

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝ. ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜ. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΡΓ. ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

**“Προσδιορισμός μέσης θανατηφόρου συγκέντρωσης και εμβρυοτοξικής
δράσης φυσικών εκχυλισμάτων στο zebrafish”**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Πελαγία Π. Αναστασιάδου

Τεχνολόγος Ιχθυολόγος

Αθήνα, 2017

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Δρ Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα
Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό τμήμα Αθηνών

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝ. ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜ. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΡΓ. ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

**“Προσδιορισμός μέσης θανατηφόρου συγκέντρωσης και εμβρυοτοξικής
δράσης φυσικών εκχυλισμάτων στο zebrafish”**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Πελαγία Π. Αναστασιάδου

Τεχνολόγος Ιχθυολόγος

Αθήνα, 2017

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Δρ Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα
Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό τμήμα Αθηνών

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Προσδιορισμός μέσης θανατηφόρου συγκέντρωσης και εμβρυοτοξικής δράσης φυσικών εκχυλισμάτων στο zebrafish”

Πελαγία Π. Αναστασιάδου, Τεχνολόγος Ιχθυολόγος

Τριμελής επιτροπή

Πολυδεύκης Χατζόπουλος(Επιβλέπων)

Σταμάτης Ρήγας, Επικ. Καθηγητής, Εργαστήριο Φυσιολογίας & Μορφολογίας Φυτών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δημήτρης Μπέης, Ερευνητής Β΄, Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημίας Αθηνών, ΙΙΒΕΑΑ

Περίληψη

Η φύση είναι μια ανεξάντλητη πηγή χημικών μορίων με σημαντικές βιολογικές ιδιότητες, ποικιλία και πρωτοτυπία σε δομικά χαρακτηριστικά που είναι δύσκολο αν όχι αδύνατο να προσεγγιστούν από οποιοδήποτε συνθετικής χημείας εργαστήριο. Το γεγονός αυτό καθιστά τα φυσικά προϊόντα εξαιρετικά ενδιαφέροντα από ερευνητικής σκοπιάς για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών και εν γένει βιοδραστικών προϊόντων.

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αποτελεί ένα πολύ μικρό βήμα προς την κατεύθυνση αυτή. Αντικείμενο της αποτέλεσε ο έλεγχος έξι (6) επιμέρους κλασμάτων φυσικών εκχυλισμάτων, τα οποία έχουν απομονωθεί από το φυτό *Ασημοσορβιά* (*Sorbus umbellate*) της ελληνικής χλωρίδας. Στην εργασία αυτή, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτού του ελέγχου σε *in vivo* πειράματα στο zebrafish (*Danio rerio*). Το σύστημα αυτό, λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων που προσφέρει, αποτελεί ένα αναπτυξιακό μοντέλο που χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα τα τελευταία χρόνια. Οι υπό μελέτη ουσίες δηλαδή το εκχύλισμα (TE) και τα κλάσματα του (F4, F5, F6, F7, F8, F9) προστέθηκαν σε έμβρυα zebrafish και στη συνέχεια, ελέγχθηκε στις 96 ώρες η τοξικότητά τους για κάθε συγκέντρωση τους εκφρασμένη σε mg ουσίας ανά 1 ml υδατικού διαλύματος. Αφού υπολογίστηκε η τοξικότητά τους με μέτρηση της συγκέντρωσης στην οποία πεθαίνει το 50% (LC50) των πειραματοζώων, επιλέχθηκαν τρία κλάσματα ώστε να μελετηθεί η επίδραση τους στο ήπαρ και η ικανότητά τους να επάγουν ή να αναστέλλουν την αγγειογένεση στο μοντέλο-οργανισμό zebrafish.

Τα δεδομένα της θνησιμότητας των εμβρύων αναλύθηκαν με την ανάλυση

Probit.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε σαφές ότι το χόριο είναι πολύτιμο για την προστασία των εμβρύων δεδομένου ότι οι τιμές LC50 & LC95 ήταν πολύ μικρότερες στα έμβρυα των 24hpf στα οποία είχε αφαιρεθεί το χόριο σε σχέση με τις τιμές των LC50 & LC95 στα έμβρυα 3hpf στα οποία δεν είχε αφαιρεθεί το χόριο.

Με βάση τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι το κλάσμα F6 είχε σε έμβρυα 3hpf τις μεγαλύτερες LC50 & LC95 από τα υπόλοιπα πέντε κλάσματα και το αρχικό εκχύλισμα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε για το δεύτερο στόχο της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας, τη διερεύνηση δηλαδή των επιπτώσεων του στο ήπαρ και στην αγγειογένεση, αλλά δεν υπήρχε αρκετό υλικό για επεξεργασία. Επίσης, επιλέξαμε εκτός από το αρχικό εκχύλισμα να μελετήσουμε τα κλάσματα F5, F6, F7 & F9.

Λέξεις κλειδιά: φυσικά εκχυλίσματα, zebrafish, τοξική δράση

Summary

Nature is an unlimited source of biomolecules with important biological properties and unique structural features. These molecules are extremely difficult to be synthesized *ex vivo*. Owing to the biological impacts and effects, natural products are extremely interesting since they possess bioactive properties and could be developed as new medicinal drugs.

The main objective was to test seven (7) sub-fractions of natural extracts on the liver and angiogenesis. The extracts were isolated from the plant *Asimosorvia (Sorbus umbellate)* of Greek flora. In this study, we present the results of the *in vivo* testing experiments on zebrafish (*Danio rerio*). Due to the plethora of its advantages, zebrafish has emerged as a high-throughput but low-cost model organism and is widely used in research in recent years. The chemical molecules were added to zebrafish embryos and then tested for toxicity effects at 96 hours post fertilization. The toxicity of the molecules was assessed by measuring the concentration at which 50% of experimental animals died (LC50). Three fractions were selected to study their effect on the liver and their ability to induce or inhibit angiogenesis on zebrafish.

The data from this study showed that the chorion that surrounds zebrafish embryos protects them from exposure to chemical compounds. LC50 & LC95 were much lowest in embryos of 24 hpf that have been dechorionated, compared to the values of LC50 and LC95 in 3 hpf embryos, in which the chorion has not been removed. They were collected by using Probit analysis.

Based on the results of this study, we conclude that the F6 molecule showed the lowest values of LC50 and LC95 compared to the other five aliquots and the original extract. However, more work is needed to conclude any toxicity effects on liver and angiogenesis

Keywords: biomolecules, zebrafish, toxicity effects

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, του Κέντρου Κλινικής, Πειραματικής, Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας στο Ιδρύμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή κύριο Πολυδεύκη Χατζόπουλο, επιβλέποντα της συγκεκριμένης εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Δημήτρη Μπέη για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής του ομάδας καθώς επίσης και για την επιστημονική του καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου μετέφερε μέσα από την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας. Τους ευχαριστώ επίσης για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, τη συνεχή υποστήριξη και τις συμβουλές τους, που θα αποτελέσουν για εμένα οδηγό στη μετέπειτα επιστημονική μου πορεία.

Στο σημείο αυτό ευχαριστώ, τον Δρ Δημήτρη Μπέη, που με δέχτηκε στο εργαστήριο του δίνοντας μου την ευκαιρία να εξοικειωθώ με τις υψηλού επιπέδου ερευνητικές τεχνικές που πραγματοποιούνται σε αυτό.

Επιπροσθέτως θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διευθύντρια του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου όπου εργάζομαι τα τελευταία 25 χρόνια Δρ Κική Μαχαίρα για την διευκόλυνση που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης του μεταπτυχιακού μου.

Ευχαριστώ τον Δρ Παναγιώτη Τσακανίκα που με εντρίφισε στις νέες τεχνικές και ψηφιακές τεχνολογίες και με τη βοήθεια του κατάφερα να αναλύσω τα δεδομένα των πειραμάτων αυτής της εργασίας με έναν αλγόριθμο που ανέπτυξε σε περιβάλλον MATLAB, τις φίλες και

συναδέλφους μου Αιμιλία Μαρκέλλου, τη Ντέμη Νικολοπούλου και τη Δέσποινα Μπουρνελέ για τη στήριξη και ουσιαστική τους επιμέλεια στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων καθώς επίσης και τους Αναστασία Σπυροπούλου, Αγαθή Χαριστού, Κυριακοπούλου Κατερίνα, Κατσάνου Φένια, Μάριο Μειντάνη, Γιώργο Κολιόπουλο και Θανάση Γιατρόπουλο για την στήριξη που μου έδειξαν.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Παναγιώτη Κέφαλο, τη μεταδιδακτορικό ερευνήτρια Μαντώ Αγάλου καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Μπέη, Αντωνία Κατσούδα, Παναγιώτη Σαράντη και Νίκο Μαλισσόβα για την άριστη συνεργασία και τη βοήθεια που μου προσέφεραν και που με αντιμετώπισαν με διάθεση συνεργασίας και δε δίστασαν να μου παρέχουν βοήθεια σε λειτουργικά και πρακτικά ζητήματα που με απασχόλησαν καθημερινά στο χώρο του Εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κόρη μου Κάτια, το σύζυγο μου Στέλιο και τη μητέρα μου Καίτη, για την αμέριστη και με όλους τους τρόπους υποστήριξη, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, αλλιώς η εκπλήρωση αυτού του στόχου δεν θα ήταν δυνατή ούτε θα είχε την ίδια αξία.

<u>Περιεχόμενα</u>	Σελίδες
Περίληψη	8-9
Summary	9-10
1. Εισαγωγή	11-43
1.1 Περιγραφή του ζωικού μοντέλου zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	11
1.2 Κατάταξη – Ονοματολογία – Κατανομή του zebrafish	12
1.3 Γονιδίωμα του zebrafish	13
1.4 Μορφολογία του zebrafish	14-16
1.5 Αναπαραγωγή του οργανισμού zebrafish	16
1.6 Αναπτυξιακά στάδια του zebrafish	17-20
1.7 Διατροφή του zebrafish	21
1.8 Ασθένειες του zebrafish	21-22
1.9 Το zebrafish σαν πρότυπος οργανισμός στην έρευνα	22
1.10 Πλεονεκτήματα του zebrafish για τη χρήση του ως πρότυπος οργανισμός στην έρευνα	22-26
1.11 Τομείς της έρευνας που χρησιμοποιείται το zebrafish	26-29
1.11.1 Καρδιααγγειακό σύστημα	26
1.11.2 Αναγέννηση ιστών και οργάνων του zebrafish	27
1.11.3 Χρήση σε μελέτες καρκίνου	27
1.11.4 Ανοσολογία και Φαρμακευτική	27-28

1.11.5 Χρήση στη Γενετική – Αναπτυξιακή Βιολογία	28-29
1.12 Αγγειογένεση	29-35
1.12.1 Γενικές πληροφορίες	29-33
1.12.2 Ασθένειες που σχετίζονται με την αγγειογένεση	33-34
1.12.3 Αγγειογένεση ως θεραπευτικός στόχος	34-35
1.13 Ήπαρ	35
1.13.1 Γενικές πληροφορίες	35-36
1.13.2 Το ήπαρ στο zebrafish	36-39
1.14 Φυσικά εκχυλίσματα	39-41
1.14.1 Γενικές πληροφορίες	39-40
1.15 Χημικός Έλεγχος	41-42
1.16 Σκοπός	43
2. Υλικά - Μέθοδοι	43-60
2. 1. Πειραματόζωα	43-44
2.1.1 Συνθήκες διαβίωσης του zebrafish στις εγκαταστάσεις του ΙΙΒΕΑΑ	44-47
2.1.2 Διατροφή του zebrafish στο Εργαστήριο	47
2.1.2.1 Πρωϊνή διατροφή με Artemia salina	47-49
2.1.3. Αναπαραγωγή του zebrafish στο Εργαστήριο	49-51
2.2 Προσδιορισμός χημικού ελέγχου	51-54
2.2.1 Εγκυρότητα βιοδοκιμής	54
2.2.2 Διαλύματα βιοδοκιμής	54-55

2.2.3 Διαδικασία –Συνθήκες	55
2.2.4 Συγκεντρώσεις	55
2.2.5 Κατανομή των αυγών στις πλάκες 24 φρεατίων – πηγαδιών	56-57
2.2.6 Έναρξη της έκθεσης και διάρκεια της βιοδοκιμής	57-58
2.3 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	58-59
2.4 Λοιπά προγράμματα λογισμικού	60
2.5 Επεξεργασία και ανάλυση εικόνας	60-62
3 Αποτελέσματα	63-73
3.1 Θνησιμότητα των διάφορων εκχυλισμάτων	63-66
3.2 Επίδραση των εκχυλισμάτων στο ήπαρ και στην αγγειογένεση	67-73
4. Συζήτηση	74-78
5. Βιβλιογραφία	79-81

Περίληψη

Η φύση είναι μια ανεξάντλητη πηγή χημικών μορίων με σημαντικές βιολογικές ιδιότητες, ποικιλία και πρωτοτυπία σε δομικά χαρακτηριστικά που είναι δύσκολο αν όχι αδύνατο να προσεγγιστούν από οποιοδήποτε συνθετικής χημείας εργαστήριο. Το γεγονός αυτό καθιστά τα φυσικά προϊόντα εξαιρετικά ενδιαφέροντα από ερευνητικής σκοπιάς για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών και εν γένει βιοδραστικών προϊόντων.

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αποτελεί ένα πολύ μικρό βήμα προς την κατεύθυνση αυτή. Αντικείμενο της αποτέλεσε ο έλεγχος έξι (6) επιμέρους κλασμάτων φυσικών εκχυλισμάτων, τα οποία έχουν απομονωθεί από το φυτό *Ασημοσορβιά* (*Sorbus umbellate*) της ελληνικής χλωρίδας. Στην εργασία αυτή, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτού του ελέγχου σε *in vivo* πειράματα στο zebrafish (*Danio rerio*). Το σύστημα αυτό, λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων που προσφέρει, αποτελεί ένα αναπτυξιακό μοντέλο που χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα τα τελευταία χρόνια. Οι υπό μελέτη ουσίες δηλαδή το εκχύλισμα (TE) και τα κλάσματα του (F4, F5, F6, F7, F8, F9) προστέθηκαν σε έμβρυα zebrafish και στη συνέχεια, ελέγχθηκε στις 96 ώρες η τοξικότητα τους για κάθε συγκέντρωση τους εκφρασμένη σε mg ουσίας ανά 1 ml υδατικού διαλύματος. Αφού υπολογίστηκε η τοξικότητά τους με μέτρηση της συγκέντρωσης στην οποία πεθαίνει το 50% (LC50) των πειραματοζώων, επιλέχθηκαν τρία κλάσματα ώστε να μελετηθεί η επίδραση τους στο ήπαρ και η ικανότητά τους να επάγουν ή να αναστέλλουν την αγγειογένεση στο μοντέλο-οργανισμό zebrafish.

Τα δεδομένα της θνησιμότητας των εμβρύων αναλύθηκαν με την ανάλυση

Probit.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε σαφές ότι το χόριο είναι πολύτιμο για την προστασία των εμβρύων δεδομένου ότι οι τιμές LC50 & LC95 ήταν πολύ μικρότερες στα έμβρυα των 24hrf στα οποία είχε αφαιρεθεί το χόριο σε σχέση με τις τιμές των LC50 & LC95 στα έμβρυα 3hrf στα οποία δεν είχε αφαιρεθεί το χόριο.

Με βάση τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι το κλάσμα F6 είχε σε έμβρυα 3hrf τις μεγαλύτερες LC50 & LC95 από τα υπόλοιπα πέντε κλάσματα και το αρχικό εκχύλισμα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε για το δεύτερο στόχο της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας, τη διερεύνηση δηλαδή των επιπτώσεων του στο ήπαρ και στην αγγειογένεση, αλλά δεν υπήρχε αρκετό υλικό για επεξεργασία. Επίσης, επιλέξαμε εκτός από το αρχικό εκχύλισμα να μελετήσουμε τα κλάσματα F5, F6, F7 & F9.

Summary

Nature is an unlimited source of biomolecules with important biological properties and unique structural features. These molecules are extremely difficult to be synthesized *ex vivo*. Owing to the biological impacts and effects, natural products are extremely interesting since they possess bioactive properties and could be developed as new medicinal drugs.

The main objective was to test seven (7) sub-fractions of natural extracts on the liver and angiogenesis. The extracts were isolated from the plant *Asimosorvia (Sorbus umbellate)* of Greek flora. In this study, we present the results of the *in vivo* testing experiments on zebrafish (*Danio rerio*). Due to the plethora of its advantages, zebrafish has emerged as a high-throughput

but low-cost model organism and is widely used in research in recent years. The chemical molecules were added to zebrafish embryos and then tested for toxicity effects at 96 hours post fertilization. The toxicity of the molecules was assessed by measuring the concentration at which 50% of experimental animals died (LC50). Three fractions were selected to study their effect on the liver and their ability to induce or inhibit angiogenesis on zebrafish.

The data from this study showed that the chorion that surrounds zebrafish embryos protects them from exposure to chemical compounds. LC50 & LC95 were much lowest in embryos of 24 hpf that have been dechorionated, compared to the values of LC50 and LC95 in 3 hpf embryos, in which the chorion has not been removed. The were collected by using Probit analysis.

Based on the results of this study, we conclude that the F6 molecule showed the lowest values of LC50 and LC95 compared to the other five aliquots and the original extract. However, more work is needed to conclude any toxicity effects on liver and angiogenesis.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το ζωικό μοντέλο Zebrafish (*Danio rerio*) - Περιγραφή

Το zebrafish είναι ένας σπονδυλωτός υδρόβιος οργανισμός και αποτελεί ένα μοντέλο με πολλά πλεονεκτήματα όπως, μικρό γονιδίωμα, πλήρης αλληλούχηση του γονιδιώματός του, γενετικές μεταλλάξεις, εύκολες γενετικές διασταυρώσεις, μικρές χωροταξικές δεξαμενές για την ανάπτυξή του, αναπτυξιακή βιολογία, κ.α. Ιδιαίτερα όσον αφορά την μελέτη του καρδιαγγειακού συστήματος το zebrafish αποτελεί ένα σπουδαίο οργανισμό. Ο χρόνος ενηλικίωσης του είναι περίπου τρεις μήνες μετά τη γονιμοποίηση σε οργανισμούς υπό αιχμαλωσία. Η γονιμοποίηση των ωαρίων του zebrafish συμβαίνει εξωτερικά, και τα έμβρυα τα οποία αναπτύσσονται ταχύτατα, είναι διαφανή επιτρέποντας τη μη επεμβατική *in vivo* απεικόνιση. Επιπροσθέτως, τις πρώτες ημέρες της ζωής τους, τα έμβρυα δεν εξαρτώνται από ένα πλήρως λειτουργικό καρδιαγγειακό σύστημα, διευκολύνοντας έτσι τη μελέτη διαφορετικών καρδιαγγειακών φαινοτύπων οι οποίοι δεν είναι εφικτό να μελετηθούν σε θηλαστικά μοντέλα.



Εικόνα 1: άτομο zebrafish

1.2 Κατάταξη – Ονοματολογία – Κατανομή του Zebrafish

Το **zebrafish** (*Danio rerio*) είναι ένα τροπικό ψάρι του γλυκού νερού το οποίο ανήκει στην οικογένεια των **κυπρινοειδών**. (πιν. 1)

Έχει φυλογενετική σχέση με το είδος [Danio kyathit](#) και με το γένος *Devario*. Άλλα ονόματα με τα οποία είναι γνωστό το Zebrafish (λόγω των ραβδώσεων) είναι τα εξής: Brachydanio rerio, Leopard Danio, Striped danio, Zebra, Zebra danio. Αξίζει να σημειωθεί πως το όνομα Danio έχει προέλευση από την ιδιωματική γλώσσα των κατοίκων της Ινδίας και της Σρι Λάνκα. Από τώρα και κάθε αναφορά του στην υπόλοιπη εργασία θα αναφέρεται ως zebrafish.

Υπερβασίλειο	Eukaryota
Βασίλειο	Metazoa
Φύλο	Chordota
Υπόφυλο	Vertebrata (Craniata)
Ομοταξία	Actinopterygii
Υφομοταξία	Neopterygii (Teleostei)
Υπέρταξη	Ostariophysi
Τάξη	Cypriniformes
Οικογένεια	Cyprinidae
Γένος	Danio
Είδος	<i>Danio rerio</i>

Πίνακας 1: Ταξινόμηση του zebrafish

Το Zebrafish έχει ενδημική παρουσία στην περιοχή γύρω από τα Ιμαλάια, σε χώρες δηλαδή όπως είναι η Ινδία, το Μπουτάν, το Μπαγκλαντές, η Μιανμάρ, το Νεπάλ, το Πακιστάν. Επίσης, έχει εισαχθεί στην Κολομβία, στις Η.Π.Α., στην Ιαπωνία, στις Φιλιππίνες κ.α. (www.fishbase.org)

Η προέλευσή του είναι από το Γάγγειο ποταμό στην Ανατολική Ινδία και τα zebrafish έχουν ως ενδιαίτημα πέρα από τα ποτάμια, τα ρυάκια, τα κανάλια, τους τάφρους, τα λιμνάζοντα ύδατα, τα νερά με μικρή ροή ή καθόλου ροή περιλαμβανομένων και των ορυζώνων.

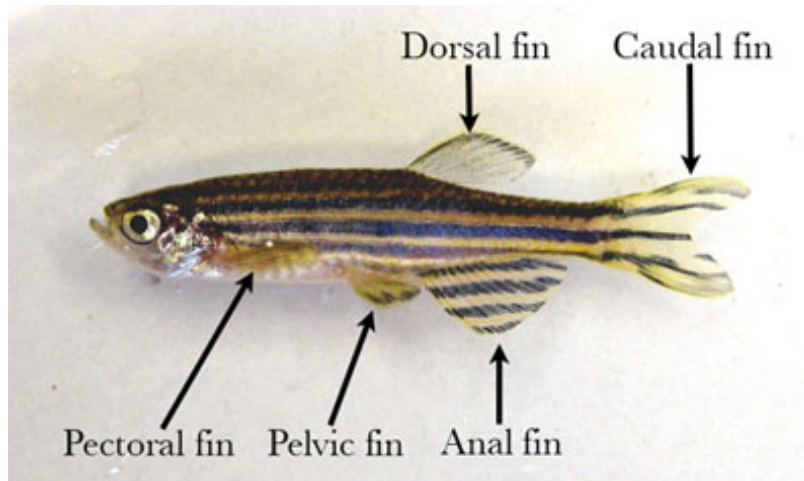
1.3 Γονιδίωμα του zebrafish

Το Zebrafish έχει 25 χρωμοσώματα, τα οποία περιλαμβάνουν 28.770 γονίδια που κωδικοποιούν για τουλάχιστον 27.404 πρωτεΐνες. Το μέγεθος του γονιδιώματός του είναι 1.412×10^9 bp (Kettleborough et al. 2013).

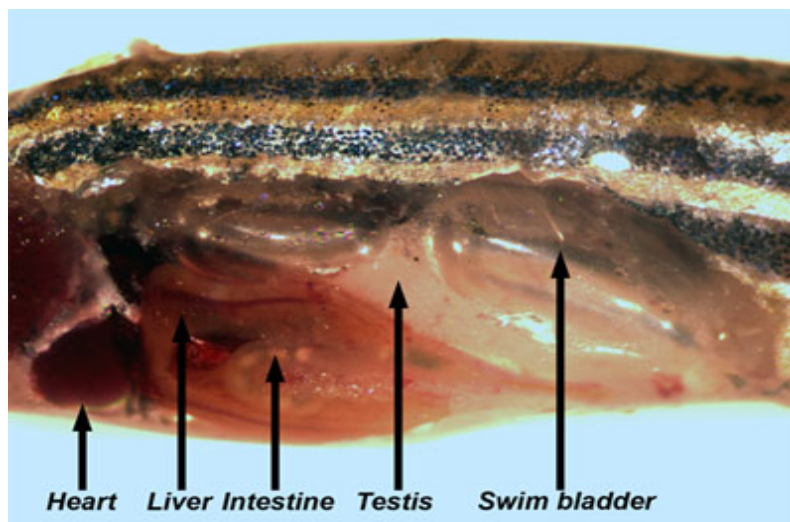
1.4 Μορφολογία του zebrafish

Το zebrafish, έχει λάβει την ονομασία του από τις 5 όμοιες, οριζόντιες μπλε γραμμές στο πλευρικό σώμα του, που εκτείνονται ως το ουριαίο πτερύγιο του. Όσον αφορά το χρωματισμό του, εμφανίζει ένα ιδιαίτερο μοτίβο εναλλαγής σκουρόχρωμων και ανοιχτόχρωμων οριζόντιων λωρίδων που εκτείνονται μέχρι το τέλος του ουραίου πτερυγίου. Στο μοτίβο αυτό, που θυμίζει τις ρίγες της ζέβρας, οφείλει η κοινή του ονομασία, zebrafish ή αλλιώς ψάρι-ζέβρα. Το μοτίβο οφείλεται σε τρεις τύπους κυττάρων: τα μελανοφόρα (σκούρα μπλε), τα ξανθοφόρα (χρυσά) και τα ιριδοφόρα (ιριδίζοντα) κύτταρα (Parichy 2006). Αρχικά διαμορφώνονται δύο κεντρικές λωρίδες και ακολούθως κατά την ανάπτυξη διατάσσονται οι επόμενες,

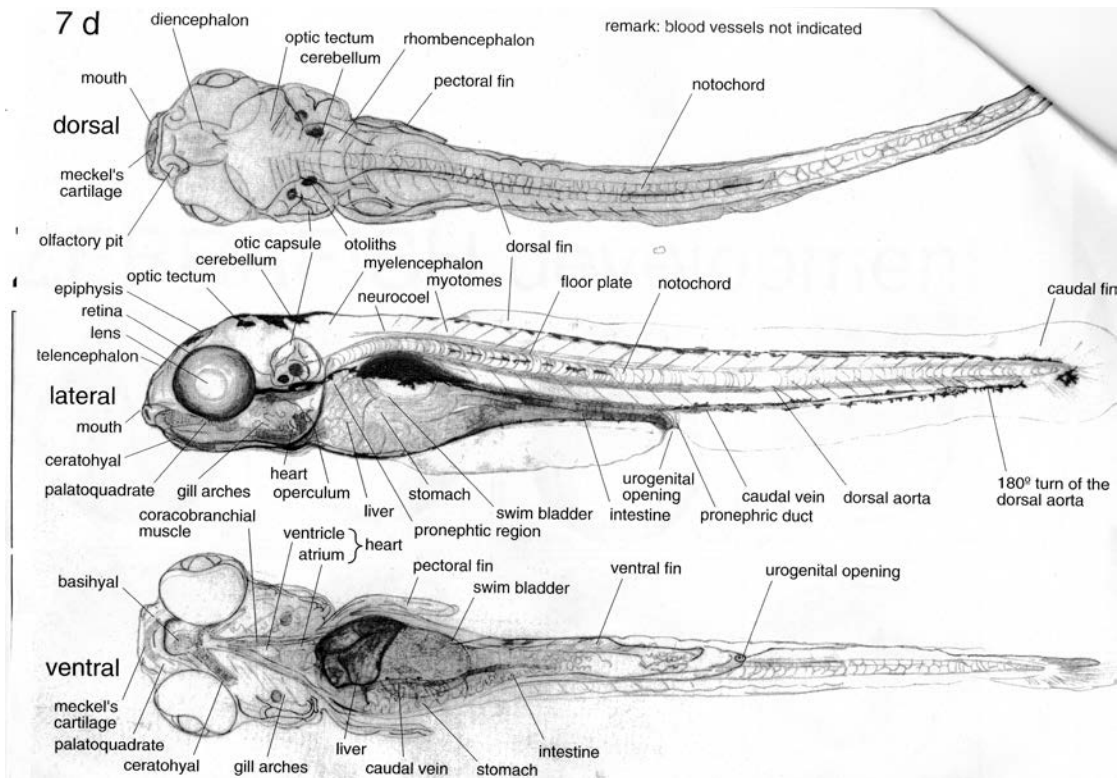
επάνω και κάτω από τις ήδη υπάρχουσες (McClure 1999). Το σχήμα του είναι ατρακτοειδές, πλευρικά συμπιεσμένο με το στόμα του να βρίσκεται προς τα πάνω. Το zebrafish μπορεί να μεγαλώσει σε μήκος μέχρι και 6,4 εκ., βέβαια αυτά που βρίσκονται σε εργαστηριακές συνθήκες σπάνια μεγαλώνουν πάνω από 4 εκ. Συνήθως ζουν 2-3 χρόνια αλλά σε ιδανικές συνθήκες μπορούν να ζήσουν μέχρι και 5 χρόνια.



Εικόνα 2: Άτομο του είδους zebrafish. Από πάνω αριστερά και δεξιόστροφα: ραχιαίο πτερύγιο, ουριαίο πτερύγιο, εδρικό πτερύγιο, κοιλιακό πτερύγιο & θωρακικό πτερύγιο



Εικόνα 3 : Τομή- όργανα του zebrafish. Από αριστερά προς τα δεξιά: καρδιά, ήπαρ, έντερο, όργανα αναπαραγωγής & νυκτική κύστη



Σχήμα 1 : Άτομο zebrafish επτά ημερών. Η πάνω φωτογραφία είναι ραχιαία κάτοψη του ψαριού, η μεσαία είναι πλευρική όψη και η κάτω είναι κάτοψη από την κοιλιακή χώρα . Τα όργανα του ατόμου αναφέρονται.

Ο διαχωρισμός μεταξύ θηλυκών και αρσενικών δεν είναι εύκολος, ειδικά σε κάποιον που δεν έχει εξοικίωση με το zebrafish. Ο μοναδικός σίγουρος τρόπος είναι η μεγαλύτερη κοιλιά που έχουν τα θηλυκά ειδικά όταν φέρουν αυγά. Άλλες διαφορές είναι ότι το αρσενικό είναι τορπιλόμορφο, με χρυσές ή ροζ ρίγες μεταξύ των μπλε ριγών αντίθετα τα θηλυκά είναι πιο ωοειδή με άσπρη κοιλιά και ασημένιες ρίγες μεταξύ των μπλε ριγών. Επίσης, τα ενήλικα θηλυκά φέρουν μια γενετική θηλή μπροστά από την αρχή του εδρικού πτερυγίου.



Εικόνα 4 : Θηλυκό (πάνω) και αρσενικό (κάτω) άτομο zebrafish.

1.5 Αναπαραγωγή

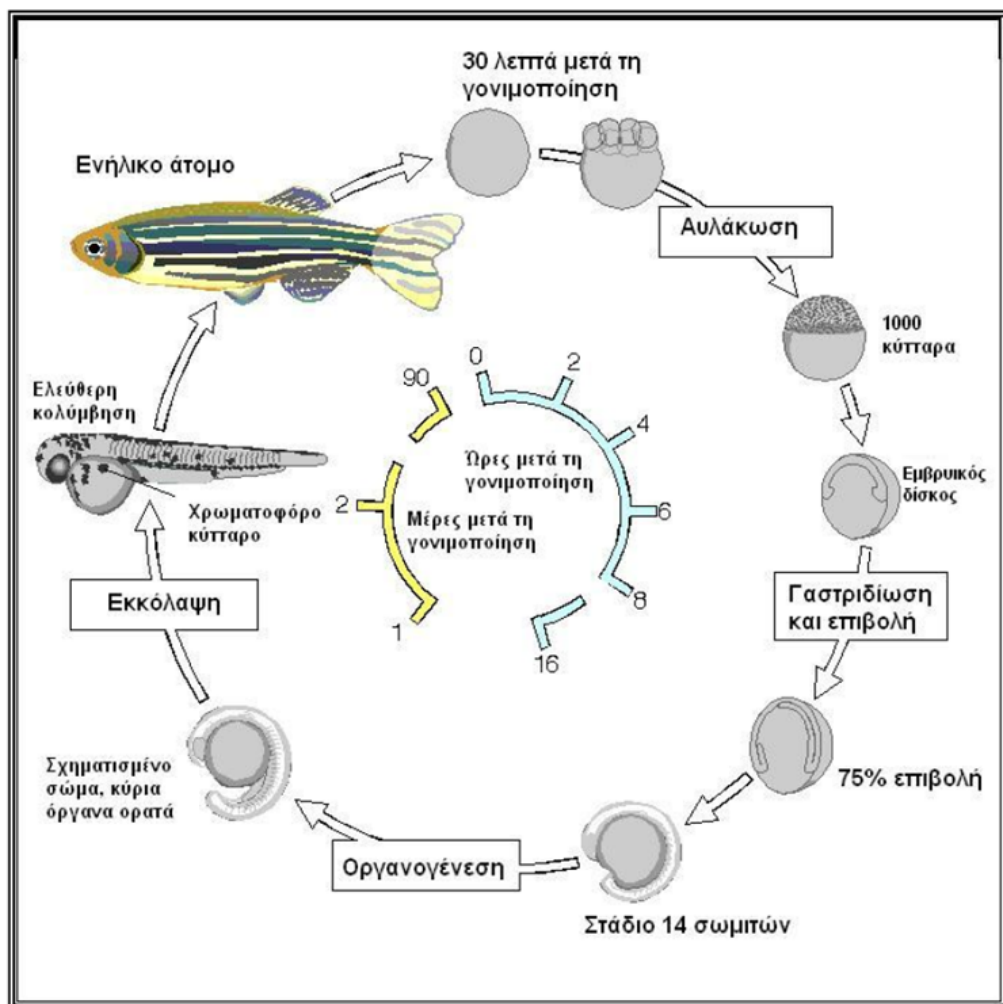
Στη φύση η αναπαραγωγική διαδικασία συμβαίνει ετήσια και διαρκεί για 3 με 4 μήνες και πιο συγκεκριμένα από τον Απρίλιο μέχρι τον Αύγουστο. Τα θηλυκά αφήνουν τα αυγά τους τα οποία μπορεί να είναι εκατοντάδες σε αριθμό και τα γονιμοποιούν εξωτερικά τα αρσενικά. Τα έμβρυα έπειτα γίνονται διαφανή (εικόνα 5). Τα θηλυκά μπορούν να γεννούν, με διαλείμματα 2-3 ημερών, εκατοντάδες αυγά κάθε φορά.



Εικόνα 5: Έμβρυα zebrafish.

1.6 Αναπτυξιακά στάδια zebrafish

Καταρχήν πρέπει να τονιστεί πως ο ρυθμός ανάπτυξης του zebrafish εξαρτάται από τη θερμοκρασία στην οποία βρίσκεται. Έτσι, σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες αναπτύσσεται πιο γρήγορα και σε μικρότερες πιο αργά. Σαν θερμοκρασία αναφοράς για τα πειράματα της παρούσας εργασίας είναι οι 28,5 °C (Kimmel et al. 1995) (Shih and Fraser 1995).



Εικόνα 6 : Ο κύκλος ζωής του zebrafish.

http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB_Ch02/DBNModel.html

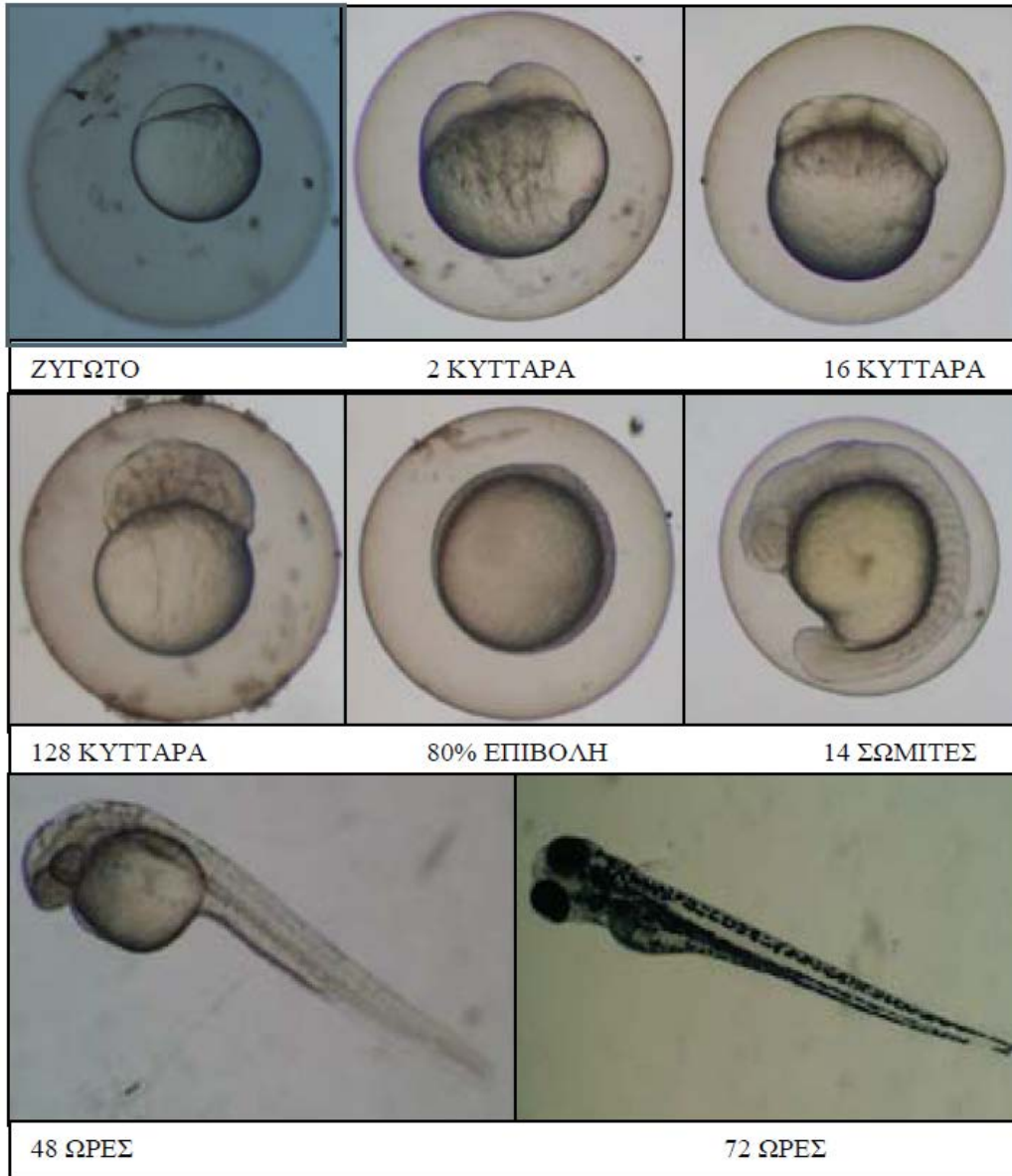
Τα αυγά του zebrafish είναι τελολεκιθικά και η διάμετρος τους είναι 1-1,2 mm. Τριάντα λεπτά μετά τη γονιμοποίηση πραγματοποιείται η πρώτη αυλάκωση (cleavage). Αν τα δύο βλαστομερίδια που δημιουργούνται είναι διαφανή και συμμετρικά, τότε το αυγό είναι γονιμοποιημένο. Μετά την πρώτη αυλάκωση, τα βλαστομερίδια διαιρούνται ανά 20 λεπτά περίπου και μία ώρα μετά τη γονιμοποίηση το έμβρυο βρίσκεται στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων. Οι συνεχιζόμενες αυλακώσεις οδηγούν στο στάδιο του βλαστιδίου (blastula) και στο σχηματισμό του βλαστόδισκου (blastodisc). Τα κύτταρα που βρίσκονται βαθιά στο βλαστόδισκο αποτελούν το λεκιθικό συγκυτιακό στρώμα (Yolk Syncytial Layer -YSL), από το οποίο θα προκύψουν οι τρεις βλαστικές στοιβάδες, το εξώδερμα, το μεσόδερμα και το ενδόδερμα. Τα κύτταρα του YSL μετακινούνται προς το ζωικό πόλο, καλύπτουν τη λέκιθο και ξεκινάει το στάδιο της επιβολής (epiboly) (Kimmel et al. 1995).

Στο 50% της επιβολής ξεκινάει η γαστριδίωση στις 5 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Στο εσωτερικό του βλαστόδισκου υπάρχει το βλαστόδερμα που αποτελείται από δύο επιμέρους στοιβάδες κυττάρων, τον επιβλάστη που είναι η ανώτερη στοιβάδα και τον υποβλάστη που είναι η κατώτερη (Kimmel et al. 1995). Στο στάδιο αυτό σχηματίζεται ο εμβρυικός δίσκος στις 5,5-6 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Η γαστριδίωση ολοκληρώνεται στις 12 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των τριών βλαστικών στοιβάδων (εξώδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα) των ιστών του εμβρύου. Στο τέλος της γαστριδίωσης, η εξωτερική επιφάνεια του εμβρύου αποτελείται

αποκλειστικά από εξώδερμα (100% επιβολή), από το οποίο θα προκύψουν στη συνέχεια οι ιστοί της επιδερμίδας και του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Κατά τη διάρκεια του επόμενου σταδίου, του σταδίου της σωμιτογένεσης, δημιουργούνται οι σωμίτες. Στο στάδιο των 14 σωμιτών (16 ώρες μετά τη γονιμοποίηση) γίνεται η αποκόλληση της ουράς και στις 19 ώρες μετά τη γονιμοποίηση παρατηρούνται οι πρώτες μυικές κινήσεις του εμβρύου. Στις 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, το έμβρυο είναι στο φυλοτυπικό στάδιο του σπονδυλόζωου, αφού ξεκινάει ο σχηματισμός πολλών οργάνων, όπως ο εγκέφαλος, τα μάτια, τα ακουστικά κυστίδια, οι νεφροί και η καρδιά (Kimmel et al. 1995). Ο φαρυγγικός θόλος, τα μελανοκύτταρα και η ανάπτυξη των πτερυγίων είναι τα σημαντικότερα γεγονότα της φαρυγγικής περιόδου (24 – 48 hpf). Οι βραγχιακές σχισμές, τα σαγόνια και τα θωρακικά πτερύγια αναπτύσσονται ταχέως μέσα στο επόμενο 24ώρο που είναι και το χρονικό σημείο που βγαίνει από το χόριο. Τα μελανοφόρα κύτταρα τοποθετούνται έτσι ώστε να δημιουργηθούν οι χαρακτηριστικές ζωνώσεις στο σώμα του zebrafish, το κυκλοφορικό σύστημα σχηματίζεται και ξεκινάει να πάλλεται η καρδιά. Το πρώτο αορτικό τόξο σχηματίζεται πλήρως και όλα τα εσωτερικά όργανα έχουν ολοκληρώσει την ανάπτυξή τους στις 48 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Καθώς εξελίσσεται η ανάπτυξη, η νυκτική κύστη φουσκώνει και η λάρβα αρχίζει να κολυμπάει ενεργητικά και να τρέφεται εξωγενώς (περίπου 5 μέρες μετά την γονιμοποίηση). Το zebrafish φτάνει στην ενηλικίωση περίπου στους 3 μήνες μετά την γονιμοποίηση. Στις εικόνες 6 & 7

φαίνονται τα αναπτυξιακά στάδια του zebrafish καθώς και ο κύκλος ανάπτυξής του.



Εικόνα 7 : Στάδια ανάπτυξης του zebrafish. Τα βασικά αναπτυξιακά στάδια του zebrafish. Από αριστερά προς τα δεξιά και προς τα κάτω συναντάμε το ζυγωτό, το οποίο κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης έχει διάμετρο 0,7mm, το στάδιο των δύο κυττάρων, το στάδιο των δεκαέξι κυττάρων, το στάδιο των εκατό είκοσι οχτώ κυττάρων, το στάδιο της 80% επιβολής, το στάδιο των δεκατεσσάρων σωματιών στις 16 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, έμβρυο 48 ωρών μετά τη γονιμοποίηση και έμβρυο

72 ωρών μετά τη γονιμοποίηση.

1.7 Διατροφή του zebrafish

Το zebrafish είναι παμφάγο ζώο. Τρέφεται κυρίως με ζωοπλαγκτό, έντομα, λάρβες εντόμων και φυτοπλαγκτό. Επίσης, μπορεί να τραφεί με μικρά οστρακοειδή και σκουλήκια (Spence et al. 2008).

Το zebrafish μπορεί να τραφεί εξωγενώς από την 5^η μέρα και μετά, περίοδο στην οποία ανοίγει το στόμα του. Μέχρι τότε τρέφεται από την λέκιθο. Οι επόμενες 3-4 εβδομάδες είναι και οι πλέον απαιτητικές σε ενέργεια. Οι τροφές τους έχουν μέγεθος 150 – 200 μm και πρέπει να έχουν περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες πάνω από 45 – 60%, σε λίπη 6 – 10% και λιγότερο από 5% σε υδατάνθρακες. Από το στάδιο αυτό και έπειτα, το zebrafish μπορεί να τραφεί με τροφές μεγέθους 400 – 600 μm και με περιεκτικότητα σε λίπη 10 – 15%.

1.8 Ασθένειες του zebrafish

Οι ασθένειες που εμφανίζει το zebrafish μπορεί να έχουν προκληθεί από βακτήρια, από πρωτόζωα ή μετάζωα. Από τις βακτηριακές, η πιο σημαντική ασθένεια είναι η *Mycobacteriosis*. Αυτή η ασθένεια είναι χρόνια συστηματική ασθένεια με μικρή θνησιμότητα. Τα κλινικά συμπτώματα είναι λήθαργος, ανορεξία, υπεραιμία ή αιμορραγία στο κεφάλι, έλκη, ξεφτισμένα πτερύγια και χλωμά βράγχια. Άλλες ασθένειες που προκαλούνται από βακτήρια είναι η Βακτηριακή Ασθένεια των Βράγχιων (BGD) και η Βακτηριακή Αεροκύστη που σχετίζεται με τη νηκτική κύστη.

Ασθένειες που προκαλούνται από πρωτόζωα, είναι η Velvet Disease που προκαλείται από το δινομαστιγωτό *Piscinoodinium pillulare* το οποίο μπορεί να προκαλέσει σε μικρό χρονικό διάστημα θάνατο στο ψάρι. Άλλες ασθένειες είναι η Μικροσποριδίωση και η ασθένεια γνωστή ως White Spot. Ασθένειες που προκαλούνται από μετάζωα, προέρχονται από έλμινθες και από αρθρόποδα.

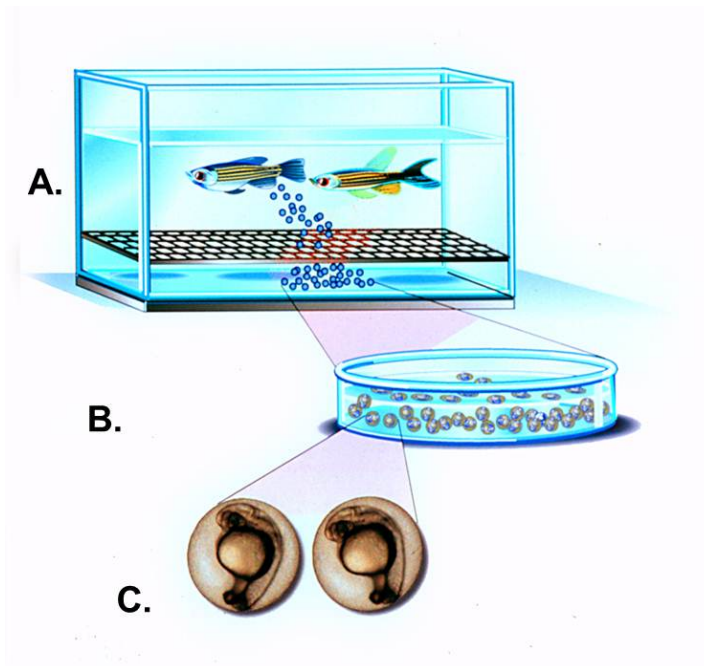
1.9 Το zebrafish σαν πρότυπος οργανισμός στην έρευνα

Το zebrafish, αποτελεί ένα ζωικό μοντέλο που ειδικά την τελευταία 20ετία γνωρίζει μεγάλη αποδοχή για πειραματική χρήση στην έρευνα παγκόσμια. Η ιστορία του στην έρευνα, ξεκινάει τη δεκαετία του 1970 όταν ο George Streisinger (καθηγητής στο Πανεπιστήμιο του Όρεγκον) θέλησε να χρησιμοποιήσει ένα πιο απλό σπονδυλωτό ζωικό μοντέλο και πιο εύκολο για γενετικά πειράματα από αυτό που προσφέρει το ποντίκι και έτσι επέλεξε το zebrafish. Επίσης, ένας συνάδελφός του, ο Chuck Kimmel ενθουσιασμένος από την εύκολη χρήση του, μελέτησε την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Το πλέον σημαντικό ρόλο για την εγκαθίδρυση του zebrafish στον ερευνητικό χώρο ως οργανισμό «μοντέλο» διαδραμάτισαν οι προσεγγίσεις γενετικής που πραγματοποιήθηκαν στο Tübingen της Γερμανίας και στη Βοστώνη. Πλέον τα τελευταία 20 χρόνια πάνω από 600 εργαστήρια παγκοσμίως χρησιμοποιούν το zebrafish ως πρότυπο μοντέλο οργανισμού για την έρευνα.

1.10 Πλεονεκτήματα του zebrafish για τη χρήση του ως πρότυπος οργανισμός στην έρευνα

Το zebrafish ως μοντέλο-οργανισμός προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των θηλαστικών για τη μελέτη της ανάπτυξης και της οργανογένεσης των σπονδυλωτών (Beis and Stainier 2006). Αναλυτικά τα πλεονεκτήματα του είναι τα εξής :

- Ο μεγάλος αριθμός αυγών που παράγεται σε κάθε αναπαραγωγική διαδικασία δίνει τη δυνατότητα για υλοποίηση πειραμάτων σε μεγάλη κλίμακα
- Η εξωτερική γονιμοποίηση προσφέρει τη δυνατότητα να συλλέγονται τα αυγά και να χρησιμοποιούνται κατά το δοκούν
- Η γρήγορη και εξωτερική ανάπτυξη των εμβρύων επιτρέπει την οπτική παρατήρηση του σχηματισμού των οργάνων
- Ο μικρός αναπαραγωγικός κύκλος : 3 μήνες μετά τη γονιμοποίηση τα zebrafish είναι έτοιμα για αναπαραγωγή.



Εικόνα 8 : Ανάπτυξη και αναπαραγωγή του zebrafish. A. Ζευγάρι zebrafish κατά την αναπαραγωγή. B. Συλλογή εμβρύων στο τρυβλίο C. Διαφανή έμβρυα στο στάδιο

ανάπτυξης σωματιών (Scott and Johnston 2012)
(<http://www.fac.org.ar/scvc/lave/pediat/diaz/diazi.htm>)

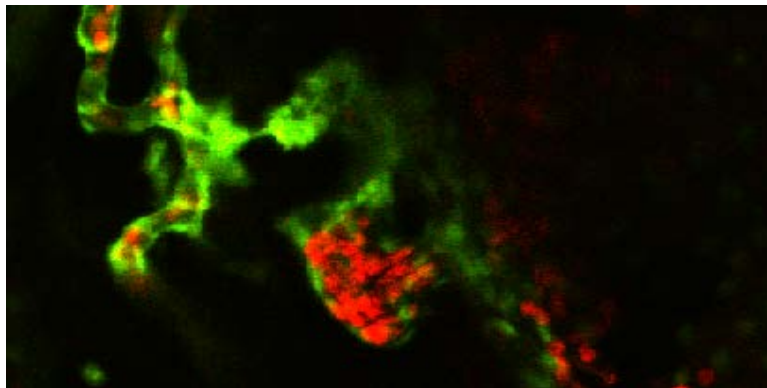
- Το μικρό μέγεθος των ενήλικων ιχθύων επιτρέπει τη διατήρησή τους σε μικρούς εργαστηριακούς χώρους με χαμηλό κόστος συντήρησης
- Η αλληλούχηση του γονιδιώματος του zebrafish έχει ολοκληρωθεί και υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες για τη χαρτογράφηση του σε βάσεις δεδομένων
- Το γονιδίωμα του zebrafish παρουσιάζει 80% ποσοστό ομολογίας με το ανθρώπινο γονιδίωμα. Πολλά γονίδια που εμπλέκονται σε ανθρώπινες ασθένειες υπάρχουν επίσης στο zebrafish και μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί σε ασθενείς μπορούν να μοντελοποιηθούν στο zebrafish.
- Το υψηλό ποσοστό ομολογίας των δύο γονιδιωμάτων αντανακλάται ακόμα και στην ομοιότητα των αποκρίσεων σε φάρμακα, λόγω της υψηλής ομολογίας των θέσεων πρόσδεσης φαρμάκων που εμφανίζουν σε πρωτεϊνικό επίπεδο ο άνθρωπος και το zebrafish.
- Ένα από τα ιδιαίτερος σημαντικά πλεονεκτήματα του zebrafish είναι ότι τα έμβρυα zebrafish είναι διαφανή, επιτρέποντας τη μη επεμβατική *in vivo* παρατήρηση της ανάπτυξης των εσωτερικών οργάνων, όπως η καρδιά (Εικόνα 9). Αυτό το πλεονέκτημα γίνεται ακόμα πιο σημαντικό χάρη στις τεχνικές δημιουργίας διαγονιδιακών σειρών που χρησιμοποιούν φθορίζουσες πρωτεΐνες π.χ. Green Fluorescent Protein (GFP), (Εικόνα 10), για τη σήμανση των κυττάρων του zebrafish. Έτσι έχουν τη δυνατότητα οι επιστήμονες να παρατηρούν με μικροσκόπια φθορισμού ή συνεστιακά μικροσκόπια

σάρωσης σε βάθος και με λεπτομέρεια τα κύτταρα και τους ιστούς του zebrafish.



Εικόνα 9 : Απεικόνιση εμβρύου σε αρχικό στάδιο ανάπτυξης

- Το μικρό μέγεθος των ενήλικων ιχθύων zebrafish (4-5 εκατοστά) διευκολύνει πολύ τον χειρισμό και την χρήση του σε διάφορες τεχνικές και μεθόδους.
- Υπάρχουν αρκετές απομονωμένες μεταλλάξεις που αξιοποιούνται στις γενετικές αναλύσεις.



Εικόνα 10 : Διαγονιδιακές σειρές zebrafish με τη χρήση του GFP

- Η ευκολία για γενετικούς χειρισμούς προσφέρει τη δυνατότητα εφαρμογής πληθώρας γενετικών τεχνικών, όπως τεχνικές πρόσθιας (forward genetics) και αντίστροφης γενετικής (reverse genetics).

1.11 Τομείς της έρευνας που χρησιμοποιείται το zebrafish

Χάρη στα πολλά και σημαντικά παραπάνω προτερήματα του, το zebrafish χρησιμοποιείται σε πολλά πεδία της ιατρικής και βιολογικής έρευνας. Ενδεικτικά περιγράφονται μερικά παρακάτω.

1.11.1 ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Όσον αφορά στη μελέτη των καρδιαγγειακών νοσημάτων, το zebrafish παρουσιάζει ένα επιπρόσθετο προτέρημα : λόγω του μικρού μεγέθους του και ειδικά τις πρώτες ημέρες της ζωής του, η ανταλλαγή αερίων κι επομένως και του οξυγόνου διεξάγεται παθητικά με διάχυση. Συνεπώς, ακόμη και αν υπάρχει κάποιο πρόβλημα στο καρδιαγγειακό σύστημα, αυτό δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα του zebrafish για τις πρώτες τουλάχιστον πέντε ημέρες. Το zebrafish αποτελεί καλό μοντέλο για καρδιαγγειακές νόσους, διότι παρόλο που η καρδιά του είναι δίχωρη και όχι τετράχωρη όπως η ανθρώπινη, αποτελείται όπως και στους ανθρώπους από μυς σχεδιασμένους να αντλούν αίμα μεταφέροντας οξυγόνο σε όλο το σώμα και από θαλάμους με βαλβίδες που εμποδίζουν την παλινδρόμηση του αίματος. Η λειτουργία της καρδιάς είναι ρυθμική και εξαρτάται από τον φλεβόκομβο που αποτελείται από εξειδικευμένα

καρδιομυοκύτταρα και ο οποίος βρίσκεται στο δεξί κάτω μέρος του κόλπου, ραχιαία από το SAR (sinoatrial ring) (Arrenberg et al. 2010).

1.11.2 Αναγέννηση ιστών και οργάνων του zebrafish

Μία από τις πιο χαρακτηριστικές ιδιότητες του zebrafish είναι η ικανότητα αναγέννησης ιστών και οργάνων, όπως τα πτερύγια, η σπονδυλική στήλη, ο αμφιβληστροειδής και εγκεφαλικοί ιστοί. Επιπλέον, σε αντίθεση με τον άνθρωπο και τα υπόλοιπα θηλαστικά, το zebrafish παρουσιάζει ικανότητα αναγέννησης του καρδιακού ιστού μετά από τραυματισμό γι αυτό το λόγο και χρησιμοποιείται ευρέως ως μοντέλο για τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη διαδικασία της καρδιακής αναγέννησης. Μάλιστα, η Βρετανική καρδιολογική εταιρεία χρηματοδότησε με 50 εκατομμύρια λίρες την έρευνα για την αναγέννηση της καρδιάς έπειτα από βλάβη με μοντέλο το ψάρι αυτό.

1.11.3 Χρήση σε μελέτες καρκίνου

Το zebrafish μπορεί να βοηθήσει την έρευνα και σε αυτή την πάθηση που αποτελεί τη μάστιγα της εποχής μας. Η ευκολία δημιουργίας διαγονιδιακών σειρών σε συνδυασμό με την οπτική διαφάνεια των εμβρύων το καθιστούν ιδανικό μοντέλο για τον καρκίνο. Συγκεκριμένα η οπτική διαφάνεια του zebrafish επιτρέπει την *in vivo* παρακολούθηση μεταμοσχευμένων καρκινικών κυττάρων καθώς και την παρατήρηση της εξέλιξης του καρκίνου και της δημιουργίας τυχόν μεταστάσεων.

1.11.4 Ανοσολογία και Φαρμακευτική

Το είδος αυτό , χρησιμοποιείται ευρέως και στην ανοσολογική έρευνα αλλά και στη φαρμακευτική καθώς το μικρό κόστος συντήρησης, ο μεγάλος αριθμός εμβρύων μετά από κάθε αναπαραγωγή και η γρήγορη και εξωτερική ανάπτυξη του βοηθούν στην δοκιμή νέων φαρμάκων τόσο για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητάς τους όσο και για τον έλεγχο της τοξικότητάς τους. Η άμεση χορήγηση των ουσιών στο θρεπτικό μέσο των εμβρύων σε συνδυασμό με την παραγωγή πληθώρας εμβρύων και την οπτική διαφάνεια καθιστούν το zebrafish ένα εξαιρετικό μοντέλο για φαρμακολογικές και τοξικολογικές μελέτες μεγάλης κλίμακας.

1.11.5 Χρήση στη Γενετική – Αναπτυξιακή Βιολογία

Όπως έχει προαναφερθεί στο zebrafish μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές γενετικές προσεγγίσεις και μέθοδοι. Χαρακτηριστική είναι η χρήση των morpholino ολιγονουκλεοτιδίων (ολιγονουκλεοτίδια που στοχεύουν την mRNA αλυσίδα που έχει παραχθεί ή το μάτισμα του mRNA, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται μείωση της έκφρασης ενός γονιδίου και της σύνθεσης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το mRNA).

Επίσης, τεχνικές πρόσθιας γενετικής έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό τη μελέτη της λειτουργίας των γονιδίων. Μεγάλης κλίμακας έλεγχοι πρόσθιας γενετικής οδήγησαν στον χαρακτηρισμό ποικίλων μεταλλαγμένων φαινοτύπων που επηρεάζουν τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης. Ακόμα, διαγονιδιακά ψάρια που εκφράζουν τη φθορίζουσα πρωτεΐνη (πχ GFP) στα ενδοθηλιακά ή μυοκαρδιακά κύτταρα χρησιμοποιούνται για την οπτική παρατήρηση του καρδιαγγειακού συστήματος του zebrafish. Τέλος, η

μεταλλαγμένη γενετική σειρά Casper δε σχηματίζει μελανοφόρα και ιριδοφόρα κύτταρα και παραμένει διάφανη σε όλη τη διάρκεια της ζωής του zebrafish, προσφέροντας τη δυνατότητα για οπτική παρατήρηση του καρδιαγγειακού συστήματος και της ανάπτυξής του ακόμα και σε ενήλικα στάδια.

1.12 Αγγειογένεση

1.12.1 Γενικές πληροφορίες για την αγγειογένεση

Ο όρος αγγειογένεση (angiogenesis) αναφέρεται για πρώτη φορά το 1935 από τον Hertig προκειμένου να περιγράψει το σχηματισμό νέων αγγείων στον πλακούντα, και αργότερα χρησιμοποιήθηκε το 1971 από τον Judah Folkman για την περιγραφή της νεοαγγείωσης που συνοδεύει την ανάπτυξη των συμπαγών όγκων (Folkman 1971). Ο Folkman πρότεινε την επιστημονική υπόθεση ότι η εγκατάσταση και διατήρηση ενός αγγειακού δικτύου αιμάτωσης αποτελεί βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη του φυσιολογικού, αλλά και του νεόπλαστου καρκινικού ιστού (Allende et al. 1996). Διακρίνονται 3 διαφορετικοί τύποι δημιουργίας και ανάπτυξης των αιμοφόρων αγγείων. Κατά την εμβρυογένεση παρατηρείται διαφοροποίηση των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων (endothelial progenitor cells; EPCs) σε νησίδες αίματος που σταδιακά συνενώνονται για να σχηματίσουν τα πρώτα τριχοειδή πλέγματα του εμβρύου (vasculogenesis)(RP and Richardson 2003). Από αυτά τα τριχοειδή πλέγματα αναπτύσσονται κατόπιν οι αρτηρίες και φλέβες του κυκλοφορικού συστήματος κατά την οργανογένεση του νέου οργανισμού (Tsikitis, Blais, and Acosta-Alvear 2005). Μέχρι πρόσφατα, ο επιστημονικός κόσμος πίστευε ότι η παραπάνω διαδικασία εξελισσόταν μόνο κατά την

περίοδο ανάπτυξης του εμβρύου. Ωστόσο, η άποψη αυτή αναθεωρήθηκε ριζικά με την απομόνωση κυκλοφορούντων πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs) στο περιφερικό αίμα (Blanco-Vives et al. 2010; Blaxter 1991). Χαρακτηριστικά βρέθηκε ότι ο αριθμός των κυκλοφορούντων EPCs αυξάνεται μετά από ερεθίσματα ιστικής ισχαιμίας. Τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα EPCs προέρχονται από το μυελό των οστών, χαρακτηρίζονται από το επιφανειακό κυτταρικό αντιγόνο CD-34 και ενσωματώνονται σε περιοχές ενεργού αγγειογένεσης στον ενήλικα (postnatal vasculogenesis) (Blaxter 1988).

Η αγγειογένεση είναι η διαδικασία κατά την οποία νέα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζονται από 19 πλήρως διαφοροποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα προϋπαρχόντων αγγείων, τα οποία, όπως αναφέρθηκε, με τη σειρά τους προήλθαν από διαφοροποίηση πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων (EPCs) κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης του οργανισμού (vasculogenesis)(Boeuf and Le Bail 1999). Η αγγειογένεση είναι μια σημαντική διαδικασία κατά την ανάπτυξη του οργανισμού και αποτελεί το μέσο με το οποίο το έμβρυο αναπτύσσεται σαν ολοκληρωμένος οργανισμός (Bolker 2014; Bookstein 1997; Boeuf and Le Bail 1999). Εκτός από την εμβρυογένεση, η αγγειογένεση εμφανίζεται σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις ως απάντηση σε ερεθίσματα υποξίας, μηχανικής πίεσης και φλεγμονής (Bookstein 1997). Φυσιολογική αγγειογένεση εμφανίζεται κατά την επούλωση πληγών, την ισχαιμία του μυοκαρδίου, και το γυναικείο αναπαραγωγικό κύκλο (Bulmer and Bull 1982). Σε αυτές τις περιπτώσεις η αγγειογένεση είναι ελεγχόμενη, δηλ. ενεργοποιείται για σύντομα χρονικά διαστήματα και μετά αναστέλλεται.

Αντιθέτως, η αγγειογένεση που εμπλέκεται σε παθολογικές καταστάσεις, είναι συνεχής και χωρίς έλεγχο και συντελεί στην εμφάνιση πολλών ασθενειών, όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Cheshenko et al. 2007; Chiang, Yan, Tong, et al. 2001). Η αγγειογένεση συνδέεται με την ανάπτυξη των όγκων και αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την μετάσταση των κακοηθών όγκων (Chiang, Yan, Tong, et al. 2001; Chiang, Pai, et al. 2001; Chiang, Yan, Guiguen, et al. 2001). Επιπλέον η ικανότητα για αγγειογένεση έχει συσχετιστεί με το βαθμό της κακοήθειας ενός όγκου. Ένας όγκος πρέπει διαρκώς να διεγείρει την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων προκειμένου να αναπτυχθεί, ενώ παράλληλα τα νέα αιμοφόρα αγγεία μέσα στην καρκινική μάζα διευκολύνουν την διήθηση των παρακείμενων ιστών, την είσοδο των καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία και την μετάστασή τους σε απομακρυσμένα όργανα (Chiang, Yan, Guiguen, et al. 2001). Η αγγειογένεση αποτελεί γενικά μία πολύπλοκη πολυπαραγοντική διαδικασία που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση, μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, την πρωτεόλυση του εξωκυττάρου υλικού, το σχηματισμό νέων τριχοειδικών αυλών (capillary tubes) και την αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των νεότευκτων αγγείων. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες γίνονται εντατικές προσπάθειες μελέτης της αγγειογένεσης σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Μελέτες σε οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν δείξει ότι η διαδικασία του σχηματισμού νέων αγγείων συμβαίνει με μία συγκεκριμένη αλληλουχία σταδίων. Τα στάδια αυτά είναι πάντα τα ίδια και ανεξάρτητα από την προέλευση των ερεθισμάτων που τα προκαλούν. Μπορούν να συνοψισθούν ως εξής:

- Τα ενδοθηλιακά κύτταρα προϋπάρχοντων μικροαγγείων, που κάτω από φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, διεγείρονται από κάποιο αγγειογενετικό ερέθισμα και αποδομούν την βασική τους μεμβράνη (Condon, Chenoweth, and Wilson 2010; D'cotta et al. 2001).
- Δημιουργείται αύξηση του αριθμού των οργανιδίων των κυττάρων, δημιουργούνται ψευδοπόδια, και τα ενδοθηλιακά κύτταρα αρχίζουν να μεταναστεύουν στο υποκείμενο εξωκυττάριο στρώμα προς το αγγειογενετικό ερέθισμα (Condon, Chenoweth, and Wilson 2010; D'cotta et al. 2001).
- Εν συνεχεία, τα κύτταρα διαφοροποιούνται πάλι σε φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα και συντάσσονται ανάλογα ώστε να σχηματίσουν τους αυλούς των νέων αγγείων.
- Έπειτα, περικύτταρα μεταναστεύουν κατά μήκος του νεοσχηματισθέντος αγγείου και δημιουργούν την εξωτερική επιφάνεια του αγγείου.
- Τέλος, σχηματίζεται η βασική μεμβράνη από τα ενδοθηλιακά κύτταρα με τη συμμετοχή και των περικυττάρων (Scott and Johnston 2012). Αυτά τα νέα τριχοειδή είναι δυνατόν να προκαλέσουν το σχηματισμό νέων εκβλαστήσεων (sprouts), και να δημιουργήσουν τελικά ένα ολόκληρο τριχοειδικό πλέγμα. Τα νεοσχηματιζόμενα τριχοειδή επιμηκύνονται με την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα άκρα τους, καθώς επίσης και με τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων στο μέσο της τριχοειδικής διακλάδωσης. Έτσι σχηματίζεται πρώτα ο σκελετός του νέου

τριχοειδούς και στη συνέχεια ο νέος αυλός. Οι νέες διακλαδώσεις αναστομώνονται μεταξύ τους και δημιουργούνται νέα τριχοειδή μέσα από τα οποία αρχίζει η ροή του αίματος (Diotel et al. 2010; Eklön and Svanbäck 2006; Engeszer et al. 2007).

1.12.2 Ασθένειες που σχετίζονται με την αγγειογένεση

Σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ των τοπικών ανασταλτικών και των αγγειογενετικών διεγερτών και η αγγειογένεση είναι μη ελεγχόμενη και ενεργή για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Υπερπαραγωγή ενός αγγειογενετικού παράγοντα ή έλλειψη ενός αντιαγγειογενετικού ενεργοποιεί τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Αυτός ο τύπος της μη ελεγχόμενης αγγειογένεσης χαρακτηρίζει μια σειρά ασθενειών του ανθρώπου με πρώτη τον καρκίνο και περίπου άλλες 70 ασθένειες. Παραδείγματος χάρη, στην αρθρίτιδα, νέα τριχοειδή αγγεία του αίματος εισβάλλουν στις αρθρώσεις και καταστρέφουν το χόνδρο. Στο διαβήτη παρατηρείται εισβολή νέων τριχοειδών του αμφιβληστροειδή χιτώνα στον υαλώδη, όπου αιμορραγούν και προκαλούν τύφλωση. Η οφθαλμική νεοαγγειογένεση είναι η πιο κοινή αιτία τύφλωσης και κυριαρχεί σε περισσότερες από είκοσι ασθένειες του οφθαλμού (Folkman 2007). Άλλες παθολογικές καταστάσεις όπου εμφανίζεται σχηματισμός νέων αγγείων είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ψωρίαση, χρόνια φλεγμονή, η αθηροσκλήρωση κ.α.

Όσον αφορά την σχέση της αγγειογένεσης με την ανάπτυξη των όγκων αναγνωρίστηκε και επιβεβαιώθηκε χάρη στις έρευνες του Folkman στην αρχή της δεκαετίας του 70, μέχρι τότε, επικρατούσε η άποψη ότι οι όγκοι

μπορούν κάλλιστα να αναπτυχθούν με την υπάρχουσα αγγείωση. Ο Folkman απέδειξε με τα πειράματά του ότι οι όγκοι οφείλουν να δημιουργήσουν νέα αγγεία προκειμένου να ικανοποιήσουν τις διατροφικές τους ανάγκες, ενώ ταυτόχρονα εκκρίνουν ορισμένους παράγοντες οι οποίοι ευνοούν την ανάπτυξη των αγγείων. Επομένως, η αγγειογένεση απαιτείται για τη συνέχιση της αύξησης των καρκινικών όγκων είτε είναι πρωτοπαθείς, είτε μεταστατικοί. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι, η αυξημένη αγγειογένεση συνδέεται με υψηλό μεταστατικό δυναμικό και κακή πρόγνωση σε πολλούς καρκίνους, όπως του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, του πνεύμονα, του ενδομητρίου και του παχέος εντέρου. Αντ' αυτού κατά την απουσία νέων αγγείων που τροφοδοτούν με θρεπτικά υλικά και απομακρύνουν τα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων, οι κακοήθεις όγκοι δεν αναπτύσσονται περισσότερο από 1 με 2 χιλιοστά σε διάμετρο (Chavez et al. 2016; Folkman 1971, 2007).

1.12.3 Αγγειογένεση ως θεραπευτικός στόχος

Η κατανόηση του ρόλου της αγγειογένεσης στην παθοβιολογία των παραπάνω νοσημάτων έχει οδηγήσει στη διερεύνηση συγκεκριμένων τρόπων παρέμβασης, που στοχεύουν είτε στην προαγωγή, είτε, συνηθέστερα, στην αναχαίτιση της αγγειογένεσης. Συνεπώς, η χρησιμοποίηση συγκεκριμένων ενώσεων που μπορεί να διεγείρουν ή να αναστείλουν την δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων ενδέχεται να βοηθήσει στην καταπολέμηση τέτοιου είδους ασθενειών. Οι μοντέρνες κλινικές εφαρμογές που σχετίζονται με την αγγειογένεση μπορεί να

διαιρεθούν σε δύο κύριες κατηγορίες: αντι-αγγειογενετικές και προ-αγγειογενετικές θεραπείες. Η δεύτερη υποομάδα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία καρδιοαγγειακών ασθενειών (ισχαιμία), την πρώτη σε συχνότητα αιτία θανάτου στον δυτικό κόσμο, ενώ οι αντι-αγγειογενετικές θεραπείες κατά προτεραιότητα στοχεύουν στη μάχη κατά του καρκίνου.

Μέχρι σήμερα οι αντικαρκινικές θεραπείες βασίζονταν στην απευθείας επίθεση κατά των καρκινικών κυττάρων είτε με τη χειρουργική αφαίρεση είτε/και με την καταστροφή τους μέσω της ακτινοβολίας ή της χημειοθεραπείας. Στις μέρες μας συνεχίζεται μία σημαντική προσπάθεια για την ανακάλυψη ουσιών που στόχο έχουν την έμμεση καταστροφή των καρκινικών κυττάρων με τη διακοπή της αιμάτωσής τους και κατά συνέπεια, του εφοδιασμού τους σε οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες. Υπάρχουν δυο τρόποι στόχευσης των αγγείων, που είναι εξίσου αποτελεσματικοί στην αναστολή της ανάπτυξης ή μετάστασης των όγκων:

- Καταστροφή προϋπάρχοντων αγγείων
- Αναστολή της αγγειογένεσης

1.13 Ήπαρ

1.13.1. Γενικά

Το Ήπαρ είναι ένα όργανο του σώματος και εκτελεί σημαντικό αριθμός ζωτικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού, της αποτοξίνωσης και της ομοιόστασης. Ηπατοκύτταρα αποτελούν την πλειοψηφία του ήπατος και ασκούν το μεγαλύτερο μέρος των λειτουργιών

του ήπατος, όπως το μεταβολισμό, τη σύνθεση των πρωτεϊνών του αίματος και παραγόντων πήξης, την αποθήκευση του γλυκογόνου, αμινοξέων, λίπους, και σίδηρου, καθώς επίσης και την έκκριση της χολής (Blouin, Bolender, and Weibel 1977). Ασθένειες του ήπατος συμπεριλαμβανομένης της ηπατίτιδας Β, κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) είναι παγκόσμια προβλήματα υγείας και αιτίες υψηλού αριθμού θανάτων ετησίως, μια μεγάλη απειλή για την ανθρώπινη υγεία (Dienstag 2008). Επομένως, είναι σημαντικό να απεικονίσουμε την ανάπτυξη του ήπατος σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο για την πρόληψη και τη θεραπεία των ασθενειών του ήπατος, αλλά επίσης να τη μεταμόσχευση του ήπατος.

1.13.2 Το ήπαρ στο zebrafish

Το ήπαρ αποτελεί ζωτικό όργανο του ανθρώπινου σώματος, καθώς είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της ομοιόστασης. Υποδέχεται πρώτο όλες τις χημικές ουσίες που εισέρχονται στον οργανισμό από στόματος, όπως θρεπτικά συστατικά, βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία, φάρμακα και τοξικές ουσίες από το περιβάλλον, και τις μεταβολίζει και αποτοξινώνει πριν εισέλθουν στη συστηματική κυκλοφορία. Με τον τρόπο αυτό, το ήπαρ συντελεί στο να απορροφώνται τα ωφέλημα και να απεκκρίνονται τα άχρηστα ή επικίνδυνα για τον ανθρώπινο οργανισμό μόρια (Timbrell 2008).

Η βασική δομική και λειτουργική μονάδα του ήπατος είναι το ηπατικό λοβίο. Τα ηπατικά λοβία είναι εξάγωνες δομές παραταγμένες γύρω από

ηπατικά φλεβίδια. Σε κάθε μια από τις έξι γωνίες του λοβίου υπάρχουν τριάδες αγγείων αποτελούμενες από ένα παρακλάδι της πυλαίας φλέβας, της ηπατικής αρτηρίας και των χοληφόρων οδών (Si-Tayeb, Lemaigre, and Duncan 2010). Βασικότερα κύτταρα του ηπατικού λοβίου είναι τα ηπατοκύτταρα, τα οποία καταλαμβάνουν περίπου το 78% του όγκου του ήπατος (Blouin, Bolender, and Weibel 1977). Τα ηπατοκύτταρα είναι πολωμένα κύτταρα παραταγμένα σε χορδές πάχους ενός κυττάρου, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται εκατέρωθεν κολποειδή επιθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 11).

Στα ηπατοκύτταρα διενεργούνται οι περισσότερες λειτουργίες του ήπατος, όπως ο μεταβολισμός, η σύνθεση πρωτεϊνών του αίματος και παραγόντων πήξης, η αποθήκευση γλυκογόνου, αμινοξέων, λίπους και σιδήρου, καθώς και η έκκριση της χολής (Blouin, Bolender, and Weibel 1977).



Εικόνα 11 : Σχηματική απεικόνιση της δομής τμήματος του ηπατικού λοβίου (εικόνα αντιγραφή από Si-Tayeb et al., 2010)

Η οξεία ή χρόνια έκθεση του ήπατος σε τοξικές ουσίες μπορεί να επηρεάσει τη φυσιολογική του λειτουργία. Επίσης, ασθένειες του ήπατος όπως είναι η ηπατίτιδα Β, η κίρρωση του ήπατος και το ηπατοκυτταρικό

καρκίνωμα, αποτελούν σημαντικές απειλές για την ανθρώπινη υγεία καθώς ευθύνονται για υψηλά ποσοστά θνησιμότητας ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο (Dienstag 2008). Προκειμένου να κατανοήσουμε καλύτερα τους μηχανισμούς φυσιολογικής ηπατικής λειτουργίας καθώς και τους μηχανισμούς πρόκλησης ηπατικών βλαβών, είναι σημαντικό να μελετήσουμε την οργανογένεση του ήπατος. Στο μέλλον η δημιουργία υγείων διαφοροποιημένων ανθρώπινων ηπατοκυττάρων εργαστηριακά θα διευκόλυνε τη μελέτη της παθολογίας του ήπατος και θα μπορούσε δυνητικά να οδηγήσει στο σχηματισμό λειτουργικών ηπατικών δομών με στόχο ακόμη και τη μεταμόσχευση ήπατος.

Στα θηλαστικά, η ηπατική μορφογένεση περιλαμβάνει τη μετανάστευση ηπατικών βλαστικών κυττάρων (hepatoblasts) στο κρανιακό μεσέγγχυμα (συγκεκριμένα στο septum transversum) όπου και διαφοροποιούνται σε ηπατοκύτταρα κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και νεογνικής ανάπτυξης (Si-Tayeb, Lemaigre, and Duncan 2010). Η τελική ωρίμανση των ηπατοκυττάρων καθορίζεται από ένα πολύπλοκο δίκτυο παραγόντων μεταγραφής οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση των ηπατικών γονιδίων.

Στην παρούσα μελέτη, προκειμένου για την περαιτέρω μελέτη της ηπατικής μορφογένεσης, χρησιμοποιήθηκε το ψάρι του γλυκού νερού zebrafish (*Danio rerio*) ως καταλληλότερο πειραματικό μοντέλο για διάφορους λόγους. Το zebrafish έχει την ικανότητα να γεννά τουλάχιστον 150 αυγά σε κάθε διασταύρωση και επομένως είναι δυνατή η παραγωγή χιλιάδων εμβρύων σε ημερήσια ή εβδομαδιαία βάση χωρίς αυτό να συνεπάγεται τεράστιο κόστος. Τα αυγά του είναι διαφανή γεγονός που

επιτρέπει την παρατήρηση των σταδίων ανάπτυξης του ήπατος με μικροσκόπιο (Wilkins and Pack 2013). Τα έμβρυα του Zebrafish σε διάλυμα άλατος είναι αυτόνομα και παραμένουν ζωντανά για αρκετές ημέρες χωρίς την προσθήκη τροφής. Έτσι, ενώ διατηρούν την πολυπλοκότητα ενός ζωντανού οργανισμού (Driessen et al. 2015), το πειραματικό μοντέλο θεωρείτε in vitro. Τα έμβρυα του zebrafish αναπτύσσονται γρήγορα και εντός 5 ημερών το ήπαρ τους αποτελείται από διαφοροποιημένα πλήρως λειτουργικά ηπατοκύτταρα, συζευγμένα σε ένα δίκτυο ενδοηπατικών χοληφόρων καναλιών που συνδέονται με τη χοληδόχο κύστη και το έντερο μέσω εξωηπατικών χοληφόρων οδών (Wilkins and Pack 2013).

Όσον αφορά στο γενετικό υλικό του zebrafish, έχει προσδιοριστεί ότι το 70% των ανθρώπινων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες αντιστοιχούν σε γονίδια που υπάρχουν στο Zebrafish, ενώ 84% των γονιδίων που συνδέονται με ασθένειες στον άνθρωπο έχουν αντίστοιχα γονίδια στο zebrafish

(<http://www.jrfglobal.com/uploads/resources/pdfs/hepatotoxicity-in-zebrafish-danio-rerio-16.pdf>).

1.14 Φυσικά προϊόντα από φυτικές πηγές

1.14.1 Γενικές πληροφορίες

Η φύση υπήρξε πάντα πλούσια πηγή μορίων με αξιόλογες βιολογικές δράσεις και σημαντικές εφαρμογές σε ποικίλους επιστημονικούς τομείς. Ο όρος "φυσικά προϊόντα" περιλαμβάνει χημικές ενώσεις ή ουσίες που προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς, όπως φυτά, μύκητες,

μικροοργανισμούς, θαλάσσιους οργανισμούς, χερσαία σπονδυλωτά και παρουσιάζουν φαρμακολογική ή βιολογική δράση. Χημικές ουσίες που προέρχονται από τα ζώα, τα φυτά και τα μικρόβια έχουν χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών από την αρχή της επιστήμης της ιατρικής. Η συστηματική επιστημονική μελέτη των φυσικών προϊόντων ανάγεται στις αρχές του 19ου αιώνα, όπου εκτός από την απομόνωσή τους άρχισε η μελέτη της δομής τους με τα αναλυτικά μέσα της εποχής. Ακόμη, έλαβε χώρα ο διαχωρισμός τους με σκοπό την χρήση τους πάνω στο ανθρώπινο γένος και την καταπολέμηση μεγάλου αριθμού παθήσεων (Newman and Cragg 2012).

Τα φυτά αποτελούν ιστορικά τη σημαντικότερη πηγή για την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών παρά την τεράστια πρόοδο που έχει συντελεστεί στη χημική σύνθεση νέων φαρμάκων. Η ανάγκη του ανθρώπου να αντιμετωπίσει τις διάφορες ασθένειες, τον οδήγησαν από πολύ νωρίς να αναζητήσει εφόδια, που θα τον βοηθήσουν στην ίαση του. Η αναγκαιότητα αυτή τον έστρεψε, κυρίως, προς τον τεράστιο πλούτο του φυτικού βασιλείου, όπου με την παρατήρηση και τη σταδιακά επισταμένη μελέτη πέτυχε να χρησιμοποιήσει διάφορα φυτικά προϊόντα για θεραπευτικές ανάγκες. Πιο συγκεκριμένα, από τα 520 νέα φάρμακα που εγκρίθηκαν τη δεκαετία 1983-1994, το 39% ήταν φυσικά προϊόντα ή προέρχονταν από φυσικά προϊόντα. Οι λόγοι για τους οποίους τα φυτικά προϊόντα εξακολουθούν να παρουσιάζουν φαρμακευτικό ενδιαφέρον είναι οι εξής:

- Οι περισσότερες κατηγορίες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται σήμερα είτε περιέχουν φυτικά προϊόντα είτε η σύνθεσή τους έχει βασιστεί στη χημική δομή φυσικών προϊόντων, όπως τα περισσότερα αντιβιοτικά, ανοσοκατασταλτικά και αντικαρκινικά φάρμακα.
- Για τα περισσότερα φάρμακα που έχουν συντεθεί χημικά, έχουν βρεθεί φυτικά προϊόντα με ανάλογη δράση.
- Τα περισσότερα φυσικά προϊόντα είναι μικρού μοριακού βάρους και μπορούν εύκολα να απορροφηθούν και να μεταβολιστούν από τον ανθρώπινο οργανισμό. Τα φυτικά είδη υπολογίζονται σε περισσότερα από 250.000, αλλά μόνο ένα μικρό ποσοστό τους έχει μελετηθεί για την εύρεση βιολογικά δραστικών ουσιών.

Με αυτό το σκεπτικό ασχοληθήκαμε στην συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία με κλάσματα εκχυλισμάτων φυτικής προέλευσης, τα οποία λαμβάνονται έτοιμα από την Φαρμακευτική Σχολή Αθηνών. Τα εκχυλίσματα αυτά προέρχονται από φυτά της ελληνικής χλωρίδας που για λόγους εμπιστευτικότητας θα αναφέρονται με τις συντομεύσεις: TE, F4, F5, F6, F7, F8 & F9 .

1.15 Χημικός Έλεγχος

Ο χημικός γενετικός έλεγχος (chemical genetic screen) μπορεί να περιγραφεί ως μία διαδικασία κατά την οποία χημικά μόρια ελέγχονται για την ικανότητά τους να αλλάξουν μία βιολογική διαδικασία σε ένα γνωστό βιολογικό σύστημα. Ο χημικός έλεγχος μπορεί να επιτευχθεί εύκολα

τεχνικά, λόγω του ότι έμβρυα συγκεκριμένων αναπτυξιακών σταδίων επωάζονται παρουσία του εξετάζόμενου κάθε φορά μορίου. Από τη στιγμή που το μόριο θα δώσει ένα αποτέλεσμα, στην περίπτωση που αυτό είναι θετικό, μπορεί να δοθεί το έναυσμα για την ανακάλυψη ενός νέου φαρμάκου (Zon and Peterson 2005; Paz and Zhu 2005; Taylor et al. 2010; Tsang 2010). Λόγω των πλεονεκτημάτων του που αναφέρθηκαν σε προηγούμενη ενότητα, το zebrafish έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα τα τελευταία χρόνια σε chemical genetic screens. Οι έλεγχοι στους οποίους χρησιμοποιείται έχουν να κάνουν είτε με τη μελέτη τοξικότητας χημικών μορίων (οικοτοξικολογικά τεστ), είτε με την ανίχνευση πιθανών αναστολέων μιας γενετικής μεταλλαγής, είτε με την εύρεση πιθανών αναστολέων ή επαγωγικών βιολογικών διαδικασιών (π.χ. αγγειογένεση), καθώς και των μοριακών μηχανισμών δράσης τους. Πολύ συχνά χρησιμοποιούνται μόρια από χημικές βιβλιοθήκες. Τα μόρια αυτά μπορεί να έχουν προκύψει από σύνθεση φαρμάκων και βρίσκονται αποθηκευμένα ως παραλλαγές μιας δραστικής ουσίας. Ο λόγος που χρησιμοποιούνται είναι για την πιθανή ανακάλυψη νέων φαρμάκων, ακόμα και σε μηχανισμούς διαφορετικούς από αυτούς για τους οποίους αρχικά συντέθηκαν. Στους ελέγχους αυτούς μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολυάριθμα έμβρυα σε πλάκες μικρών πηγαδιών (well plates) και να προστεθούν τα χημικά μόρια σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια (Paz and Zhu 2005; Taylor et al. 2010; Tsang 2010). Η προσθήκη των ουσιών σε αναπτυξιακά στάδια μικρότερα των 6hpf μπορεί να αυξήσει τη θνησιμότητα, λόγω της υψηλής ευαισθησίας του εμβρύου. Επίσης, λαμβάνονται υπόψη και άλλες παράμετροι, όπως η συγκέντρωση της

ουσίας και η αφαίρεση του χορίου ή μη από το έμβρυο (κάτι που επηρεάζει την απορρόφηση της χημικής ένωσης από αυτό). Ένας τομέας στον οποίο βρίσκει συχνά εφαρμογή η χρήση τέτοιων βιβλιοθηκών για chemical genetic screens τα τελευταία χρόνια, είναι αυτός της ανίχνευσης μορίων- υποψήφιων αναστολέων της αγγειογένεσης (Paz and Zhu 2005), με απώτερο σκοπό την παραγωγή αντικαρκινικών φαρμάκων.

1.15 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε ο συστηματικός έλεγχος επιμέρους κλασμάτων δραστικών εκχυλισμάτων F4, F5, F6, F7, F8, F9 & TE, τα οποία έχουν απομονωθεί από το φυτό *Sorbus umbellata* της ελληνικής χλωρίδας. Μελετήθηκε η θανατηφόρα συγκέντρωση και η εμβρυοτοξική δράση (διατάραξη της εμβρυογένεσης) καθώς και η επίδραση των κλασμάτων των εκχυλισμάτων στη μορφολογία και διαφοροποίηση του ήπατος. Ένας επιπλέον στόχος ήταν η διερεύνηση της ικανότητά τους να επηρεάζουν την αγγειογένεση.

2 Υλικά -Μέθοδοι

2.1 Πειραματόζωα

Τα ενήλικα zebrafish (*Danio rerio*) που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις διαγονιδιακές σειρές όπως φαίνονται ακολούθως:

Tg(cmlc2:GFP) : τα διαγονιδιακά zebrafish *cmlc2:gfp* εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε μυοκαρδιακά κύτταρα. Το γονίδιο GFP είναι κλωνοποιημένο κατωφορικά του υποκινητή του γονιδίου *cmlc2*, το οποίο κωδικοποιεί την ελαφριά αλυσίδα μυοσίνης εξειδικευμένα στον κόλπο και στη κοιλία (Huang et al. 2003)

Tg (fli:GFP) : Η διαγονιδιακή σειρά *fli* φέρει σημασμένα με πράσινο χρώμα τα ενδοθηλιακά και ενδοκαρδιακά κύτταρα του zebrafish. Έτσι είναι εφικτή η παρατήρηση του πλήρους καρδιαγγειακού συστήματος του.

Tg (kdrl:EGFP) : Η διαγονιδιακή σειρά *kdrl* φέρει σημασμένα με πράσινο χρώμα τα ενδοθηλιακά και ενδοκαρδιακά κύτταρα για την παρατήρηση του καρδιαγγειακού συστήματος του zebrafish.

Tg (Triple:GFP): Αυτή η διαγονιδιακή σειρά χρησιμοποιήθηκε για την οπτική παρατήρηση και μελέτη της ανάπτυξης του συκωτιού του zebrafish.

Οι διαγονιδιακές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη παρουσιάζουν φυσιολογική ανάπτυξη και δεν εμφανίζουν φαινοτυπικές ή ιστολογικές ανωμαλίες.

2.1.1 Συνθήκες διαβίωσης του zebrafish στις εγκαταστάσεις του ΙΙΒΕΑΑ

Το Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας του κέντρου Κλινικής, Πειραματικής, Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας στο Ιδρύμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, διαθέτει 2 χώρους που χρησιμοποιούνται ως ενυδρεία. Αυτά βρίσκονται στο υπόγειο του ΙΙΒΕΑΑ. Το πρώτο ενυδρείο που τέθηκε σε λειτουργία αποτελείται από 2 ξεχωριστά συστήματα και υποστηρίζει δεξαμενές ενός λίτρου και τριών λίτρων.

Το δεύτερο ενυδρείο που τέθηκε σε λειτουργία και το οποίο αποτελείται από 5 ξεχωριστά συστήματα. Τα 2 πρώτα υποστηρίζουν επίσης δεξαμενές ενός λίτρου και τριών λίτρων, αλλά τα συστήματα 3, 4, 5 αποτελούνται από δεξαμενές 5 λίτρων.

Οι συνθήκες διαβίωσης για τα ψάρια είναι ίδιες και στα 2 ενυδρεία αλλά και στα συνολικά 7 συστήματα ομοιογενείς. Πιο συγκεκριμένα :

- Ο κύκλος φωτός είναι 14 ώρες φως και 10 σκοτάδι (9:00 – 23:00 φως) (23:01-8:59 σκοτάδι)
- Η θερμοκρασία στα συστήματα είναι $28 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$.
- Το pH κυμαίνεται από 6,5 έως 7,2. Το σημαντικό σε σχέση με το pH είναι να παραμένει σταθερό.
- Η αγωγιμότητα του νερού από 400 έως 700 μS .
- Τα νιτρώδη ($< 2.5 \text{ mg/L}$) και τα νιτρικά ($\leq 0.025 \text{ mg/L}$).
- Στα συστήματα το νερό επανακυκλοφορεί.

Σε κάθε μονόλιτρη δεξαμενή υπάρχουν από 1 έως 3 ψάρια, σε κάθε τρίλιτρη από 3 έως 10 ψάρια και στις δεξαμενές των 5 λίτρων υπάρχουν από 4 έως 12 ψάρια. Η διατήρηση των ψαριών σε πυκνότητες

μικρότερες του 1 ψάρι/λίτρο προκαλεί συνήθως προβλήματα λόγω υπερβολικής σίτισης. Επιπλέον μετατοπίζει δραματικά την αναλογία του φύλου (προς τα θηλυκά), κάτι το οποίο λαμβάνεται ως στρεσογόνος παράγοντας.



Εικόνα 12: Σύστημα 2 του 1^{ου} ενυδρείου ανάπτυξης του zebrafish.



Εικόνα 13: Συστήματα 1 και 2 του 2^{ου} ενυδρείου για την ανάπτυξη του zebrafish



Εικόνα 14: Σύστημα 3 του 2ου ενυδρείου

Όσον αφορά στα έμβρυα, τοποθετούνται μέχρι 25 σε μονόλιτρες , ενώ σε τρίλιτρες δεξαμενές τοποθετούνται μέχρι 40 έμβρυα. Καθώς μεγαλώνουν, διαχωρίζονται τα άτομα σε πυκνότητες όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφέρουμε πως στα έμβρυα δεν χρησιμοποιούμε νερό από τα συστήματα, ούτε καθαρά απιονισμένο νερό, αλλά χρησιμοποιούμε ειδικό νερό (egg water) που έχει την παρακάτω σύσταση :

- 1Lt απιονισμένου νερού
- 1,2 γρ. τεχνητό θαλασσινό αλάτι (Instant Ocean)
- 0,32 γρ. θειϊκό ασβέστιο (CaSO₄, Merk)

2.1.2 Διατροφή του zebrafish στο Εργαστήριο

Η διατροφή είναι πολλή σημαντική για κάθε οργανισμό. Από αυτήν εξαρτάται η υγεία και η εν γένει ευρωστία του ψαριού. Συνεπώς, τελεί

ιδιαίτερης φροντίδας η τροφή. Είναι λογικό η διατροφή να εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους, η σημαντικότερη μεταξύ των οποίων είναι η ηλικία του ψαριού. Όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή, τα zebrafish δεν έχουν ανάγκη εξωτερικής τροφής μέχρι και την 5^η ημέρα από την γέννηση τους και αυτό λόγω της λεκίθου που υπάρχει μέχρι αυτό το σημείο.

Από την 5^η ημέρα και έπειτα τα ψάρια τρέφονται με γαρίδες (*Artemia*) κάθε πρωί και με ξηρά τροφή (την Z000) κάθε μεσημέρι, και σε συγκεκριμένες ώρες. Σε ηλικία 2 μηνών δίνουμε τροφή Z300.

Όσον αφορά τα πρωτόκολλα που ακολουθούνται κατά την διατροφή των ψαριών με γαρίδες αλλά και για την καλλιέργεια τους, είναι τα εξής :

2.1.2.1 Πρωινή διατροφή με *Artemia salina*

- Χρησιμοποιούμε κάθε μέρα εναλλάξ ένα από τα δύο κωνικά δοχεία εκτροφής γαρίδας (*Artemia salina*) για τάισμα (συμβουλευόμαστε πάντα την ημερομηνία)



Εικόνα 15: Κωνικά δοχεία που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια των γαρίδων (*Artemia*)

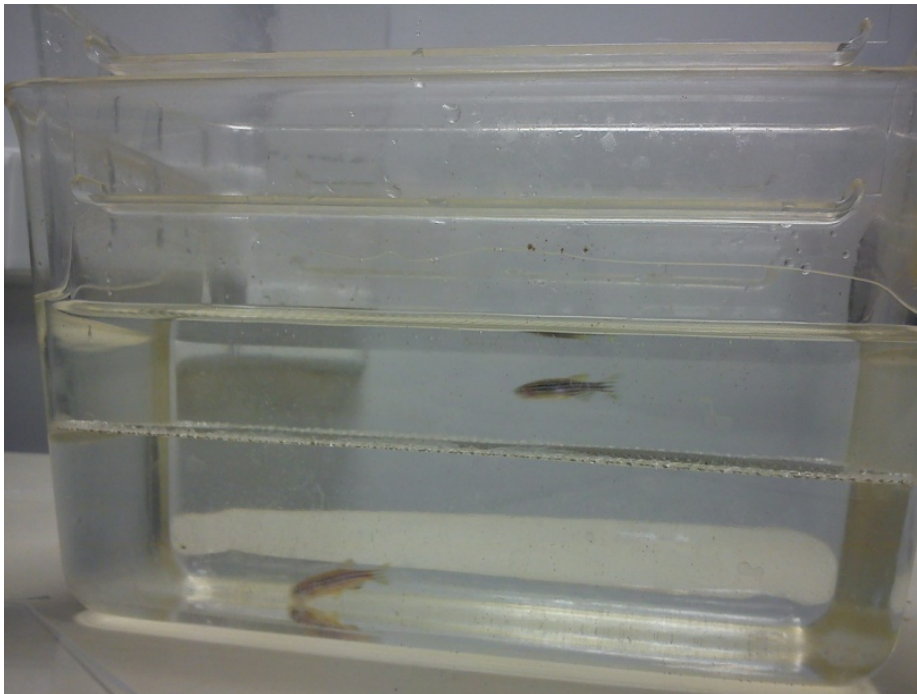
- Πριν το τάισμα αναδεύουμε έντονα την καλλιέργεια και στη συνέχεια ανοίγουμε τη στρόφιγγα στο κάτω μέρος του δοχείου για να απορρίψουμε τα κελύφη από τα εκκολαφθέντα αυγά που έχουν καθιζήσει.
- Απομακρύνουμε τον αέρα από το δοχείο καλλιέργειας *Artemia* και περιμένουμε τουλάχιστον 10 λεπτά
- Μετά την παρέλευση του προαναφερθέντος χρόνου (απαραίτητου ώστε να επιτευχθεί διαχωρισμός των ατόμων *Artemia* από τα κελύφη των αυγών) ανοίγουμε τη στρόφιγγα και διοχετεύουμε το υγρό της καλλιέργειας στο πλαστικό δοχείο, περνώντας το μέσα από το σουρωτήρι για να κρατήσουμε τις γαρίδες.
- Ρίχνουμε απιονισμένο νερό (dH₂O) στο σουρωτήρι για να ξεπλύνουμε τις γαρίδες και τις μεταφέρουμε στο πλαστικό κυλινδρικό δοχείο για τάισμα με τη βοήθεια πλαστικής πιπέτας. Συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό (dH₂O) μέχρι αυτό να γεμίσει.
- Ξεπλύνουμε καλά με νερό βρύσης και με τη βούρτσα το κωνικό δοχείο καλλιέργειας και το σουρωτήρι και επιστρέφουμε το απορριφθέν φιλτραρισμένο νερό ξανά στον κώνο. Συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό (dH₂O) και προσθέτουμε αυγά *Artemia* σε σκόνη. Τέλος επανατροφοδοτούμε με αέρα το σύστημα.
- Το τάισμα γίνεται ως εξής: Στις μονόλιτρες δεξαμενές προσθέτουμε 1-1,5ml ζωντανές γαρίδες, στις δεξαμενές με λίγα μικρά ψάρια προσθέτουμε 0,5ml ζωντατής τροφής, ενώ στα δεξαμενές με περισσότερα και μεγάλα ψάρια χρησιμοποιούμε ως και 3 ml ζωντανής τροφής.

2.1.3 Αναπαραγωγή του zebrafish στο Εργαστήριο

Τα zebrafish όπως έχει προαναφερθεί, μπορεί να διασταυρώνονται ακόμη και 2 φορές την εβδομάδα και να δίνει το κάθε ζευγάρι εκατοντάδες αυγά τη φορά. Πρέπει να γίνεται διαχωρισμός του θηλυκού από το αρσενικό πριν την ημέρα της ζητούμενης ωοτοκίας και καλό είναι αυτό να γίνεται περίπου 3 ώρες μετά την μεσημεριανή διατροφή τους.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφέρουμε πως υπάρχουν δύο τρόποι για να διασταυρώσουμε τα ψάρια όσον αφορά το πλήθος τους και τα ζευγάρια που θα χρησιμοποιήσουμε:

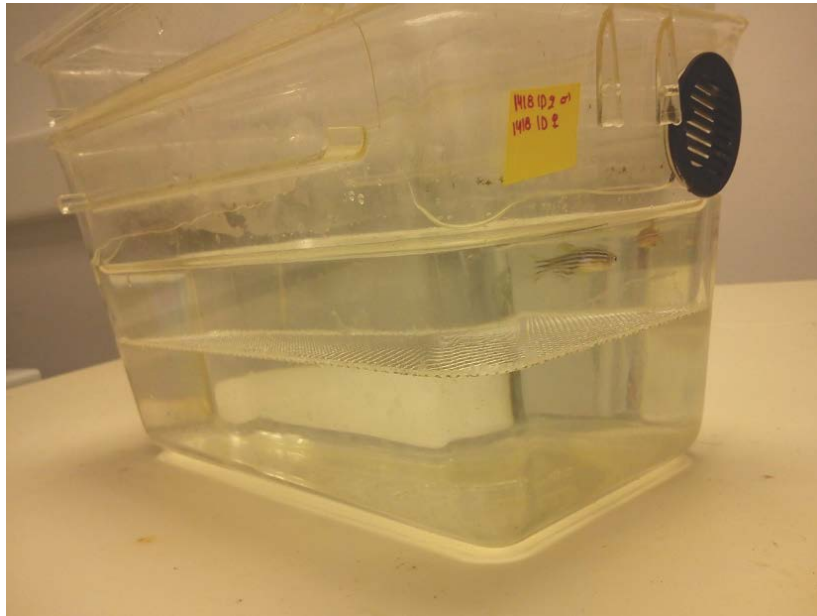
- Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ένα ζευγάρι το οποίο το διαχωρίζουμε με πλέγμα. Συνήθως, τοποθετούμε το αρσενικό από κάτω και το θηλυκό από πάνω (βλ. εικόνα16).



Εικόνα16: Δοχείο αναπαραγωγής. Αναπαραγωγή zebrafish στο εργαστήριο.

- Χρησιμοποιούμε πολλά αρσενικά και θηλυκά που τα διαχωρίζουμε πάλι με πλέγμα. Στη βέλτιστη ωτοκία (100-200 αυγά), συντελλεί η ελάττωση της στάθμης του νερού η οποία ευνοεί την αναπαραγωγή και οδηγεί στην αύξηση του αριθμού των αυγών.

Την επόμενη μέρα και μάλιστα αμέσως μετά από την έναρξη της φωτεινής περιόδου, ενώνουμε τα αρσενικά με τα θηλυκά και τα τοποθετούμε στην πάνω μεριά του πλέγματος, ώστε να μην φαγωθούν τα αυγά μόλις αυτά εναποθετηθούν από το θηλυκό (Εικόνα 17).



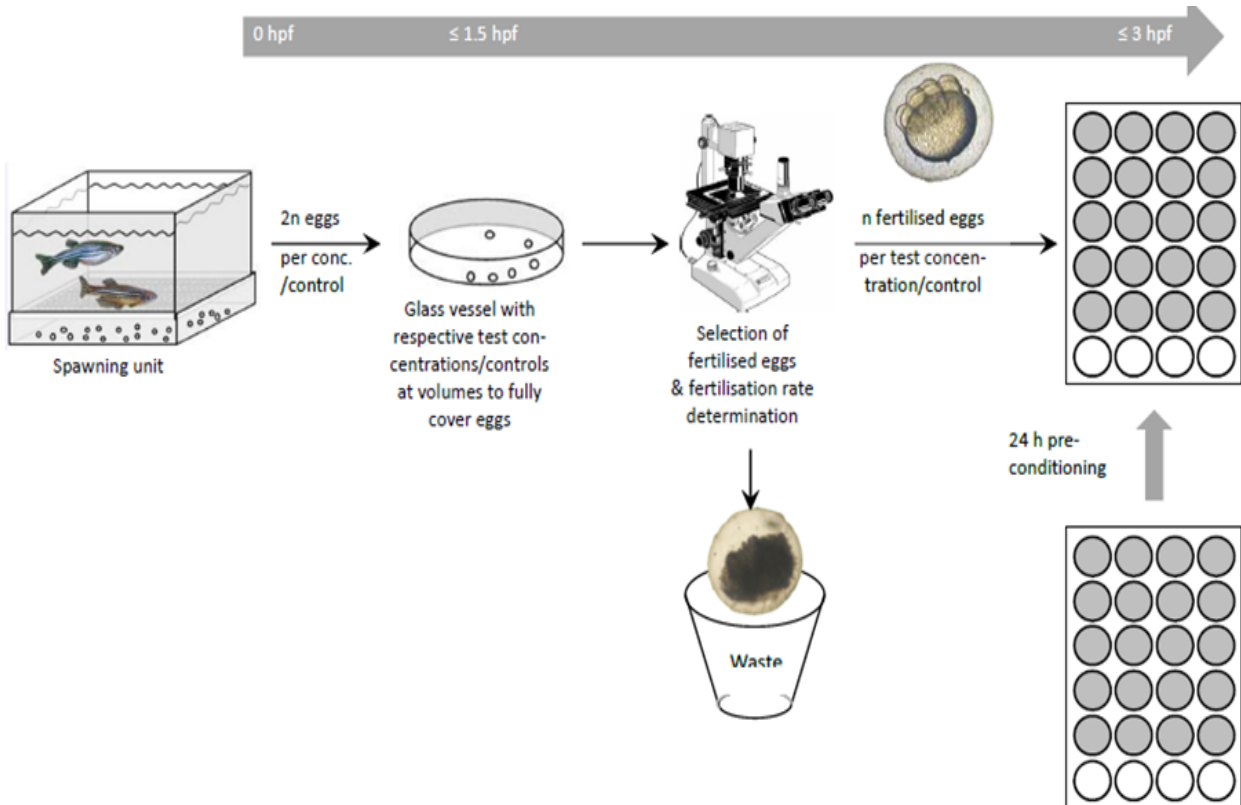
Εικόνα17: Αναπαραγωγή zebrafish στο εργαστήριο. Διατήρηση σε ξεχωριστά δοχεία τα αρσενικά, από τα θηλυκά και από τα αυγά.

Τα αφήνουμε για 1-2 ώρες για να πραγματοποιηθεί η ωτοκία και η γονιμοποίηση των αυγών από το σπέρμα των αρσενικών, η οποία πραγματοποιείται σε 15 – 20 λεπτά που θα ελευθερώσει τα αυγά το θηλυκό. Τέλος, επιστρέφουμε προσεκτικά τα ψάρια πίσω στις δεξαμενές

όπου ανήκουν, και τα αυγά που έχουν γεννηθεί τοποθετούνται μέσα σε τριβλία petri χρησιμοποιώντας συνθετικό θαλασσινό νερό με θρεπτικά άλατα (egg water) και τα οποία με τη σειρά τους τα τοποθετούμε στον επωαστικό θάλαμο στους 28 – 29 °C.

2.2 Προσδιορισμός χημικού ελέγχου

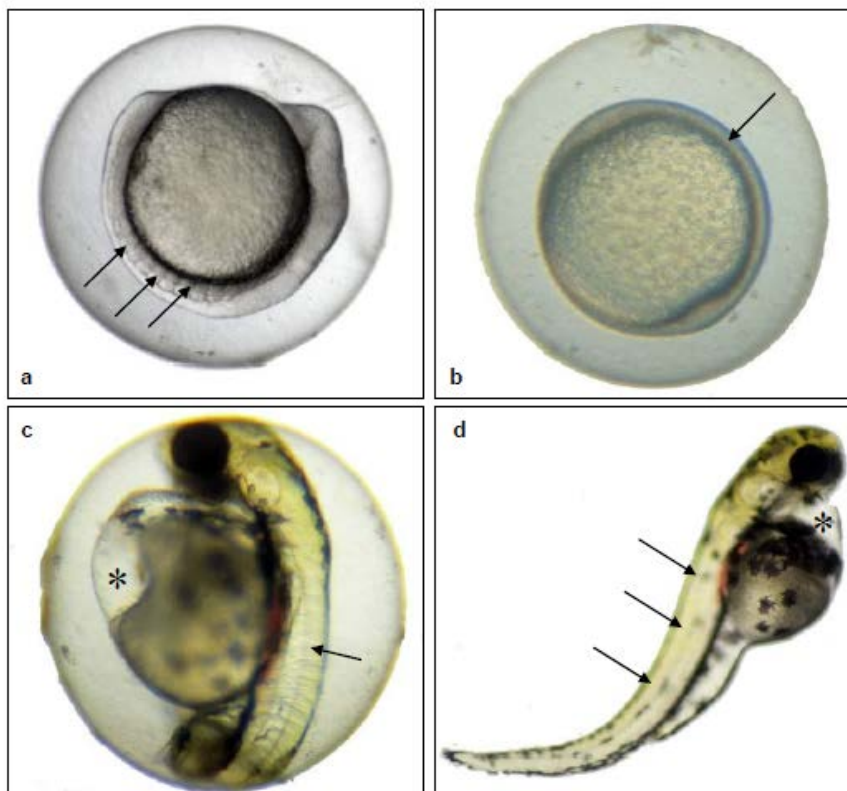
Τα πρόσφατα γονιμοποιημένα αυγά ψαριού zebrafish εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία για μια περίοδο 96 ωρών (OECD 236) (Εικόνα 18).



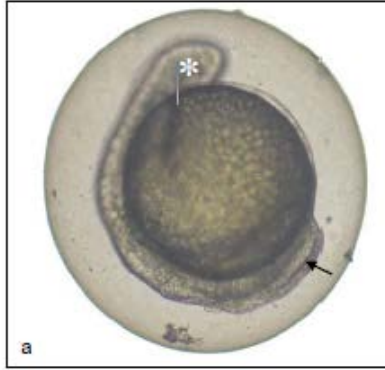
Εικ.18: Σχηματική απεικόνιση ενός χημικού ελέγχου. Ενήλικα ψάρια διασταυρώνονται παράγοντας εκατοντάδες αυγά. Με τη βοήθεια ενός μικροσκοπίου τα γονιμοποιημένα αυγά χωρίζονται από τα μη γονιμοποιημένα. Στα γονιμοποιημένα αυγά τα δύο βλαστομερίδια που δημιουργούνται είναι διαφανή και συμμετρικά. Τα έμβρυα διατάσσονται σε well-plates. Οι χημικές ουσίες προστίθενται στο θρεπτικό μέσο των εμβρύων (egg water) σε διάφορες συγκεντρώσεις και σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Τα έμβρυα αναπτύσσονται και εκτιμάται ο επιθυμητός φαινότυπος (OECD 236).

Οι παρατηρήσεις καταγράφονται κάθε 24 ώρες. Συγκεκριμένα, γίνονται καταγραφή για το δείκτη της θνησιμότητας :

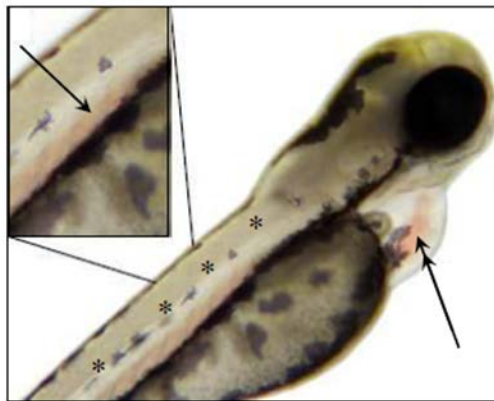
- (i) τα γονιμοποιημένα αυγά θα πρέπει να είναι συμπαγή,
- (ii) καταγραφή της έλλειψης σχηματισμού των σωματιών (Εικόνες 19&21)
- (iii) καταγραφή της έλλειψης τους αποχωρισμού της ουράς από το λεκιθικό σάκο (Εικόνα 20) και
- (iv) καταγραφή της απουσίας των παλμών της καρδιάς (Εικόνα 21)



Εικόνα19 : Έλλειψη σχηματισμού σωματιών : Στο κατά δέκα ώρες καθυστερημένης ανάπτυξης 24^{ωv} ωρών έμβρυο μπορούμε να διακρίνουμε στο (a) καλά σχηματισμένους σωμαίτες (με βέλη), ενώ στο έμβρυο στο (b) δεν φαίνεται ο σχηματισμός τους. Στο 48ωρών έμβρυο zebrafish στο (c) παρά το οίδημα φαίνεται ξεκάθαρα ο σχηματισμός σωματιών (βέλη) ενώ στο 96ωρών έμβρυο zebrafish που απεικονίζεται στο (d) (βέλη) δεν διακρίνονται καθόλου οι σωμαίτες. Σ' αυτό το έμβρυο μπορούμε να παρατηρήσουμε σκολίωση και περικαρδιακό οίδημα (αστερίσκος) (OECD 236).



Εικόνα20: Μη αποκολλημένη ουρά σε 96ωρών έμβρυο zebrafish (βέλος). Έλλειψη οφθαλμού (*).



Εικόνα21: Έλλειψη χτύπου καρδιάς 96ωρών έμβρυο zebrafish (διπλό βέλος). Έλλειψη σωματιών (*).

Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, προσδιορίστηκε και υπολογίστηκε η LC50 (η συγκέντρωση που προκαλεί 50% θνησιμότητα).

2.2.1 Εγκυρότητα της δοκιμασίας

Για να είναι έγκυρα τα αποτελέσματα της δοκιμής μας, εφαρμόστηκαν τα ακόλουθα κριτήρια:

α) Το συνολικό ποσοστό κάθε γονιμοποίησης από τα αυγά που συλλέγονταν έπρεπε να είναι $\geq 70\%$ αποδοτικότητας.

β) Η θερμοκρασία του νερού θα έπρεπε να διατηρείται στους $26,5 \pm 1$ ° C σε θαλάμους δοκιμής σε οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

γ) Η συνολική επιβίωση των εμβρύων (δείγμα ελέγχου σε νερό αραιώσης) και, ενδεχομένως, στον έλεγχο του διαλύτη θα πρέπει να είναι $\geq 90\%$ μέχρι το τέλος της έκθεσης των ζώων στις 96 ώρες.

δ) εκκόλαψη στο δείγμα ελέγχου (έλεγχος διαλύτη κατά περίπτωση) θα πρέπει να είναι $\geq 80\%$ στο τέλος της έκθεσης 96 ώρες.

2.2.2 Διαλύματα βιοδοκιμής

Τα διαλύματα δοκιμής των επιλεγμένων συγκεντρώσεων παρασκευάστηκαν, π.χ., με αραιώση ενός διαλύματος αποθέματος. Τα διαλύματα αποθέματος όπως έχει προαναφερθεί είναι ένα εκχυλίσμα (TE) με κλάσματα που προέκυψαν απ' αυτό (F4, F5, F6, F7, F8, F9) και προέρχονται από φυτά της ελληνικής χλωρίδας. Οι υπό δοκιμή ουσίες ήταν δύσκολο να διαλυθούν στο νερό, και ακολουθήθηκαν διαδικασίες που περιγράφονται στο πλαίσιο του OECD (Guidance Document No 23) για τον χειρισμό δυσδιάλυτων ουσιών. Αν και πρέπει η χρήση διαλυτών να αποφεύγεται, σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτείται, προκειμένου να παραχθεί ένα συμπυκνωμένο διάλυμα-απόθεμα. Όταν χρησιμοποιείται ένας διαλύτης για να βοηθήσει στην παρασκευή διαλύματος αποθέματος, η τελική του συγκέντρωση δεν πρέπει να υπερβαίνει 100 μl / L και θα πρέπει να είναι η ίδια σε όλα τα δοχεία δοκιμής. Όταν χρησιμοποιείται ένας διαλύτης, απαιτείται ένας πρόσθετος έλεγχος διαλύτη. Όλες οι συγκεντρώσεις για για κάθε μία από τις υπό δοκιμή ουσίες παρασκευάστηκαν από αρχικό διάλυμα 50mg/ml σε μεθανόλη (MeOH). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ουσία φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3 : Συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (mg/ml) για τα 6 κλάσματα και το αρχικό εκχύλισμα σε δύο σταδίων ανάπτυξης έμβρυα zebrafish

Χημικές ουσίες	Συγκεντρώσεις (mg/ml)
F4	0.01, 0.02, 0.05, 0.07, 0.1
F5	0.01, 0.02, 0.05, 0.07, 0.1
F6	0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2
F7	0.01, 0.02, 0.05, 0.07, 0.1
F8	0.01, 0.02, 0.05, 0.07, 0.1
F9	0.01, 0.02, 0.07, 0.1, 0.02
TE	0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.07, 0.1, 0.2

2.2.3 Διαδικασία –Συνθήκες Έκθεσης

Είκοσι έμβρυα ανά συγκέντρωση εκτίθονταν για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία. Η έκθεση ήταν τέτοια ώστε $\pm 20\%$ της ονομαστικής συγκέντρωσης χημικών διατηρούνταν καθ' όλη τη δοκιμή. Εάν δεν μπορεί να διατηρηθεί η συγκέντρωση της έκθεσης του $\pm 20\%$ της ονομαστικής συγκέντρωσης, θα πρέπει να ανανεώνεται με καινούργιο διάλυμα. Μετά την ανανέωση, θα πρέπει να ληφθεί μέριμνα ώστε τα έμβρυα να εξακολουθήσουν να καλύπτονται από ένα μικρό ποσό των παλαιών διαλυμάτων δοκιμής για να αποφεύγεται η ξήρανση. Στη διάρκεια των δοκιμών μας δε χρειάστηκε να επέμβουμε γιατί δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στον όγκο των φρεατίων –πηγαδιών.

2.2.4 Συγκεντρώσεις δοκιμής

Σύμφωνα με τον OECD, πρέπει να χρησιμοποιηθούν πέντε συγκεντρώσεις για κάθε χημική ουσία προς εξέταση. Για την ικανοποίηση των στατιστικών απαιτήσεων η διαφορά μεταξύ των δόσεων δεν θα πρέπει να

υπερβαίνει ένα σταθερό παράγοντα 2,2 (π.χ. 1^η συγκέντρωση 100mg/l, 2^η συγκέντρωση 220 mg/l κ.λ.π.). Η υψηλότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε για όλα τα δείγματα (fraction) οδήγησε σε 100% θνησιμότητα, και η χαμηλότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε δεν έδωσε κατά κανόνα κανένα παρατηρήσιμο αποτέλεσμα. Μια δοκιμή ανεύρεσης εύρους πριν από την οριστική δοκιμή πραγματοποιήθηκε με την χρήση δέκα έμβρυων ανά συγκέντρωση για την επιλογή του κατάλληλου εύρους συγκέντρωσης.

2.2.5 Κατανομή των εμβρύων πάνω στις πλάκες 24 φρεατίων-πηγαδιών

Τα έμβρυα διανέμονται σε φρεάτια στους ακόλουθους αριθμούς :

- 20 έμβρυα σε μία πλάκα για κάθε συγκέντρωση δοκιμής
- 20 έμβρυα ως έλεγχος διαλύτη σε μία πλάκα (αν χρειάζεται)*
- 4 έμβρυα σε νερό αραιώσης ως εσωτερικός έλεγχος πλάκας σε καθεμία από τις ανωτέρω πλάκες
- 20 αυγά σε νερό αραιώσης ως αρνητικός μάρτυρας σε ένα πιάτο.

*Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ένας διαλύτης, μια επιπλέον ομάδα 20 εμβρύων εκτίθεται στον διαλύτη σε ένα ξεχωριστό 24-φρεατίων, εξυπηρετώντας έτσι τον έλεγχο του διαλύτη. Για να είναι αποδεκτό το τεστ, ο διαλύτης θα πρέπει να αποδειχθεί ότι δεν έχει σημαντικές επιπτώσεις στο χρόνο της εκκόλαψης των γονιμοποιημένων αυγών, στην επιβίωση, ούτε παράγει οποιεσδήποτε άλλες αρνητικές επιπτώσεις στα έμβρυα.

2.2.6 Έναρξη της έκθεσης και η διάρκεια της δοκιμής

Η δοκιμή ξεκινά το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση των αυγών και τερματίζεται μετά από 96 ώρες έκθεσης. Τα έμβρυα πρέπει να βυθίζονται σε διαλύματα δοκιμής στο στάδιο του βλαστιδίου πριν από την

έναρξη της διάσπασης του βλαστόδισκου ή το αργότερο στη φάση των δεκαέξι κυττάρων.

Πραγματοποιείται έλεγχος τοξικότητας και κατόπιν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου φθορισμού έλεγχος επαγωγής της αγγειογένεσης στη διαγονιδιακή σειρά Tg (fli: GFP) που φέρει σημασμένα με πράσινο χρώμα τα ενδοθηλιακά και ενδοκαρδιακά κύτταρα του zebrafish, καθώς επίσης και στη διαγονιακή σειρά Tg:Triple για τη μελέτη της ανάπτυξης του ήπατος του zebrafish.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Λήψη εμβρύων από αγρίου τύπου και διαγονιδιακά Tg (kdrl:EGFP) zebrafish (διαχωρισμός γονιμοποιημένων και απόρριψη μη γονιμοποιημένων αυγών). Τα βιώσιμα γονιμοποιημένα αυγά διαχωρίζονται από τα μη γονιμοποιημένα αυγά και μεταφέρονται σε πλάκες (well-plates) και το φρεάτιο ξαναγεμίζει με 2 ml φρέσκο παρασκευασμένα διαλύματα δοκιμής εντός 180 λεπτών μετά τη γονιμοποίηση με τη βοήθεια στερεομικροσκοπίου. Βιώσιμα θεωρούνται τα αυγά που διαιρούνται και δεν παρουσιάζουν εμφανείς παρατυπίες κατά τη διαίρεση (π.χ., ασυμμετρία, σχηματισμό κυστιδίων) ή τραυματισμό του χορίου.
- Για την αφαίρεση του χορίου σε έμβρυα 24 hpf προστίθεται σε τριβλία των 10ml EW (egg water= θρεπτικό μέσο ανάπτυξης εμβρύων) 150μl προνάσης .
- Προσθήκη στα έμβρυα των ουσιών σε διάφορες συγκεντρώσεις 1μM – 100μM (αρχικό stock 10mM διαλυμένο σε απόλυτη αιθανόλη ή DMSO και μετέπειτα αραίωση στο θρεπτικό μέσο των εμβρύων (egg water).
- Εκτός από τα δείγματα των ουσιών, χρησιμοποιούμε και ως αρνητικό μάρτυρα την αντίστοιχη συγκέντρωση DMSO σε EW.

- Διατήρηση των πλακών σε θάλαμο επώασης στους 28°C και λήψη φωτογραφιών των εμβρύων από στερεοσκόπιο φθορισμού στις 24, 48, 72 και 96hrpf.

2.3 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η ιδέα της ανάλυσης probit δημοσιεύθηκε αρχικά στο περιοδικό Science από τον Chester Ittner Bliss το 1934. Εργάστηκε ως εντομολόγος για το σταθμό γεωργικών πειραμάτων στο Κονέκτικατ και αφορούσε κατά κύριο λόγο την εύρεση ενός αποτελεσματικού φυτοφαρμάκου για τον έλεγχο των εντόμων που τρέφονται με φύλλα σταφυλιών (Greenberg 1980). Η γραφική παράσταση της απόκρισης των εντόμων σε διάφορες συγκεντρώσεις των φυτοφαρμάκων, θα μπορούσε να δείξει ότι κάθε φυτοφάρμακο επηρεάζει τα έντομα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, δηλαδή την αποτελεσματικότητα του ενός από το άλλο. Ωστόσο, ο ίδιος δεν είχε στατιστικώς ορθή μέθοδο για να συγκρίνει τη διαφορά αυτή. Η σχέση της ανταπόκρισης στη συγκέντρωση ήταν σιγμοειδής στην φύση και κατά τον χρόνο παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε μόνο σε γραμμική δεδομένων. Ως εκ τούτου, ο Bliss ανέπτυξε την ιδέα της μετατροπής της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης από σιγμοειδή σε μια ευθεία γραμμή. Το 1952, ο καθηγητής της στατιστικής στο Πανεπιστήμιο του Εδιμβούργου Finney έγραψε ένα βιβλίο με τίτλο Probit Analysis (Finney 1952). Σήμερα, η ανάλυση probit εξακολουθεί να είναι η προτιμώμενη στατιστική μέθοδος στις σχέσεις συγκέντρωσης-απόκρισης.

Η ανάλυση Probit χρησιμοποιείται συνήθως στην τοξικολογία για να καθοριστεί η σχετική τοξικότητα των χημικών ουσιών σε ζωντανούς οργανισμούς. Αυτό γίνεται με τη δοκιμή της απόκρισης ενός οργανισμού υπό διάφορες συγκεντρώσεις του καθενός από τα εν λόγω χημικά και στη συνέχεια συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις.

Η απάντηση είναι πάντα διωνυμική (π.χ. θάνατος / όχι θάνατος) και η σχέση μεταξύ της απόκρισης και των συγκεντρώσεων είναι πάντα σιγμοειδής. Η ανάλυση πιθανοτήτων λειτουργεί ως μεταμόρφωση από σιγμοειδής σε γραμμική.

Με την ανάλυση Probit η σιγμοειδής καμπύλη της θνησιμότητας μετατρέπεται σε ευθεία μετά από μετατροπή των ποσοστών θνησιμότητας σε Probit μονάδες και των δόσεων σε \log_{10} . Από την Probit ανάλυση υπολογίστηκαν οι τιμές των LC_{50} (Lethal Concentration₅₀ - η συγκέντρωση στην οποία θανατώνεται το 50% του πληθυσμού) και LC_{90} (η συγκέντρωση στην οποία θανατώνεται το 90% του πληθυσμού), τα όρια εμπιστοσύνης (Confidential Limits – CL) για κάθε τιμή LC_{50} ή LC_{90} για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$, καθώς επίσης και οι κλίσεις των ευθειών (slopes) (Finney 1971). Η στατιστική ανάλυση κατά Finney πραγματοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία για την ανάλυση της 50% και 95% θνησιμότητας με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS version 16.0 (SPSS 2004).

2.4 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Για την παρατήρηση των εμβρύων χρησιμοποιήθηκαν τα στερεοσκόπια Nikon SMZ800, Leica MZ75, Leica EZ4D, το στερεοσκόπιο φθορισμού Nikon WD70 και το οπτικό μικροσκόπιο Zeiss HBO 100.

Για τη λήψη φωτογραφιών σε οπτικό στερεοσκόπιο χρησιμοποιήθηκαν οι κάμερες Digital camera Sony Leica DFC 500 και η ενσωματωμένη κάμερα στο στερεοσκόπιο Leica EZ4D. Η τελευταία χρησιμοποιήθηκε και για λήψη φωτογραφιών φθορισμού.

2.5 Επεξεργασία και ανάλυση εικόνας

Οι εικόνες επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν με έναν αλγόριθμο που αναπτύχθηκε σε περιβάλλον MATLAB. Η μέθοδος είναι προσαρμοσμένη

και η ανάλυση γίνεται με αυτόματο τρόπο, αποφεύγοντας έτσι την εισαγωγή λαθών αλλά και biases που σχετίζονται με την ανάλυση που θα εφαρμόσει κάποιος χρήστης. Έτσι ο αλγόριθμος ανιχνεύει τις περιοχές ενδιαφέροντος (ήπαρ του zebrafish) εξάγοντας στην συνέχεια τις αντίστοιχες ιδιότητες, ονομαστικά το ποσοστό φθορίζουσας περιοχής του ήπατος προς την συνολική επιφάνεια του ήπατος. Συγκεκριμένα, ο αλγόριθμος επεξεργασίας έχει ως ακολούθως. Αρχικά εφαρμόζεται ένα κατώφλι στις εικόνες που υπολογίζεται μέσω της προσέγγισης Otsu. Το κατώφλι είναι διαφορετικό για κάθε εικόνα και υπολογίζεται από τα δεδομένα (εντάσεις των εικονοστοιχείων - pixels) της κάθε εικόνας. Με αυτό τον τρόπο απομακρύνεται τόσο η περιοχή φόντου (περιοχές της εικόνας που δεν περιέχουν την περιοχή ενδιαφέροντος), όσο και ανεπιθύμητες δομές που ενυπάρχουν στην εικόνα. Στην συνέχεια και με στόχο να εντοπιστεί η περιοχή ενδιαφέροντος (ήπαρ) εφαρμόζουμε ένα φίλτρο εντροπίας. Αυτό ενισχύει την περιοχή ενδιαφέροντος, η οποία έχει την πιο πολλή πληροφορία και καταστέλλει περαιτέρω το όποιο εναπομένον φόντο. Έτσι εφαρμόζοντας εκ νέου ένα κατώφλι, μπορούμε να εξάγουμε ολόκληρη την περιοχή που μας ενδιαφέρει. Σε περίπτωση που επίσης εντοπιστούν και κάποια «ψευδή» αντικείμενα (artifacts) αυτά απομακρύνονται μέσω του ελέγχου και επαλήθευσης μιας συνθήκης που απομακρύνει όλα τα αντικείμενα που έχουν μέγεθος μικρότερο του αντικειμένου με το μέγιστο μέγεθος. Αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε γιατί γνωρίζουμε εκ των προτέρων ότι σε κάθε εικόνα απεικονίζεται μια και μόνο περιοχή ενδιαφέροντος η οποία λόγω της προηγηθείσας επεξεργασίας είναι σίγουρο ότι θα έχει την μεγαλύτερη επιφάνεια από

κάθε άλλο αντικείμενο. Τελικά, έχοντας καταστήσει την περιοχή ενδιαφέροντος, ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί τις εντάσεις των εικονοστοιχείων ως δεδομένα, όπου και εφαρμόζεται μια μέθοδος κατηγοριοποίησης χωρίς επίβλεψη (unsupervised) που καλείται Gaussian Mixture Models, με δύο Gaussian κατανομές. Στόχος είναι η κατηγοριοποίηση των εντάσεων σε δύο κατηγορίες, υψηλής και χαμηλής έντασης που θα αντιστοιχούν σε πληθυσμούς εικονοστοιχείων που ανήκουν στην φθορίζουσα περιοχή του ήπατος και στο υπόλοιπο του ήπατος αντίστοιχα. Ο λόγος του πρώτου πληθυσμού προς το άθροισμά τους υπολογίζεται και εξάγεται σε ένα αρχείο excel. Τα αποτελέσματα, στην συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν για την περαιτέρω στατιστική ανάλυση και εξαγωγή συμπερασμάτων.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΟΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Στο πρώτο στάδιο της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας ελέγχθηκε η διασταύρωση και η κανονική ανάπτυξη των zebrafish. Ακολούθως έγινε εκτίμηση και έλεγχος τοξικότητας των διαφόρων ουσιών (αρχικό εκχύλισμα και κλάσματα του) σε έμβρυα άγριου τύπου zebrafish. Στην ανάλυση η τοξικότητα αναγράφεται σε LC_{50} – Lethal concentration in 50% of animals) (Beliaeva et al. 2009) η μέτρηση της συγκέντρωσης στην οποία πεθαίνει το 50% των πειραματοζώων (OECD236). Ο συγκεκριμένος δείκτης χρησιμοποιείται ευρέως σε τοξικολογικούς ελέγχους φαρμάκων, χημικών μορίων ή και δειγμάτων από το περιβάλλον και αποτελεί μία χρήσιμη παράμετρο για τον προσδιορισμό της τοξικότητάς τους καθώς και τον καθορισμό των δόσεων στις μελέτες επαναλαμβανόμενης χορήγησης σε πειραματάζωα όπως είναι οι μελέτες υποχρόνιας και χρόνιας τοξικότητας, τοξικότητας στην αναπαραγωγή, μελέτες καρκινογένεσης.

Για τον καλύτερο προσδιορισμό, η εκτίμηση της επώασης για τη μέτρηση της LC_{50} έγινε σε δύο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια των εμβρύων, στα 3hrpf (πριν από τη γαστριδίωση) και στα 24hrpf που έχει αφαιρεθεί το χόριο. Η ίδια προσέγγιση έγινε για όλα τα δείγματα καθώς και για το μόριο μάρτυρας (DMSO).

Πρέπει εδώ να αναφερθεί πως η επώαση των εμβρύων με τα εκχυλίσματα διήρκεσε μέχρι τις 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, οπότε και πραγματοποιήθηκε έλεγχος της θνησιμότητας με βάση τα κριτήρια θανάτου των εμβρύων που ορίζονται από τον OECD.

Για το αρχικό εκχύλισμα και κάθε κλάσμα του (F_χ), δοκιμάσαμε τις συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στους παρακάτω πίνακες σε έμβρυα και καταμετρήθηκαν τα νεκρά προς το σύνολο των ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε συγκέντρωση. (Πίνακας 3.1). Στη συνέχεια υπολογίσαμε την LC₅₀ (μέση θανατηφόρο συγκέντρωση κατά 50%) και την LC₉₅ (95% θνησιμότητα στα έμβρυα) για κάθε ουσία. (Πίνακας 3.2)

Πίνακας 3.1 (Α-Η). Αποτελέσματα ύστερα από έκθεση των ψαριών στα υπό εξέταση κλάσματα στις 96hrf (Α. F4, Β. F5, Γ. F6, Δ. F7, Ε. F8, Ζ. F9 & Η. ΤΕ)

A

F4 (mg/ml) (τελικές συγκεντρώσεις)	Έμβρυα 3hrf νεκρά/σύνολο ψαριών	Έμβρυα 24hrf νεκρά/σύνολο ψαριών
0.01	0/10	1/15
0.02	1/18	-
0.05	10/19	20/20
0.07	13/19	14/14
0.1	16/19	16/16

B

F5 (mg/ml) (τελικές συγκεντρώσεις)	Έμβρυα 3hrf νεκρά/σύνολο ψαριών	Έμβρυα 24hrf νεκρά/σύνολο ψαριών
0.01	-	1/10
0.02	0/20	20/20
0.05	0/20	20/20
0.07	2/20	-
0.10	3/20	20/20

Γ

F6 (mg/ml) (τελικές συγκεντρώσεις)	Έμβρυα 3hrf νεκρά/σύνολο ψαριών	Έμβρυα 24hrf νεκρά/σύνολο ψαριών
0.01	3/18	1/20
0.02	2/18	20/20
0.05	4/18	20/20
0.1	10/17	17/17
0.2	16/17	17/17

Δ

F7 (mg/ml) (τελικές συγκεντρώσεις)	Έμβρυα 3hrf νεκρά/σύνολο ψαριών	Έμβρυα 24hrf νεκρά/σύνολο ψαριών
0.01	-	2/10
0.02	0/20	20/20
0.05	1/20	20/20
0.07	6/20	-
0.10	6/20	10/10

Ε

F8 (mg/ml) (τελικές συγκεντρώσεις)	Έμβρυα 3hrf νεκρά/σύνολο ψαριών	Έμβρυα 24hrf νεκρά/σύνολο ψαριών
0.01	-	0/10
0.02	1/18	10/16
0.05	2/18	11/20
0.07	7/18	-
0.10	-	10/10

Z

F9 (mg/ml) (τελικές συγκεντρώσεις)	Έμβρυα 3hrf νεκρά/σύνολο ψαριών	Έμβρυα 24hrf νεκρά/σύνολο ψαριών
0.01	-	1/10
0.02	0/20	20/20
0.07	4/18	-
0.1	9/17	10/10
0.20	12/17	

H

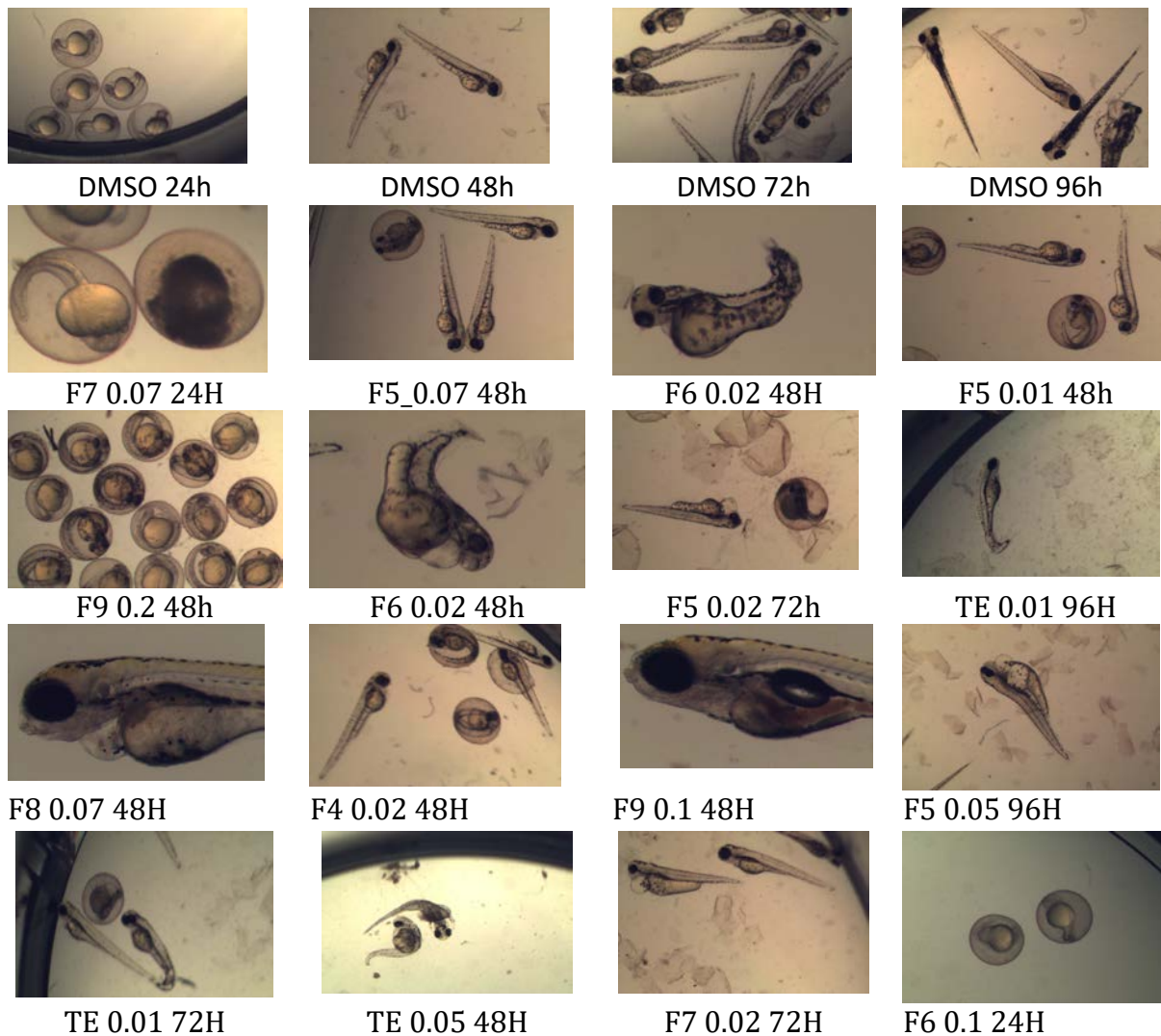
Ολικό εκχύλισμα (TE) (mg/ml)(τελικές συγκεντρώσεις)	Έμβρυα 3hrf νεκρά/σύνολο ψαριών	Έμβρυα 24hrf νεκρά/σύνολο ψαριών
0.002	-	0/18
0.005	-	2/20
0.01	5/19	18/18
0.02		-
0.05	5/18	19/19
0.10	6/18	19/19
0.2	19/20	-

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε για τις συγκεκριμένες ουσίες ότι το χόριο προστατεύει τα έμβρυα σε πολύ μεγάλο ποσοστό από την επίδραση τους με εξαίρεση το F6 που στην συγκέντρωση 0.2mg/ml ήταν το ίδιο θανατηφόρο στα έμβρυα και για τα δύο στάδια της επώασης.

Τα ανωτέρω αποτελέσματα αναλύθηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 16 με Probit analysis όπως έχουμε ήδη αναφέρει για τον προσδιορισμό των τιμών των LC₅₀ & LC₉₅ και φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 3.2.

Επιπλέον, κατά τη διάρκεια των δοκιμών, στις συγκεντρώσεις άνω του LC₅₀

για κάθε ουσία, οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν στα έμβρυα zebrafish με οπτικό στερεοσκόπιο, σχετίζονταν με καθυστερημένη ανάπτυξη, μειωμένη κατανάλωση της λέκιθου και συνεστραμμένη ουρά (Εικόνα 22). Επιπλέον, τα έμβρυα στις 72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση εμφάνιζαν μειωμένη καρδιακή συσταλτικότητα, συγκέντρωση λιμνάζοντος αίματος στην είσοδο της καρδιάς και περικαρδιακό οίδημα ως αποτέλεσμα της ελαττωματικής ανάπτυξης της καρδιάς.



Εικόνα 22: Φαινότυποι που παρατηρήθηκαν στα έμβρυα zebrafish με οπτικό

στερεοσκόπιο

Πίνακας 3.2: συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται 50% και 95% θνησιμότητα στα έμβρυα, με προσθήκη των ουσιών σε δύο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια (3hpf και 24hpf) για τα 6 κλάσματα και το αρχικό εκχύλισμα

Εκχύλισμα/ κλάσματα	Κλίση ευθείας (\pm T.Σ.)	LC ₅₀	LC ₉₅	χ^2 ^a	B.E.
F4 (3hpf)	3.715 \pm 0.756	0.051	0.142	0.256	3
F4 (24hpf)	7.173 \pm 6.033	0.016	0.027	0.005	2
F5 (3hpf)	3.884 \pm 2.279	0.175	0.465	0.958	2
F5 (24hpf)	8.784 \pm 2.369	0.013	0.020	1.304	2
F6 (3hpf)	1.854 \pm 0.362	0.068	0.522	8.249	3
F6 (24hpf)	5.863 \pm 1.907	0.013	0.024	4.304	3
F7 (3hpf)	3.812 \pm 1.427	0.111	0.301	2.6	2
F7 (24hpf)	8.679 \pm 2.495	0.012	0.019	0.674	2
F8 (3hpf)	2.421 \pm 1.127	0.11	0.526	1.560	1
F8 (24hpf)	2.273 \pm 0.627	0.028	0.147	10.187	2 ^β
F9 (3hpf)	3.051 \pm 774	0.117	0.403	1.417	2
F9 (24hpf)	13.043 \pm	0.010	0.013	16.370	1 ^β
TE (3hpf)	1.704 \pm 0.306	0.05	0.463	10.860	4 ^β
TE (24hpf)	8.153 \pm 1.991	0.007	0.010	1.974	3

^α Οι τιμές LC εκφράζονται σε mg/ml και υπάρχει μεταξύ τους στατιστικώς σημαντική διαφορά όταν τα όρια εμπιστοσύνης (O.E.) για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ (95%) δεν επικαλύπτονται. ^β Από τη στιγμή που η καλή προσαρμογή των δοκιμών είναι σημαντική ($P < 0,05$), ένας ετερογενής παράγοντας χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των ορίων εμπιστοσύνης (O.E.). BE είναι οι βαθμοί ελευθερίας και χ^2 είναι το στατιστικό κριτήριο (Chi-Square test)

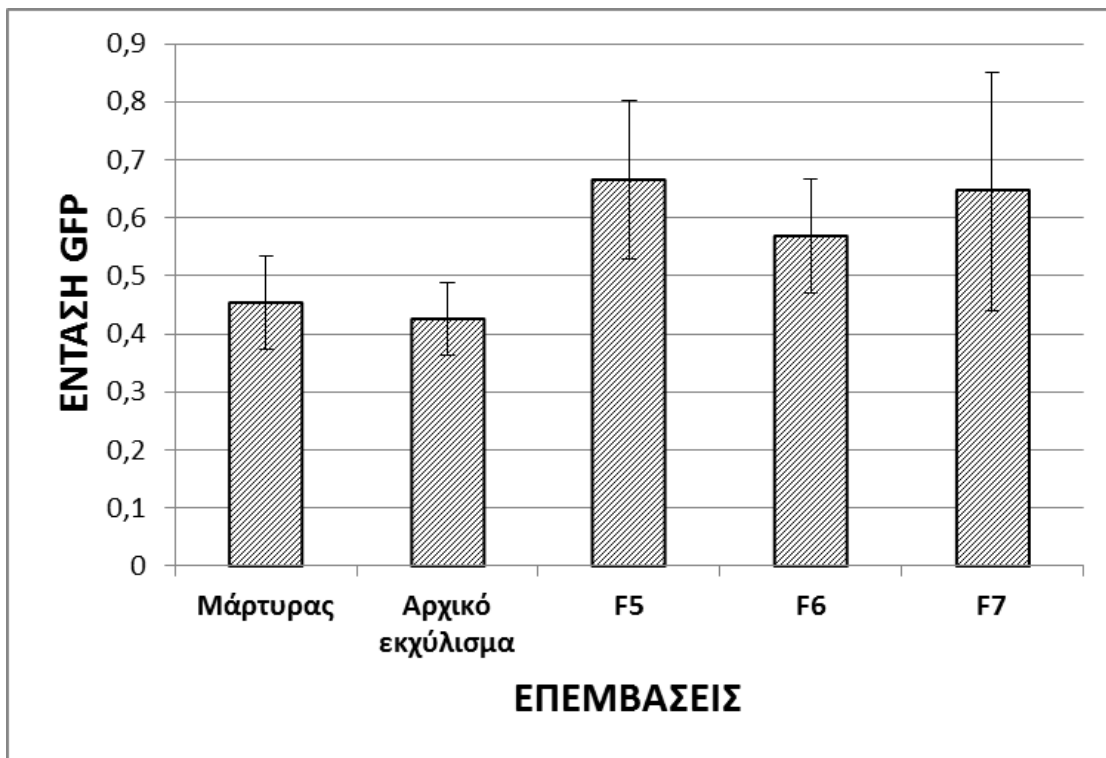
3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΟΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΟ ΗΠΑΡ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Το δεύτερο μέρος του χημικού γενετικού ελέγχου περιλάμβανε τον έλεγχο του αρχικού εκχυλίσματος και των κλασμάτων του για τη διερεύνηση των επιπτώσεων τους στο ήπαρ και την επαγωγή της αγγειογένεσης. Επίσης, επιλέξαμε εκτός από το αρχικό εκχύλισμα TE να μελετήσουμε τα κλάσματα F5, F6, F7 & F9.

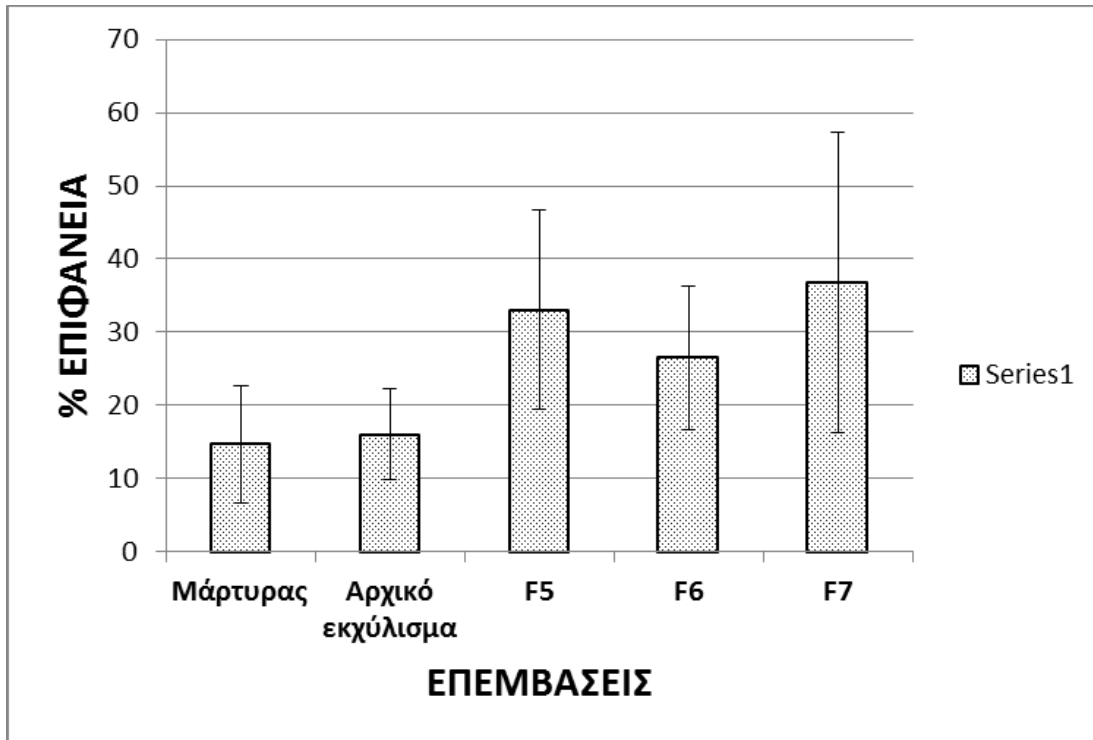
Επειδή οι συγκεντρώσεις των ουσιών θα έπρεπε να είναι μη θνησιγόνες λόγω τοξικότητας, ελέγχθηκαν συγκεντρώσεις οι οποίες δεν υπερέβαιναν το LC₅₀ του αρχικού εκχυλίσματος και των κλασμάτων του. Έτσι για τα μεν F5, F6, F7 η συγκέντρωση ήταν 0,006mg/ml, για το F9 η συγκέντρωση ήταν 0,005mg/ml και για το TE η συγκέντρωση ήταν 0,0035mg/ml.

Όσον αφορά στο ήπαρ, με τη βοήθεια της διαγονιδιακής σειράς zebrafish Tg (Triple:GFP) έγινε επώαση εμβρύων πριν το στάδιο έναρξης της γαστρίδωσης (πριν τις 3hpf) και μετρήθηκε σε στερεοσκόπιο φθορισμού η ένταση του GFP και η επιφάνεια του ήπατος, όπως φαίνεται στους Πίνακες 3.3 και 3.4 χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο που αναπτύχθηκε σε περιβάλλον MATLAB όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.5.

Πίνακας 3.3. Η ένταση του GFP στο ήπαρ

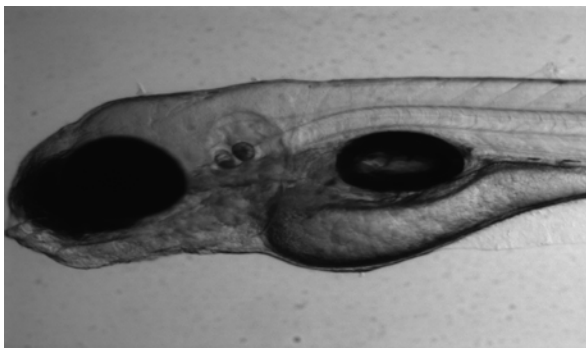


Πίνακας 3.4. Επίδραση των χημικών στην έκταση του ήπατος



Ακολουθούν ενδεικτικές φωτογραφίες της φαινοτυπικής ανάλυσης του ήπατος στις 96hrpf από ψάρια που επώαστηκαν με τις υπό μελέτη ουσίες **(Εικόνα 23)**.

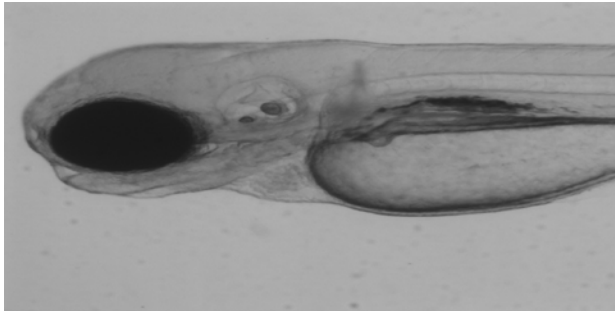
Επίσης, με τη βοήθεια της διαγονιδιακής σειράς zebrafish Tg(fli:GFP) έγινε φαινοτυπική ανάλυση και παρατηρήθηκε σε στερεοσκόπιο φθορισμού η ικανότητα των εμβρύων να σχηματίσουν τα αγγεία που βρίσκονται περιφερειακά του ματιού και της θωρακικής χώρας, μετά από επώαση των εμβρύων με το αρχικό εκχύλισμα (TE) και τα κλάσματα F5, F6, F7 & F9 πριν το στάδιο έναρξης της αγγειογένεσης (πριν τις 24hrpf) (**Εικόνα 24**).



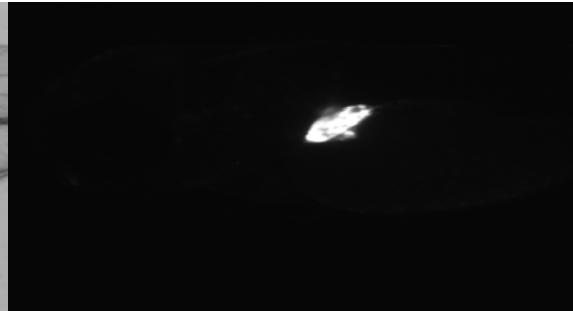
Control- whole body



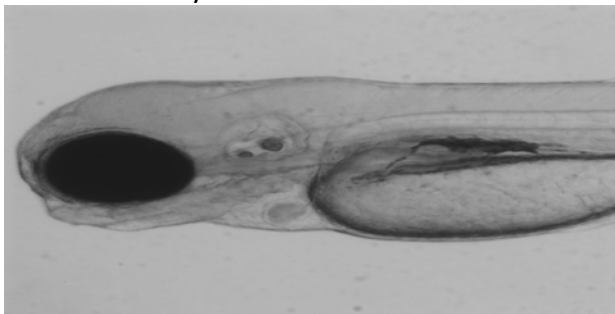
Control -liver



F5- whole body



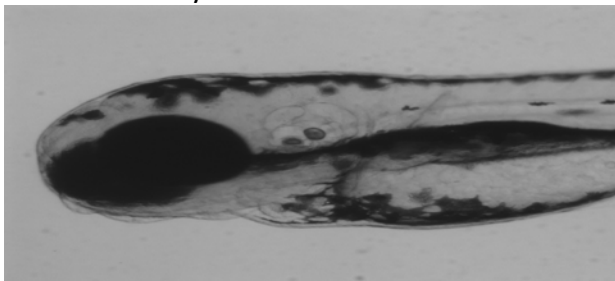
F5_liver



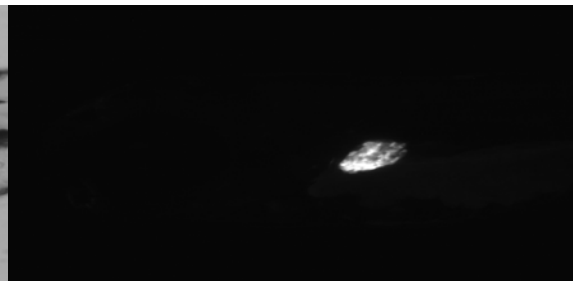
F6- whole body



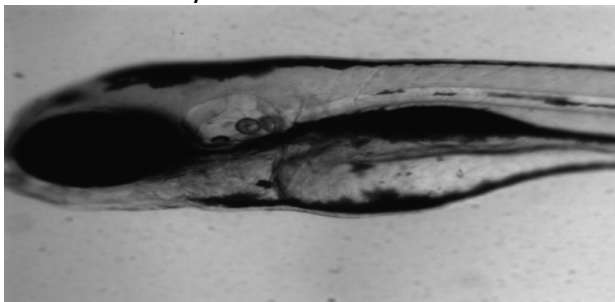
F6-liver



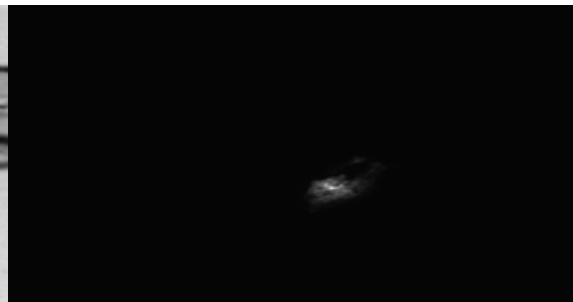
F7- whole body



F7-liver

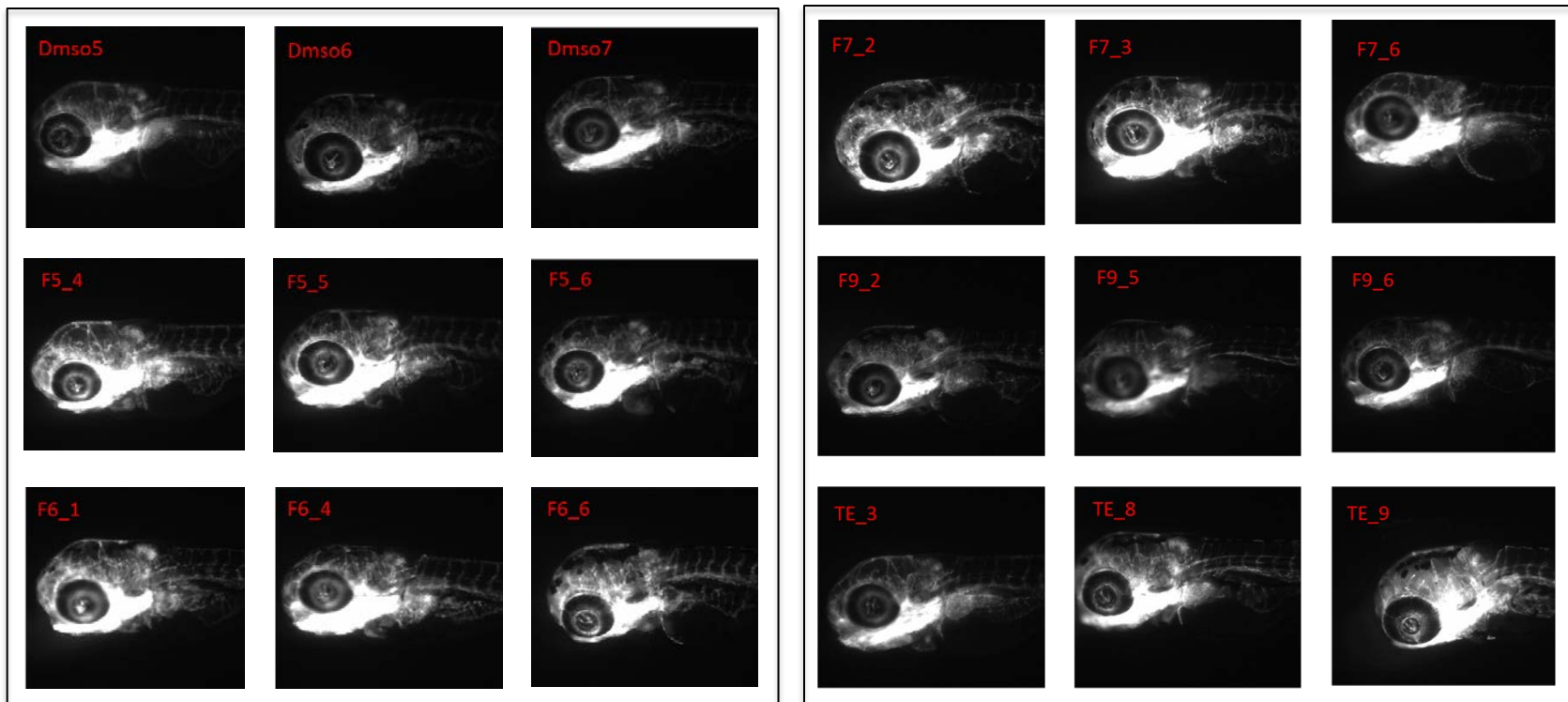


TE_ whole body



TE_liver

Εικ. 23: Απεικόνιση εμβρύων zebrafish 96hpf μετά την επίδραση των αναφερόμενων χημικών και η έκταση του GFP στο ήπαρ.



(α)

(β)

Εικόνα 24: Απεικόνιση εμβρύων zebrafish 96hpf για τη μελέτη της αγγειογένεσης σε (α) μάρτυρα και κλάσματα F5 και F6, και (β) κλάσματα F7, F9 και αρχικό εκχύλισμα (TE) όπως αναγράφονται μέσα στην κάθε εικόνα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το zebrafish, το είδος *Danio rerio*, είναι ένα τροπικό ψάρι του γλυκού νερού που ανήκει στην οικογένεια των κυπρινοειδών. Χάρη στην πληθώρα των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει, το zebrafish έχει αναδειχθεί σε ένα ιδανικό μοντέλο-οργανισμό για τη μελέτη της οργανογένεσης των σπονδυλωτών. Ο μεγάλος αριθμός αυγών-απογόνων που παράγεται σε κάθε αναπαραγωγική διαδικασία, η γρήγορη και εξωτερική ανάπτυξη των εμβρύων, ο μικρός αναπαραγωγικός κύκλος και το χαμηλό κόστος συντήρησης των ενήλικων ιχθύων καθιστούν το zebrafish ένα ελκυστικό ζωικό πειραματικό μοντέλο. Τα έμβρυα zebrafish είναι διαφανή, επιτρέποντας τη μη επεμβατική *in vivo* παρατήρηση της ανάπτυξης εσωτερικών οργάνων, όπως η καρδιά. Αυτό το πλεονέκτημα γίνεται ακόμα πιο σημαντικό χάρη στις τεχνικές δημιουργίας διαγονιδιακών σειρών που χρησιμοποιούν φθορίζουσες πρωτεΐνες, για τη σήμανση των κυττάρων του zebrafish. Έτσι δίνεται η δυνατότητα στους επιστήμονες να παρατηρούν με μικροσκόπια φθορισμού ή συνεστιακά μικροσκόπια σάρωσης σε βάθος και με λεπτομέρεια τα κύτταρα και τους ιστούς του zebrafish καθώς επίσης να μελετήσουν τα οντογενετικά γεγονότα της ανάπτυξης.

Χάρη στην ευκολία για γενετικούς χειρισμούς που προσφέρει το zebrafish, τεχνικές πρόσθιας και αντίστροφης γενετικής έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία με σκοπό την ταυτοποίηση νέων σηματοδοτικών μονοπατιών και τη μελέτη της λειτουργίας των γονιδίων. Επιπλέον, χάρη στο υψηλό ποσοστό ομολογίας του γονιδιώματός του με το ανθρώπινο γονιδίωμα, πολλές μεταλλάξεις γονιδίων που εμπλέκονται σε ανθρώπινες ασθένειες μπορούν να μοντελοποιηθούν στο zebrafish. Η σημαντική ομολογία των δύο γονιδιωμάτων αντανακλάται ακόμα και στην ομοιότητα των αποκρίσεων σε φάρμακα, λόγω της υψηλής ομολογίας των

θέσεων πρόσδεσης φαρμάκων που εμφανίζουν σε πρωτεϊνικό επίπεδο ο άνθρωπος και το zebrafish. Επομένως, το zebrafish αποτελεί ένα εξαιρετικό μοντέλο για τοξικολογικές και φαρμακολογικές μελέτες με σκοπό την ανεύρεση νέων φαρμακευτικών μορίων για την θεραπευτική αντιμετώπιση ποικίλων ανθρώπινων ασθενειών.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο έλεγχος σε έμβρυα zebrafish αγρίου τύπου της τοξικότητας ενός εκχυλίσματος που προήλθε από την φυσική χλωρίδα της Ελλάδας καθώς και έξι (6) κλασμάτων του. (Λόγω της εμπιστευτικότητας δεν μπορεί να αναφερθεί αλλά ούτε και γνωρίζω τη σύσταση και την πηγή των εκχυλισμάτων). Η τοξικότητα μιας ουσίας εκτιμάται με τη μέτρηση της συγκέντρωσης η οποία προκαλεί θάνατο στο 50% των πειραματοζώων (LC_{50} – Lethal concentration in 50% of animals) (Beliaeva et al. 2009) (OECD236). Ο συγκεκριμένος δείκτης LC_{50} χρησιμοποιείται ευρέως σε τοξικολογικούς ελέγχους φαρμάκων, χημικών μορίων ή και δειγμάτων από το περιβάλλον και αποτελεί μία χρήσιμη παράμετρο για τον προσδιορισμό της τοξικότητάς τους καθώς και τον καθορισμό των δόσεων στις μελέτες επαναλαμβανόμενης χορήγησης σε πειραματόζωα όπως είναι οι μελέτες υποχρόνιας και χρόνιας τοξικότητας, τοξικότητας στην αναπαραγωγή, μελέτες καρκινογένεσης.

Για τον καλύτερο προσδιορισμό, η μέτρηση της LC_{50} έγινε σε δύο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια των εμβρύων: σε έμβρυα στις 3 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (πριν από τη γαστριδίωση) στα οποία δεν είχε αφαιρεθεί το χόριο και σε έμβρυα στις 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση στα οποία είχε αφαιρεθεί το χόριο. Η ίδια προσέγγιση έγινε για όλα τα δείγματα καθώς και για το μόριο μάρτυρας (DMSO). Πρέπει εδώ να αναφερθεί πως η επώαση των εμβρύων με τα εκχυλίσματα

διήρκεσε μέχρι τις 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, οπότε και πραγματοποιήθηκε έλεγχος της θνησιμότητας με βάση τα κριτήρια θανάτου των εμβρύων που ορίζονται από τον OECD. Για την κάθε ουσία χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις και μετά την καταμέτρηση του αριθμού των νεκρών ψαριών προς το συνολικό αριθμό ψαριών υπολογίστηκαν οι τιμές LC₅₀ (μέση θανατηφόρο συγκέντρωση κατά 50%) και LC₉₅ (95% θνησιμότητα στα έμβρυα) για κάθε ουσία. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι οι τιμές LC₅₀ & LC₉₅ ήταν πολύ μικρότερες στα έμβρυα των 24hrf στα οποία είχε αφαιρεθεί το χόριο σε σχέση με τις τιμές των LC₅₀ & LC₉₅ στα έμβρυα των 3hrf στα οποία δεν είχε αφαιρεθεί το χόριο. Επομένως, με βάση τα αποτελέσματα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το χόριο είναι πολύτιμο για την προστασία των εμβρύων zebrafish από την έκθεση τους σε καθαρές ουσίες. Εξαιρεση αποτέλεσε το κλάσμα F6 που η συγκέντρωση 0.2mg/ml ήταν εξίσου θανατηφόρα στα έμβρυα και των δύο σταδίων. Επίσης, το συγκεκριμένο κλάσμα παρουσίασε στα έμβρυα των 3hrf τις μικρότερες τιμές LC₅₀ & LC₉₅ συγκριτικά με τα υπόλοιπα πέντε κλάσματα και το αρχικό εκχύλισμα, γεγονός που δείχνει ότι είναι το πλέον τοξικό σε σχέση με τα υπόλοιπα κλάσματα.

Επιπλέον, σε συγκεντρώσεις άνω του LC₅₀ για κάθε ουσία, παρατηρήθηκαν στα έμβρυα zebrafish φαινότυποι που σχετίζονταν με καθυστερημένη ανάπτυξη, μειωμένη κατανάλωση της λεκίθου, περικαρδιακό οίδημα, βραδυκαρδία ή συνεστραμμένη ουρά, γεγονός που υποδεικνύει ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις οι συγκεκριμένες ουσίες προκαλούν αναπτυξιακές ανωμαλίες στα έμβρυα zebrafish. Επειδή όμως οι ίδιες επιδράσεις παρατηρήθηκαν και σε συγκεντρώσεις κάτω από τη θανατηφόρο αποτελούν ένδειξη τερατογόνου δράσης.

Η δεύτερη φάση του χημικού γενετικού ελέγχου περιλάμβανε τη μελέτη της επίδρασης της τοξικότητας του αρχικού εκχυλίσματος και των κλασμάτων του στο ήπαρ και στην επαγωγή της αγγειογένεσης. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών που ελέγχθηκαν δεν υπερέβαιναν τη LC_{50} , έτσι ώστε να μην είναι θνησιγόνες λόγω τοξικότητας.

Όσον αφορά στην φαινοτυπική ανάλυση του ήπατος, έγινε επώαση των εμβρύων με τις υπό μελέτη ουσίες πριν το στάδιο έναρξης της γαστρίδωσης (πριν τις 3hrpf) και με τη βοήθεια της διαγονιδιακής σειράς Tg(Triple:GFP) μετρήθηκε στις 96hr σε στερεοσκόπιο φθορισμού η ένταση της GFP πρωτεΐνης και η επιφάνεια του ήπατος. Ακόμα, με τη βοήθεια της διαγονιδιακής σειράς zebrafish Tg(fli:GFP) έγινε φαινοτυπική ανάλυση και παρατηρήθηκε σε στερεοσκόπιο φθορισμού ο σχηματισμός των αγγείων που βρίσκονται περιφερειακά του ματιού και της θωρακικής χώρας, μετά από επώαση των εμβρύων με το αρχικό εκχύλισμα (TE) και τα κλάσματα F5, F6, F7 & F9 πριν το στάδιο έναρξης της αγγειογένεσης (πριν τις 24hrpf).

Η βιολογική αυτή διαδικασία ορίζεται ως ο σχηματισμός νέων αγγείων από ήδη υπάρχοντα, και λόγω της εμπλοκής σε πολλά νοσήματα και ειδικά στον καρκίνο, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη ενώσεων που μπορούν να την επηρεάζουν. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι τα φυτικής προέλευσης προϊόντα αποτελούν μία νέα δυναμική κατηγορία ρυθμιστών της αγγειογένεσης με αποτέλεσμα ένα μεγάλο μέρος ερευνητικής δραστηριότητας να έχει επικεντρωθεί στη μελέτη αυτών.

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι τα έμβρυα zebrafish των 24 ωρών μετά τη γονιμοποίηση στα οποία έχει αφαιρεθεί το χόριο παρουσιάζουν χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τα έμβρυα των 3 ωρών μετά τη γονιμοποίηση,

στα οποία δεν έχει αφαιρεθεί, υποδεικνύοντας τη λειτουργική σημασία του χορίου ως έναν αποτελεσματικό φραγμό για τη διαπερατότητα εξωτερικών ουσιών. Φαίνεται επίσης ότι τα κλάσματα που εξετάστηκαν είχαν μεγαλύτερη επίδραση στο ήπαρ από το αρχικό εκχύλισμα.

Με τη ολοκλήρωση αυτής της εργασίας αξίζει να αναφερθούν κάποιες υλοποιήσιμες προτάσεις για μελλοντική έρευνα.

- Συστηματικός έλεγχος καθαρών φυσικών ενώσεων που θα απομονωθούν από τα δραστικά κλάσματα των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων, με στόχο την απομόνωση μορίων με προ- ή αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες.
- Επέκταση των *in vitro* πειραματικών μοντέλων προσομοίωσης της ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων σε *in vivo* μοντέλα αγγειογένεσης σε πειραματόζωα.
- Πραγματοποίηση μοριακών μελετών ώστε να βρεθεί ο μηχανισμός δράσης των δραστικών μορίων σε κυτταρικό επίπεδο.
- Προσπάθεια σύνθεσης ενώσεων που αποτελούν δομικά ανάλογα των φυσικών βιοδραστικών ενώσεων με πιθανά βελτιωμένες βιολογικές η/και φαρμακοκινητικές ιδιότητες όσον αφορά την αγγειογένεση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allende, Miguel L, Adam Amsterdam, Thomas Becker, Koichi Kawakami, Nicholas Gaiano, and Nancy Hopkins. 1996. 'Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development', *Genes & development*, 10: 3141-55.
- Arrenberg, Aristides B, Didier YR Stainier, Herwig Baier, and Jan Huisken. 2010. 'Optogenetic control of cardiac function', *Science*, 330: 971-74.
- Beis, Dimitris, and Didier YR Stainier. 2006. 'In vivo cell biology: following the zebrafish trend', *Trends in cell biology*, 16: 105-12.
- Beliaeva, NF, VN Kashirtseva, NV Medvedeva, Iulu Khudoklinova, OM Ipatova, and AI Archakov. 2009. '[Zebrafish as a model organism for biomedical studies]', *Biomeditsinskaia khimiia*, 56: 120-31.
- Blanco-Vives, Borja, N Villamizar, Jesús Ramos, María J Bayarri, Olvido Chereguini, and FJ Sánchez-Vázquez. 2010. 'Effect of daily thermo-and photo-cycles of different light spectrum on the development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae', *Aquaculture*, 306: 137-45.
- Blaxter, JHS. 1988. '1 Pattern and Variety in Development', *Fish physiology*, 11: 1-58.
- . 1991. 'The effect of temperature on larval fishes', *Netherlands Journal of Zoology*, 42: 336-57.
- Blouin, A., R. P. Bolender, and E. R. Weibel. 1977. 'Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study', *J Cell Biol*, 72: 441-55.
- Boeuf, Gilles, and Pierre-Yves Le Bail. 1999. 'Does light have an influence on fish growth?', *Aquaculture*, 177: 129-52.
- Bolker, Jessica A. 2014. 'Model species in evo - devo: a philosophical perspective', *Evolution & development*, 16: 49-56.
- Bookstein, Fred L. 1997. *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology* (Cambridge University Press).
- Bulmer, MG, and JJ Bull. 1982. 'Models of polygenic sex determination and sex ratio control', *Evolution*: 13-26.
- Chavez, M. N., G. Aedo, F. A. Fierro, M. L. Allende, and J. T. Egana. 2016. 'Zebrafish as an Emerging Model Organism to Study Angiogenesis in Development and Regeneration', *Front Physiol*, 7: 56.
- Cheshenko, Ksenia, Francois Brion, Yann Le Page, Nathalie Hinfray, Farzad Pakdel, Olivier Kah, Helmut Segner, and Rik IL Eggen. 2007. 'Expression of zebra fish aromatase cyp19a and cyp19b genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor', *Toxicological Sciences*, 96: 255-67.
- Chiang, Evelyn F-L, Chin-I Pai, Mary Wyatt, Yi-Lin Yan, John Postlethwait, and Bon-chu Chung. 2001. 'Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites', *Developmental biology*, 231: 149-63.

- Chiang, Evelyn Feng-Lin, Yi-Lin Yan, Yann Guiguen, John Postlethwait, and Bon-chu Chung. 2001. 'Two Cyp19 (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain', *Molecular biology and evolution*, 18: 542-50.
- Chiang, Evelyn Feng - Lin, Yi - Lin Yan, Sok - Keng Tong, Pei - Hung Hsiao, Yann Guiguen, John Postlethwait, and Bon - Chu Chung. 2001. 'Characterization of duplicated zebrafish cyp19 genes', *Journal of Experimental Zoology*, 290: 709-14.
- Condon, Catriona H, Stephen F Chenoweth, and Robbie S Wilson. 2010. 'Zebrafish take their cue from temperature but not photoperiod for the seasonal plasticity of thermal performance', *Journal of Experimental Biology*, 213: 3705-09.
- D'cotta, Helena, Alexis Fostier, Yann Guiguen, Marina Govoroun, and Jean - Francois Baroiller. 2001. 'Aromatase plays a key role during normal and temperature - induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*', *Molecular reproduction and development*, 59: 265-76.
- Dienstag, Jules L. 2008. 'Hepatitis B virus infection', *New England Journal of Medicine*, 359: 1486-500.
- Diotel, Nicolas, Yann Le Page, Karen Mouriec, Sok-Keng Tong, Elisabeth Pellegrini, Colette Vaillant, Isabelle Anglade, François Brion, Farzad Pakdel, and Bon-chu Chung. 2010. 'Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions', *Frontiers in neuroendocrinology*, 31: 172-92.
- Driessen, M., A. P. Vitins, J. L. Pennings, A. S. Kienhuis, Bv Water, and L. T. van der Ven. 2015. 'A transcriptomics-based hepatotoxicity comparison between the zebrafish embryo and established human and rodent in vitro and in vivo models using cyclosporine A, amiodarone and acetaminophen', *Toxicol Lett*, 232: 403-12.
- Eklöv, Peter, and Richard Svanbäck. 2006. 'Predation risk influences adaptive morphological variation in fish populations', *The American Naturalist*, 167: 440-52.
- Engeszer, Raymond E, Larissa B Patterson, Andrew A Rao, and David M Parichy. 2007. 'Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field', *Zebrafish*, 4: 21-40.
- Finney, David John. 1952. "Probit analysis." In.: JSTOR.
- Folkman, Judah. 1971. 'Tumor angiogenesis: therapeutic implications', *New England Journal of Medicine*, 285: 1182-86.
- . 2007. 'Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?', *Nature reviews Drug discovery*, 6: 273-86.
- Greenberg, BG(1980). "Chester I. Bliss, 1899-1979." *International Statistical Review / Revue Internationale Statistique* 8(1): 135-136.
- Huang, Chiu - Ju, Chi - Tang Tu, Chung - Der Hsiao, Fong - Jou Hsieh, and Huai - Jen Tsai. 2003. 'Germ - line transmission of a myocardium - specific GFP transgene reveals critical regulatory elements in the cardiac myosin light chain 2 promoter of zebrafish', *Developmental Dynamics*, 228: 30-40.
- Kettleborough, Ross NW, Elisabeth M Busch-Nentwich, Steven A Harvey, Christopher M Dooley, Ewart de Bruijn, Freek van Eeden, Ian Sealy, Richard J White, Colin Herd, and Isaac J Nijman. 2013. 'A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function', *Nature*, 496: 494-97.

- Kimmel, Charles B, William W Ballard, Seth R Kimmel, Bonnie Ullmann, and Thomas F Schilling. 1995. 'Stages of embryonic development of the zebrafish', *Developmental Dynamics*, 203: 253-310.
- McClure, Michelle. 1999. 'Development and evolution of melanophore patterns in fishes of the genus *Danio* (Teleostei: Cyprinidae)', *Journal of Morphology*, 241: 83-105.
- Newman, David J, and Gordon M Cragg. 2012. 'Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010', *Journal of natural products*, 75: 311-35.
- Parichy, David M. 2006. 'Evolution of danio pigment pattern development', *Heredity*, 97: 200-10.
- Paz, Keren, and Zhenping Zhu. 2005. 'Development of angiogenesis inhibitors to vascular endothelial growth factor receptor 2. Current status and future perspective', *Front Biosci*, 10: 1415-39.
- RP, Bininda-Emonds Olaf, and Michael K Richardson. 2003. 'Inverting the hourglass: quantitative evidence against the phylotypic stage in vertebrate development', *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270: 341-46.
- Scott, G. R., and I. A. Johnston. 2012. 'Temperature during embryonic development has persistent effects on thermal acclimation capacity in zebrafish', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 14247-52.
- Shih, John, and Scott E Fraser. 1995. 'Distribution of tissue progenitors within the shield region of the zebrafish gastrula', *Development*, 121: 2755-65.
- Si-Tayeb, Karim, Frédéric P Lemaigre, and Stephen A Duncan. 2010. 'Organogenesis and development of the liver', *Developmental cell*, 18: 175-89.
- Spence, Rowena, Gabriele Gerlach, Christian Lawrence, and Carl Smith. 2008. 'The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*', *Biological Reviews*, 83: 13-34.
- Taylor, Kerrie L, Nicola J Grant, Nicholas D Temperley, and E Elizabeth Patton. 2010. 'Small molecule screening in zebrafish: an in vivo approach to identifying new chemical tools and drug leads', *Cell Communication and Signaling*, 8: 1.
- Timbrell, John A. 2008. 'Biochemical mechanisms of toxicity: specific examples', *Principles of Biochemical Toxicology, 4th ed. Informa Health Care*.
- Tsang, Michael. 2010. 'Zebrafish: a tool for chemical screens', *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 90: 185-92.
- Tsikitis, M, A Blais, and D Acosta-Alvear. 2005. 'An initial blueprint for myogenic differentiation', *Genes & development*: 553-69.
- Wilkins, B. J., and M. Pack. 2013. 'Zebrafish models of human liver development and disease', *Compr Physiol*, 3: 1213-30.
- Zon, Leonard I, and Randall T Peterson. 2005. 'In vivo drug discovery in the zebrafish', *Nature reviews Drug discovery*, 4: 35-44.