πειραματικών σχεδιασμών. Ωστόσο, με την μέθοδο αυτή δεν διευκρινίζεται κατά πόσο το αποτέλεσμα οφείλεται στην επίδραση της υπό μελέτης ουσίας στην κινητικότητα των κυττάρων ή στην επίδρασή της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Για το σκοπό αυτό κρίθηκε σκόπιμο να πραγματοποιηθούν παράλληλα, και μελέτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Σε πλακίδιο κυτταροκαλλιέργειας 6 βοθρίων καλλιεργούνται κύτταρα έως ότου καλύψουν κατά 80-90% τον πυθμένα αυτού.
- Μόλις η μικροσκοπική παρατήρηση επιβεβαιώσει την κάλυψη του πυθμένα των βοθρίων, το υπερκείμενο υγρό θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και με την χρήση ενός

αποστειρωμένου ρύγχους πίπετας αποκολλώνται κύτταρα από τον πυθμένα δημιουργώντας μια “τεχνητή πληγή” (scratch/wound).

- Τα αποκολλημένα κύτταρα απομακρύνονται με εκπλύσεις με διάλυμα PBS.
- Στα βοθρία προστίθεται νέο υγρό θρεπτικό υλικό (παρουσία 0.1% FBS) το οποίο περιέχει την προς εξέταση ουσία. Το χαμηλό ποσοστό FBS χρησιμοποιείται για την μελέτη της επίδρασης του μυκητοκτόνου κυρίως στην κυτταρική μετανάστευση, χωρίς η πλήρωση της χαραγής να επηρεάζεται από την επίδραση του kresoxim-methyl στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.



Εικόνα 3.5: (A) Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου προσομοίωσης τραύματος δια αμυχής (Scratch-Wound Healing Assay), προσαρμογή από Yarrow et.al. 2004. (B) Μέτρηση της επιφάνειας μέτρησης με την χρήση του λογισμικού ImageJ.

- Το πλακίδιο με τα κύτταρα μεταφέρεται στον επωαστικό θάλαμο και σε τακτά χρονικά διαστήματα παρατηρείται στο μικροσκόπιο η κάλυψη της χαραγμένης επιφάνειας από τα μεταναστεύοντα κύτταρα.
- Αντιπροσωπευτικές εικόνες των κυττάρων λαμβάνονται σε χρόνο 0 και 24 ώρες με κατάλληλη κάμερα προσαρμοσμένη σε μικροσκόπιο και πάντα στην ίδια περιοχή της χαραγής. Παρατηρείται η σταδιακή πλήρωση της χαραγής με κύτταρα, παρουσία του υπό μελέτη μυκητοκτόνου και μετράται η επιφάνεια πλήρωσης με χρήση του λογισμικού Image J (Image J, 1.29*, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, Schneider et al., 2012), (Εικόνα 3.5).

3.2.2.5. Μελέτη της ικανότητας δημιουργίας αποικιών (Clonogenic assay)

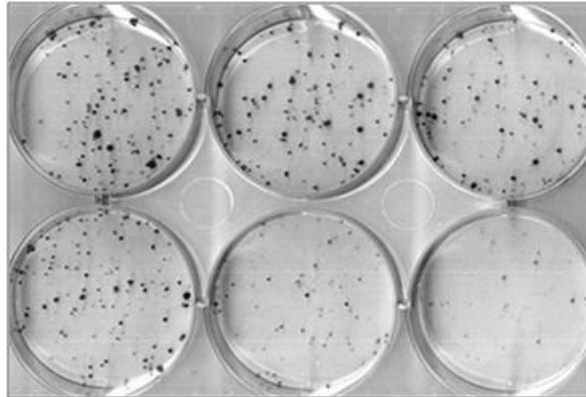
Η ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν αποικίες (κλώνους) περιγράφηκε κατά τη δεκαετία του 1950 και αποτέλεσε ένα βασικό εργαλείο για μελέτες τοξικότητας. Μεγάλο μέρος των πληροφοριών σχετικά με την επίδραση ουσιών σε κύτταρα θηλαστικών, έχει ληφθεί από δοκιμασίες επιβίωσης κυττάρων και δημιουργίας αποικιών (κλώνων). Μολονότι αυτές οι δοκιμασίες αρχικά χρησιμοποιούνταν για τη μελέτη των συνεπειών της ακτινοβολίας στα κύτταρα, σήμερα χρησιμοποιούνται πλέον ευρέως για την εξέταση των επιδράσεων διάφορων παραγόντων. Στην παρούσα διατριβή η μέθοδος αυτή χρησίμευσε για την μελέτη της δράσης του kresoxim-methyl σε κύτταρα θηλαστικών (Munshi et al., 2005).

Για διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία δεν πολλαπλασιάζονται, όπως τα νευρικά, τα μυϊκά ή τα εκκριτικά κύτταρα, ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να οριστεί ως η απώλεια μιας συγκεκριμένης λειτουργίας. Για πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, όπως τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα ή τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια, η απώλεια της ικανότητας για διαρκή πολλαπλασιασμό αποτελεί την απώλεια της αναπαραγωγικής ακεραιότητας. Επομένως, ένα κύτταρο που διατηρεί την ικανότητά του να συνθέτει πρωτεΐνες και DNA και να ολοκληρώνει μια ή δύο μιτώσεις, αλλά δεν είναι σε θέση να διαιρεθεί και να παράγει ένα μεγάλο αριθμό απογόνων, θεωρείται νεκρό. Αυτό πολύ συχνά αναφέρεται ως απώλεια της αναπαραγωγικής ακεραιότητας ή αναπαραγωγικός θάνατος (Munshi et al., 2005). Από την άλλη πλευρά, ένα κύτταρο που δεν είναι αναπαραγωγικά νεκρό και έχει διατηρήσει την ικανότητα να διαιρείται και να πολλαπλασιάζεται επ'αόριστον, παράγοντας ένα κλώνο ή καλύτερα μια μεγάλη αποικία τότε αναφέρεται ως «κλωνογόνο». Η ικανότητα ενός και μόνου (single) κυττάρου να αναπτυχθεί σε μια μεγάλη αποικία που μπορεί να παρατηρηθεί με γυμνό μάτι είναι η απόδειξη ότι έχει διατηρήσει την ικανότητά του για αναπαραγωγή (Franken et al., 2006).

Η μέθοδος ξεκινά με ανακαλλιέργεια κυττάρων και μέτρηση του κυτταρικού αιωρήματος, κατόπιν:

- Σε πλακίδιο κυτταροκαλλιέργειας 6 βοθρίων καλλιεργούνται κύτταρα έως ότου καλύψουν κατά 80-90% τον πυθμένα αυτού.
- Μόλις η μικροσκοπική παρατήρηση επιβεβαιώσει την κάλυψη του πυθμένα των βοθρίων, το υπερκείμενο υγρό θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και στα βοθρία προστίθεται νέο υγρό θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει το μυκητοκτόνο.
- Το πλακίδιο με τα κύτταρα μεταφέρεται στον επωαστικό θάλαμο και μετά το πέρας 24 ωρών τα κύτταρα επαναιωρούνται και μετράται ο αριθμός τους ανά μονάδα όγκου με την χρήση αιματοκυτταρόμετρου.

- Συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων από κάθε μεταχείριση (100-200) εμβολιάζονται σε νέο πλακίδιο κυτταροκαλλιέργειας το οποίο επωάζεται για χρονικό διάστημα 7 ημερών.
- Μετά το πέρας των 7 ημερών τα κύτταρα μονιμοποιούνται με διάλυμα μεθανόλης:PBS σε αναλογία 9:1 για 5min στους -20°C και χρωματίζονται με Commasie Brilliant Blue ώστε να είναι ορατές οι αποικίες που έχουν σχηματιστεί, (Εικόνα 3.6).

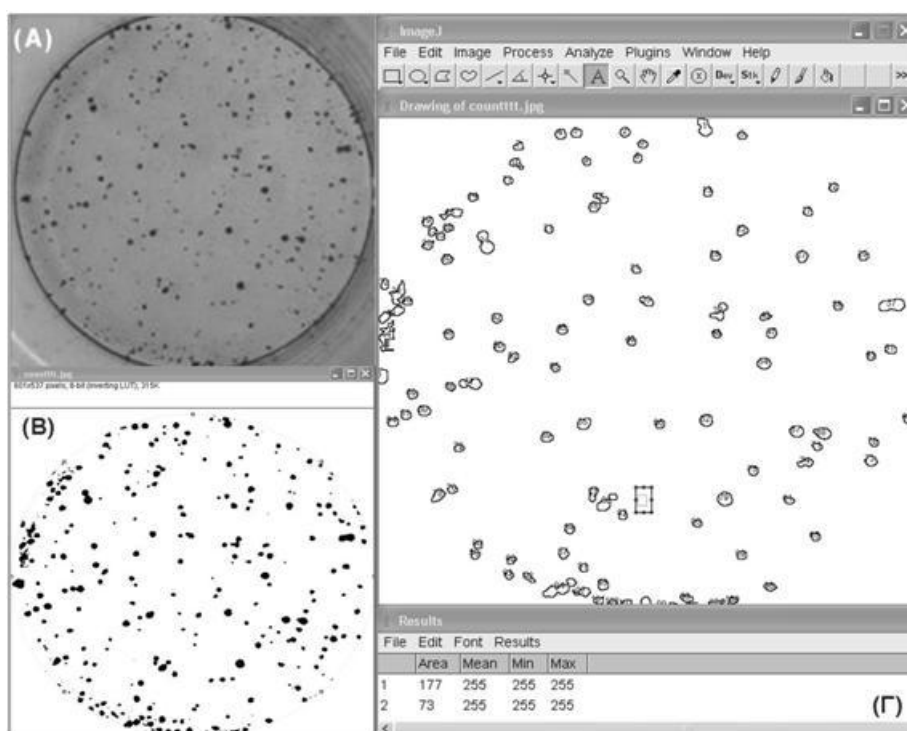


Εικόνα 3.6: Clonogenic Assay σε πλακίδιο έξι βοθρίων, διακρίνονται οι αποικίες που προέρχονται από ένα μεμονωμένο κύτταρο.

- Αντιπροσωπευτικές εικόνες των αποικιών λαμβάνονται με κατάλληλη κάμερα προσαρμοσμένη σε στερεοσκόπιο. Η καταμέτρηση των αποικιών γίνεται με χρήση του λογισμικού Image J (ImageJ, 1.41, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA,) (Εικόνα 3.7).

Στα τρυβλία που επωάζονται για 7 ημέρες κάθε μονό κύτταρο, που έχει εκτεθεί στις διάφορες συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου, θα διαιρεθεί πολλές φορές και θα σχηματίσει μια αποικία, η οποία κατόπιν χρώσης θα είναι εύκολα ορατή με γυμνό μάτι. Όλα τα κύτταρα που περιλαμβάνονται σε κάθε αποικία είναι οι απόγονοι ενός και μόνου (single) προγόνου. Για συγκεκριμένα και ανεξάρτητα 100 κύτταρα που εμβολιάστηκαν, ο αριθμός των μετρούμενων αποικιών ιδανικά, θα πρέπει να είναι 100, αλλά σπάνια είναι τόσα για διάφορους λόγους, συμπεριλαμβάνοντας το μη βέλτιστο μέσο ανάπτυξης, τα σφάλματα κατά την καταμέτρηση του κυτταρικού εναιωρήματος, τα λάθη στην καταμέτρηση του αρχικού αριθμού των επιστρωμένων κυττάρων καθώς και λάθη γενικού χειρισμού. Ο όρος **απόδοση τρυβλίου [plating efficiency - PE]** υποδεικνύει το ποσοστό των εμβολιασμένων κυττάρων που τελικά αναπτύσσονται σε αποικίες, όπου $PE = (\text{αριθμός των μετρούμενων αποικιών} / \text{αριθμός των σπαρμένων κυττάρων}) \times 100$.

Πριν την μονιμοποίηση και χρώση των κυττάρων πραγματοποιείται μικροσκοπική παρατήρηση στην οποία διακρίνονται: ορισμένα από τα εμβολιασμένα μεμονωμένα κύτταρα τα οποία εξακολουθούν να είναι μεμονωμένα και δεν έχουν διαιρεθεί, μερικά κύτταρα που έχουν καταφέρει να ολοκληρώσουν μια ή δύο διαιρέσεις σχηματίζοντας μια μικρή αποικία και μερικά κύτταρα που έχουν εξελιχθεί σε μεγάλες αποικίες που διαφέρουν ελάχιστα από το μάρτυρα, αν και μπορούν να διαφέρουν περισσότερο ως προς το μέγεθος. Αυτά τα κύτταρα διαπιστώνεται ότι έχουν διατηρήσει την αναπαραγωγική τους ακεραιότητα.



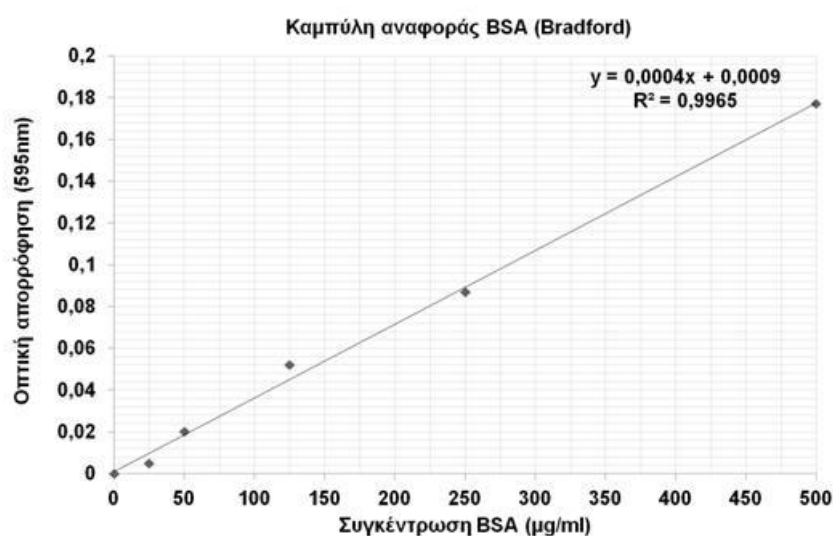
Εικόνα 3.7: Μέτρηση κυτταρικών αποικιών με την χρήση του λογισμικού ImageJ. A. Βοθρίο κυτταροκαλλιέργειας με ορατές αποικίες κυττάρων Vero μετά από χρώση με *Commasie Brilliant Blue*. B. Ψηφιοποίηση και αφαίρεση θορύβου της εικόνας A. Γ. Καταμέτρηση των αποικιών με τη βοήθεια του λογισμικού.

3.2.3. Εκτίμηση βιοχημικών χαρακτηριστικών οξειδωτικού στρες κυττάρων N2a και Vero μετά από έκθεση τους στο kresoxim-methyl

3.2.3.1. Επίδραση του μυκητοκτόνου στη δράση αποτοξινωτικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων

3.2.3.1.i. Προετοιμασία ολικού κυτταρολύματος και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικού περιεχομένου (μέθοδος Bradford)

Η μέθοδος ξεκινά με ανακαλλιέργεια κυττάρων, μέτρηση του κυτταρικού αιωρήματος και επίστρωση κυττάρων σε πλακίδιο κυτταροκαλλιέργειας 6 βοθρίων, έως ότου τα κύτταρα καλύψουν κατά 80-90% τον πυθμένα αυτού. Μόλις η μικροσκοπική παρατήρηση επιβεβαιώσει την κάλυψη του πυθμένα των βοθρίων, το υπερκείμενο υγρό θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και στα βοθρία προστίθεται νέο υγρό θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει το υπό μελέτη μυκητοκτόνο. Το πλακίδιο με τα κύτταρα μεταφέρεται στον επωαστικό θάλαμο και μετά το τέλος της έκθεσης των 24 ωρών τα κύτταρα επαναιωρούνται σε PBS, φυγοκεντρώνονται και προστίθεται σε αυτά διάλυμα λύσης [50m Tris (pH:7.5), 10mM NaCl, 0.5% Triton-X100]. Κατόπιν τα κύτταρα αφήνονται για λύση στον πάγο για 15min και επαναφυγοκεντρώνονται (10.000 στροφές / 4°C) για την απομάκρυνση των κυτταρικών θρασμάτων. Το κυτταρικό εκχύλισμα (υπερκείμενο) συλλέγεται, ακολουθεί προσδιορισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι την ανάλυσή τους.



Γράφημα 3.1: Τυπική πρότυπη καμπύλη BSA μέσω αντιδραστηρίου Bradford

Η αρχή της μεθόδου Bradford βασίζεται στον σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ του Coomassie Brilliant Blue G, που περιέχεται στο αντιδραστήριο Bradford, και των πρωτεϊνών στο υπό μελέτη διάλυμα. Το σύμπλοκο απορροφά στα 595 nm αντί στα 465 nm που απορροφά το Coomassie Brilliant Blue G. Η ένταση της απορρόφησης είναι γραμμικά ανάλογη της συγκέντρωσης πρωτεϊνών και οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης στα άγνωστα δείγματα υπολογίζονται βάση πρότυπης καμπύλης κλιμακούμενων συγκεντρώσεων αλβουμίνης BSA (Γράφημα 3.1).

3.2.3.1.ii. Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της μεταφοράσης της γλουταθειόνης (GST)

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST στο κυτταρικό εκχύλισμα βασίστηκε στη μέθοδο των Habig et al. (1974), με τροποποιήσεις για χρήση φωτομέτρου 96 μικροβοθρίων (Sharma et al., 1997). Η ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης χρησιμοποιήθηκε ως πρώτο υπόστρωμα του ενζύμου και το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζολίου (CDNB) ως δεύτερο. Η μέτρηση της δραστηριότητας βασίζεται στην αντίδραση: $GSH + CDNB \rightarrow GS-DNB + HCl$ και υπολογίζεται μέσω της ταχύτητας σχηματισμού του συμπλόκου GS-DNB, η οποία οδηγεί στην αύξηση της απορρόφησης στα 340 nm.

Πιο αναλυτικά, για την ενζυμική αντίδραση σε κάθε μικροβοθρίο προστίθενται: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (100 mM, pH 7.4), GSH (1 mM) και CDNB (1mM). Αρχικά τα δείγματα επωάζονται για 5 min στους 30°C. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 10 μl του κυτταρικού εκχυλίσματος και μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης στα 340nm για 5 min. Τα δείγματα που δεν περιέχουν το κυτταρικό εκχύλισμα αποτελούν το τυφλό. Η τελική καθαρή τιμή της κλίσης ΔA_{340nm} ανά min υπολογίζεται από το μέσο όρο των κλίσεων (ΔA) ανά λεπτό μείον τις κλίσεις του τυφλού.

Η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου εκφράζεται σε units GST ανά mg ολικής πρωτεΐνης του εκχυλίσματος των κυττάρων, λαμβάνοντας υπόψη τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης του συμπλόκου ϵ_{GS-DNB} (340nm)=0.0096 $\mu M^{-1} cm^{-1}$ και την ενζυμική μονάδα της GST (1 Unit_{GST}) που ορίζεται ως η ποσότητα ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή 1 μmol συμπλόκου GS-DNB ανά min.

3.2.3.1.iii. Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της καταλάσης (CAT)

Η CAT καταλύει την μετατροπή του H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο και στην παρούσα μελέτη ο προσδιορισμός της δραστηριότητάς της έγινε με βάση την μέθοδο του Aebi (Aebi, 1984). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε κυβέττα 3 ml στην οποία προστίθενται 50 μl κυτταρικού εκχυλίσματος και 2945 μl ρυθμιστικού διαλύματος

φωσφορικών (pH 7.4). Τα δείγματα επωάζονται για 10 min στους 37°C. Κατόπιν 5 ml από διάλυμα H₂O₂ 30% w/v προστίθενται στα δείγματα και αμέσως μετράται η μεταβολή της οπτικής απορρόφησης στα 240 nm (UV) για 1.5 min. Η δραστηριότητα του ενζύμου προκαλεί μείωση της αρχικής οπτικής απορρόφησης που έχουν τα δείγματα αμέσως μετά την προσθήκη του H₂O₂. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Η μεταβολή της απορρόφησης βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης της CAT με το υπόστρωμα (H₂O₂).

Η δραστηριότητα της καταλάσης υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης του H₂O₂. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ειδική δραστηριότητα καταλάσης [Unit_{CAT} (μmol/min) δείγματος ανά mg πρωτεΐνης δείγματος]. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$U_{\text{CAT}}/\text{mg πρωτεΐνης} = [(\Delta A_{\text{δείγματος}}/\text{min}/43.6) \times 60 \times 1000]/C_{\text{prot}}$$

όπου: $\Delta A_{\text{δείγματος}}/\text{min}$: μέση τιμή της μεταβολής της απορρόφησης ανά min, $\epsilon_{240\text{H}_2\text{O}_2}$ (M⁻¹cm⁻¹): 43.6 συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂, τιμή 60: συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος (Vτελ.αντίδρασης/μl αιωρήματος: 3000 μl/50 μl), τιμή 1000: μετατροπή mol/l σε μmol/ml και C_{prot}: συγκέντρωση πρωτεΐνης (mg/ml) μέσω αντιδραστήριου Bradford.

3.2.3.1.iv. Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) καταλύει την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου χρησιμοποιώντας ως αναγωγική ουσία τη γλουταθειόνη. Η δραστηριότητά της προσδιορίστηκε φωτομετρικά με τη μέτρηση της κατανάλωσης του NADPH που απορροφά στα 340nm (Maestro & McDonald, 1986). Πρόκειται για συζευγμένη αντίδραση κατά την οποία το GSSG που προκύπτει από την κατάλυση μέσω της GPx, χρησιμοποιείται από την αναγωγή του GSSG (GR) για να αναγεννηθεί η GSH με κατανάλωση NADPH. Όλα τα υποστρώματα καθώς και η GR προστίθενται σε περίσσεια, ώστε η ταχύτητα της αντίδρασης να εξαρτάται από την ποσότητα της GPx. Υπάρχουν δύο κατηγορίες ενζύμων με ενεργότητα GPx, αυτά που περιέχουν σελήνιο και αυτά που δεν περιέχουν σελήνιο (selenium και non-selenium GPxs) στο ενεργό τους κέντρο. Η μέθοδος ανιχνεύει μόνο τη Se-GPx, όταν υπόστρωμα είναι το H₂O₂, ενώ ανιχνεύει και τις δύο μορφές (GPx_{total}) όταν υπόστρωμα είναι το υδροϋπεροξειδίο κουμενίου (cumene hydroperoxide, CuOOH).

Στην παρούσα μελέτη μετρήθηκαν και οι δύο μορφές του ενζύμου, μέσω του CuOOH. Ο ρυθμός της οξειδωσης NADPH σε NADP⁺, ο οποίος μετράται μέσω της μείωσης της απορρόφησης στα 340nm, είναι ανάλογος της δραστηριότητας της GPx. Η τελική καθαρή τιμή της κλίσης ΔA_{340nm} ανά min υπολογίζεται από το μέσο όρο των κλίσεων (ΔA) και η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου εκφράζεται σε Units GPx ανά mg ολικής πρωτεΐνης του εκχυλίσματος των κυττάρων, αφού ληφθεί υπόψη ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης ϵ_{NADPH} (340nm)=6.22 mM⁻¹ cm⁻¹ και η ενζυμική μονάδα της GPX (1 Unit_{GPX}), που ορίζεται ως η ποσότητα ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή 10⁻³ mmol υποστρώματος σε προϊόν ανά min.

3.2.3.1.v. Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD)

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD βασίστηκε στη μέθοδο αναγωγής του άλατος του νιτροτετραζολίου (NBT) από το O₂⁻, σύμφωνα με τους Misra and Fridovich, 1977. Η SOD αντιδρά με το O₂⁻ που δημιουργείται φωτοχημικά από την διάσπαση της ριβοφλαβίνης και κατά συνέπεια παρεμποδίζει την μετατροπή του NBT σε φορμαζάνη μπλέ χρώματος.

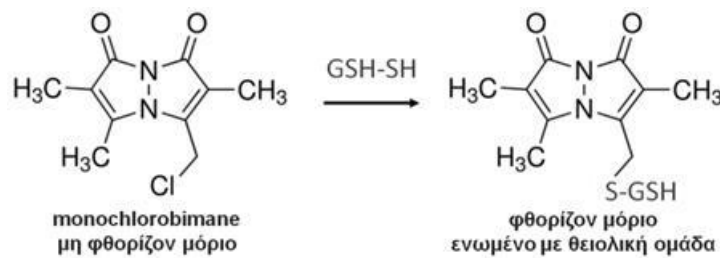
Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη κυτταρικού εκχυλίσματος σε διάλυμα αντίδρασης SOD (50 mM KH₂PO₄, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 0.25% Triton X-100, 20 μM ριβοφλαβίνη και 57 μM NBT) και επώαση κάτω από λάμπα φθορίου (Philips T-LD/58 Watt, απόσταση: 10cm) για 5min. Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 560nm. Ως μάρτυρας (τυφλό) χρησιμοποιήθηκε μόνο διάλυμα λύσης [50m Tris (pH:7.5), 10mM NaCl, 0.5% Triton-X100].

Η ενζυμική δραστηριότητα της SOD υπολογίστηκε με βάση το ποσοστό αναστολής της δημιουργίας φορμαζάνης. Το ποσοστό αναστολής υπολογίζεται ως εξής: % αναστολή = [(Ατυφλού - Αδείγματος) / Ατυφλού]×100 και ως ενζυμική μονάδα 1Unit_{SOD} ορίστηκε το ποσό ενζύμου που προκαλεί το 50% της παρεμπόδισης στην απορρόφηση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ειδική δραστηριότητα SOD [Unit_{SOD} ανά mg πρωτεΐνης δείγματος] με χρήση Bradford.

3.2.3.2. Επίδραση του μυκητοκτόνου σε μη ενζυμικούς δείκτες οξειδωτικού στρες

3.2.3.2.i. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός των επιπέδων γλουταθειόνης (GSH)

Για τον προσδιορισμό των ενδοκυττάρων επιπέδων γλουταθειόνης χρησιμοποιήθηκε φθορισμομετρική μέθοδος προσδιορισμού που βασίζεται στον ιχνηθέτη μονοχλωρομπιμίνη (monochlorobimane).



Εικόνα 3.8: Μη-φθορίζων ιχνηθέτης *monochlorobimane*, ο οποίος όταν ενώνεται με θειόλες, κυρίως τη γλουταθειόνη (GSH) φθορίζει ισχυρά.

Ο ιχνηθέτης αυτός διαπερνά με ευκολία τις κυτταρικές μεμβράνες και ενώνεται με τις ενδοκυττάρειες θειόλες. Η ελεύθερη μορφή του παρουσιάζει ελάχιστο φθορισμό. Όταν όμως ενωθεί με τις ενδοκυττάρειες θειόλες και κυρίως με τη γλουταθειόνη, αντίδραση η οποία καταλύεται από το ένζυμο μεταφοράς της γλουταθειόνης (glutathione-S-transferase, GST), σχηματίζει ένα προϊόν το οποίο φθορίζει ισχυρά (Εικόνα 3.8). Για την μέτρηση, κύτταρα N2a και Vero επιστρώθηκαν σε αδιαφανή (μαύρα) μικροβοθρία 96 θέσεων και μετά την προσκόλληση τους εκτέθηκαν στο μυκητοκτόνο. Μετά το πέρας της έκθεσης, το υλικό που περιείχε το ξενοβιοτικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με ισότονο διάλυμα PBS και ακολούθησε επώαση με τον ιχνηθέτη (50 μ M mBCl) για 40min και συνθήκες 5% CO₂/95% αέρα, στους 37°C.

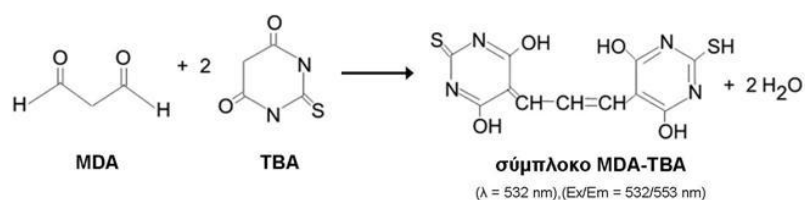
Τέλος, τα πλακίδια μετρήθηκαν με χρήση φθορισμόμετρου (TECAN infinite M200 Pro) σε μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής τα 360nm και 455 nm αντίστοιχα. Για κάθε δείγμα μετρήθηκε ο φθορισμός πριν την επώαση με τον ιχνηθέτη και αφαιρέθηκε από την τελική τιμή φθορισμού. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό % φθορισμού σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα.

3.2.3.2.ii. Προσδιορισμός των αλδεϋδικών παραγώγων της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (TBARS)

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η φωτομέτρικη μέθοδος, η οποία βασίζεται στην αντίδραση σε υψηλή θερμοκρασία του θειοβαρβιτουρικού οξέος (thiobarbituric acid, TBA) με τη μηλονική διαλδεϋδη (MDA, malondialdehyde), (Εικόνα 3.9), η οποία είναι παράγωγο της υπεροξειδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Poly Unsaturated Fatty Acids, PUFAs) που περιέχουν περισσότερους από δύο διπλούς δεσμούς αλλά επίσης εκτός από ελεύθερη συνδέεται και με πρωτεΐνες. Εκτός από την MDA υπάρχουν και άλλα αλδεϋδικά παράγωγα υπεροξειδωσης στο κύτταρο που μπορεί να αντιδράσουν με το TBA, η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως μη εξειδικευμένη και υπολογίζει το σύνολο των ουσιών αυτών που εν συντομία καλούνται (και η μέθοδος) ουσίες αντιδρούσες με θειοβαρβιτουρικό οξύ (ThioBarbituric Acid Reactive Substances, TBARS) (Conti et al., 1991; Grotto et al., 2009).

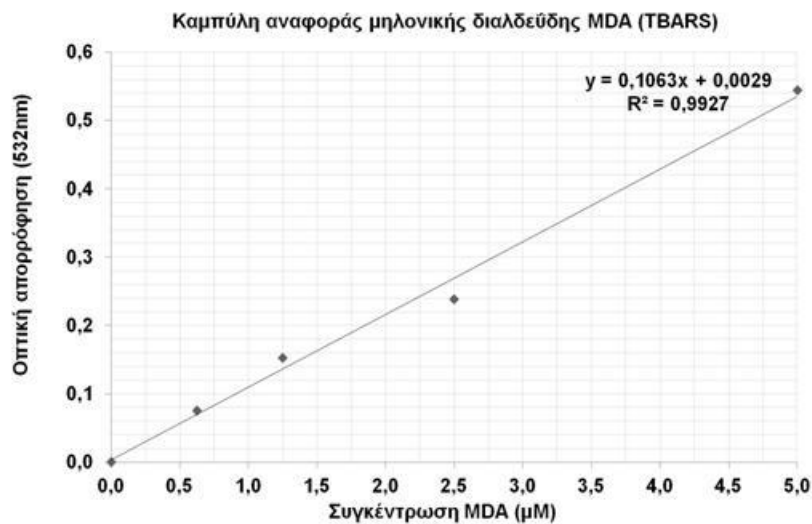
Οι Kohn και Liversedge, ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν την χρωματομετρική αντίδραση του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) με μια άγνωστη ουσία, η οποία σχηματίστηκε κατά την αερόβια επώαση του ομογενοποιημένου ιστού και αργότερα ταυτοποιήθηκε από τους Patton και Kurtz (Kohn & Liversedge, 1944; Patton & ParkKurtz, 1955) ως μηλονική διαλδεϋδη (MDA, malondialdehyde). Από τότε η αντίδραση MDA/TBA έχει υιοθετηθεί ευρέως ως μια ευαίσθητη μέθοδος για την εκτίμηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Η MDA, παράγεται από τη διαίρεση των ριζών των υπεροξειδίων, τα οποία είναι αποτέλεσμα της λιπιδικής υπεροξειδωσης και περιέχουν τουλάχιστον δύο διπλούς δεσμούς.

Η MDA γενικά μπορεί να μετρηθεί σε βιολογικά υγρά (π.χ. σε ούρα, πλάσμα), όπως επίσης και σε απομονωμένα κύτταρα. Ο μηχανισμός της αντίδρασης μέσω της οποίας η MDA παράγεται από τα υπεροξειδία των λιπιδίων έχει περιγραφεί από τους Dahle et al., 1962. Η MDA αντιδρά με το TBA για να δημιουργήσουν το μόριο MDA-TBA, το οποίο πολύ συχνά προσδιορίζεται ποσοτικά με φασματοφωτόμετρο στα 532nm (Pincemail et al., 1996) ή με φθορισμόμετρο (Ex/Em:532/553). Οι μετρήσεις αυτές αντανακλούν την υπεροξειδωση και των ω-3, αλλά και των ω-6 λιπαρών οξέων.



Εικόνα 3.9: Αντίδραση της MDA με TBA στην οποία βασίζεται η μέθοδος προσδιορισμού TBARS

Αρχικά προστίθεται 10% TCA στα κυτταρικά εκχυλίσματα και επωάζονται στον πάγο για 10min. Κατόπιν προστίθεται αντιδραστήριο TBARS (0.5% TBA σε 20% TCA και 0.33 N HCl) και τα δείγματα επωάζονται στους 95°C για 45min. Μετά την επώαση τα δείγματα αφήνονται να κρυώσουν και προστίθεται σε αυτά 70% TCA. Μετά από ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρηση (15000 g για 3 min) και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του υπερκείμενου στα 532nm. Τα δείγματα χωρίς το κυτταρικό αιώρημα αποτελούν το τυφλό. Η μετατροπή της οπτικής απορρόφησης σε συγκέντρωση παραγματοποιήθηκε από πρότυπη καμπύλη MDA μέσω του αντιδραστήριου 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP).



Γράφημα 3.2: Τυπική πρότυπη καμπύλη μηλονικής διαλδεύδης μέσω αντιδραστήριου TBARS.

3.2.3.2.iii. Εκτίμηση επιπέδων ROS μέσω έμμεσης μέτρησης φθορισμομετρικών ιχνηθετών

Η παρουσία ελευθέρων ριζών ελέγχεται διεθνώς με μεθόδους χημειοφωταύγειας, φασματοφωτομετρίας και φωτονικής μικροσκοπίας. Πολλές από αυτές τις μεθόδους βασίζονται σε μη ειδικές οξειδοαναγωγικές ιδιότητες των ROS και συνεπώς η χρήση τους εμπεριέχει σφάλματα, καθώς δεν προσφέρουν εξειδίκευση. Για το λόγο αυτό, συνίσταται η χρήση περισσότερων από μίας μεθόδων για την ανίχνευση των ROS (Turrens, 2003). Η ανίχνευση διαφόρων ROS πραγματοποιείται μέσω της οξείδωσης που προκαλούν σε κατάλληλους ιχνηθέτες (H_2DCFDA , MitoSOXTM Red, Amplex[®] Red), οι οποίοι έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες, όντας σχετικά μη τοξικοί στα κύτταρα. Η οξείδωση των ανιχνευτών αυτών, εξειδικευμένα για κάθε μορφή ελεύθερης ρίζας και ιχνηθέτη, προκαλεί στο φθορισμό τους μετά από διέγερση και εκπομπή σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, επιτρέποντας μια έμμεση εκτίμηση των επιπέδων ROS στα κύτταρα.

Μέτρηση ενδοκυτταρικών ROS (H₂O₂) μέσω του H₂DCFDA

Η μέτρηση των ενδοκυτταρικών ROS συνήθως πραγματοποιείται με τη χρήση του DCFH-DA (H₂DCFDA, 2',7'-dichlorofluorescein), το οποίο μετατρέπεται σε φθορίζον (2',7'-dichlorofluorescein) μετά από οξειδωσή του από ROS. Η ουσία DCFH-DA είναι ένα μη-πολικό μόριο το οποίο διασπάται στο παράγωγο DCFH (μη-φθορίζον) μέσω εστερασών του κυττάρου στο οποίο εισέρχεται. Το παράγωγο DCFH, εντός του κυττάρου πλέον, είναι μεμβρανικά μη-διαπερατό μόριο, το οποίο οξειδώνεται υπό την επίδραση διαφόρων υπεροξειδασών στο τελικό προϊόν 2',7'- dichlorofluorescein/DCF το οποίο φθορίζει στο πράσινο (488nm διέγερση/530nm εκπομπή) (Swift and Sarvazyan, 2000). Η διαδικασία αυτή απαιτεί επώαση στους 37°C, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η ενζυμική υδρόλυση.

Για την φθορισμομετρική ανίχνευση ενδοκυττάρων ROS μέσω του DCFH-DA, κύτταρα N2a και Vero επιστρώνονται σε αδιαφανή (μαύρα) μικροβοθρία κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων και αφήνονται για 24h προσκόλληση. Κατόπιν προστίθενται οι μελετούμενες συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM απουσία ορού (FBS) και του δείκτη pH Phenol Red. Μετά το τέλος της επώασης αφαιρείται από τα μικροβοθρία το θρεπτικό μέσο που περιέχει το μυκητοκτόνο και τα κύτταρα ξεπλένονται με ισότονο διάλυμα φωσφορικών (PBS). Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με 100μM του ιχνηθέτη DCFH-DA στο θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας DMEM, απουσία Phenol Red και συνθήκες 5% CO₂/95% αέρα, στους 37°C για 30min. Μετά την επώαση, τα κύτταρα ξεπλένονται με ισότονο διάλυμα PBS και ακολουθεί μέτρηση του φθορισμού σε μήκη κύματος διέγερσης 488nm και εκπομπής 530nm. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό % αύξησης του φθορισμού πριν και μετά την προσθήκη του ιχνηθέτη, μέσω του τύπου: [(Ft30 - Ft0)/Ft0 × 100] (Wang & Joseph, 1999).

Μέτρηση μιτοχονδριακών ROS (O₂⁻) μέσω του MitoSOX™ Red

Ο ανιχνευτής MitoSOX™ Red έχει την ικανότητα να διαπερνά τις μεμβράνες ζωντανών κυττάρων, να συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια και να φθορίζει μετά από οξειδωσή από του από το υπεροξειδικό ανιόν. Η ειδικότητα του MitoSOX™ Red για το O₂⁻ σε σύγκριση με άλλα ROS, όπως το H₂O₂, η υδροξυλική ρίζα, το μονήρες οξυγόνο και ο υπεροξυνιτρίτης έχει διαπιστωθεί πειραματικά και από τον κατασκευαστή (Molecular Probes, Invitrogen).

Το MitoSOX™ Red προέρχεται από την υδροεθιδίνη (HE-HydroEthidine), η οποία χρησιμοποιούνταν ευρέως τα προηγούμενα χρόνια για την ανίχνευση του ενδοκυτταρικού υπεροξειδικού ανιόντος. Η οξειδωσή της οδηγεί στο φθορίζον προϊόν 2-υδρόξυ-εθίδιο (2-hydroxy-ethidium), το οποίο διεγείρεται στα 480nm και εκπέμπει

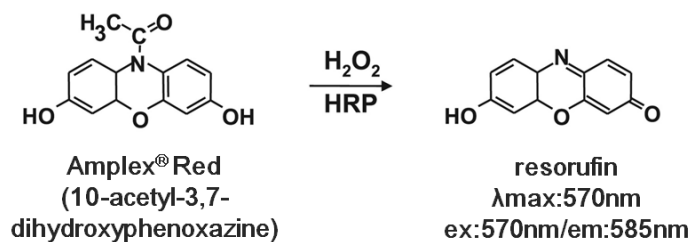
στα 567nm. Το MitoSOX™ Red παρουσιάζει το πλεονέκτημα του μιτοχονδριακού εντοπισμού, χάρη στην προσθήκη μίας πλάγιας ομάδας φωσφονίου (phosphonium), η οποία προσδίδει θετικό φορτίο, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της χρωστικής στο μιτοχόνδριο (Robinson et al., 2007). Η χρωστική αυτή έχει ήδη χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα εφαρμογών, μεταξύ των οποίων κυτταρομετρία ροής και μικροσκοπία συνεστίασης (Mukhopadhyay et al., 2007).

Για την φθορισμομετρική ανίχνευση μιτοχονδριακού O_2^- μέσω του MitoSOX™ Red, κύτταρα N2a και Vero επιστρώνονται σε αδιαφανή (μαύρα) μικροβοθρία κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων και αφήνονται για 24h προσκόλληση. Κατόπιν προστίθενται οι μελετούμενες συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM απουσία ορού (FBS) και του δείκτη pH Phenol Red. Μετά το τέλος της επώασης αφαιρείται από τα μικροβοθρία το θρεπτικό που περιέχει το μυκητοκτόνο και τα κύτταρα ξεπλένονται με ισότονο διάλυμα φωσφορικών (PBS). Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με 5μM του ιχνηθέτη MitoSOX™ Red στο θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας DMEM, απουσία Phenol Red και συνθήκες 5% CO_2 /95% αέρα, στους 37°C για 30min. Μετά την επώαση, τα κύτταρα ξεπλένονται με ισότονο διάλυμα PBS και ακολουθεί μέτρηση του φθορισμού σε μήκη κύματος διέγερσης 488nm και εκπομπής 530nm. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με β΄άση την μιτοχονδριακή μάζα μέσω του ιχνηθέτη MitoTracker® Green AM και εκφράστηκαν ως ποσοστό % αύξησης του φθορισμού πριν και μετά την προσθήκη του ιχνηθετη, μέσω του τύπου: $[(Ft30 - Ft0)/Ft0 \times 100]$ (Wang & Joseph, 1999).

Μέτρηση εξωκυτταρικών ROS (H_2O_2) στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας μέσω του Amplex® Red

Η ανίχνευση ROS με την χρήση της φθορισμομετρικής μεθόδου Amplex® Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) περιγράφεται ως μία από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους για την ανίχνευση των ROS και πιο συγκεκριμένα του εκκρινόμενου H_2O_2 κυττάρων ή ιστών και έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε μελέτες παγκοσμίως (Starkov et al., 2002; Dikalov et al., 2007).

Η μέθοδος βασίζεται στην μετροπή του Amplex® Red παρουσία υπεροξειδάσης αγριοραπανίδας (horseradish peroxidase, HPR) και H_2O_2 σε resorufin με στοιχειομετρικό λόγο 1:1, (Zhou et al., 1997). Η μέτρηση του προϊόντος μπορεί να γίνει τόσο φωτομετρικά (570nm, για υψηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 (>75μM), όσο και φθορισμομετρικά (ex:570nm/ em:585nm) για μεγαλύτερη ευαισθησία έως 0.01nM H_2O_2 (Molecular Probes Inc, 2009).



Εικόνα 3.10: Μετατροπή του Amplex® Red στο φθορίζον μόριο resorufin, παρουσία HPR και H_2O_2 .

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει την έκθεση των κυττάρων στο μυκητοκτόνο σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM απουσία του δείκτη pH Phenol Red. Μετά την έκθεση το θρεπτικό μέσο συλλέγεται και προστίθεται σε αυτό διάλυμα αντίδρασης Amplex® Red (50 μM Amplex® Red και 0.1 U/mL HRP σε διάλυμα φωσφορικών, pH 7.4), ακολουθεί επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι. Τέλος παραγματοποιείται φθορισμομετρική μέτρηση σε μήκη κύματος διέγερσης 570nm και εκπομπής 585nm. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό % αύξησης του φθορισμού σε σχέση με το θρεπτικό του μάρτυρα διαλύτη/φορέα.

3.2.4. Εκτίμηση βιοχημικών χαρακτηριστικών απόπτωσης κυττάρων N2a και Vero μετά από έκθεση τους στο kresoxim-methyl

3.2.4.1. Ανίχνευση κατακερματισμένου DNA (DNA fragmentation)

Μια από τις χαρακτηριστικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται στα αποπτωτικά κυττάρα, είναι ο κατακερματισμός ή σπάσιμο της αλυσίδας του DNA τους σε τμήματα μικρότερου μοριακού βάρους. Στην παρούσα μελέτη η εκτίμηση του κατακερματισμένου DNA πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της διφαινουλαμίνης καθώς και με ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης στα πλαίσια της τεχνικής DNA ladder.

Μέθοδος διφαινουλαμίνης (DPA)

Η μέθοδος μελέτης της κατάτμησης του DNA με την χρήση διφαινουλαμίνης (DPA) επιτρέπει τον προσδιορισμό του ποσοστού θραύσης των διαλυτών τμημάτων του DNA που απελευθερώνονται από των αποπτωτικό πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, δίνοντας με αυτό τον τρόπο μια ποσοτικοποιημένη ανταπόκριση των κυττάρων σε ενδεχόμενη τοξική βλάβη. Πειραματικά, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο από Squier et al., 2001. Η μέθοδος βασίζεται στην δημιουργία προϊόντος ($\lambda_{\max}=600\text{nm}$) που σχηματίζεται σε όξινο περιβάλλον κατά την αντίδραση της 2-δεοξυριβόζης, που απελευθερώνεται κατά την υδρόλυση των πουρινικών νουκλεοτιδίων του DNA, με την διφαινουλαμίνη.

Η διαδικασία ξεκινά με ανακαλλιέργεια κυττάρων, μέτρηση του κυτταρικού αιωρήματος και επίστρωση κυττάρων σε πλακίδιο κυτταροκαλλιέργειας 6 βοθρίων, έως ότου τα κύτταρα καλύψουν κατά 80-90% τον πυθμένα αυτού. Μόλις τα κύτταρα καλύψουν του πυθμένα των βοθρίων, το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και προστίθεται το υπό μελέτη μυκητοκτόνο. Τα κύτταρα επωάζονται για 24h με το μυκητοκτόνο και κατόπιν επαναιωρούνται σε PBS, φυγοκεντρώνονται και προστίθεται σε αυτά διάλυμα λύσης (TTE: 10mM Tris (pH: 7.4), 0.2% Triton-X100, 1mM EDTA) για 30min στους 4°C. Μετά την κυτταρική και πυρηνική λύση, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 13000 στροφές για 10min ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των θραυσμάτων DNA από την ακέραια χρωματίνη. Στη συνέχεια το υπερκείμενο (θραύσματα DNA) μεταφέρεται σε νέα erpendorf, ενώ το ίζημα (ακέραιο DNA) επαναιωρείται σε ρυθιστικό διάλυμα [TE:10mM Tris (pH:7.4), 1mM EDTA]. Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη και στις δύο φάσεις 25% TCA και ολονύκτια επώαση σε 4°C. Κατόπιν πραγματοποιείται φυγοκέντριση (13000 στροφές, 10min) και τα ιζήματα επαναιωρούνται σε διάλυμα 5%TCA και τοποθετούνται σε

θερμοκρασία 90°C για 15min ώστε να πραγματοποιηθεί υδρόλυση του DNA. Μετά το πέρας της υδρόλυσης προστίθεται το αντιδραστήριο DPA [150mg διφαινουλαμίνη σε 10ml παγόμορφο (glacial) οξικό οξύ, 150μl πυκνό θειικό οξύ, 50μl ακεταλδεϋδη] και ακολουθεί ανάδευση και ολονύκτια επώαση για τον σχηματισμό χρώματος. Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 600nm και ο υπολογισμός του ποσοστού κατακερματισμού (θραυσματοποιημένο/ολικό DNA) υπολογίζεται μέσω του λόγου της οπτικής απορρόφησης υπερκείμενου προς το άθροισμα των οπτικών απορροφήσεων υπερκείμενου και ιζήματος.

Ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (τεχνική DNA ladder)

Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, το DNA των κυττάρων συχνά κατακερματίζεται εξαιτίας της δράσης ενδονουκλεασών. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία τμημάτων DNA μεγέθους 200–480 βάσεων, τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν σε πήκτωμα αγαρόζης μετά την απομόνωση του DNA με την τεχνική DNA ladder.

Με βάση την τεχνική αυτή, κύτταρα N2a και Vero μετά την έκθεσή τους στο μυκητοκτόνο προστέθηκαν σε διάλυμα λύσης (20 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5, 0.2% Triton X-100 και 0.1 mg/mL proteinase K) και επώαστηκαν στους 37°C για 18 ώρες. Στη συνέχεια, προστέθηκε διάλυμα RNase A (50 μg/mL) στους 37°C για 30min. Το DNA απομονώθηκε με διάλυμα φαινόλης, χλωροφορμο-ισοαμυλ-αλκοόλης (24:1) και εκχυλίστηκε με διάλυμα 50% ισοπροπρανόλης. Το εκχύλισμα ξεπλύθηκε με 80% αιθανόλης, αφυδατώθηκε και διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα TE (10mM Tris-HCl pH:8 και 1mM EDTA pH:8). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% και ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE (40mM Tris, 20mM παγόμορφο οξικό οξύ και 1mM EDTA pH:8) σε 80-100V, για 4-5h. Μετά την ηλεκτροφόρηση, έγινε χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (1 μg/mL) στο πήκτωμα και ακολούθησε ξέπλυμα του και φωτογράφιση υπό υπεριώδη (UV) ακτινοβολία, (UVP BioDoc-It™ Imaging System, P/N 95-0405-01).

3.2.4.2. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός κασπάσης-3

Η ενεργοποίηση της ομάδας των πρωτεασών που ονομάζονται κασπάσες, ευθύνεται για την επαγωγή αποπτωτικών φαινομένων σε κύτταρα θηλαστικών. Από την οικογένεια των κασπασών, η κασπάση-3 (CPP32, Yama, Apopain) είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς λαμβάνει μέρος και στις δύο οδούς απόπτωσης (ενδογενής οδός-μιτοχονδριακό μονοπάτι και εξωγενής οδός-μονοπάτι υποδοχέων θανάτου) και ως εκ τούτου, αποτελεί την πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδο ανίχνευσης της απόπτωσης, (Porter & Jänicke, 1999). Οι μέθοδοι προσδιορισμού της δραστικότητας των

κασπασών, που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία, περιλαμβάνουν ανοσοϊστοχημικές, φθορισμομετρικές και ή φωτομετρικές προσεγγίσεις.

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της ειδικής δραστηριότητας της κασπάσης-3 με τη χρήση φασματοφωτομετρίας μέσω της αναγνώρισης της ακολουθίας DEVD (Gurtu et al., 1997). Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι οικονομικά προσιτή, έχει μεγάλη ευαισθησία και επαναληψιμότητα, που δεν απαιτεί εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό. Η μέθοδος στηρίζεται στην φωτομετρική ανίχνευση της χρωμοφόρου ουσίας p-νιτροανιλίνης (p-nitroaniline, pNA), μετά από τη διάσπασή της από το εξειδικευμένο υπόστρωμα DEVD-pNA. Η ελεύθερη pNA μπορεί να προσδιοριστεί με τη χρήση φωτομέτρου, καθώς εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 405 nm. Η συγκριτική μελέτη της απορρόφησης της pNA σε ένα δείγμα το οποίο εκτέθηκε σε κάποιον αποπτωτικό παράγοντα, σε σχέση με την απορρόφηση στο δείγμα μάρτυρα, επιτρέπει τον προσδιορισμό της αύξησης της ενζυμικής δραστηριότητας της κασπάσης-3.

Η πειραματική διαδικασία ξεκινά με ανακαλλιέργεια κυττάρων, μέτρηση του κυτταρικού αιωρήματος και επίστρωση κυττάρων σε πλακίδιο κυτταροκαλλιέργειας 6 βοθρίων, έως ότου τα κύτταρα καλύψουν κατά 80-90% τον πυθμένα αυτού. Μόλις η μικροσκοπική παρατήρηση επιβεβαιώσει την κάλυψη του πυθμένα των βοθρίων, το υπερκείμενο υγρό θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και στα βοθρία προστίθεται νέο υγρό θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει το υπό μελέτη μυκητοκτόνο. Το πλακίδιο με τα κύτταρα μεταφέρεται στον επωαστικό θάλαμο και μετά το τέλος της έκθεσης των 24 ωρών τα κύτταρα επαναιωρούνται σε PBS, φυγοκεντρώνονται και προστίθεται σε αυτά διάλυμα λύσης [50m Tris (pH: 7.5), 10mM NaCl, 0.5% Triton-X100]. Κατόπιν τα κύτταρα αφήνονται για λύση στον πάγο για 15min και επαναφυγοκεντρώνονται (10.000 στροφές/4°C) για την απομάκρυνση των κυτταρικών θρασμάτων. Το κυτταρικό εκχύλισμα (υπερκείμενο) χρησιμοποιείται για τον φωτομετρικό προσδιορισμό της κασπάσης. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται σε βοθρία 96 θέσεων και η αντίδραση περιείχε: 50μl κυτταρικό εκχύλισμα, 50μl ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (20mM HEPES (pH:7.5), 10% γλυκερόλη, 2mM DTT) και 50μM υποστρώματος DEVD-pNA. Το παραπάνω μείγμα επωάζεται στους 37 °C για 1-3h και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 405nm. Σε κάθε δείγμα μετρήθηκε η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών μέσω μεθόδου Bradford, για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, τα οποία εκφράστηκαν ως ποσοστό % ελεύθερης pNA σε σχέση με το μάρτυρα διαλύτη/φορέα.

3.2.4.3. Μελέτη μεταβολών ενδοκυτταρικών ιόντων Ca^{+2}

Τα ιόντα Ca^{+2} δρουν σαν αγγελιοφόροι, ρυθμίζοντας πληθώρα κυτταρικών διεργασιών και μεταξύ αυτών τους τύπους κυτταρικού θανάτου που θα ακολουθήσει ένα κύτταρο (Pinton et al., 2008). Η συγκέντρωση $[Ca^{2+}]$ αποτελεί σημαντικό δείκτη απόπτωσης καθώς αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η $[Ca^{2+}]$ αυξάνεται τόσο σε πρώιμα, όσο και σε όψιμα στάδια της αποπτωτικής οδού, (Kruman et al., 1998; Tombal et al., 1999; Lynch et al., 2000). Η απελευθέρωση Ca^{+2} από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) ή η εισροή Ca^{+2} μέσω ενεργοποίησης διαύλων Ca^{2+} έχουν προταθεί ως αποπτωγενή (Pinton και Rizzuto, 2006).

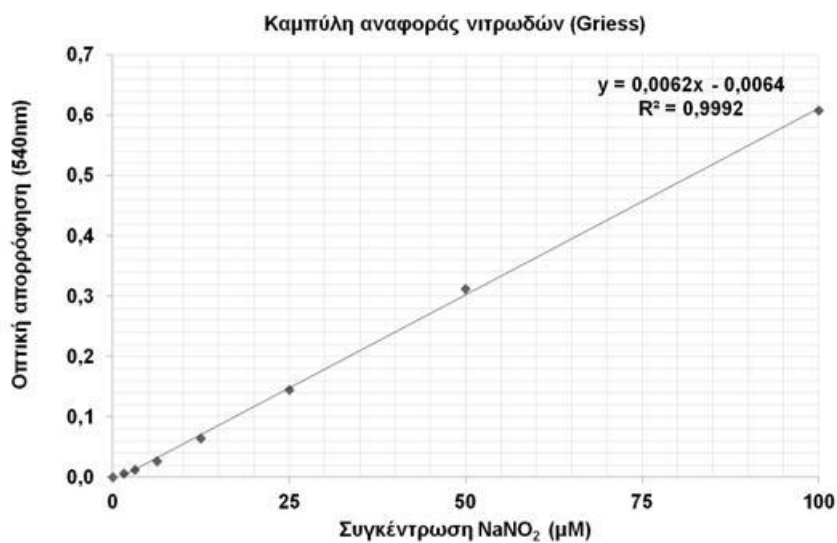
Για την μελέτη κινητοποίησης του ασβεστίου σε κύτταρα N2a και Vero χρησιμοποιήθηκε ο φθορισμομετρικός ιχνηθέτης ακετοξικός μεθυλεστέρας του Fluo-3 (Fluo-3 AM) ο οποίος διαπερνά εύκολα την λιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης και υδρολύεται από τις ενδοκυτταρικές εστεράσες στο κυτοσόλιο. Το ιόν που παράγεται δεσμεύει χηλικά τα ιόντα ασβεστίου. Ο ακετοξικός μεθυλεστέρας και το ελεύθερο ιόν του Fluo-3 δεν φθορίζουν ενώ το χηλικό σύμπλοκο του Fluo-3 με τα ιόντα Ca^{2+} εκπέμπει φθορισμό στα 530nm.

Για την φθορισμομετρική μέτρηση, κύτταρα N2a και Vero επιστρώνονται σε αδιαφανή (μαύρα) μικροβοθρία κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων και αφήνονται για 24h προσκόλληση. Κατόπιν προστίθενται οι μελετούμενες συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM απουσία ορού (FBS) και του δείκτη pH Phenol Red. Μετά το τέλος της επώασης αφαιρείται από τα μικροβοθρία το θρεπτικό που περιέχει το μυκητοκτόνο και τα κύτταρα ξεπλένονται με ισότονο διάλυμα φωσφορικών (PBS). Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με 4μM Fluo-3 AM στο θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας DMEM, απουσία Phenol Red και συνθήκες 5% CO_2 /95% αέρα, στους 37°C για 1h (Oda et al., 2000). Μετά την επώαση, τα κύτταρα ξεπλένονται ελαφρά με ισότονο διάλυμα φωσφορικών PBS και μετράται ο φθορισμός σε μήκη κύματος διέγερσης 485nm και εκπομπής 520nm. Ο φθορισμός κανονικοποιήθηκε με βάση τις ολικές πρωτεΐνες κάθε δείγματος και εκφράστηκε σαν ποσοστό % σε σχέση με το μάρτυρα (Sanson et al., 2008).

3.2.4.4. Προσδιορισμός μονοξειδίου του αζώτου (NO) στο μέσο καλλιέργειας με τη μέθοδο Griess (νιτρώδη ιόντα)

Η μέτρηση του μονοξειδίου του αζώτου είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί καθώς το NO είναι δεν ανιχνεύεται άμεσα εξαιτίας του μικρού χρόνου ημίσειας ζωής αλλά και του πλήθους των αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχει. Ως εκ τούτου, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του γίνεται έμμεσα από τη μέτρηση των νιτρωδών ιόντων. Το NO αποτελεί ένα ιδιαίτερα δραστικό μόριο το οποίο αντιδρά με το οξυγόνο

και μεταπίπτει σε νιτρώδη και νιτρικά ιόντα. Μια χαρακτηριστική δοκιμασία για να διερευνηθεί η παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου είναι η μέτρηση των νιτρωδών (NO_2) το οποίο είναι ένα από τα κύρια και πιο σταθερά προϊόντα διάσπασης του NO . Η ανίχνευση των νιτρωδών ιόντων πραγματοποιείται μέσω της αντίδρασης Griess, η οποία βασίζεται σε μία χημική αντίδραση δύο σταδίων, κατά την οποία οξεισμένα ιόντα NO^{2-} δίνουν ένα παράγοντα νίτρωσης που αντιδρά με σουλφανιλαμίδιο για να προκύψει ένα διαζονικό ιόν. Το ιόν αυτό στη συνέχεια αντιδρά με τη ναφθυλαιθυλενοδιαμίνη, για να σχηματιστεί ένα χρωμοφόρο σύμπλοκο το οποίο απορροφά το φως στα 540-570nm.



Γράφημα 3.3: Τυπική πρότυπη καμπύλη νιτρωδών μέσω αντιδραστήριου Griess.

Μετά την 24h επώαση των κυττάρων με το μυκητοκτόνο, το θρεπτικό μέσο (DMEM απουσία FBS και Phenol Red) μεταφέρεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προστίθεται σε αυτό αντιδραστήριο Griess (σουλφανιλαμίδιο 0.7%, διυδροχλωρική ναφθυλαιθυλενοδιαμίνη 0.07% και οξικό οξύ 60%) σε αναλογία 1:1 και ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι για 20min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, η συγκέντρωση των νιτρωδών προσδιορίζεται με φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 540nm και μέσω πρότυπης καμπύλης από κλιμακούμενες συγκεντρώσεις NaNO_2 (Γράφημα 3.3). Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν βάση των ολικών πρωτεϊνών των κυττάρων κάθε δείγματος και εκφράστηκαν ως % ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα.

3.2.4.5. Μελέτη μεταβολών μιτοχονδριακού μεμβανικού δυναμικού

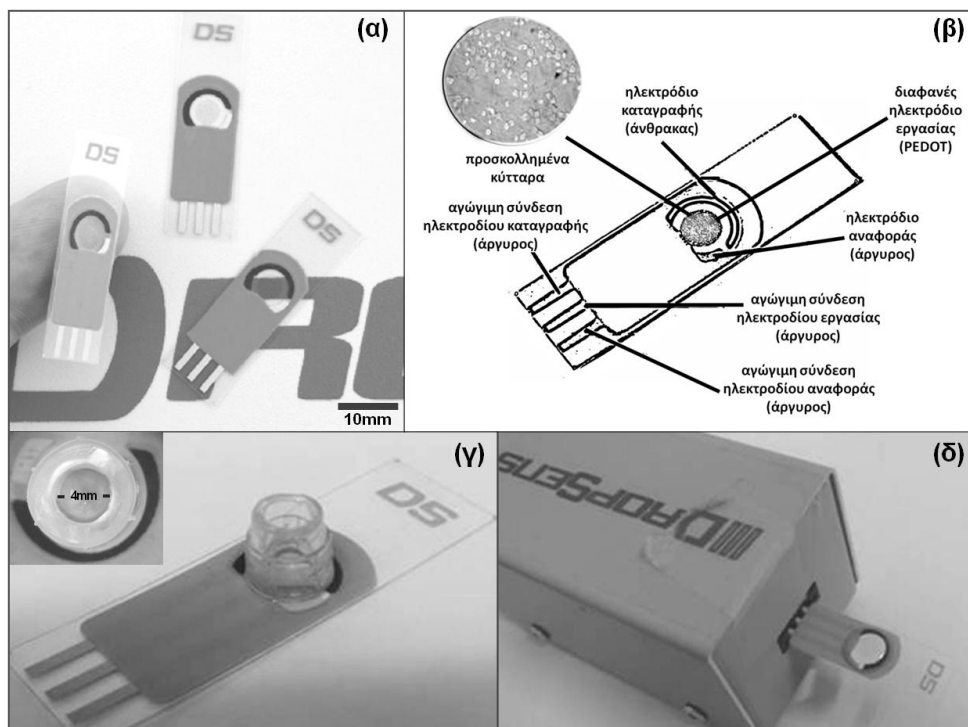
Το μεμβανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων αποτελεί σημαντικό δείκτη απόπτωσης καθώς η απώλεια του συνδέεται στενά με την έναρξη της αποπτωτικής

διαδικασίας (Gottlieb et al., 2003; Halestrap, 2006). Για την μελέτη του Δψm χρησιμοποιήθηκε ο φθορισμομετρικός ιχνηθέτης TMRE (Tetramethylrhodamine, ethyl ester) ο οποίος είναι μια κατιονική, λιποφιλική ένωση που συσσωρεύεται στα ενεργά μιτοχόνδρια και φθορίζει με βάση το δυναμικό που υπάρχει εκεί. Πειραματικά, κύτταρα N2a και Vero επιστρώνονται σε βοθρία κυτταροκαλλιέργειας 6 θέσεων και αφήνονται για 24h προσκόλληση. Κατόπιν προστίθενται οι μελετούμενες συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM απουσία ορού (FBS) και του δείκτη pH Phenol Red. Μετά το τέλος της επώασης αφαιρείται από τα μικροβοθρία το θρεπτικό που περιέχει το μυκητοκτόνο και τα κύτταρα ξεπλένονται με ισότονο διάλυμα φωσφορικών (PBS). Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με 200nM TMRE και 1μM MitoTracker[®] Green FM στο θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας DMEM, απουσία Phenol Red και συνθήκες 5% CO₂/95% αέρα, στους 37°C για 1h. Μετά την επώαση, τα κύτταρα ξεπλένονται ελαφρά με ισότονο διάλυμα φωσφορικών PBS και ακολουθεί λύση τους 10% Triton-X (Majewski et al., 2004). Κατόπιν μετράται ο φθορισμός σε μήκη κύματος διέγερσης 450nm και εκπομπής 580nm για το TMRE και 490nm, 515nm για το MitoTracker[®] Green FM, αντίστοιχα. Ο φθορισμός του TMRE κανονικοποιήθηκε με τον MitoTracker[®] Green FM καθώς ο δεύτερος συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια ανεξαρτήτως του Δψm και αντικατοπτρίζει την συνολική μιτοχονδριακή μάζα (Lee et al., 2002).

3.2.5. Κατασκευή βιοαισθητήρα

3.2.5.1. Εκτίμηση βιοσυμβατότητας πολυμερούς PEDOT με κύτταρα N2a και Vero μέσω μελέτης κυτταρικής προσκόλλησης και βιωσιμότητας

Για την μελέτη της προσκόλλησης των δύο τύπων κυττάρων στο πολυμερές χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρόδια μεταξοτυπίας PEDOT της εταιρείας DropSens (Llanera, Spain) (DRP-P10). Πριν την επίστρωση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε ξέπλυμα της επιφάνειας του πολυμερούς με διάλυμα EtOH 70% και στη συνέχεια με PBS. Κατόπιν τα ηλεκτρόδια αφέθηκαν να στεγνώσουν κάτω από ασηπτικές συνθήκες (θάλαμο νηματικής ροής) σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, όπως αυτή περιγράφεται παραπάνω, τα κύτταρα μετρήθηκαν με το αιμοκυττόμετρο και επιστρώθηκαν στην επιφάνεια εργασίας του ηλεκτροδίου με την βοήθεια ενός αποκομμένου ρύγχους πίπετας (Εικόνα 3.11γ). Η διάμετρος του ρύγχους ισούται με την διάμετρο του ηλεκτροδίου (4mm) δημιουργώντας ένα "βοθρίο κυτταροκαλλιέργειας" ικανό να συγκρατήσει 40 μl υλικού κυτταροκαλλιέργειας. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε συγκέντρωση 4×10^4 κύτταρα/cm² και για τις δύο σειρές σε πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM/10% FBS. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν συμβατικά πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας (TCP).

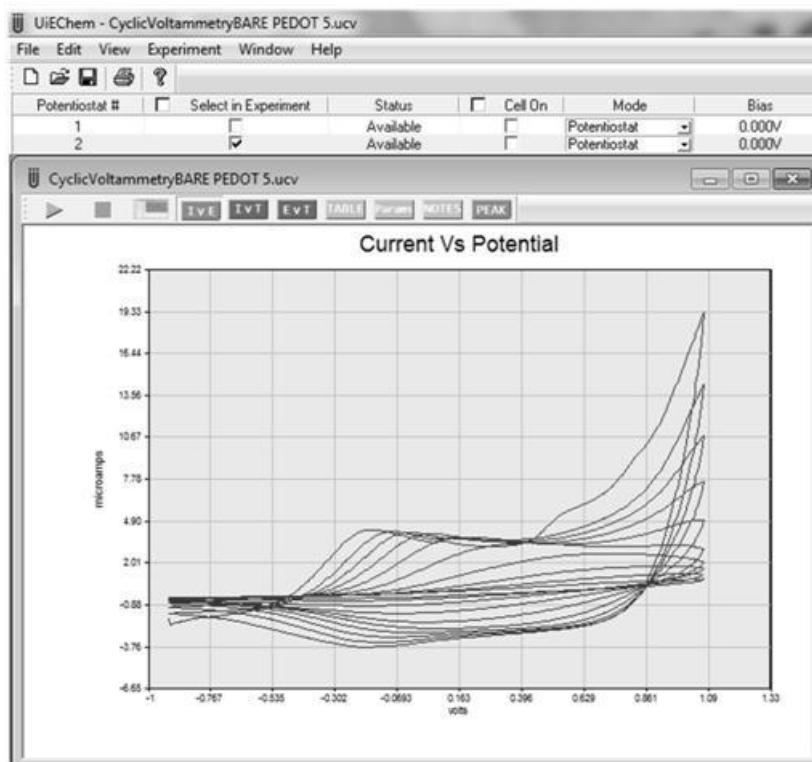


Εικόνα 3.11: Ηλεκτρόδια μεταξοτυπίας (DropSens-P10). Τα ηλεκτρόδια εργασίας αποτελούνται από το ηλεκτρικά αγωγίμο και διαφανές πολυμερές PEDOT, τα βοηθητικά ηλεκτρόδια (καταγραφής) από γραφίτη, ενώ το ηλεκτρόδιο αναφοράς από άργυρο. Εξαιτίας της βιοσυμβατότητας του PEDOT, μπορεί να πραγματοποιηθεί προσκόλληση κυττάρων στην επιφάνειά του.

Για την μελέτη προσκόλλησης τα κύτταρα επώαστηκαν υπό συνθήκες κλασικής κυτταροκαλλιέργειας με το πολυμερές για 3h, ενώ για την μελέτη βιωσιμότητας για 24h. Μετά το πέρας των χρόνων επώασης, τα κύτταρα παρατήθηκαν με τη χρήση μικροσκοπίου ανάστροφης φάσης, κατόπιν το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν απαλά με PBS για την απομάκρυνση μη προσκολλημένων/ νεκρών κυττάρων από την επιφάνεια του πολυμερούς και τέλος τα εναπομείναντα κύτταρα μετρούνταν με την χρήση μικροσκοπίου ανάστροφης φάσης. Ως ποσοστό προσκόλλησης υπολογίστηκε ο λόγος % των προσκολλημένων κυττάρων μετά την επώαση των 3h προς τον αρχικό αριθμό επίστρωσης. Ως ποσοστό βιωσιμότητας μετά την επώαση των 24h υπολογίστηκε ο λόγος % του αριθμού κυττάρων στο πολυμερές προς τον αριθμό κυττάρων στα συμβατικά πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας (TCP).

3.2.5.2. Προκαταρκτικά πειράματα κυκλικής βολταμετρίας

Η κυκλική βολταμετρία αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο χαρακτηρισμού των οξειδοαναγωγικών συστημάτων και είναι συχνά ο αρχικός πειραματισμός που πραγματοποιείται σε ηλεκτροχημικές μελέτες υλικών, επιστρώσεων (coatings) και ηλεκτροδίων αποδίδοντας χρήσιμες πληροφορίες για τη εκτίμηση της ενεργής ηλεκτροκαταλυτικής τους επιφάνειας.



Εικόνα 3.12: Τυπικό βολταμογράφημα ηλεκτροδίων PEDOT (DRP-P10), εφαρμοζόμενο δυναμικό: $-1V$ έως $+1V$, ρυθμός σάρωσης: $100mV s^{-1}$, αριθμός κύκλων: 10, διάλυμα PBS.

Στην παρούσα εργασία ελέχθησαν αρχικά, μέσω κυκλικής βολταμετρίας, η σταθερότητα και η αναπαραγωγιμότητα των ηλεκτροδίων PEDOT και κατόπιν μελετήθηκε η ικανότητα συσσώρευσης φορτίων στην επιφάνειά τους, πριν και μετά την κυτταρική επίστρωση. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με την χρήση του ποτενσιοστάτη PG580 της εταιρείας Uniscan Instruments Ltd. (Buxton, Derbyshire, UK), των ηλεκτροδίων DRP-P10 (Εικόνα 3.11) και της συσκευής διεπαφής DropSens DSC της εταιρείας DropSens (Llanera, Spain) (εικόνα 3.11δ).

Οι συνθήκες διεξαγωγής της κυκλικής βολταμετρίας ήταν: εύρος εφαρμοζόμενου δυναμικού από -1V έως +1V, ρυθμός σάρωσης 100mV s^{-1} , υδατικό διάλυμα PBS και θερμοκρασία δωματίου. Για την καταγραφή των ηλεκτροχημικών αποκρίσεων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό UiEChem™ της εταιρείας Bio-Logic Science Instruments SAS (Εικόνα 3.12) (Claix, France). Ο όγκος του διαλύματος μέτρησης (60μl) προσθέτονταν μέσω μηχανικής πιπέτας και κάλυπτε την επιφάνεια και των τριών ηλεκτροδίων (Εικόνα 3.11δ).

Για την μελέτη των ηλεκτροχημικών ιδιοτήτων των ηλεκτροδίων χρησιμοποιήθηκε το χαρακτηριστικό μέγεθος της ειδικής ηλεκτρικής χωρητικότητας C_s (specific capacitance C_s , F/g), το οποίο υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση:

$$C_s = \frac{2 \int IdV}{m \times \Delta V \times S}$$

όπου, C_s η ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα, $\int IdV$ εμβαδόν του κυκλικού βολταμογραφήματος (ολοκλήρωμα της καμπύλης), m μάζα του ενεργού υλικού του ηλεκτροδίου, ΔV το εύρος εφαρμοζόμενου δυναμικού και S ο ρυθμός σάρωσης δυναμικού (Wang et al., 2013).

3.2.5.3. Εφαρμογή κυκλικής βολταμετρίας σε διαφορετικούς αριθμούς κυττάρων N2a και Vero

Διαφορετικός αριθμός κυττάρων N2a και Vero επωάστηκαν υπό συνθήκες κλασσικής κυτταροκαλλιέργειας για 24h στα ηλεκτρόδια PEDOT και ακολούθησαν πειράματα κυκλικής με τις συνθήκες που αναφέρονται παραπάνω. Κατόπιν υπολογίστηκε η ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα C_s για κάθε συγκέντρωση κυττάρων. Οι συγκεντρώσεις κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: $1,3,6,9,12 \times 10^4/\text{cm}^2$ και για τις δύο κυτταρικές σειρές.

3.2.5.4. Μελέτη της απόκρισης του βιοαισθητήρα στο μυκητοκτόνο kresoxim-methyl

Κύτταρα N2a και Vero επιστρώθηκαν σε ηλεκτρόδια PEDOT, επωάστηκαν για 3h προκειμένου να επιτευχθεί κυτταρική προσκόλληση στο πολυμερές και κατόπιν εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του kresoxim-methyl για 24h. Μετά το τέλος της έκθεσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυκλικής βολταμετρίας με τις συνθήκες που αναφέρονται παραπάνω και υπολογίστηκε η ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα Cs για κάθε συγκέντρωση μυκητοκτόνου.

3.2.5.5. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων Vero με παρεμβαλλόμενο RNA (μεταγραφική σίγηση γονιδίων)

Κατά την πειραματική αυτή διαδικασία πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων Vero με παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες RNA (siRNA), προκειμένου να μειωθεί η συσσώρευση των μεταγραφών του Nrf2. Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 ο πιο σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας στην έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων καθώς συμμετέχει στην ενεργοποίηση των ενζύμων φάσης II κατά την αντίδραση των κυττάρων σε ξеноβιοτικά ερεθίσματα. Οι τάξεις των πρωτεϊνών που επάγονται από τον Nrf2 μπορούν περιλαμβάνουν ένζυμα που δεσμεύουν ηλεκτροφιλικές ουσίες, αντιοξειδωτικά ένζυμα, πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την ομοιόσταση της γλουταθειόνης και αναγωγικά ισοδύναμα (Osburn & Kensler, 2008).

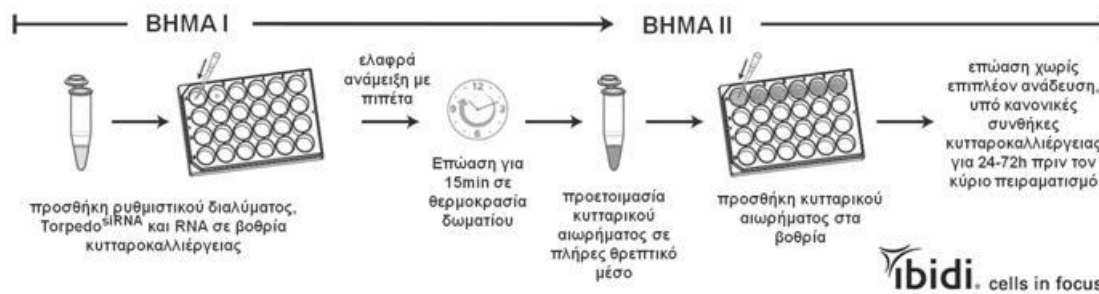
Πίνακας 3.3: Ενδεικνυόμενες συνθήκες για τη διαμόλυνση κυττάρων με την χρήση του αντιδραστήριου Torpedo^{siRNA} της Ibbidi.

τύπος τρυβλίου	επιφάνεια ανά βοθρίο	ρυθμιστικό διάλυμα (μl)	RNA (pmol)	Torpedo ^{siRNA} (μl)	κυτταρικό αιώρημα (ml)
96 βοθρίων	0.3cm ²	15	15	1	0.1
48 βοθρίων	1cm ²	30	30	2	0.25
24 βοθρίων	1.9cm²	60	60	4	0.5
12 βοθρίων	3.6cm ²	120	120	8	1
6 βοθρίων	9cm ²	180	180	12	2

Η μεταφορά των siRNAs στο εσωτερικό των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με την τεχνολογία διαμόλυνσης Torpedo^{siRNA} (Ibbidi GmbH, Planegg, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το αντιδραστήριο Torpedo^{siRNA} είναι ειδικά σχεδιασμένο για την διαμόλυνση των μικρών RNA (siRNA και miRNA) σε κύτταρα θηλαστικών και ο μηχανισμός διαμόλυνσής του βασίζεται σε τεχνολογία λιπιδίων. Προσφέρει χαμηλή κυτταροτοξικότητα σε κύτταρα θηλαστικών, υψηλή

αποτελεσματικότητα διαμόλυνσης και είναι συμβατό με μεγάλο αριθμό κυτταρικών σειρών. Επιπλέον, ο ειδικός σχεδιασμός του επιτρέπει ένα πρωτόκολλο διαμόλυνσης με σταθερή αναλογία αντιδραστηρίου-RNA, χωρίς την ανάγκη για περαιτέρω βελτιστοποίηση (www.ibidi.com).

Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται σχηματικά στην Εικόνα 3.13 και πραγματοποιήθηκε σε τρυβία κυτταροκαλλιέργειας 24 βοθρίων με τις ενδεικνυόμενες αναλογίες αντιδραστηρίων που περιγράφονται από τον κατασκευαστή (Πίνακας 3.3) και την αναλογία αντιδραστηρίου:RNA να ήταν πάντα 1 μ l Torpedo^{siRNA}:15 μ mol RNA. Τα RNAi που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το εξειδικευμένο Nrf-2 siRNA της Qiagen και αρνητικό control siRNA της ίδιας εταιρείας (*NRF2-specific siRNA/SI03246614*; *Negative (non-silencing) control siRNA/SI03650325*, Qiagen). Μετά την παροδική διαμόλυνση τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν σε πειραματισμούς βιωσιμότητας όπως αναφέρονται σε προηγούμενες πειραματικές ενότητες καθώς και σε πειραματισμούς κυτταρικής προσκόλλησης σε ηλεκτρόδια PEDOT και κατασκευής του βιοαισθητήρα..



Εικόνα 3.13: Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας παροδικής διαμόλυνσης (Torpedo^{siRNA}) κυτάρων με παρεμβαλλόμενο RNA, προσαρμοσμένη από Ibbidi GmbH.

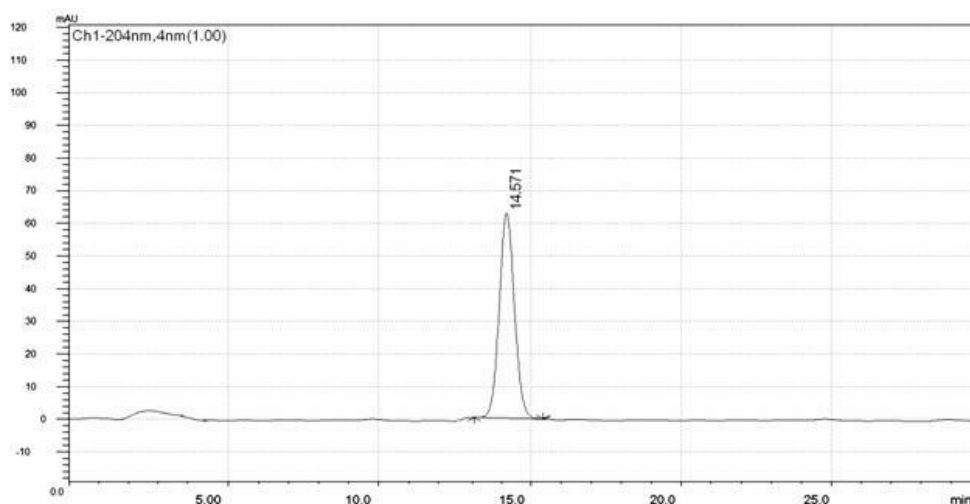
3.2.5.6. Μελέτη της απόκρισης βιοαισθητήρα μετα-μεταγραφικά τροποποιημένων κυτάρων Vero στο μυκητοκτόνο kresoxim-methyl

Κύτταρα Vero μετά από μετα-μεταγραφική σίγηση του Nrf2 επιστρώθηκαν σε ηλεκτρόδια PEDOT, επώστηκαν για 3h προκειμένου να επιτευχθεί κυτταρική προσκόλληση στο πολυμερές και κατόπιν εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου για 24h. Μετά το τέλος της έκθεσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυκλικής βολταμετρίας με τις συνθήκες που αναφέρονται παραπάνω και υπολογίστηκε η ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα Cs για κάθε συγκέντρωση του kresoxim-methyl.

3.2.5.7. Προσδιορισμός του kresoxim-methyl μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του μυκητοκτόνου έγινε με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC). Για την ανίχνευση του μυκητοκτόνου χρησιμοποιήθηκε σύστημα Shimadzu LC-20AD, με αυτόματο δειγματολήπτη SIL-20A, αυτόματο απαερωτή DGU-20A5, φούρνο CTO-20A και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector) SPD-M20A της Shimadzu. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του προγράμματος LCsolution, v. 1.0.0.1. της Shimadzu. Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του kresoxim-methyl χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής Diode Array με μήκος κύματος λ 205 nm, στήλη Discovery C18 αντίστροφης φάσης, μήκους 250mm, εσωτερικής διαμέτρου 4.6 mm και πορώδους υλικού πλήρωσης 5 μ m.

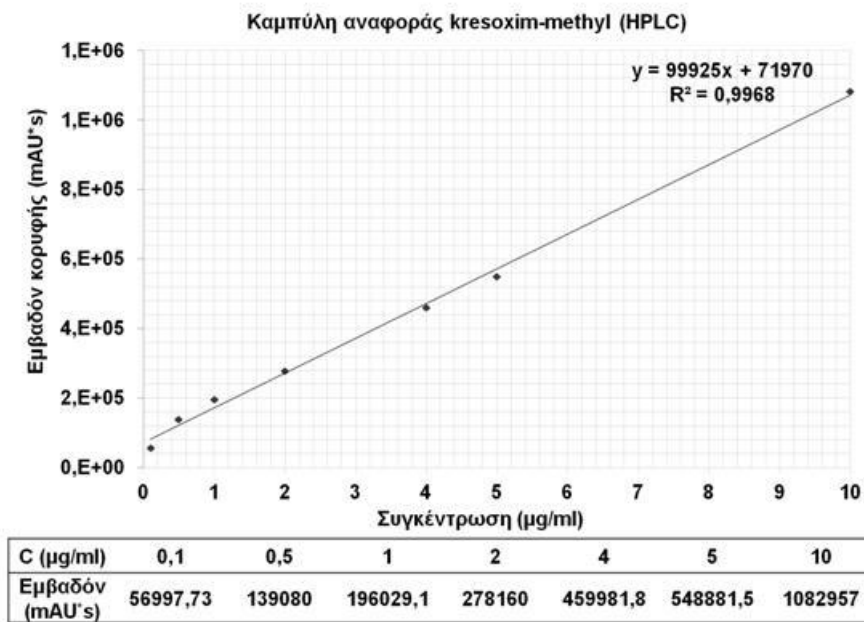
Οι συνθήκες μέτρησης ήταν: κινητή φάση με ισοκρατικό σύστημα σύστασης μεθανόλη:νερό (75:25 v/v). Το νερό ήταν δις απεσταγμένο, διηθημένο και οξιμισμένο με προσθήκη οξικού οξέος, ενώ η μεθανόλη υψηλής καθαρότητας (99.9%). Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στα 0.5 ml/min, ο όγκος εισαγωγής (injection volume) ήταν 10 μ l, ψ =780-810 και η θερμοκρασία της στήλης ήταν σταθερή στους 30°C. Η διάρκεια της κάθε ανάλυσης ήταν 30 λεπτά. Η καταγραφή των εκλουόμενων συστατικών, γίνονταν συνεχώς μέσω του φάσματος απορρόφησης από τον ανιχνευτή διάταξης διόδων (DAD) στα 205nm. Η ταυτοποίηση του μυκητοκτόνου βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης, ο οποίος ταυτοποιήθηκε με χρήση πρότυπης ουσίας. Με το ίδιο πρόγραμμα έκλουσης και τις ίδιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας, ελήφθησαν και τα χρωματογραφήματα πρότυπων διαλυμάτων του kresoxim-methyl για την χάραξη καμπύλης αναφοράς.



Εικόνα 3.14: Τυπικό χρωματογράφημα του kresoxim-methyl, υπό συνθήκες μέτρησης όπως αναφέρονται παραπάνω, χρόνος έκλουσης $RT=14.57min$.

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων επιλέχτηκε η μεθανόλη ως διαλύτης. Αρχικά κατασκευάστηκε πυκνό διάλυμα, συγκέντρωσης 100 µg/ml, από την στερεή κρυσταλλική μορφή του μυκητοκτόνου, λαμβάνοντας υπόψη την καθαρότητα του. Κατόπιν παρασκευάστηκαν, με διαδοχικές αραιώσεις, διαλύματα του μυκητοκτόνου σε συγκεντρώσεις 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 5 και 10 mg/mL.

Η ποσοτική αποτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τη μέση τιμή του εμβαδού της κορυφής της προσδιοριζόμενης ένωσης. Με τον τρόπο αυτό κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς και υπολογίστηκε η εξίσωση της ευθείας (Γράφημα 3.4).



Γράφημα 3.4: Πρότυπη καμπύλη kresoxim-methyl (HPLC).

4. Αποτελέσματα

4. Αποτελέσματα

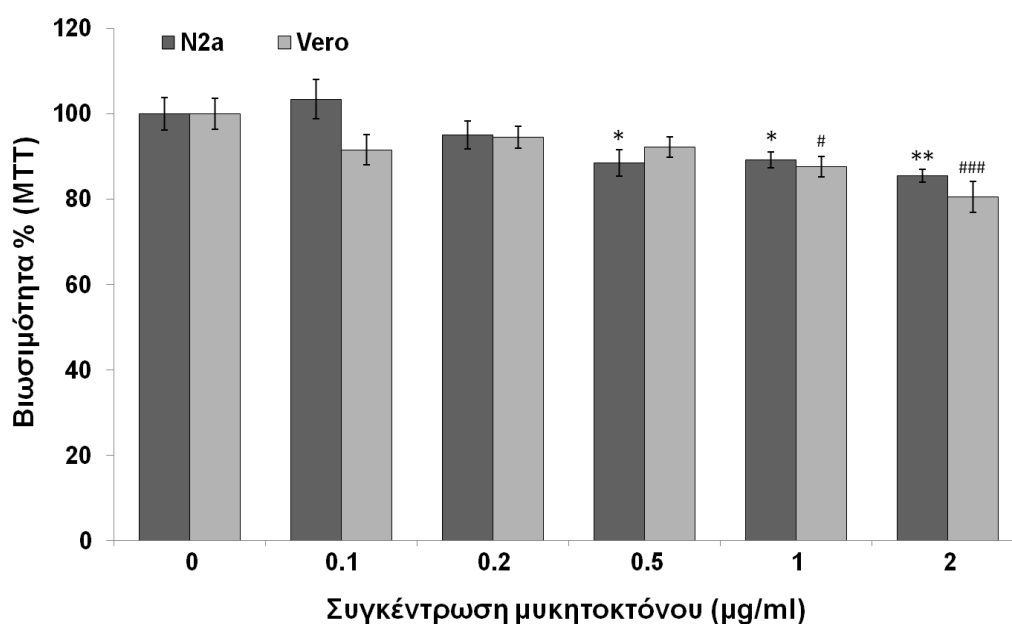
4.1. Επίδραση του kresoxim-methyl κυτταρικές διεργασίες νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero

4.1.1. Επίδραση του kresoxim-methyl στην βιωσιμότητα κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h

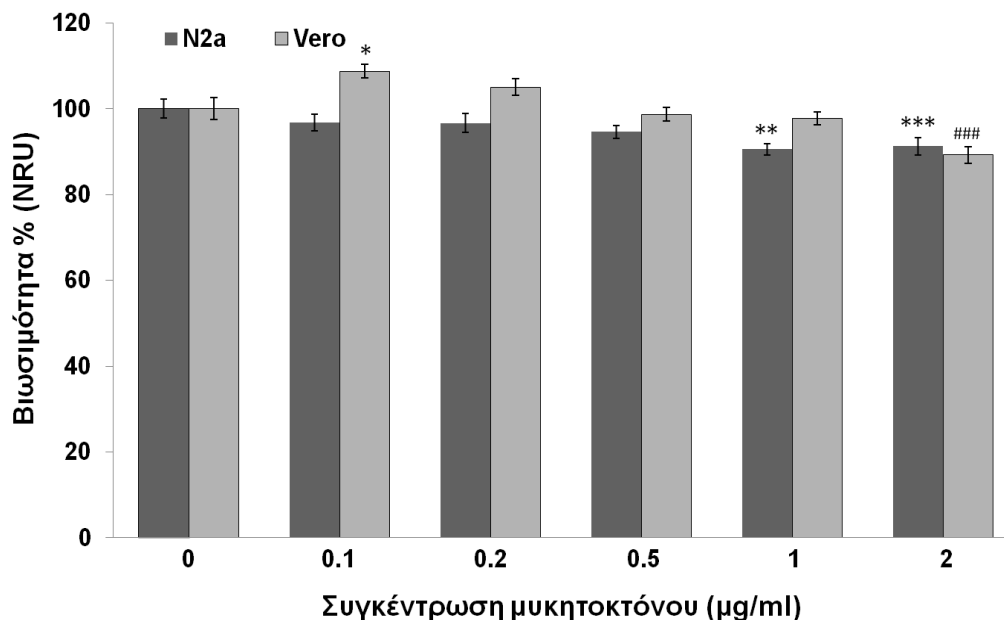
Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράστηκε ως το ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων και προσδιορίστηκε με την εκτίμηση ζωτικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως η μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων και η σταθερότητα της λυσοσωμικής μεμβράνης. Οι δύο κυτταρικές σειρές επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl για 24 ώρες και κατόπιν εκτιμήθηκε η βιωσιμότητα με τις μεθόδους MTT και NRU.

Η επώαση με το μυκητοκτόνο επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων N2a όσον αφορά την μιτοχονδριακή δραστηριότητα [One way Anova, $F(5,90)=5.153>4.921$ για $p=0.0005$]. Επιπρόσθετες μεταγενέστερες αναλύσεις (post-hoc) έδειξαν ότι κύτταρα που επωάστηκαν με μυκητοκτόνο 0.5 $\mu\text{g/ml}$ και 1 $\mu\text{g/ml}$ καθώς και τα κύτταρα που επωάστηκαν με 2 $\mu\text{g/ml}$ παρουσίασαν μειωμένη βιωσιμότητα της τάξης του 90% ($p\leq 0.05$) για τις δύο μικρότερες και του 85% ($p\leq 0.01$) για την μεγαλύτερη, σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Γράφημα 4.1). Στατιστικώς σημαντικά επηρεάστηκε και η βιωσιμότητα των κυττάρων Vero από την έκθεση τους στο μυκητοκτόνο [$F(5,90)=4.572>4.526$ για $p=0.001$], με την συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$ να μειώνει την βιωσιμότητα στο 87% ($p\leq 0.05$) και την συγκέντρωση 2 $\mu\text{g/ml}$ στο 80% ($p\leq 0.001$) σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Γράφημα 4.1).

Η στατιστική επεξεργασία της επίδρασης του μυκητοκτόνου στην βιωσιμότητα μέσω της σταθερότητας της λυσοσωμικής μεμβράνης έδειξε μια σημαντική επίδραση του kresoxim-methyl στα κύτταρα N2a [$F(5,90)=4.521>4.133$ για $p=0.002$]. Εκ των υστέρων στατιστική ανάλυση αποκάλυψε μειωμένη βιωσιμότητα σε επίπεδα 90% και για τις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις 1 $\mu\text{g/ml}$ ($p\leq 0.01$) και 2 $\mu\text{g/ml}$ ($p\leq 0.001$) σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Γράφημα 4.2). Η στατιστική ανάλυση των κυττάρων Vero για την αντίστοιχη παράμετρο βιωσιμότητας ανέδειξε επίσης σημαντική επίδραση του μυκητοκτόνου [$F(5,90)=13.811>7.223$ για $p=0.00001$]. Στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρείται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση 2 $\mu\text{g/ml}$, με την βιωσιμότητα στο 88% ($p\leq 0.001$) σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Γράφημα 4.2).



Γράφημα 4.1: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου *kresoxim-methyl* στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=16$, one-way ANOVA, Dunnett's test, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ έναντι μάρτυρα N2a και $\#p \leq 0.05$, $###p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα Vero).



Γράφημα 4.2: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου *kresoxim-methyl* στη σταθερότητα της λυσοσωμικής μεμβράνης κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=16$, one-way ANOVA, Dunnett's test, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ & $***p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα N2a και $###p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα Vero).

4.1.2. Επίδραση του kresoxim-methyl στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h

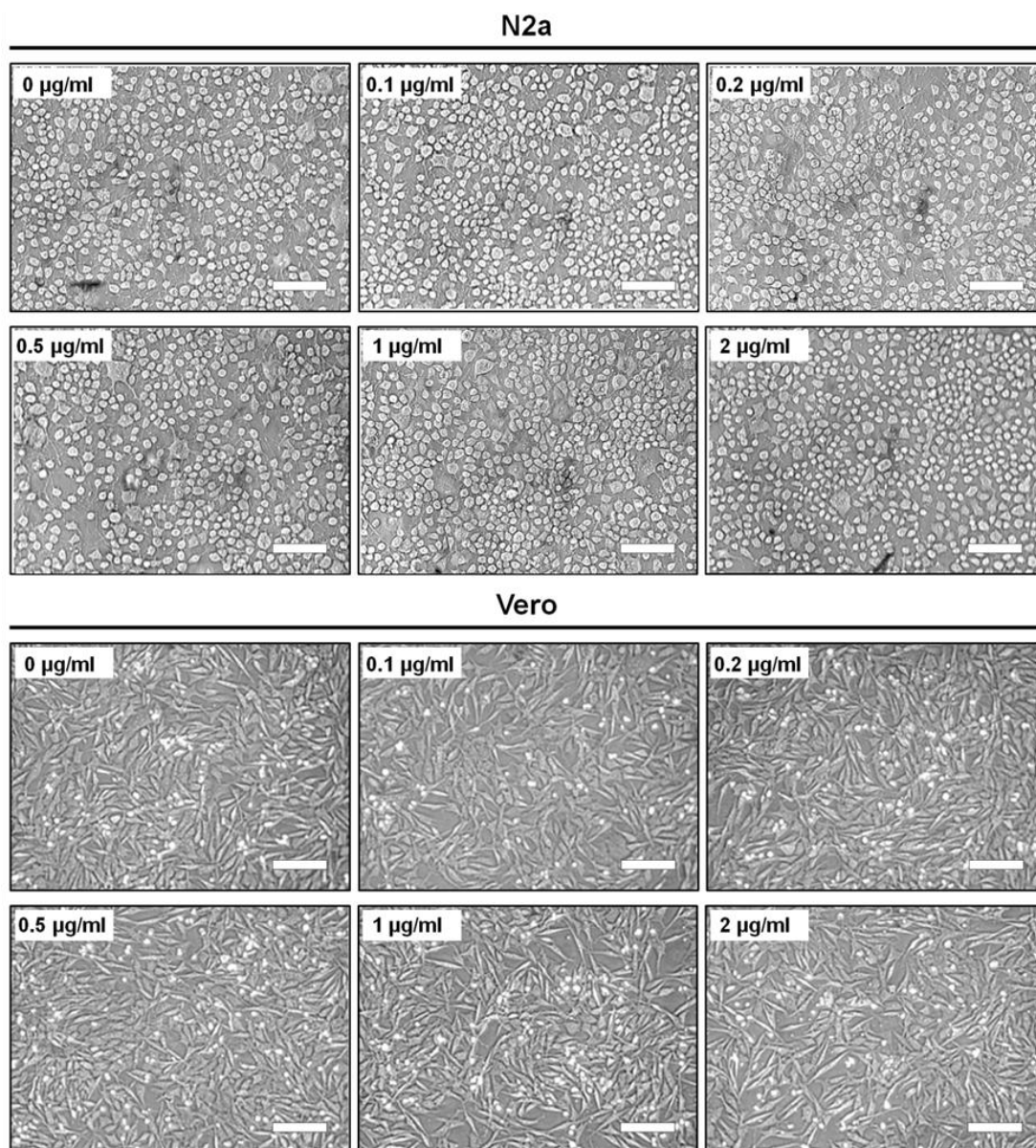
Με σκοπό την περαιτέρω μελέτη της επίδρασης των πέντε συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου στις κυτταρικές λειτουργίες, μελετήθηκαν οι δείκτες πολλαπλασιασμού των δύο ειδών κυττάρων κάτω από την επίδραση του kresoxim-methyl. Τα κύτταρα N2a διπλασίασαν τον αριθμό τους μετά από 24.32h στην περίπτωση του μάρτυρα (Πίνακας 4.1). Η στατιστική επεξεργασία για την περίπτωση των N2a, έδειξε πως η έκθεση το μυκητοκτόνο δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [$F(5,102)=1.804 < 2.30$ για $p=0.05$]. Τα κύτταρα Vero εμφάνισαν γρηγορότερο ρυθμό αύξησης, διπλασιάζοντας τον αριθμό τους σε 22.53h στην περίπτωση του μάρτυρα, ενώ το μυκητοκτόνο επηρέασε στατιστικά σημαντικά τον πολλαπλασιασμό [$F(5,102)=27.973 < 7.089$ για $p=0.00001$]. Μετέπειτα στατιστική ανάλυση αποκάλυψε αύξηση του χρόνου διπλασιασμού και επακόλουθη μείωση του ειδικού ρυθμού πολλαπλασιασμού για τις συγκεντρώσεις 1μg/ml ($p \leq 0.001$) και 2μg/ml ($p \leq 0.001$) (Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στον πολλαπλασιασμό κυττάρων N2a και Vero, (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=6$, one-way ANOVA, Dunnett's test, ^{###} $p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα Vero).

Συγκέντρωση μυκητοκτόνου (mg/ml)	χρόνος διπλασιασμού PDT (h)		ειδικός ρυθμός πολλαπλασιασμού μ (h^{-1})	
	N2a	Vero	N2a	Vero
0	24.32	22.53	0.0145	0.0159
0.1	23.29	23.98	0.0153	0.0148
0.2	23.79	24.51	0.0149	0.0143
0.5	23.63	24.37	0.0151	0.0145
1	23.48	27.61 ^{###}	0.0152	0.0123 ^{###}
2	25.20	31.74 ^{###}	0.0139	0.0098 ^{###}

4.1.3. Επίδραση του kresoxim-methyl στα μορφολογικά χαρακτηριστικά κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero

Για την διερεύνηση των μηχανισμών, μέσω των οποίων οι επιλεγμένες συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου επηρεάζουν τις κυτταρικές λειτουργίες, οι δύο τύποι κυττάρων εξετάστηκαν και με τη χρήση ανάστροφης μικροσκοπίας για την καταγραφή επαγόμενων μορφολογικών αλλαγών, μετά από επώαση τους με το kresoxim-methyl.



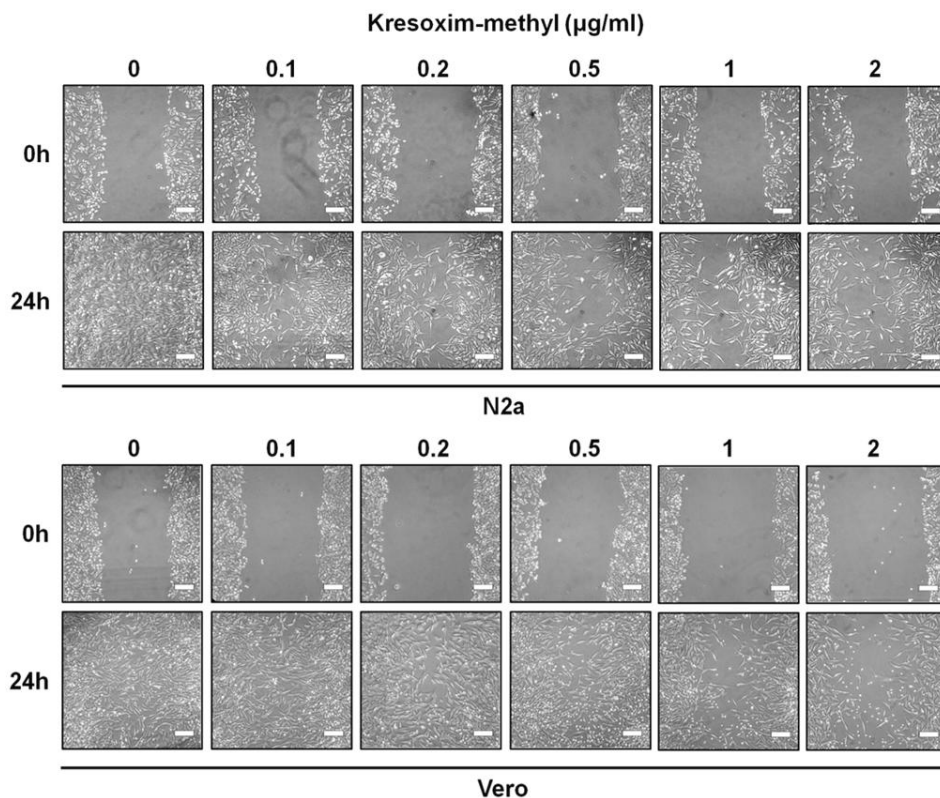
Εικόνα 4.1: Παρατήρηση σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης κυττάρων N2a και Vero, μετά από 24h έκθεση τους στο *kresoxim-methyl* (συγκέντρωση διαλύτη/φορέα DMSO: 0,05%), κλίμακα 100µm.

Η μορφολογία και των δύο κυτταρικών σειρών συντηρήθηκε για όλες τις συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου. Τα N2a διατήρησαν το χαρακτηριστικό σχήμα τους υπό συνθήκες ελλιπούς διαφοροποίησης, δηλαδή αμοιβαδοειδές κυτταρικό σώμα είναι από το οποίο εκφύονται περιορισμένοι άξονες (Εικόνα 4.1). Διαφορές ως προς την πυκνότητα των κυττάρων ανά τρυβλίο ή τον αριθμό των κυττάρων ανά τρυβλίο θα ήταν αδύκνιμο να ποσοτικοποιηθούν μέσω της μικροσκοπικής παρατήρησης. Από τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις, συνυπολογίζοντας και τις μετρήσεις βιωσιμότητας, η δράση του μυκητοκτόνου ήταν παρόμοια ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και παρόμοια με τον μάρτυρα. Τα Vero επίσης διατήρησαν το τυπικό σχήμα ινοβλάστη με δι- ή πολυ-πολικό (bipolar/multipolar) επίμηκες σώμα και

ελάχιστη κυτταροπλασματική κοκκίωση, εμφανίζοντας μια τάση να φαίνονται ελαφρώς πιο επιμήκη στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (1μg/ml και 2μg/ml).

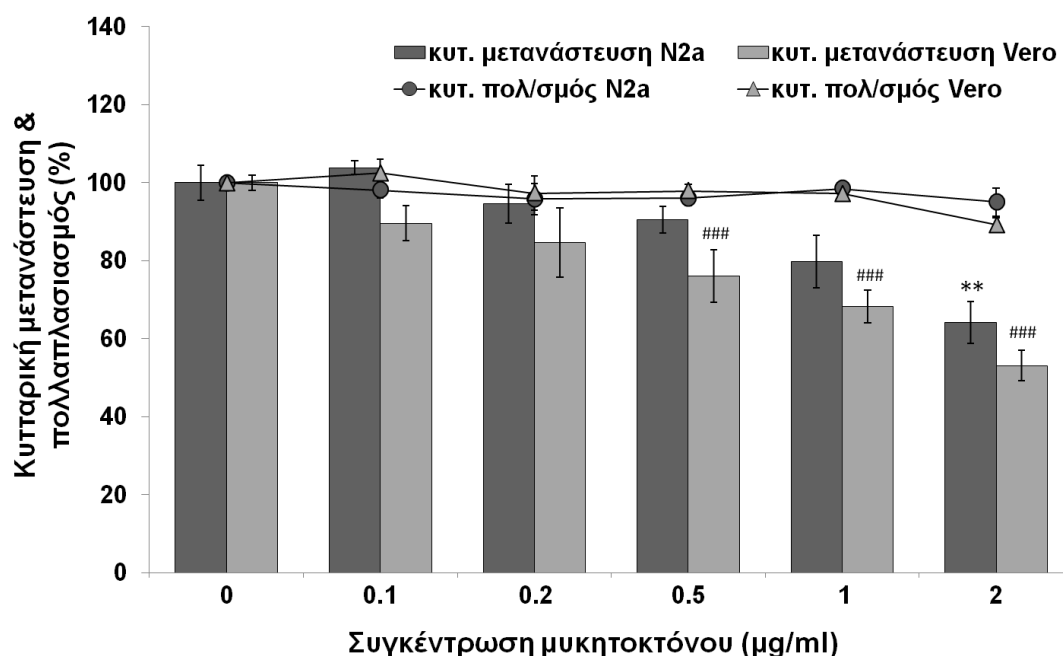
4.1.4. Επίδραση του kresoxim-methyl στην κυτταρική κινητικότητα νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero

Έχοντας μελετήσει τη δράση του kresoxim-methyl στην βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό των N2a και Vero μελετήθηκε και η δράση του σε άλλη μια λειτουργία των κυττάρων, την κυτταρική μετανάστευση, μέσω της βιοδοκιμής προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχής (wound healing assay). Η δοκιμή επούλωσης πληγής είναι μια σχετικά απλή και ταχεία μέθοδος, η οποία επιτρέπει την οπτική καταγραφή της κινητικότητας των κυττάρων σε διάφορες χρονικές περιόδους και για διάφορες συγκεντρώσεις, παρακολουθώντας την προσπάθεια των κυτταρικών πληθυσμών να επουλώσουν και να καλύψουν μια τεχνητή «αμυχή». Ωστόσο με το πείραμα αυτό δεν διευκρινίζεται κατά πόσο το αποτέλεσμα οφείλεται στην επίδραση της υπό μελέτη ουσίας στην κινητικότητα των κυττάρων ή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Για αυτό το λόγο κρίθηκε σκόπιμο να πραγματοποιηθεί παράλληλη μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού για το χρονικό διάστημα της βιοδοκιμής και τα αποτελέσματα τους παρουσιάζονται ταυτόχρονα στο Γράφημα 4.3.



Εικόνα 4.2: Επίδραση του kresoxim-methyl στην κυτταρική μετανάστευση μετά από έκθεση 24h σε N2a και Vero, μέσω βιοδοκιμής προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχής (Wound healing assay). Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική από πέντε ανεξάρτητα πειράματα, κλίμακα 100μm.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.2, τόσο στα N2a όσο και στα Vero η συλλογική κυτταρική μετανάστευση αναστέλλεται παρουσία μυκητοκτόνου, χωρίς να επηρεάζεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (Γράφημα 4.3). Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω κατάλληλου λογισμικού (Image J) αναδεικνύει στατιστικά σημαντική επίδραση του kresoxim methyl, τόσο για τα N2a [$F(5,24)=5.597>3.895$ για $p=0.01$], όσο και για τα Vero [$F(5,24)=20.495>11.439$ για $p=0.00001$]. Εκ των υστέρων στατιστική ανάλυση ανέδειξε μείωση στην κινητικότητα των N2a, η οποία ανέρχεται σε 64% ($p\leq 0.01$) για τα 2 $\mu\text{g/ml}$ (Γράφημα 4.3). Στην περίπτωση των Vero, η μείωση της κινητικότητας παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις των 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 1 $\mu\text{g/ml}$ και 2 $\mu\text{g/ml}$ και κυμάνθηκε στα 76%, 68% και 53% ($p\leq 0.001$), αντίστοιχα (Γράφημα 4.3).

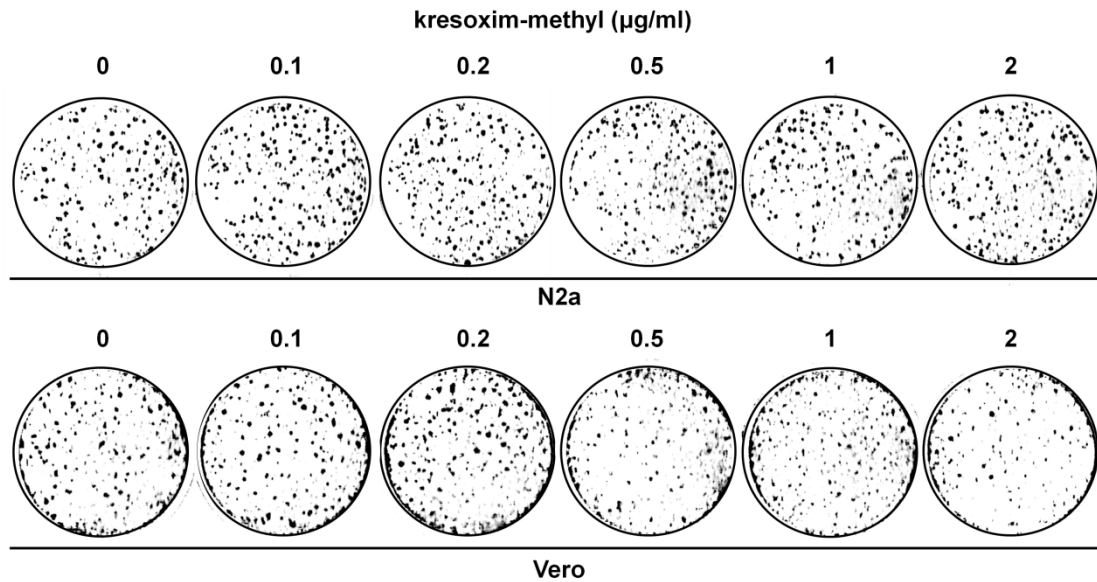


Γράφημα 4.3: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στη κινητικότητα κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=6$, one-way ANOVA, Dunnett's test, ** $p\leq 0.01$, *** $p\leq 0.001$ έναντι μάρτυρα N2a και ## $p\leq 0.01$ έναντι μάρτυρα Vero).

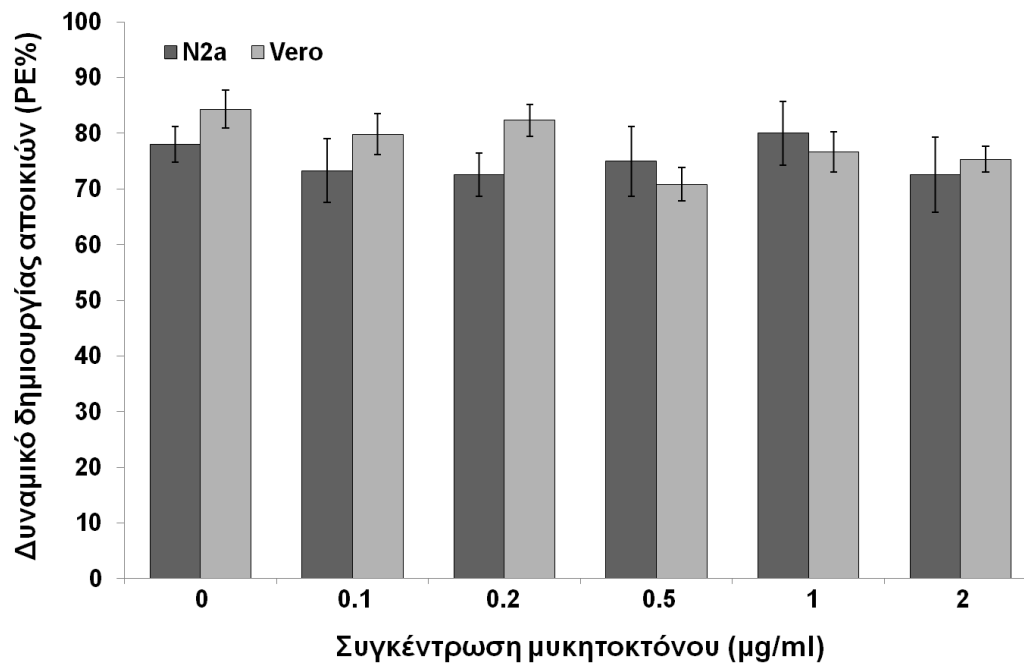
4.1.5. Μελέτη της αναπαραγωγικής ακεραιότητας μέσω ικανότητας δημιουργίας αποικιών

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του kresoxim-methyl στην ικανότητα των δύο κυτταρικών σειρών για αναπαραγωγή μέσω της δημιουργίας κλώνων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκτίμησης κλωνογονικότητας μέσω του δυναμικού δημιουργίας αποικιών (clonogenic assay). Τα κύτταρα μετά την 24h έκθεσή τους στο μυκητοκτόνο, καλλιεργήθηκαν σε χαμηλή σπορά και για περίοδο 7 ημερών υπό φυσιολογικές συνθήκες, ώστε να γίνει εκτίμηση του ποσοστού των μοναδιαίων

κυττάρων που μπορούν να δημιουργούν αποικίες. Στην Εικόνα 4.3 παρουσιάζονται χαρακτηριστικές ψηφιοποιημένες φωτογραφίες τρυβλίων για κάθε κυτταρική σειρά και συγκέντρωση, ενώ στο *Γράφημα 4.4* παρουσιάζονται οι μέσες αποδόσεις (plating efficiencies, PE) των τρυβλίων για κάθε χειρισμό.



Εικόνα 4.3: Επίδραση 24h έκθεσης kresoxim-methyl στην ικανότητα δημιουργίας αποικιών κυττάρων N2a και Vero, μέσω βιοδοκιμής κλωνογονικότητας (clonogenic assay, 7 ημερών). Αντιπροσωπευτικές εικόνες τρυβλίων μετά από ψηφιοποίηση και αφαίρεση θορύβου (ImageJ).



Γράφημα 4.4: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στη ικανότητα δημιουργίας αποικιών (clonogenic assay) κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % μέσω των αποδόσεων τρυβλίων (plating efficiencies, PE).

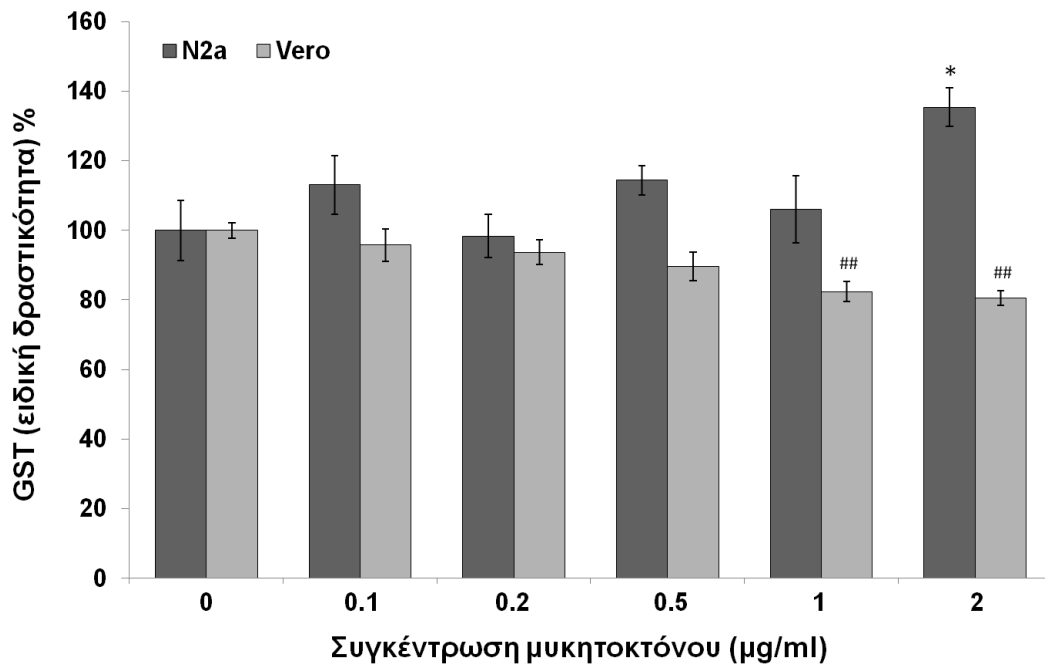
Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω κατάλληλου λογισμικού (Image J) δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση του kresoxim methyl στις μέσες αποδόσεις τρυβλίων PE για τα N2a [$F(5,12)=0.330 < 3.105$ για $p=0.05$]. Επιπλέον, τα Vero εμφάνισαν μια ελαφρά πτωτική τάση στις 3 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις χωρίς ωστόσο η επίδραση να είναι στατιστικά σημαντική [$F(5,12)=2.372 < 3.105$ για $p=0.05$].

4.2. Βιοχημικά χαρακτηριστικά οξειδωτικού στρες κυττάρων N2a και Vero μετά από έκθεση τους στο kresoxim-methyl

4.2.1. Δραστηκότητες αποτοξινωτικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων κυττάρων N2a και Vero μετά από έκθεση τους στο kresoxim-methyl

4.2.1.1. Επίδραση του kresoxim-methyl στην ενζυμική δραστικότητα της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST) κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h

Τα νευρικά καρκινικά κύτταρα N2a και οι νεφρικοί ινοβλάστες κύτταρα Vero επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl για χρονικό διάστημα 24h και κατόπιν μετρήθηκε η ειδική δραστικότητα του ενζύμου μεταφοράς της γλουταθειόνης.



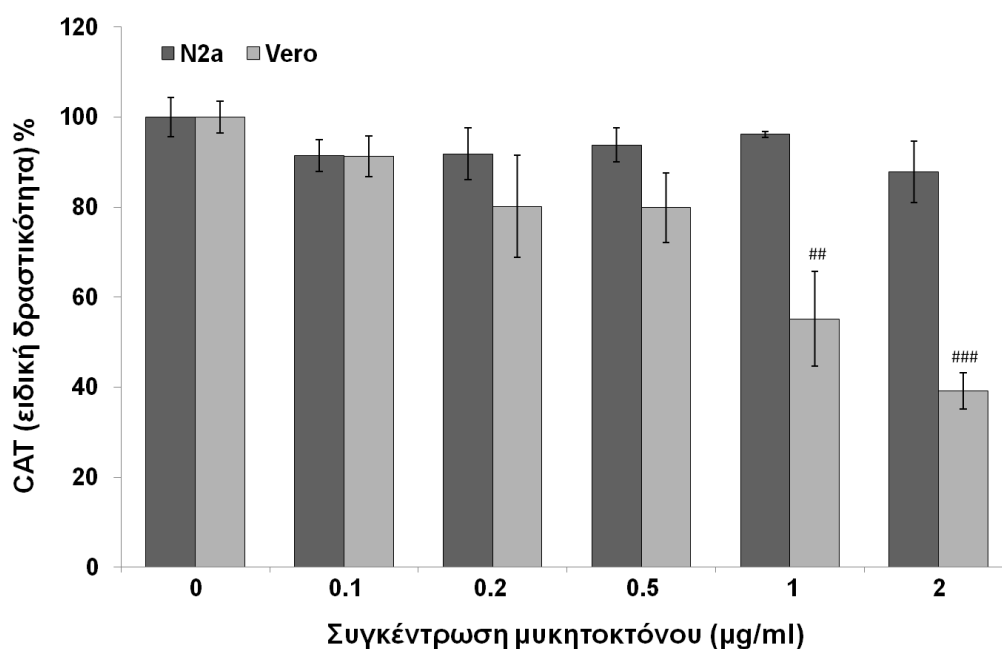
Γράφημα 4.5: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στην ειδική δραστικότητα GST κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=4$, one-way ANOVA, Dunnett's test, $*p \leq 0.05$ έναντι μάρτυρα N2a, $##p \leq 0.01$ έναντι μάρτυρα Vero).

Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το CDNB, ενώ τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως το ποσοστό ειδικής δραστικότητας GST σε σχέση με το μάρτυρα. Η επώαση με το μυκητοκτόνο επηρέασε στατιστικά σημαντικά την ειδική δραστικότητα της GST στα κύτταρα N2a [$F(5,18)=3.396 > 2.772$ για $p=0.05$], με τις επιπρόσθετες μεταγενέστερες αναλύσεις να δείχνουν στατιστικά σημαντική αύξηση

στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (2μg/ml) 135% ($p < 0.05$). Στατιστικά σημαντικά επηρεάστηκε και η ειδική δραστικότητα GST των κυττάρων Vero [$F(5,18)=5.130 > 4.956$ για $p=0.005$], με τις post-hoc αναλύσεις να δείχνουν μείωση της δραστικότητας για τις συγκεντρώσεις 1μg/ml και 2μg/ml στο 82.3% ($p \leq 0.01$) και 80.5% ($p \leq 0.01$) αντίστοιχα (Γράφημα 4.5).

4.2.1.2. Επίδραση του kresoxim-methyl στην ενζυμική δραστικότητα της καταλάσης (CAT) κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h

Τα κύτταρα νευροβλαστώματος N2a και οι νεφρικοί ινοβλάστες Vero επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl για χρονικό διάστημα 24h και κατόπιν μετρήθηκε η ειδική δραστικότητα του ενζύμου καταλάσης.



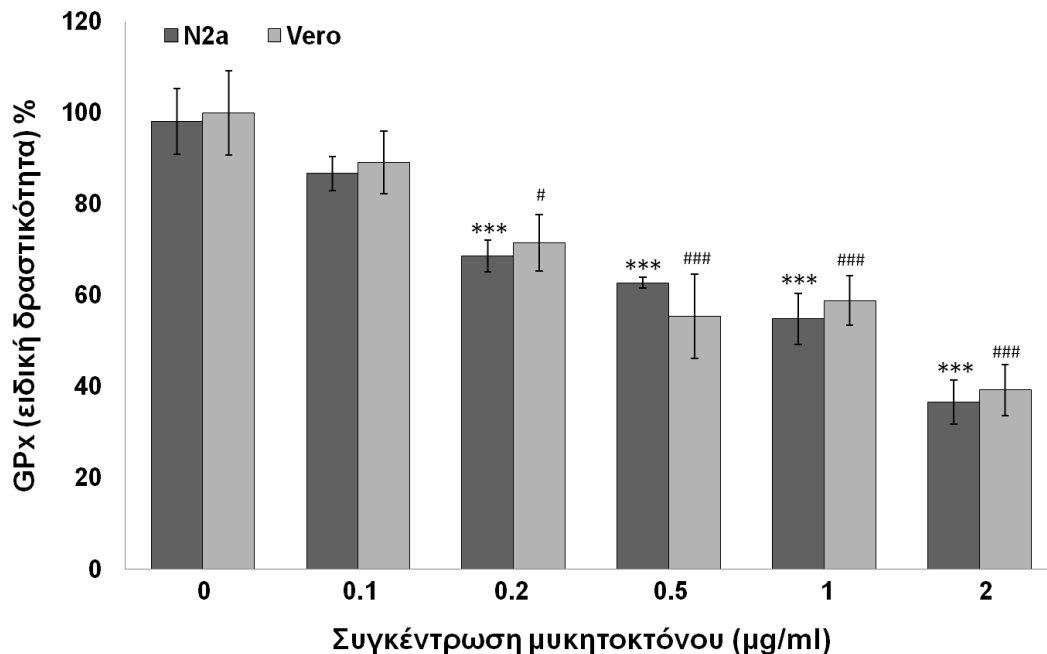
Γράφημα 4.6: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στην ειδική δραστικότητα CAT κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=3$, one-way ANOVA, Dunnett's test, ^{##} $p \leq 0.01$ και ^{###} $p \leq 0.01$ έναντι μάρτυρα Vero).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως το ποσοστό ειδικής δραστικότητας CAT σε σχέση με το μάρτυρα. Η έκθεση των κυττάρων στο μυκητοκτόνο δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα της CAT για την περίπτωση των N2a [$F(5,12)=0.847 < 3.105$ για $p=0.05$], ενώ η επίδραση ήταν στατιστικά σημαντική στην περίπτωση των Vero [$F(5,12)=9.011 > 8.892$ για $p=0.001$]. Μεταγενέστερες αναλύσεις έδειξαν σημαντική μείωση στη δραστικότητα της καταλάσης στα Vero και για τις δύο μεγαλύτερες

συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου σε επίπεδα 55% ($p \leq 0.01$) και 39% ($p \leq 0.001$) για τις 1μg/ml και 2μg/ml, αντίστοιχα (Γράφημα 4.6).

4.2.1.3. Επίδραση του kresoxim-methyl στην ενζυμική δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h

Τα κύτταρα N2a και Vero επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του kresoxim-methyl για χρονικό διάστημα 24h και κατόπιν μετρήθηκε η ειδική δραστικότητα του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου (CuOOH) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως το ποσοστό ειδικής δραστικότητας GPx σε σχέση με το μάρτυρα.



Γράφημα 4.7: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στην ειδική δραστικότητα GPx κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=3$, one-way ANOVA, Dunnett's test, *** $p \leq 0.05$ έναντι μάρτυρα N2a, # $p \leq 0.01$ και ### $p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα Vero).

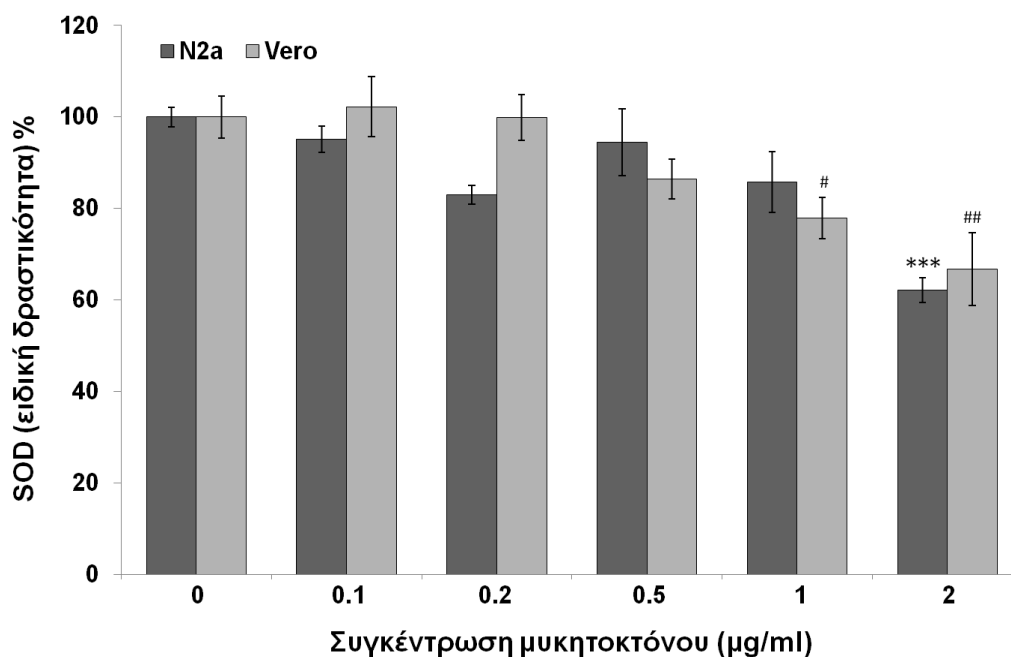
Η επώαση με το μυκητοκτόνο επηρέασε στατιστικά σημαντικά την ειδική δραστικότητα της GPx τόσο στα κύτταρα N2a [$F(5,24)=22.219 > 11.439$ για $p=0.0001$], όσο και στα Vero [$F(5,24)=9.654 > 9.297$ για $p=0.0005$]. Οι post-hoc αναλύσεις των N2a δείχνουν μείωση της ειδικής δραστικότητας για τις συγκεντρώσεις 0.2μg/ml, 0.5μg/ml, 1μg/ml και 2μg/ml στα 68.60%, 61.71%, 54.89% και 37.04% ($p \leq 0.001$) αντίστοιχα, ενώ η ειδική δραστικότητα των Vero μειώθηκε στο 71.50% ($p \leq 0.05$),

55.33% ($p \leq 0.001$), 58.80% ($p \leq 0.001$), και 39.29% ($p \leq 0.001$) για τις συγκεντρώσεις 0.2μg/ml, 0.5μg/ml, 1μg/ml και 2μg/ml, αντίστοιχα (Γράφημα 4.7).

4.2.1.4. Επίδραση του kresoxim-methyl στην ενζυμική δραστικότητα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h

Τα κύτταρα N2a και Vero επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του kresoxim-methyl για χρονικό διάστημα 24h και κατόπιν μετρήθηκε η ειδική δραστικότητα του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως το ποσοστό ειδικής δραστικότητας SOD σε σχέση με το μάρτυρα.

Η επώαση με το μυκητοκτόνο επηρέασε στατιστικά σημαντικά την ειδική δραστικότητα της SOD και στις δύο κυτταρικές σειρές ([N2a: $F(5,24)=9.193 > 8.457$ για $p=0.0001$] και [Vero: $F(5,24)=6.672 > 5.976$ για $p=0.001$]). Στα κύτταρα N2a, οι post-hoc αναλύσεις δείχνουν μείωση της δραστικότητας για την συγκέντρωση 2μg/ml στο 68.2% ($p \leq 0.001$), ενώ για τα Vero η δραστικότητα μειώθηκε σε 77.85% ($p \leq 0.05$) και 66.74% ($p \leq 0.01$) για τις συγκεντρώσεις 1μg/ml και 2μg/ml (Γράφημα 4.8).

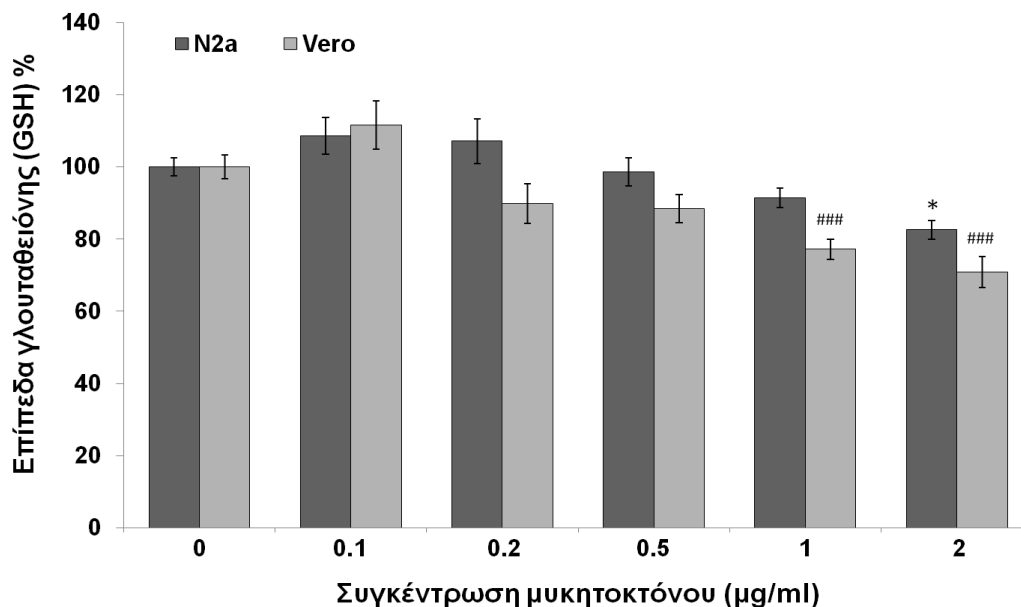


Γράφημα 4.8: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στην ειδική δραστικότητα SOD κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=5$, one-way ANOVA, Dunnett's test, $***p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα N2a, $^{\#}p \leq 0.05$ και $^{##}p \leq 0.01$ έναντι μάρτυρα Vero).

4.2.2. Μη ενζυμικοί δείκτες οξειδωτικού στρες κυττάρων N2a και Vero μετά από έκθεση τους στο kresoxim-methyl

4.2.2.1. Επίδραση του kresoxim-methyl στα επίπεδα ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης (GSH) κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h

Τα επίπεδα ενδοκυττάριας GSH προσδιορίστηκαν φθορισμομετρικά, με τη χρήση του ιχνηθέτη mBCl. Η ένταση του φθορισμού μετατράπηκε και παρουσιάζεται ως εκατοστιαία ποσοστά ως προς τον μάρτυρα. Τα επίπεδα GSH επηρεάστηκαν στατιστικά σημαντικά από το μυκητοκτόνο και τις δύο κυτταρικές σειρές (Γράφημα 4.8). Ειδικότερα, στα κύτταρα N2a [$F(5,54)=5.854 > 5.291$ για $p=0.0005$] παρουσιάζεται μια μείωση της GSH στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του kresoxim-methyl, με στατιστικά σημαντική διαφορά στα 2μg/ml, με ποσοστό 82.5% ($p \leq 0.05$) σε σχέση με τον μάρτυρα. Επιπλέον, οι μικρότερες συγκεντρώσεις παρουσιάζουν μια μικρή τάση ανόδου των επιπέδων GSH, χωρίς ωστόσο οι διαφορές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές. Όσον αφορά τα κύτταρα Vero [$F(5,54)=10.349 > 8.047$ για $p=0.00001$], τα επίπεδα GSH έδειξαν μειώσεις από την συγκέντρωση 0.2μg/ml και πάνω. Στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, τα ποσοστά ενδοκυττάριας γλουταθειόνης πέφτουν στο 77.2% ($p \leq 0.001$) και 70.9% ($p \leq 0.001$) για 1μg/ml και 2μg/ml αντίστοιχα (Γράφημα 4.9).

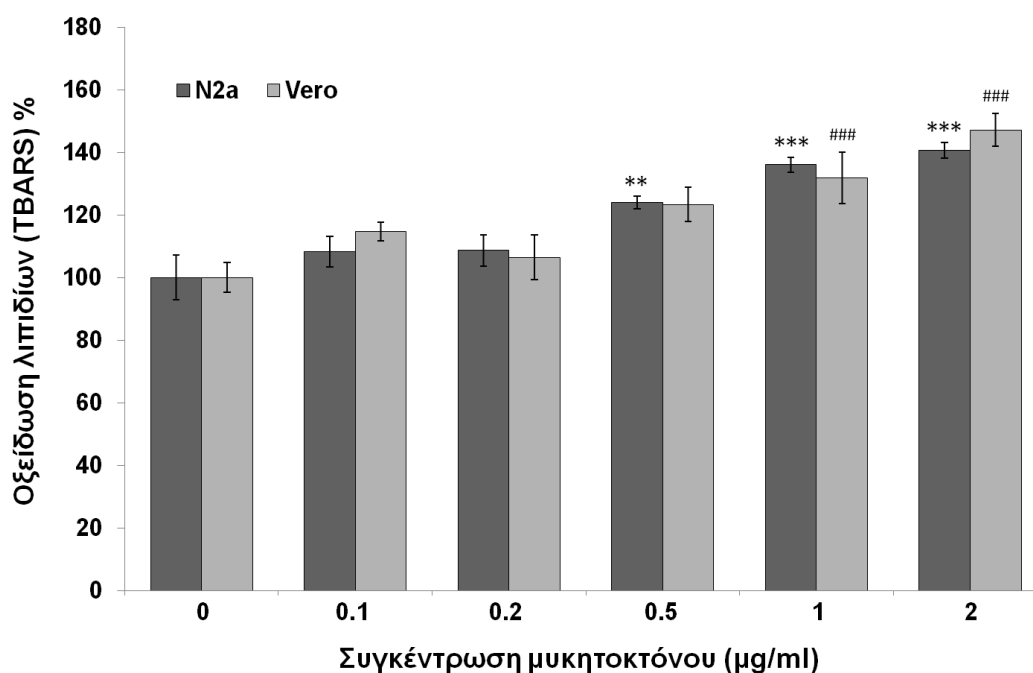


Γράφημα 4.9: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στα επίπεδα ενδοκυττάριας γλουταθειόνης κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=10$, one-way ANOVA, Dunnett's test, * $p \leq 0.5$ έναντι μάρτυρα N2a και ### $p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα Vero).

4.2.2.2. Επίδραση του kresoxim-methyl στα επίπεδα οξειδωσης λιπιδίων κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h

Τα επίπεδα οξειδωσης λιπιδίων εκτιμήθηκαν μέσω της δοκιμής θειοβαρβιτουρικού οξέως (TBARS) με την έμμεση μέτρηση της μηνολικής διαλδεύδης (MDA), μετά από 24h επώαση των κυττάρων με το μυκητοκτόνο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως % ποσοστά σε σχέση με το μάρτυρα.

Η έκθεση των κυττάρων στο kresoxim-methyl επηρέασε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα οξειδωμένων λιπιδίων και στις δύο κυτταρικές σειρές. Τα κύτταρα νευροβλαστώματος N2a [$F(5,12)=14.156 > 12.563$ για $p=0.0002$] παρουσίασαν μια αυξητική τάση με στατιστικά σημαντική αύξηση για τις συγκεντρώσεις 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ και 2 $\mu\text{g/ml}$ στα 124% ($p \leq 0.01$), 136% ($p \leq 0.001$) και 140% ($p \leq 0.001$), αντίστοιχα (Γράφημα 4.10). Ανοδική τάση στα επίπεδα οξειδωσης λιπιδίων εμφάνισαν και οι ινοβλάστες Vero [$F(5,12)=8.775 > 7.586$ για $p=0.002$], με στατιστικά σημαντικές διαφορές στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις 132% και 147% για 1 $\mu\text{g/ml}$ και 2 $\mu\text{g/ml}$ ($p \leq 0.001$), αντίστοιχα.

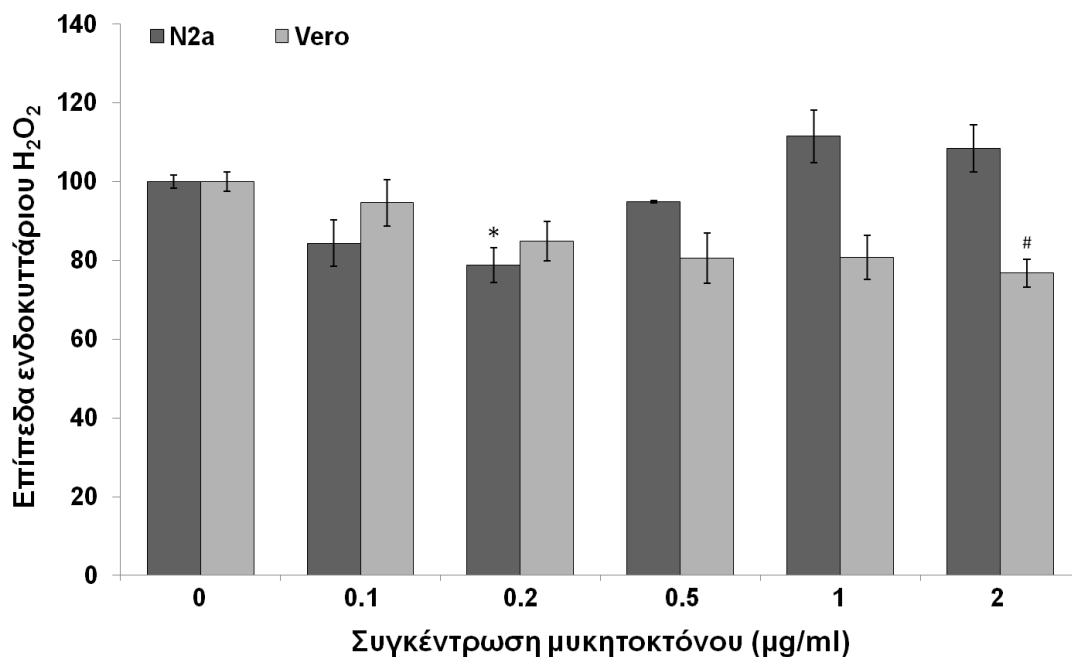


Γράφημα 4.10: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στα επίπεδα οξειδωσης λιπιδίων (TBARS) κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=3$, one-way ANOVA, Dunnett's test, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα N2a και ### $p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα Vero).

4.2.2.3. Επίδραση του kresoxim-methyl στα επίπεδα ROS νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μέσω έμμεσης μέτρησης φθορισμομετρικών ιχνηθετών

Η παρουσία ελευθέρων ριζών μελετήθηκε μέσω οξείδωσης που προκαλούν σε κατάλληλους φθορισμομετρικούς ιχνηθέτες (H₂DCFDA, MitoSOXTM Red, Amplex[®] Red) και μέσω αυτών μετρήθηκαν τα επίπεδα ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού H₂O₂ καθώς και τα επίπεδα μιτοχονδριακού O²⁻ και για τις δύο κυτταρικές σειρές μετά από 24h επώαση με το μυκητοκτόνο.

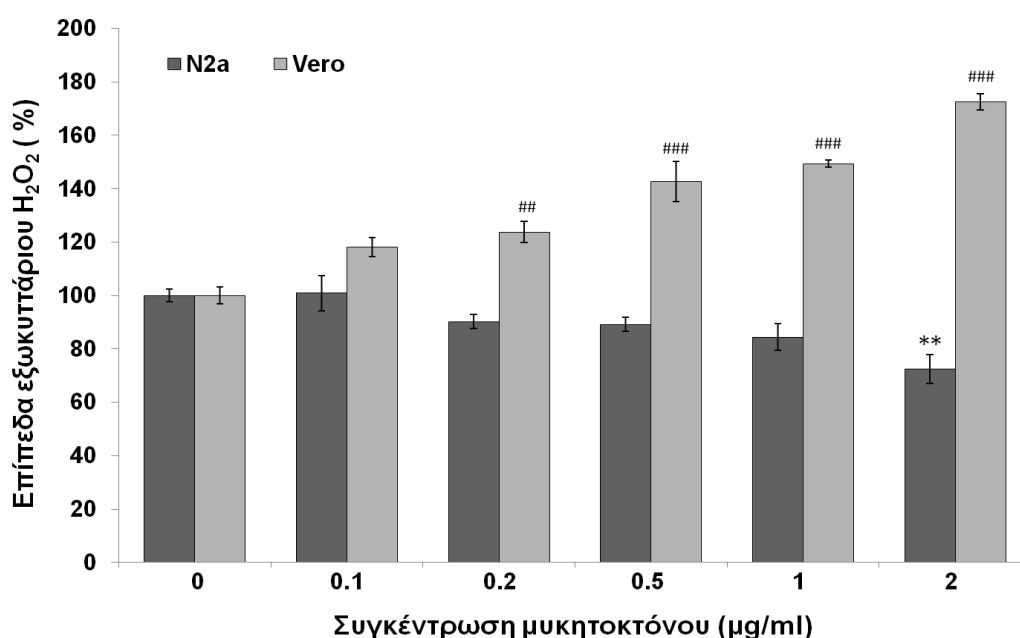
Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα H₂O₂ εκτιμήθηκαν φθορισμομετρικά, μέσω του DCFH-DA μετά από επώαση 24h και παρουσιάζονται ως % ποσοστά σε σχέση με το μάρτυρα (Γράφημα 4.11). Η έκθεση των κυτάρων στο kresoxim-methyl επηρέασε στατιστικώς σημαντικά το ενδοκυτταρικό H₂O₂ της σειράς Vero, καθώς παρατηρείται μείωση των επιπέδων του [F(5,18)=3.274>2.772 για p=0.05] καθώς αυξάνονται οι συγκεντρώσεις του kresoxim-methyl. Μεταγενέστερες αναλύσεις έδειξαν πτώση των επιπέδων H₂O₂, για την μεγαλύτερη συγκέντρωση των 2μg/ml στο 76.7% (p≤0.05).



Γράφημα 4.11: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στα επίπεδα ενδοκυτταρικού H₂O₂ κυτάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=4, one-way ANOVA, Dunnett's test, *p≤0.05 έναντι μάρτυρα N2a και #p≤0.05 έναντι μάρτυρα Vero).

Τα επίπεδα H₂O₂ στο μέσο καλλιέργειας των κυτάρων (εξωκυτταρικό H₂O₂), εκτιμήθηκαν φθορισμομετρικά μέσω της μεθόδου Amplex[®] Red μετά από επώαση 24h και παρουσιάζονται ως % ποσοστά σε σχέση με τον μάρτυρα (Γράφημα 4.12). Η

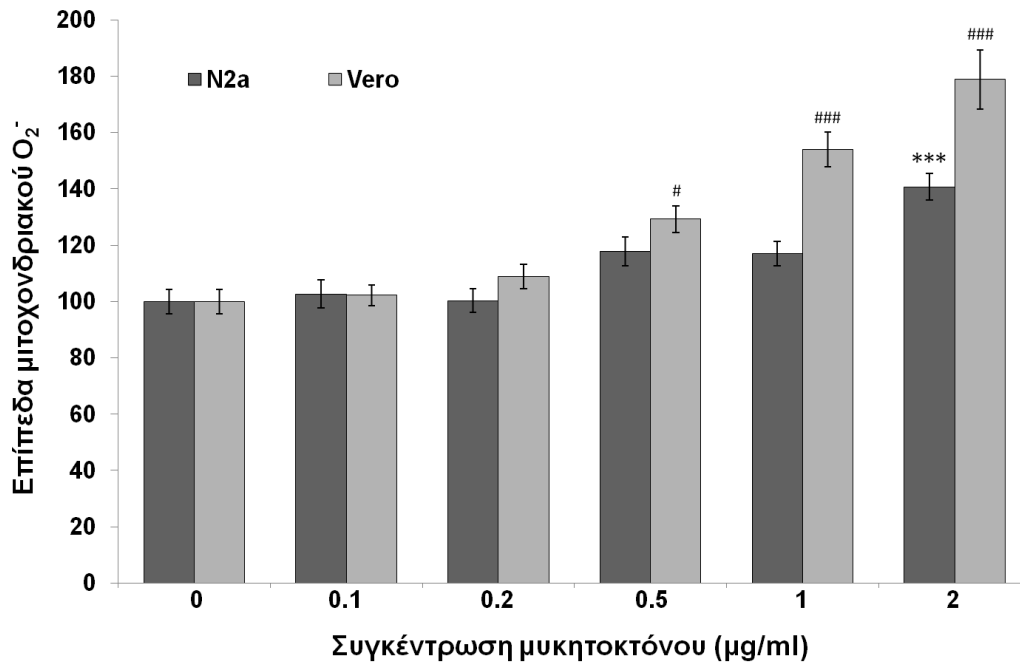
έκθεση των κυττάρων στο kresoxim-methyl επηρέασε στατιστικώς σημαντικά το εκκρινόμενο H_2O_2 και για τους δύο τύπους κυττάρων. Στα νευρικά κύτταρα N2a [$F(5,18)=5.717>4.956$ για $p=0.005$], το εξωκυτταρικό H_2O_2 μειώνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του μυκητοκτόνου με την συγκέντρωση $2\mu\text{g/ml}$ να προκαλεί στατιστικά σημαντική πτώση σε επίπεδο 72% ($p\leq 0.005$) σε σχέση με το μάρτυρα. Στα νεφρικά κύτταρα Vero, η τάση του εκκρινόμενου H_2O_2 αλλάζει, καθώς παρατηρείται αξιόλογη και στατιστικά σημαντική αύξηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου [$F(5,18)=37.515>14.267$ για $p=0.00001$] καθώς αυξάνονται οι συγκεντρώσεις του kresoxim-methyl. Επιπρόσθετες μεταγενέστερες αναλύσεις κατέδειξαν αύξηση των επιπέδων H_2O_2 , με ποσοστά 123% ($p\leq 0.01$), 142% ($p\leq 0.001$), 149% ($p\leq 0.001$) και 172% ($p\leq 0.001$) για τις συγκεντρώσεις $0.2\mu\text{g/ml}$, $0.5\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$ και $2\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα.



Γράφημα 4.12: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στα επίπεδα εξωκυτταρικού H_2O_2 κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=4$, one-way ANOVA, Dunnett's test, ** $p\leq 0.01$ έναντι μάρτυρα N2a και ### $p\leq 0.001$, ### $p\leq 0.001$ έναντι μάρτυρα Vero).

Τέλος, τα επίπεδα μιτοχονδριακού O_2^- εκτιμήθηκαν φθορισμομετρικά, μέσω του ιχνηθέτη MitoSOXTM Red μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν βάση μιτοχονδριακής μάζας χρησιμοποιώντας τον φθορισμομετρικό ιχνηθέτη MitoTracker Green[®] FM και παρουσιάζονται ως % ποσοστά σε σχέση με το μάρτυρα. Η έκθεση των κυττάρων στο kresoxim-methyl επηρέασε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα του μιτοχονδριακού O_2^- και στις δύο κυτταρικές σειρές. Τα κύτταρα νευροβλαστώματος N2a [$F(5,18)=11.539>10.073$ για

$p=0.0001$] παρουσίασαν μια ελαφρώς ανοδική τάση με στατιστικά σημαντική αύξηση στο 140% ($p\leq 0.001$) για την μεγαλύτερη συγκέντρωση 2 $\mu\text{g/ml}$. Παρόμοια ανοδική τάση εμφάνισαν και οι ινοβλάστες Vero [$F(5,18)=27.352>14.267$ για $p=0.00001$], με τα επίπεδα μιτοχονδριακού O_2^- να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές αυξήσεις για τις συγκεντρώσεις 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, και 2 $\mu\text{g/ml}$ σε ποσοστά 129% ($p\leq 0.05$), 153% ($p\leq 0.001$) και 178% ($p\leq 0.001$) αντίστοιχα (Γράφημα 4.13).

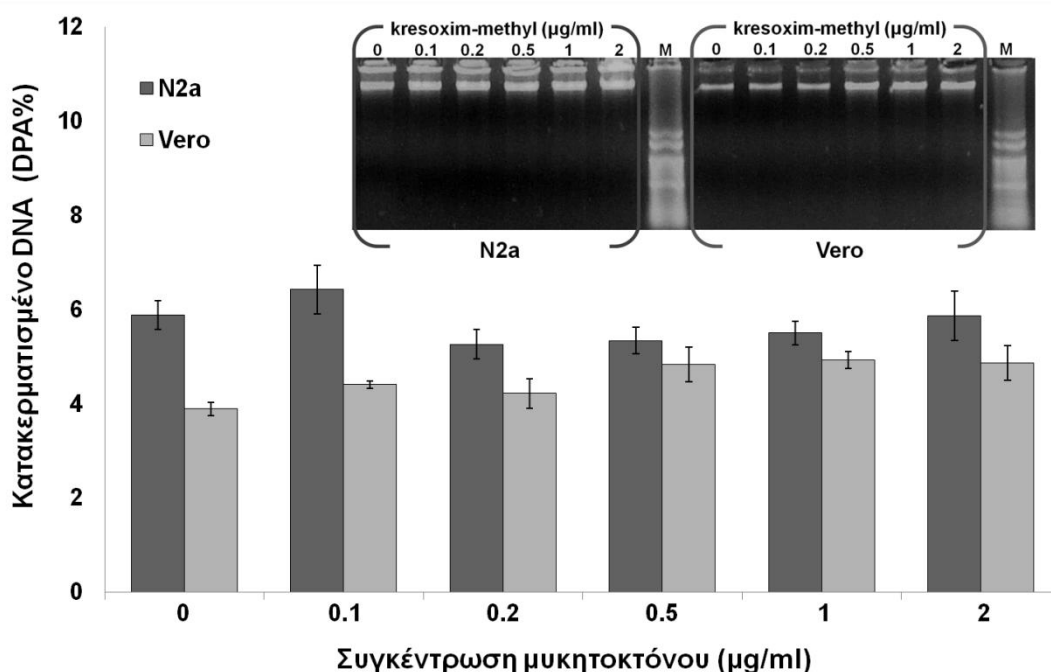


Γράφημα 4.13: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου *kresoxim-methyl* στα επίπεδα μιτοχονδριακού O_2^- (MitoSOXTM Red) κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=4$, one-way ANOVA, Dunnett's test, *** $p\leq 0.001$ έναντι μάρτυρα N2a και # $p\leq 0.05$, ### $p\leq 0.001$ έναντι μάρτυρα Vero).

4.3. Βιοχημικά χαρακτηριστικά απόπτωσης κυττάρων N2a και Vero μετά από έκθεση τους στο kresoxim-methyl

4.3.1. Επίδραση του kresoxim-methyl στα επίπεδα κατακερματισμού του DNA σε κύτταρα νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h

Το ποσοστό κατάτμησης του DNA αποτελεί δείκτη απόπτωσης και η μέτρηση του πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της διφαινυλαμίνης (DPA) καθώς και με ηλεκτροφόρηση DNA (DNA ladder). Η μέθοδος DPA επιτρέπει τον προσδιορισμό του λόγου θραύσης των διαλυτών τμημάτων του DNA, καθώς το κατακερματισμένο DNA απομονώνεται από την υπόλοιπη χρωματίνη με φυγοκέντρηση και ανιχνεύεται φωτομετρικά από το προϊόν αντίδρασης της διφαινυλαμίνης με τις ριβόζες, παρέχοντας μια ποσοτικοποιημένη ένδειξη του κατακερματισμού του γενετικού υλικού των κυττάρων. Στην δεύτερη τεχνική που εφαρμόστηκε, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση DNA των δύο κυτταρικών σειρών σε πήκτωμα αγαρόζης. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, το DNA των κυττάρων συχνά κατακερματίζεται εξαιτίας της δράσης ενδονουκλεασών σε τμήματα μεγέθους 200–480 βάσεων. Αυτά τα τμήματα μετά από ηλεκτροφόρηση δίνουν τις χαρακτηριστικές ζώνες (DNA ladders) κατακερματισμένου DNA και αποτελούν δείκτη απόπτωσης.

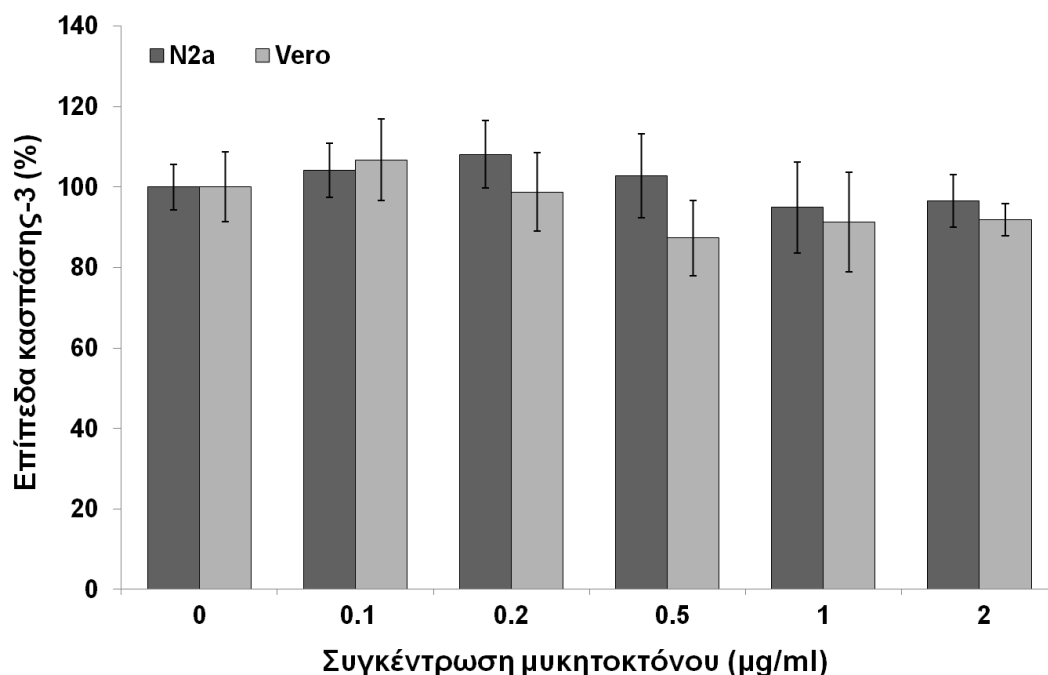


Γράφημα 4.14: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στα επίπεδα κατακερματισμένου DNA κυττάρων N2a και Vero, μέσω μεθόδου DPA, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό % κατακερματισμού (θραυσματοποιημένο/ολικό DNA). Ένθετο: ηλεκτροφόρηση (DNA ladder) σε πήκτη αγαρόζης DNA κυττάρων N2a και Vero.

Η έκθεση των κυττάρων στο μυκητοκτόνο δεν επηρέασε σημαντικά το ποσοστό κατάτμησης του DNA και των δύο κυτταρικών σειρών. Όπως παρατηρείται στο Γράφημα 4.14 τα ποσοστά κατακερματισμένου DNA για τα μη εκτεθειμένα κύτταρα κυμαίνονταν στο 5.87% για το νευροβλάστωμα N2a και στο 3.88% για τους ινοβλάστες Vero, ενώ μπορεί να παρατηρηθεί μια αυξητική τάση στα ποσοστά των Vero καθώς αυξάνονται οι συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου, χωρίς ωστόσο στατιστικά σημαντικές διαφορές, [Vero: $F(5,18)=0.439 < 2.772$ για $p=0.05$] και [N2a: $F(5,18)=0.968 < 2.772$ για $p=0.05$]. Επιπλέον, η ηλεκτροφόρηση DNA δεν κατέστησε ορατές θραύσεις (DNA ladders) στο γενετικό υλικό για καμία ομάδα κυττάρων ή συγκέντρωση μυκητοκτόνου (Γράφημα 4.14, ένθετο).

4.3.2. Επίδραση του kresoxim-methyl στα επίπεδα κασπάσης-3 κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h

Τα κύτταρα N2a και Vero επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του kresoxim-methyl για χρονικό διάστημα 24h και κατόπιν μετρήθηκαν τα επίπεδα του ενζύμου κασπάσης-3. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται (Γράφημα 4.15) ως το % ποσοστό σε σχέση με το μάρτυρα.

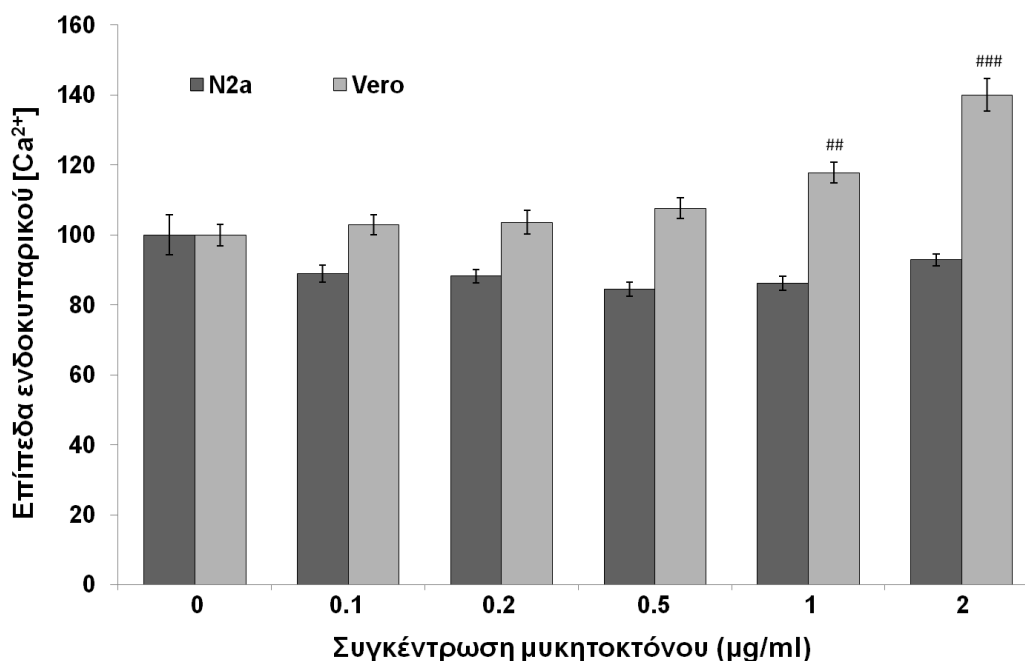


Γράφημα 4.15: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στα επίπεδα κασπάσης-3 κυττάρων N2a και Vero, μέσω μεθόδου DPA, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό % σε σχέση με το μάρτυρα.

Η έκθεση των κυττάρων στο μυκητοκτόνο δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα κασπάσης-3 και στις δύο κυτταρικές σειρές, [N2a: $F(5,18)=0.341 < 2.772$ για $p=0.05$] και [Vero: $F(5,18)=0.576 < 2.772$ για $p=0.05$].

4.3.3. Επίδραση του kresoxim-methyl στα επίπεδα ενδοκυτταρικού ασβεστίου $[Ca^{2+}]$ κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h

Η συγκέντρωση $[Ca^{2+}]$ αποτελεί σημαντικό δείκτη απόπτωσης και τα επίπεδα της εκτιμήθηκαν φθορισμομετρικά, μέσω του ιχνηθέτη Fluo-3 μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με βάση τις ολικές πρωτεΐνες και παρουσιάζονται ως % ποσοστά σε σχέση με το μάρτυρα. Η έκθεση των κυττάρων στο kresoxim-methyl δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα του $[Ca^{2+}]$ στα κύτταρα νευροβλαστώματος [$F(5,18)=1.786 < 2.772$ για $p=0.05$], ενώ η επίδρασή του στους ινοβλάστες Vero ήταν στατιστικά σημαντική [$F(5,18)=19.807 > 14.267$ για $p=0.00001$]. Οι post-hoc αναλύσεις για τα Vero έδειξαν στατιστικά σημαντικές αυξήσεις στο ενδοκυτταρικό ασβέστιο για τις συγκεντρώσεις 1μg/ml και 2μg/ml σε ποσοστά 118% ($p \leq 0.01$), 140% ($p \leq 0.001$) αντίστοιχα (Γράφημα 4.16).



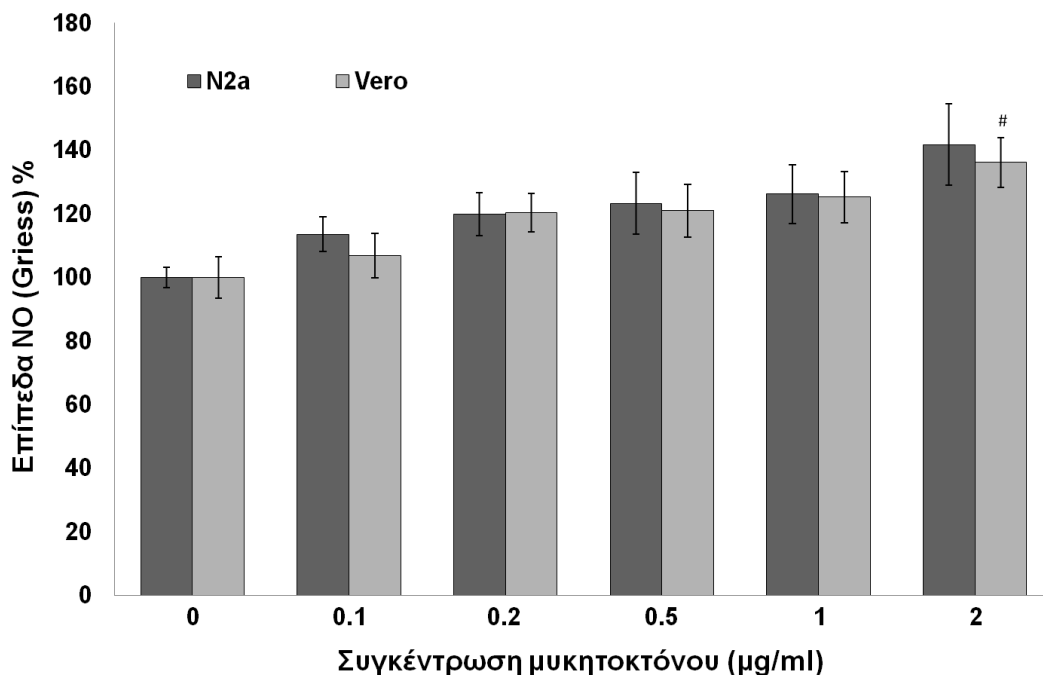
Γράφημα 4.16: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στα επίπεδα ενδοκυτταρικού ασβεστίου $[Ca^{2+}]$ κυττάρων N2a και Vero, μέσω μεθόδου DPA, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=4$, one-way ANOVA, Dunnett's test, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ έναντι μάρτυρα Vero).

4.3.4. Επίδραση του kresoxim-methyl στα επίπεδα νιτρωδών ιόντων στο μέσο καλλιέργειας κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h.

Τα επίπεδα νιτρωδών ιόντων μετρήθηκαν μέσω της δοκιμής Griess για την έμμεση εκτίμηση του NO, μετά από 24h επώαση των κυττάρων με το μυκητοκτόνο.

Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με βάση τις ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων και παρουσιάζονται ως % ποσοστά σε σχέση με το μάρτυρα.

Η έκθεση των κυττάρων στο kresoxim-methyl έδειξε μια αυξητική τάση και στους δύο τύπους κυττάρων. Ωστόσο, δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα νιτρωδών ιόντων στο μέσο καλλιέργειας στα κύτταρα νευροβλαστώματος N2a [$F(5,18)=2.639 > 2.772$ για $p=0.05$], ενώ στα κύτταρα Vero η επίδραση του ήταν στατιστικά σημαντική [$F(5,12)=3.121 > 2.772$ για $p=0.05$] με τις post-hoc αναλύσεις να δείχνουν αύξηση των επιπέδων στο 136% για την μεγαλύτερη συγκέντρωση μυκητοκτόνου 2μg/ml ($p \leq 0.05$), (Γράφημα 4.17).

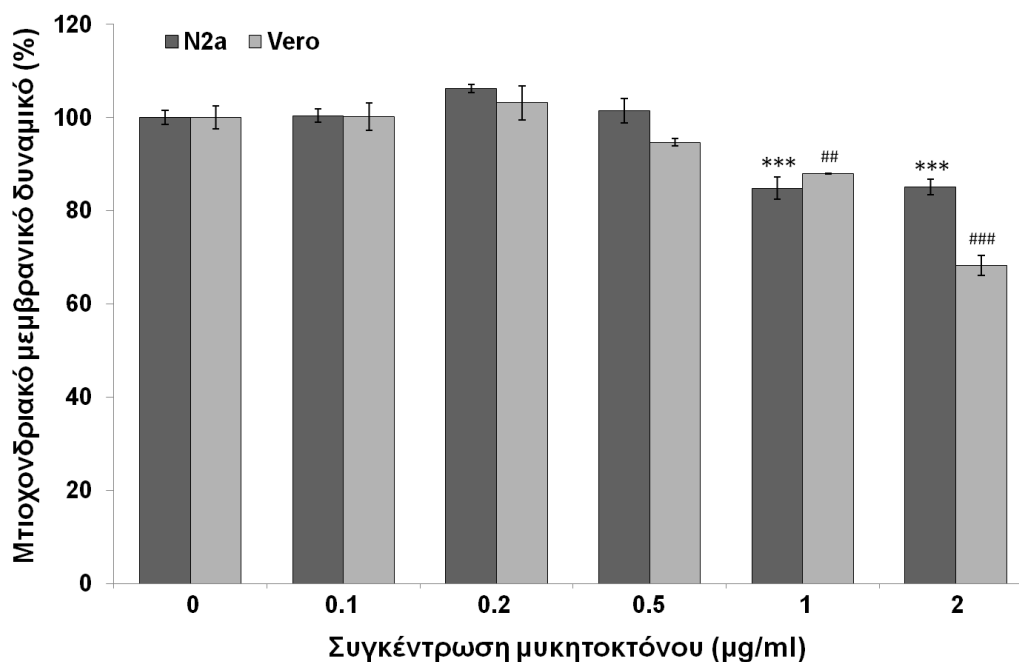


Γράφημα 4.17: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl στα επίπεδα νιτρωδών ιόντων (έμμεση εκτίμηση NO) στο μέσο καλλιέργειας κυττάρων N2a και Vero, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=4$, one-way ANOVA, Dunnett's test, $\#p \leq 0.05$ έναντι μάρτυρα Vero).

4.3.5. Επίδραση του kresoxim-methyl στο μιτοχονδριακό μεμβρανικό δυναμικό κυττάρων νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστών Vero μετά από επώαση 24h.

Το μεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων αποτελεί σημαντικό δείκτη απόπτωσης και τα επίπεδα του εκτιμήθηκαν φθορισμομετρικά, μέσω του ιχνηθέτη TMRE μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με βάση τη μιτοχονδριακή μάζα (MitoTracker[®] Green FM) και παρουσιάζονται ως % ποσοστά σε σχέση με το μάρτυρα. Η έκθεση των κυττάρων στο kresoxim-methyl επηρέασε στατιστικά σημαντικά το μεμβρανικό των μιτοχονδρίων στα κύτταρα

νευροβλαστώματος [$F(5,12)=44.055>22.638$ για $p=0.00001$], ενώ η επίδρασή του στους ινοβλάστες Vero ήταν εξίσου στατιστικά σημαντική [$F(5,12)=51.697>22.638$ για $p=0.00001$]. Οι post-hoc αναλύσεις για τα N2a έδειξαν στατιστικά σημαντικές μειώσεις σε επίπεδα 85% ($p\leq 0.001$) και για στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις 1μg/ml και 2μg/ml. Τα κύτταρα Vero εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές μειώσεις στις ίδιες συγκεντρώσεις με τα N2a (1μg/ml και 2μg/ml) σε ποσοστά 88% ($p\leq 0.01$) και 68% ($p\leq 0.001$), αντίστοιχα (Γράφημα 4.18).

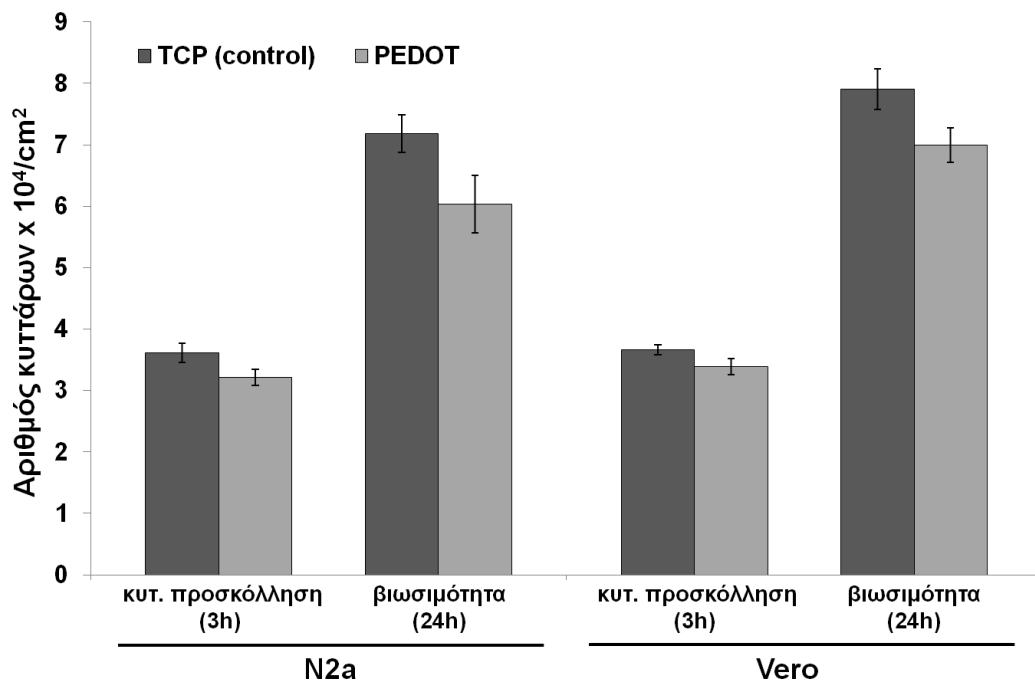


Γράφημα 4.18: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μικητοκτόνου *kresoxim-methyl* στα επίπεδα μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού κυττάρων N2a και Vero, μέσω ιχνηθέτη TMRE και κανονικοποίηση με MitoTracker® Green FM, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα διαλύτη/φορέα (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, $n=3$, one-way ANOVA, Dunnett's test, ## $p\leq 0.01$, ### $p\leq 0.001$ έναντι μάρτυρα Vero).

4.4. Κατασκευή πρότυπου κυτταρικού βιοαισθητήρα με χρήση ηλεκτροδίων PEDOT

4.4.1. Βιοσυμβατότητα PEDOT με τις κυτταρικές σειρές N2a και Vero μέσω μελέτης κυτταρικής προσκόλλησης και βιωσιμότητας

Η κυτταρική προσκόλληση, η οποία αποτελεί σημαντική παράμετρο της βιοσυμβατότητας των υλικών, εξετάστηκε και για τις δύο κυτταρικές σειρές μετά από 3h επώαση εναιωρήματος κυττάρων με το πολυμερές, υπό κανονικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας. Η επώαση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αποκομμένων ακρορύγχιων που χρησίμευσαν ως βοθρία κυτταροκαλλιέργειας και περιγράφεται πειραματικό μέρος. Μετά την επώαση και την πλύση της επιφάνειας του PEDOT με PBS, τα ηλεκτρόδια φωτογραφήθηκαν και τα προσκολλημένα κύτταρα μετρήθηκαν με την χρήση του λογισμικού Image J. Ως υλικό αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν συμβατικά πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας (TCP) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται Γράφημα 4.19.

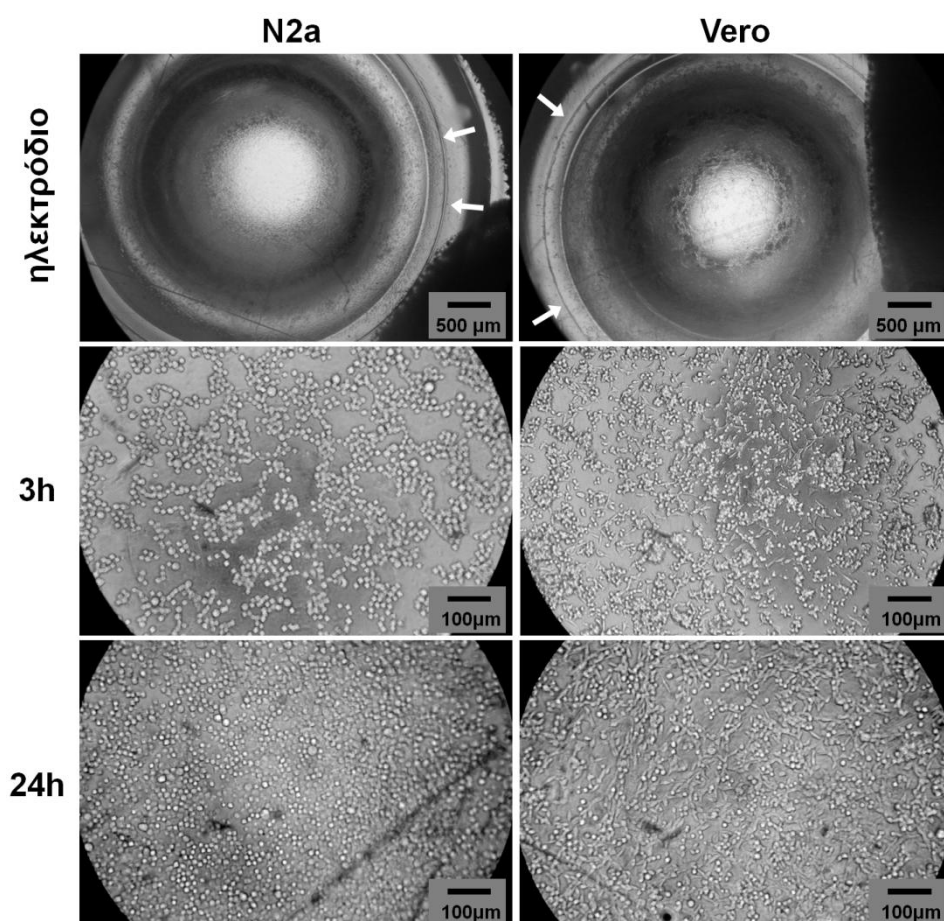


Γράφημα 4.19: Κυτταρική προσκόλληση και βιωσιμότητα N2a και Vero στο πολυμερές PEDOT μετά από 3h και 24h επώαση. Ο αρχικός αριθμός επίστρωσης ($T=0h$) είναι 4×10^4 κύτταρα ανά cm^2 επιφάνειας πολυμερούς και για τις δύο κυτταρικές σειρές. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν συμβατικά πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας (TCP).

Όπως παρατηρείται στο Γράφημα 4.17, η κυτταρική προσκόλληση στο υλικό PEDOT κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με τα συμβατικά πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας και για τις δύο κυτταρικές σειρές. Μετά από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, οι αριθμοί προσκολλημένων κυττάρων δεν παρουσιάζουν

στατιστικά σημαντικές διαφορές με τους αντίστοιχους μάρτυρες [3h (N2a, t-test: TCP vs PEDOT, $p=0.0941$) / 3h (Vero, t-test: TCP vs PEDOT, $p=0.1202$)]. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν αυξημένη ικανότητα κυτταρικής προσκόλλησης στο πολυμερές, αντίστοιχη με τα συμβατικά πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας, ενισχύοντας την ύπαρξη βιοσυμβατότητας με τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές.

Αφού διαπιστώθηκε η ικανότητα των κυττάρων να προσκολλούνται στο πολυμερές, ακολούθησε μελέτη βιωσιμότητας μετά από 24h επώαση των κυττάρων με το PEDOT (Γράφημα 4.19). Τα κύτταρα αύξησαν τον αριθμό τους μετά από 24h, υποδηλώνοντας έτσι πως είναι δυνατός και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός πάνω στο πολυμερές και ενισχύοντας ακόμα περισσότερο την βιοσυμβατότητά του με τα υπό μελέτη κύτταρα. Η στατιστική επεξεργασία δεν έδειξε σημαντικές διαφορές στον αριθμό κυττάρων μεταξύ πολυμέρους και συμβατικών πλακιδίων και για τις δύο κυτταρικές σειρές [24h (N2a, t-test: TCP vs PEDOT, $p=0.1104$) / 24h (Vero, t-test: TCP vs PEDOT, $p=0.1023$)].



Εικόνα 4.4: Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων N2a και Vero μετά από επίστρωσή τους στο πολυμερές PEDOT και 3h ή 24h επώαση. Τα βέλη υποδεικνύουν τα όρια του βοθρίου, το οποίο περιορίζει την εξάπλωση της κυτταρικής μονοστοιβάδας μόνο στο ηλεκτρόδιο μέτρησης από PEDOT.

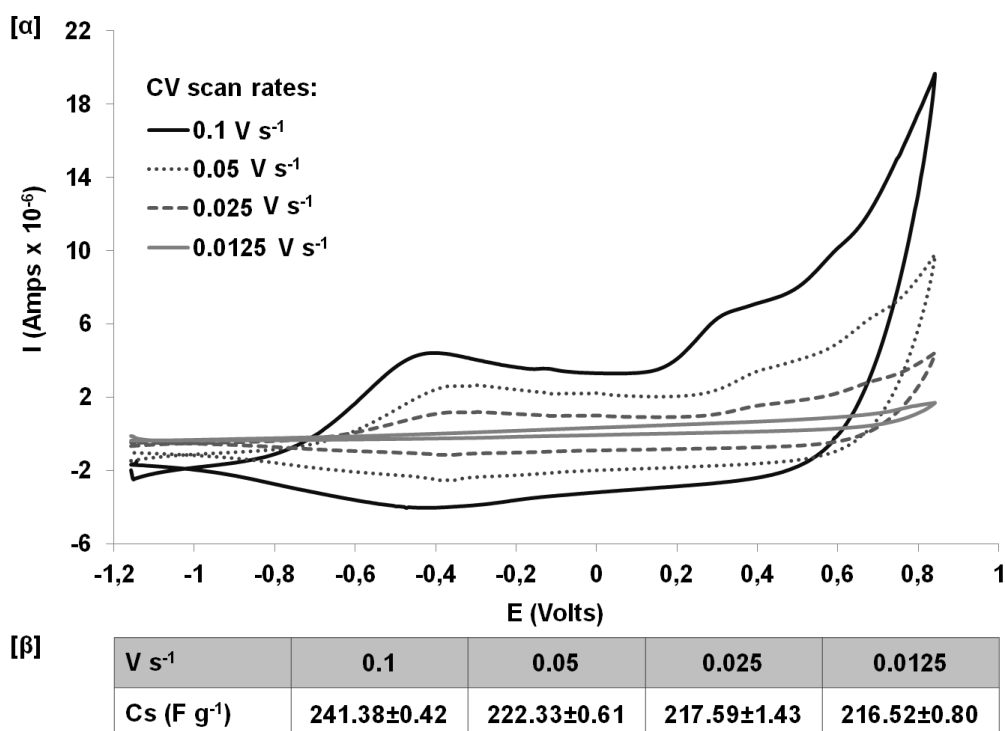
Η επίστρωση των κυττάρων έγινε μόνο στην κυκλική επιφάνεια του ηλεκτροδίου μέτρησης (PEDOT) και η χρήση του βοθρίου (Εικόνα 4.4, λευκά βέλη) δεν επέτρεψε την εξάπλωση των κυττάρων στην υπόλοιπη επιφάνεια (βοηθητικά ηλεκτρόδια). Οι μορφολογικές παρατηρήσεις για τις δύο χρονικές περιόδους και σειρές κυττάρων, έδειξαν πως οι ινοβλάστες Vero διατήρησαν πολύ καλύτερα τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά σε σχέση με τα κύτταρα νευροβλαστώματος N2a (Εικόνα 4.4). Παρόλο που και οι δύο κυτταρικές επέδειξαν ικανοποιητικά ποσοστά προσκόλλησης και βιωσιμότητας, τα κύτταρα N2a παρουσίασαν μια σφαιρική μορφολογία χωρίς καθόλου προεκβολές, ενώ τα Vero διατήρησαν το επίμηκες σχήμα ινοβλάστη που τα χαρακτηρίζει. Κατά την 24h επώαση με το πολυμερές, παρόλο που και οι δύο σειρές πολλαπλασιάστηκαν πάνω στο πολυμερές, τα N2a συνέχισαν να επιδεικνύουν μια σφαιρική μορφολογία χωρίς χαρακτηριστικά νευρικών κυττάρων, ενώ αντίθετα τα Vero ενίσχυσαν την χαρακτηριστική μορφή ινοβλάστη και δημιούργησαν προεκβολές που συνιστούν ισχυρή προσκόλληση στην υπό μελέτη επιφάνεια.

4.4.2. Επίδραση της προσκόλλησης κυττάρων N2a και Vero στην σταθερότητα και επαναληψιμότητα ηλεκτροδίων PEDOT μέσω κυκλικής βολταμετρίας

Μετά την προσκόλληση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων, πραγματοποιήθηκε μελέτη της ηλεκτροχημικής απόκρισης των ηλεκτροδίων μέσω κυκλικής βολταμετρίας (Cyclic Voltammetry, CV) και για τις δύο κυτταρικές σειρές. Αρχικά επιλέχθηκε ο βέλτιστος ρυθμός σάρωσης δυναμικού με βάση την κυκλική βολταμετρία σε ηλεκτρολυτικό διάλυμα PBS.

Σύμφωνα με το Γράφημα 4.20,α η αύξηση της ταχύτητας σάρωσης δυναμικού οδηγεί σε μεγαλύτερες εντάσεις ρεύματος των ανοδικών και καθοδικών κορυφών, οι οποίες για τις ταχύτητες 0.1V και 0.05V, δεν μετατοπίζονται σημαντικά. Συγκριτικά οι δύο μεγαλύτερες ταχύτητες οδηγούν σε βολταμογραφήματα όπου οι κορυφές καθίστανται περισσότερο ευκρινείς. Επιπλέον, οι τιμές της ειδικής ηλεκτρικής χωρητικότητας Cs για τις τέσσερις ταχύτητες σάρωσης κυμαίνονται από 216 F g⁻¹ έως 241 F g⁻¹ (Γράφημα 4.20, β) αρκετά κοντά στη θεωρητική ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα του PEDOT που βρίσκεται, λόγω του σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους του, στην πλησιέστερη τιμή των 210 F g⁻¹ (Kulesza et al., 2008; Wang, 2009).

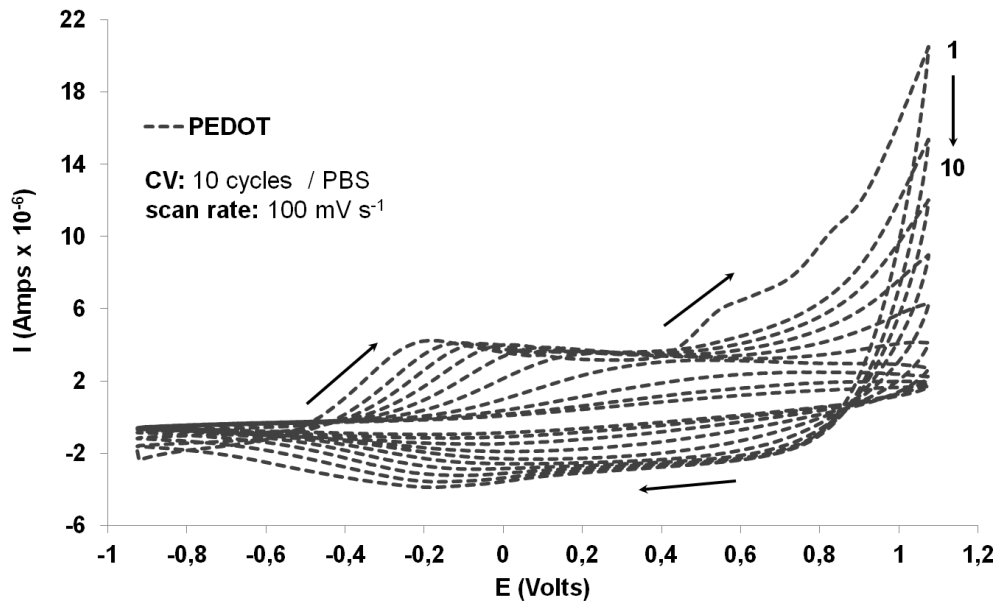
Καθώς η μεγαλύτερη ταχύτητα σάρωσης έδωσε μεγαλύτερη χωρητικότητα και ευκρινέστερες κορυφές, επιλέχθηκε για την πραγματοποίηση των ηλεκτροχημικών πειραματισμών της παρούσας μελέτης.



Γράφημα 4.20: α) Χαρακτηριστικά κυκλικά βολταμογραφήματα ηλεκτροδίων PEDOT για διαφορετικούς ρυθμούς σάρωσης δυναμικού, σε περιοχή σάρωσης $-1V \rightarrow +1V$, διάλυμα PBS και ένα κύκλο επεξεργασίας, β) ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα ηλεκτροδίου ανά ρυθμό σάρωσης.

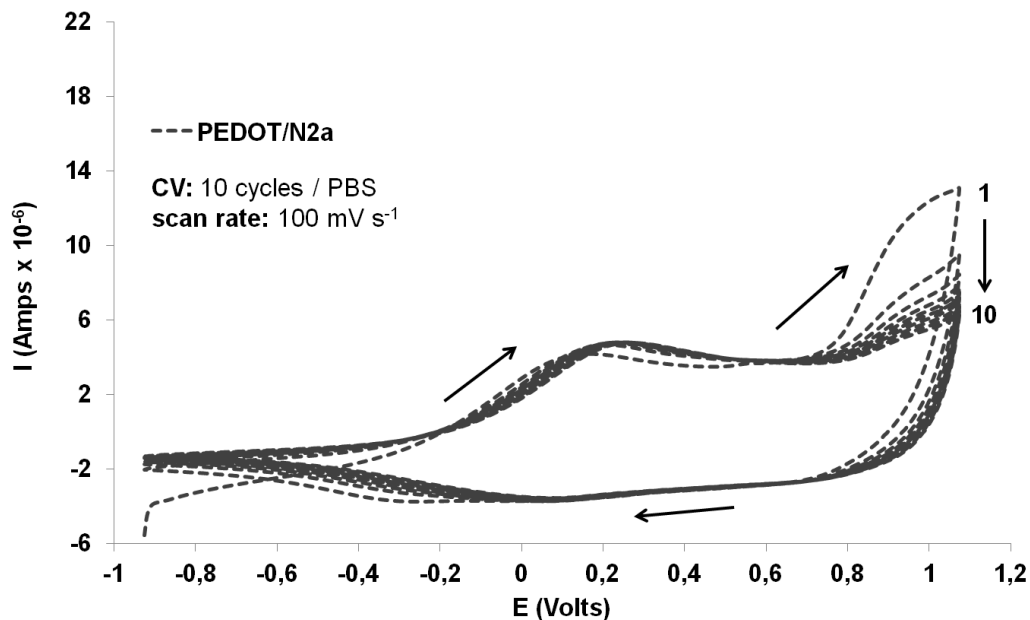
Κατόπιν μελετήθηκε η σταθερότητα των ηλεκτροδίων σε συνάρτηση με τον αριθμό των κύκλων επεξεργασίας. Στο γράφημα 4.21 παρουσιάζεται ένα τυπικό βολταμογράφημα ακάλυπτων ηλεκτροδίων PEDOT σε διάλυμα PBS, περιοχή σάρωσης δυναμικού $-1V$ έως $+1V$, 10 κύκλων επεξεργασίας και ταχύτητας σάρωσης $100mV s^{-1}$. Εκκινώντας της κυκλική σάρωση του δυναμικού από $-1V$ και ακολουθώντας την πορεία του βέλους από αριστερά προς τα δεξιά, δηλαδή από καθοδικά προς ανοδικά δυναμικά μέχρι $+1V$, παρατηρείται μείωση της πυκνότητας του ρεύματος με την αύξηση των κύκλων επεξεργασίας. Επιπλέον στον πρώτο κύκλο επεξεργασίας εμφανίζονται δύο πεπλατυσμένες ανοδικές κορυφές στα δυναμικά $+0.3V$ και $+0.6V$ αντίστοιχα οι οποίες δεν διακρίνονται στους επόμενους κύκλους.

Κατά την αντίστροφη σάρωση του δυναμικού μέχρι την αρχική τιμή, δηλαδή από $+1V \rightarrow -1V$, εμφανίζεται μια πεπλατυσμένη κορυφή σε αρνητική τιμή δυναμικού ($-0.2V$) η οποία με την αύξηση των κύκλων επεξεργασίας διευρύνεται και μετατοπίζεται ελαφρώς προς τα δεξιά (λιγότερο αρνητικές τιμές δυναμικού). Παρόλο που οι κορυφές που παρατηρούνται σε όλους του κύκλους δεν είναι αρκετά οξείες και εμφανείς, δεν μπορεί να αποκλειστεί η ύπαρξη οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, καθώς το PEDOT όπως και όλα τα αγώγιμα πολυμερή περιέχουν ένα ευρύ φάσμα



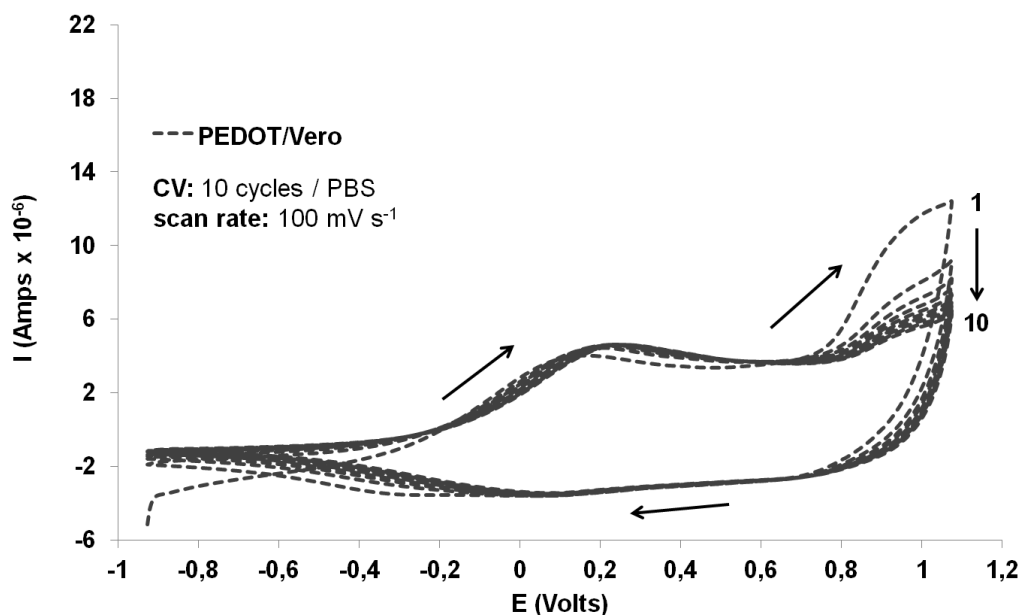
Γράφημα 4.21: Χαρακτηριστικά κυκλικά βολταμογραφήματα ηλεκτροδίων PEDOT σε διάλυμα PBS, περιοχή σάρωσης δυναμικού $-1V \rightarrow +1V$ για 10 κύκλους επεξεργασίας και ρυθμό σάρωσης δυναμικού $100mV s^{-1}$.

ενεργειακών καταστάσεων, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε πεπλατυσμένες κορυφές οξειδωτικών ή αναγωγικών ηλεκτροχημικών αντιδράσεων (Chae et al., 2010). Η μετάβαση από τον 1^ο στον 10^ο κύκλο επεξεργασίας, στην περίπτωση των προσκολλημένων κυττάρων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου (Γραφήματα 4.20,4.21), εμφάνισε παρόμοια μείωση στην πυκνότητα ρεύματος και μετατόπιση του



Γράφημα 4.22: Χαρακτηριστικά κυκλικά βολταμογραφήματα ηλεκτροδίων PEDOT επιστρωμένα με κύτταρα N2a σε διάλυμα PBS, περιοχή σάρωσης δυναμικού $-1V \rightarrow +1V$ για 10 κύκλους επεξεργασίας και ρυθμό σάρωσης δυναμικού $100mV s^{-1}$.

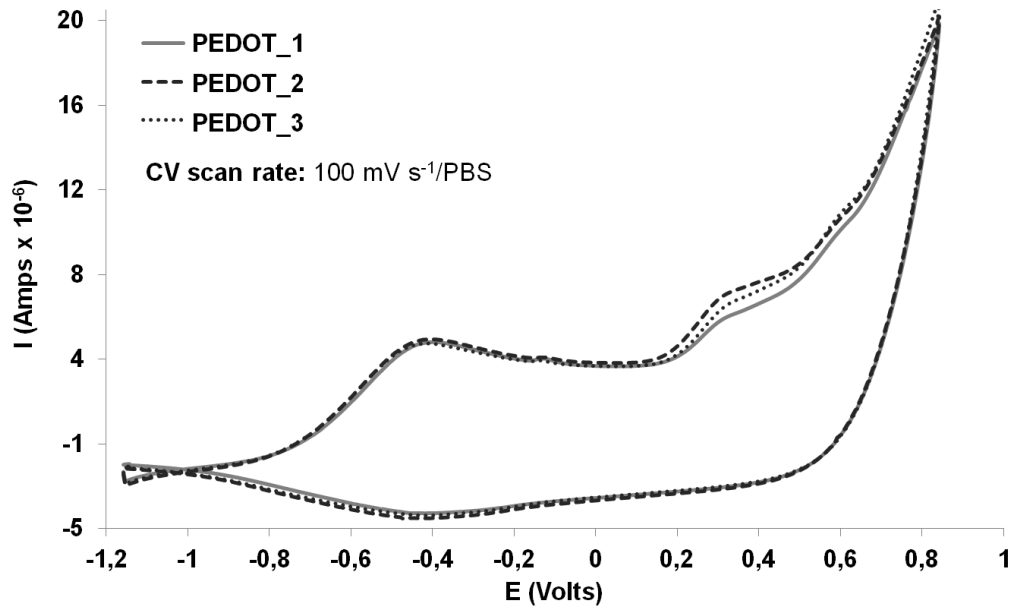
βολταμογραφήματος ελαφρώς δεξιά (θετικότερες τιμές δυναμικού). Κατά την αντίστροφη σάρωση εμφανίζεται μια πεπλατυσμένη κορυφή σε αρνητική τιμή δυναμικού (-0.55V) η οποία με την αύξηση των κύκλων επεξεργασίας διευρύνεται και μετατοπίζεται ελαφρώς προς τα δεξιά (λιγότερο αρνητικές τιμές δυναμικού) και για τις δύο κυτταρικές σειρές.



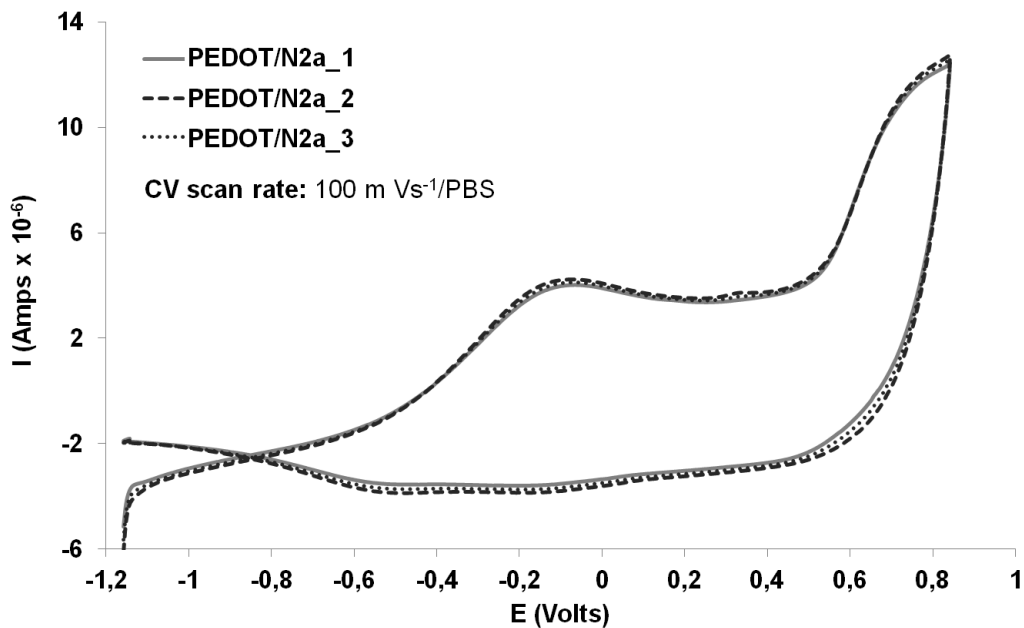
Γράφημα 4.23: Χαρακτηριστικά κυκλικά βολταμογραφήματα ηλεκτροδίων PEDOT επιστρωμένα με κύτταρα Vero σε διάλυμα PBS, περιοχή σάρωσης δυναμικού -1V→+1V για 10 κύκλους επεξεργασίας και ρυθμό σάρωσης δυναμικού 100 mV s^{-1} .

Με βάση τα παραπάνω, τα ηλεκτρόδια PEDOT στους παρούσες συνθήκες πειραματισμού χάνουν τα ηλεκτροχημικά χαρακτηριστικά τους μετά τον πρώτο κύκλο επεξεργασίας και ως αποτέλεσμα επιλέχθηκε ο πρώτος κύκλος επεξεργασίας για τον περαιτέρω πειραματισμό στην κατασκευή του βιοαισθητήρα.

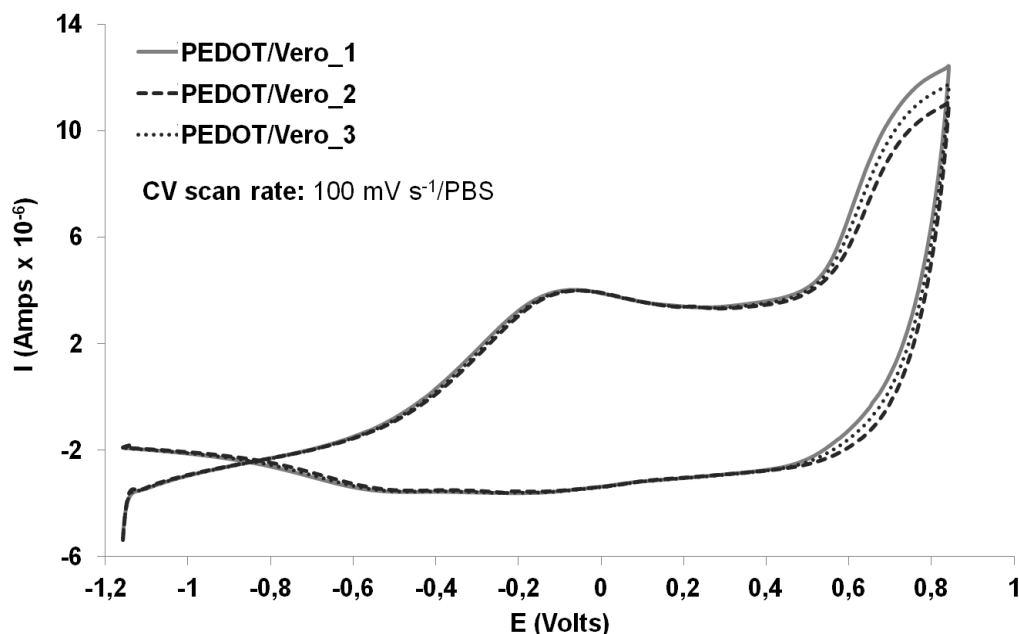
Κατόπιν εκτιμήθηκε η επαναληψιμότητα των ηλεκτροχημικών αποκρίσεων ανεξάρτητων ηλεκτροδίων (επικαλυμμένων ή μη) κάτω από ίδιες συνθήκες μέτρησης όπως παρουσιάζεται στα Γραφήματα 4.24, 4.25 και 4.26. Οι επαναλήψεις κυκλικής βολταμετρίας για διαφορετικά ηλεκτρόδια εμφανίζουν αμελητέες αποκλίσεις και για την περίπτωση των ακάλυπτων αλλά και για τα επιστρωμένα ηλεκτρόδια. Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) κυμαίνονται στο 0.3% για τα ακάλυπτα ηλεκτρόδια, 0.5% για τα επιστρωμένα με N2a και 1.2% για τα επιστρωμένα με Vero.



Γράφημα 4.24: Κυκλικά βολταμογραφήματα ανεξάρτητων ηλεκτροδίων PEDOT υπό τις ίδιες συνθήκες μέτρησης, με περιοχή σάρωσης δυναμικού $-1V \rightarrow +1V$ για έναν κύκλο επεξεργασίας και ρυθμό σάρωσης δυναμικού $100mV s^{-1}$.



Γράφημα 4.25: Κυκλικά βολταμογραφήματα ανεξάρτητων ηλεκτροδίων PEDOT επιστρωμένων με κύτταρα N2a, υπό τις ίδιες συνθήκες μέτρησης, με περιοχή σάρωσης δυναμικού $-1V \rightarrow +1V$ για έναν κύκλο επεξεργασίας και ρυθμό σάρωσης δυναμικού $100mV s^{-1}$.



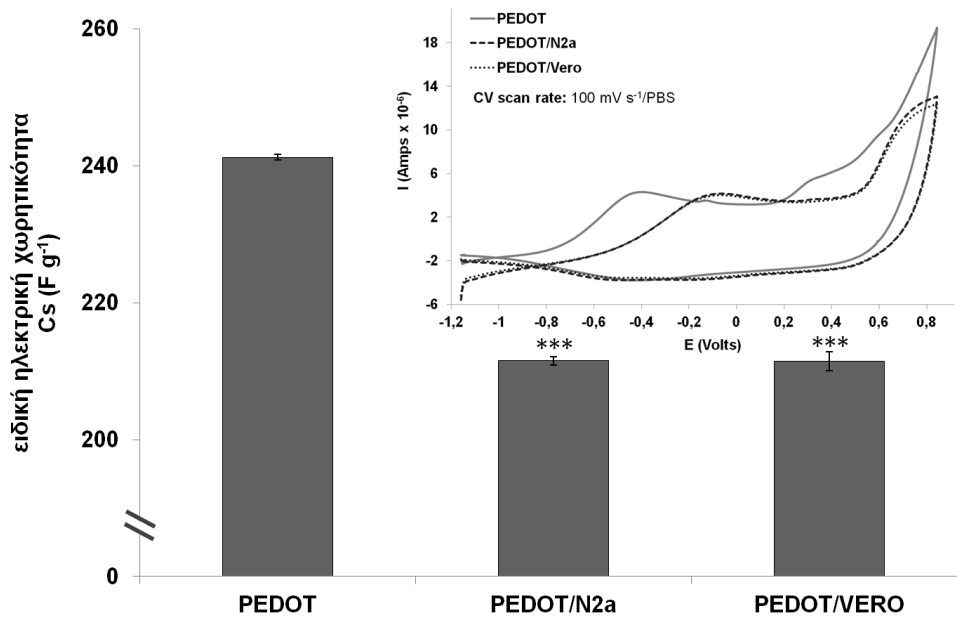
Γράφημα 4.26: Κυκλικά βολταμογραφήματα ανεξάρτητων ηλεκτροδίων PEDOT επιστρωμένων με κύτταρα Vero, υπό τις ίδιες συνθήκες μέτρησης, με περιοχή σάρωσης δυναμικού $-1V \rightarrow +1V$ για έναν κύκλο επεξεργασίας και ρυθμό σάρωσης δυναμικού $100mV s^{-1}$.

Τέλος πραγματοποιήθηκε σύγκριση των βολταμογραφημάτων ενός κύκλου επεξεργασίας για τα επικαλυμμένα και μη ηλεκτρόδια. Σύμφωνα με το Γράφημα 4.27 (εσωτερικό βολταμογράφημα) διαπιστώνεται ότι οι δύο πεπλατυσμένες ανοδικές κορυφές στα δυναμικά $+0.3V$ και $+0.6V$ που παρατηρούνται στον πρώτο κύκλο επεξεργασίας στην περίπτωση του ακάλυπτου PEDOT, δεν είναι εμφανείς στα βολταμογραφήματα των N2a και Vero, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται η ύπαρξη τους καθώς ενδέχεται να έχουν αμβλυνθεί.

Η ύπαρξη κυττάρων και η σύνδεσή τους μόνο με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου πιθανών να εξομοιώνει τις ανεξάρτητες και διαφοροποιημένες ενεργές οξειδωαναγωγικές θέσεις του ηλεκτροδίου και να αυξάνει την μεταξύ τους αλληλεπίδραση, οδηγώντας στην δημιουργία αλληλεπικαλυπτόμενων κορυφών (Peng et al., 2011).

Συνεχίζοντας την σύγκριση κενών και επικαλυμμένων ηλεκτροδίων παρατηρείται ότι η ύπαρξη μονοστοιβάδας κυττάρων στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων επηρέασε στατιστικά σημαντικά και την ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα τους [$F(2,6) = 364.582 > 136.247$ για $p = 0.00001$], (Γράφημα 4.27). Οι τιμές των επικαλυμμένων ηλεκτροδίων παρουσιάζουν μείωση από $26.5 F/g$ έως $32.5 F/g$ (12.5% έως 15.3%) σε σχέση με τα ακάλυπτα ηλεκτρόδια και διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.001$) και για τις δύο κυτταρικές σειρές. Αυτή η μικρή μείωση της χωρητικότητας είναι μια πιθανή ένδειξη ότι οι μονοστοιβάδες N2a και Vero επιτρέπουν την ροή ηλεκτρονίων

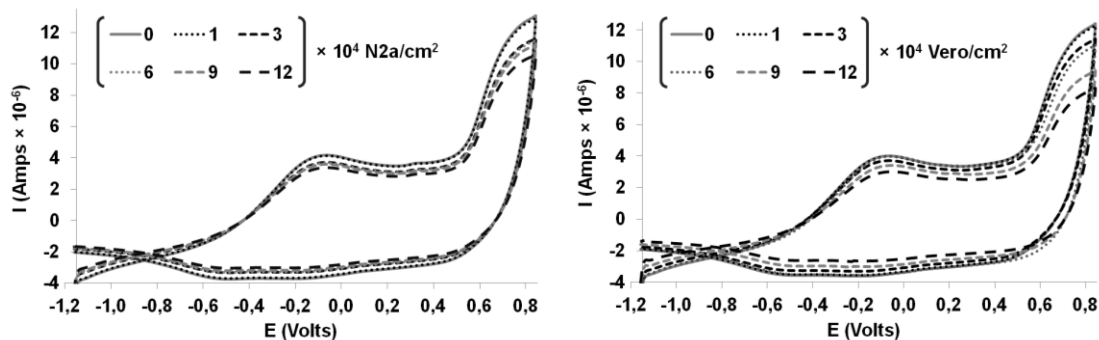
και επομένως μπορούν να δράσουν σαν αγωγοί. Για συγκριτικούς λόγους παρατίθενται συγκεντρωτικά (εσωτερικό γράφημα 4.27) και τα κυκλικά βολταμογραφήματα ηλεκτροδίων PEDOT επικαλυμμένα με κύτταρα ή μη.



Γράφημα 4.27: Ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα κενών και επιστρωμένων με κύτταρα ηλεκτροδίων PEDOT και εσωτερικό γράφημα με τα αντίστοιχα κυκλικά βολταμογραφήματά τους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=3$, one-way ANOVA, Tukey's test, *** $p \leq 0.001$ έναντι PEDOT.

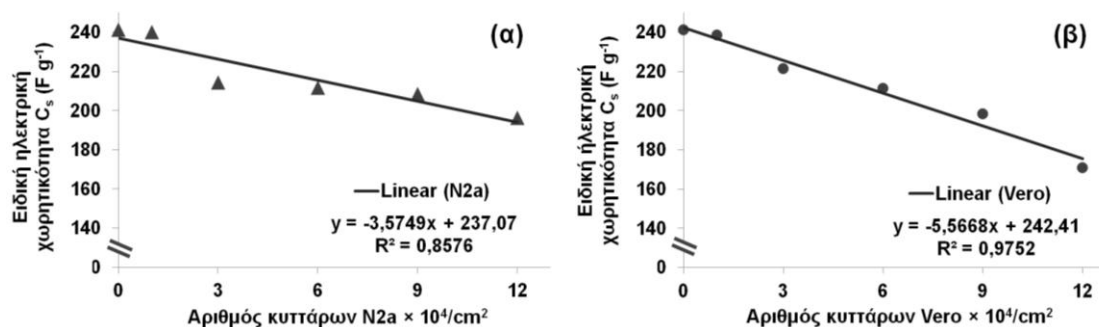
4.4.3. Επίδραση του αριθμού κυττάρων στην ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα ηλεκτροδίων PEDOT

Εφόσον διαπιστώθηκε η ηλεκτρική αγωγιμότητα των ηλεκτροδίων PEDOT μετά από επίστρωση και δημιουργία μονοστοιβάδας κυττάρων N2a και Vero στην επιφάνειά τους, μελετήθηκε η σχέση του αριθμού κυττάρων και της ειδικής ηλεκτρικής χωρητικότητας των επιστρωμένων ηλεκτροδίων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Γραφήματα 4.28 - 4.29 και αφορούν τους αριθμούς κυττάρων μετά την 24h επώαση με το πολυμερές.



Γράφημα 4.28: Κυκλικά βολταμογραφήματα ηλεκτροδίων PEDOT επιστρωμένων με κύτταρα N2a και Vero σε διαφορετικές κυτταρικές πυκνότητες σε διάλυμα PBS.

Οι συνολικές εντάσεις ρεύματος στα κυκλικά βολταμογραφήματα του Γραφήματος 4.28 παρουσιάζουν μείωση με την αύξηση του αριθμού των κυττάρων και για τις δύο κυτταρικές σειρές. Η μείωση που παρατηρείται στα κύτταρα Vero είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα N2a. Οι ειδικές ηλεκτρικές χωρητικότητες για κάθε κυτταρική συγκέντρωση, όπως προέκυψαν από τα παραπάνω βολταμογραφήματα, παρουσιάζονται στο Γράφημα 4.29 και εμφανίζουν αρνητική γραμμική σχέση με τον αριθμό των προσκολλημένων κυττάρων και για τις δύο κυτταρικές σειρές.



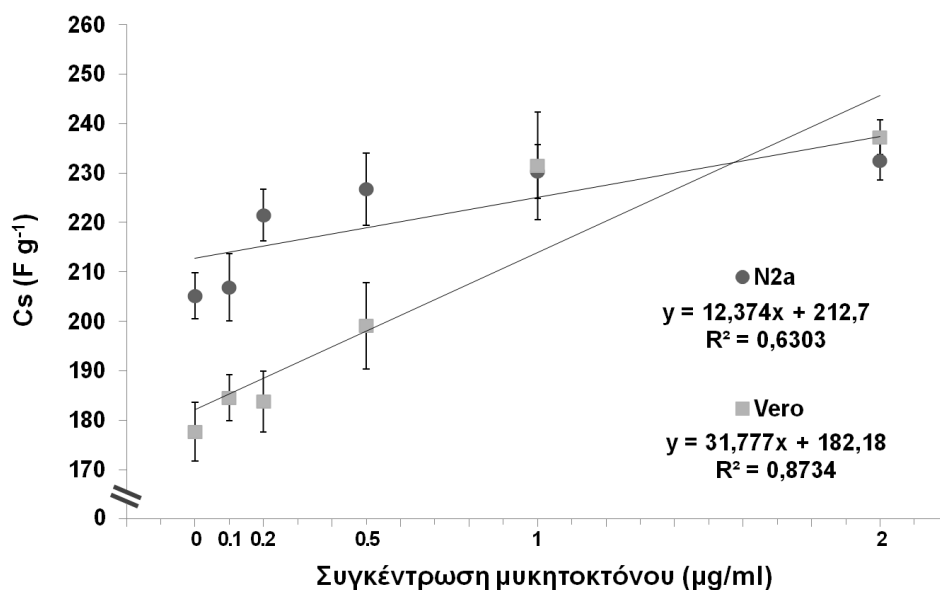
Γράφημα 4.29: Ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα (C_s) ηλεκτροδίων PEDOT επιστρωμένων με κύτταρα N2a (α) και Vero (β) σε διαφορετικές κυτταρικές πυκνότητες. Η C_s υπολογίστηκε μετά από κυκλική βολταμετρία των ηλεκτροδίων όπως παρουσιάζεται στο Γράφημα 4.28.

Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων οδηγεί σε χαμηλότερες τιμές C_s και στους δύο τύπους κυττάρων με τα Vero να εμφανίζουν υψηλότερο συντελεστή γραμμικής συσχέτισης ($R^2=0.9752$), σε σχέση με τα N2a ($R^2=0.8576$).

4.4.4. Επίδραση του μυκητοκτόνου στην ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα ηλεκτροδίων PEDOT επιστρωμένων με κύτταρα N2a και Vero

Σε συνέχεια της συσχέτισης του αριθμού προσκολλημένων κυττάρων με την C_s των ηλεκτροδίων, μελετήθηκε η επίδραση του μυκητοκτόνου σε προσκολλημένα σε ηλεκτρόδια κύτταρα. Για το σκοπό αυτό, μετρήθηκε η ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα ηλεκτροδίων με κύτταρα μετά από 24h επώασή τους (πάνω στα ηλεκτρόδια και υπό συνθήκες κλασσικής κυτταροκαλλιέργειας) με το kresoxim-methyl. Οι C_s για κάθε συγκέντρωση μυκητοκτόνου και κυτταρική σειρά παρουσιάζονται στο Γράφημα 4.30.

Οι ειδικές ηλεκτρικές χωρητικότητες εμφανίζουν θετική γραμμική σχέση με την συγκέντρωση του μυκητοκτόνου, με την γραμμική συσχέτιση των Vero ($R^2=0.87$) να υπερéχει σε σχέση με των N2a ($R^2=0.63$).



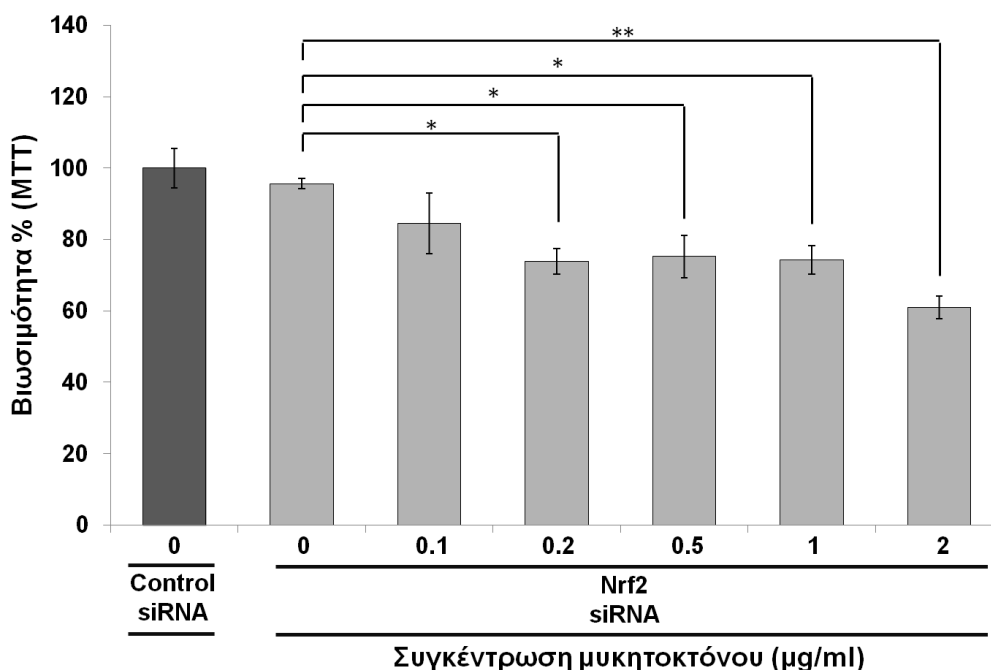
Γράφημα 4.30: Ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα (C_s) ηλεκτροδίων PEDOT με προσκολλημένα κύτταρα N2a και Vero ($6 \times 10^4/cm^2$), μετά από 24h έκθεση τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις kresoxim-methyl.

4.4.5. Μετα-μεταγραφική τροποποίηση κυττάρων Vero μέσω παροδικής διαμόλυνσης siRNA

Λαμβάνοντας υπόψη την συνολική βιοχημική απόκριση των κυττάρων Vero έναντι του μυκητοκτόνου (ενότητες 4.1 έως 4.3) καθώς την μέχρι τώρα απόδοση τους στην κατασκευή του βιοαισθητήρα, οι νεφρικοί ινοβλάστες Vero επιλέχθηκαν για μετα-μεταγραφική τροποποίηση με στόχο τη μείωση της αποτοξινωτικής και αντιοξειδωτικής άμυνας τους και κατά συνέπεια την αύξηση της τοξικότητας του μυκητοκτόνου και ταυτόχρονης ευαισθησίας του βιοαισθητήρα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε αρνητική ρύθμιση της συσσώρευσης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 σε κύτταρα Vero, μέσω τεχνολογίας RNAi.

4.4.5.1. Βιωσιμότητα κυττάρων Vero έναντι του kresoxim-methyl μετά από παροδική μείωση της έκφρασης του Nrf2 με χρήση siRNA

Προκειμένου να διασφαλιστεί το γεγονός ότι η διαδικασία διαμόλυνσης δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα των κυττάρων, τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ήταν κύτταρα Vero τα οποία είχαν μετασχηματιστεί με αρνητικό control siRNA. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράστηκε ως το ποσοστό % των βιώσιμων κυττάρων σε σχέση με τον siRNA μάρτυρα και προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου MTT. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Γράφημα 4.31.



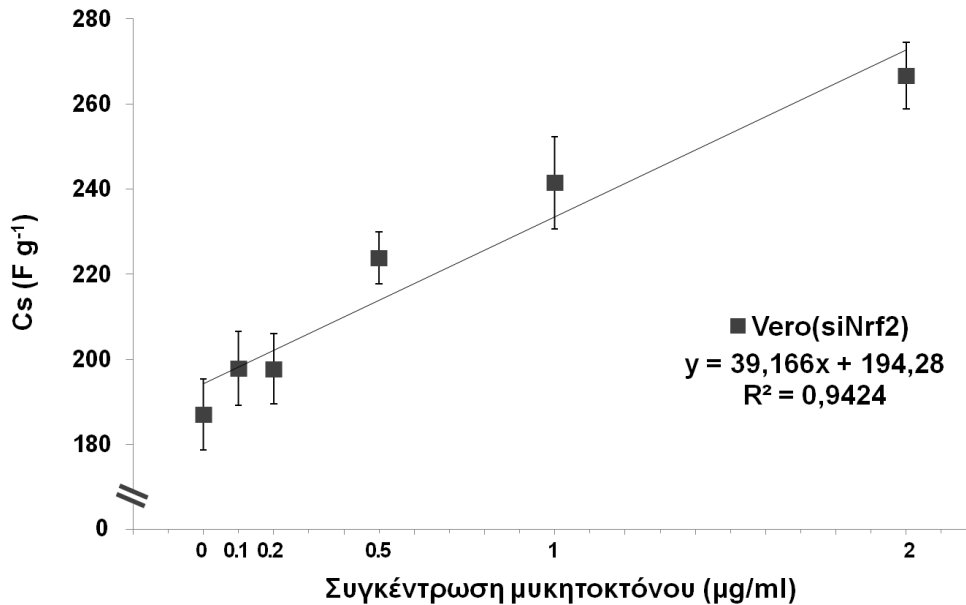
Γράφημα 4.31: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου *kresoxim-methyl* στη βιωσιμότητα (μιτοχονδριακή δραστηριότητα) παροδικά διαμολυσμένων με *Nrf2-siRNA* κυττάρων *Vero*, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα *Control-siRNA* (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=3$, one-way ANOVA, Dunnett's test, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ έναντι μάρτυρα διαλύτη/φορέα).

Η επώαση με το μυκητοκτόνο επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων *Vero/Nrf2-siRNA* [$F(5,12)=5.508 > 5.064$ για $p=0.01$]. Επιπρόσθετες μεταγενέστερες αναλύσεις (post-hoc) έδειξαν ότι κύτταρα που επωάστηκαν με μυκητοκτόνο 0.2µg/ml, 0.5µg/ml και 1µg/ml καθώς και τα κύτταρα που επωάστηκαν με 2 µg/ml παρουσίασαν μειωμένες βιωσιμότητες της τάξης του 73% ($p \leq 0.05$), 75% ($p \leq 0.05$), 74% ($p \leq 0.05$) και 61% ($p \leq 0.01$) αντίστοιχα, σε σύγκριση με αυτά που εκτέθηκαν στον διαλύτη/φορέα (Γράφημα 4.31). Επιπλέον η διαμόλυνση με το *Nrf2-siRNA* δεν επηρέασε την βιωσιμότητα των κυττάρων, καθώς κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το *Nrf2-siRNA* δεν παρουσίασαν διαφορές στη βιωσιμότητα σε σχέση με τα *Control-siRNA* σε συνθήκες απουσίας μυκητοκτόνου.

4.4.5.2. Επίδραση του μυκητοκτόνου στην ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα ηλεκτροδίων PEDOT επιστρωμένων με κύτταρα *Vero* μετά από *Nrf2* σίγηση

Εφόσον μελετήθηκε η βιωσιμότητα των παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων *Vero*, έναντι του μυκητοκτόνου, μελετήθηκε η επίδραση του σε προσκολλημένα σε ηλεκτρόδια κύτταρα *Vero/Nrf2siRNA*. Για το σκοπό αυτό, μετρήθηκε η ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα ηλεκτροδίων με κύτταρα μετά από 24h επώασή τους (πάνω στα ηλεκτρόδια και υπό συνθήκες κλασσικής κυτταροκαλλιέργειας) με το *kresoxim-*

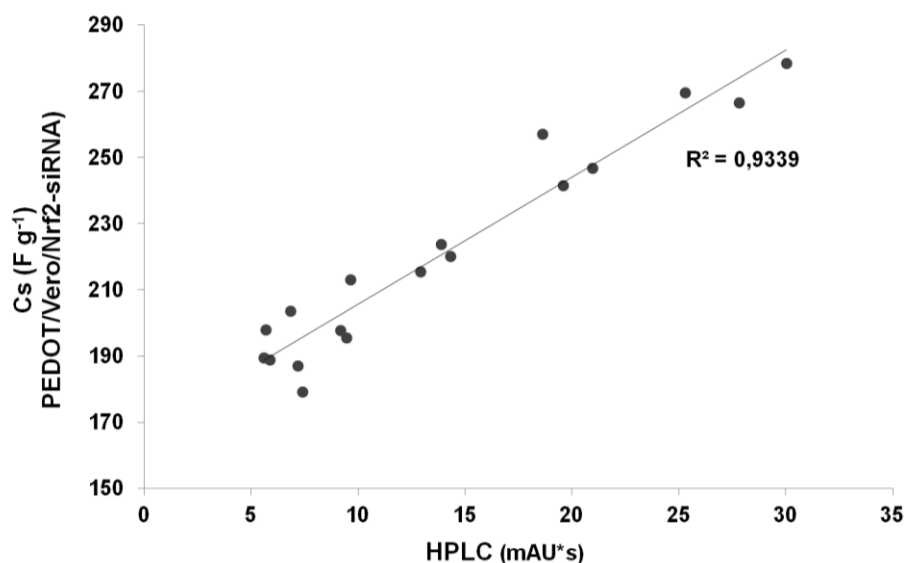
methyl. Οι C_s για κάθε συγκέντρωση μυκητοκτόνου και κυτταρική σειρά παρουσιάζονται στο Γράφημα 4.32.



Γράφημα 4.32: Ειδική ηλεκτρική χωρητικότητα (C_s) ηλεκτροδίων PEDOT με προσκολλημένα κύτταρα *Vero/Nrf2-siRNA* ($6 \times 10^4/cm^2$), μετά από 24h έκθεση τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις *kresoxim-methyl*.

4.4.6. Σύγκριση βιοαισθητήρα PEDOT-*Vero/Nrf2-siRNA* με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων του βιοαισθητήρα με την HPLC κατασκευάστηκε διάγραμμα διασποράς μεταξύ των αποκρίσεων του βιοαισθητήρα και των τιμών HPLC πρότυπων δειγμάτων *kresoxim-methyl* (Γράφημα 4.33). Ο βιοαισθητήρας εμφανίζει γραμμική συσχέτιση με την HPLC με $R^2=0.93$.



Γράφημα 4.33: Διάγραμμα διασποράς για τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν μετά την εφαρμογή του βιοαισθητήρα PEDOT-*Vero/Nrf2-siRNA* και της μεθόδου HPLC κατά τον προσδιορισμό πρότυπων συγκεντρώσεων *kresoxim-methyl*.

5. Συζήτηση

5. Συζήτηση

Ο άνθρωπος, ένα από τα πολυπληθέστερα είδη της ομοταξίας των θηλαστικών, εκτίθεται καθημερινά σε χημικές τοξικές ουσίες του περιβάλλοντος οι οποίες αποτελούν προϊόντα ξένα για τους ανώτερους οργανισμούς (ξενοβιοτικά). Ένα μεγάλο μέρος από τις ουσίες αυτές είναι λιπόφιλες με αποτέλεσμα να απορροφούνται εύκολα από το δέρμα, τους πνεύμονες και το γαστρεντερικό σύστημα. Η περιοδική έκθεση του οργανισμού στις τοξικές ουσίες θα μπορούσε να οδηγήσει σε χρόνια συσσώρευση και μεγάλη τοξικότητα αν ο οργανισμός δεν είχε τη δυνατότητα να τις απομακρύνει. Ωστόσο, οι ανώτεροι οργανισμοί διατηρούν την ομοιόστασή τους μεταβολίζοντας και αποβάλλοντας τα ξενοβιοτικά σε σημαντικό βαθμό, μέσω αμυντικών και επιδιορθωτικών μεταβολικών μηχανισμών.

Τα κυριότερα βιολογικά συστήματα που υπόκεινται σε βλάβες από τοξικές ξενοβιοτικές ουσίες είναι τα ένζυμα, οι λιπιδιακές μεμβράνες των κυττάρων, τα συστήματα αναπνοής και ενέργειας (μιτοχόνδρια), τα συστήματα πρωτεϊνικής σύνθεσης (ενδοπλασματικό δίκτυο) και τα ενδοκυτταρικά οργανίδια του πυρήνα. Η παρούσα εργασία εστίασε τη μελέτη σε μια σχετικά νέα κατηγορία ξενοβιοτικών ουσιών, τις στρομπιλουρίνες, οι οποίες δρουν ως παρεμποδιστές της κυτταρικής αναπνοής, διαταράσσοντας την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (Bartl et al., 2002).

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν μείζονα πηγή ελευθέρων ριζών για το κύτταρο. Έχει υπολογιστεί πως το 0.15% του μοριακού οξυγόνου που φυσιολογικά ανάγεται στο σύμπλοκο IV για τη δημιουργία νερού μετατρέπεται σε υδροξυλική ρίζα (St-Pierre et al., 2002; Turrens, 2003). Συνολικά, σχεδόν το 1-2% του οξυγόνου που εισέρχεται στο μιτοχόνδριο ανάγεται ατελώς και οδηγεί στην παραγωγή $O_2^{\cdot-}$.

Οι περισσότερες επιβλαβείς επιδράσεις του οξυγόνου οφείλονται στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών και άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), στα οποία περιλαμβάνονται τα πρωτογενή δραστικά παράγωγα του οξυγόνου αλλά και όσα προκύπτουν δευτερογενώς κατά τις διάφορες χημικές αλληλεπιδράσεις με τα στοιχεία του κυτταρικού περιβάλλοντος (π.χ. ελεύθερες υπεροξυλ-ρίζες, ενδιάμεσα προϊόντα της υπεροξειδωσης λιπιδίων). Οι ROS σχηματίζονται αναπόφευκτα στον αερόβιο μεταβολισμό και είναι η κύρια αιτία εκδήλωσης του φαινομένου του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα.

Το οξειδωτικό στρες προέρχεται από την ανατροπή της ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή δραστικών ενώσεων οξυγόνου ή αζώτου και αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Οι βλάβες που προκαλούνται επηρεάζουν την λειτουργικότητα πολλών

κυτταρικών ομοιοστατικών συστημάτων. Το ξενοβιοτικά-επαγόμενο οξειδωτικό στρες, ως μηχανισμός τοξικότητας, έχει γίνει στόχος εκτεταμένης έρευνας τις τελευταίες δύο δεκαετίες (Abdollahi et al., 2004). Ο μηχανισμός δράσης των στρομπιλουρινών (Εικόνα 1.7), ο οποίος συνδέεται άμεσα με την παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια, καθιστά απαραίτητη τη μελέτη της επίδρασης τους στην οξειδωτική ισορροπία των κυττάρων.

Στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε η επίδραση του kresoxim-methyl, μιας από τις πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες στρομπιλουρίνες παγκοσμίως, στην οξειδωτική ομοιόσταση κυττάρων θηλαστικών. Διεθνώς, τα βιβλιογραφικά δεδομένα από μελέτες επίδρασης των στρομπιλουρινών σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών είναι ακόμα περιορισμένα λόγω της σχετικά πρόσφατης εμφάνισής τους, αλλά και της χαμηλής τοξικότητάς τους στα θηλαστικά καθώς προέρχονται από χημική τροποποίηση μιας φυσικής ουσίας (strobilurin A, Εικόνα 1.5) που παράγεται από τον μύκητα *Strobilurus tenacellus* (Vincelli, 2002). Η παρούσα εργασία εξετάζει την επίδραση μη θανατηφόρων δόσεων του μυκητοκτόνου, δόσεων που συμπίπτουν και με τα μέγιστα επιτρεπτά όρια (MRLs) που έχουν θεσπιστεί για την υπολειμματικότητα του σε αγροτικά προϊόντα (Πίνακας 3.2., EFSA, 2010), στις λειτουργίες των κυττάρων με έμφαση στο οξειδωτικό στρες και στην απόπτωση.

Η συνεχής ύπαρξη οξειδωτικού στρες μέσω της έκθεσης ενός οργανισμού σε μη τοξικές δόσεις ξενοβιοτικών μπορεί μακροπρόθεσμα και έμμεσα να επιφέρει αθροιστικά αποτελέσματα. Οι περισσότερες θεωρίες περί γήρανσης επικεντρώνονται στις συσσωρευτικές επιδράσεις του οξειδωτικού στρες, οι οποίες αφορούν μιτοχονδριακές μεταλλάξεις, δυσλειτουργίες και οξειδωτικές βλάβες (Lin et al., 2006). Η πρώτη θεωρία περί γήρανσης λόγω ελευθέρων ριζών (free radical theory of aging) έχει προταθεί από τον Denham Harman εδώ και 60 χρόνια και προτείνει πως η γήρανση είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης επιβλαβών επιδράσεων των ελευθέρων ριζών και πως η ικανότητα ενός οργανισμού να ανταπεξέρχεται στις κυτταρικές βλάβες λόγω ROS, καθορίζει το εύρος ζωής του (Harman, 1955). Από τότε εκατοντάδες μελέτες έχουν συνδέσει το οξειδωτικό στρες με την διαδικασία γήρανσης και με πληθώρα σοβαρών παθολογικών καταστάσεων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η αθηροσκλήρωση και τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η ισχαιμική βλάβη, τα κακοήθη νεοπλασμάτα, οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις κ.α. (Hogg, 1997; Moskovitz et al., 2002).

Κυτταροτοξικότητα kresoxim-methyl έναντι N2a και Vero

Αρχικά η εργασία επικεντρώθηκε στην επίδραση του μυκητοκτόνου στην βιωσιμότητα κυττάρων θηλαστικών. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν

προέρχονται από μη συναφείς ιστούς (N2a: καρκινικά κύτταρα νευροβλαστώματος, και Vero: φυσιολογικοί αθανατοποιημένοι ινοβλάστες νεφρών) με σκοπό την διαφορική μελέτη των επιδράσεων με βάση τον ιστό (νευρικά έναντι νεφρικών) αλλά και την παθογένεια (καρκινικά έναντι φυσιολογικών). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων βιωσιμότητας εμφανίζουν μια δόσο-εξαρτώμενη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας από το μυκητοκτόνο, μετά από 24h έκθεση, και για τις δύο κυτταρικές σειρές. Οι συντελεστές συσχέτισης (Pearson's r) μεταξύ των συγκεντρώσεων του kresoxim-methyl και του ποσοστού ζωντανών κυττάρων είναι: $r=-0.81$ και $r=-0.89$ για τα κύτταρα N2a και τις μεθόδους MTT και NRU αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση των κυττάρων Vero οι συντελεστές συσχέτισης είναι: $r=-0.92$ και $r=-0.97$ για τις MTT και NRU αντίστοιχα. Οι μελέτες βιωσιμότητας δείχνουν πως και οι πέντε συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου μπορούν να θεωρηθούν "μη-θανατηφόρες δόσεις" και για τις δύο κυτταρικές σειρές. Μόνο οι δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 1 μ g/ml και 2 μ g/ml έδωσαν στατιστικά σημαντικά μειωμένη βιωσιμότητα, η οποία ωστόσο κυμάνθηκε σε ποσοστά 80%-90% σε σχέση με τον μάρτυρα.

Συγκριτικά, και οι δύο μέθοδοι προσδιορισμού βιωσιμότητας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα υποθανατηφόρας τοξικότητας των επιλεγμένων συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου και για τις δύο κυτταρικές σειρές, με τους συντελεστές συσχέτισης για MTT-NRU να είναι $r=0.84$ για τα κύτταρα N2a και $r=0.65$ για τα Vero. Τα αποτελέσματα συμφωνούν μερικώς με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν παρόμοιες μη θανατηφόρες επιδράσεις των στρομπιλουρινών σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών (Gao et al., 2014). Οι Gao et al. χρησιμοποιώντας την στρομπιλουρίνη azoxystrobin για 24h, σε κύτταρα από μυοβλαστική σειρά αρουραίου L6, ινοβλάστες ποντικού 3T3-L1, ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα HepG2 και πρωτογενή ηπατικά κύτταρα από ποντίκι, κατέληξαν στο συμπέρασμα πως συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου που κυμαίνονται από 0.25 μ g/ml έως 8 μ g/ml επιφέρουν σχεδόν μηδενική θνησιμότητα και στους 4 τύπους κυττάρων. Το azoxystrobin ανήκει, όπως και το kresoxim-methyl, στα QoI μυκητοκτόνα και μαζί αποτελούν τις δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στρομπιλουρίνες παγκοσμίως (Yremas and Gold, 1999; Howell et al., 2014). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε από τους Gao et al. (8 μ g/ml) είναι 4 φορές μεγαλύτερη από την συγκέντρωση 2 μ g/ml που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη και έδωσε 80%-90% βιωσιμότητα. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στους διαφορετικούς τύπους κυτταρικών σειρών, αλλά και στην διαφορετική αρχή των μεθόδων εκτίμησης των ζωντανών κυττάρων. Οι Gao et al. χρησιμοποίησαν την μέθοδο της σουλφοροδαμίνης B (sulforhodamine B, SRB), με

την οποία προσδιορίζεται η κυτταρική πυκνότητα με βάση το περιεχόμενο σε κυτταρικές πρωτεΐνες (Vichai et al., 2006), ενώ στην παρούσα μελέτη τα ζωντανά κύτταρα εκτιμήθηκαν με βάση τη μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων τους και τη σταθερότητα των λυσοσωμικών μεμβρανών τους. Μια ακόμα μελέτη επίδρασης στρομπιλουρινών σε κύτταρα θηλαστικών από τους Daniel et al., 2007 παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα για το μυκητοκτόνο trifloxystrobin σε κύτταρα CHO (ωοθηκών ποντικού), με διάμεσο θανατηφόρο δόση LD₅₀ γύρω στα 0.3μg/ml (0,7μM) για την 72h επώαση. Καθώς τα διαστήματα έκθεσης διαφέρουν, δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Εκτός από τα πειράματα βιωσιμότητας, η κυτταροτοξικότητα του μυκητοκτόνου μελετήθηκε και με μια σειρά μεθόδων που ελέγχουν κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η κυτταρική μετανάστευση και η αναπαραγωγική ακεραιότητα. Το kresoxim-methyl δεν επηρέασε τους δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων N2a, ενώ στα Vero οι δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του αύξησαν τον χρόνο διπλασιασμού και κατά συνέπεια μείωσαν τον ειδικό ρυθμό πολλαπλασιασμού, υποδεικνύοντας κυτταροτοξικότητα.

Παρόλο που και οι δύο κυτταρικές σειρές εμφάνισαν παρόμοια αποτελέσματα στους δείκτες βιωσιμότητας, έδωσαν διαφορετική αντίδραση στους δείκτες πολλαπλασιασμού (Πίνακας 4.1.). Η διαφορική αυτή απόκριση ίσως να οφείλεται στα καρκινικά χαρακτηριστικά των κυττάρων νευροβλαστώματος. Τα καρκινικά κύτταρα, μπορούν τεκμηριωμένα να επανασυντονίζουν τα δίκτυα μεταβολισμού και παραγωγής ενέργειάς τους, ώστε να υποστηρίζουν και να ενισχύουν τον ταχύ πολλαπλασιασμό, την συνεχή ανάπτυξη και την επιβίωση τους κάτω από μη ευνοϊκές συνθήκες. Όταν ένα κύτταρο μετατρέπεται σε καρκινικό απορυθμίζονται σημαντικά μονοπάτια που αφορούν την κυτταρική ανάπτυξη και τον θάνατο (Vogelstein B. & Kinzler K.W., 2004). Ορισμένα από αυτά τα μονοπάτια ρυθμίζουν το μεταβολισμό του κυττάρου. Όπως έχει περιγράψει, ήδη από το 1931, ο O.Warburg, στα καρκινικά κύτταρα η ενέργεια παράγεται κυρίως μέσω του μονοπατιού της γλυκόλυσης, ακόμα και παρουσία φυσιολογικής συγκέντρωσης O₂ (αερόβια γλυκόλυση), ενώ το μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι ανεπαρκές και υπολειτουργεί (Matoba S. et al., 2006; Bellance N. et al., 2009; Sung H.J et al., 2010; Sharovalov Y. et al., 2011; Madan E. et al., 2011), σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα όπου το μεγαλύτερο ποσοστό της ενέργειας που παράγεται προέρχεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε “Warburg effect” και αρχικά θεωρήθηκε πάγια κατάσταση όλων των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, μεταγενέστερες εργασίες έδειξαν πως το “Warburg effect” αφορά ένα μεγάλο ποσοστό καρκινικών κυττάρων αλλά όχι όλα, καθώς υπάρχουν κύτταρα που

στηρίζονται κυρίως στην οξειδωτική φωσφορυλίωση για την παραγωγή ενέργειας (Bellance N. et al., 2009) αλλά υπάρχουν και κύτταρα τα οποία ενώ στηρίζουν στην παραγωγή ενέργειας στο μονοπάτι της γλυκόλυσης, μπορούν να στραφούν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση όταν οι συνθήκες του μικρο-περιβάλλοντός τους το επιτάσσουν (π.χ έλλειψη γλυκόζης) ή ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του όγκου και την ενεργοποίηση γονιδίων που ρυθμίζουν μεταβολικά μονοπάτια (Jose C. et al., 2010; Bellance N. et al., 2009).

Τα κύτταρα νευροβλαστώματος N2a χρησιμοποιούν σε πολύ μεγάλο βαθμό την γλυκόλυση (Krieger-Hinck et al., 2006; Mazzio et al., 2010), παρουσιάζουν θετική ρύθμιση (upregulation) των γονιδίων που την ελέγχουν και μπορούν να μετατρέψουν μεγάλες ποσότητες γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ αντί της οξειδωτικής της (Deubzer et al., 2010). Γενικότερα, τα πλεονεκτήματα πολλαπλασιασμού και επιβίωσης που προσφέρει το μονοπάτι της γλυκόλυσης στα καρκινικά κύτταρα είναι πολλά, καθώς επιτρέπει α) την ταχύτερη ανάπτυξή τους (διότι η παραγωγή ATP πραγματοποιείται σε λιγότερα στάδια συγκριτικά με την οξειδωτική φωσφορυλίωση), β) την επιβίωσή υπό συνθήκες υποξίας, γ) τη συσσώρευση ROS που οδηγούν σε περαιτέρω γενωμική αστάθεια και καταστροφή του DNA, καθώς και δ) την παραγωγή ενδιάμεσων προϊόντων, απαραίτητων για τα βιοσυνθετικά μονοπάτια (πχ ριβόζες για σχηματισμό νουκλεοτιδίων) (Wanka C. et al., 2011).

Μια ακόμα κυτταρική λειτουργία που μελετήθηκε υπό την επίδραση του μυκητοκτόνου ήταν η κυτταρική μετανάστευση. Χρησιμοποιώντας το μοντέλο της επούλωσης πληγής (wound healing assay), όπως αυτό περιγράφεται στο πειραματικό μέρος, παρατηρήθηκε η ανασταλτική δράση του μυκητοκτόνου στην κυτταρική κινητικότητα και των δύο κυτταρικών σειρών με εντονότερη παρεμπόδιση στα κύτταρα Vero (Εικόνα 4.2. και Γράφημα 4.3). Και οι δύο τύποι κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο είχαν καλύψει πλήρως την τεχνητή αμυχή μετά από 24h. Τα κύτταρα N2a που εκτέθηκαν στην μεγαλύτερη συγκέντρωση 2μg/ml του μυκητοκτόνου δεν κάλυψαν την αμυχή σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, ενώ τα Vero δεν κατάφεραν να καλύψουν την αμυχή στα 0.5μg/ml, 1μg/ml και 2μg/ml μυκητοκτόνου με στατιστικά σημαντικά μειωμένα ποσοστά πλήρωσης και για τις 3 συγκεντρώσεις. Η παράλληλη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού για το χρονικό διάστημα της δοκιμής δεν έδειξε σημαντικές διαφορές στον πολλαπλασιασμό, γεγονός που πιθανώς να υποδεικνύει πως οι διαφορές στην μετανάστευση των κυττάρων οφείλονται, κατά κύριο λόγο, την επίδραση του μυκητοκτόνου στην κινητικότητα και όχι στον ρυθμό πολλαπλασιασμού.

Η κινητικότητα των κυττάρων θηλαστικών αποτελεί σημαντικό αντικείμενο μελέτης τόσο στις έρευνες ανάπτυξης, μορφογένεσης και ιστικής διαφοροποίησης φυσιολογικών κυττάρων, όσο και στις έρευνες που αφορούν καρκινικές λειτουργίες (Stamenkovic et al., 2003). Η κυτταρική μετανάστευση, ο κυτταροσκελετός, η προσκόλληση, η ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης, η διαφοροποίηση και η μορφογένεση, επηρεάζονται σημαντικά από την εξωκυττάρια ύλη (ECM-Extracellular Matrix) (Mouw et al., 2014). Η ECM αποτελεί βασικό συστατικό του μικροπεριβάλλοντος με μεγάλη δομική και λειτουργική σημασία. Λειτουργεί ως "ικρίωμα" εξυπηρετώντας την οργάνωση των ιστών και ρυθμίζοντας τη διαθεσιμότητα των αυξητικών παραγόντων με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών και οργάνων. Η προσκόλληση των κυττάρων στην εξωκυττάρια ύλη εξυπηρετεί την κυτταρική επιβίωση, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους, καθώς η απουσία αλληλεπιδράσεων μπορεί να ενεργοποιήσει μονοπάτια κυτταρικού θανάτου ενώ τυχόν τροποποιήσεις της σύστασής της μπορούν να οδηγήσουν σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος (Frantz et al., 2010). Η παρεμπόδιση της *in vitro* "επούλωσης πληγής" σε ινοβλάστες λόγω οξειδωτικού στρες έχει αναφερθεί αρκετά στην διεθνή βιβλιογραφία. Στις μελέτες των Lamers et al., 2011 και Banerjee et al., 2014, η παρεμπόδιση της κυτταρικής μετανάστευσης ινοβλαστών CHO.K1 (ωοθηκών), NIH-3T3 (εμβρυακοί) και ινοβλαστών Vero αναστράφηκε με τη προσθήκη ενός αντιοξειδωτικού παράγοντα, χωρίς καμία αλλαγή στα κύτταρα μάρτυρες. Το οξειδωτικό στρες και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στα νεφρικά κύτταρα εμπλέκονται σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις, όπως η νεφρίτιδα και ο καρκίνος (Dounousi et al., 2006; Gomes et al., 2009; Granata et al., 2009).

Τέλος η κυτταροτοξικότητα του μυκητοκτόνου μελετήθηκε και μέσω της επίδρασης του στην αναπαραγωγική ικανότητα των κυττάρων (clonogenic assay). Για τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, όπως τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια, η απώλεια της ικανότητας για διαρκή πολλαπλασιασμό αποτελεί την απώλεια της αναπαραγωγικής ακεραιότητας. Η 24h έκθεση στο μυκητοκτόνο δεν επηρέασε την αναπαραγωγική ικανότητα των κυττάρων σε καμία συγκέντρωση (Εικόνα 4.3 και Γράφημα 4.4). Αλλαγές στην κλωνογονικότητα υποδεικνύουν βλάβες στο DNA και συνήθως αφορούν παράγοντες με μεταλλαξιγόνο δράση. Το kresoxim-methyl δεν χαρακτηρίστηκε ως μεταλλαξιγόνο κατά τις έρευνες έγκρισής του (EFSA, 2010) καθώς δεν προκάλεσε βλάβες στο DNA ή στην *ex vivo* επιδιόρθωση σε ηπατικά κύτταρα αρουραίων και δεν προκάλεσε σχηματισμό μικροπυρήνων σε ποντίκια ή αρουραίους που υποβλήθηκαν σε αγωγή *in vivo*.

Αποτοξινωτική και αντιοξειδωτική άμυνα έναντι kresoxim-methyl

Η αντίδραση των κυττάρων στο μυκητοκτόνο όσον αφορά στις ενζυμικές δραστηριότητες των GST, CAT, GPx και SOD υποδεικνύει ανισορροπία στην οξειδοαναγωγική κατάστασή τους. Μεταβολές στο ισοζύγιο προοξειδωτικών/ αντιοξειδωτικών προέκυψαν και από τους μη ενζυμικούς δείκτες που μελετήθηκαν.

Η έκθεση των κυττάρων νευροβλαστώματος στο kresoxim-methyl προκάλεσε αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της GST για την μεγαλύτερη συγκέντρωση, ενώ δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά την δραστηριότητα στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις (Γράφημα 4.5). Αντίθετα, οι ινοβλάστες Vero μείωσαν την δραστηριότητα του ενζύμου στατιστικά σημαντικά στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Οι GSTs ανήκουν στα ένζυμα μεταβολισμού της φάσης II που είναι υπεύθυνα για την αποτοξίνωση ξеноβιοτικών ουσιών και δραστικών μεταβολιτών που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη σε κύτταρα και ιστούς (Yang et al., 2010). Τα ισόενζυμα της GST παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση διάφορων κατηγοριών ηλεκτρονιόφιλων, καθώς και των ROS και των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης (Landi, 2000; Yang et al., 2003). Η αύξηση της δραστηριότητας της GST στο νευροβλάστωμα μόνο στα 2μg/ml πιθανώς να συνιστά πως αυτή η συγκέντρωση αποτελεί το κατώφλι για την ενεργοποίηση των αποτοξινωτικών μηχανισμών έναντι του μυκητοκτόνου. Αντίθετα, οι νεφρικοί ινοβλάστες παρουσίασαν στατιστικά μειωμένη δραστηριότητα GST στα 1μg/ml και 2μg/ml. Η μείωση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στην μειωμένη διαθεσιμότητα του υποστρώματος (GSH) που επίσης παρατηρήθηκε στις ίδιες συγκεντρώσεις (θετική συσχέτιση $r=0.89$, πίνακας 5.1) και στα κύτταρα Vero (Uguchukin et al., 2006; Walshe et al., 2007). Η μείωση αυτή θα μπορούσε επίσης να οφείλεται και σε χαμηλά επίπεδα του NADPH, συμπαράγοντα για τη μετατροπή GSSG προς GSH. Η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) ανάγεται μέσω του NADPH που παράγεται από την αφυδρογονάση της φωσφορικής-6-γλυκόζης (G6PD) στο μεταβολικό μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Έχει διαπιστωθεί πως κύτταρα με μειωμένα επίπεδα G6PD είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξειδωτική καταπόνηση. Αυτή η πίεση είναι εντονότερη στα ερυθρά αιμοσφαίρια τα οποία ελλείψη μιτοχονδρίων, δεν έχουν εναλλακτικό μέσο παραγωγής αναγωγικής ισχύος (Berg et al., 2002). Επιπλέον, κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες, οι οργανισμοί μπορούν να μεταστρέψουν την μεταβολική ροή τους από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στη γλυκόλυση, συμπεριλαμβανομένου και του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών, το οποίο παρέχει αναγωγική ισχύ για τη διατήρηση της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (Perl et al., 2011). Συνεπώς η παρεμπόδιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας από το kresoxim-methyl θα μπορούσε να έχει οδηγήσει τα Vero στις

παραπάνω μεταβολές με αποτέλεσμα την μειωμένη διαθεσιμότητα NADPH μέσω του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών.

Συνεχίζοντας στα αντιοξειδωτικά ένζυμα, η έκθεση των κυττάρων νεύρο-βλαστώματος N2a στο kresoxim-methyl δεν προκάλεσε μεταβολές στην ενζυμική δραστικότητα της CAT σε καμία συγκέντρωση (Γράφημα 4.6), επιπλέον τα κύτταρα N2a μείωσαν την δραστικότητα της SOD (Γράφημα 4.8) μόνο στην μεγαλύτερη συγκέντρωση του kresoxim-methyl, ενώ εμφάνισαν σημαντικές μειώσεις στην δραστικότητα της GPx σε όλες σχεδόν τις συγκεντρώσεις (Γράφημα 4.7). Τα κύτταρα Vero, εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές μειώσεις στις δραστικότητες CAT και SOD στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου και σημαντικές μειώσεις στην GPx σε όλες σχεδόν τις συγκεντρώσεις.

Πίνακας 5.1: Στατιστικά σημαντικές μεταβολές και συσχετίσεις ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών αποκρίσεων κυττάρων N2a και Vero στο kresoxim-methyl (↑, †: $p \leq 0.05$, ↓↓, ††: $p \leq 0.01$, ↓↓↓, †††: $p \leq 0.001$)

kresoxim-methyl (24h) ($\mu\text{g/ml}$)	N2a									
	GST	CAT	GPx	SOD	GSH	TBARS	InH ₂ O ₂	ExH ₂ O ₂	mtO ₂ ⁻	
0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.2	-	-	↓↓↓	-	-	-	↑	-	-	-
0.5	-	-	↓↓↓	-	-	↑↑	-	-	-	-
1	-	-	↓↓↓	-	-	↑↑↑	-	-	-	-
2	↑	-	↓↓↓	↓↓↓	↓	↑↑↑	-	↓↓	↑↑↑	
pearson's r	GST	CAT	GPx	SOD	GSH	TBARS	InH ₂ O ₂	ExH ₂ O ₂	mtO ₂ ⁻	
GST	-				-					
CAT	-0.72	-			-0.85	-				
GPx	-0.69	+0.66	-		-0.89	+0.70	-			
SOD	-0.77	+0.74	+0.88	-	+0.86	-0.90	-0.58	-		

kresoxim-methyl (24h) ($\mu\text{g/ml}$)	Vero									
	GST	CAT	GPx	SOD	GSH	TBARS	InH ₂ O ₂	ExH ₂ O ₂	mtO ₂ ⁻	
0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.2	-	-	↓	-	-	-	-	↑↑	-	-
0.5	-	-	↓↓↓	-	-	-	-	↑↑↑	↑	
1	↓↓	↓↓	↓↓↓	↓	↓↓↓	↑↑↑	-	↑↑↑	↑↑↑	
2	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↓	↑↑↑	↑↑↑	
pearson's r	GST	CAT	GPx	SOD	GSH	TBARS	InH ₂ O ₂	ExH ₂ O ₂	mtO ₂ ⁻	
GST	-				-					
CAT	+0.97	-			-0.77	-				
GPx	+0.92	+0.90	-		+0.89	-0.82	-			
SOD	+0.95	+0.94	+0.89	-	-0.85	+0.97	-0.93	-		

Η SOD είναι ένα ένζυμο που εξουδετερώνει τις ενδοκυτταρικές ρίζες υπεροξειδίου και παίζει σημαντικό ρόλο στο αμυντικό σύστημα απέναντι στο οξειδωτικό στρες (Abreu & Cabelli, 2010). Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές SOD (Cu/ZnSOD, MnSOD, ECSOD) και όλες απαιτούν ένα οξειδοαναγωγικό δραστικό μέταλλο μεταπτώσεως στην ενεργή θέση για να πραγματοποιηθεί η καταλυτική διάσπαση του ανιόντος σουπεροξειδίου (Suzuki et al., 2000; Culotta et al., 2006). Δύο από τις ισομορφές SOD βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου ενώ η τρίτη βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο (Suzuki et al., 2000). Η Cu/ZnSOD (κυτταροπλασματική χαλκο-ψευδάργυρο-δισμουτάση του υπεροξειδίου) απαιτεί χαλκό-ψευδάργυρο ως συμπαράγοντα και κατά κύριο λόγο βρίσκεται στο κυτοσόλιο (κυτταρόπλασμα) και στον μιτοχονδριακό ενδιάμεσο χώρο. Η MnSOD (μιτοχονδριακή μαγγανο-δισμουτάση του υπεροξειδίου) χρησιμοποιεί μαγνήσιο σαν συμπαράγοντα και βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Τέλος, η EC-SOD (εξωκυτταρική δισμουτάση του υπεροξειδίου) απαιτεί χαλκό-ψευδάργυρο σαν συμπαράγοντα και βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο (Zelko et al., 2002).

Ο μηχανισμός δράσης του kresoxim-methyl βασίζεται στην παρεμπόδιση του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας. Στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα μιτοχονδριακού υπεροξειδικού ανιόντος σημείωσαν σημαντικές ανόδους στην μεγαλύτερη συγκέντρωση μυκητοκτόνου και στις δύο κυτταρικές σειρές (Γράφημα 4.13). Ειδικότερα στα Vero παρατηρήθηκαν μεγάλες αυξήσεις στις 2 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που ανέρχονται σε άνοδο έως και 70%. Το σύμπλοκο III της αναπνευστικής αλυσίδας αποτελεί την κύρια πηγή παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου κατά την διαδικασία της αναπνοής (Trumpower, 2002; Andreyev et al., 2005) και τα σύμπλοκα I και III παράγουν κυρίως O_2^- (Turrens, 1997). Οι Rogers et al., 2001 παρατήρησαν πως έκθεση πνευμονικών επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων σε αντιμυκίνη A και myxothiazole, δύο επίσης αναστολείς του συμπλόκου III στα μιτοχόνδρια, έδειξε δραματική αναστολή στα TNF-α επαγόμενα επίπεδα του MnSOD mRNA. Επιπλέον η έκθεση σε αντιμυκίνη A, μεταλλαγμένων ινοβλαστών ποντικού LA9, ανθεκτικών στην αντιμυκίνη A στο κυτόχρωμα bc (σύμπλοκο III), δεν έδειξε την παραπάνω αναστολή (Rogers et al., 2001). Στην παρούσα μελέτη τα αποτελέσματα SOD (Γράφημα 4.9) και μιτοχονδριακού υπεροξειδικού ανιόντος (Γράφημα 4.13) εμφάνισαν ισχυρή αρνητική συσχέτιση $r=-0.89$ και $r=-0.99$ για τα N2a και Vero αντίστοιχα (πίνακας 5.1), επιπλέον καθώς εκτιμήθηκε η συνολική δραστικότητα των ενδοκυτταρικών SOD η μείωση που παρατηρήθηκε στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του kresoxim-methyl στα N2a και Vero θα μπορούσε να οφείλεται σε μείωση της MnSOD στα μιτοχόνδρια.

Η CAT εντοπίζεται αποκλειστικά στα υπεροξεισώματα κυττάρων θηλαστικών, με πιθανό κύριο ρόλο την απομάκρυνση του H_2O_2 που παράγεται κατά τη διάρκεια της οξειδωσης των λιπαρών οξέων. Οι επιπτώσεις της CAT στο κυτοσολικό H_2O_2 βασίζονται στη διάχυση του σε αυτά τα οργανίδια. Επιπλέον, παρά τον υψηλό αριθμό ανακύκλωσης της (turnover number), η καταλάση δεν είναι αποτελεσματική σε χαμηλά επίπεδα H_2O_2 , διότι είναι δύσκολο να κορεστεί με H_2O_2 καθώς για την κατάλυση απαιτείται η αλληλεπίδραση δύο μορίων H_2O_2 σε μια μόνο ενεργό θέση, κάτι λιγότερο πιθανό σε χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 (Gutteridge & Halliwell, 2000). Ως εκ τούτου, η καταλάση δεν αναμένεται να παίξει σημαντικό ρόλο στην εξάλειψη χαμηλών επιπέδων H_2O_2 . Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια επίπεδα του H_2O_2 κυττάρων N2a μετά την έκθεση τους στο μυκητοκτόνο (Γραφήματα 4.11 και 4.12) γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει τις μη-μεταβολές στην CAT (Γράφημα 4.6).

Όσον αφορά τις μειώσεις της CAT στα κύτταρα Vero, θα πρέπει να σημειωθεί πως συνοδεύονται από μια στατιστικά σημαντική και μεγάλη αύξηση των επιπέδων εξωκυτταρικού H_2O_2 με ισχυρά αρνητικό συντελεστή συσχέτισης $r=-0.95$, (πίνακας 5.1). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η καταλάση ρυθμίζεται εκτενώς από τις αποκρίσεις των κυττάρων στο εξωκυτταρικό H_2O_2 μέσω των κυτταροπλασματικών κινασών της τυροσίνης (Non Receptor-NRPTKs) c-Abl και Arg, και προτείνουν ένα μοντέλο στο οποίο οι c-Abl και Arg προάγουν την αποδόμηση του ενζύμου κάτω από υψηλά επίπεδα H_2O_2 (Sun et al., 2000; Cao et al., 2003a; Cao et al., 2003b).

Η αδρανοποίηση της GPx, η οποία παρατηρήθηκε και στις δύο κυτταρικές σειρές (Γράφημα 4.7), έχει δειχθεί να οφείλεται σε νιτρικά οξείδια ή καρβονύλια και σε περιπτώσεις in vivo μελετών, αλλά και σε κυτταρικές καλλιέργειες (Miyamoto et al., 2003). Ελάττωση της δραστηριότητας της GPx μπορεί να οφείλεται στην αδρανοποίηση του ενζύμου από τα αυξημένα επίπεδα ROS ή στην μειωμένη διαθεσιμότητα του υποστρώματος του (GSH) (Uguchukin et al., 2006; Walshe et al., 2007). Υπό φυσιολογικές συνθήκες το καταλυτικό κέντρο της GPx, που αντιπροσωπεύεται από τη χαρακτηριστική ομάδα σεληνόλης E-SeH, προσδίδει στο άτομο του σεληνίου μια ισχυρή πυρηνοφιλία προς την αντίδραση με υπεροξειδία για την παραγωγή του αντίστοιχου οξέος E-SeOH (Roy et al., 2005). Είναι γνωστό ότι παρουσία οξειδωτικού στρες το σεληνικό οξύ που σχηματίζεται αντιδρά ραγδαία με τον συμπάραγοντα γλουταθειόνης (GSH) και αναγεννάται μέσω του σχηματισμού ενός συμπλόκου, το οποίο με τη σειρά του ανάγεται μέσω της NADPH αναγωγής, κλείνοντας των οξειδοαναγωγικό κύκλο της GPx. Συμφώνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, κάτω από συνθήκες εξάντλησης της GSH ή παρουσία αυξημένων επιπέδων οξειδωτικών μέσων, το οξύ E-SeOH που παράγεται σε απόκριση της

οξειδωσης της GPx δύναται να υποστεί περαιτέρω οξειδωση σε E-SeO₂H και E-SeO₃H (Bhabak et al., 2008). Οι δύο αυτές μορφές δεν μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με τη GSH με αποτέλεσμα την διαταραχή του καταλυτικού μονοπατιού της GPx. Επιπλέον οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν ισχυρή οξειδωτική δράση. Στην παρούσα μελέτη για τη περίπτωση των κυττάρων Vero παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων H₂O₂ (Γράφημα 4.12) και ταυτόχρονη μείωση της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (Γράφημα 4.9) μετά από την έκθεση στο μυκητοκτόνο. Οι δύο αυτές παρατηρήσεις σε συνδυασμό με την μείωση της δραστηριότητας της GPx συμφωνούν με τις παραπάνω μελέτες. Οι συντελεστές της GPx με το H₂O₂ είναι r=-0.97 για τα Vero, ενώ οι συντελεστές της GPx με τη GSH είναι r=0.88.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι μεταβολές στα επίπεδα GSH συνιστούν μεταπτώσεις στην οξειδωτική ισορροπία των κυττάρων. Το τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης αποτελεί την πιο άφθονη μη πρωτεϊνική πηγή θειόλης στα κύτταρα και είναι ένα σημαντικό ενδοκυττάριο αντιοξειδωτικό που προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, βρίσκεται στους ιστούς θηλαστικών σε συγκεντρώσεις της τάξης των nmol ανά γραμμάριο, με μεγαλύτερα επίπεδα στο συκώτι και το αίμα και μικρότερα στους πνεύμονες και τον εγκέφαλο (Giustarini et al., 2013). Μεγάλο ποσοστό της ενδοκυττάριας GSH απαντάται στο κυτοσόλιο (Lu, 2000) ενώ ένα ποσοστό περίπου 20% βρίσκεται στα μιτοχόνδρια για την προστασία από τα ROS που παράγονται ως υποπροϊόντα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Livingstone & Davis, 2007). Η GSH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα, στον μεταβολισμό θρεπτικών συστατικών και κυτταρικών γεγονότων (Wu et al., 2004). Η κύρια ρύθμιση των επιπέδων GSH πραγματοποιείται μέσω αλλαγών στη δραστηριότητα και τη γονιδιακή έκφραση του ενζύμου συνθετάση της γ-γλουτάμυλο-κυστεΐνης (GCS). (Lu et al., 2009). Η GSH ασκεί τη δράση της με το να δίνει ένα άτομο υδρογόνου σε έναν μεγάλο αριθμό ριζών (Yu, 1994), χρησιμεύοντας ως υπόστρωμα για την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) (Meister & Anderson, 1983) και ανάγοντας άλλα αντιοξειδωτικά στο κύτταρο όπως η βιταμίνη E (Reddy et al., 1982). Τα επίπεδα της GSH μειώνονται σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες (Lu, 2000). Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι τα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH μετά την επώαση με το μυκητοκτόνο μειώθηκαν για τις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (1μg/ml και 2μg/ml) κατά 8.5% και 14.5% στο νευροβλάστωμα N2a και κατά 22.8% και 29.1% στους ινοβλάστες Vero (Γράφημα 4.9). Λόγω των καταλοίπων κυστεΐνης, η GSH οξειδώνεται μη ενζυμικά σε GSSG από ηλεκτρόφιλες ουσίες (π.χ. ελεύθερες ρίζες και

δραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου). Η εκροή GSSG από το κύτταρο συμβάλλει στην απώλεια της ενδοκυτταρικής GSH (Wu et al., 2004).

Τέλος, ένας ακόμα δείκτης που σχετίζεται με την αντίδραση των κυττάρων σε οξειδωτικά ερεθίσματα και μελετήθηκε στην παρούσα εργασία είναι τα επίπεδα οξειδωσης λιπιδίων μέσω μέτρησης μηλονικής διαλδεύδης (MDA). Η MDA αυξήθηκε στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και στις δύο κυτταρικές σειρές (Γράφημα 4.10), ενισχύοντας τα μέχρι τώρα αποτελέσματα για αυξημένη ύπαρξη ROS, τα οποία προκαλούν υπεροξειδωτική βλάβη των λιπιδίων. Η λιπιδική υπεροξειδωση αλλάζει τη ρευστότητα των κυτταρικών μεμβρανών, μειώνει την ικανότητα διατήρησης μιας εξισορροπημένης βαθμίδας συγκέντρωσης και αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης (Radak et al., 1999). Συνεπώς, είναι πιθανό να εντοπίσουμε απώλεια ενδοκυτταρικών υγρών, μείωση της μεταφοράς ηλεκτρονίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο και αλλαγές στις μιτοχονδριακές λειτουργίες (Jackson & O'Farrell, 1993). Στην παρούσα μελέτη, στην περίπτωση των Vero, παράλληλα με την λιπιδιακή υπεροξειδωση παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά εκκρινόμενου H_2O_2 , αλλαγές στο ενδοκυτταρικό $[Ca^{2+}]$ και μείωση του μιτοχονδριακού δυναμικού (Γραφήματα 4.10, 4.12, 4.16 και 4.18).

Kresoxim-methyl και απόπτωση

Οι μιτοχονδριακές βλάβες και δυσλειτουργίες είναι βασικό χαρακτηριστικό του κυτταρικού θανάτου που μεσολαβείται από ROS (Green, 1998). Τα μιτοχόνδρια έχουν θεμελιώδη ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού θανάτου μέσω τριών κυρίως μηχανισμών: α) διακοπή της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και της παραγωγής ATP, β) απελευθέρωση πρωτεϊνών που ενεργοποιούν τις κασπάσες και γ) αλλοίωση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού, το οποίο οδηγεί στην παραγωγή ROS. Η παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ και η λιπιδική υπεροξειδωση που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη, αυξάνονται στην απόπτωση η οποία μπορεί να προκληθεί από χιλιάδες ερεθίσματα, αν και δεν είναι επιβεβαιωμένο ότι οδηγούν άμεσα σε αυτή (Wallace, 2001).

Ο πόρος μετάπτωσης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας, (mitochondria Permeability Transition Pore, mPTP) είναι ένα μη ειδικό πρωτεϊνικό κανάλι διαπερατό σε πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους (μεγέθους μέχρι 1500Da) και σε ιόντα. Αποτελείται από τις πρωτεΐνες: VDAC (Voltage Dependent Anion Channel), ANT (Adenine Nucleotide Translocator) και κυκλοφιλίνη D (Cyc-D, cyclophilin D) (Argaud et al., 2005). Το οξειδωτικό stress ή η κυτταροπλασματική υπερφόρτωση σε ιόντα ασβεστίου είναι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία του πόρου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού

(Zorov et al., 2000; Halestrap, 2006). Οι δύο αυτές αλλαγές σε $[Ca^{2+}]$ και $\Delta\psi_{mt}$ παρατηρήθηκαν και στην παρούσα μελέτη μετά την έκθεση κυττάρων Vero στο μυκητοκτόνο και εμφάνισαν ισχυρή αρνητική συσχέτιση $r=-0.99$ (πίνακας 5.1) καθώς υπήρξε αύξηση του $[Ca^{2+}]$ και ταυτόχρονη μείωση του $\Delta\psi_{mt}$ (Γραφήματα 4.16 και 4.18). Το όριο των επιπέδων οξειδωτικού stress που απαιτούνται για αυτήν την ενεργοποίηση φαίνεται να είναι χαμηλότερο στα καταπονημένα μιτοχόνδρια. Η ενεργοποίηση του πόρου οδηγεί στη διόγκωση της μιτοχονδριακής θεμέλιας ουσίας (matrix) και την απελευθέρωση κυτοχρώματος c και άλλων παραγόντων, με τελικό αποτέλεσμα την απόπτωση.

Οι βιολογικές δράσεις του NO είναι αλληλοσυγκρουόμενες με πληθώρα μελετών να καταδεικνύει την προστατευτική δράση του NO αλλά και με πολλές μελέτες που υποδεικνύουν τοξικές δράσεις του ενδογενώς παραγόμενου NO (Wink et al., 1996; Wink et al., 1998; Grisham et al., 1999). Το NO παράγεται από τις συνθάσες του μονοξειδίου του αζώτου (NOS), οι οποίες αποτελούν μια οικογένεια τριών ισοενζύμων, που έχουν διαφορετική κατανομή στους διάφορους ιστούς, καθώς και διακριτούς ρόλους (nNOS, eNOS, iNOS). Την τελευταία 15ετία έχει αναφερθεί η ύπαρξη μιας μιτοχονδριακής NOS (mtNOS), ενός Ca^{2+} εξαρτημένου ενζύμου που παίζει σημαντικό ρόλο στην βιοενεργητική των μιτοχονδρίων (Giulivi et al., 1998; Elfering et al., 2002) και πιθανά εμπλέκεται και στην απόπτωση. Συμφώνα με τους Dedkova & Blatter, 2005 το μιτοχονδριακό μεμβρανικό δυναμικό αλληλεπιδρά με το NO, στην μελέτη τους αναφέρουν πως το εξωγενώς παρεχόμενο NO μείωσε το μιτοχονδριακό μεμβρανικό ενδοθηλιακών κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη το μιτοχονδριακό μεμβρανικό μειώθηκε στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου, ενώ τα επίπεδα NO δεν αυξήθηκαν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, εκτός από την μεγαλύτερη συγκέντρωση μυκητοκτόνου στα Vero (Γραφήματα 4.18 και 4.17).

Ένα κύτταρο μπορεί να οδηγηθεί σε απόπτωση μέσω δύο οδών, την εξωγενή, που επάγεται από μόρια θανάτου (TNF- α , λεμφοτοξίνη κ.α.) τα οποία δεσμεύονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς και την ενδογενή, που επάγεται από στρεσογόνα σήματα (έλλειψη αυξητικών παραγόντων, καταστροφή DNA) τα οποία προκαλούν την απελευθέρωση από τα μιτοχόνδρια του κυτταροχρώματος-c και άλλων αποπτωτικών παραγόντων. Τόσο η ενδογενής όσο και η εξωγενής οδός καταλήγουν στην ενεργοποίηση μιας οικογένειας πρωτεασών που ονομάζονται κασπάσες. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η πέψη του DNA, η αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και της πυρηνικής μεμβράνης και ο κατακερματισμός των κυττάρων (Elmore, 2007). Στην παρούσα μελέτη η έκθεση στο μυκητοκτόνο δεν έδειξε να ενεργοποιεί το

μονοπάτι των κασπασών με βάση μετρήσεις της κασπάσης-3 (Γράφημα 4.15), της κεντρικής αποπτωτικής ενδονουκλεάσης στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Σαν συνέπεια της μη ενεργοποίησης των κασπασών, δεν παρατηρήθηκε ούτε κατακερματισμός DNA (Γράφημα 4.14).

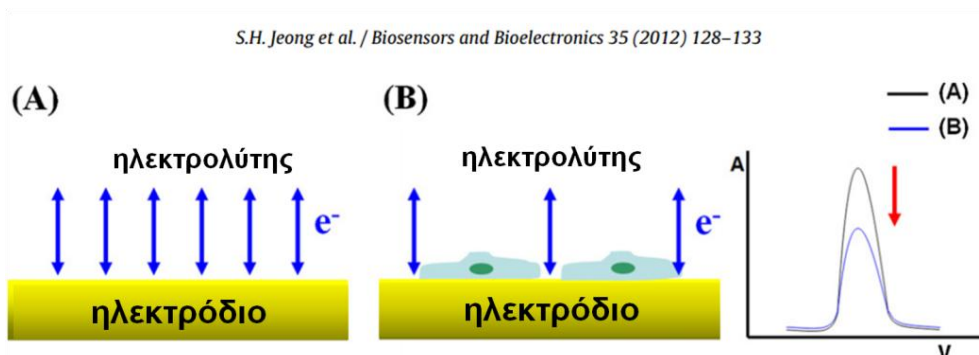
Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η 24h επώαση με το μυκητοκτόνο δεν επάγει την απόπτωση. Ωστόσο, οι μεταβολές σε συγκεντρώσεις ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Γράφημα 4.16) σε συνάρτηση με την απώλεια του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού, ιδιαίτερα για τα κύτταρα Vero (Γράφημα 4.18), θα μπορούσαν να ερμηνευτούν ως πολύ αρχικά στάδια ενεργοποίησης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

Κυτταρικός βιοαισθητήρας

Η κατασκευή του κυτταρικού βιοαισθητήρα βασίστηκε στην προσκόλληση και καλλιέργεια των δύο κυτταρικών σειρών σε ηλεκτρόδια από το βιοσυμβατό και ηλεκτρικά αγώγιμο πολυμερές PEDOT (Εικόνες 3.11 και 4.4). Η κυτταρική προσκόλληση αποτελεί σημαντική παράμετρο της βιοσυμβατότητας των υλικών. Στην παρούσα μελέτη και οι δύο σειρές κυττάρων επέδειξαν ικανοποιητικά ποσοστά προσκόλλησης και βιωσιμότητας έναντι του πολυμερούς (Γράφημα 4.19). Η βιοσυμβατότητα του PEDOT επιδεικνύεται συνεχώς μέσω του αυξανόμενου αριθμού επιστημονικών μελετών τα τελευταία χρόνια. Οι τύποι κυττάρων που εμφανίζονται συμβατοί με το PEDOT περιλαμβάνουν κύτταρα νευρικά (Asplund et al., 2012), ηπατικά, ινοβλάστες (Luo et al., 2008) και κερατινοκύτταρα (Stewart et al., 2013). Στην παρούσα μελέτη τα ποσοστά κυτταρικής προσκόλλησης και βιωσιμότητας κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα με αυτά των εμπορικών πλακιδίων και δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Γράφημα 4.19). Ωστόσο τα κύτταρα Vero διατήρησαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, σε αντίθεση με τα N2a που εμφάνισαν μορφολογία χαλαρής προσκόλλησης. Η αλληλεπίδραση κυττάρων Vero με το πολυμερές έχει μελετηθεί, με το πολυμερές να παρουσιάζει ποσοστά βιωσιμότητας παρόμοια ή ακόμα και καλύτερα από αυτά των συμβατικών πλακιδίων κυτταροκαλλιέργειας (Bendrea et al., 2013; Fabregat et al., 2013).

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα που χαρακτηρίζει το πολυμερές PEDOT επέτρεψε την χρησιμοποίησή του μαζί με κύτταρα σε ηλεκτροχημικούς πειραματισμούς, δρώντας σαν δευτερεύων μεταγωγέας σήματος του κυτταρικού βιοαισθητήρα. Η προσκόλληση κυττάρων στην επιφάνεια του πολυμερούς φάνηκε να επηρεάζει το ηλεκτροχημικό του αποτύπωμα μετά από κυκλική βολταμετρία (Γράφημα 4.27). Η δημιουργία κυτταρικής μονοστοιβάδας πάνω στο ηλεκτρόδιο μειώνει τις εντάσεις ρεύματος (Εικόνα 5.1.) καθώς η εμπέδηση των επικαλυμμένων ηλεκτροδίων αυξάνεται (Jeong

et al., 2012). Η επίδραση των φαινομένων πρόσδεσης στην αντίσταση μεταφοράς ηλεκτρονίων, βασίζεται στο μόριο οξειδωαναγωγής. Η πρόσδεση των κυττάρων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου μειώνει τις εντάσεις ρεύματος, λόγω της παρεμβολής της κυτταρικής στοιβάδας μεταξύ του οξειδωαναγωγικού παράγοντα (ηλεκτρολυτικό διάλυμα) και του ηλεκτροδίου (Xing et al., 2008; Strehlitz et al., 2008).



Εικόνα 5.1: Διαφοροποιήσεις στη ροή ηλεκτρονίων και ένταση ρεύματος κενών και επικαλυμμένων με κύτταρα ηλεκτροδίων, προσαρμογή από Jeong et al., 2013.

Η αλλαγή αυτή αποτυπώθηκε μέσω μεταβολής της ειδικής χωρητικότητας των ηλεκτροδίων (Cs) (Γράφημα 4.27). Ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με την Cs του ηλεκτροδίου, με τα κύτταρα Vero να εμφανίζουν καλύτερη γραμμικότητα έναντι των N2a (Γράφημα 4.29). Η επίδραση του kresoxim-methyl στη βιωσιμότητα και στις κυτταρικές διεργασίες αποτυπώθηκε και στην ηλεκτροχημική αντίδραση των ηλεκτροδίων. Καθώς η επώαση με το μυκητοκτόνο επηρεάζει τον αριθμό των κυττάρων αλλά και άλλες κυτταρικές λειτουργίες, η απόκριση των ηλεκτροδίων παρουσίασε θετική γραμμική συσχέτιση με τις συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου με $R^2=0.63$ για τα N2a και $R^2=0.87$ για τα Vero (Γράφημα 4.30). Συμπερασματικά τα κύτταρα Vero εμφάνισαν ανώτερη απόδοση στην κατασκευή του βιοαισθητήρα και λαμβάνοντας υπόψη τη συνολική βιοχημική τους απόκριση στο μυκητοκτόνο, επιλέχθηκαν για μετα-μεταγραφική τροποποίηση με στόχο τη μείωση της αποτοξινωτικής και αντιοξειδωτικής άμυνας τους και κατά συνέπεια την αύξηση της τοξικότητας του μυκητοκτόνου και ταυτόχρονης ευαισθησίας του βιοαισθητήρα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μειω-ρύθμιση της συσσώρευσης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 σε κύτταρα Vero, μέσω τεχνολογίας RNAi.

Μετα-μεταγραφική τροποποίηση

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη ενός πολύπλοκου κυτταρικού μηχανισμού σίγησης γονιδίων άρχισαν να εμφανίζονται τα τελευταία 15 χρόνια. Έρευνες σε φυτά, σκώληκες και μύγες έδειξαν ότι η εισαγωγή δίκλωνου RNA (dsRNA) οδηγούσε σε

εξειδικευμένη και επιλεκτική καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Πλέον έχει αποδειχθεί ότι σχεδόν όλα τα φυτικά και ζωικά κύτταρα διαθέτουν αυτόν τον εσωτερικό μηχανισμό για να καθιστούν σιωπηλά με φυσιολογικό τρόπο τα γονίδια ένα προς ένα. Ο μηχανισμός αυτός έχει εξελιχθεί αφενός για να προστατεύει τα κύτταρα από εχθρικά γονίδια (πχ. ιικά) και αφετέρου για να ρυθμίζει τη δραστηριότητα των φυσιολογικών γονιδίων κατά την ανάπτυξη (Vaishnav et al., 2010).

Ειδικότερα, η παρεμβολή RNA αποτελεί ένα βιοχημικό μονοπάτι που αποτελείται από ενζυμικά σύμπλοκα που συμμετέχουν στην επιλεκτική σίγηση της έκφρασης ενός συγκεκριμένου γονιδίου-στόχου. Οι επαναστατικές ανακαλύψεις των τελευταίων ετών για το RNAi δεν βοήθησαν μόνο στην κατανόηση της γονιδιακής ρύθμισης αλλά αμέσως χρησιμοποιήθηκαν ως εργαλεία σε όλο το φάσμα της λειτουργικής γονιδιωματικής, της ανάλυσης δηλαδή των δεδομένων που έχουν προκύψει από τα προγράμματα αποκωδικοποίησης των γονιδιωμάτων διάφορων οργανισμών. Έτσι, διάφορα πειράματα πχ. στα θηλαστικά, στοχεύουν στην επαγωγή του RNAi μέσω διαμόλυνσης με *in vitro* συντιθέμενα siRNAs. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η δημιουργία μη λειτουργικών φαινοτύπων (loss of function phenotypes) με στόχο την αποσαφήνιση της λειτουργίας των γονιδίων και των πρωτεϊνικών προϊόντων τους και γενικότερα τη μελέτη της κυτταρικής φυσιολογίας (Resnier et al., 2013).

Η επιλεκτική σίγηση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 αποδεικνύει την συμμετοχή του στους μηχανισμούς άμυνας έναντι αντιδραστικών ηλεκτροφιλικών ουσιών και δείχθηκε για πρώτη φορά με τη χρήση ακεταμινοφαίνης. Τα ποντίκια με απαλοιφή του Nrf2 εμφάνισαν μεγαλύτερη ηπατοτοξικότητα που εκδηλώθηκε με αυξημένα επίπεδα ALT και τροποποιημένη ηπατική ιστολογία μετά από έκθεση σε ακεταμινοφαίνη, συγκριτικά με αντίστοιχα ποντίκια αγρίου τύπου (Enomoto et al., 2001). Στην παρούσα μελέτη η μετα-μεταγραφική σίγηση του Nrf2 μέσω παροδικής διαμόλυνσης αύξησε την κυτταροτοξικότητα του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl έναντι νεφρικών κυττάρων Vero σε ποσοστά έως και 31.9%. Στον πίνακα 5.2 παρουσιάζονται τα ποσοστά βιωσιμότητα κυττάρων Vero με ή χωρίς μετά-μεταγραφική σίγηση του Nrf2, έναντι του kresoxim-methyl.

Πιο συγκεκριμένα, ο Nrf2 συμμετέχει στην ενεργοποίηση των ενζύμων φάσης II κατά την απάντηση των κυττάρων σε ξενοβιοτικά ερεθίσματα και ο ρόλος του στην προστασία από το οξειδωτικό στρες είναι σημαντικός καθώς τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) μπορούν να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA με επιβλαβή αποτελέσματα για τον οργανισμό και το κύτταρο. Σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη έχει δείχθει σε πειραματικό επίπεδο με τη χρήση εμβρυϊκών

ινοβλαστών ποντικού, ότι η απάλειψη του Nrf2 κάνει πιο ευαίσθητα τα κύτταρα στην επίδραση του ανιόντος υπεροξειδίου που παράγεται από το ζιζανιοκτόνο diquat (Osburn et al., 2006).

Πίνακας 5.2: Συγκριτικές βιωσιμότητες Vero με ή χωρίς μετά-μεταγραφική σίγηση του Nrf2, έναντι του kresoxim-methyl.

% βιωσιμότητα μάρτυρα	Kresoxim-methyl ($\mu\text{g/ml}$)				
	0.1	0.2	0.5	1	2
Vero	91,59 \pm 3,57	94,53 \pm 2,51	92,20 \pm 2,38	87,57 \pm 2,36	80,52 \pm 3,60
Vero (-Nrf2)	84,46 \pm 8,44	73,86 \pm 3,61	75,23 \pm 5,91	74,27 \pm 4,04	61,04 \pm 3,16
% μείωση βιωσιμότητας	8,4	27,9	22,5	17,9	31,9

Η χρησιμοποίηση των μετά-μεταγραφικά σιγασμένων κυττάρων Vero ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης του κυτταρικού βιοαισθητήρα αύξησε την ευαισθησία του έναντι του μυκητοκτόνου (Γράφημα 4.32). Η μεταβολή αυτή μπορεί να οφείλεται στην αλλαγή της κυτταρικής πυκνότητας λόγω αυξημένης τοξικότητας η οποία έδειξε πως επηρεάζει γραμμικά την Cs των ηλεκτροδίων. Εκτός από τον αριθμό των κυττάρων, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη πως η καλλιέργεια κυττάρων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου επιτρέπει την μεταξύ τους επικοινωνία μέσω δημιουργίας συνάψεων (gap junctions) που δρουν σαν δίαυλοι επικοινωνίας, με αποτέλεσμα τις ηλεκτρικές συνδέσεις γειτονικών κυττάρων. Όταν τα κύτταρα διεγείρονται, οι μεταξύ τους συνάψεις μπορούν να τα συνδέσουν ηλεκτρικά. Έτσι, στοιβάδες κυττάρων που υφίστανται βιοχημικές αλλαγές θα μπορούσαν, για ένα μικρό χρονικό διάστημα, να δράσουν σαν ημιαγωγοί (Kotnik & Miklavcic, 2000).

Καθώς τα τροποποιημένα κύτταρα στερούνται αμυντικών μηχανισμών έναντι του ξενοβιοτικού, είναι πιθανή η εμφάνιση αυξημένων επιπέδων ROS, τα οποία εκλυόμενα στο εξωκυτταρικό περιβάλλον είναι πιθανό να προκαλέσουν και οξειδώσεις στα βιολογικά υλικά που αποτελούν την διεπιφάνεια κυττάρων/PEDOT. Αυτά περιλαμβάνουν πρωτεΐνες κυτταρικής προσκόλλησης και στοιχεία του κυτταροσκελετού που επηρεάζουν την δύναμη προσκόλλησης των κυττάρων στα βιοϋλικά. Οι Wang et al., 2013 έδειξαν πως η έκθεση ενδοθηλιακών κυττάρων σε H_2O_2 μείωσε την κυτταρική προσκόλληση ρυθμίζοντας αρνητικά (downregulation) την έκφραση γονιδίων μορίων που σχετίζονται με την προσκόλληση όπως οι integrin

alpha 7 και cadherin 1 και 5. Σύμφωνα με τα βιοχημικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η έκθεση των κυττάρων Vero στο kresoxim-methyl, αύξησε τα επίπεδα του εξωκυτταρικού H_2O_2 σε μεγάλο βαθμό και βάση της δράσης του Nrf2 αναμένεται να είναι ακόμα μεγαλύτερα και στα τροποποιημένα Vero (Γράφημα 4.12).

Ο βελτιωμένος βιοαισθητήρας παρουσίασε υψηλή γραμμικότητα έναντι του μυκητοκτόνου ($R^2=0.94$) και θετική γραμμική συσχέτιση με την μέθοδο HPLC ($R^2=0.93$) (Γράφημα 4.33). Το γεγονός αυτό τον καθιστά πιθανό εργαλείο για μελέτες ουσιών με κυτταροτοξική δράση. Τα πλεονεκτήματα του παρόντα βιοαισθητήρα είναι η σημαντικά υψηλή επαναληψιμότητα του, καθώς η τυπική απόκλιση από το μέσο όρο των μετρήσεων δεν ξεπερνούσε το 2% καθώς και η πιθανή χρησιμοποίηση του σε μεγάλο εύρος εφαρμογών. Παρόλα αυτά η συγκεκριμένη διάταξη στην παρούσα μορφή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν εργαλείο εκτίμησης του γενικού τοξικολογικού προφίλ μιας ουσίας και όχι σαν όργανο ανίχνευσης της. Τα ζωικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη, και ειδικότερα τα μεταγραφικά τροποποιημένα παρουσιάζουν τοξικότητα σε ένα μεγάλο εύρος ουσιών. Αυτό το χαρακτηριστικό τους μπορεί να αποτελεί μειονέκτημα αλλά και πλεονέκτημα της μεθόδου, ανάλογα με τον τομέα έρευνας που θα χρησιμοποιηθεί. Μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση για τον συγκεκριμένο βιοαισθητήρα θα ήταν η μελέτη αντικαρκινικών φαρμάκων σε καρκινικές σειρές μετά από επιλεκτική σίγηση γονιδίων. Η κατασκευή του αισθητήρα επιτρέπει την χρησιμοποίηση διαφορετικών ειδών κυττάρων και είναι πιθανή ακόμα και η χρησιμοποίηση κυττάρων από βιοψίες ή δειγματοληψίες ασθενών με σκοπό την *in vitro* διάγνωση. Επιπλέον θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν εργαλείο στον τομέα των αντιοξειδωτικών βιοδραστικών προϊόντων ή τοξινών παρέχοντας μια πρώτη ένδειξη για την επίδραση τους σε κύτταρα θηλαστικών.

Η κατασκευή του αισθητήρα επιδέχεται πολλές βελτιώσεις με σκοπό την αυτοματοποίηση του καθώς πραγματοποιήθηκε με "εργαστηριακά μέσα" και στην παρούσα του μορφή απαιτεί προσεχτικούς χειρισμούς και γνώση εξειδικευμένων βιολογικών τεχνικών, γεγονός που τον καθιστά έναν "ακαδημαϊκό αισθητήρα".

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι βιολογικές επιδράσεις και ιδιαίτερα οι επιδράσεις στο οξειδωτικό στρες του μυκητοκτόνου kresoxim-methyl σε σειρές κυττάρων θηλαστικών N2a και Vero και πραγματοποιήθηκε κατασκευή κυτταρικού βιοαισθητήρα ο οποίος ανιχνεύει την κυτταροτοξικότητα του μυκητοκτόνου σε νεφρικούς ινοβλάστες Vero μετα-μεταγραφικά τροποποιημένους ώστε να εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία στα ξеноβιοτικά. Τα κύτταρα Vero έδειξαν μεγαλύτερη ευαισθησία το μυκητοκτόνο και έδωσαν θετικές αποκρίσεις σε περισσότερους δείκτες οξειδωτικού στρες σε σχέση με τα N2a. Επιπλέον, οι δόσεις του μυκητοκτόνου αν και υποθανάτιες (sub-lethal) μετέβαλαν το οξειδοαναγωγικό

ισοζύγιο και των δύο κυτταρικών σειρών. Τέλος πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων στο βιοσυμβατό και αγώγιμο πολυμερές PEDOT, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή κυτταρικού βιοαισθητήρα. Ο βιοαισθητήρας έδειξε καλή γραμμική συσχέτιση με το μυκητοκτόνο, η οποία βελτιώθηκε αισθητά μετά την εφαρμογή μετα-μεταγραφικής τροποποίησης κυττάρων Vero η οποία μείωσε την αντιοξειδωτική τους άμυνα και ως αποτέλεσμα αύξησε την ευαισθησία και γραμμικότητα του αισθητήρα.

6. Βιβλιογραφία

6. Βιβλιογραφία

Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., & Rezaiee, A. (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Review*, 10(6), RA141-RA147.

Abreu, I. A., & Cabelli, D. E. (2010). Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(2), 263-274.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, 105, 121-126.

Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A. M., & Cook, J. L. (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 274(37), 26071-26078.

Amdur, M. O., Doull, J., & Klaassen, C. D. (1993). Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 35(1), 76.

Andrade, C., Abdalla, D. S. P., Oliveira, M. D., Faulin, T., & Hering, V. (2011). *Biosensors for detection of Low-Density Lipoprotein and its modified forms*. INTECH Open Access Publisher.

Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., & Starkov, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 200-214.

Antunes, F., Han, D., & Cadenas, E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(9), 1260-1267.

Argaud, L., Gateau-Roesch, O., Raisky, O., Loufouat, J., Robert, D., & Ovize, M. (2005). Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*, 111(2), 194-197.

Asplund, M., Thaning, E., Lundberg, J., Sandberg-Nordqvist, A. C., Kostyszyn, B., & von Holst, H. (2009). Toxicity evaluation of PEDOT/biomolecular composites intended for neural communication electrodes. *Biomedical Materials*, 4(4), 045009.

Balba, H. (2007). Review of strobilurin fungicide chemicals. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 42(4), 441-451.

Banerjee, P., Mehta, A., & Shanthi, C. (2014). Investigation into the cyto-protective and wound healing properties of cryptic peptides from bovine Achilles tendon collagen. *Chemico-biological interactions*, 211, 1-10.

Banker, M. J., & Clark, T. H. (2008). Plasma/serum protein binding determinations. *Current drug metabolism*, 9(9), 854-859.

Battin, E. E., & Brumaghim, J. L. (2009). Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell biochemistry and biophysics*, 55(1), 1-23.

Bendrea, A. D., Fabregat, G., Torras, J., Maione, S., Cianga, L., del Valle, L. J., ... & Alemán, C. (2013). Polythiophene-g-poly (ethylene glycol) graft copolymers for electroactive scaffolds. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(33), 4135-4145.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Plays a Key Role in Protection Against Reactive Oxygen Species. *Biochemistry*. 5th.

Boelsterli, U. A. (2007). Mechanistic toxicology: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. CRC Press.

Brigelius-Flohé, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9), 951-965.

Buffenstein, R., Edrey, Y. H., Yang, T., & Mele, J. (2008). The oxidative stress theory of aging: embattled or invincible? Insights from non-traditional model organisms. *Age*, 30(2-3), 99-109.

Cao, C., Leng, Y., & Kufe, D. (2003a). Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29667-29675.

Cao, C., Leng, Y., Liu, X., Yi, Y., Li, P., & Kufe, D. (2003b). Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *Biochemistry*, 42(35), 10348-10353.

Carvalho, F.P. (2006), "Agriculture, pesticides, food security and food safety", *Environmental Science & Policy*, Vol. 9, 685-692.

Carvahlo (2006); European Commission (2009); European Crop Protection Association (2012)).

Chae, J. H., Ng, K. C., & Chen, G. Z. (2010). Nanostructured materials for the construction of asymmetrical supercapacitors. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part A: Journal of Power and Energy*, 224(4), 479-503.

Chippendale, T. W., Hu, B., El Haj, A. J., & Smith, D. (2012). A study of enzymatic activity in cell cultures via the analysis of volatile biomarkers. *Analyst*, 137(20), 4677-4685.

Conti, M., Morand, P. C., Levillain, P., & Lemonnier, A. (1991). Improved fluorometric determination of malonaldehyde. *Clinical Chemistry*, 37(7), 1273-1275.

- Cordero-Herrera, I., Martín, M. A., Goya, L., & Ramos, S. (2015). Cocoa flavonoids protect hepatic cells function against high glucose-induced oxidative stress. Relevance of MAPKs. *Molecular nutrition & food research*.
- Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991. *Concerning the placing of plant protection products on the market*. Official Journal L 230, 19/08/1991 p. 0001 0032.
- Cullinan, S. B., Gordan, J. D., Jin, J., Harper, J. W., & Diehl, J. A. (2004). The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Molecular and cellular biology*, 24(19), 8477-8486.
- D'Orazio, P. (2003). Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 334(1), 41-69.
- Daniel, S. L., Hartman, G. L., Wagner, E. D., & Plewa, M. J. (2007). Mammalian cell cytotoxicity analysis of soybean rust fungicides. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 78(6), 474-478.
- Daunert, S., Barrett, G., Feliciano, J. S., Shetty, R. S., Shrestha, S., & Smith-Spencer, W. (2000). Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. *Chemical Reviews*, 100(7), 2705-2738.
- Dedkova, E. N., & Blatter, L. A. (2005). Modulation of mitochondrial Ca²⁺ by nitric oxide in cultured bovine vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 289(4), C836-C845.
- Deubzer, B., Mayer, F., Kuci, Z., Niewisch, M., Merkel, G., Handgretinger, R., & Bruchelt, G. (2010). H₂O₂-mediated cytotoxicity of pharmacologic ascorbate concentrations to neuroblastoma cells: potential role of lactate and ferritin. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 25(6), 767-774.
- Dickinson, D. A., & Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology*, 64(5), 1019-1026.
- Dikalov, S., Griendling, K. K., & Harrison, D. G. (2007). Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension*, 49(4), 717-727.
- Dounousi, E., Papavasiliou, E., Makedou, A., Ioannou, K., Katopodis, K. P., Tselepis, A., ... & Tsakiris, D. (2006). Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *American journal of kidney diseases*, 48(5), 752-760.
- Eggs, B. R. (1996). *Biosensors: an introduction* (pp. 16-19). Chichester, UK.: Wiley.
- Gorton, L. (Ed.). (2005). *Biosensors and modern biospecific analytical techniques* (Vol. 44). Elsevier.

Elfering, S. L., Sarkela, T. M., & Giulivi, C. (2002). Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38079-38086.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

Enomoto, A., Itoh, K., Nagayoshi, E., Haruta, J., Kimura, T., O'Connor, T., ... & Yamamoto, M. (2001). High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicological Sciences*, 59(1), 169-177.

European Commission. (2009), "Fact Sheet: EU action on pesticides". Available at: http://ec.europa.eu/food/plant/plant_protection_products/index_en.htm (July 1 2012).

European Crop Protection Association, "FAQ: What are pesticides?" Available at: <http://www.ecpa.eu/faq> (October 2012).

European Food Safety Authority; Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance kresoxim-methyl. EFSA Journal 2010; 8(11): 1891[88 pp.]

Fabregat, G., Ballano, G., Armelin, E., del Valle, L. J., Cativiela, C., & Alemán, C. (2013). An electroactive and biologically responsive hybrid conjugate based on chemical similarity. *Polymer Chemistry*, 4(5), 1412-1424.

Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.

Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Current opinion in cell biology*, 10(2), 248-253.

Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & Van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5), 2315-2319.

Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science*, 123(24), 4195-4200.

Gao, A. H., Fu, Y. Y., Zhang, K. Z., Zhang, M., Jiang, H. W., Fan, L. X., ... & Li, J. Y. (2014). Azoxystrobin, a mitochondrial complex III Q_o site inhibitor, exerts beneficial metabolic effects in vivo and in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(7), 2212-2221.

Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., & Fenn, W. O. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science See Saiensu*, 119.

Ghafourifar, P., & Richter, C. (1997). Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS letters*, 418(3), 291-296.

- Giulivi, C., Poderoso, J. J., & Boveris, A. (1998). Production of nitric oxide by mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 11038-11043.
- Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Milzani, A., Fanti, P., & Rossi, R. (2013). Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nature protocols*, 8(9), 1660-1669.
- Gomes, P., Simão, S., Silva, E., Pinto, V., Amaral, J. S., Afonso, J., ... & Soares-da-Silva, P. (2009). Aging increases oxidative stress and renal expression of oxidant and antioxidant enzymes that are associated with an increased trend in systolic blood pressure. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(3), 138-145.
- Gottlieb, E., Armour, S. M., Harris, M. H., & Thompson, C. B. (2003). Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 10(6), 709-717.
- Grace, D., Abraham, S., Varghese, A., & Sathianarayanan, S. (2008). Absorption And Metabolism Of Xenobiotics: An Overview. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness*, 7(1).
- Granata, S., Zaza, G., Simone, S., Villani, G., Latorre, D., Pontrelli, P., ... & Pertosa, G. (2009). Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC genomics*, 10(1), 388.
- Green, D. R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*, 94(6), 695-698.
- Griffith, O. W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9), 922-935.
- Grisham, M. B., Jourd'Heuil, D., & Wink, D. A. (1999). I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 276(2), G315-G321.
- Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S. C., ... & Farina, M. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova*, 32(1), 169-174.
- Gülden, M., Dierickx, P., & Seibert, H. (2006). Validation of a prediction model for estimating serum concentrations of chemicals which are equivalent to toxic concentrations in vitro. *Toxicology in vitro*, 20(7), 1114-1124.
- Culotta, V. C., Yang, M., & O'Halloran, T. V. (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(7), 747-758.

Gutteridge, J., & Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 136-147.

Gurtu, V., Kain, S. R., & Zhang, G. (1997). Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Analytical biochemistry*, 251(1), 98-102.

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.

Halestrap, A. P. (2006). Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochemical Society Transactions*, 34(2), 232-237.

Harman, D. (1955). *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry* (pp. 298-300). Berkeley, CA: University of California Radiation Laboratory.

Harman, D. (1955). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.

Harris, C.A. (2002), "The regulation of pesticides in Europe – Directive 91/414", *Journal of Environmental Monitoring*, Vol. 4, 28-31.

Hogg, N. (1997, December). Free radicals in disease. In *Seminars in reproductive endocrinology* (Vol. 16, No. 4, pp. 241-248).

Howell, C. C., Semple, K. T., & Bending, G. D. (2014). Isolation and characterisation of azoxystrobin degrading bacteria from soil. *Chemosphere*, 95, 370-378.

Jeong, S. H., Lee, D. W., Kim, S., Kim, J., & Ku, B. (2012). A study of electrochemical biosensor for analysis of three-dimensional (3D) cell culture. *Biosensors and Bioelectronics*, 35(1), 128-133.

Kiilerich-Pedersen, K., Poulsen, C. R., Jain, T., & Rozlosnik, N. (2011). Polymer based biosensor for rapid electrochemical detection of virus infection of human cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 28(1), 386-392.

Kintzios, S., & P. Banerjee, P. (2015). Mammalian cell-based sensors for high throughput screening for detecting chemical residues, pathogens, and toxins in food, High Throughput Screening for Food Safety Assessment, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, edited by Arun K. Bhunia, Moon S. Kim and Chris R. Taitt, Woodhead Publishing, 123-146.

Kintzios, S. E. (2007). Cell-based biosensors in clinical chemistry. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 7(10), 1019-1026.

Kintzios, S., Marinopoulou, I., Moschopoulou, G., Mangana, O., Nomikou, K., Endo, K., ... & Simonian, A. (2006). Development of a novel, multi-analyte biosensor system

for assaying cell division: Identification of cell proliferation/death precursor events. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(7), 1365-1373.

Kintzios, S., Pistola, E., Panagiotopoulos, P., Bomsel, M., Alexandropoulos, N., Bem, F., ... & Levin, R. (2001). Bioelectric recognition assay (BERA). *Biosensors and Bioelectronics*, 16(4), 325-336.

Kobayashi, M., & Yamamoto, M. (2006). Nrf2–Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Advances in enzyme regulation*, 46(1), 113-140.

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30(6), 620-650.

Kohn, H. I., & Liversedge, M. (1944). On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 82(3), 292-300.

Kotnik, T., & Miklavčič, D. (2000). Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells. *Biophysical Journal*, 79(2), 670-679.

Koyun, A., Ahlatcolu, E., & Koca, Y. (2012). Biosensors and their principles. *A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones*.

Krieger-Hinck, N., Gustke, H., Valentiner, U., Mikecz, P., Buchert, R., Mester, J., & Schumacher, U. (2006). Visualisation of neuroblastoma growth in a Scid mouse model using [18F] FDG and [18F] FLT-PET. *Anticancer research*, 26(5A), 3467-3472.

Krieger, R. (Ed.). (2001). *Handbook of Pesticide Toxicology, Two-Volume Set: Principles and Agents (Vol. 1)*. Academic Press.

Kruman, I., Guo, Q., & Mattson, M. P. (1998). Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *Journal of neuroscience research*, 51(3), 293-308.

Kulesza, P. J., Skunik, M., Baranowska, B., Chojak, M., & Miecznikowski, K. (2008). Electrochemical Charging of Ultra-Thin Films of Conducting Polymer Supported Carbon Nanotubes and Particles: Application to Supercapacitors. *ECS Transactions*, 6(25), 245-256.

Lakhan, S. E., Kirchgessner, A., & Hofer, M. (2009). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med*, 7(1), 97.

- Lamers, M. L., Almeida, M. E., Vicente-Manzanares, M., Horwitz, A. F., & Santos, M. F. (2011). High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. *PLoS one*, 6(8), e22865.
- Landi, S. (2000). Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 463(3), 247-283.
- Lee, V. Y., McClintock, D. S., Santore, M. T., Budinger, G. S., & Chandel, N. S. (2002). Hypoxia sensitizes cells to nitric oxide-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 16067-16074.
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787-795.
- Luo, S. C., Mohamed Ali, E., Tansil, N. C., Yu, H. H., Gao, S., Kantchev, E. A., & Ying, J. Y. (2008). Poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)(PEDOT) nanobiointerfaces: thin, ultrasoother, and functionalized PEDOT films with in vitro and in vivo biocompatibility. *Langmuir*, 24(15), 8071-8077.
- Lu, F. C. (1996). Biotransformation of toxicants. *Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs and Risk Assessment*, eds. Lu FC and Kacew S, 27-39.
- Lynch, K., Fernandez, G., Pappalardo, A., & Peluso, J. J. (2000). Basic Fibroblast Growth Factor Inhibits Apoptosis of Spontaneously Immortalized Granulosa Cells by Regulating Intracellular Free Calcium Levels through a Protein Kinase C δ -Dependent Pathway 1. *Endocrinology*, 141(11), 4209-4217.
- Majewski, N., Nogueira, V., Bhaskar, P., Coy, P. E., Skeen, J. E., Gottlob, K., ... & Hay, N. (2004). Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Molecular cell*, 16(5), 819-830.
- Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & De Castro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, 32(8), 595-603
- Mates, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1), 83-104.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins, 3. J. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 17(1), 24-38.
- Martins, T. D., Ribeiro, A. C. C., Dias, D. L., Cavalcante, H. P. M., de Camargo, H. S., & da Costa Filho, P. A. (2013). *New insights on optical biosensors: techniques, construction and application*. INTECH Open Access Publisher.

- Mazzio, E. A., Soliman, Y. I., & Soliman, K. F. (2010). Variable toxicological response to the loss of OXPHOS through 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced mitochondrial damage and anoxia in diverse neural immortal cell lines. *Cell biology and toxicology*, 26(6), 527-539.
- McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine*, 108(8), 652-659.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- Μενκίσογλου, Ο. (1998), *Γεωργικά Φάρμακα*, Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Πήγασος 2000.
- Mohanty, S. P., & Kougiannos, E. (2006). Biosensors: a tutorial review. *Potentials, IEEE*, 25(2), 35-40.
- Molecular Probes Inc. (2009). Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide Protocol. (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp_22188.pdf), 1-7.
- Moschopoulou, G., & Kintzios, S. (2006). Application of “membrane-engineering” to bioelectric recognition cell sensors for the ultra-sensitive detection of superoxide radical: A novel biosensor principle. *Analytica chimica acta*, 573, 90-96.
- Moskovitz, J., Yim, M. B., & Chock, P. B. (2002). Free radicals and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2), 354-359.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1), 55-63.
- Μουρκίδου-Παπαδοπούλου, Ε. (1991), *Γεωργικά Φάρμακα*, Θεσσαλονίκη: Α.Π.Θ.Υπηρεσία Δημοσιευμάτων.
- Mouw, J. K., Ou, G., & Weaver, V. M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(12), 771-785.
- Munshi, A., Hobbs, M., & Meyn, R. E. (2005). Clonogenic cell survival assay. In *Chemosensitivity* (pp. 21-28). Humana Press.
- Newman, J. D., & Turner, A. P. (2005). Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12), 2435-2453.
- Nicholson, R. S. (1965). Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics. *Analytical Chemistry*, 37(11), 1351-1355.

Nohl, H., Gille, L., SchÖnheit, K., & Liu, Y. (1996). Conditions allowing redox-cycling ubiquinone in mitochondria to establish a direct redox couple with molecular oxygen. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(2), 207-213.

Νόμος 721/1997, δημοσιεύθηκε στο ΦΕΚ 298/7-10-1977, Περί εγκρίσεως κυκλοφορίας και ελέγχου των γεωργικών φαρμάκων, ως και ρυθμίσεως συναφών θεμάτων.

Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, 31(11), 1287-1312.

Oda, T., Morikawa, N., Saito, Y., Masuho, Y., & Matsumoto, S. I. (2000). Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36781-36786.

Omicinski, C. J., Heuvel, J. P. V., Perdew, G. H., & Peters, J. M. (2011). Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicological Sciences*, 120 (suppl 1), S49-S75.

Osburn, W. O., Wakabayashi, N., Misra, V., Nilles, T., Biswal, S., Trush, M. A., & Kensler, T. W. (2006). Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion. *Archives of biochemistry and biophysics*, 454(1), 7-15.

Osburn, W. O., & Kensler, T. W. (2008). Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659(1), 31-39.

Oubrahim, H., Stadtman, E. R., & Chock, P. B. (2001). Mitochondria play no roles in Mn (II)-induced apoptosis in HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9505-9510.

Parkinson, A. (2001) Biotransformation of xenobiotics, in *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*, 6th ed. (Klaassen, C. D., ed.), McGraw-Hill, New York, pp. 133–224

Patton, S., & ParkKurtz, G. W. (1955). A Note on the Thiobarbituric Acid Test for Milk Lipid Oxidation 1, 2. *Journal of Dairy Science*, 38(8), 901.

Peng, C., Zhou, X., Zhang, S., & Chen, G. (2011). Electrochemical Considerations in Supercapacitors with Nanocomposites. *ECS Transactions*, 33(27), 107-116.

Perepichka, I. F., & Perepichka, D. F. (2009). *Handbook of thiophene-based materials: applications in organic electronics and photonics* (pp. 1-131). Chichester, UK: Wiley.

Perl, A., Hanczko, R., Telarico, T., Oaks, Z., & Landas, S. (2011). Oxidative stress, inflammation and carcinogenesis are controlled through the pentose phosphate pathway by transaldolase. *Trends in molecular medicine*, 17(7), 395-403.

Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., & Rizzuto, R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, 27(50), 6407-6418.

Pinton, P., & Rizzuto, R. (2006). Bcl-2 and Ca^{2+} homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death & Differentiation*, 13(8), 1409-1418.

Porter, A. G., & Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation*, 6(2), 99-104.

Προεδρικό Διάταγμα 115/1997, Έγκριση, διάθεση στην αγορά και έλεγχος φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε συμμόρφωση προς την οδηγία 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου όπως έχει συμπληρωθεί, δημοσιεύθηκε στο ΦΕΚ 104/30-5/1997.

Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 2014.

Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125-1131.

Resnier, P., Montier, T., Mathieu, V., Benoit, J. P., & Passirani, C. (2013). A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer. *Biomaterials*, 34(27), 6429-6443.

Robinson, K. M., Janes, M. S., & Beckman, J. S. (2008). The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nature protocols*, 3(6), 941-947.

Robson, M. G., & Toscano, W. A. (Eds.). (2007). *Risk assessment for environmental health* (Vol. 2). John Wiley & Sons.

Rogers, R. J., Monnier, J. M., & Nick, H. S. (2001). TNF-alpha selectively induces MnSOD expression via mitochondria-to-nucleus signaling whereas IL-1beta utilizes an alternative pathway. *Journal of Biological Chemistry*.

Sanson, M., Ingueneau, C., Vindis, C., Thiers, J. C., Glock, Y., Rousseau, H., ... & Nègre-Salvayre, A. (2008). Oxygen-regulated protein-150 prevents calcium homeostasis deregulation and apoptosis induced by oxidized LDL in vascular cells. *Cell Death & Differentiation*, 15(8), 1255-1265.

Santi, C., Di Lorenzo, R., Battistelli, B., Scalera, C., Tidei, C., Dragone, V., ... & Tiecco, M. (2011). Bioinspired use of organoselenium catalysts. *ECSOC-15, CD-ROM edition*, ISBN, 3-906980.

Scheirer, W., and Merten O. W., "Instrumentation of animal cell culture reactors," in *Animal Cell Bioreactors*, C. S. Ho and D. I. C. Wang, Eds., pp. 405–443, Butterworth-Heinemann, Boston, Mass, USA, 1991.

Scrosati, B. (Ed.). (1993). *Applications of electroactive polymers* (Vol. 75). London: Chapman & Hall.

Sharma, S., Nemezc, S. K., Zhu, S., & Steele, V. E. (1997). Identification of chemopreventive agents by screening for induction of glutathione-S-transferase as a biomarker. *Methods in cell science*, 19 (1), 49-52.

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, 82(2), 291-295.

Souza Jr, F. G., Oliveira, G. E., & Lopes, M. C. (2012). Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials, and Their Composites, Blends and IPNS: v. 2–Cap. 22: Environmental Recovery by Magnetic Bio-Resi.

St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J., & Brand, M. D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 44784-44790.

Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of pathology*, 200(4), 448-464.

Starkov, A. A. (2010). Measurement of mitochondrial ROS production. In *Protein Misfolding and Cellular Stress in Disease and Aging* (pp. 245-255). Humana Press.

Stewart, E. M., Fabretto, M., Mueller, M., Molino, P. J., Griesser, H. J., Short, R. D., & Wallace, G. G. (2013). Cell attachment and proliferation on high conductivity PEDOT–glycol composites produced by vapour phase polymerisation. *Biomaterials Science*, 1(4), 368-378.

Strehlitz, B., Nikolaus, N., & Stoltenburg, R. (2008). Protein detection with aptamer biosensors. *Sensors*, 8(7), 4296-4307.

Squier, M. K., & Cohen, J. J. (2001). Standard quantitative assays for apoptosis. *Molecular biotechnology*, 19(3), 305-312.

Sun, X., Wu, F., Datta, R., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2000). Interaction between protein kinase C δ and the c-Abl tyrosine kinase in the cellular response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 275(11), 7470-7473.

Swain, G. M. (2007). Solid electrode materials: pretreatment and activation. *Handbook of Electrochemistry*, 1, 111-114.

Swift, L. M., & Sarvazyan, N. (2000). Localization of dichlorofluorescein in cardiac myocytes: implications for assessment of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 278(3), H982-H990.

Timbrell, J. A., & Marrs, T. C. (2009). Biotransformation of Xenobiotics. *General, Applied and Systems Toxicology*.

Tombal, B., Denmeade, S. R., & Isaacs, J. T. (1999). Assessment and validation of a microinjection method for kinetic analysis of $[Ca^{2+}]$ in individual cells undergoing apoptosis. *Cell calcium*, 25(1), 19-28.

Tong, K. I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., & Yamamoto, M. (2006). Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Molecular and Cellular Biology*, 26(8), 2887-2900.

Trumpower, B. L. (2002). A concerted, alternating sites mechanism of ubiquinol oxidation by the dimeric cytochrome bc 1 complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1555(1), 166-173.

Turrens, J. F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience reports*, 17(1), 3-8.

Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552(2), 335-344.

Vaishnav, A. K., Gollob, J., Gamba-Vitalo, C., Hutabarat, R., Sah, D., & Meyers, R. (2010). Review A status report on RNAi therapeutics. *Silence*, 1, 14-26.

Wallace, D. C. (2001). Mouse models for mitochondrial disease. *American journal of medical genetics*, 106(1), 71-93.

Wang, G., Zhang, L., & Zhang, J. (2012). A review of electrode materials for electrochemical supercapacitors. *Chemical Society Reviews*, 41(2), 797-828.

Wang, H., & Joseph, J. A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5), 612-616.

Wang, J. (2000). Survey and summary from DNA biosensors to gene chips. *Nucleic Acids Research*, 28(16), 3011-3016.

Wang, P., & Liu, Q. (2009). Cell-Based Biosensors. *Cell-based biosensors: principles and applications*. Artech House, 2009.

- Wang, W., Guo, S., Penchev, M., Ruiz, I., Bozhilov, K. N., Yan, D., ... & Ozkan, C. S. (2013). Three dimensional few layer graphene and carbon nanotube foam architectures for high fidelity supercapacitors. *Nano Energy*, 2 (2), 294-303.
- Wang, Y. (2009). Research progress on a novel conductive polymer-poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT). *Journal of Physics Conference Series*, 152 (1), 2023.
- Weber, D. S., Rocic, P., Mellis, A. M., Laude, K., Lyle, A. N., Harrison, D. G., & Griendling, K. K. (2005). Angiotensin II-induced hypertrophy is potentiated in mice overexpressing p22phox in vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 288(1), H37-H42.
- Welling, P. G. (1995). Differences between pharmacokinetics and toxicokinetics. *Toxicologic pathology*, 23(2), 143-147.
- Williams Jr, C. H. (1992). Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and mercuric ion reductase—a family of flavoenzyme transhydrogenases. *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*, 3, 121-211.
- Williams, P. L., James, R. C., & Roberts, S. M. (Eds.). (2003). *Principles of toxicology: environmental and industrial applications*. John Wiley & Sons.
- Wink, D. A., Hanbauer, I., Grisham, M. B., Laval, F., Nims, R. W., Laval, J., ... & Mitchell, J. B. (1996). Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. *Current topics in cellular regulation*, 34, 159-187.
- Wink, D. A., & Mitchell, J. B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(4), 434-456.
- Wu, Y., Zhang, X., Kang, X., Li, N., Wang, R., Hu, T., ... & Chen, S. (2013). Oxidative stress inhibits adhesion and transendothelial migration, and induces apoptosis and senescence of induced pluripotent stem cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 40(9), 626-634.
- Xing, J. Z., Zhu, L., Gabos, S., & Xie, L. (2006). Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity. *Toxicology in vitro*, 20(6), 995-1004.
- Yang, T. L. (2011). Chitin-based materials in tissue engineering: applications in soft tissue and epithelial organ. *International journal of molecular sciences*, 12(3), 1936-1963.
- Yang, Y. M., Noh, K., Han, C. Y., & Kim, S. G. (2010). Transactivation of genes encoding for phase II enzymes and phase III transporters by phytochemical antioxidants. *Molecules*, 15(9), 6332-6348.

Yang, Y., Sharma, R., Sharma, A., Awasthi, S., & Awasthi, Y. C. (2003). Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION*-, 50(2), 319-336.

Yarrow, J. C., Perlman, Z. E., Westwood, N. J., & Mitchison, T. J. (2004). A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC biotechnology*, 4(1), 21

Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337-349.

Zhang, S. Z., Lipsky, M. M., Trump, B. F., & Hsu, I. C. (1990). Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Cell Biology and Toxicology*, 6(2), 219-234.

Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., & Haugland, R. P. (1997). A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical biochemistry*, 253(2), 162-168.

Zorov, D. B., Filburn, C. R., Klotz, L. O., Zweier, J. L., & Sollott, S. J. (2000). Reactive oxygen species (Ros-Induced) Ros release a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *The Journal of experimental medicine*, 192(7), 1001-1014.