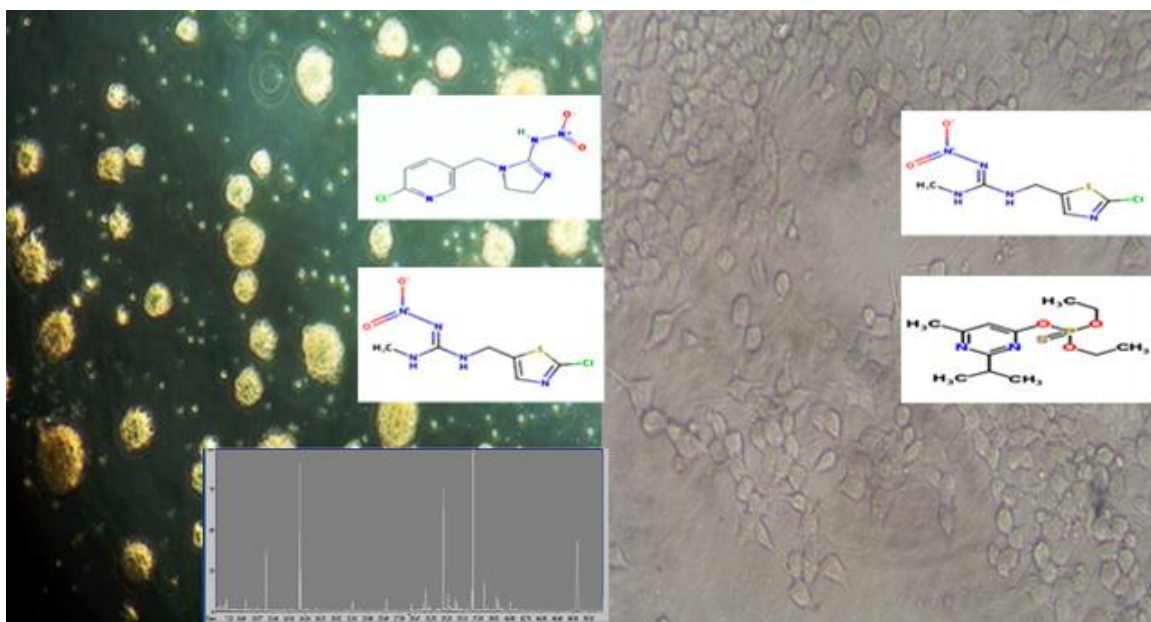




ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Ανάπτυξη Μεθοδολογίας για τη Μελέτη της Τοξικότητας
Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων σε Κυτταρικές Καλλιέργειες με
Εφαρμογή Μεταβολομικής



ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΦΩΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2018



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Ανάπτυξη Μεθοδολογίας για τη Μελέτη της Τοξικότητας
Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων σε Κυτταρικές Καλλιέργειες με
Εφαρμογή Μεταβολομικής

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΦΩΤΟΠΟΥΛΟΥ
ΑΘΗΝΑ 2018



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

Ανάπτυξη Μεθοδολογίας για τη Μελέτη της Τοξικότητας
Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων σε Κυτταρικές Καλλιέργειες με
Εφαρμογή Μεταβολομικής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΦΩΤΟΠΟΥΛΟΥ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- 1. Κωνσταντίνος Α. Αλιφέρης, Λέκτορας, Επιβλέπων.**
- 2. Σπυρίδων Κίντζιος, Καθηγητής, Μέλος.**
- 3. Δήμητρα Θωμαΐδου, Ερευνήτρια Βαθμίδας Α', Μέλος.**

ΑΘΗΝΑ 2018

Περίληψη

Η εις βάθους μελέτη και κατανόηση της επίδρασης φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Φ.Π.) στο μεταβολισμό ανθρώπων και άλλων οργανισμών μη-στόχων, αποτελεί σημαντικό αντικείμενο στα πρώτα στάδια της έρευνας και ανάπτυξής τους. Οι πρόσφατες εξελίξεις σχετικές με την ανάπτυξη προηγμένων «ομικών» τεχνικών, όπως αυτή της μεταβολομικής, έχουν πλέον καταστήσει εφικτή τη μελέτη και χαρτογράφηση του μεταβολισμού βιολογικών συστημάτων και της ρύθμισής του σε αντίδραση σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες.

Η ανάγκη αξιολόγησης της τοξικότητας ενός τεράστιου αριθμού μορίων με εφαρμογή οικονομικά εφικτών μεθόδων, σε συνδυασμό με την ανάγκη για μείωση του αριθμού των πειραματόζων που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό, καθιστά επιτακτική την ανάπτυξη νέων μεθόδων αξιολόγησης υψηλής ρυθμοαπόδοσης (high throughput).

Στα πλαίσια αυτά, χρησιμοποιώντας πρωτογενή νευρικά βλαστικά κύτταρα NSCs ποντικών και την κυτταρική σειρά N2a ως κυτταρικά συστήματα-μοντέλα, αξιολογήθηκε η τοξικότητα τριών δραστικών ουσιών (δ.ο.) εντομοκτόνων των clothianidin, imidacloprid και diazinon. Οι βιοδοκιμές τοξικότητας για τον προσδιορισμό των τιμών μέσης παρεμπόδισης IC_{50} έδειξαν ότι τα NSCs είναι το πιο ευαίσθητο σύστημα. Επιπλέον, με εφαρμογή προηγμένης μεθόδου μεταβολομικής/βιοπληροφορικής, μελετήθηκε η επίδραση των clothianidin, imidacloprid και του μείγματος τους στο μεταβολισμό των κυττάρων.

Τα αποτελέσματα της GC/EI/MS μεταβολομικής απέδειξαν ότι η μέθοδος έχει μεγάλες δυνατότητες για την αξιολόγηση της τοξικότητας των NSCs σε εντομοκτόνα. Πιο συγκεκριμένα, ότι οι βιολογικές επαναλήψεις του μάρτυρα διακρίνονται από τις επαναλήψεις των υπόλοιπων επεμβάσεων, επιβεβαιώνοντας την επίδραση των δ.ο. στο μεταβολισμό των κυττάρων. Οι επεμβάσεις με το clothianidin και τα μείγματα των δύο δ.ο. προκαλούν παρόμοιες μεταβολές στο μεταβολισμό των NSCs, σε αντίθεση με το imidacloprid. Γενικότερα, παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις στη δραστηριότητα βιοσυνθετικών μεταβολικών οδών συσχετιζόμενων με αντιδράσεις σε καταπονήσεις και ανακαλύφθηκαν αντίστοιχοι μεταβολίτες-βιοσημαντές. Ανάμεσα σε αυτούς, συμπεριλαμβάνονται οι

D-glucose, D-fructose, glycine, glycerol, stearic acid, οι οποίοι λειτουργούν και ως σήματα για τη ρύθμιση του μεταβολισμού των κυττάρων.

Αν και η εφαρμογή της μεταβολομικής σε μελέτες τοξικογενετικής (toxicogenomics) είναι ακόμα σε αρχικό στάδιο, η συμβολή της κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική στην περαιτέρω έρευνα σχετική με τη μελέτη της τοξικότητας μεμονωμένων και μειγμάτων δ.ο. Φ.Π. με τη χρήση πρότυπων βιολογικών οργανισμών για την αξιολόγηση των τοξικολογικών τους προφίλ σε οργανισμούς μη-στόχους.

Λέξεις κλειδιά: Εντομομοκτόνα, NSCS, νευροβλαστώματα N2a, μεταβολομική

Abstract

In-depth study and understanding of the effect of plant protection products (PPPs) on the metabolism of humans and other non-target organisms is an important subject in the early stages of their research and development. Recent progress in the development of advanced "omics" techniques such as metabolomics have now made it possible to study and map the metabolism of biological systems and their regulation in response to biotic and abiotic factors.

The need to evaluate the toxicity of a large number of molecules using economically feasible methods, coupled with the need to reduce the number of test animals used for this purpose, makes it imperative to develop new high throughput methods.

In this context, using the primary neural stem cells (NSCs) of mice and the N2a cell line as cells system -odel, an assessment of the toxicity of three active ingredients (ai) of the insecticides clothianidin, imidacloprid and diazinon was conducted. Toxicity bioassays for the determination half maximal inhibitory concentration IC_{50} have shown that NSCs are the most sensitive system. In addition, by applying an advanced method of metabolomics / bioinformatics, the effect of clothianidin, imidacloprid, as well as combinations thereof, on cell metabolism was studied.

The results of GC/EI/MS metabolomics have shown that the method has great potential for assessing the toxicity of NSCs in insecticides. In particular, they have shown that the biological repeats of the control are distinguished from the repetitions of the remaining interventions, confirming the effect of the ai on the metabolism of cells. The interventions with clothianidin and the mixtures of the two ai cause similar changes in the metabolism of NSCs, as opposed to imidacloprid. More generally, fluctuations in the activity of biosynthetic metabolic pathways associated with stress reactions were observed and relevant biosynthetic metabolites were discovered. Among them, D-glucose, D-fructose, glycine, glycerol, and stearic acid, which are also used as signals for the regulation of cell metabolism.

Although the application of metabolomics to toxicogenomics studies is still in its infancy, its contribution is considered to be of particular importance in further

research into the study of toxicity of individual and mixtures of ai in PPPS using model biological organisms to assess their toxicological profiles in non-target organisms.

Key words: Pesticides, NSCS, neuroblastoma N2a, metabolomics

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Abstract	6
Ευχαριστίες	12
Λίστα συντομογραφιών	14
1. Εισαγωγή	17
1.1 Φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.) και φυτοπροστασία: ορισμοί και σημασία για τον αγροδιατροφικό τομέα	19
1.2 Τοξικότητα και μηχανισμοί δράσης (Μ.Δ.) φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Φ.Π.)	23
1.3 Μηχανισμοί δράσης των κύριων κατηγοριών φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Φ.Π.)	25
1.3.1 Μηχανισμοί δράσης μυκητοκτόνων	25
1.3.2 Μηχανισμοί δράσης ζιζανιοκτόνων	27
1.3.3 Μηχανισμοί δράσης εντομοκτόνων	29
1.3.3.1 Diazinon	33
1.3.3.2 Νεονικοτινοειδή	35
1.4 Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδραστικότητα και τοξικότητα των δραστικών ουσιών	38
1.5 Μέθοδοι αξιολόγησης τοξικότητας βιοδραστικών ουσιών	39
1.6 Βλαστικά κύτταρα (Stem Cells)	40
1.7 Ιδιότητες βλαστικών κυττάρων	41
1.7.1 Διαίρεση των βλαστικών κυττάρων	43
1.7.1.1 Ασύμμετρη διαίρεση	44
1.7.1.2 Συμμετρική διαίρεση	45
1.7.2 Τύποι βλαστικών κυττάρων	46
1.7.2.1 Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα	46
1.7.2.2 Ενήλικα βλαστικά κύτταρα	47
1.7.2.3 Διαφορές μεταξύ εμβρυικών και ενήλικων κυττάρων	50
1.8 Νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs)	50
1.8.1 Οι νευρώνες	52
1.8.2 Τα αστροκύτταρα	53
1.8.3 Τα ολιγοδενδροκύτταρα	53
1.8.4 Τα επενδυματικά κύτταρα	55
1.9 Νευροβλαστώματα N2a	55
1.10 Χρήση βλαστικών κυττάρων σε μελέτες τοξικότητας	56
1.11 «Ομικές» (Omics)-Τοξικογενετική (toxicogenomics)	57

1.12 Χρήση μεταβολομικής σε κυτταρικές καλλιέργειες.....	59
1.13 Μεταβολομική.....	60
1.13.1 Αναλυτικά όργανα για εφαρμογή της μεταβολομικής.....	61
1.13.2 Αναλυτές Μαζών (Analyzers Mass)	63
1.13.2.1 Αναλυτές ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Ion Cyclotron, FT ICR).....	63
1.13.2.2 Τετραπολικοί αναλυτές Χρόνου Πτήσης αναλυτές (Quadrupole time-of-flight, Q-TOF).....	64
1.13.2.3 Αναλυτές τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbital Trap analyzers, Orbitrap)	66
1.13.3 Προεπεξεργασία δεδομένων	68
1.13.4 Στατιστική/βιοπληροφορική ανάλυση.....	68
2. Σκοπός της έρευνας	71
3. Υλικά και Μέθοδοι	75
3.1. Χημικά και αντιδραστήρια	77
3.2 Βιολογικό Υλικό: απομόνωση και καλλιέργεια νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs) και νευροβλαστώματα N2a	77
3.2.1 Νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs)	77
3.2.1.1 Απομόνωση νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)	78
3.2.1.2 Απομόνωση NSCs από τον ιστό της έσω υποκοιλιακής ζώνης από ποντίκια <i>Mus musculus</i>	79
3.3 Θρεπτικά υποστρώματα για την απομόνωση και καλλιέργεια των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs) και νευροβλαστώματα N2a..	82
3.3.1 Απομόνωση και καλλιέργεια NSCs.....	82
3.3.2 Υλικό ανάπτυξης νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs).....	82
3.3.3 Πέρασμα νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs).....	83
3.4 Νευροβλαστώματα N2a	84
3.4.1 Καλλιέργεια και απομόνωση κυττάρων N2a	84
3.4.2 Διαδικασία του περάσματος των κυττάρων N2a	85
3.5 Μέτρηση αριθμού κυττάρων NSCs.....	86
3.6 Μέτρηση αριθμού κυττάρων N2a.....	88
3.7 Βιοδοκιμές για την αξιολόγηση της τοξικότητας των clothianidin, imidacloprid και diazinon σε νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs) και σε διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a.....	89
3.7.1 Αξιολόγηση της τοξικότητας των clothianidin, imidacloprid και diazinon σε νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs)	89
3.7.2 Αξιολόγηση της τοξικότητας των clothianidin, imidacloprid και diazinon σε διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a	91

3.8 Μεταβολομική ανάλυση για τη μελέτη της επίδρασης μεμονωμένων εντομοκτόνων ή συνδυασμών τους στο μεταβολισμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs).....	92
3.8.1 Πειραματικός σχεδιασμός	92
3.8.2 Δειγματοληψία και εκχυλίσσεις κυττάρων	93
3.8.3 Μεταβολομική ανάλυση του ενδομεταβολόματος των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs) με αέριο χρωματογράφο-φασματομέτρο μάζας (GC/EI/MS).....	96
3.8.4 Κατασκευή ανοιχτής πρόσβασης βάσης μεταβολιτών των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)	97
3.8.5 Βιοπληροφορική-μεταβολομική ανάλυση και ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης του clothianidin, imidacloprid και του μείγματος τους στο μεταβολισμό στελεχών των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)	98
4. Αποτελέσματα & Συζήτηση	100
4.1 Καλλιέργεια νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs) και νευροβλαστωμάτων N2a.....	102
4.2 Κυτταροτοξικότητα των clothianidin, imidacloprid και diazinon στα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs) – προσδιορισμός των τιμών IC₅₀	102
4.3 Τα clothianidin, imidacloprid και diazinon έχουν διαφορετική επίδραση στη βιωσιμότητα διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κύτταρων N2a	104
4.4 Ανάπτυξη πρωτοκόλλου εκχύλισης του ενδο-μεταβολόμα-τος (endo-metabolome) νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs).....	107
4.4.1 Ανάλυση μεταβολικού προφίλ των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)	107
4.5 Επισκόπηση της επίδρασης επεμβάσεων Clothianidin, Imidacloprid και του μείγματος τους στο μεταβολισμό νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs) με εφαρμογή GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης.....	110
4.5.1 Επίδραση της επέμβασης με Clothianidin στο μεταβολισμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs).....	114
4.5.2 Επίδραση της επέμβασης του Imidacloprid στο μεταβολισμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)	115
4.5.3 Επίδραση της επέμβασης των μιγμάτων Clothianidin και Imidacloprid στο μεταβολισμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)	116
4.6 Μεταβολίτες-βιοσημαντές της επίδρασης των εντομοκτόνων Clothianidin, Imidacloprid και του μείγματος τους στα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs).....	117
4.6.1 Μεταβολίτες-βιοσημαντές της τοξικότητας του εντομοκτόνου clothianidin στα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs)	117

4.6.2 Μεταβολίτες-βιοσημαντές της τοξικότητας του εντομοκτόνου imidacloprid στα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs).....	121
4.6.3 Μεταβολίτες-βιοσημαντές της τοξικότητας του εντομοκτόνου clothianidin-imidacloprid στα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs).....	123
4.7 Ρόλος επιλεγμένων μεταβολιτών-βιοσημαντών της τοξικότητας των clothianidin, imidacloprid και του μείγματος τους στο μεταβολισμό και τη φυσιολογία νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)	126
4.7.1 Υδατάνθρακες.....	126
4.7.2 Αμινοξέα	128
4.7.3 Καρβοξυλικά οξέα.....	128
4.7.4 Λιπαρά οξέα	129
4.7.5 Λοιποί μεταβολίτες-βιοσημαντές.....	130
5. Συμπεράσματα	132
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	136
Παράρτημα	144

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μελέτης μου, θα ήθελα να απευθύνω θερμές ευχαριστίες σε όλους όσους συντέλεσαν στη διεξαγωγή και ολοκλήρωση αυτού του κύκλου σπουδών μου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Δρ. Κωνσταντίνο Α. Αλιφέρη, Λέκτορα του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ανάθεση αυτού του ενδιαφέροντος θέματος, για τη βοήθεια και την καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο Δρ. Σπυρίδωνα Κίντζιο, Καθηγητή του Εργαστηρίου Κυτταρικής Τεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη συμμετοχή του στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή και για την ευκαιρία που μου έδωσε να υλοποιήσω μέρος των πειραμάτων στο Εργαστήριο του, καθώς και τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια του Εργαστηρίου Δρ. Σοφία Μαυρίκου, για την άριστη συνεργασία και τη βοήθεια κατά τη διάρκεια των πειραμάτων σε νευροβλαστώματα N2a.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Δήμητρα Θωμαΐδου, Ερευνήτρια του Ελληνικού Ινστιτούτου ΠΑΣΤΕΡ για την πρόθυμη συνεργασία και για την ευκαιρία που μου έδωσε να υλοποιήσω ένα μεγάλο μέρος του πειράματος στο Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευρολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου ΠΑΣΤΕΡ, καθώς και τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια του Εργαστηρίου Δρ. Έλσα Παπαδημητρίου για την εκπαίδευση, την καθοδήγηση και τη βοήθεια κατά τη διάρκεια των πειραμάτων σε νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs).

Ευχαριστίες οφείλω επίσης να εκφράσω στους Καθηγητές, στα μέλη Δ.Ε.Π. και το προσωπικό του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας για την άριστη συνεργασία στα πλαίσια υλοποίησης της διατριβής μου, καθώς και την ομάδα Pesticide Metabolomics Group στην οποία εντάσσομαι.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα κα Μάιρα Λυκογιάννη για την ανεκτίμητη συνεισφορά της στις πειραματικές διαδικασίες και τι συμβουλές της, οι οποίες αποδείχθηκαν πολύτιμες σε όλη τη διάρκεια της μελέτης και της συγγραφής της. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο Διδάκτορα κο Ιωάννη Καλαμπόκη για τον χρόνο που αφιέρωσε και την

πολύτιμη βοήθεια του κατά την πραγματοποίηση στατιστικών και μεταβολομικών αναλύσεων καθώς και για τις συμβουλές του όποτε εγώ του απευθύνθηκα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης, οφείλω να εκφράσω στην συμφοιτήτρια μου κα Δήμητρα Καραμάνου η οποία ήταν δίπλα μου στηρίζοντάς με όποτε τη χρειάστηκα.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους δικούς μου ανθρώπους, στην οικογένεια μου, την δίδυμη μου αδερφή Ρόζα για την ολόπλευρη στήριξη της και την ώθηση της να ολοκληρώσω αυτή την προσπάθεια καθώς και τους φίλους μου που ήταν κοντά μου.

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΦΩΤΟΠΟΥΛΟΥ

Λίστα συντομογραφιών

Σύντμηση	Αγγλική ορολογία	Ελληνική απόδοση
Ach	Acetylcholine	Ακετυλοχολίνη
AChE	Acetylcholinesterase	Ακετυλοχολινεστεράση
ADSCs	Neural Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells	Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα από Διαφοροποιημένα Παράγωγα του Λιπώδους Ιστού Ποντικών
BFGF	Fibroblast Growth Factor	Βασικός Αυξητικός Παράγοντας Ινοβλαστών
DMEM	Dulbecco's Medium	Θρεπτικό Μέσο Κυτταροκαλιέργειας Ζωικών Κυττάρων
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό Οξύ
EC ₅₀	Half Maximal Effective Concentration	Μέση Αποτελεσματική Συγκέντρωση
ED ₅₀	Effective Dose	Μέση Αποτελεσματική Δόση
EGF	Epidermal Growth Factor	Επιδερμικός Αυξητικός Παράγοντας
EPA	Environmental Protection Agency	Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος
ESCs	Embryonic Stem Cells	Εμβρυϊκά Βλαστοκύτταρα
EFSA	European Food Safety Authority	Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων
FCS	Fetal Bovine Serum	Ορός Εμβρύου Μόσχου
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee	Επιτροπή Δράσης για την Ανθεκτικότητα σε Μυκητοκτόνα
GC	Gas Chromatography	Αέρια Χρωματογραφία
HEPES	HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic Acid	Ρυθμιστικό Διάλυμα
HCA	Hierarchical Clustering Analysis	Ιεραρχική Ομαδοποίηση
HR	Hypersensitive Response	Εκδήλωση Υπερευαισθησίας
HRAC	Herbicide Resistance Action Committee	Επιτροπή Δράσης για την Ανθεκτικότητα σε Ζιζανιοκτόνα
IC ₅₀	Half Maximal Inhibitory Concentration	Μέση Συγκέντρωση Παρεμπόδισης
ICM	Inner Cell Mass	Εσωτερική Κυτταρική Μάζα
IRAC	Insecticide Resistance Action Committee	Επιτροπή Δράσης για την Ανθεκτικότητα σε Εντομοκτόνα
Kegg	Kyoto encyclopedia of Genes and Genomes	Εγκυκλοπαίδεια των Γενών και Γονιδιωμάτων του Κυότο
Laminar	Vertical Laminar Flow	Θάλαμος Κάθετης Νηματικής Ροής
LD ₅₀	Lethal Dose	Μέση Θανατηφόρος Δόση
LC	Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία
MeOH	Methanol	Μεθανόλη

MS	Mass Spectrometry	Φασματομετρία Μαζών
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	Βρωμιούχο Διμεθυλ-θιαζολ-διφαινυλτετραζόλιο
MRLs	Maximum Residue Levels	Ανώτατα Όρια Υπολειμμάτων
NIST	National Institute of Standards and Technology	Εθνικό Ινστιτούτο Προτύπων και Τεχνολογίας
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού
NSCs	Neural Stem Cells	Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα
OPLS-DA	Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis	Μέθοδος Ορθογώνιων Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων-Διακριτικής Ανάλυση
PBS	Phosphate Buffer Saline	Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών Αλάτων με Χλωριούχο Νάτριο
SGZ	Subgranular Zone	Ενήλικη Υποκοιλιακή Ζώνη
SVZ	Subventricular Zone	Υποκοιλιακή Ζώνη
TD ₅₀	Toxic Dose	Μέση Τοξική Δόση
TOF	Time of Flight	Αναλυτή Χρόνου Πτήσης
Δ.Ο	Active Ingredient	Δραστική Ουσία
E.E	European Union	Ευρωπαϊκή Ένωση
Φ.Π.	Plant Protection Products	Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα

1. Εισαγωγή

1.1 Φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.) και φυτοπροστασία: ορισμοί και σημασία για τον αγροδιατροφικό τομέα

Παρά την πρόοδο που σημειώνει τα τελευταία χρόνια η βιολογική καταπολέμηση εχθρών και ασθενειών των φυτών σε ολόκληρο τον κόσμο και την τάση για ανακάλυψη νέων περιβαλλοντικά φιλικότερων από τις ήδη υπάρχουσες μεθόδων, η χημική καταπολέμηση αποτελεί τη ραχοκοκκαλιά της φυτοπροστασίας (Oerke, 2006). Ιδανικά, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.) (plant protection products, PPPs), γνωστά και ως γεωργικά φάρμακα ή φυτοφάρμακα, θα πρέπει να είναι αποτελεσματικά, να εμφανίζουν μικρή τοξικότητα σε οργανισμούς μη-στόχους, να εμφανίζουν εκλεκτική δράση και εξειδικευμένο μηχανισμό δράσης.

Σύμφωνα με την Κοινοτική Νομοθεσία, ως Φ.Π. ορίζονται *“Οι δραστικές ουσίες και τα σκευάσματα, τα οποία περιέχουν μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες, με τη μορφή με την οποία προσφέρονται στον χρήστη και προορίζονται: για να προστατέψουν τα φυτά από εχθρούς και ασθένειες, να επηρεάσουν τις βιολογικές διεργασίες των φυτών (ρυθμιστές αύξησης φυτών), να διατηρούν και να προστατεύουν τα φυτικά προϊόντα κατά την αποθήκευση και εμπορία και να καταστρέφουν ανεπιθύμητα φυτά ή τμήματα αυτών”* (Κοινοτική Οδηγία ΕΚ 91/114).

Από τις αρχές του 19^{ου} αιώνα, ξεκίνησε η συστηματική αντιμετώπιση των εχθρών και ασθενειών των φυτών με σκοπό την εξασφάλιση ικανοποιητικής ποιότητας και ποσότητας τροφίμων για τη διατροφή του διαρκώς αυξανόμενου ανθρώπινου πληθυσμού. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν ανόργανα Φ.Π., κυρίως αρσενικούχα και χαλκούχα, όπως ο βορδιγάλιος πολτός. Η εισαγωγή των σύγχρονων συνθετικών οργανικών Φ.Π. ξεκίνησε στα μέσα του 20^{ου} αιώνα, με την ανακάλυψη των διθειοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων και των οργανοχλωριωμένων, οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων. Οι δεκαετίες του 1950-’80 αποτέλεσαν ορόσημο, καθώς υπήρξε ραγδαία πρόοδος στην ανακάλυψη και ανάπτυξη μεγάλου αριθμού Φ.Π. Η χρήση τους στην φυτοπροστασία στην αρχή επικράτησε μόνο στις αναπτυγμένες χώρες, ενώ μετά το 1980, με ελάχιστες εξαιρέσεις χωρών της Αφρικανικής και Ασιατικής Ηπείρου, η χρήση τους γενικεύθηκε (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008).

Η εντατική χρήση Φ.Π. για την προστασία της γεωργικής παραγωγής αποτελεί σημείο αναφοράς της μεγάλης αλλαγής κατά τη λεγόμενη “Πράσινη Επανάσταση” που έχει συντελεστεί στον αγροτικό τομέα τις τελευταίες δεκαετίες. Η αύξηση της

παραγωγής οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως τη χρήση λιπασμάτων προηγμένης τεχνολογίας, ανθεκτικών ποικιλιών και εξελιγμένων μηχανημάτων. Ωστόσο, η χρήση Φ.Π. χαρακτηρίζει τη νέα εποχή στις πρακτικές της φυτικής παραγωγής. Εντυπωσιακές είναι οι οικονομικές και παραγωγικές αποδόσεις σε παγκόσμια κλίμακα. Σύμφωνα με έρευνα, το ετήσιο οικονομικό όφελος των ΗΠΑ έχει προσδιοριστεί στα \$16 δις (Pimentel and Greiner, 1997). Πιο συγκεκριμένα οι ΗΠΑ έχουν επταπλασιάσει τον όγκο της σοδειάς σε εννιά είδη καλλιεργειών από το 1940 μέχρι σήμερα (Warren, 1998). Αντίστοιχα, στην Ινδία διαδραμάτισαν καθοριστικό ρόλο στη βελτίωση της παραγωγής, από το 1951 μέχρι σήμερα. Η παραγωγή των σιτηρών τετραπλασιάσθηκε και αντιμετώπισε τις ανάγκες σίτισης του πληθυσμού ενώ ταυτόχρονα ενισχύθηκαν σημαντικές οι εξαγωγές (Jha and Chand, 1999).

Σημαντική είναι η συμβολή των Φ.Π. τόσο στη ραγδαία αύξηση της παραγωγής όσο και στη βελτίωση του βιοτικού επιπέδου του ανθρώπου (Cooper and Dobson, 2007). Για παράδειγμα, σε χώρες όπου οι κλιματικές συνθήκες δεν είναι κατάλληλες, η παραγωγή οπωροκηπευτικών δε θα ήταν βιώσιμη (Petrusheva, 1975). Επίσης, η προστασία των φυτών από εχθρούς και ασθένειες σε συνδυασμό με την αύξηση της γεωργικής παραγωγής με την καταπολέμηση ζιζανίων, έδωσε τη δυνατότητα εκμηχάνισης της γεωργίας (π.χ. μηχανική συγκομιδή πολλών αγροτικών προϊόντων όπως πατάτας, τομάτας, βάμβακος κ.ά) (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008). Επίσης, καθοριστική είναι η συμβολή των Φ.Π. στη μετασυλλεκτική προστασία νωπών φρούτων και λαχανικών κατά την περίοδο μεταφοράς και εμπορίας αλλά και των αποθηκευμένων προϊόντων από παθογόνους μύκητες που κάτω από ευνοϊκές συνθήκες παράγουν εξαιρετικά τοξικές μυκοτοξίνες (Bruns, 2003). Εν γένει, η πρόσβαση σε οικονομικά και καλής ποιότητας φρέσκα φρούτα και λαχανικά αποδίδεται κυρίως στη φυτοπροστασία που παρέχουν τα Φ.Π. (Gianessi, 1999). Η διαθεσιμότητα ασφαλών και υψηλής θρεπτικής αξίας τροφίμων, οδήγησε στην βελτίωση της ποιότητας ζωής των ανθρώπων και στην αύξηση του προσδόκιμου της ζωής σε παγκόσμια κλίμακα (The European Food Information Council, 2006.).

Η συμβολή τους είναι καθοριστική στην προστασία και τον έλεγχο όχι μόνο της γεωργικής παραγωγής στον αγρό και στους χώρους αποθήκευσης, αλλά και της δημόσιας υγείας. Πολλές σοβαρές ασθένειες που μεταδίδονται από έντομα, ποντίκια και άλλους οργανισμούς (π.χ. ελονοσία, κίτρινος πυρετός, τύφος, ασθένεια του ύπνου, πανώλη, λεπτοσπείρωση κ.α.), κατέστη δυνατό να

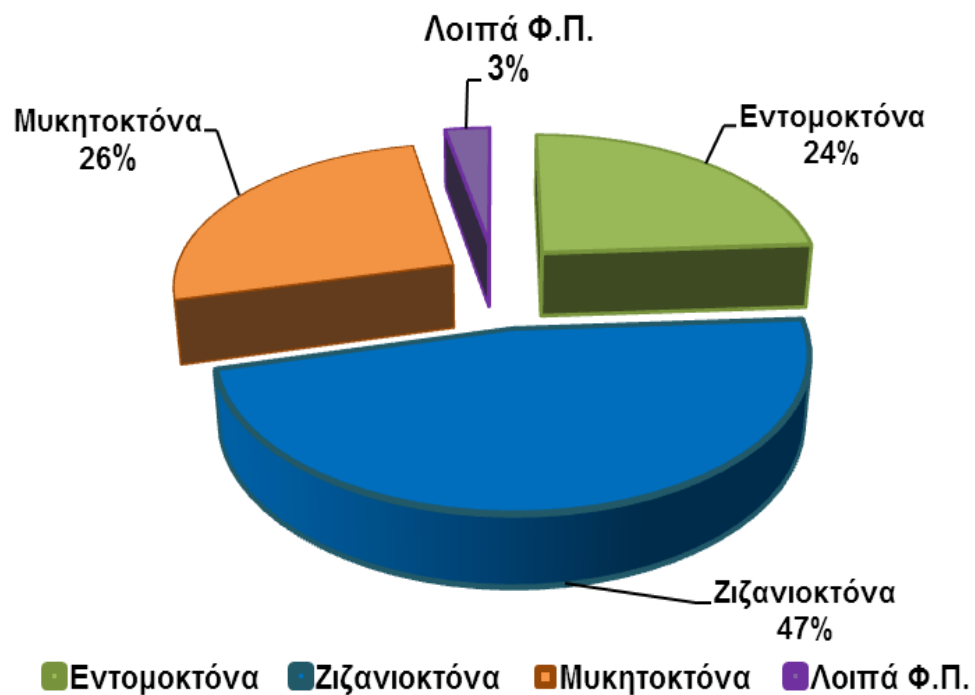
αντιμετωπισθούν. Οι ασθένειες αυτές προκάλεσαν το θάνατο εκατομμυρίων ανθρώπων σε όλο τον κόσμο. Ακόμα και σήμερα, εκτιμάται ότι 700.000-900.000 παιδιά πεθαίνουν ετησίως από ελονοσία στην τροπική Αφρική λόγω έλλειψης υγειονομικής προστασίας (Aliferis and Jabaji, 2011).

Υπολογίζεται ότι υπάρχουν πάνω από 1000 δ.ο. ενώ διατίθενται στην αγορά περίπου 30.000 διαφορετικά σκευάσματα οι συνολικές πωλήσεις σε παγκόσμιο επίπεδο ανέρχονται στα 39.4 δισεκατομμύρια (Environmental Protection Agency, (EPA.). Οι κύριες ομάδες των Φ.Π. που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως για την προστασία των φυτών είναι τα ζιζανιοκτόνα (47%), τα μυκητοκτόνα (26%) και τα εντομοκτόνα (24%) και μικρότερης σημασίας τα ακαρεοκτόνα και τα νηματωδοκτόνα (**Εικόνα 1**). Η φυτοπροστασία συμπληρώνεται από καλλιεργητικά και άλλα μέτρα, ώστε να περιορίζεται όσο είναι δυνατό η μικρότερη εισροή ξενοβιοτικών ουσιών στο περιβάλλον και λιγότερα υπολείμματα των δ.ο στα φυτικά προϊόντα.

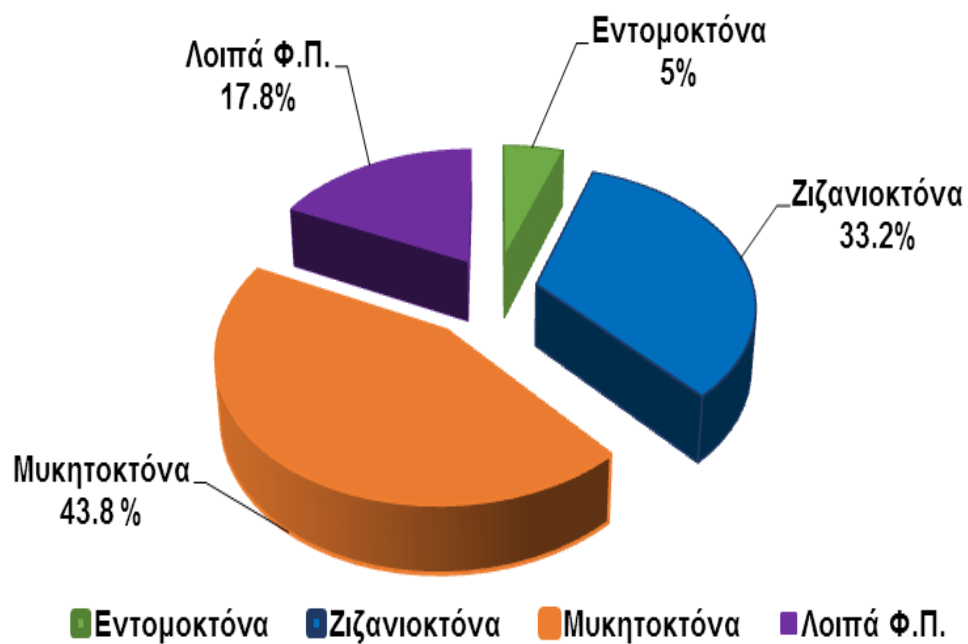
Σύμφωνα με τη (Eurostat, 2014.), (<http://ec.europa.eu/eurostat>) η συνολική ποσότητα των πωλήσεων των Φ.Π. στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.) ανήλθε σε περίπου 400.000 τόνους. Αναλυτικότερα, τα μυκητοκτόνα ήταν η πιο διαδεδομένη ομάδα των Φ.Π. με μερίδιο 44% του συνόλου, ακολουθούν τα ζιζανιοκτόνα καταλαμβάνοντας το 33% αντίστοιχα. Μαζί με την ομάδα των εντομοκτόνων (5%), οι τρεις βασικές ομάδες κατέχουν το 82,2% του συνόλου των Φ.Π. που πωλήθηκαν (**Εικόνα 2**).

Εξετάζοντας τα κράτη μέλη της Ε.Ε. μεμονωμένα, η Ισπανία, η Γαλλία, η Ιταλία και η Γερμανία κατατάσσονται στις πρώτες θέσεις χρήσης Φ.Π. (50.000-80.000 τόνους), η οποία συνδέεται με την μεγάλη αγροτική παραγωγή των χωρών αυτών. Η Ελλάδα βρίσκεται στη 13^η θέση με ποσότητα χρήσης 10.000 τόνους (**Εικόνα 3**). Παρόλ' αυτά, η χρήση των Φ.Π. προκαλεί ανεπιθύμητες παρενέργειες σε οργανισμούς μη-στόχους και αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον καθώς τεράστιος όγκος Φ.Π. απελευθερώνεται κάθε χρόνο. Με την εφαρμογή τους, αυτά διασπείρονται στο περιβάλλον και μπορούν να ρυπάνουν εδάφη και ύδατα (επιφανειακά και υπόγεια) και να εισχωρήσουν στην τροφική αλυσίδα με τη μορφή υπολειμμάτων, όπου εν τέλει λαμβάνονται από τον άνθρωπο μέσω της τροφής και του νερού (Taylor et al., 2003, den Hond et al., 2003). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτέλεσε το 2009, όταν υψηλά επίπεδα οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων ανιχνεύθηκαν σε ενήλικες σε πέντε διαφορετικές περιοχές της Ισπανίας (Lasker,

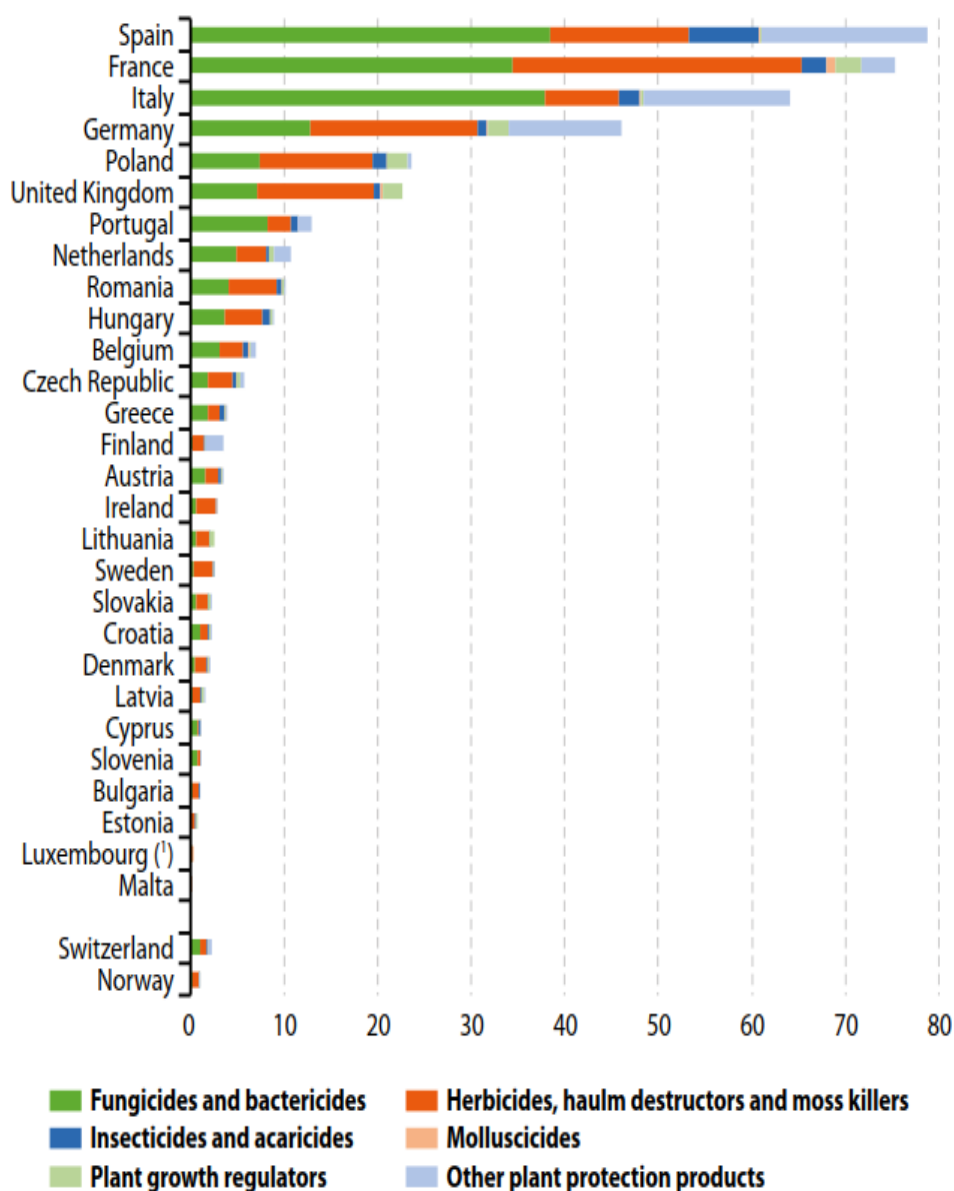
2012). Επίσης, ίχνη υπολειμμάτων Φ.Π. έχουν βρεθεί σε μέρη όπου δεν έχουν εφαρμοσθεί ποτέ, συγκεκριμένα στην Ανταρκτική και τα Βραχώδη Όρη (Zadoks, 2003, Carvalho, 2006).



Εικόνα 1. Πωλήσεις Φ.Π. στην παγκόσμια αγορά (Phillips McDougall 2014)



Εικόνα 2. Οι πωλήσεις Φ.Π. στην Ε.Ε. (Eurostat 2014)



Εικόνα 3. Οι πωλήσεις των έξι κύριων ομάδων Φ.Π. στις χώρες της Ε.Ε. (Eurostat 2014)

1.2 Τοξικότητα και μηχανισμοί δράσης (Μ.Δ.) φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Φ.Π.)

Σε πολύ μεγάλο βαθμό, η τοξικότητα των δ.ο. είναι συνδεδεμένη με το Μ.Δ. τους, ο οποίος περιγράφει όλα τα βιοχημικά γεγονότα που οδηγούν στην τοξικότητά τους (Aliferis and Jabaji, 2011). Παρά το γεγονός ότι τα Φ.Π. εμφανίζουν έναν κύριο Μ.Δ., με βάση τον οποίο κατηγοριοποιούνται (FRAC., IPAC., HRAC.) παράλληλα, επιδρούν σε μεγάλο αριθμό βιοχημικών συστημάτων, τα οποία χαρακτηρίζουν

τους δευτερεύοντες Μ.Δ. τους και από τους οποίους πολλές φορές καθορίζεται και η τοξικότητά τους. Η έρευνα σχετική με το τελευταίο, βρίσκεται σε αρχικό στάδιο και για ένα μικρό αριθμό δ.ο. οι δευτερεύοντες Μ.Δ. έχουν πλήρως εξακριβωθεί (Aliferis and Jabaji, 2011, Aranibar et al., 2001).

Κατά τον 15^ο αιώνα τέθηκαν από τον Παράκελσο οι βάσεις της Τοξικολογίας. Η Τοξικολογία αποτελεί παρακλάδι της Φαρμακολογίας και είναι η επιστήμη που μελετά τη φύση, τη δράση και τις συνέπειες κάθε ουσίας επί ζωντανών οργανισμών, με έμφαση στις ανεπιθύμητες ενέργειες που η έκθεσή τους σε αυτά προκαλεί. Με τον όρο **τοξικότητα (toxicity)** περιγράφεται το σύνολο των μη επιθυμητών, δυσμενών επιδράσεων, των Φ.Π. στους διάφορους οργανισμούς (ζωικούς και φυτικούς) που δεν είναι στόχοι των Φ.Π. (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου *et al.*, 2008).

Η τοξικότητα, ανάλογα με τη μορφή ή τον χρόνο εμφάνισης της επιβλαβούς ή δυσμενούς δράσης διακρίνεται σε **οξεία τοξικότητα (acute toxicity)**, στην οποία οι δυσμενείς επιδράσεις εμφανίζονται μέσα σε λίγες ώρες ή ημέρες μετά την λήψη μιας δόσης κάποιου παράγοντα και σε **έμμεση ή χρόνια τοξικότητα (chronic toxicity)**, στην οποία οι δυσμενείς επιδράσεις εμφανίζονται μετά από πολλές ημέρες ή έτη ανεξάρτητα από την δόση ή την συχνότητα λήψης ή έκθεσης στον επιβλαβή παράγοντα και σχετίζονται με καρκινογένεσεις, μεταλλάξεις, νευροτοξικότητες, ηπατονεφροτοξικότητες, διαταραχές ορμονικής ισορροπίας, εμβρυοτοξικότητες, γονοτοξικότητες, τερατογένεσεις κ.ά. (Kristanc and Kreft, 2016)

Η **οξεία τοξικότητα (acute toxicity)**, οφείλεται συνήθως στην αναστολή λειτουργίας ενός φυσιολογικού συστήματος του οργανισμού και μπορεί να προσδιορισθεί ποσοτικά (LD_{50}/ED_{50} ή TD_{50}/ED_{50}). Ο λόγος LD_{50}/ED_{50} ή TD_{50}/ED_{50} (mg/kg) δείχνει τα περιθώρια ασφαλείας μιας ουσίας (ποσοτική εκτίμηση της εκλεκτικότητας του κάθε Φ.Π.). Όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος τόσο μεγαλύτερη είναι εκλεκτικότητα και το αντίστοιχο εύρος ασφαλείας.

Θεμελιώδεις έννοιες στη Γεωργική Φαρμακολογία, εκτός από τις παραπάνω, είναι η EC_{50} και η IC_{50} . Η τιμή **EC_{50} (half maximal effective concentration)** είναι η συγκέντρωση μιας ουσίας που προκαλεί 50% παρεμπόδιση της ανάπτυξης ενός οργανισμού σε μια καλλιέργεια. Η τιμή **IC_{50} (half maximal inhibitory concentration)**, είναι η συγκέντρωση μιας ουσίας που δίνει το 50% της παρεμπόδισης σε μια βιολογική διαδικασία π.χ σε ένζυμα, κύτταρα ή

μικροοργανισμούς. Οι τιμές αυτές είναι σημαντικές και χρησιμοποιούνται για την αξιολογηθεί η καταλληλότητα και η απόδοση των Φ.Π. (Sebaugh, 2011).

Για να εκτιμήσουμε τις θανατηφόρες δόσεις, κατασκευάζουμε τις καμπύλες δόσης-θνησιμότητας, η οποίες είναι κατά κανόνα σιγμοειδείς και ασύμμετρες. Η μορφή της σιγμοειδούς καμπύλης ποικίλλει ανάλογα με το είδος του οργανισμού, την τοξική ουσία και άλλους παράγοντες (Savi et al., 2017).

1.3 Μηχανισμοί δράσης των κύριων κατηγοριών φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Φ.Π.)

Η ευρεία εφαρμογή Φ.Π. ενέχει σημαντικούς κινδύνους, ιδίως όταν πρόκειται για μη-εκλεκτικές ενώσεις με ευρύ φάσμα δράσης και μεγάλη υπολειμματική διάρκεια. Για το λόγο αυτό, η ασφαλής και αποτελεσματική χρήση των Φ.Π. καθιστά αναγκαία και απαιτεί τη γνώση των Μ.Δ και κατά επέκταση της βιοδραστικότητας των μορίων τους. Στη συνέχεια, περιγράφονται οι Μ.Δ. των 3 κύριων κατηγοριών.

1.3.1 Μηχανισμοί δράσης μυκητοκτόνων

Περισσότερες από 40 δ.ο. μυκητοκτόνων έχουν ανακαλυφθεί με διαφορετικούς Μ.Δ. σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία της FRAC (2018), (Aliferis and Jabaji, 2011), ενώ σε ορισμένες από αυτές δεν έχει διευκρινιστεί μέχρι σήμερα ο ακριβής Μ.Δ. τους. Οι δ.ο. ανάλογα με τη θέση και το Μ.Δ. που δρουν κατηγοριοποιούνται σε οχτώ μεγάλες κατηγορίες (**Πίνακας 1**).

Πίνακας 1. Κατάταξη των μυκητοκτόνων σε 8 μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το Μ.Δ. σύμφωνα με τα στοιχεία της FRAC (2018), (Aliferis and Jabaji, 2011).

Ομάδα	Χημική Ομάδα	Μηχανισμός Δράσης
1. Προστατευτικά μυκητοκτόνα	Ανόργανα	Πολυθεσικό τρόπο δράσης
	Χαλκούχα	
	Διμεθυλο-διθειοκαρβαμιδικά	
	Αιθυλενο-δις-διθειοκαρβαμιδικά	
	Φθαλιμίδια	

	Κινόνες	
2. Μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στις διαδικασίες παραγωγής ενέργειας των κυττάρων (αλυσίδα αναπνοής)	Οξαθειίνες καρβοξανλικές ή (καρβοξαμίδια) και συγγενικά ανιλίδια	Αναστέλλουν την σαξινική αφυδρογονάση στο Σύμπλοκο II της αναπνοής
	Στρομπιλουρίνες	Παρεμβαίνουν στην αλυσίδα της αναπνοής στο Σύμπλοκο III (σύμπλεγμα των κυτοχρωμάτων bc)
	Οξαζολιδινόνες ή Αζόλια	
	α) Χλωροφαινόλες Νιτροφαινόλες και άλλες	Αποδεσμευτές της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης από την σύνθεση του ATP
	β) Αρυλαμινοπυριδίνες	
3. Μυκητοκτόνα που επηρεάζουν τις μεμβράνες και την εναπόθεση συστατικών κυτταρικών τοιχωμάτων	Δικαρβοξυμίδια	Υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων των λιπιδίων
	Αμίδια καρβοξυλικών οξέων	Αναστολείς της βιοσύνθεσης φωσφολιπιδίων των μεμβρανών
4. Μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν σε βιοσυνθετικές διεργασίες των μυκήτων	N-Ακυλαλανίνες ή φαινυλαμίδια και συγγενικά ακυλαλανίδια	Αναστολείς βιοσύνθεσης νουκλεϊκών οξέων
	Πυριμιδίνες	
	Ανιλίνο-πυριμιδίνες	Αναστολείς βιοσύνθεσης αμινοξέων
	Με ένα ακόρεστο πενταμελή δακτύλιο α. Τριαζόλια	Αναστολείς βιοσύνθεσης στερολών (SBI)
	β. Ιμιδαζόλια	
	Με ένα κορεσμένο εξαμελή δακτύλιο α. Μορφολίνες β. Πιπεριδίνες	
	Λοιπά α. Σπιροκεταλαμίνες β. Υδροξυ-ανιλίδια	
	Οργανοφωσφορικό (tolclofos-methyl)	Αναστολείς βιοσύνθεσης λεκιθινών
5. Μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στην μίτωση	Βενζιμιδαζολικά και συγγενικά μυκητοκτόνα	Παρεμβαίνουν στον πολυμερισμό της β-τουμπουλίνης
	Αμίδια	
6. Μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στην μετάδοση μηνυμάτων	Φαινυλοπυρρόλια	Αναστέλλουν μία κινάση MAP (mitogen-activated protein)
7. Μυκητοκτόνα με άγνωστο τρόπο δράσης	Κυανοακεταμιδοξίμη	
	Φθαλαμικά οξέα	

	Βενζοτριάζινες	
	Βενζολοσουλφοναμίδια	
	Πυριδαζινόνες	
	Φαινυλο-ακεταμίδιο	
	Κυανο-μεθυλενοθειαζολιδίνες	
	Πυριμιδινονοδραζονών	
	Τετραζολυλοξίμες	
8. Μυκητοκτόνα που επηρεάζουν τις σχέσεις ξενιστών-παθογόνων και διεγείρουν αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών	Βενζο-θειαδιαζόλιο (BTH)	Ενεργοποίηση της HR, σαλικυλικού οξέος σύνθεση ειδικών πρωτεϊνών ανθεκτικότητας
	Θειαδιαζολοκαρβοξαμίδιο	
	Πολυσακχαρίτες	

1.3.2 Μηχανισμοί δράσης ζιζανιοκτόνων

Έχουν αναφερθεί περισσότερες από 20 δ.ο. ζιζανιοκτόνων με διαφορετικό Μ.Δ. σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία της HRAC (2018), (Aliferis and Jabaji, 2011), οι οποίες ανάλογα με τη θέση και το Μ.Δ. που παρεμβαίνουν κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες (**Πίνακας 2**).

Πίνακας 2. Κατάταξη των ζιζανιοκτόνων ανάλογα με το Μ.Δ. τους (Επιτροπής HRAC, (2008) (Aliferis and Jabaji, 2011).

Ομάδα	Χημική Ομάδα	Μηχανισμός Δράσης
1. Ζιζανιοκτόνα με δράση ορμονική-συνθετικές αυξίνες	Φαινοξυ-αλκανοϊκά Βενζοϊκά και άλλα καρβοξυλικά οξέα	Έχουν ορμονική δράση και ειδικά δράση αυξίνης, δρουν όπως η φυσική αυξίνη, το IAA
2. Ζιζανιοκτόνα των οποίων η δράση εξαρτάται άμεσα ή έμμεσα από το ηλιακό φως	Παράγωγα Ουρίας Τριαζίνες, Τριαζινόνες Ουρακίλες, Καρβαμιδικά Φαινυλοπυριδαζίνες ή Πυριδαζινόνες Βενζοθειαδιαζόλια	α) Παρεμβαίνουν στη φωτοσύνθεση. Αναστέλουν τη ροή των ηλεκτρονίων στο Φωτοσύστημα II
	Διπυριδύλια	β) Ζιζανιοκτόνα που παρεμβαίνουν στο φωτοσύστημα I
	Διφαινυλο-αιθέρες Τριαζολόνες Οξαδιαζόλια	γ) Αναστολείς της οξειδάσης του πρωτοπορφυρογόνου (Λοιποί αναστολείς του Protox)
		δ) Αναστολείς βιοσύνθεσης καρροτινοειδών δ1) Αναστολείς της αφυδρογονάσης του φυτοενίου
	Υδροξυφαινυλο-πυρουβικού Βενζουλοκυκλοεξανεδιόνες ή Τρικετόνες Κυκλοπροπυλο-ισοξαζόλια Πυραζόλια	δ2) Αναστολείς της διοξυγενάσης του 4-υδροξυφαινυλο-πυρουβικού (4-hydroxyphenyl-pyruvate-dioxygenase, 4-HPPD)
	Τριαζόλια	Αναστολείς αγνώστου σημείου δράσεως
		Αναστολείς της συνθετάσης της γλουταμίνης
3. Ζιζανιοκτόνα που παρεμβαίνουν στην μίτωση (λειτουργία ατράκτου)	Δινιτροανιλίνες Αμίδια	Δρουν στην αναστολή της συναρμολόγησης β-τουμπουλίνης
4. Ζιζανιοκτόνα που αναστέλουν βιοσυνθετικές διεργασίες των φυτών	Πολυκυκλικά αλκανοϊκά οξέα, Κυκλο-εξανεδιόνες Θειοκαρβαμιδικά Χλωρακεταμίδια Οξυακεταμίδια	4.1 Αναστολείς βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων
	Σουλφονυλουρίες Τριαζολοπυριμιδίνες Ιμιδαζολίνονες	4.2 Αναστολείς βιοσύνθεσης αμινοξέων α) Αναστολείς της ακετολακτικής συνθάσης (ALS)
		β) Αναστολείς της συνθάσης του ενολοπυρουβυλο-σκιικιμικού-3-φωσφορικού οξέος (EPSP)

1.3.3 Μηχανισμοί δράσης εντομοκτόνων

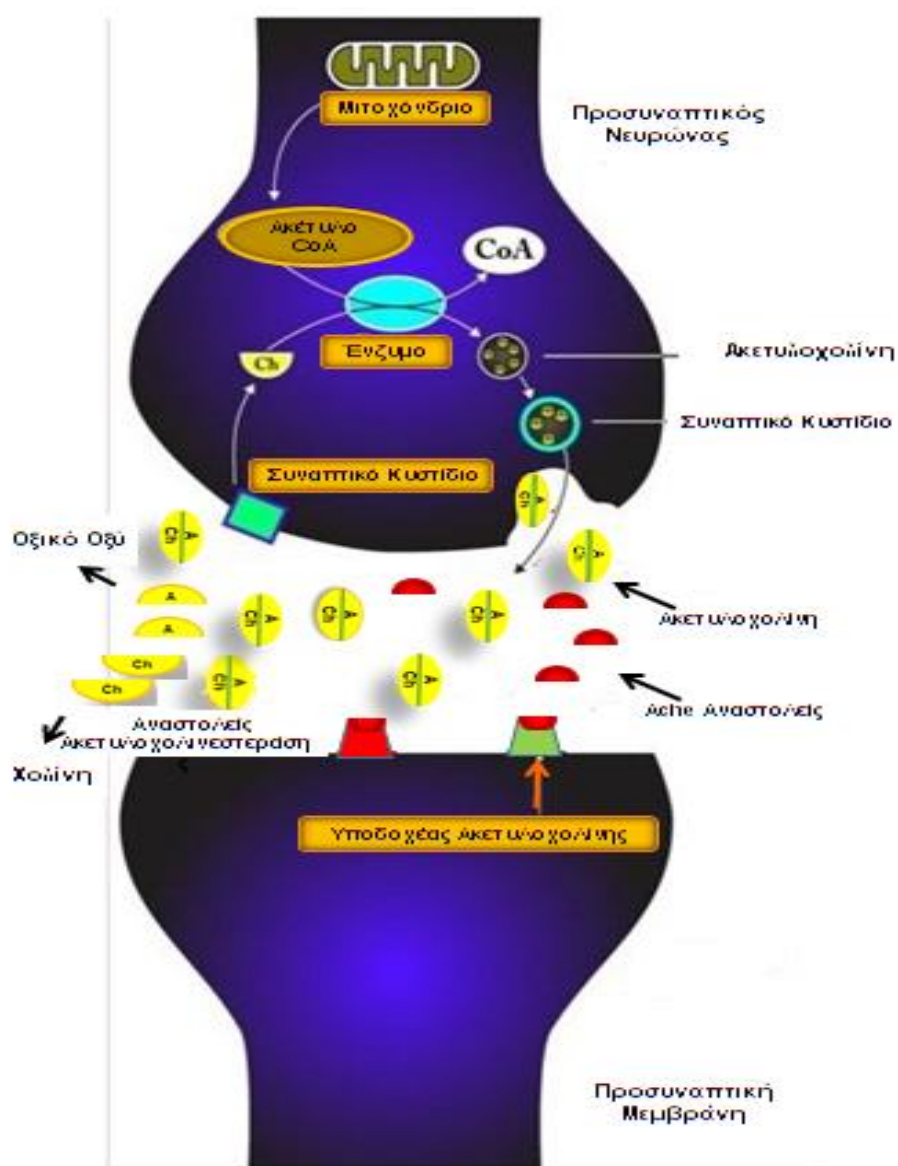
Σήμερα, κυκλοφορούν στο εμπόριο περισσότερες από 26 δ.ο. εντομοκτόνων με διαφορετικούς Μ.Δ., οι περισσότερες από τις οποίες παρεμβαίνουν στη λειτουργία του νευρικού συστήματος των εντόμων IRAC, (2018); (Aliferis and Jabaji, 2011) (**Πίνακας 3**). Μερικές παρεμβαίνουν στις λειτουργίες αύξησης και ανάπτυξης των εντόμων (Insect Growth Regulators, IGRs) και οι υπόλοιπες ανήκουν σε αυτές που εμφανίζουν διάφορους Μ.Δ.

Στην παρούσα μελέτη λόγω της συγγένειας του νευρικού συστήματος των εντόμων με τον άνθρωπο, μελετήθηκαν 3 εντομοκτόνα που παρεμβαίνουν στη λειτουργία του νευρικού συστήματος των εντόμων σχετικά με την τοξικότητα τους σε πρότυπα βιολογικά συστήματα που προέρχονταν από ποντίκια όπως είναι τα νευρικά βλαστικά κύτταρα και τα νευροβλαστώματα. Πιο συγκεκριμένα ασχοληθήκαμε με το diazinon που ανήκει στην κατηγορία των οργανοφωσφορικών και κατατάσσεται ως μετρίως τοξικό εντομοκτόνο κατηγορίας II στα θηλαστικά (moderate toxic class II, EPA) και τα clothianidin και imidacloprid που ανήκουν στη κατηγορία των νεονικοτινοειδών με μικρή τοξικότητα στα θηλαστικά κατηγορίας I (moderate toxic class I, EPA). Τα τελευταία χρόνια υπάρχει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω των ενεπιθύμητων επιπτώσεων που έχουν προκαλέσει σε οργανισμούς μη στόχους όπως οι μέλισσες EFSA (Authority, 2015).

Πίνακας 3. Κατάταξη των οργανοφωσφωρικών και νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων που παρεμβαίνουν στην λειτουργία του νευρικού συστήματος των εντόμων IRAC, (2018)

Ομάδα	Χημική Ομάδα	Μηχανισμός Δράσης	Βιοδραστικές Ουσίες
Εντομοκτόνα που παρεμβαίνουν στην λειτουργία του νευρικού συστήματος των εντόμων	A. Καρβαμιδικά	1. Αναστολείς της Ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) στις Χολινεργικές συνάψεις	Alanycarb, Aldicarb, Bendiocarb, Benfuracarb, Butocarb, Butocarb, Butoxycarb, Butoxycarb
	B. Οργανοφωσφωρικά		Acephate, Azamethiphos, Azinphos-ethyl, Azinphos-methyl, Cadusafos, Chlorethoxyfos, Chlorfenvinphos, Chlormephos, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Coumaphos, Cyanophos, Diazinon,
	A. Νεονικοτινοειδή	4. Εντομοκτόνα που παρεμβαίνουν στους υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (nAChRs)	Acetamiprid, Clothianidin, Dinotefuran, Imidacloprid, Nitenpyram, Thiacloprid, Thiamethoxam
	B. Νικοτίνη		Nicotine
	Γ. Σουφλοξαμίνες		Sulfoxaflo
	Δ. Βουτενολίδια		Flupyradifurone
	Ε. Μεσοιονικά		Triflumezopyrim

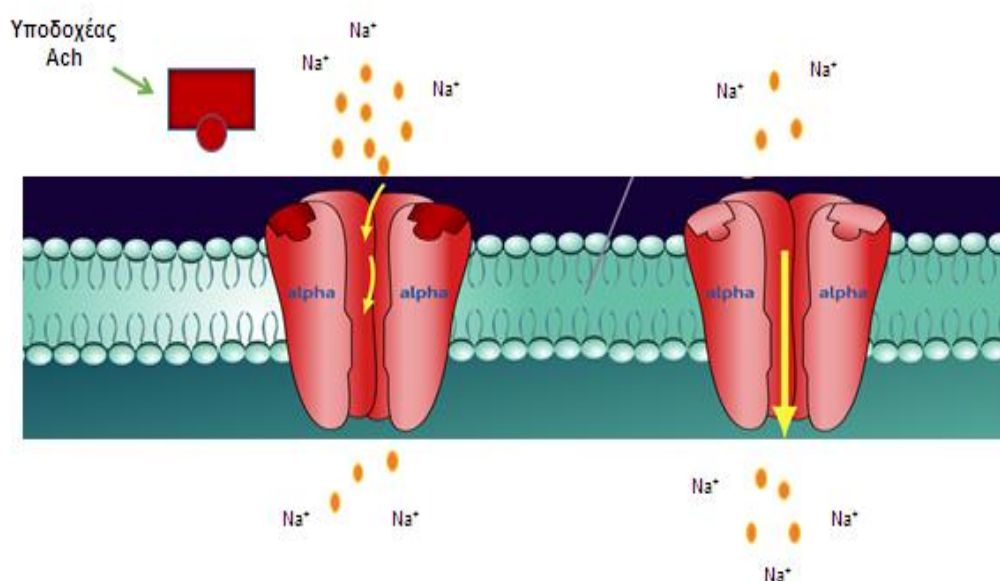
Το diazinon όπως και όλα τα οργανοφωσφωρικά δρα αναστέλλοντας το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (AChE) (**Πίνακας 3**). Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης (ACh) σε χολίνη και οξικό οξύ κατά την μεταφορά του μηνύματος από τον ένα νευρώνα στον άλλο (**Εικόνα 4**). Η αναστολή του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα η ακετυλοχολίνη να παραμένει προσκολλημένη επάνω στους υποδοχείς της προκαλώντας την συνεχή διέγερση των μετασυναπτικών μεμβρανών και παραγωγή δυναμικών ενεργείας γεγονός που προκαλεί την παράλυση του νευρικού συστήματος που οδηγεί στον ακαριαίο θάνατο των εντόμων.



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της ακετυλοχολίνης σε μία χολινεργική σύναψη (τροποποιημένο, <https://www.nature.com/scientificreports>)

Τα νεονικοτινοειδή έχουν διαφορετικό Μ.Δ. από τα οραγανοφωσφωρικά (**Πίνακας 3**). Πιο συγκεκριμένα, δρουν με τη δέσμευση μετασυναπτικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης (nAChRs) στο περιφεριακό σύστημα των εντόμων. Τα νεονικοτινοειδή παρεμβαίνουν στους νικοτινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης. Οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης είναι ligand-gated channels. Δηλαδή είναι αντλίες ή δίοδοι ιόντων νατρίου/καλίου (**Εικόνα 5**). Οι αντλίες αυτές

ανοίγουν λόγω της στερεοχημικής αλλαγής που προκαλείται από το πιάσιμο της ακετυλοχολίνης στους υποδοχείς της. Με την πλήρωση των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης ανοίγουν οι δίοδοι ιόντων νατρίου και έτσι δημιουργείται νέο δυναμικό ενεργείας στην μετασυναπτική μεμβράνη και η μετάδοση του αρχικού σήματος ή μηνύματος συνεχίζεται στο επόμενο νευρικό κύτταρο. Τουλάχιστον δύο μόρια ακετυλοχολίνης απαιτούνται για την ενεργοποίηση των διόδων ιόντων στην μετασυναπτική μεμβράνη.



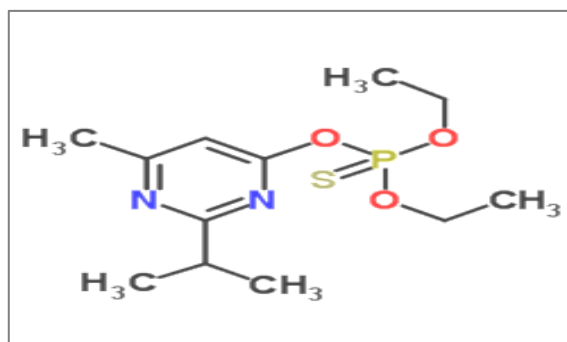
Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης σ το μετασυναπτική μεμβράνη από τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα (τροποποιημένο, <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-6-human-physiology/65-neurons-and-synapses/neurotransmitters.html>)

Τα νεονικοτινοειδή συναγωνίζονται την ακετυλοχολίνη στους υποδοχείς της. Προσκολλόνται επάνω στους υποδοχείς, όπως και η ακετυλοχολίνη, προκαλούν τις ίδιες αλλαγές στην στεροχημεία του υποδοχέα, αλλά αντίθετα με την ακετυλοχολίνη η οποία αμέσως υδρολύεται από την ακετυλοχολινεστεράση, τα νεονικοτινοειδή μένουν πιασμένα στους υποδοχείς προκαλώντας την συνεχή παραγωγή δυναμικών ενεργείας με αποτέλεσμα την παράλυση του νευρικού συστήματος και το θάνατο των εντόμων (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008).

1.3.3.1 Diazinon

Γενικές πληροφορίες-χρήσεις

Το diazinon ανήκει στη μεγαλύτερη ομάδα εντομοκτόνων τα οργανοφωσφορικά. Εισήχθηκε στη γεωργική πρακτική το 1953 με το εμπορικό όνομα Basudin ήταν το πρώτο εντομοκτόνο της υποομάδας των ετεροκυκλικών παραγώγων. Αργότερα κυκλοφόρησαν στην αγορά και άλλα σκευάσματα με τη συγκεκριμένη δ.ο. όπως τα Diazain, Diazate, Diazinox, Gardentox και Spectracide (**Εικόνα 6**). Είναι μη διασυστηματικό εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο επαφής και στομάχου και ασφυκτικό, έχει ευρύ φάσμα δράσης και χρησιμοποιείται για έντομα που έχουν μυζητικού και μασητικού τύπου στοματικά μόρια, όπως είναι ο δάκος, ο πυρηνοτρίτης, η μύγα της μεσογείου, κοκοειδή κ.α) και ακάρεα. Επίσης χρησιμοποιείται εναντίον κατσαρίδων και γενικότερα εντόμων υγειονομικής σημασίας και έχει δράση εναντίον νηματωδών. Έχει χρήση και σαν προστατευτικό σπόρων. Επιπλέον, προϊόντα που περιέχουν τη δ.ο. diazinon χρησιμοποιούνται για την προστασία οικόσιτων ζώων (ίππους, χοίροι, ερίφια, σκύλους) από παράσιτα όπως είναι οι ψύλλοι, οι κρότωνες (τσιμπούρια), οι ψείρες και ασθένειες όπως η σαρκοκοπτική ψώρα (Hadi et al., 2016). Εφαρμόζεται σε μεγάλο εύρος καλλιεργειών όπως ρύζι, σόγια, κρασοστάφυλα, καλαμπόκι, ζαχαροκάλαμα, γεώμηλα, μήλα και πολλά άλλα φρούτα και κηπευτικά.



Εικόνα 6. Χημική δομή της δ.ο. Diazinon

Τοξικότητα στον άνθρωπο, τα ανώτερα ζώα και το περιβάλλον

Το diazinon κατατάσσεται ως μετρίως τοξικό εντομοκτόνο κατηγορίας II (moderate toxic class II, EPA). Τα συμπτώματα που συνδέονται με τη δηλητηρίαση του diazinon στον άνθρωπο περιλαμβάνουν συμπτώματα και των δυο μορφών τοξικότητας. Τα συμπτώματα της οξείας έκθεσης εκδηλώνονται με πόνους στη κοιλιακή χώρα που τελικά μετατρέπονται σε σπασμούς, τάση προς εμετό, ζάλη, εφίδρωση, αυξημένη παραγωγή σάλιου, βραδυκαρδία, πονοκέφαλο και μυδρίαση. Σε πολύ υψηλές δόσεις, η έκθεση μπορεί να επιφέρει πτώση σε κώμα, παράλυση του διαφράγματος, παράλυση του αναπνευστικού κέντρου του εγκεφάλου και τελικά πρόκληση θανάτου από ασφυξία. Όσον αφορά τα συμπτώματα της χρόνιας έκθεσης, μελέτες σε εκτεθειμένους πληθυσμούς, την συνδέουν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα, λευχαιμίας και λεμφώματος (Guyton et al., 2015, Zafiroopoulos et al., 2014, Fritschi et al., 2015). Επιπλέον, μελέτες σε πειραματόζωα αναφέρουν διαταραχές στην λειτουργία των νευρώνων και στη συμπεριφορά τους (Timofeeva et al., 2008), ότι προκαλούν αυξημένα υπατοκυτταρικά καρκινώματα σε ποντίκια και λευχαιμία σε αρουραίους αντίστοιχα (Guyton et al., 2015). Ακόμη, προκαλούν επιπτώσεις και στην αναπαραγωγή των τρωκτικών, σε μελέτη χρόνιας έκθεσης αρουραίων καταγράφηκαν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας νεογνών (EPA 2000) καθώς σε αντίστοιχη μελέτη αρουραίων παρατηρήθηκαν ορμονικές διαταραχές (Gokalp et al., 2005). Τέλος, το εντομοκτόνο αυτό έχει χαρακτηριστεί ως επικίνδυνη ουσία για το περιβάλλον και προκαλεί ατμοσφαιρικούς ρύπους (EPA 2006).

Σύμφωνα με μελέτες το ορφανοφωσφορικό εντομοκτόνο diazinon έχει ανιχνευτεί σε τρόφιμα ευρείας κατανάλωσης όπως είναι το κρέας, το ψωμί, τα σιτηρά, το ρύζι και τα φρούτα (Nougadère et al., 2012, Caldas et al., 2006). Η συγκεκριμένη δ.ο. μαζί με 3 ακόμη εντομοκτόνα ανιχνεύθηκε σε υπόγεια και επιφανειακά νερά στις Η.Π.Α. και σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες (Ελευθεροχωρινός, 1996). Όσον αφορά τη χώρα μας, το diazinon βρέθηκε να υπερβαίνει τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια (maximum residue levels, MRLs), σε δείγματα ελαιόλαδου (Caldas and de Souza, 2000). Σε πρόσφατη μελέτη, η ρύπανση που προκαλείται στα επιφανειακά ύδατα της Ελλάδας από υπολείμματα Φ.Π. προϊόντων λαμβάνοντας υπόψη τα επίπεδα συγκεντρώσεων τους στο περιβάλλον και τις τοξικολογικές τους ιδιότητες. Παρατηρήθηκε ότι το diazinon

ανάμεσα σε τρεις δ.ο. που ανιχνεύθηκαν ήταν η ουσία με την υψηλότερη συγκέντρωση που ανιχνεύθηκε στα επιφανειακά ύδατα (Konstantinou et al., 2006).

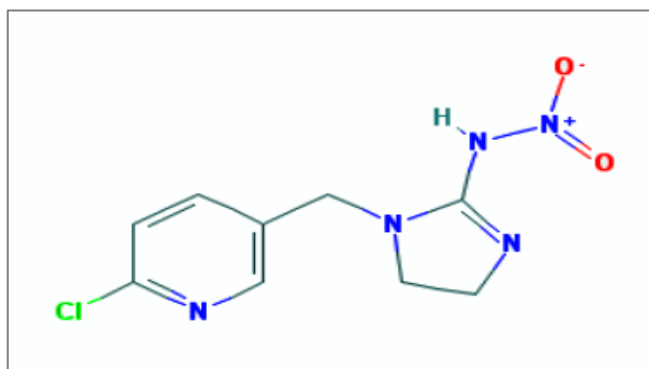
1.3.3.2 Νεονικοτινοειδή

Γενικές πληροφορίες-χρήσεις

Η δομή της νικοτίνης αποτέλεσε το πρότυπο για την ανάπτυξη μιας νέας ομάδας εντομοκτόνων των νεονικοτινοειδών που θεωρείται η πιο σημαντική ομάδα εντομοκτόνων που αναπτύχθηκε κατά την τελευταία τριανταετία. Στην ομάδα των νεονικοτινοειδών υπάγονται οι ενώσεις imidacloprid και clothianidin.

i) Imidacloprid

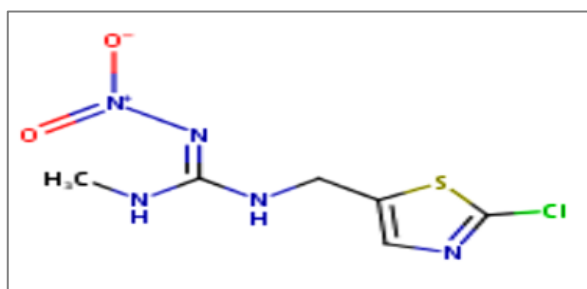
Το imidacloprid ήταν το πρώτο μέλος από της δεύτερης γενιάς των νεονικοτινοειδών που εμφανίστηκε στη γεωργική πρακτική στις αρχές της δεκαετίας του '90 με τα διάφορα εμπορικά ονόματα όπως (Admire, Gaucho, Confidor και Premise) (**Εικόνα 7**). Είναι διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου. Απορροφάται εύκολα από τα φυτά, έχει διελεσματική κίνηση και έχει την ιδιότητα να μετακινείται μέσα στα φυτά αποπλαστικά. Έχει αποτελεσματική δράση εναντίον εντόμων με μυζητικού τύπου στοματικά μόρια όπως αφίδες, θρίπες, αλευρώδεις κ.ά. Ωστόσο, χρησιμοποιείται και σε μερικά έντομα που έχουν μασητικού τύπου στοματικά μόρια όπως για παράδειγμα στο δορυφόρο της πατάτας, καθώς και εναντίον εντόμων εδάφους όπως τερμίτες αλλά και για ψύλλους οικόσιτων ζώων. Έχει ευρεία εφαρμογή σε πολλές καλλιέργειες πυρηνόκαρπων και γιγαρτόκαρπων, σε λαχανικά, ζαχαρότευτλα, βαμβάκι και ρύζι.



Εικόνα 7. Χημική δομή της δ.ο. Imidacloprid

ii) Clothianidin

Η επιτυχία του imidacloprid ώθησε την έρευνα για την εξεύρεση και άλλων μορίων με όμοιο τρόπο δράσης όπως το clothianidin, το οποίο εισήχθηκε στη γεωργική πράξη το 2002 με τα εμπορικά ονόματα (Dantotsu, Poncho) (**Εικόνα 8**) για την καταπολέμηση εντόμων με μυζητικού τύπου στοματικά μόρια όπως αφίδες, αλευρώδεις και μασητικά έντομα στα οπωροφόρα, εσπεριδοειδή και κηπευτικά.



Εικόνα 8. Χημική δομή της δ.ο. Clothianidin

Τοξικότητα στον άνθρωπο, τα ανώτερα ζώα και το περιβάλλον

Τα νεονικοτινοειδή έχουν χαμηλή τοξικότητα στον άνθρωπο και είναι πιο ασφαλές από πολλά οργανοφωσφορικά. Ωστόσο, όπως δείχνουν όλο και περισσότερα επιστημονικά στοιχεία, τα εντομοκτόνα της ομάδας αυτής και κυρίως οι δ.ο. imidacloprid, clothianidin φαίνεται να απειλούν ωφέλιμα έντομα όπως είναι οι μέλισσες οι αγριομέλισσες, οι πεταλούδες και οι βομβίνοι. Σύμφωνα με εργαστηριακές μελέτες που έχουν διεξαχθεί οι επιπτώσεις στους επικονιαστές από την έκθεση στα νεονικοτινοειδή σχετίζονται με αλλαγές στη φυσιολογία, τη μνήμη, τη μάθηση και τη συμπεριφορά. Αντίστοιχες μελέτες δείχνουν τόσο η οξεία όσο και η χρόνια έκθεση στα νεονικοτινοειδή, επηρεάζει την ικανότητα πτήσης των μελισσών, με αποτέλεσμα να πετούν με ασταθείς, αποπροσανατολισμένους ρυθμούς και πολλές φορές αδυνατούν να επιστρέψουν πίσω στην κυψέλη.

Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να έχει επηρεάσει και τη χώρα μας καθώς μεγάλες απώλειες μελισσών από δηλητηριάσεις καταγράφηκαν στην Κεντρική και κυρίως στη Νότια Ελλάδα από τη χρήση των νεονικοτινοειδών (clothianidin, imidacloprid, thiametoxam) στους φοίνικες (Bacandritsos et al., 2010). Επίσης, στην Αττική σημειώθηκαν μεγάλες απώλειες μελισσιών κατά του θερινούς μήνες το 2011 και

2012 (Χαριζάνης, 2014). Πρόσφατα σε νέα έρευνα βρέθηκαν υπολείματα και των πέντε νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων (acetamiprid, clothianidin, imidacloprid, thiacloprid, και thiamethoxam) στο μέλι. Αναλυτικότερα, αναλύθηκαν 198 δείγματα μελιού από όλο το κόσμο ως προς τις δ.ο. και βρέθηκαν υπολείματα μιας από τις παραπάνω ουσίες τουλάχιστον στο 75% των δειγμάτων, το 45% των δειγμάτων περιείχαν δύο ή περισσότερες από αυτές τις ουσίες και το 10% περιείχε τις τέσσεραες ή όλες τις ουσίες. (Mitchell et al., 2017).

Η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων EFSA (Authority, 2015) δημοσίευσε στοιχεία για την αξιολόγηση κινδύνου για τις μέλισσες για τις τρεις δ.ο. (clothianidin, thiamethoxam και imidacloprid). Σύμφωνα με το Κανονισμό (ΕΕ) αριθμ. 485/2013 η χρήση των δ. ο. (clothianidin, thiamethoxam και imidacloprid) απαγορεύτηκε στις καλλιέργειες που προσελκύουν τις μέλισσες. Επίσης, ο Κανονισμός απαγόρευσε τη χρήση των συγκεκριμένων εντομοκτόνων ως επικάλυψη των σπόρων (στο έδαφος ή στα φυλλώματα) για τις ακόλουθες καλλιέργειες: καλαμπόκι, ελαιοκράμβη, σόγια, κριθάρι, κεχρί, βρώμη, ρύζι, σίκαλη, σόργο και σιτάρι. Σήμερα τα εντομοκτόνα αυτά βρίσκονται στο επίκεντρο του επιστημονικού ενδιαφέροντος και εξετάζονται αν θα συνεχίσουν να έχουν έγκριση κυκλοφορίας στην αγορά και αν η χρήση του θα εφαρμόζεται εκτενώς σε όλες τις καλλιέργειες στο μέλλον.

Πίνακας 4. Τοξικότητες σε διάφορους οργανισμούς

Ουσίες	Θηλαστικά			Ποντίκια	Αρουραίοι	Πουλιά	Ψάρια	Μέλισσα
	Acute oral LD ₅₀ (mg/kg)	NOAEL (mg/kg day)	Καρκινο- /γένεση (mg/kg)	Acute oral LD ₅₀ (mg/kg)	Acute oral LD ₅₀ (mg/kg)	Acute oral LD ₅₀ (mg/kg)	LC50 (ppm)	LD50 (μg)
Clothianidin	475	5,7	Όχι	425	4250-5000	37	211	0,0179
Imidacloprid	450	9,8	Όχι	150	3044-5000	31	237	0,0218

Πηγές: (Tomizawa and Casida, 2005, Tomlin, 2009)

1.4 Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδραστικότητα και τοξικότητα των δραστικών ουσιών

Εκτός από το Μ.Δ. υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδραστικότητα και τη τοξικότητα των δ.ο. Ο κύριος παράγοντας εκδήλωσης της τοξικότητας είναι η δόση, γνωστή η ρήση του Παράκελσου «*η δόση κάνει το δηλητήριο*». Ένας άλλος παράγοντας είναι το ίδιο το χαρακτηριστικό της κάθε ουσίας ώστε να έχει μεγάλη ή μικρή τοξικότητα. Ο μεταβολισμός, συνήθως οι μεταβολίτες είναι λιγότερο τοξικοί διότι είναι πιο υδατοδιαλυτοί και απεκκρίνονται γρηγορότερα. Οι αντιδράσεις ξеноβιοτικών παραγόντων μεταξύ τους και με τα συστατικά των κυττάρων

Οι βιοδραστικές ουσίες μπορεί να δράσουν με διάφορους τρόπους:

- i. Αθροιστικά αυτή είναι η πιο συνήθης κατάσταση.
- ii. Συνεργιστικά η μία ουσία να επαυξήσει την δράση της άλλης
- iii. Ανταγωνιστικά η μια ουσία να εξουδετερώσει, σε μεγάλο ή μικρό βαθμό, τη δράση της άλλης.
- iv. Εθιστικά όταν δυο οι περισσότερες ξеноβιοτικές ουσίες χορηγούνται μαζί, ή μια ή περισσότερες από αυτές, να διεγείρουν τους μηχανισμούς αποτοξίνωσης των υπολοίπων. Το πρόγραμμα δοσολογίας: χαρακτηριστικό παράδειγμα όταν μια δόση προσλαμβάνεται από το στόμα, με άδειο στομάχι, απορροφάται πιο γρήγορα παρά όταν ή ίδια δόση δίνεται σε μερικώς γεμάτο στομάχι. Η λήψη μιας δόσης καθημερινά καλά αναμειγμένης με τη τροφή είναι λιγότερο επικίνδυνη παρά όταν η ίδια δόση λαμβάνεται καθημερινά μόνη της. Μια ουσία φτάνει σε μικρότερη συγκέντρωση στο αίμα και στους άλλους ιστούς όταν η ίδια δόση δίδεται κατά τη διάρκεια της ημέρας παρά συμπυκνωμένη σε σύντομο χρονικό διάστημα.
- v. Οι μηχανισμοί αποτοξίνωσης και απέκκρισης μπορούν να ανταπεξέλθουν μικρές συγκεντρώσεις σε μεγάλο χρονικό διάστημα παρά μεγάλες σε μικρό χρονικό διάστημα. Τρόπος ή οδός λήξης: οι ξеноβιοτικές ουσίες συνήθως είναι πιο τοξικές όταν λαμβάνονται από το στόμα παρά το δέρμα και πολύ πιο τοξικές όταν λαμβάνονται δια της αναπνοής μέσω των πνευμόνων. Είδη ζώων: (ξενιστές – παράσιτα), αρκετά Φ.Π. χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των ζώων. Τα

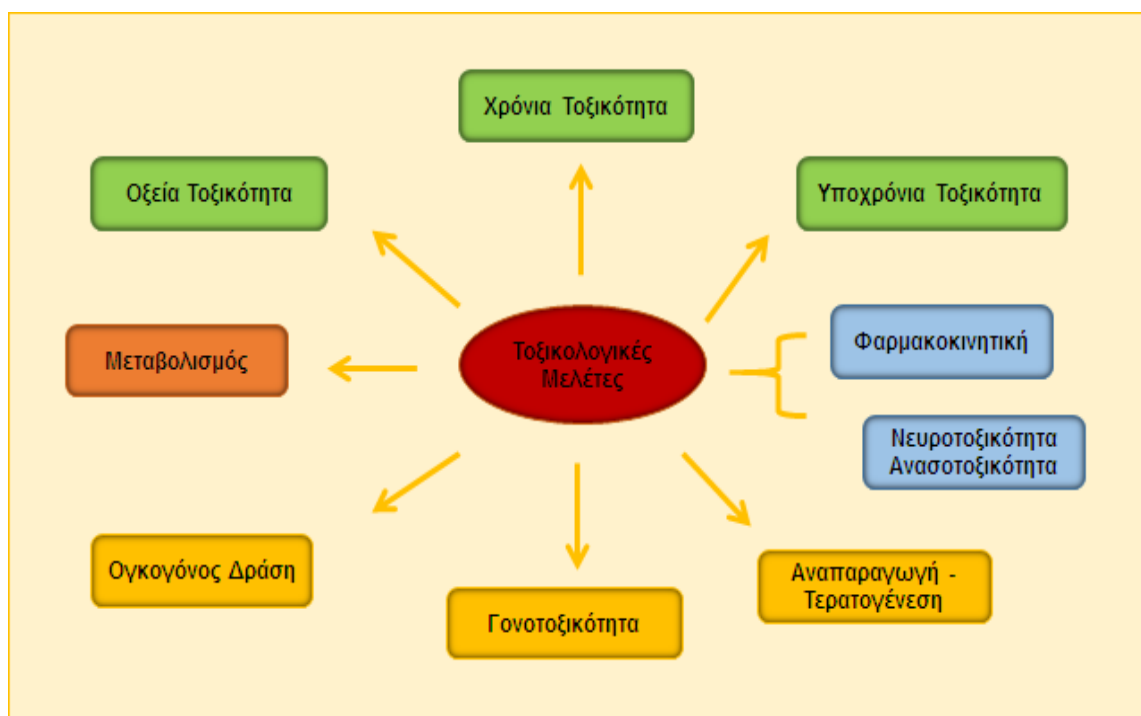
περισσότερα από τα φάρμακα αυτά είναι διασυστηματικά ζώων. Η δόση της ουσίας που είναι αποτελεσματική εναντίον των παρασίτων δεν προκαλεί τοξικά φαινόμενα στους ξενιστές.

- vi. Άλλες διαφορές: διαφορές μεταξύ φύλων, ατομικές διαφορές, διαφορές φυλών και ηλικίας πειραματόζωων, επίπεδο διατροφής και σύσταση τροφής, αν και κατά πόσον τα πειραματόζωα βρίσκονται απομονωμένα ή συνωστισμένα, ασθένειες, θερμοκρασία, ατμοσφαιρική πίεση και υψόμετρο, παρουσία φωτός και άλλες ακτινοβολίες, βιολογικό ρολόι των ζώων. Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση και ένταση της βιολογικής δράσης των ξενοβιοτικών ουσιών (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008).

1.5 Μέθοδοι αξιολόγησης τοξικότητας βιοδραστικών ουσιών

Για την αξιολόγηση της επικινδυνότητας της τοξικότητας των βιοδραστικών ουσιών στον άνθρωπο και τα άλλα ανώτερα ζώα διενεργείται ένα ευρύ φάσμα τοξικολογικών μελετών (**Εικόνα 9**), οι οποίες είναι πολύ δαπανηρές και αποτελούν ένα πολύ σημαντικό ποσοστό του συνολικού κόστους ανάπτυξης ενός Φ.Π. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ως πειραματόζωα κυρίως ποντίκια, αρουραίοι, κουνέλια, πτηνά, σκύλοι και πίθηκοι. Οι ουσίες συνήθως χορηγούνται με την τροφή, ενδοφλέβια ή απευθείας στο στομάχι. Στα πειράματα αυτά αξιολογούνται οι επιπτώσεις σε διάφορα όργανα (νεφρά, ήπαρ, καρδιά, οφθαλμοί, αδένες, νευρικό και πεπτικό σύστημα κ.α.), στην αναπαραγωγή αλλά και στις επόμενες γενεές. Επίσης, μελέτες έχουν διεξαχθεί σε κύτταρα *in vitro* για να μελετήσουν τη γονιδιατοξικότητα και να προσδιορίσουν καρκινογόνο ή μεταλλαξιογόνο δράση σε κύτταρα (Kirkland et al., 2014). Αντίστοιχες, μελέτες τοξικότητας έχουν διεξαχθεί σε υδρόβιους οργανισμούς όπως τα οστρακόδερμα *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Lemna minor* και *Potamogeton pectinatus* (Hartman and Martin, 1985, Solomon et al., 1996, Fernández-Alba et al., 2001), (Olette et al., 2008). Επιστήμονες έχουν μελετήσει τις δυνητικά δυσμενείς επιπτώσεις των Φ.Π. και των ρύπων που μπορεί να προκαλούν στα ψάρια και εξέτασαν ταυτόχρονα τους περιβαλλοντικούς κινδύνους που ελλοχεύουν σε γλυκά ύδατα και θαλάσσιους οργανισμούς (Murthy et al., 2013).

Πλέον, για λόγους κόστους, χρόνου και για να αποφεύγεται η θανάτωση πειραματόζωνων, απαιτούνται νέες μέθοδοι υψηλής ρυθμό-απόδοσης για την αξιολόγηση της τοξικότητας δ.ο. Μια τέτοια προσέγγιση θα μπορούσε να αποτελέσει η χρήση «ομικών» μεθόδων σε συνδυασμό με πρότυπα βιολογικά συστήματα όπως είναι τα κύτταρα.



Εικόνα 9. Απαιτούμενα τοξικολογικά δεδομένα για την εκτίμηση του κινδύνου τοξικότητας (hazard risk assessment) (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010)

1.6 Βλαστικά κύτταρα (Stem Cells)

Κατά το 19^ο αιώνα, ο Rudolph Virchow διατύπωσε τη θεωρία ότι όλοι οι ιστοί των θηλαστικών αποτελούνται από κύτταρα. Το κύτταρο αποτελεί τη βασική δομική και λειτουργική μονάδα των οργανισμών, δηλαδή είναι η μικρότερη μονάδα που αν απομονωθεί έχει την ιδιότητα να διατηρεί τα βασικά χαρακτηριστικά που εμφανίζουν οι μορφές ζωής.

Στα θηλαστικά, εκτιμάται ότι υπάρχουν πάνω από 200 τύποι κυττάρων που επιτελούν διάφορες λειτουργίες: τα ερυθρά αιμοσφαίρια μεταφέρουν το οξυγόνο, τα νευρικά κύτταρα μεταφέρουν μηνύματα και τα μυϊκά κύτταρα βοηθούν στην

κίνηση. Τα κύτταρα που έχουν παρόμοια μορφή και λειτουργία συνήθως συνδέονται και αποτελούν έναν ιστό. Τα κύτταρα που επιτρέπουν την αναγέννηση ιστών ονομάζονται βλαστοκύτταρα. Ανακαλύφθηκαν από τους Καναδούς ερευνητές Ernest McCulloch και James Till, πραγματοποιώντας πειράματα με ποντίκια (Becker et al., 1963, Till, 1961). Έκτοτε, τα βλαστικά κύτταρα βρίσκονται στο επίκεντρο του επιστημονικού και ιατρικού ενδιαφέροντος. Μια από τις ευρείες εφαρμογές τους σήμερα είναι η μελέτη τοξικότητας φαρμάκων.

Με τον όρο **βλαστικό κύτταρο (stem cells)** περιγράφουμε ένα σύνολο από ανώριμα κύτταρα, τα οποία έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε έναν ή περισσότερους κυτταρικούς τύπους, καθώς και να διατηρούν ένα απόθεμα ανώριμων βλαστικών κυττάρων, μέσω αυτό-ανανεωτικών και ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων (Krtolica, 2005, Weissman, 2000).

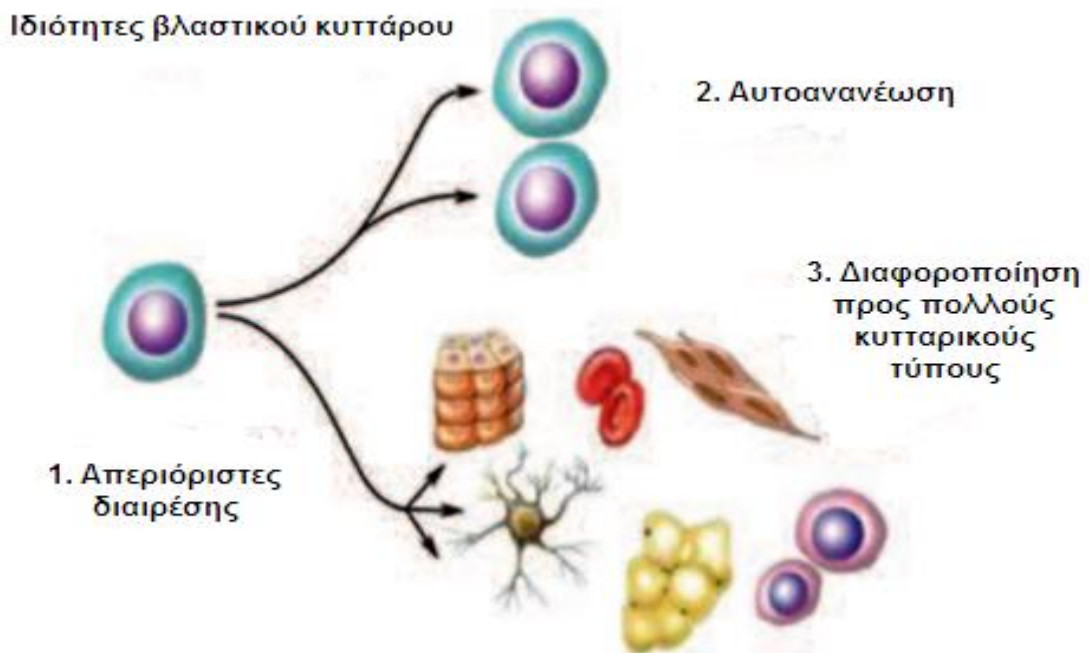
1.7 Ιδιότητες βλαστικών κυττάρων

Τα βλαστικά κύτταρα ως αρχέγονα κύτταρα φέρουν διάφορα βασικά χαρακτηριστικά που τα διαφοροποιούν από άλλα κύτταρα θηλαστικών. Αυτά είναι τα εξής (**Εικόνα 10**).

Πρώτον, έχουν την ικανότητα **αυτό-ανανέωσης (self-renewal)**. Αυτό σημαίνει πως όταν ένα βλαστικό κύτταρο περάσει στη φάση της μιτωτικής διαίρεσης, έχει να επιλέξει μεταξύ τριών τύπων μιτωτικών διαιρέσεων:

- i. **Διαίρεση αντιγραφής (replicating division)** στην οποία και τα δύο θυγατρικά κύτταρα διατηρούν τις ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων.
- ii. **Διαίρεση διαφοροποίησης (differentiating division)** στην οποία και τα δύο θυγατρικά κύτταρα είναι περισσότερο δεσμευμένα σε κάποια κυτταρική σειρά.
- iii. **Ασύμμετρη διαίρεση (asymmetric division)** στην οποία το ένα θυγατρικό κύτταρο είναι πανομοιότυπο με τον εαυτό του ενώ το άλλο οδηγείται σε διαφοροποίηση και μεταφέρεται στον ανάλογο ιστό ή όργανο (Morrison et al., 1997).

Δεύτερον, το κύτταρο θα πρέπει να έχει την ικανότητά να εξειδικεύεται ή να διαφοροποιείται σε πολλούς άλλους κυτταρικούς τύπους (**δυναμικό διαφοροποίησης**).



Εικόνα 10. Βασικά χαρακτηριστικά του βλαστικού κυττάρου. Το βλαστικό κύτταρο έχει την ικανότητα να αυτο-ανανεώνεται, να διαφοροποιείται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του ιστού και να υφίσταται πολλές διαιρέσεις (Πηγή: <https://www.nationalacademies.org/stemcells>. Academic noncommercial use is permitted)

Ανάλογα με το δυναμικό διαφοροποίησής τους, διακρίνονται διαφορετικοί τύποι βλαστικών κυττάρων (**Πίνακας 5**):

- **Παντοδύναμα (Totipotent)** βλαστικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε εμβρυικούς και εξωεμβρυικούς τύπους κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να δημιουργήσουν ένα ζωντανό οργανισμό.
- **Ολοδύναμα (Pluripotent)** βλαστικά κύτταρα είναι απόγονοι των παντοδύναμων κυττάρων και μπορούν να διαφοροποιηθούν σχεδόν σε όλα τα κύτταρα που προέρχονται από τις τρεις βλαστικές στιβάδες (το εξώδερμα, το ενδόδερμα, και το μεσόδερμα).
- **Πολυδύναμα (Multipotent)** βλαστικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα της αυτο-ανανέωσης, αλλά η ικανότητα διαφοροποίησής τους είναι περιορισμένη. Μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα πολύ σχετιζόμενων οικογενειακών κυττάρων και να ωριμάσουν σε κύτταρα του ιστού ή του οργάνου από το οποίο προέρχονται. Βασικός τους ρόλος είναι

να τα συντηρούν και να τα επιδιορθώνουν βλάβες που επέρχονται στα κύτταρα.

- **Ολιγοδύναμα (Oligopotent)** βλαστικά κύτταρα που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε δύο ή περισσότερες κυτταρικές σειρές που ανήκουν όμως σε ένα συγκεκριμένο είδος ιστού όπως λεμφοειδή ή μυελοειδή βλαστικά κύτταρα.
- **Μονοδύναμα (Unipotent)** βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται τα κύτταρα που είναι ικανά να εξελιχθούν μόνο σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, αλλά διατηρούν τη βασική ιδιότητα να αυτό-ανανεώνονται για μεγάλο χρονικό διάστημα (Schöler, 2016).

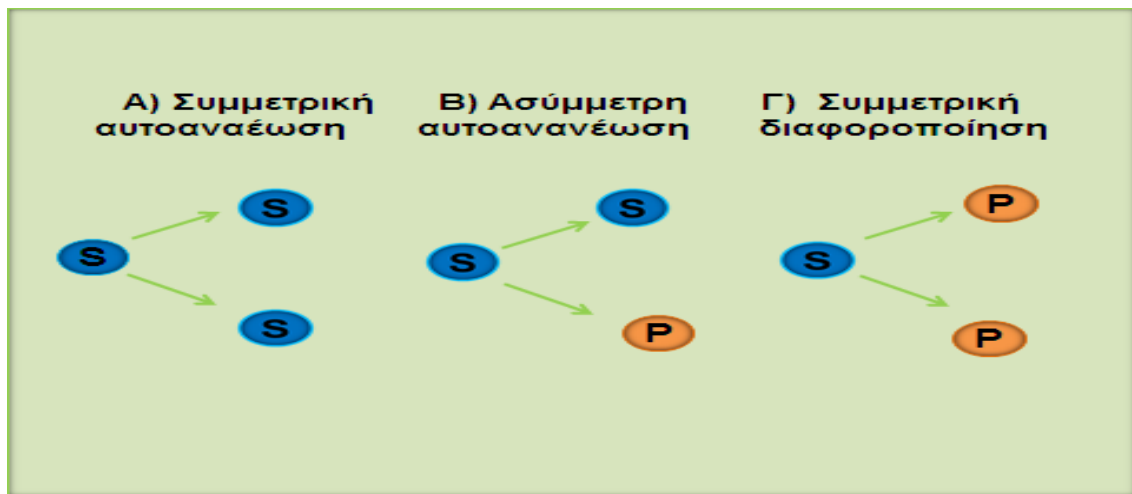
Πίνακας 5. Ταξινόμηση των βλαστικών κυττάρων, με βάση το δυναμικό διαφοροποίηση και την προέλευση τους (Kolios and Moodley, 2013)

Δυναμικό Διαφοροποίησης	Προέλευση
Παντοδύναμα	Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα
Ολοδύναμα	
Πολυδύναμα	
Ολιγοδύναμα	Ενήλικα ή σωματικά βλαστικά κύτταρα
Μονοδύναμα	

1.7.1 Διαίρεση των βλαστικών κυττάρων

Τα βλαστικά κύτταρα έχουν δύο βασικές χαρακτηριστικές ιδιότητες, την ιδιότητα να δημιουργούν νέα βλαστικά κύτταρα (**αυτοανανέωση**) και την ιδιότητα να παράγουν κύτταρα ικανά να **διαφοροποιούνται**. Για να επιτελέσουν τις δύο αυτές λειτουργίες ακολουθούν μια στρατηγική **ασύμμετρης διαίρεσης**. Η διαίρεση αυτή αποτελεί μοναδικό χαρακτηριστικό των βλαστικών κυττάρων αλλά δεν είναι η μοναδική στρατηγική αυτοανανέωσης των κυττάρων. Τα βλαστικά κύτταρα υφίσταται και **συμμετρικές διαιρέσεις** ως μέσο δυναμικού ελέγχου του αριθμού τους, ανάλογα ιστικές ανάγκες που προκύπτουν (Morrison et al., 1997).

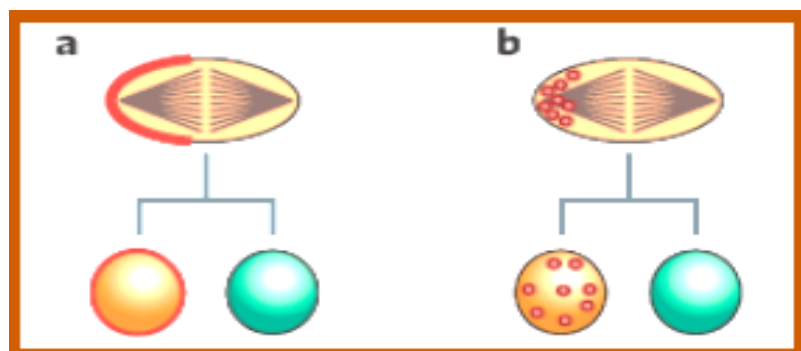
Επομένως, τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να επιτελέσουν μόνο συμμετρικές διαιρέσεις ή να εφαρμόσουν συνδυασμό ασύμμετρων και συμμετρικών διαιρέσεων (**Εικόνα 11**).



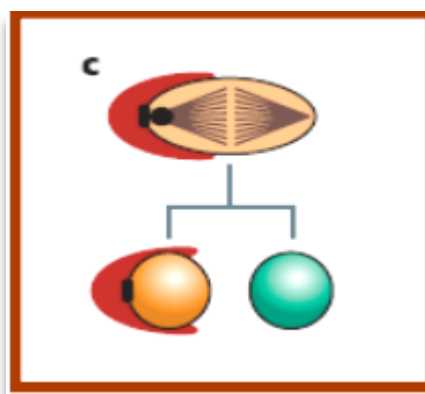
Εικόνα 11. **A)** συμμετρική αυτοανανέωση όταν ένα βλαστοκύτταρο διαιρείται σε δύο βλαστικά κύτταρα. **B)** ασύμμετρη διαίρεση, όταν χωρίζει σε ένα προγονικό κύτταρο και ένα βλαστικό κύτταρο. **Γ)** συμμετρική διαφοροποίηση, όταν το κύτταρο διαιρείται σε δύο προγόνους

1.7.1.1 Ασύμμετρη διαίρεση

Με τον όρο ασύμμετρη διαίρεση περιγράφεται η διαδικασία κατά την οποία ένα θυγατρικό κύτταρο είναι πανομοιότυπο με τον εαυτό του ενώ το άλλο οδηγείται σε διαφοροποίηση. Ελέγχεται από δυο τυπικούς μηχανισμούς: Η πρώτη μορφή διαίρεσης στηρίζεται στον ασύμμετρο καταμερισμό στοιχείων που καθορίζουν την κυτταρική μοίρα, όπως παράγοντες κυτταρικής πολικότητας, και ονομάζεται εσωτερικός μηχανισμός ασύμμετρης διαίρεσης (**Εικόνα 12**). Η δεύτερη μορφή διαίρεσης περιλαμβάνει την ασύμμετρη τοποθέτηση των θυγατρικών κυττάρων σε σχέση με εξωτερικά ερεθίσματα και ονομάζεται εξωτερικός μηχανισμός ασύμμετρης διαίρεσης. Σε αυτή τη μορφή διαίρεσης, η μόνη διαφορά μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων είναι η θέση των θυγατρικών κυττάρων στη φωλέα. Με αποτέλεσμα στην αρχική να έχουν ίδιο αναπτυξιακό δυναμικό και να καταλήγουν σε διαφορετικούς δρόμους ανάπτυξης λόγω έκθεσης σε διαφορετικά εξωτερικά ερεθίσματα (Potten and Loeffler, 1990) (**Εικόνα 13**).



Εικόνα 12. Εσωτερικός μηχανισμός συμμετρικής διαίρεσης: ασύμμετρος καταμερισμός ρυθμιστών κυτταρικής πολικότητας (κόκκινο) (**A**) και ασύμμετρος καταμερισμός στοιχείων που καθορίζουν την κυτταρική μοίρα (**B**) (Πηγή: <https://www.nature.com/>)



Εικόνα 13. Εξωτερικός μηχανισμός ασύμμετρης διαίρεσης. Ρυθμισμένος προσανατολισμός της μιτωτικής ατράκτου συγκρατεί μόνο το ένα από τα θυγατρικά κύτταρα στη φωλεά ώστε μόνο αυτό να έχει πρόσβαση σε σήματα απαραίτητα για τη διατήρηση της ταυτότητας του λαστικού κυττάρου ενώ το άλλο εκτίθεται σε σήματα που προάγουν τη διαφοροποίησή του (Πηγή: <https://www.nature.com/>)

1.7.1.2 Συμμετρική διαίρεση

Με τον όρο συμμετρική διαίρεση περιγράφεται η διαδικασία όπου και τα δύο θυγατρικά κύτταρα είτε διατηρούν τις ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων είτε είναι περισσότερο διαφοροποιημένα. Δεν χάνουν τις ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων.

Συμμετρικές διαιρέσεις επιτελούνται κατά την ανάπτυξη του οργανισμού και κατά την αποκατάσταση και αναγέννηση ιστών μετά από βλάβη. Στα θηλαστικά τα βλαστικά κύτταρα φαίνεται να διαιρούνται συμμετρικά προκειμένου να επεκτείνουν τον πληθυσμό τους κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα των ποντικών διπλασιάζονται σε αριθμό κάθε μέρα κατά διάρκεια της κύησης τους, γεγονός που δείχνει πως τουλάχιστον κάποιο κλάσμα των κυττάρων αυτών κάνει συμμετρικές διαιρέσεις αυτοανανέωσης.

Αντίστοιχη λειτουργία ακολουθούν και τα αδιαφοροποίητα νευρικά προγονικά κύτταρα στον αναπτυσσόμενο εγκεφαλικό φλοιό των τρωκτικών, καθώς τα προγονικά κύτταρα της βασικής στιβάδας του δέρματος φαίνεται να αυξάνουν σημαντικά τον αριθμό τους πριν παράγουν πιο διαφοροποιημένα κύτταρα. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να ακολουθήσουν και άλλες μελέτες που να περιγράφουν με πιο ολοκληρωμένο τον τρόπο με τον οποίο επιτελείται η συμμετρική διαίρεση στα θηλαστικά (Potten and Loeffler, 1990).

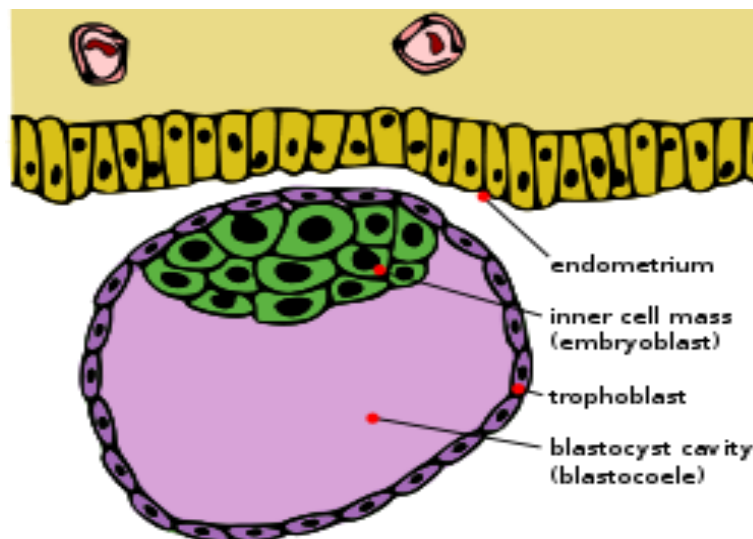
1.7.2 Τύποι βλαστικών κυττάρων

Δύο τύποι βλαστικών κυττάρων απαντώνται στα θηλαστικά (Fortier, 2005): Ο πρώτος τύπος είναι τα **εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (embryonic stem cells, ESCs)** τα οποία προέρχονται κατά τη γέννηση. Αυτά είναι παντοδύναμα και στο στάδιο της βλαστοκύστης γίνονται ολοδύναμα και θα αποτελέσουν αφορμή για το έμβρυο μελλοντικά. Ο δεύτερος τύπος είναι τα **ενήλικα βλαστικά κύτταρα (adult stem cells)** που βρίσκονται σε όλα τα όργανα και τους ιστούς των θηλαστικών. Αυτά είναι ολιγοδύναμα και στη συνέχεια, γίνονται μονοδύναμα. Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα είναι σημαντικά για την ανάπτυξη, επούλωση και αντικατάσταση των κυττάρων που έχουν καταστραφεί ή υποστεί κακώσεις (Porada et al., 2006).

1.7.2.1 Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (**embryonic stem cell, ESCs**) προέρχονται από τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ζωής, από τον αρχέγονο σχηματισμό, που λέγεται

βλαστοκύστη (**blastocyst**) (Evans and Kaufman, 1981). Η βλαστοκύστη έχει δύο κυτταρικά στρώματα, την εσωτερική κυτταρική μάζα (**inner cell mass-ICM**), η οποία θα σχηματίσει το έμβρυο, και την εξωτερική κυτταρική μάζα, που ονομάζεται τροφοβλάστης (**trophoblast**), που θα σχηματίσει στη συνέχεια τον πλακούντα (**Εικόνα 14**). Τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα θεωρούνται ολοδύναμα έχουν δηλαδή, την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε όλα τα είδη των σωματικών κυττάρων και να μπορούν να διαιρούνται συνεχώς παράγοντας θυγατρικά κύτταρα (Fuchs and Segre, 2000). Η χρήση τους είναι σημαντική στην επιστήμη καθώς, τα κύτταρα αυτά αποτελούν τα πιο σημαντικά εργαλεία για την κατανόηση της λειτουργίας των γονιδίων με τη βοήθεια της γενετικής χειραγώγησης. Τέλος, έρευνες έχουν δείξει ότι τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα είναι αξιόπιστη πηγή για την ανάπτυξη τοξικολογικών μελετών *in vitro* (Genschow et al., 2000). Αντίστοιχα, σε *in vivo* μελέτες, η δοκιμή εμβρυικών βλαστικών κυττάρων είναι εξαιρετικά ακριβής στην πρόβλεψη κυτταρικής τοξικότητας (Scholz et al., 1999).



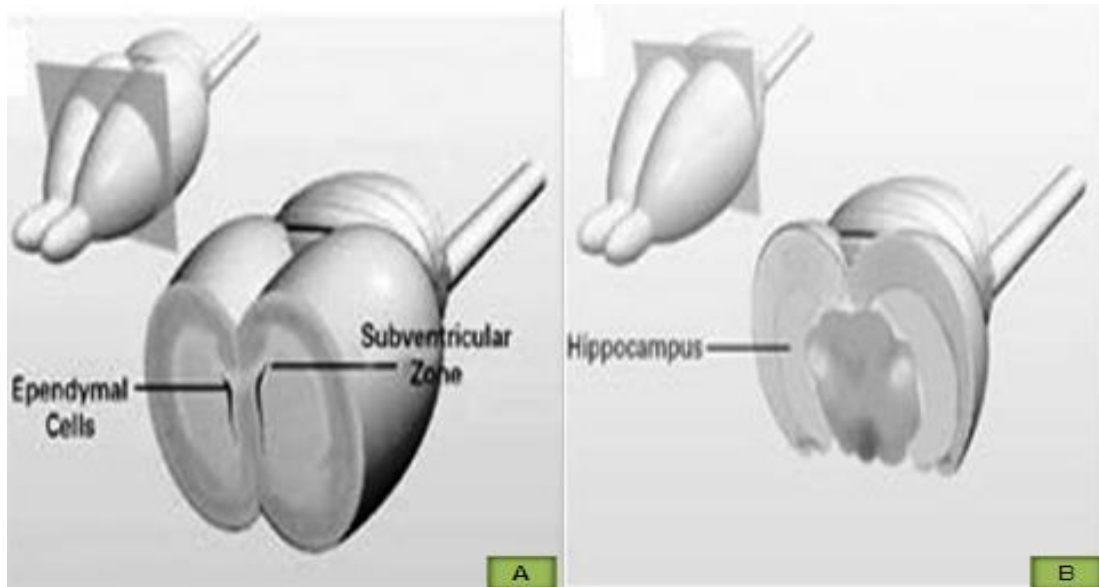
Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση του εμβρύου των θηλαστικών κατά το στάδιο της βλαστοκύστης: εσωτερική κυτταρική μάζα (**Inner Cell Mass-ICM**) και την εξωτερική κυτταρική μάζα που ονομάζεται τροφοβλάστης (**Blastocyst**) (Πηγή: <https://www.wikipedia.org/>)

1.7.2.2 Ενήλικα βλαστικά κύτταρα

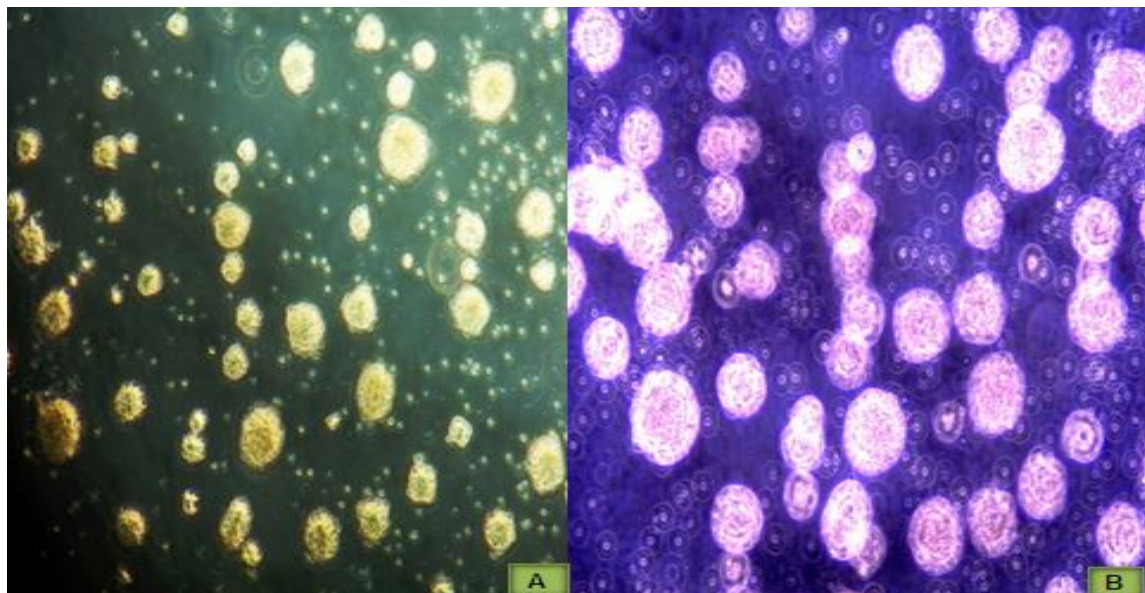
Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα (**adult stem cells**) συμβάλλουν στην αναγέννηση των ιστών και προέρχονται από διάφορους ιστούς όπως μυελό των οστών, δέρμα,

καρδιά, εγκέφαλο, ήπαρ και το επιθήλιο του εντέρου. Η μορφολογία και τα χαρακτηριστικά τους διαφέρουν ανάλογα με τον ιστό προέλευσης τους. Αυτά παράγονται κατά την οντογένεση και παραμένουν σε εξειδικευμένες περιοχές στα όργανα σε ήρεμη κατάσταση για αρκετό χρονικό διάστημα. Διαθέτουν, όπως και τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα απεριόριστη ικανότητα αύξησης και αυξημένη δραστηριότητα τελομεράσης. Γενικότερα, έχουν πιο περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης παράγοντας πιο περιορισμένο αριθμό προγονικών κυττάρων. Επίσης, υπόκεινται πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση κατόπιν μεταβολών στο μικρό περιβάλλον τους σε πλέον ώριμους και ιστο-ειδικούς κυτταρικούς τύπους. Δηλαδή, ενεργοποιούνται όταν υπάρχει ανάγκη κυτταρικής ανανέωσης του ιστού σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις.

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα ενήλικα νευρικά βλαστικά κύτταρα υπάρχουν σε συγκεκριμένες περιοχές του ΚΝΣ των θηλαστικών και υποβάλλονται σε μια μέτρια, αλλά συνεχή νευρογένεση μετά τη γέννηση και σε όλη την ενήλικη ζωή τους. Η νευρογένεση εμφανίζεται σε δύο κύριες περιοχές του εγκεφάλου: στην υποκοιλιακή ζώνη (**subventricular zone-SVZ**) (*Εικόνα 15A*) δίπλα στις πλευρικές κοιλίες και στην ενήλικη υποκοιλιακή ζώνη (**subgranular zone- SGZ**) εντός της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου (*Εικόνα 15B*). Η SVZ αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα διαιρούμενων κυττάρων που εκτείνεται κατά μήκος της επενδυματικής κυτταρικής στιβάδας. Η στιβάδα αυτή διαχωρίζει την κοιλιακή περιοχή από το SVZ. Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν *in vitro* με αυξητικούς παράγοντες σε προσκολλημένες ή μη προσκολλημένες καλλιέργειες που ονομάζονται νευροσφαίρες (Gage et al., 1995) (*Εικόνα 16 A & B*).



Εικόνα 15 A & B. Νευρογενείς περιοχές του ΚΝΣ των ενήλικων θηλαστικών.α) στην υποκοιλιακή ζώνη (**subventricular zone–SVZ**) δίπλα στις πλευρικές κοιλίες και β) στην ενήλικη υποκοιλιακή ζώνη (**subgranular zone- SGZ**) εντός της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου (Πηγή: <https://www.nature.com/articles/nrc1889/figures/1>)



Εικόνα 16 A & B. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο απεικονίζουν τα νευρικά βλαστικά κύτταρα που σχηματίζουν νευροσφαίρες

1.7.2.3 Διαφορές μεταξύ εμβρυικών και ενήλικων κυττάρων

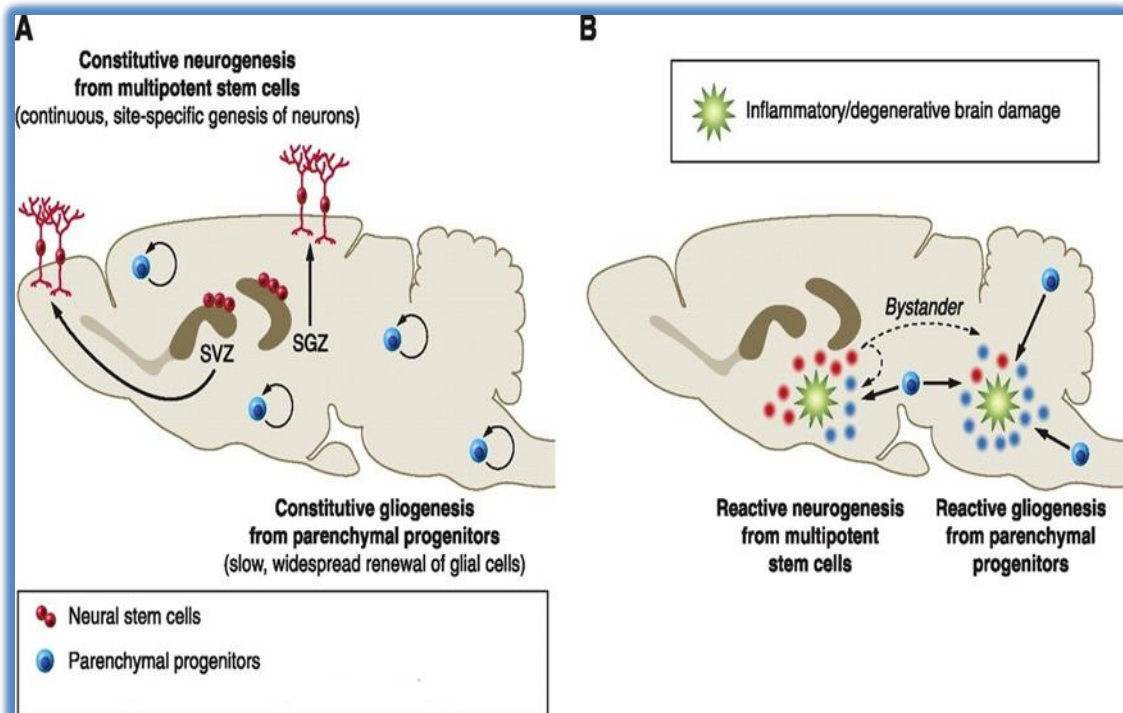
Οι βασικές διαφορές των εμβρυικών και ενήλικων βλαστικών κυττάρων παρατίθενται στον **Πίνακα 6**.

Πίνακας 6. Διαφορές μεταξύ εμβρυικών και ενήλικων κυττάρων

	Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα	Ενήλικα βλαστικά κύτταρα
	Μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους	Μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα του ιστού από τον οποίο προέρχονται
Ιδιότητες	Έχουν μικρότερους κύκλους κυτταρικής διαίρεσης	Έχουν μεγαλύτερους κύκλους κυτταρικής διαίρεσης
	Τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας υπάρχουν για περιορισμένο χρονικό διάστημα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης	Τα περισσότερα ενήλικα βλαστικά κύτταρα παραμένουν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού

1.8 Νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs)

Τα τελευταία χρόνια έχει ανακαλυφθεί η παρουσία αρχέγονων κυττάρων (**neural stem cells**) καθώς και **προδρομικών κυττάρων (glial progenitor cells)** στον εγκέφαλο των ενήλικων θηλαστικών. Τα αρχέγονα νευρικά κύτταρα εντοπίζονται στην **υποκοιλιακή ζώνη (subventricular zone– SVZ)** της τρίτης κοιλίας και των πλαγίων κοιλιών και στην ενήλικη υποκοιλιακή ζώνη (**subgranular zone- SGZ**) εντός της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου (Bond et al., 2015). Αντίθετα, τα προδρομικά γλοιακά κύτταρα είναι διάσπαρτα κυρίως στη λευκή αλλά και στη φαιά ουσία (**Εικόνα 17**).

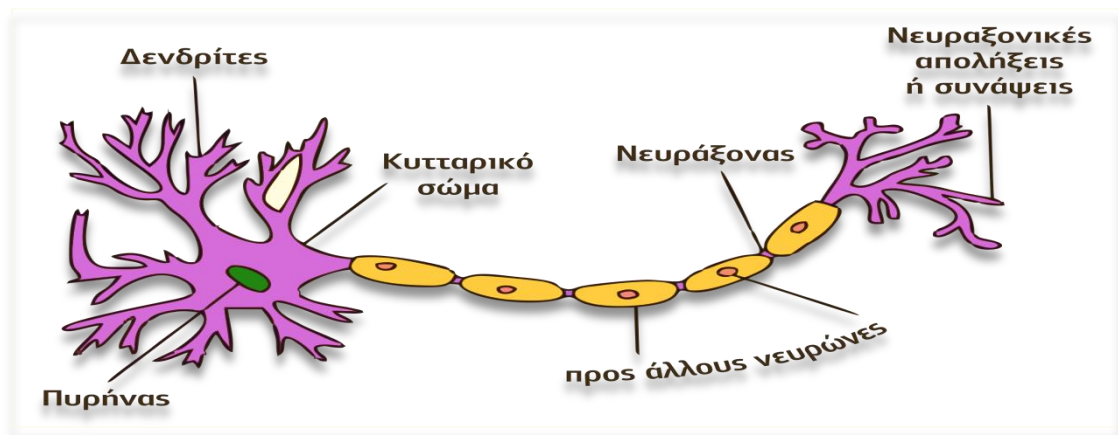


Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση της νευρογένεσης στις δύο περιοχές του εγκεφάλου: στην **υποκοιλιακή ζώνη (SVZ)** που βρίσκεται στην πλευρική κοιλία και της **ενήλικης υποκοιλιακής ζώνης (SGZ)** εντός της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου. Τα γλοιακά κύτταρα είναι διάσπαρτα κυρίως στη λευκή αλλά και στη φαιά ουσία (Πηγή: <https://neurowiki2012.wikispaces.com>)

Τα **νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs)** είναι **πολυδύναμα (multipotent)** κύτταρα που παράγουν νευρώνες και νευρογλοία του νευρικού συστήματος όλων των ζώων κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Μερικά νευρικά βλαστικά κύτταρα παραμένουν στον εγκέφαλο των ενηλίκων σπονδυλωτών και συνεχίζουν δηλαδή, να παράγουν νευρώνες σε όλη τη ζωή. Τα βλαστικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται και διαφοροποιούνται σε τέσσερεις τύπους κυττάρων: τους νευρώνες, τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα επενδυματικά κύτταρα (Doetsch et al., 1999).

1.8.1 Οι νευρώνες

Οι νευρώνες ποικίλουν σε ότι αφορά το μέγεθος, τη μορφολογία τους και τα λειτουργικά τους χαρακτηριστικά. Ένας τυπικός νευρώνας αποτελείται από τέσσερα διακριτά μέρη (**Εικόνα 18**). Το κυτταρικό σώμα, περιέχει τον πυρήνα και τα ριβοσώματα και καταλήγει σε πολλές αποφυάδες. Επίσης, αποτελεί το τροφικό κέντρο του νευρώνα. Ο νευράξονας είναι η μακρύτερη αποφυάδα του νευρικού συστήματος και εκτείνεται από το κυτταρικό σώμα μέχρι τα κύτταρα-στόχους. Αλλιώς, ονομάζεται νευρική ίνα και έχει την ιδιότητα να μεταφέρει πληροφορίες κατά μήκος μεγάλων αποστάσεων μέσα στο νευρικό σύστημα. Οι δενδρίτες είναι μικρότεροι σε μέγεθος και διακλαδούμενοι αποτελούν μαζί με το κυτταρικό σώμα την υποδεκτική περιοχή του νευρώνα. Τα σώματα των νευρώνων διατάσσονται σε ομάδες, στήλες ή στοιβάδες διατηρώντας αυστηρή σωματοτοπία καθ' όλα τα επίπεδα του κεντρικού νευρικού συστήματος και συνιστούν τη φαιά ουσία. Οι νευράξονες ομαδοποιούνται σχηματίζοντας δεμάτια δηλαδή σύνολα νευραξόνων με κοινή αρχή και τέλος και κοινή λειτουργία. Αυτά συνιστούν τη λευκή ουσία του κεντρικού νευρικού συστήματος.



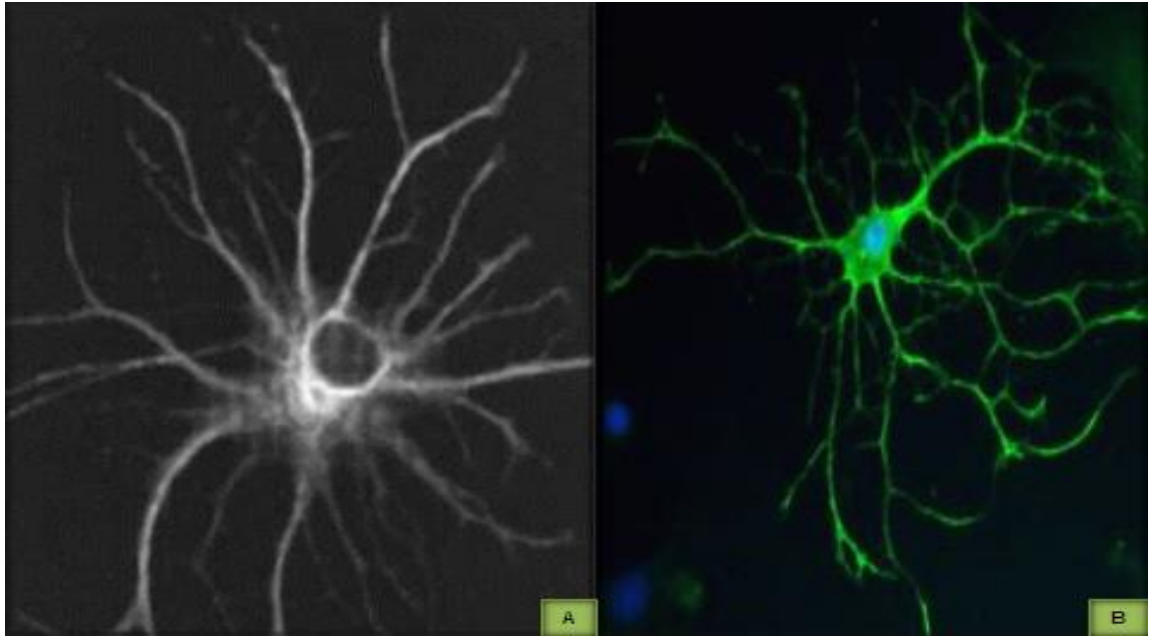
Εικόνα 18. Στο σχήμα απεικονίζεται το κυτταρικό σώμα, ο νευράξονας, οι δενδρίτες και οι νευραξονικές απολήξεις (Πηγή: <http://el.wikipedia.org/wiki/>)

1.8.2 Τα αστροκύτταρα

Τα αστροκύτταρα, όπως δηλώνει η ονομασία τους, έχουν αστεροειδή σχήμα (προέρχονται από τις ελληνικές λέξεις αστρο που σημαίνει αστέρι και κύτταρο) (**Εικόνα 19B**). Αποτελούν τον μεγαλύτερο σε αριθμό τύπο κυττάρου της γλοίας και διανέμονται σε όλο το κεντρικό σύστημα. Επίσης, έχουν σφαιρικό κεντρικά τοποθετημένο πυρήνα και πολλές αποφυάδες. Μερικές από αυτές σχηματίζουν ποδίσκους στην επιφάνεια των νεύρων του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Οι κύριες μορφές που υπερισχύουν στην λευκή και φαιά ουσία του εγκεφάλου είναι τα πρωτοπλασματικά και τα ινώδη αστροκύτταρα αντίστοιχα. Οι αποφυάδες των αστροκυττάρων έρχονται σε άμεση επαφή με το αγγειακό τοίχωμα συμβάλλοντας έτσι στη δημιουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ενώ δημιουργούν ένα αφοριστικό πέταλο στην επιφάνεια του εγκεφάλου κάτω από την χοριοειδή μήνιγγα. Τα αστροκύτταρα εκτελούν πολλές λειτουργίες, όπως είναι η βιοχημική υποστήριξη των ενδοθηλιακών κυττάρων που σχηματίζουν τον φραγμό αίματος-εγκεφάλου, η παροχή θρεπτικών ουσιών στο νευρικό ιστό, η διατήρηση της εξωκυτταρικής ισορροπίας ιόντων.

1.8.3 Τα ολιγοδενδροκύτταρα

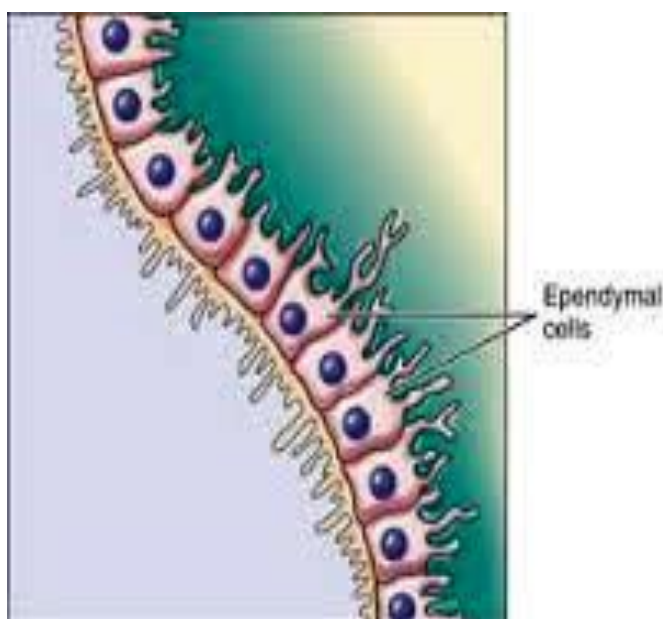
Τα ολιγοδενδροκύτταρα έχουν μικρότερο μέγεθος, βραχύτερες και λιγότερες αποφυάδες από τα αστροκύτταρα. Αυτά εντοπίζονται τόσο στη φαιά ουσία κοντά στο σώμα του νευρικού κυττάρου όσο και στη λευκή ουσία κατά μήκος της πορείας και μεταξύ των αξόνων των νευρικών κυττάρων (**Εικόνα 19A**). Είναι υπεύθυνα για τη λειτουργία μόνωσης των νευραξόνων, τυλίγοντας σφικτά τις μεμβρανικές αποφυάδες ομόκεντρα γύρω από το νευράξονα και σχηματίζοντας ένα έλυτρο μυελίνης, δημιουργώντας έτσι μια συμβιωτική σχέση με τους νευρώνες. Κάθε ολιγοδενδροκύτταρο είναι υπεύθυνο για τη μυελίνωση περισσοτέρων του ενός νευραξόνων. Ο αριθμός των διαδικασιών που σχηματίζουν έλυτρα μυελίνης από ένα μόνο ολιγοδενδροκύτταρο ποικίλλει ανάλογα με την περιοχή του ΚΝΣ και το είδος του ζώου (Peters, 1991)



Εικόνα 19 A & B. Φωτογραφίες **A)** ολιγοδεδροκύτταρο σε πρόδρομο κύτταρο (Printerest) (Πηγή: <https://gr.depositphotos.com/9480882/stock-photo-neuron-oligodendrocytes.html>). **B)** αστροκυττάρου από εγκέφαλο ποντικού (Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Astrocyte>)

1.8.4 Τα επενδυματικά κύτταρα

Τα επενδυματικά κύτταρα βρίσκονται την κοιλιακή επιφάνεια του νευρικού συστήματος και διατηρούν την επιθηλιακή τους διάταξη. Στην πλειοψηφία τους τα κύτταρα αυτά διαθέτουν κροσσούς, οι οποίοι βοηθούν στη διακίνηση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Ο ρόλος τους είναι σημαντικός, καθώς ρυθμίζουν την απορρόφηση των ιόντων και καθορίζουν την κατεύθυνση προς την οποία μεταναστεύουν τα κύτταρα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ΚΝΣ (Riquelme et al., 2008) (**Εικόνα 20**).



Εικόνα 20. Στο σχήμα απεικονίζεται η θέση των επιδερμικών κυττάρων (Πηγή: <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com>)

1.9 Νευροβλαστώματα N2a

Τα κύτταρα N2a γνωστά και ως κύτταρα Neuro-2a είναι καρκινικοί νευροβλάστες (**Εικόνα 21 A & B**). Αυτή η κυτταρική σειρά προέρχεται από νευρώνες που βρίσκονται στον εγκέφαλο του ποντικού. Βασικό χαρακτηριστικό αυτών των κυττάρων είναι η ικανότητά τους να διαφοροποιούνται σε νευρώνες εντός μερικών ημερών (Tremblay et al., 2010). Τα νευροβλαστώματα N2a έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε μελέτες για να μελετήσουν την ανάπτυξη των νευριτών, τη νευροτοξικότητα των κυττάρων, στη συναπτογένεση και τη σηματοδότηση μονοπατιών. Οι κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την επιλογή και αξιολόγηση νέων δ.ο. με παρόμοιο ή

διαφορετικό μηχανισμό δράσης σε μελέτες τοξικότητας. Τα κύτταρα N2a έχουν το πλεονέκτημα να ανταποκρίνονται γρήγορα στην έλλειψη ορού και άλλων ερεθισμάτων που εξαρτώνται από το περιβάλλον τους εκφράζοντας μόρια σηματοδότησης που οδηγούν σε νευρωνική διαφοροποίηση και ανάπτυξη νευριτών (Evangelopoulos et al., 2005).



Εικόνα 21 A & B. Φωτογραφίες κυττάρων N2a από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

1.10 Χρήση βλαστικών κυττάρων σε μελέτες τοξικότητας

Τα βλαστικά κύτταρα βρίσκονται στο επίκεντρο του επιστημονικού ενδιαφέροντος. Μια από τις ευρείες εφαρμογές τους σήμερα είναι σε μελέτες τοξικότητας σε διάφορους τομείς. Στον κλάδο της ιατρικής και της φαρμακευτικής έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολυάριθμες μελέτες για να μελετήσουν τους τοξικούς παράγοντες και τις επιδράσεις των φαρμάκων. Οι επιστήμονες έχουν χρησιμοποιήσει εμβρυϊκά βλαστικά κυττάρα D3 και εμβρυονικούς ινοβλάστες (MEF-LacZ) ποντικών για να μελετήσουν την επίδραση του μεγέθους των νανοσωματιδίων αργύρου (Ag) στην κυτταροτοξικότητα, την αναπτυξιακή τοξικότητα και τη γονιδοτοξικότητα (Park et al., 2011).

Επίσης, μελέτες έχουν διεξαχθεί χρησιμοποιώντας συστήματα *in vitro* πολυδύναμων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων για να μελετήσουν και να

διερευνήσουν τις μεταλλαξιογόνες, τις κυτταροτοξικές και τις εμβρυοτοξικές επιδράσεις των διάφορων χημικών ουσιών όπως πενικιλίνη, ασκορβικό οξύ, σαλκυλικό οξύ κ.α. (Rohwedel et al., 2001).

. Αντίστοιχες, μελέτες τοξικότητας έχουν γίνει σε Φ.Π. περιλαμβάνοντας δ.ο. και των τριών κύριων κατηγοριών, ως κυτταρικά συστήματα-μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν τρεις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές εμβρυϊκά (HEK293), πλακουντικά (JEG3), και ηπατικά (HepG2) κύτταρα (Mesnage et al., 2014).

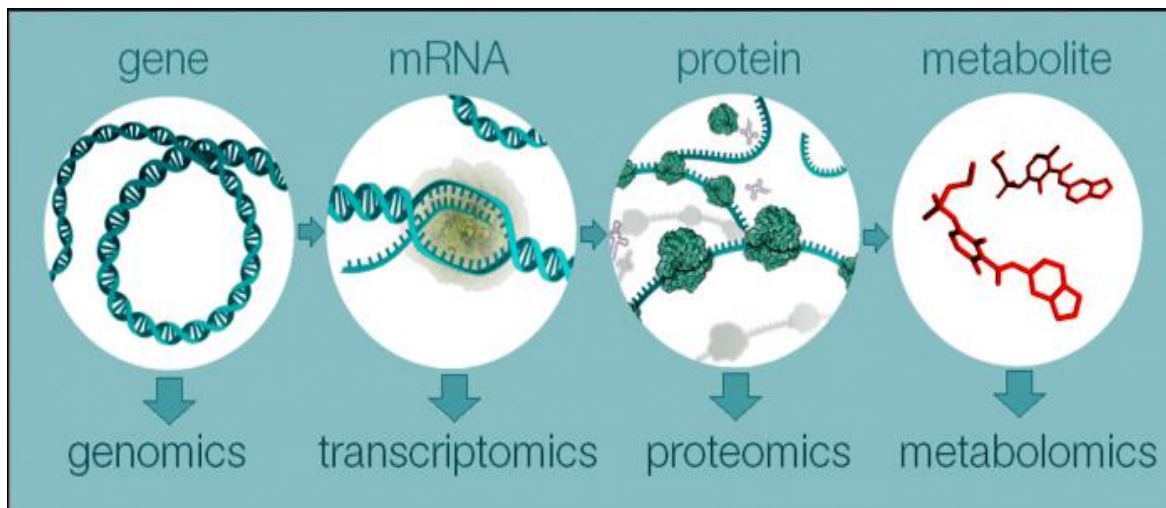
Σε μια πρόσφατη, μελέτη χρησιμοποιήθηκαν νευρικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από διαφοροποιημένα παράγωγα του λιπώδους ιστού ποντικίου (ADSCs) για να μελετήσουν την νευροτοξικότητα της δ.ο. chlorpyrifos στα διάφορα στάδια διαφοροποίησης των κυττάρων, την κυτταροτοξική επίδραση που προκαλεί το συγκεκριμένο εντομοκτόνο στην έκφραση μερικών γονιδίων και πρωτεϊνών σε ειδικούς νευρώνες και αξιολογήθηκε η δραστικότητα του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (Ache) (Hadi et al., 2016).

Τέλος, διάφορα είδη βλαστικών κυττάρων εμβρυϊκά, νευρικά, ενήλικα κ.α. από διάφορους ιστούς έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην τοξικολογία και έχει αποδειχθεί μέχρι σήμερα ως ο καλύτερος και ο αποτελεσματικότερος τρόπος για την αξιολόγηση και εκτίμηση της επίδρασης των τοξικών παραγόντων σε τροφές, στον άνθρωπο, τα ζώα και στο περιβάλλον.

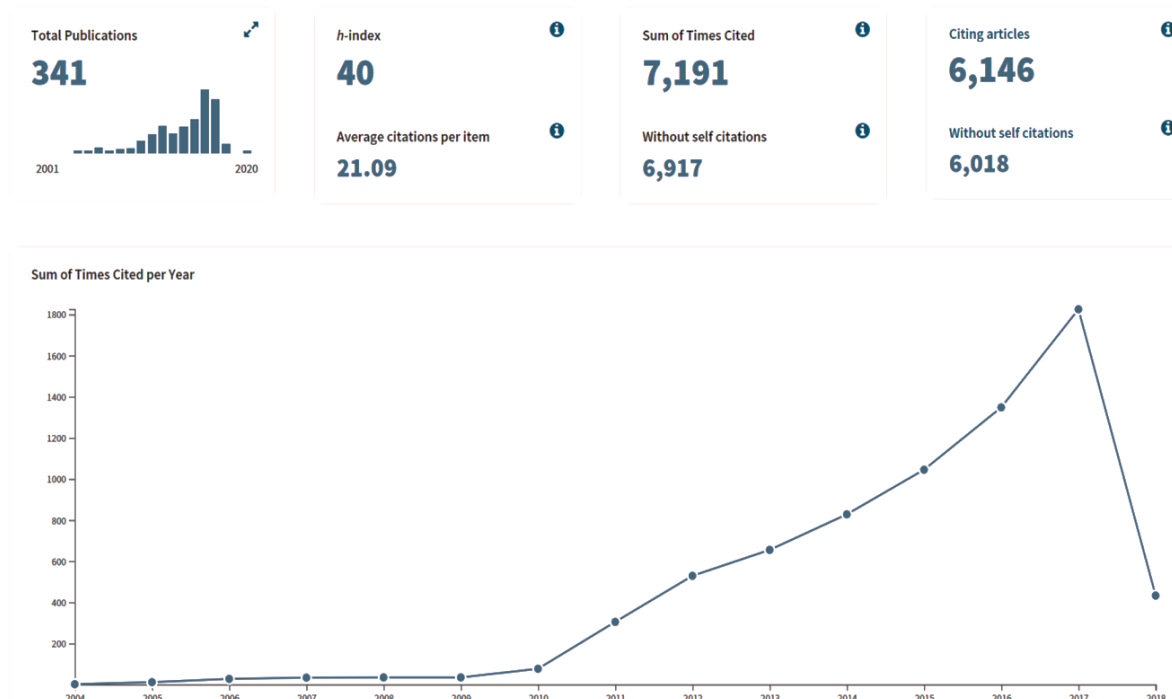
1.11 «Ομικές» (Omics)-Τοξικογενομική (toxicogenomics)

Η μεταβολομική ανήκει στις «ομικές» (omics) τεχνικές, οι οποίες έδωσαν την δυνατότητα της ταυτόχρονης ποσοτικοποίησης πλήθους βιολογικών μοριακών συστατικών. Ο όρος «omics» περιλαμβάνει διάφορες τεχνικές, όπως i) τη γονιδιωματική (genomics) η οποία εξετάζει τον πολυμορφισμό των γονιδίων ii) τη μεταγραφομική (transcriptomics) κατά την οποία γίνεται ανάλυση των κωδικοποιημένων και μη mRNAs, iii) την πρωτεομική (proteomics) που αφορά την ανάλυση πρωτεϊνών (Galbraith, 2006) και iv) την μεταβολομική (metabolomics) όπου ερευνάται το σύνολο ή η πλειοψηφία των μεταβολιτών ενός οργανισμού (Hall, 2006) (**Εικόνα 22**). Λόγω το του μεγάλου όγκου πληροφοριών και της πολυπλοκότητας των δεδομένων που λαμβάνονται από τις «ομικές», απαιτείται προηγμένη ανάλυσής τους με χρήση εξελιγμένων λογισμικών βιοπληροφορικής

(bioinformatics). Η μελέτη των βλαστικών κυττάρων είναι ένα από τα πεδία έρευνας της τοξικολογίας, στο οποίο οι «ομικές» μπορούν να διαδραματίσουν πολύ σημαντικό ρόλο (**Εικόνα 23**).



Εικόνα 22. Οι τέσσερις «ομικές» τεχνικές: i) η γονιδιωματική, ii) η μεταγραφωματική iii) η πρωτεομική και iv) η μεταβολομική (Πηγή: https://www.researchgate.net/figure/Fig-1-Data-integration-from-multiple-Omics-platforms-genomics-transcriptomics_fig1_303801337)



Εικόνα 23. Αριθμός παραθέσεων και δημοσιεύσεων σχετικά με μεταβολομικές αναλύσεις σε κύτταρα, για το χρονικό διάστημα 01/2001 έως 03/2018 μετά από

αναζήτηση δημοσιεύσεων για τους όρους «cell metabolomics» στη βάση δεδομένων Web of knowledge (Πηγή: <https://webofknowledge.com>)

Η μεταβολομική όταν εφαρμόζεται σε μελέτες τοξικότητας αναφέρεται συχνά με τον όρο τοξικογενομική και περιλαμβάνει διάφορες πτυχές της παθο-βιοχημείας και της βιολογίας των οργανισμών. Η εφαρμογή της μεταβολομικής στην τοξικολογία παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών τοξικότητας, δίνοντας τη δυνατότητα να προσδιορισθούν οι βιοδείκτες των τοξικών επιδράσεων και να δημιουργηθούν μοντέλα πρόβλεψης τοξικότητας (Craig et al., 2006, Heijne et al., 2005) Από αναλυτική άποψη, ο στόχος της μεταβολομικής στις μελέτες τοξικότητας είναι να «επιτύχει μια ολοκληρωμένη μέτρηση του μεταβολόματος και πώς αυτό αποκρίνεται σε παράγοντες πίεσης, περιγράφοντας τις αλλαγές που συμβαίνουν στη σχέση μεταξύ των βιοχημικών μονοπατιών» (Robertson, 2005). Σήμερα, είναι αναγκαίο να γίνει μια πιο ολιστική προσέγγιση της τοξικολογίας, κάτι που είναι εφικτό με τη δύναμη των «ομικών» για την κατανόηση των επιπτώσεων των τοξικών ουσιών στους οργανισμούς. Οι «ομικές» μαζί με τα κατάλληλα εργαλεία θα σηματοδοτήσουν το μέλλον για την αξιολόγηση και μελέτη της δραστηριότητας, της αποτελεσματικότητας και της τοξικότητας των βιοδραστικών ουσιών, με σκοπό την περαιτέρω χρησιμοποίησή τους στη φυτοπροστασία.

1.12 Χρήση μεταβολομικής σε κυτταρικές καλλιέργειες

Τα τελευταία χρόνια, η μεταβολομική έχει εφαρμοστεί σε διάφορους κλάδους επιστήμης από την ιατρική, την φαρμακευτική μέχρι και την γεωπονική επιστήμη. Ως μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι οργανισμοί. Η στρατηγική αυτή έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε ένα μεγάλο εύρος κυττάρων σε διάφορα είδη θηλαστικών συμπεριλαμβάνοντας πρωτογενής καλλιέργειες κυττάρων που λαμβάνονται από διαφορετικούς ιστούς όπως εμβρυικά, εμβρυονικά, ενήλικα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα μέχρι αθανатоποιημένες, μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές (Leon et al., 2013).

Πιο συγκεκριμένα η μεταβολομική έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες κυτταρικές καλλιέργειες θηλαστικών για να μελετήσουν και να αξιολογήσουν την τοξικότητα σε διάφορους κλάδους, για την παρακολούθηση κυτταρικών καλλιεργειών, στον

κλάδο της φαρμακευτικής και της βιοφαρμακευτικής έρευνας, για να παρακολουθήσουν την επίδραση των διατροφικών πολυφαινολών σε λευχαιμικά κύτταρα K562 με την προσέγγιση Foodomics (Leon et al., 2013). Οι *in vitro* εφαρμογές μεταβολομικής στα κύτταρα (cell metabolomics) πλεονεκτούν σε σχέση με άλλα υποκείμενα ή ζωικά μοντέλα στην υψηλή διαθεσιμότητα, στη μεγαλύτερη αναπαραγωγικότητα, έχουν σχεδόν απεριόριστη διάρκεια ζωής, στο χαμηλότερο κόστος και στον εύκολο χειρισμό των ελεγχόμενων πειραματικών μεταβλητών. Επιπλέον, οι προσεγγίσεις *in vitro* αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο στην τοξικολογία. Το 2007, το Εθνικό Συμβούλιο Έρευνας δημοσίευσε “Δοκιμές τοξικότητας στον 21^ο αιώνα: ένα όραμα και μια στρατηγική” (Council, 2007). Η έκθεση πρότεινε ριζική μετατόπιση της τοξικολογίας, όπου οι τρέχουσες δοκιμές σε ζώα θα πρέπει να αντικατασταθούν από κυτταρικά συστήματα *in vitro* σε συνδυασμό με νέες, πολλά υποσχόμενες τεχνικές όπως η μεταβολική. Ωστόσο, στα κυτταρικά συστήματα *in vitro* η μεταβολική δεν χρησιμοποιείται ακόμη εντατικά στα Φ.Π.. Τα τελευταία χρόνια άρχισαν να χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές και έχουν δείξει πολλές προοπτικές στην τοξικολογία.

1.13 Μεταβολομική

Η μεταβολομική είναι ένα βιοαναλυτικό «ομικό» εργαλείο υψηλής ρυθμό απόδοσης (high-throughput), το οποίο τα τελευταία χρόνια αναπτύσσεται με ραγδαίο ρυθμό για την αξιολόγηση και κατανόηση της επίδρασης της έκθεσης βιολογικών συστημάτων σε βιοδραστικούς παράγοντες (Aliferis and Jabaji, 2011). Ο όρος εισήχθη για πρώτη φορά από τον (Oliver et al., 1998). Με τον όρο μεταβολομική περιγράφεται η ποσοτική και η ποιοτική ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού (μερικών εκατοντάδων) μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011, Fiehn, 2002) , όπως αμινοξέα, λιπίδια, υδατάνθρακες, ορμόνες κ.ά. Με την προσέγγιση της μεταβολομικής αναμένεται σαν αποτέλεσμα η καλύτερη κατανόηση των βιολογικών συστημάτων σε μοριακό επίπεδο και ειδικά όταν συνδυάζεται με πληροφορίες από το γονιδίωμα και το μεταγραφικό.

Το μεταβόλομα (metabolome) αντιπροσωπεύει τη συλλογή όλων των μεταβολιτών σε ένα βιολογικό κύτταρο, ιστό, βιολογικό όργανο ή οργανισμό, που

είναι τα τελικά προϊόντα των κυτταρικών διαδικασιών. Η μεταβολική βιοσύνθεση, αντικατοπτρίζοντας την αλληλεπίδραση γονιδίων-περιβάλλοντος, δίνει μια ακριβή περιγραφή της κυτταρικής φυσιολογίας. Συνδυασμένη με αναλύσεις βιοπληροφορικής (bioinformatics) δίνει σημαντικές πληροφορίες για τη ρύθμιση και λειτουργία του μεταβολισμού ενός βιολογικού συστήματος, αποτελώντας την πιο κατάλληλη μέθοδο για τη μελέτη και συσχέτιση φαινοτύπου-γονοτύπου. Σε σύγχρονες προσεγγίσεις στην έρευνα και ανάπτυξη Φ.Π., η μεταβολομική αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για την επιλογή υψηλής ρυθμοαπόδοσης βιοδραστικών ουσιών, προκειμένου να ανακαλυφθούν και να επιλεχθούν εκείνες με τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα, νέους Μ.Δ. και βελτιωμένες οικοτοξικολογικές και τοξικολογικές ιδιότητες. Αυτό είναι δυνατό με την εξέλιξη των αναλυτικών οργάνων και κατασκευή λογισμικών για την ανάλυση μεγάλου όγκου δεδομένων και μεταβολικών βάσεων δεδομένων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

Στις μέρες μας, η μεταβολομική έχει καθιερωθεί ως ένα ισχυρό εργαλείο για την ολοκληρωμένη μελέτη της βιολογίας συστημάτων. Ως διεπιστημονικό πεδίο της επιστήμης η μεταβολική συνδυάζει την αναλυτική χημεία, τη βιοπληροφορική, τις στατιστικές αναλύσεις και τη βιοχημεία. Όταν εφαρμόζεται σε τοξικολογικές μελέτες, η μεταβολική περιλαμβάνει επίσης πτυχές της παθοχημικής, της βιολογίας των συστημάτων και της μοριακής διάγνωσης (Griffiths et al., 2010). Τέλος, βασικό ρόλο στις μεταβολομικές αναλύσεις των δειγμάτων έχει η επιλογή της αναλυτικής μεθόδου που θα χρησιμοποιηθεί για τις αναλύσεις. Αυτή εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες και τη χημική σύνθεση των δειγμάτων, τον σκοπό της μελέτης, τα διαθέσιμα όργανα και την τεχνογνωσία.

1.13.1 Αναλυτικά όργανα για εφαρμογή της μεταβολομικής

Η ανάλυση των μεταβολομικών αναλύσεων πραγματοποιείται με τεχνικές ενόργανης χημικής ανάλυσης και κατά βάση με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, NMR) και φασματομετρία μαζών (mass spectrometry, MS) (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Το NMR έχει υψηλή επαναληψιμότητα, δεν απαιτεί ιδιαίτερη

προετοιμασία των δειγμάτων και είναι μη καταστροφική τεχνική (Pechlivanis et al., 2010). Αυτό σημαίνει ότι ένα δείγμα μπορεί σε πρώτη φάση να αναλυθεί με NMR και στη συνέχεια να αποτελέσει αντικείμενο περαιτέρω ανάλυσης με άλλες μεθόδους. Το όργανο αυτό μειονεκτεί στη σχετικά χαμηλή ευαισθησία με (όριο ανίχνευσης 1-5 μM) με αποτέλεσμα την ανίχνευση περιορισμένου σχετικά αριθμού μεταβολιτών. Στο υψηλό κόστος αγοράς και συντήρησης του οργάνου και στη δυσκολία αναγνώρισης των μεταβολιτών σε πολύπλοκα δείγματα μέσα από βάσεις δεδομένων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

Μία εναλλακτική προσέγγιση είναι η χρήση χρωματογραφικών μεθόδων ανάλυσης, η χρήση υγρής χρωματογραφίας (Liquid Chromatography, LC) ή αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography, GC) επιτυγχάνουν τον διαχωρισμό των μεταβολιτών, η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τους πραγματοποιείται με φασματομετρία μαζών (MS) (Fiehn et al., 2000). Σε σύγκριση με το NMR ο ανιχνευτής MS παρέχει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης μειονεκτεί όμως ως προς την επαναληψιμότητα, που είναι χαμηλότερη σε σχέση με του οργάνου NMR (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Η GC σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC/MS) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πολλά εργαστήρια. Λόγω της αξιοπιστίας, το μεγάλο εύρος εφαρμογών της, σχετικά χαμηλό το κόστος αγοράς, λειτουργίας και συντήρησης του οργάνου. Αυτή ήταν η πρώτη μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή και ανάπτυξη μεταβολικών MS (Oerke, 2006). Επιπλέον, η μέθοδος GC σε συνδυασμό με αναλυτή χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF) και φασματομετρία μάζας (GCxGC/TOF-MS) έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τον χαρακτηρισμό των μεταβολικών προφίλ σε πολύπλοκα βιολογικά μείγματα (Hope et al., 2005, Welthagen et al., 2005, Mohler et al., 2006). Το μεγάλο πλεονεκτήματα της ανάλυσης GCxGC/TOF-MS είναι ότι επιτυγχάνει μεγαλύτερο διαχωρισμό κορυφών, με αποτέλεσμα η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών είναι πιο ακριβής (Ralston-Hooper et al., 2008, Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Μια από τις πιο πρόσφατες εξελίξεις των αναλυτικών οργάνων είναι η LC σε συνδυασμό με ανιχνευτή Orbitrap. Η είσοδος του οργάνου στην αγορά το 2005 άνοιξε νέους ορίζοντες στη εφαρμογή της μεταβολομικής παγκοσμίως.

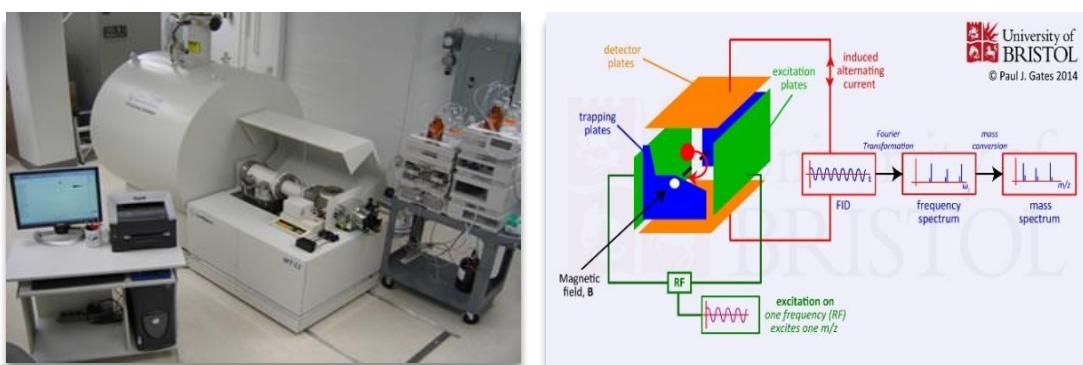
Δεδομένου ότι τα βιολογικά δείγματα είναι αρκετά πολύπλοκα, ο χαρακτηρισμός του συνόλου των μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος είναι δύσκολος και

απαιτεί το συνδυασμό περισσότερων από μία μεθόδους ανάλυσης. Με σκοπό να παρέχονται περισσότερες πληροφορίες και πιο αξιόπιστες.

1.13.2 Αναλυτές Μαζών (Analyzers Mass)

1.13.2.1 Αναλυτές ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Ion Cyclotron, FT ICR)

Ο αναλυτής μετασχηματισμού κατά **Fourier (Fourier Transform-FT)** είναι η πιο πρόσφατη εκδοχή του αναλυτή κυκλοτρονικού συντονισμού (**Ion Cyclotron Resonance-ICR**). Πρόκειται για ένα ηλεκτρομαγνητικό αναλυτή στον οποίο εφαρμόζεται τόσο ισχυρό μαγνητικό πεδίο που η ακτίνα της τροχιάς του ιόντος γίνεται μικρότερη από τις εσωτερικές διαστάσεις του αναλυτή. Με αυτόν τον τρόπο τα ιόντα παγιδεύονται σε μια κυκλική διαδρομή μέσα στο ICR και το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται εμποδίζει την έξοδο τους από την παγίδα. Η ένταση του σήματος κάθε συχνότητας είναι ανάλογη προς τον αριθμό ιόντων που έχουν τη συγκεκριμένη τιμή m/z . Όταν ασκηθεί κατάλληλη ραδιοσυχνότητα τα ιόντα που αντιστοιχούν σε αυτή τη ραδιοσυχνότητα διεγείρονται, οπότε και ανιχνεύονται (**Εικόνα 24**). Μια άλλη μέθοδος είναι η διέγερση όλων των ιόντων με μια γρήγορη σάρωση συχνοτήτων και το πολύπλοκο σήμα που προκύπτει αναλύεται στις επιμέρους συχνότητες με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT).



Εικόνα 24 A & B. A) Όργανο FT-ICR (Πηγή: www.uwo.ca) **B)** Αρχή λειτουργίας ανιχνευτή FT-ICR (Πηγή: <http://www.bris.ac.uk/chemistry/>)

Η ανάλυση με FTICR είναι μια τεχνική υψηλής ανάλυσης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των μαζών με υψηλή ακρίβεια. Το όργανο

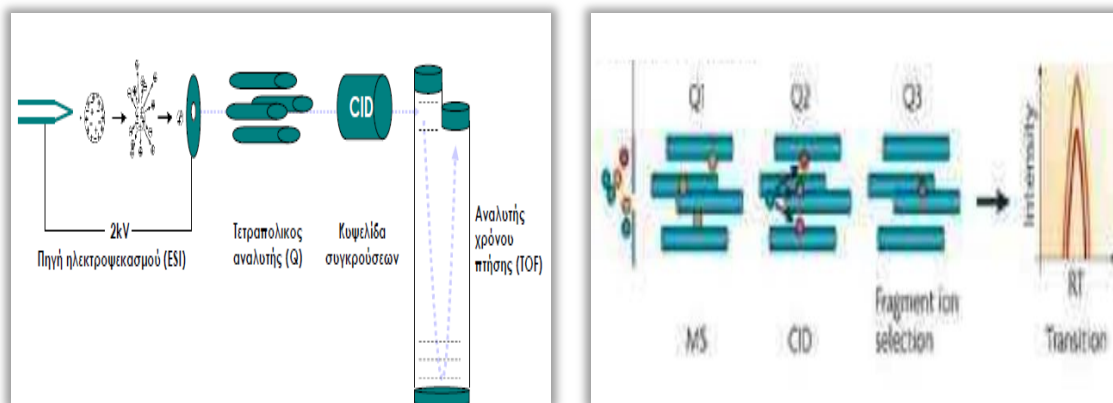
FTICR μπορεί να συνδυαστεί με MS και να επιτύχει υψηλότερα επίπεδα ανάλυσης από άλλες μορφές φασματομέτρου μάζας, επειδή ένας υπεραγώγιμος μαγνήτης είναι πολύ πιο σταθερός από την τάση RF (ραδιοσυχνότητας). Επίσης, χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων, όπως η βιομάζα ή τα προϊόντα υγροποίησης αποβλήτων. Επιπλέον αυτή η τεχνική υψηλής ανάλυσης είναι χρήσιμη στη μελέτη μεγάλων μακρομορίων όπως πρωτεΐνες με πολλαπλά φορτία, τα οποία μπορούν να παραχθούν με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού. Το FTICR-MS έχει ευρεία εφαρμογή και σε άλλους κλάδους όπως, η πρωτεομική, η γωνιδιωματική και η μεταβολομική.

Τα όργανα FT-ICR είναι εξαιρετικά ακριβά, αλλά το μεγάλο τους κόστος αντισταθμίζεται από άλλα πλεονεκτήματά τους, όπως η ασύγκριτη αναλυτική τους ικανότητα ($R > 1.000.000$) και η μεγάλη ακρίβεια στους προσδιορισμούς των ατομικών μαζών ($< 5 \text{ ppm}$), η ανάλυση εξαιρετικά πολύπλοκων μιγμάτων, η δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλών ιόντων, και η δυνατότητα να συνδυαστούν με δίδυμης MS/MS φασματογραφίας μαζών αναλύσεις (Marshall and Hendrikson, 2002).

Το όργανο αυτό εκτός ότι είναι πολύ ακριβό όργανο απαιτούνται και ειδικές εργαστηριακές εγκαταστάσεις λόγω του μεγάλου μεγέθους που καταλαμβάνει. Επίσης, μειονεκτεί στη μικρή ταχύτητα σάρωσης (τυπικά 1 Hz), έχει υψηλή απαίτηση κενού (10^{-8} - 10^{-10} Torr) και έχει πολύπλοκη λειτουργία.

1.13.2.2 Τετραπολικοί αναλυτές Χρόνου Πτήσης αναλυτές (Quadrupole time-of-flight, Q-TOF)

Οργανολογικά ο αναλυτής μαζών Q-TOF μπορεί να θεωρηθεί ως η προσθήκη ενός τετράπολου σε ένα TOF (**Εικόνα 25**) ή ως η αντικατάσταση του Q3 ενός τριπλού τετραπόλου με ένα TOF, (**Εικόνα 26**) (Bateman et al., 2002). Το πρώτο Q1 και το τρίτο Q3 τετράπολο λειτουργούν ως αναλυτές μαζών, ενώ το ενδιάμεσο Q2 χρησιμοποιείται για την θρασματοποίηση των ιόντων. Ο αναλυτής αυτός εφευρέθηκε το 1999, στην αρχή σχεδιάστηκε για την ανάλυση ποιοτικών προσδιορισμών και γρήγορα επεκτάθηκε και σε ποσοτικές αναλύσεις.



Εικόνα 25 A & B. A) Η προσθήκη ενός τετράπολου σε ένα TOF αναλυτή (Πηγή: <https://nationalmaglab.org>) **B)** Η αντικατάσταση του Q3 ενός τριπλού τετραπόλου με ένα TOF αναλυτή (Πηγή: <http://tccc.iesl.forth.gr>)



Εικόνα 26. Όργανο Q-TOF (Πηγή: <http://msvision.eu/>)

Αρχικά, ο αναλυτής Q-TOF χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση αλληλουχίας πεπτιδίων (*de novo*) (Zubarev and Makarov, 2013). Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση μεταβολιτών και γλυκοπρωτεϊνών. Η υψηλή απόδοση του αναλυτή αυτού τόσο σε πειράματα MS όσο και MS/MS και η δυνατότητα χρήσης πηγών ιοντισμού, όπως APCI και ESI, τον κατέστησαν αρκετά δημοφιλή και γρήγορα επεκτάθηκε και χρησιμοποιήθηκε σε μεγάλο εύρος αναλύσεων που εκτείνεται από τη νάνο-ανάλυση βιολογικών δειγμάτων μέχρι και την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων στο φαρμακευτικό κλάδο.

Βασικά πλεονεκτήματα του οργάνου είναι η υψηλή διακριτική ικανότητα ($R \sim 10.000-20.000$, μέγιστο 40.000). Η υψηλή ακρίβεια μάζας (1-5ppm) και υψηλή ευαισθησία με κατώτερο όριο ανίχνευσης 100 fmoI/MI που απέδειξαν σε συνδυασμό με την εύκολη λειτουργία για επιστήμονες με εμπειρία στην ενόργανη ανάλυση με αναλυτές μαζών τριπλού ή απλού τετραπόλου (QQQ,Q) οδήγησαν στη γρήγορη διάδοσή του. Το όργανο αυτό μειονεκτεί όμως, στο ότι έχει υψηλό

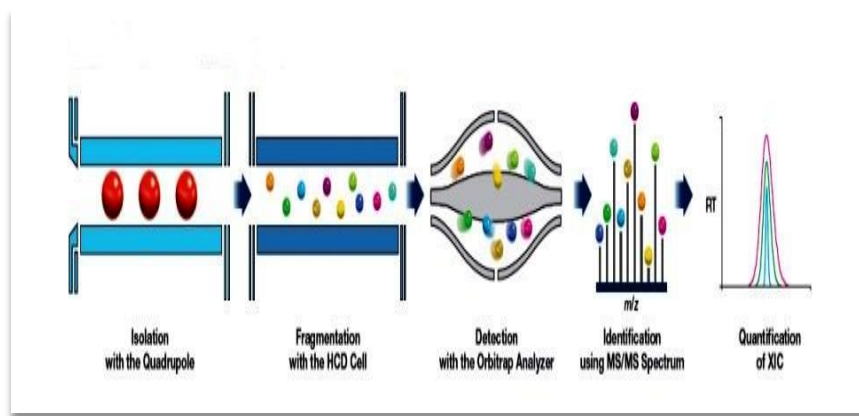
κόστος αγοράς και συντηρήσεις, έχει μικρή ταχύτητα σάρωσης και υψηλή απαίτηση κενού (10^{-7} Torr).

1.13.2.3 Αναλυτές τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbital Trap analyzers, Orbitrap)

Ο αναλυτής Orbitrap είναι ο πιο πρόσφατος, τελευταίας τεχνολογίας αναλυτής μαζών που εφευρέθηκε από τον Makarov και κυκλοφόρησε στην αγορά το 2005. Το Orbitrap λειτουργεί παγιδεύοντας ιόντα σε κυκλική κίνηση. Αποτελείται από ένα κεντρικό ηλεκτρόδιο με μορφή ατράκτου και ένα εξωτερικό κυλινδρικό ηλεκτρόδιο, ομοαξονικό με το κεντρικό ηλεκτρόδιο (**Εικόνα 27**). Η διαφορά δυναμικού που εφαρμόζεται μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων αναγκάζει τα ιόντα σε περιστροφική κίνηση γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο και ταυτόχρονα σε ταλάντωση στον άξονα z. Μετά την ανίχνευση του ιοντικού ρεύματος εφαρμόζεται μετασχηματισμός Fourier (FT) για τη μετατροπή του σήματος σε φάσμα m/z (Zubarev and Makarov, 2013, Perry et al., 2008), (**Εικόνα 28**).



Εικόνα 27 A & B. Α) Αναλυτής Orbitrap <http://planetorbitrap.com> **Β)** Παγίδα ιόντων Orbitrap (Πηγή: <http://departments.agri.huji.ac.il/zabam/orbitrap.html>)



Εικόνα 28. Σχηματική απεικόνιση διαχωρισμός των ιόντων, πώς κάθε ουσία διαχωρίζεται στο χρωματογράφημα (Πηγή: <https://www.thermofisher.com>)

Το Orbitrap έχει ευρεία χρήση σε πολλούς κλάδους χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό μικρών μορίων έως μεγαλομόρια, βιομόρια, στο περιβάλλον και τρόφιμα. Εφαρμόζεται στη γονιδιωματική, τη πρωτεϊνωματική και τη μεταβολοκομική καθώς είναι επιστήμες που απαιτούν την ανάλυση εξαιρετικά σύνθετων μειγμάτων, π.χ. αναλύσεις κυττάρων (Marshall and Hendrickson, 2002). Επιπρόσθετα, χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση εξαιρετικά χαμηλών και άγνωστων ενώσεων σε πολύπλοκες μήτρες.

Ο αναλυτής Orbitrap παρουσιάζει πολύ υψηλή διακριτική ικανότητα (mass resolution: έως 150.000), μεγάλη ακρίβεια μάζας (mass accuracy: 2-5 ppm) (εσωτερική και εξωτερική Βαθμονόμηση, αντίστοιχα) καθώς επίσης, έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης μεγάλου εύρους μαζών (mass range: 1-5000) και να συνδυαστεί με MS/MS αναλύσεις (Zubarev and Makarov, 2013, Perry *et al.*, 2008). Έχει τη μεγαλύτερη χωρητικότητα από τις ιοντικές παγίδες και δεν καταστρέφει την ανίχνευση ιόντων. Η μεγάλη ακρίβεια μάζας και η πολυπλοκότητα του επιτρέπει να χρησιμοποιείται στην ανάλυση εξαιρετικά σύνθετων μειγμάτων όπως είναι οι αναλύσεις κυττάρων (Marshall and Hendrickson, 2002).

Όμως, είναι ακριβό όργανο και ειδικά οι υβριδικοί αναλυτές και έχει πολύπλοκη λειτουργία. Επίσης, ένα άλλο μειονέκτημα που εμφανίζει είναι η σχετικά αργή σάρωση και υψηλή απαίτηση κενού (10⁻⁸ Torr)

1.13.3 Προεπεξεργασία δεδομένων

Στην αρχή, τα ιόντα των ενώσεων που δεν σχετίζονται με την ανάλυση του βιολογικού υλικού πρέπει να ανιχνευθούν και να απομακρυνθούν από την περαιτέρω ανάλυση. Τα σήματα αυτά προέρχονται συνήθως από τα αποτελέσματα του οργάνου ή μόλυνση των δειγμάτων, ή ακαθαρσίες των διαλυτών και της στήλης, τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγοποίηση των δειγμάτων. Σε περίπτωση που δεν ανιχνευθούν αυτά τα σήματα θα έχει ως αποτέλεσμα τα αποτελέσματα των αναλύσεων να έχουν λανθασμένη ερμηνεία. Για να αποφευχθεί αυτό το σφάλμα γίνεται ανάλυση τυφλών δειγμάτων που έχουν προετοιμαστεί ακολουθώντας τα ίδια πρωτόκολλα όπως τα βιολογικά δείγματα και είναι πολύ χρήσιμα για την ανίχνευση αυτών σημάτων. Στη συνέχεια, τα φάσματα ευθυγραμμίζονται με βάση τη διατήρηση φορές ή αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z). Επομένως, τα πολλαπλά σήματα που προκύπτουν από μια μεμονωμένη ένωση πρέπει να είναι ανιχνεύονται και συνοψίζονται. Αυτά τα σήματα θα μπορούσαν να είναι το αποτέλεσμα μιας ατελούς παραγοντοποίησης. Στο τελευταίο στάδιο τα φάσματα MS κανονικοποιούνται και υποβάλλονται σε πολυπαραγοντική ανάλυση για την ανίχνευση των τάσεων και των βιοσημαντών (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

1.13.4 Στατιστική/βιοπληροφορική ανάλυση

Η μεταβολομική στηρίζεται στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η οποία σχετίζεται με τη στατιστική προσέγγιση της ανάλυσης του τεράστιου όγκου των δεδομένων που προέρχονται από πειράματα μεταβολομικής. Η εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων-διακριτικής ανάλυσης (Partial Least Squares-Discriminant Analysis, PLS-DA) χρησιμοποιείται για να ανακαλυφθούν οι κρυφές μεταβλητές που συμβάλλουν στο διαχωρισμό των κατηγοριών. Με αυτό τον τρόπο γίνεται η ανίχνευση των πιο σημαντικών μεταβλητών (βιοσημαντών) των οποίων οι παρατηρούμενοι διαχωρισμοί θα πρέπει να βασίζονται στο PLS-DA. Το ορθογώνιο PLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis

OPLS-DA) αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδος που έχει σχεδιαστεί για να χειρίζεται τη διακύμανση στον άξονα X ο οποίος είναι κάθετος στον άξονα Y. Αυτή η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε πειράματα μεταβολομικής για τη διάκριση μεταξύ των επεμβάσεων και της ανίχνευσης των βιοσημαντών. Επιπλέον, η εφαρμογή multi-block πολυπαραγοντική ανάλυση σε συνδυαστικά δεδομένα που λαμβάνονται από διαφορετικές αναλυτικές μεθόδους πλατφόρμες αποδείχθηκε ότι είναι μια ισχυρή στατιστική μέθοδος η οποία παρέχει πολύτιμες συμπληρωματικές πληροφορίες για την υψηλή απόδοση ταυτοποίηση των ενώσεων σε σύνθετα δείγματα. Προεπεξεργασμένες μήτρες δεδομένων λαμβάνονται από διαφορετικές αναλυτικές πλατφόρμες και συνδυάζονται σε μία ενιαία μήτρα και στη συνέχεια υποβάλλονται σε multi-block πολυπαραγοντικές αναλύσεις όπως multi-block PLS-DA.

Αν και οι παραπάνω μέθοδοι PCA και PLS-DA είναι οι κύριες στατιστικές αναλύσεις που χρησιμοποιούνται στη μεταβολομική για την ανίχνευση τάσεων και βιοσημαντών. Η ιεραρχική ομαδοποίηση (Hierarchical Clustering Analysis, HCA) μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά στις μεθόδους PCA και PLS-DA, καθώς είναι μια στατιστική μεθοδολογία που παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την ομαδοποίηση των επεμβάσεων σε μεγάλα σύνολα δεδομένων. Η μέθοδος HCA έχει σκοπό να ομαδοποιηθούν σε ομάδες οι επεμβάσεις που βρίσκονται κοντά μεταξύ τους. Το HCA αρχίζει με έναν αριθμό συμπλεγμάτων που είναι ίσο με αυτό των παρατηρήσεων και σταδιακά οι δύο οι παρατηρήσεις ή τα συμπλέγματα που βρίσκονται πιο κοντά συγχωνεύονται σε ένα σύμπλεγμα. Ο υπολογισμός των αποστάσεων ομαδοποίησης βασίζεται σε αλγορίθμους. Τα αποτελέσματα του HCA παρουσιάζονται σε δένδρογράμματα, όπου οι παρατηρήσεις απεικονίζονται σε σχέση με τις αποστάσεις του συμπλέγματος. (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

Παράλληλα, η ύπαρξη εργαλείων βιοπληροφορικής όπως BIOCYC Human Metabolome Database (<https://biocyc.org/>) και η μεταβολική βάση δεδομένων KEGG (i.e., Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome, KEGG). δίνουν μεγάλες δυνατότητες όταν συνδυαστούν με μεταβολομική.

2. Σκοπός της έρευνας

Σκοπό της έρευνας αποτέλεσε η ανάπτυξη μεθοδολογίας υψηλής ρυθμοαπόδοσης για την αξιολόγηση της τοξικότητας Φ.Π. και συγκεκριμένα εντομοκτόνων, μέσω της μελέτης των επιπτώσεών τους στο μεταβολισμό πρότυπων βιολογικών συστημάτων (κυτταροκαλλιιεργειών) με εφαρμογή μεταβολομικής. Επιπλέον, σκοπό αποτέλεσε η ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών των παρατηρούμενων τοξικοτήτων των εφαρμοζόμενων δ.ο. και του μείγματος τους με την εφαρμογή μεταβολομικής.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Χημικά και αντιδραστήρια

Στις βιοδοκιμές αξιολογήθηκαν οι δ.ο. με εντομοκτόνο δράση, clothianidin (99.4% β/β, Bayer Crop Science, Leverkusen, Germany), imidacloprid (98.7% β/β, Bayer Crop Science, Leverkusen, Germany) και diazinon (96 % β/β, Sigma-Aldrich Ltd, Steinheim, Germany). Για τη διάλυση των ουσιών χρησιμοποιήθηκε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (Merck, USA) και τα πρότυπα διαλύματα διατηρούνταν στους -20°C. Για τις εκχυλίσεις και την προετοιμασία των NSCs για μεταβολομική ανάλυση του ενδομεταβολόματός τους με αέριο χρωματογράφο-φασματομέτρο μάζας (GC/EI/MS), χρησιμοποιήθηκαν: ρυθμιστικό διάλυμα PBS (NaCl 8 g L⁻¹, KCl 0,2 g L⁻¹, Na_2HPO_4 1,42 g L⁻¹ και KH_2PO_4 0,24 g L⁻¹), πυριδίνη (99.8% β/β), methoxylamine hydrochloride (98%) N-methyl-N-(trimethyl-silyl) trifluoroacetamide (MSTFA). Για τις εκχυλίσεις των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες μεθανόλη και οξικός αιθυλεστέρας (GC/MS grade, Carlo Erba Reagents, val de Reuil, France).

3.2 Βιολογικό Υλικό: απομόνωση και καλλιέργεια νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs) και νευροβλαστώματα N2a

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες NSCs και η κυτταρική σειρά N2a.

3.2.1 Νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs)

Στο πρώτο πείραμα για την αξιολόγηση τη τοξικότητας των εντομοκτόνων (clothianidin, imidacloprid και diazinon) χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο βιολογικό σύστημα NSCs, τα οποία απομονώνονταν από εγκεφάλους νεογέννητων ποντικών. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το ερευνητικό Ελληνικό Ινστιτούτο ΠΑΣΤΕΡ (Hellenic Pasteur Institute)-Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευρολογίας.

Όλα τα ερευνητικά πρωτόκολλα που αφορούν στο χειρισμό των πειραματικών ζωικών μοντέλων πραγματοποιούνται σύμφωνα με την ισχύουσα ελληνική νομοθεσία και την οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης (86/906/ΕΟΚ) για την προστασία των χρησιμοποιημένων ζώων. Όλα τα ζώα χειρίστηκαν σύμφωνα με

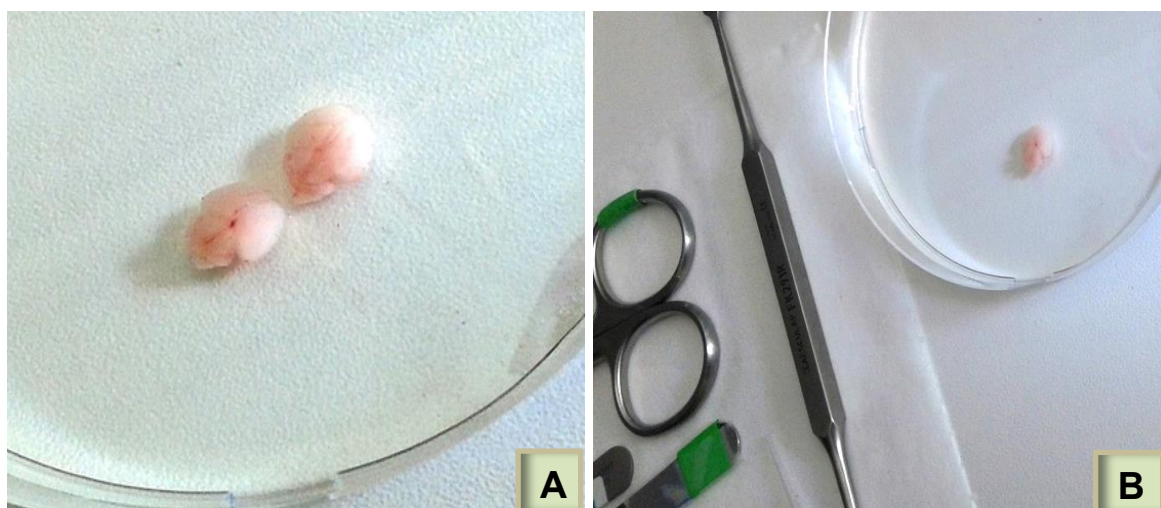
τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Υ.) για τα δικαιώματα των ζώων (86/906 / ΕΟΚ και 2007/526 / ΕΕ)

3.2.1.1 Απομόνωση νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)

Για την απομόνωση NSCs χρησιμοποιούνταν εγκέφαλοι από 4-5 ημερών ποντίκια του είδους *Mus musculus* (C 57BL/ 6J). Τα ζώα διατηρούνταν και αναπαράγονταν σε πιστοποιημένο ζωοτροφείο στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Τα πειραματόζωα διατηρούνταν σε σταθερό κύκλο φωτός/σκότους 12 ωρών με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Οι “weaver” μύες τρέφονται με ενισχυμένη σε αμινοξέα και θρεπτικά συστατικά υγρή τροφή, τα νεογνά παρέμεναν με τη μητέρα τους και τρέφονταν από αυτή.

Αναλυτικότερα, τα νεογνά θανατώνονταν με τομή που πραγματοποιούνταν στο σημείο του λαιμού και διαχώριζε το κρανίο από το υπόλοιπο σώμα των ζώων. Στη συνέχεια, ο εγκέφαλος απομονώνονταν από το κρανίο των ζώων με χρήση ειδικών λαβίδων, ψαλιδιού και σπάτουλας. Κάθε εγκέφαλος που απομονωνόταν τοποθετούνταν σε τρυβλίο με κρύο (σε θερμοκρασία πάγου) ρυθμιστικό διάλυμα PBS (**Εικόνες 29 A & B**).

Στη συνέχεια, επιλέγονταν η έσω υποκοιλιακή ζώνη στο στερεοοσκόπιο, σημείο στο οποίο βρίσκονται τα NSCs. Για να επιτευχθεί αυτό, με τη χρήση των λαβίδων αφαιρούνταν οι ινοβλάστες και η παρεγκεφαλίδα από τους εγκεφάλους. Τα δυο ημισφαίρια διχοτομούνταν στη μέση και από την κάτω εσωτερική πλευρά του κυπέλου της υποκοιλιακής ζώνης (SVZ) παίρνονταν μικρά κομμάτια ιστού και μεταφέρονταν σε σωλήνα (falcon) των 15 mL. Ο ιστός αυτός επιλέχθηκε για να γίνει το παρακάτω πρωτόκολλο για την απομόνωση των NSCs.



Εικόνα 29 A&B. Οι εγκεφαλοι ποντικών του είδους *Mus musculus* (C 57BL/ 6J) μετά το διαχωρισμό τους από το κρανίο (**A**) τοποθετούνταν σε παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS μέσα σε τρυβλίο (**B**), για να ακολουθήσει ο διαχωρισμός και η επιλογή της έσω υποκοιλιακής ζώνης

3.2.1.2 Απομόνωση NSCs από τον ιστό της έσω υποκοιλιακής ζώνης από ποντίκια *Mus musculus*

Ο ιστός της έσω υποκοιλιακής ζώνης από ποντίκια *Mus musculus* μεταφέρονταν σε σωλήνα (falcon) των 15 mL και επωάζονταν στο dissociation media με το **Διάλυμα 1 (Πίνακας 7)**, για 15 λεπτά στους 37°C. Πριν τη διαδικασία αυτή, το διάλυμα φιλτραρίζονταν και προστίθενται DNάση. Το ένζυμο αυτό έχει την ιδιότητα να σπάει σε μικρότερα κομμάτια τα θραύσματα του DNA.

Dissociation Media

Διάλυμα 1

	5 mL
Θρυψίνη	66 mL (stock 100 mg mL ⁻¹)
Υαλουρονιδάση	70 mL (stock 50 mg mL ⁻¹)
Κινηρενικό οξύ	10 mL (stock 100 mg mL ⁻¹)
DNάση	100 mL

Πίνακας 7. Σύσταση του Διαλύματος 1 (HBSS-Γλυκόζη)

Υλικό	Ποσότητες
HBSS 1X τελικό όγκο	500 mL
D-Γλυκόζη (stock 300 mg mL ⁻¹)	9.0 mL
HEPES 1 M	7.5 mL

Στη συνέχεια, ο ιστός που βρίσκονταν μέσα στο σωλήνα (falcon). Μεταφέρονταν στο θάλαμο κάθετης ροής (laminar), ακολουθούσε (απαλή) λειοτρίβηση 10 φορές (ή περισσότερο) με πιπέτα (pasteur) των 5 mL, η οποία πρώτα είχε πυρακτωθεί προκειμένου να μειωθεί η διάμετρος της διατομής της. Το διάλυμα μεταφέρονταν στον επωαστικό θάλαμο για 15 λεπτά στους 37°C. Μέγιστος συνολικός χρόνος επώασης σε αυτό το μέσο 30 λεπτά. Έπειτα, ο ιστός αναμιγνύονταν με 1 mL από το παγωμένο *Διάλυμα 3* (**Πίνακας 8**).

Πίνακας 8. Σύσταση του Διαλύματος 3 (BSA-EBSS-HEPES)

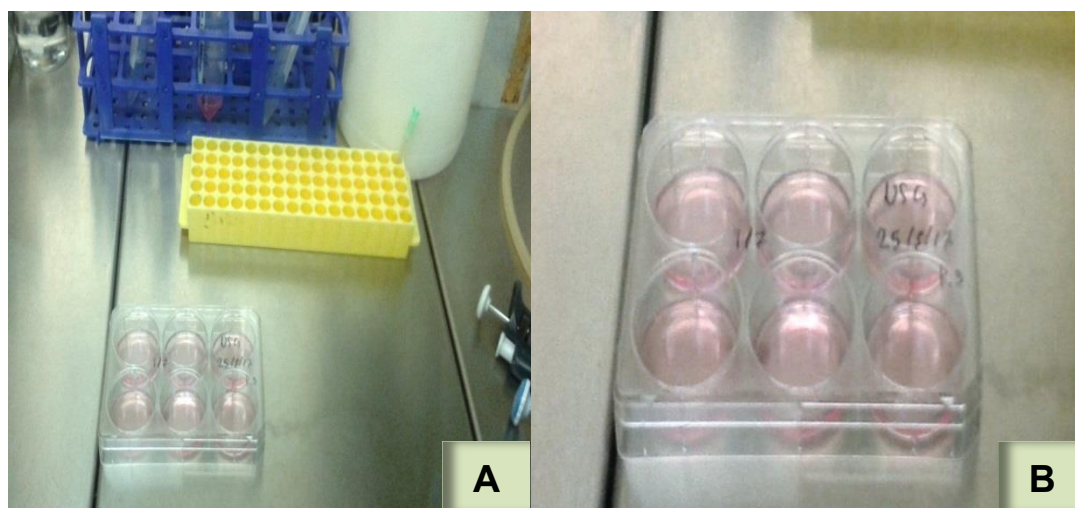
Υλικό	Ποσότητες
BSA	20 g
HEPES 1M	10 mL
EBSS 1X Gibco (τελικό όγκο)	500 mL

Τα κύτταρα περνούσαν σε ειδικό φίλτρο 70μm (BD Falcon 2350). Ακολουθούσε η διαδικασία της φυγοκέντρωσης για 5 λεπτά με ταχύτητα 830 rpm. Απομακρύνονταν το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναφέρονταν σε 10 mL παγωμένου *Διαλύματος 2* (**Πίνακας 9**). Πραγματοποιούνταν φυγοκέντρωση στο διάλυμα με μεγαλύτερη ταχύτητα 1800rpm για 10 λεπτά. Απομακρύνονταν το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναφέρονταν σε 2 mL παγωμένου *Διαλύματος 3*. Σε αυτό το στάδιο, χρησιμοποιούνταν ένας μικρός σωλήνας (falcon) και συμπληρώνονταν με 12 mL *Διάλυμα 3*. Εφαρμόζονταν 2 mL κυτταρικού εναιωρήματος στην κορυφή του νέου σωλήνα. Το διάλυμα μεταφέρονταν για φυγοκέντρωση για 7 λεπτά στα 830 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνονταν και τα κύτταρα τοποθετούνταν σε πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας 6 θέσεων με κατάλληλο

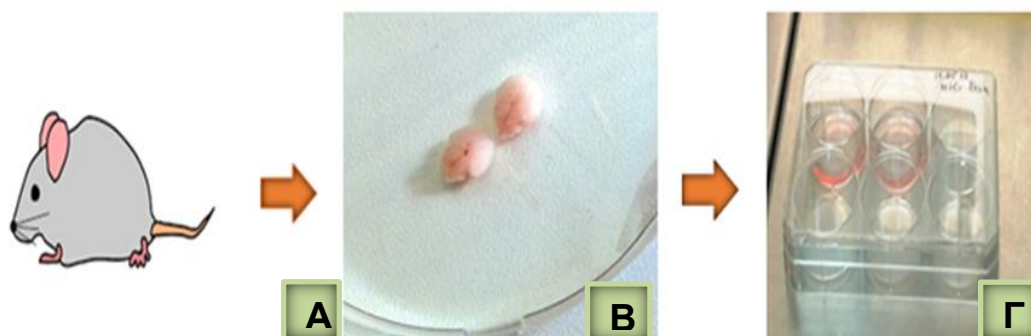
θρεπτικό μέσο (**Εικόνα 30**). Κάθε 5-7 ημέρες πραγματοποιούνται το πέρασμα των κυτάρων. Για να εξασφαλιστεί ότι όλα τα κύτταρα της πρωτογενούς καλλιέργειας είναι αποκλειστικά NSCs πραγματοποιούνται τουλάχιστον τρία περάσματα στην καλλιέργεια, κατά τα οποία λόγω του θρεπτικού διαλύματος επιβίωσαν μόνο αυτά (**Εικόνα 31**).

Πίνακας 9. Σύσταση του Διαλύματος 2 (Σουκρόζη –HBSS)

Υλικό	Ποσότητες
HBSS 1X (τελικό όγκο)	500 mL
Σουκρόζη	154 g



Εικόνα 30. Πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας 6 θέσεων (**A**) που περιέχουν θρεπτικό μέσο κατάλληλο για την ανάπτυξη νευρικών βλαστικών κυτάρων του είδους *Mus musculus* (C 57BL/ 6J) μέσα σε θάλαμο κάθετης ροής (Laminar) (**B**)



Εικόνα 31. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων απομόνωσης των νευρικών βλαστικών κυττάρων του είδους *Mus musculus* (C 57BL/ 6J) ποντίκι ως πρότυπος οργανισμός (**A**), απομόνωση εγκεφάλων (**B**), πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας 6 θέσεων που περιέχουν θρεπτικό μέσο κατάλληλο για την ανάπτυξη NSCs (**Γ**)

3.3 Θρεπτικά υποστρώματα για την απομόνωση και καλλιέργεια των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs) και νευροβλαστώματα N2a

3.3.1 Απομόνωση και καλλιέργεια NSCs

Για την παρασκευή των διαλυμάτων για την απομόνωση NSCs χρησιμοποιήθηκε HEPES, HBSS 1X (Gibco, New York, USA) και BSA (Sigma-Aldrich Ltd, Steinheim, Germany). Για τα Dissociation Media χρησιμοποιήθηκαν θρυψίνη, υαλουρονιδάση, κινηρενικό οξύ και DNάση (Sigma-Aldrich Ltd, Steinheim, Germany).

Για την παρασκευή των διαλυμάτων ανάπτυξης NSCs χρησιμοποιήθηκαν:

1. DMEM: (1 g L⁻¹ D-γλυκόζη: L-γλουταμίνη: πυρουβικό οξύ) (Invitrogen Ltd, Carlsbad, United States)
2. F-12 θρεπτικό μείγμα (Gibco)
3. 1% (w/v) διάλυμα πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Invitrogen Ltd)
4. B-27 χωρίς συμπλήρωμα ορού (Gibco)
5. HEPES ρυθμιστικό διάλυμα (Gibco)
6. (EGF) R&D Systems Inc. (Minneapolis, USA)
7. (bFGF) R&D Systems Inc. (Minneapolis, USA)
8. Θρυψίνη/ EDTA (Invitrogen Ltd)

3.3.2 Υλικό ανάπτυξης νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιούνταν για την καλλιέργεια αποτελούνταν από μείγμα 1:1 DMEM- F-12 Nutrient Mixture και όλα τα παρακάτω υλικά. Στο θρεπτικό διάλυμα προσθέτονταν επίσης δυο αυξητικοί παράγοντες ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF) και ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor, bFGF) (**Πίνακας 10**). Οι παράγοντες αυτοί είναι κατάλληλοι για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό μόνο των NSCs,

τα υπόλοιπα είδη κυττάρων που υπήρχαν στην καλλιέργεια δεν κατάφεραν να επιβιώσουν με την προσθήκη των συγκεκριμένων αυξητικών παραγόντων.

Πίνακας 10. Στο πίνακα παρατίθενται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη καλλιέργεια των NSCs

Υλικό	Ποσότητες
DMEM: (1 g L ⁻¹ D-Γλυκόζη: L-Γλουταμίνη: Πυρουβικό οξύ)	25 mL
F-12 θρεπτικό μείγμα	25 mL
Πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη	100 mL
B-27 χωρίς συμπλήρωμα ορού	50 µL
Hepes ρυθμιστικό διάλυμα	1 M (400 µL 50mL ⁻¹)
(EGF)	(2 µL 500 µg mL ⁻¹)
(bFGF)	(10 µL 100 µg mL ⁻¹)
Θρυψίνη/ EDTA	100 mL

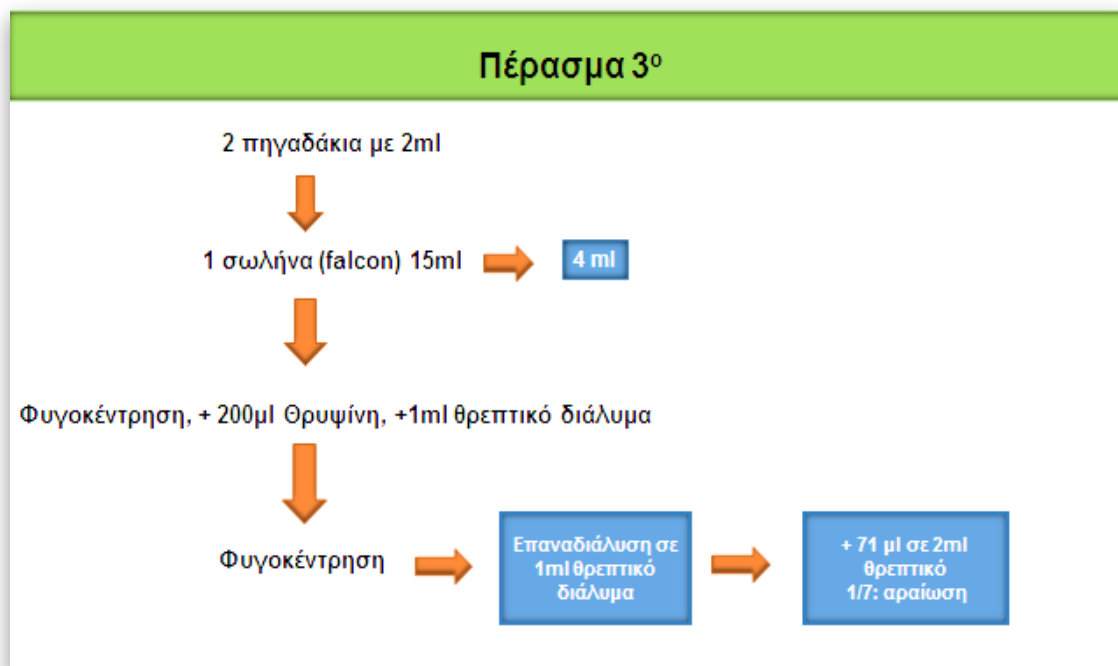
3.3.3 Πέρασμα νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)

Αρχικά, συλλέγονταν το θρεπτικό υλικό με τις νευρόσφαιρες και μεταφέρονταν σε σωλήνα (falcon) των 15 mL. Ακολουθούσε η διαδικασία της φυγοκέντρωσης σε ταχύτητα 830 rpm για 7 λεπτά. Απομακρύνονταν το υπερκείμενο, προσθέτονταν 200 µL θρυψίνη/EDTA (πραγματοποιούνταν καλή ανάδευση με τη χρήση πιπέτας) και ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 5 λεπτά. Η θρυψίνη χρησιμοποιούνταν για να σπάσουν μεταξύ τους οι νευρόσφαιρες, για αυτό απαιτούσε προσοχή ώστε να μην ξεπεραστεί ο χρόνος επώασης, διότι υπήρχε κίνδυνος διάλυσης των κυτταρικών μεμβρανών. Στη συνέχεια, προσθέτονταν στο διάλυμα 1 mL DMEM/ 10% FCS/FBS για τη διακοπή της αντίδρασης.

Για την ομογενοποίηση των κυττάρων και προκειμένου να πάρουμε μοναδιαία καλλιέργεια χρησιμοποιούνταν πιπέτες (pasteur) οι οποίες πρώτα πυρακτώνονταν ώστε να μειωθεί η διάμετρος της διατομής τους. Επαναλαμβάνονταν η διαδικασία της φυγοκέντρωσης στα 830 rpm για 5 λεπτά. Απομακρύνονταν το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναιωρηματοποιούνταν σε νέο θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα μεταφέρονταν σε πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας 6 θέσεων. Αναλυτικότερα,

τοποθετούνταν 2 mL θρεπτικό μέσο σε κάθε πηγαδάκι και προσθέτονταν κύτταρα σταγόνα σταγόνα περιμετρικά (**Εικόνα 32**).

Τέλος, για να εξασφαλιστεί καλή διασπορά των νευρόσφαιρων στα πηγαδάκια πραγματοποιούνταν ανακίνηση σε σχήμα σταυρού και το πλακίδιο μεταφέρονταν στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C, με σχετική υγρασία (RH) 90% και 5% CO₂.



Εικόνα 32. Σχηματική απεικόνιση από το 3^ο πέρασμα της καλλιέργειας. Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθούνταν για όλα τα περάσματα της κυτταροκαλλιέργειας NSCs

3.4 Νευροβλαστώματα N2a

3.4.1 Καλλιέργεια και απομόνωση κυττάρων N2a

Στο δεύτερο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Neuro-2a της American Tissue Culture Collection (ATCC®) CCL-131™, η οποία προέρχεται από νευροβλαστώματα εγκεφάλου ποντικίου (*Mus musculus*). Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το πρόσφατο πρωτόκολλο της βιολογίας κυττάρου «Βασικές Τεχνικές σε Κυτταροκαλλιέργειες Θηλαστικών» (Craig et al., 2006). Το πείραμα διεξήχθη σε συνεργασία με το Εργαστήριο Κυτταρικής Τεχνολογίας του Γ.Π.Α.

Η κυτταρική σειρά N2a αποθηκεύονταν και διατηρούνταν σε κρυο-φιαλίδιο στους -80°C . Στη συνέχεια, ακολουθούσε η διαδικασία της απόψυξης. Το κρυο-φιαλίδιο (cryovial) το οποίο περιείχε ειδικό μέσο για ξεπάγωμα (freezing solution) τοποθετούνταν στο υδατόλουτρο στους 37°C . Όταν το περιεχόμενο υγροποιούνταν, ακολουθούσε αραίωση περίπου είκοσι φορές με θρεπτικό υλικό το οποίο πρώτα προθερμαίνονταν στους 37°C , τοποθετούνταν σε φιάλες καλλιέργειας και μεταφέρονταν στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C , 5% CO_2 .

3.4.2 Διαδικασία του περάσματος των κυττάρων N2a

Τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε ειδική φλάσκα στον επωαστικό θάλαμο. Μεταφέρονταν σε θάλαμο κάθετης ροής (laminar) και με τη χρήση πιπέτας συλλέγονταν το θρεπτικό μέσο από τη φλάσκα ώστε να μείνουν μόνο τα κύτταρα. Ακολουθούσε ξέπλυμα των κυττάρων με (1-2 mL) PBS για την απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων. Στη συνέχεια για την αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα προσθέτονταν ενζυμικό διάλυμα 1 mL θρυψίνη/EDTA και η καλλιέργεια μεταφέρονταν στον επωαστικό θάλαμο για 5-10 λεπτά. Ακολουθούσε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε 9 mL θρεπτικό μέσο DMED, τα κύτταρα μεταφέρονταν σε σωλήνα (falcon) των 15 mL και ακολουθούσε φυγοκέντρηση για 4 λεπτά με ταχύτητα 1200 rpm. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθέτονταν 1 mL θρεπτικό μέσο. Στο τελικό στάδιο προσθέτονταν 20 mL θρεπτικό 1/10 κύτταρα (**Εικόνα 33**). Μεταφορά της καλλιέργειας στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C με 5 % CO_2 .



Εικόνα 33. Ειδική φλάσκα στην οποία τοποθετούνταν και αναπτύσσονταν τα κύτταρα N2a

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιούνταν για την καλλιέργεια ζωικών των κυττάρων N2a περιείχε:

- 1x DMED
- 10% (v/v) ορός εμβρύου μόσχου (FCS)
- 1% (w/v) διάλυμα πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη
- 1% (v/v) L-γλουταμίνη
- 0.5% πυρροβικό οξύ
- 7.5% NaHCO₃

Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στον επωαστικό θάλαμο με 5% CO₂ 37°C.

Για τη διάλυση των ουσιών χρησιμοποιούνταν διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (SDS CARLO ERBA). Επίσης, για την διαφοροποίηση των κυττάρων χρησιμοποιούνταν ο παράγοντας κυκλική μονοφωσφορική διβουτυλοαδενοσίνη N6,2'-O-Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt Sigma-Aldrich Ltd (Steinheim, Germany). Τέλος, για την μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων χρησιμοποιούνταν η χρωστική MTT (3-(4,5-διμεθυλοθιαζολ-2-υλ)-2,5-βρωμίδιο του διφαινυλοτετραζολίου) Sigma-Aldrich Ltd (Steinheim, Germany).

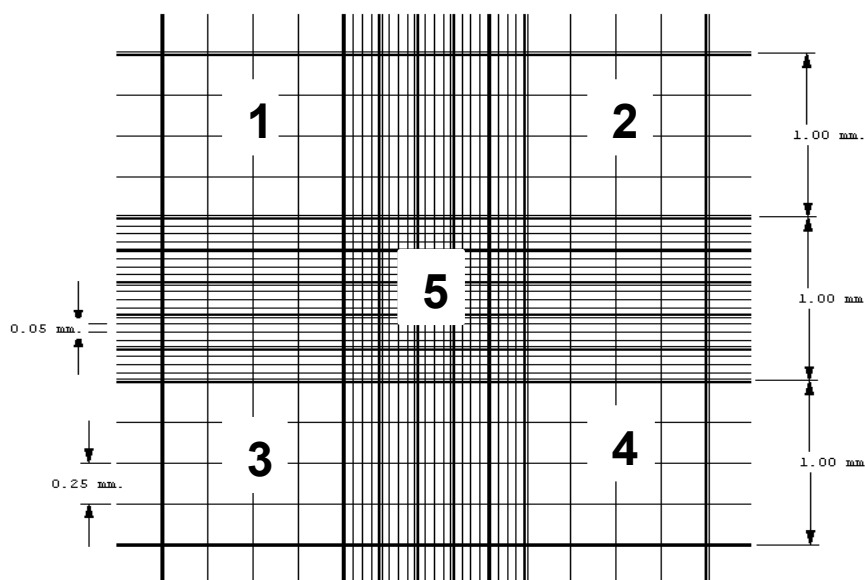
3.5 Μέτρηση αριθμού κυττάρων NSCs

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων NSCs που εμπεριέχονται σε ένα εναιώρημα πραγματοποιούνταν με τη χρήση αιματοκυτόμετρου. Το αιμοκυτόμετρο αποτελείται από μια τροποποιημένη χοντρή αντικειμενοφόρο πλάκα που έφερνε δύο ορθογώνια κοιλώματα που αποτελούσαν τους θαλάμους μέτρησης. Ο κάθε θάλαμος αποτελείται από ένα τετράγωνο πλέγμα κάθετων γραμμών, το οποίο περιείχε 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm (Kirkman-Brown and Björndahl, 2009). Πάνω στην αντικειμενοφόρο τοποθετούνταν μία καλυπτρίδα, δημιουργώντας ένας χώρος, ύψους 0,1 mm μεταξύ πλέγματος και καλυπτρίδας στον οποίο εισέρχονταν το κυτταρικό εναιώρημα.

Συνοπτικά, συλλέγονταν το θρεπτικό υλικό με τις νευρόσφαιρες, ακολουθούσε φυγοκέντρηση και προσθέτονταν στο διάλυμα 200 μL θρυψίνη/EDTA και 1 mL θρεπτικού διαλύματος σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω

(παράγραφο 3.3.3.2). Στο στάδιο αυτό, ακολουθούσε η μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων με τη χρήση αιμοκυττόμετρου (Neubauer).

Αναλυτικότερα, τοποθετούνταν στο χείλος της καλυπτρίδας 25 μL κυτταρικού εναιωρήματος σε κάθε μια από τις δυο πλευρές της πλάκας του αιμοκυττόμετρου με τη βοήθεια πιπέτας (προηγούνταν καλή ανάδευση για να εξασφαλίζεται ομοιόμορφη διασπορά των κυττάρων στο εναιώρημα με το θρεπτικό μέσο). Το εναιώρημα μόλις τοποθετούνταν το αιμοκυττόμετρο απλώνονταν στην τετραγωνισμένη επιφάνεια. Με τη βοήθεια του μικροσκοπίου μετρώνται τα πέντε (τέσσερα γωνιακά και το κεντρικό - 1,2,3,4 και 5 (**Εικόνα 34**) από τα 9 τετράγωνα. Δεν λαμβάνονται υπόψη στη μέτρηση τα κύτταρα που εφάπτονται στα πλαίσια των τετραγώνων.



Εικόνα 34. Πλέγμα κάθετων γραμμών αιμοκυττόμετρου (Πηγή: <http://www.abcam.com/protocols/counting-cells-using-a-haemocytometer>)

Για να υπολογισθεί ο συνολικός αριθμός των κυττάρων, υπολογίζονταν ο μέσος όρος των 10 τετραγώνων και πολλαπλασιάζονταν με 10^4 . Ο αριθμός που προέκυπτε πολλαπλασιάζονταν με τα mL διαλύματος που είχε το αρχικό διάλυμα και προέκυπτε ο συνολικός αριθμός των κυττάρων στο διάλυμα.

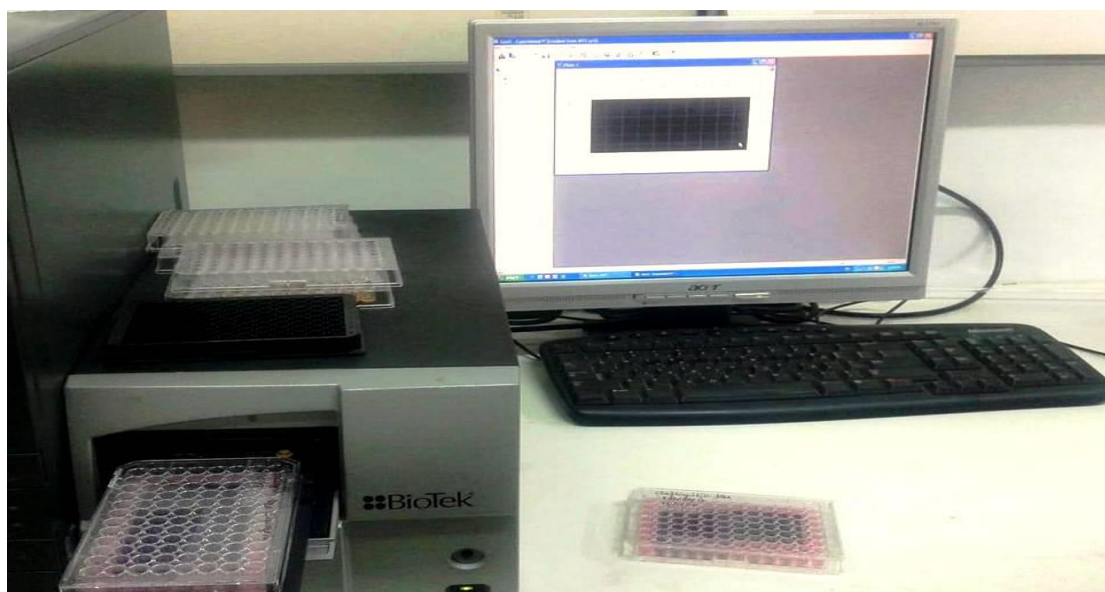
$$\text{Σύνολο κυττάρων/mL}^{-1} = \text{αριθμός μετρηθέντων κυττάρων} \times 10^4 \times \text{αραίωση}$$

3.6 Μέτρηση αριθμού κυττάρων N2a

Η μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων N2a πραγματοποιούνταν με την δοκιμή MTT, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για έλεγχο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ή για δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Η χρωστική MTT είναι άλας τετραζολίου κίτρινου χρώματος. Με βάση την ιδιότητα της τα ζωντανά κύτταρα μπορούν να ανάγουν άλατα τετραζολίου (MTT) σε χρωματιστά σύμπλοκα σχημαζόμενα ενώ τα νεκρά κύτταρα δεν μπορούν να πραγματοποιήσουν αυτή την αντίδραση (Mosmann, 1983).

Αναλυτική πορεία:

Για τη χρωστική MTT γινόταν αραιώση 5 mg/mL^{-1} σε PBS στην αρχή αφαιρούνταν από όλα τα πηγαδάκια η ποσότητα του θρεπτικού, προσθέτονταν χρωστική 20 μL MTT, ακολουθούσε επώαση των κυττάρων στον επωαστικό θάλαμο για 3 ώρες (Mosmann, 1983). Με το πέρας του χρόνου προσθέτονταν σε όλα τα πηγαδάκια 200 μL DMSO και ακολουθούσε η μέτρηση στο φωτόμετρο πλάκας Power Wave 340 με μήκος κύματος 560nm (**Εικόνα 35**). Τα αποτελέσματα εκφράζονταν ως οι Μ.Ο. $\pm$ τυπικές αποκλίσεις (SD) 3 διαφορετικών μετρήσεων. Στη συνέχεια, επεξεργάζονταν με τη μέθοδο probit στο Excel και προέκυπταν οι τιμές των μέσων συγκέντρωσης παρεμπόδισης IC_{50} .

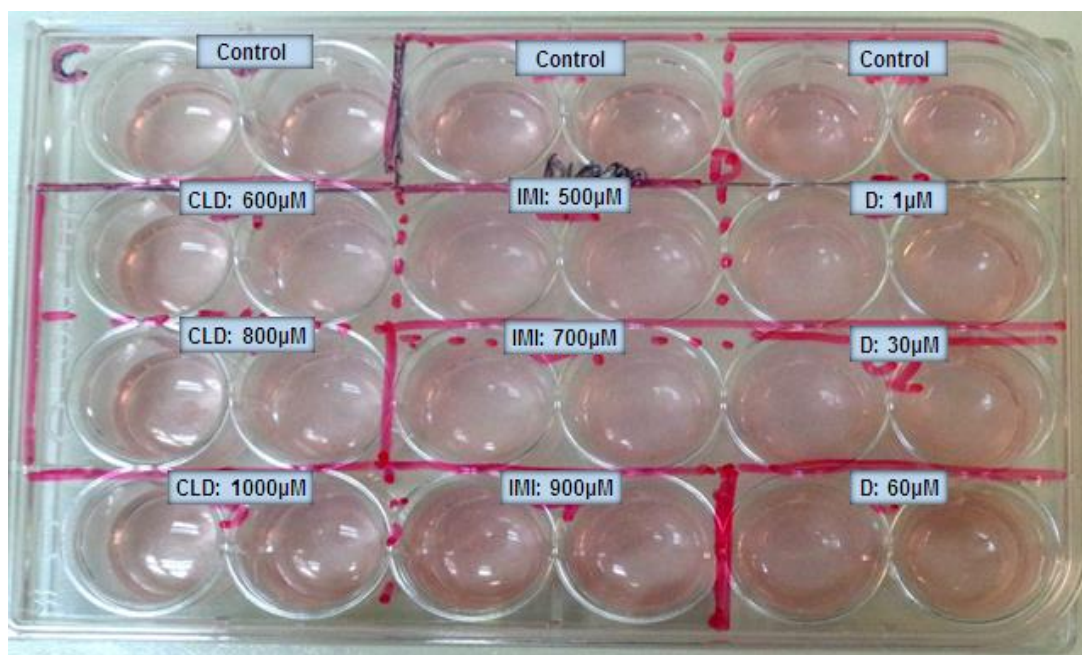


Εικόνα 35. Μέτρηση αριθμού των κυττάρων N2a με χρωστική MTT στο φωτόμετρο πλάκας Power Wave 340

3.7 Βιοδοκιμές για την αξιολόγηση της τοξικότητας των clothianidin, imidacloprid και diazinon σε νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs) και σε διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a

3.7.1 Αξιολόγηση της τοξικότητας των clothianidin, imidacloprid και diazinon σε νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs)

Για τα πειράματα μεταβολομικής είναι σημαντικό να παρεμποδίσουμε το μεταβολισμό του συστήματος που μελετάμε χωρίς να θανατωθεί εντελώς ο οργανισμός. Για αυτό το λόγο υπολογίσαμε αυτές τις τιμές. Εφαρμόστηκαν οι δ.ο. clothianidin, imidacloprid και diazinon αμέσως μετά την ολοκλήρωση του 3^{ου} περάσματος, όπου η καλλιέργεια βρισκόταν σε εκθετική ανάπτυξη. Για τον υπολογισμό της τοξικότητας των εντομοκτόνων στα NSCs, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέτρησης παρεμπόδισης πολλαπλασιασμού τους παρουσία εντομοκτόνου σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων (0-4000μM). Η δ.ο. diazinon χρησιμοποιήθηκε μόνο για τον προσδιορισμό των τιμών μέση συγκέντρωση παρεμπόδισης IC₅₀ ως θετικός μάρτυρας, λόγω της μέτριας τοξικότητας που προκαλεί στα θηλαστικά και δε χρησιμοποιήθηκε στη μεταβολομική ανάλυση. Αρχικά, στρώθηκαν 50.000 κύτταρα NSCs σε πλακίδιο κυτταροκαλλιέργειας 24 θέσεων, τοποθετήθηκαν 500 μL θρεπτικό διάλυμα σε όλα τα βοηθία και προστέθηκαν οι δ.ο. Αντίστοιχα, προστέθηκε σε όλα τα πηγαδάκια ίση ποσότητα DMSO προκειμένου να είναι ίδιες οι συνθήκες διαλυτότητας για όλες τις ουσίες και να μην ξεπερνά το 0,4% w/v DMSO. Αναλυτικά, οι συγκεντρώσεις στις οποίες δοκιμάστηκαν τα κύτταρα για το clothianidin είναι 600, 800 και 1000 μM, για το imidacloprid 500, 700 και 900 μM και για το diazinon 1, 30 και 60 μM (**Εικόνα 36**). Για κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις. Επίσης, σε έξι θέσεις του πλακιδίου τοποθετήθηκαν κύτταρα σε διάλυμα DMSO και αποτέλεσαν τον μάρτυρα του πειράματος. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας το πλακίδιο με τα κύτταρα και τα εντομοκτόνα τοποθετήθηκε στον επωαστικό θάλαμο ανάπτυξης για 48h στους 37⁰C, με σχετική υγρασία (RH) 90% και 5% CO₂%.



Εικόνα 36. Βιοδοκιμές κυτταροτοξικότητας εφαρμόστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις στα εντομοκτόνα Clothianidin (CLD), Imidacloprid (IMI) και Diazinon (D) στα NSCs

Μετά από 48 ώρες, τα πλακίδια απομακρύνθηκαν από τον επωαστικό θάλαμο ανάπτυξης και μετρήθηκαν δυο παράμετροι της παρεμπόδισης του πολλαπλασιασμού ανάπτυξης και της ζωικότητας των NSCs.

Η μέτρηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων και ο υπολογισμός της παρεμπόδισης πολλαπλασιασμού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της χρωστικής trypan blue. Η συγκεκριμένη χρωστική έχει την ιδιότητα να βάφει μόνο τα νεκρά κύτταρα και αυτό συμβαίνει γιατί δεν μπορεί να διαπεράσει τις μεμβράνες των ζωντανών κυττάρων οι οποίες είναι άρτιες/ ανέπαφες (Strober, 2015)

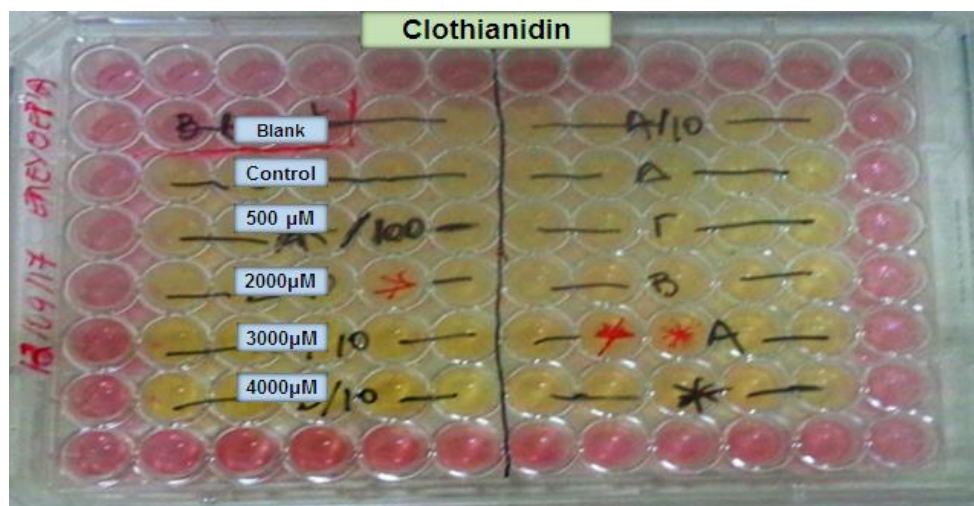
Σε σωλήνα (erpendorf) μεταφέρονταν μείγμα 1:1 (20 μ L/20 μ L) από το διάλυμα της χρωστικής trypan blue και το εναιώρημα των κυττάρων. Ακολουθούσε καλή ανάδευση στο διάλυμα και 20 μ L εναιωρήματος μεταφέρονταν όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (παράγραφο 3.5) σε κάθε πλέγμα του αιμακυταρόμετρου και ακολουθούσε μέτρηση.

Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων υπολογίζονταν με την διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω (παράγραφος 3.5). Τα αποτελέσματα επεξεργάζονταν με τη μέθοδο probit στο Excel και προκύπτουν οι τιμές των μέσων συγκέντρωσης παρεμπόδισης IC_{50} .

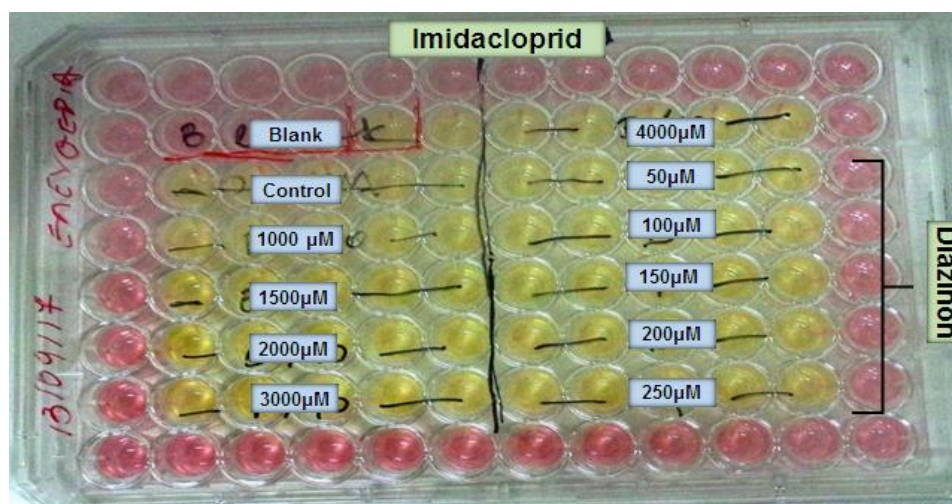
3.7.2 Αξιολόγηση της τοξικότητας των clothianidin, imidacloprid και diazinon σε διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a

Αξιολογήθηκαν οι δ.ο. clothianidin, imidacloprid και diazinon. Για τον υπολογισμό της τοξικότητας των τριών αυτών εντομοκτόνων στα κύτταρα N2a πραγματοποιούνταν πειράματα μέτρησης παρεμπόδισης πολλαπλασιασμού των κυττάρων παρουσία του εντομοκτόνου σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων (0-4000μM) σε διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Για την διαφοροποίηση των κυττάρων χρησιμοποιούνταν ο παράγοντας κυκλική μονοφωσφορική διβουτυλοαδενοσίνη (db-cAMP) ποσότητας 300 μM προκειμένου τα κύτταρα να βρεθούν σε κατάσταση αποστέρησης.

Αρχικά, στρώνονταν (10.000 - 12.000) κύτταρα N2a ανά πηγαδάκι σε 2 πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας των 96 θέσεων, τοποθετούνταν 90 μL θρεπτικό διάλυμα σε όλα τα βοθρία ενώ στα περιφεριακά κελιά του πλακιδίου προσθέτονταν μόνο 200 μL θρεπτικό διάλυμα μεταφέρονταν στον επωαστικό θάλαμο για ένα 24 ώρο προκειμένου τα κύτταρα να επικολληθούν στην πλακέτα. Με το πέρας του χρόνου τα κύτταρα μεταφέρονταν στο θάλαμο κάθετης ροής (laminar), με τη χρήση μηχανικής πιπέτας αφαιρούνταν όλο το θρεπτικό από τα βοθρία και προσθέτονταν οι δ.ο.. Αντίστοιχα, προσθέτονταν σε όλα τα πηγαδάκια ίση ποσότητα DMSO προκειμένου να είναι ίδιες οι συνθήκες διαλυτότητας για όλες τις ουσίες και να μην ξεπερνούν το 0,4% w/v DMSO. Αναλυτικά, οι συγκεντρώσεις στις οποίες δοκιμάστηκαν τα διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα κύτταρα για το clothianidin 0, 500, 2000, 3000 και 4000 μM (**Εικόνα 37**), το imidacloprid 0, 1000, 1500, 2000, 3000 και 4000 μM και για το diazinon 0, 50 100, 150, 200 και 250 μM (**Εικόνα 38**). Για κάθε επέμβαση γινόταν 5 επαναλήψεις. Επίσης, σε δυο θέσεις του πλακιδίου τοποθετούνταν κύτταρα σε διάλυμα DMSO και αποτελούσαν τον μάρτυρα του πειράματος. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα πλακίδια τοποθετούνταν στον επωαστικό θάλαμο ανάπτυξης για 48h στους 37°C, με σχετική υγρασία (RH) 90% και 5% CO₂%.



Εικόνα 37. Σε πλακίδιο κυτταροκαλλιέργειας 96 βοθρίων τα διαφοροποιημένα κύτταρα N2a επωάστηκαν με τη δ.ο. clothianidin



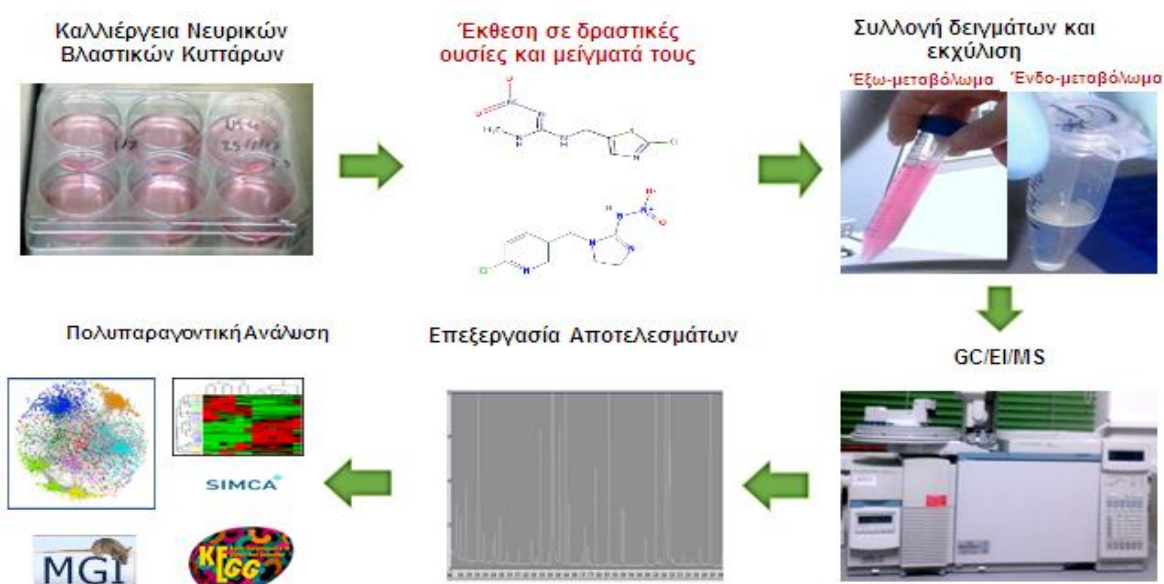
Εικόνα 38. Σε πλακίδιο κυτταροκαλλιέργειας 96 βοθρίων τα διαφοροποιημένα κύτταρα N2a επωάστηκαν με τις δ.ο. imidacloprid και diazinon

3.8 Μεταβολομική ανάλυση για τη μελέτη της επίδρασης μεμονωμένων εντομοκτόνων ή συνδυασμών τους στο μεταβολισμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)

3.8.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Για το πείραμα της μεταβολομικής στα NSCs πραγματοποιήθηκαν 4 επεμβάσεις, πιο συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν περίπου 450.000 κύτταρα ανά βοθρίο, έγινε συνένωση (pooling) ανά 4 πηγαδάκια και προέκυπτε μια επανάληψη για την κάθε

επέμβαση. Χρησιμοποιήθηκαν πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας 6 βοθρίων και για κάθε επέμβαση έγιναν 5 επαναλήψεις με μεμονωμένα εντομοκτόνα ή μείγματος τους ακολουθώντας το πρωτόκολλο που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 39**. Οι βιοδοκιμές εφαρμόστηκαν στο 50% των τιμών μέσης συγκέντρωσης παρεμπόδισης IC_{50} για κάθε ένα εντομοκτόνο ξεχωριστά και ταυτόχρονα παρασκευάστηκαν μείγματα των δύο εντομοκτόνων στο 25% της τιμής μέσης συγκέντρωσης παρεμπόδισης IC_{50} του imidacloprid και ισομοριακή ποσότητα του clothianidin. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με τα εντομοκτόνα στον επωαστικό θάλαμο για 48h στις ίδιες συνθήκες.



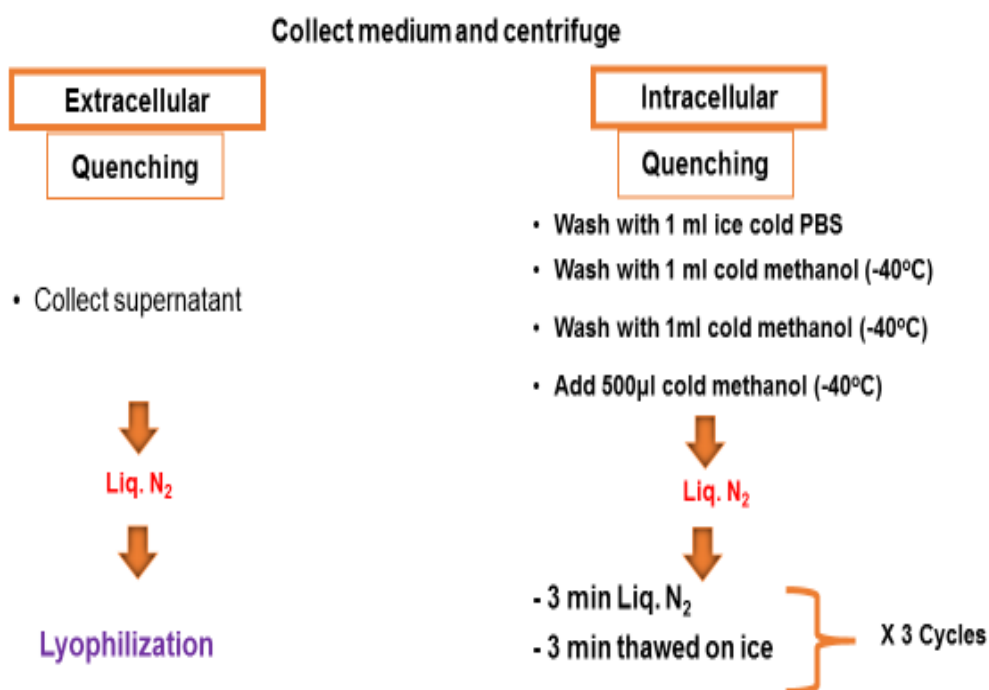
Εικόνα 39. Στάδια πειράματος μεταβολομικής ανάλυσης για τη μελέτη της επίδρασης των εντομοκτόνων clothianidin και imidacloprid και του μείγματος τους στο μεταβολισμό των νευρικών NSCs

3.8.2 Δειγματοληψία και εκχυλίσεις κυττάρων

Τα δείγματα συλλέχθηκαν 48 ώρες μετά τις επεμβάσεις με τα εντομοκτόνα σε σωλήνες (falcon) των 15 mL και εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο Κύτταρα Θηλαστικών με Μεταταβολομική: «Πειραματικός σχεδιασμός και προετοιμασία δειγμάτων» (León et al., 2013). Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5min στα 850 rpm.

Το **υπερκείμενο (extracellular)** του κάθε δείγματος μεταφέρθηκε σε καινούριο σωλήνα (falcon) (15 mL) και όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο να σταματήσει άμεσα ο μεταβολισμός τους (**quenching**). Η αποθήκευση και η συντήρηση των δειγμάτων έγινε στους -80°C . Η ανάλυση τους θα πραγματοποιηθεί σε επόμενο στάδιο και θα αποτελέσει αντικείμενο περεταίρω έρευνας.

Τα ανέπαφα κύτταρα και οι πυρήνες συσσωρεύονται στην κάτω επιφάνεια των σωλήνων (falcon) σχηματίζοντας το **πέλλετ** των κυττάρων (**intracellular**). Στο κάθε δείγμα έγινε πλύσιμο με 1 mL κρύο PBS ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5min με ταχύτητα 850rpm. Στο επόμενο στάδιο έγινε πλύσιμο των κυττάρων με κρύα μεθανόλη (-40°C) και φυγοκέντρηση των κυττάρων στις ίδιες συνθήκες για να σταματήσει άμεσα ο μεταβολισμός των κυττάρων (**quenching**). Το στάδιο αυτό επαναλήφθηκε και δεύτερη φορά. Έπειτα προστέθηκε 0,5 mL μεθανόλη σε όλα τα δείγματα και τοποθετήθηκαν στο υγρό άζωτο. Η αποθήκευση και συντήρηση των κυττάρων έγινε στους -80°C (**Εικόνα 40**).



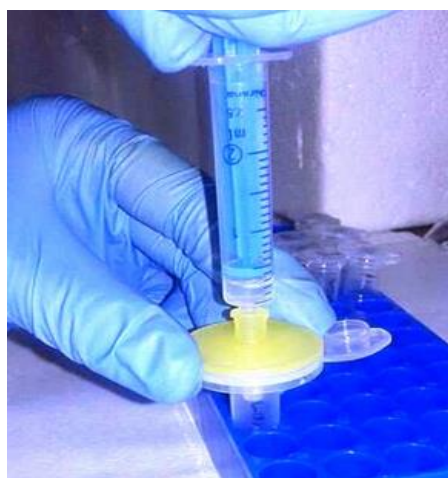
Εικόνα 40. Συλλογή και χειρισμός των NSCs για μεταβολομική ανάλυση

Το **πέλλετ (intracellular)** του κάθε δείγματος μεταφέρονταν σε erpendorfs (**Εικόνα 41**). Ακολουθεί η διαδικασία 3 λεπτά στο υγρό N₂, 3 λεπτά σε πάγο για 3 φορές για να σπάσουν οι μεμβράνες των κυττάρων.



Εικόνα 41. Στο κάτω μέρος του erpendorf έχει σχηματιστεί το πέλλετ (intracellular) των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)

Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα που προέρχονταν από το **πέλλετ (intracellular ή endo-metabolome)** των κυττάρων τοποθετήθηκαν για 30min σε λουτρό υπερήχων (Branson 1210, Danbury, USA) και ακολούθησε ανάδευση σε οριζόντιο περιστροφικό αναδευτήρα (GFL 3006, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burfwedel, Germany) για 1 ώρα στις 250 rpm στους 20°C. Στο επόμενο στάδιο τα εκχυλίσματα φιλτραρίστηκαν με φιλτράκι 0.2 μm (Macherey-Nagel, Duren, Germany) και τοποθετήθηκαν σε νέα erpendorfs (**Εικόνα 42**). Ακολούθησε η εξάτμιση των δειγμάτων σε συσκευή εξάτμισης.



Εικόνα 42. Τα δείγματα φιλτραρίστηκαν με φιλτράκι 0.2 μm και τοποθετήθηκαν σε νέα erpendorfs

Στο τελευταίο στάδιο πριν την ανάλυση των δειγμάτων ακολούθησε η διαδικασία της παραγωγοποίησης όλων των δειγμάτων **πέλλετ (intracellular ή endometabolome)**. Σε κάθε erpendorf προστίθονταν 80 μL MeOX και μεταφέρονται για 2h σε υδατόλουτρο στους 30°C (Daihan Labtech, Gyeonggi-do, Korea). Τέλος, προστίθενται 80 μL MSTFA σε όλα τα δείγματα και μεταφέρονται για 1,5h στους 37°C σε υδατόλουτρο. Με την ολοκλήρωση της παραπάνω διαδικασίας, τα δείγματα αναλύθηκαν στον αέριο χρωματογράφο GC/EI/MS.

3.8.3 Μεταβολομική ανάλυση του ενδομεταβολόματος των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs) με αέριο χρωματογράφο-φασματομέτρο μάζας (GC/EI/MS)

Για την ανάλυση των μεταβολικών προφίλ των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs) χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος Agilent 6890 MS (Agilent Technologies Inc.) που συνδέεται με ανιχνευτή μάζας 5973 (inert mass selective detector, MSD) και αυτόματο δειγματολήπτη 7683 (autosampler) (**Εικόνα 43**). Χρησιμοποιήθηκε στήλη (HP-5MS, μήκους 30m, διαμέτρου 0.25mm, πάχος υμενίου 0.25 μm , Agilent Technologies Inc.) και αναλογία έκχυσης 5:1 και θερμοκρασία 230°C. Συνολικός όγκος του κάθε δείγματος που αναλύονταν ήταν 2 μL . Ως φέρων αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο με ρυθμό ροής 1 mL min^{-1} . Η αρχική θερμοκρασία του κλιβάνου ήταν σταθερή στους 70°C για 5min και ακολούθησε αύξηση με ρυθμό 5°C min^{-1} μέχρι τους 295°C, όπου διατηρήθηκε σταθερή για 2min. Χρησιμοποιήθηκε θετικός ιονισμός ηλεκτρονίων στα 70eV. Τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης αποκτήθηκαν στην περιοχή μαζών 50-750 Da με ρυθμό 2 σαρώσεις ανά δευτερόλεπτο με αρχική καθυστέρηση 10min. Η θερμοκρασία για την πηγή MS ρυθμίστηκε στους 230°C. και για το τετραπόλο στους 150°C. Συνάμα, αναλύθηκαν κενά δείγματα (blanks) προκειμένου να ανιχνευθεί πιθανή ρύπανση από το χειρισμό και την προετοιμασία του δείγματος, τα αντιδραστήρια, τη στήλη ή το όργανο.



Εικόνα 43. Αέριος χρωματογράφος Agilent 6890N με ανιχνευτή μάζας MS 5973 inert mass selective detector (MSD)

3.8.4 Κατασκευή ανοιχτής πρόσβασης βάσης μεταβολιτών των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)

Οι μεταβολίτες που καταγράφηκαν σε αυτή τη μελέτη θα δημοσιευθούν σε βάση δεδομένων ανοιχτής πρόσβασης (υπό κατασκευή, (<https://www.aua.gr/pesticide-metabolomicsgroup/Resources/default.html>), με σκοπό την ενίσχυση μελετών μεταβολομικής σακχαρομυκήτων (**Παράρτημα Α**). Εφαρμόστηκε μεθοδολογία παρόμοια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για τη βάση μεταβολιτών του *Aspergillus nidulans* η οποία κατασκευάστηκε από την ομάδα μας (https://www.aua.gr/pesticidemetabolomicsgroup/Resources/libraries/Aspergillus_nidulans_PMG_data_sets/PMG_Aspergillus_nidulans_metabolite_library_list.html) (Kalampokis et al., 2018).

Η βάση δεδομένων κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας δεδομένα αναλύσεων GC/EI/MS και περιλαμβάνει τα φάσματα μαζών και πληροφορίες για τους μεταβολίτες όπως, τα φάσματα μαζών, το χρόνο κατακράτησης (Retention time), τη μάζα αναφοράς (quantitative mass) και τα στοιχεία Metabolites Common name, Metabolites Derivatives, Synonym(s), KEGG ID, Golm Metabolome Database ID, PubChem ID, CAS Registry Number, Biosynthetic pathway(s), Abbreviated Biosynthetic pathway(s), Monoisotopic mass (Da), Average Molecular Mass (Da), Molecular Formula και Chemical group (**Παράρτημα Α**).

Οι πληροφορίες για τη συμπλήρωση των δεδομένων λαμβάνονταν από τις βάσεις δεδομένων Kegg (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes-

GenomeNet, <http://www.genome.jp/kegg>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) και Golm Metabolome Database (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>). Επίσης στη βάση δεδομένων θα περιλαμβάνονται οι πλήρεις συνθήκες ανάλυσης (π.χ. αναλυτής, συνθήκες ανάλυσης).

3.8.5 Βιοπληροφορική-μεταβολομική ανάλυση και ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης του clothianidin, imidacloprid και του μείγματος τους στο μεταβολισμό στελεχών των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)

Για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων στη μεταβολομική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MS DIAL (Tsugawa et al., 2015). Το λογισμικό επιτρέπει την αυτοματοποίηση της προεπεξεργασίας των χρωματογραφημάτων, όπως ευθυγραμμίσεις, διόρθωση των γραμμών βάσης, συμπλήρωμα των κενών δεδομένων. Χρησιμοποιήθηκαν οι προτεινόμενες ρυθμίσεις για την ανάλυση GC/ESI/MS δεδομένων.

Η μήτρα που προέκυψε από την ανάλυση με το MS DIAL, εξήχθη στο MS Excel® για περαιτέρω ανάλυση και επεξεργασία. Πιο συγκεκριμένα, με βάση την ανάλυση των χρωματογραφημάτων με το AMDIS, κορυφές που αντιστοιχούσαν σε ουσίες άσχετες με το αναλυόμενο βιολογικό υλικό και κορυφές με δεδομένα σε λιγότερο από το 50% των επαναλήψεων για κάθε επέμβαση, αφαιρούνταν από περαιτέρω ανάλυση με σκοπό την ενίσχυση της αξιοπιστίας και ακρίβειας της ανάλυσης. Μετά την επεξεργασία αυτή, η μήτρα εξαγόταν στο λογισμικό SIMCA-P v.13.0.3 (Umetrics, MKS Instruments Inc. Umeå, Sweden) για την ανακάλυψη των τάσεων ανάμεσα στα δεδομένα και την ανακάλυψη των αντίστοιχων μεταβολιτών-βιοσημαντών με εφαρμογή πολυπαραγοντικής ανάλυσης (multivariate analysis) (Aliferis and Jabaji, 2010, Aliferis and Chrysai-Tokousbalides, 2011).

Η ανίχνευση πιθανών ακραίων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με Principal Component Analysis (PCA) και ακολούθησε η ανακάλυψη των βιοσημαντών της επίδρασης του clothianidin, imidacloprid και των μιγμάτων τους στο μεταβολισμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs) με εφαρμογή Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA, $P < 0.05$) (Aliferis and Jabaji, 2012, Aliferis and Chrysai-Tokousbalides, 2011). Επίσης, στα δεδομένα εφαρμόστηκε

ιεραρχική ανάλυση σε συστάδες (Hierarchical cluster analysis, HCA) (Aliferis and Chrysai-Tokousbalides, 2011).

Η ανακάλυψη των βιοσημαντών πραγματοποιούνταν με τη χρήση Coefficient plots για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα για τα ζεύγη των επιλεγμένων συγκρίσεων, με διαστήματα εμπιστοσύνης που προέρχονταν από jack-knifing (95%) και S-plots (Wiklund et al., 2008). Τέλος σχεδιάστηκε ο μεταβολικός χάρτης (metabolic map) χρησιμοποιώντας ως διακύμανση για τους μεταβολίτες τιμή Coefficient >1 και <-1 .

4. Αποτελέσματα & Συζήτηση

4.1 Καλλιέργεια νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs) και νευροβλαστωμάτων N2a

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την απομόνωση NSCs έδωσε καλής ποιότητας καλλιέργειες με πολλές νευρόσφαιρες και μεγάλο αριθμό κυττάρων (**Εικόνα 44**).



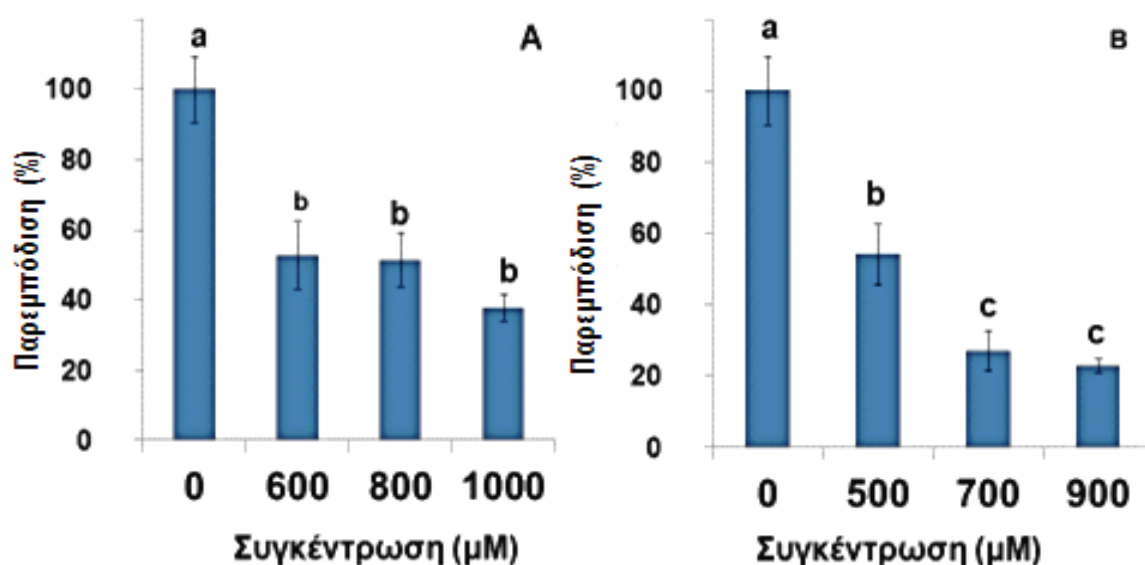
Εικόνα 44. NSCs με πολλές και μεγάλες νευρόσφαιρες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x40)

Η πρωτογενής καλλιέργεια των NSCs ήταν αρκετά ευαίσθητη στους χειρισμούς και τις μολύνσεις από βακτήρια και ιούς. Αυτό δυσκόλευε τον πειραματισμό, καθώς οι καλλιέργειες, πριν χρησιμοποιηθούν στη διεξαγωγή των πειραμάτων, απαιτούσαν να πραγματοποιούνται 3 περάσματα κάθε 3-5 μέρες. Επίσης, το στάδιο της καλλιέργειας αμέσως μετά το 3^ο πέρασμα, αποδείχθηκε ότι ήταν το καταλληλότερο για την εφαρμογή των πειραμάτων καθώς, τα κύτταρα σχημάτιζαν μεγάλες νευρόσφαιρες, η καλλιέργεια βρισκόταν σε εκθετική φάση ανάπτυξης και κατ' επέκταση υπήρχε μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων. Αντίθετα, η κυτταρική σειρά N2a ήταν πιο εύκολη στο χειρισμό, καθώς ως καρκινικά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να πολλαπλασιάζονται απεριόριστα.

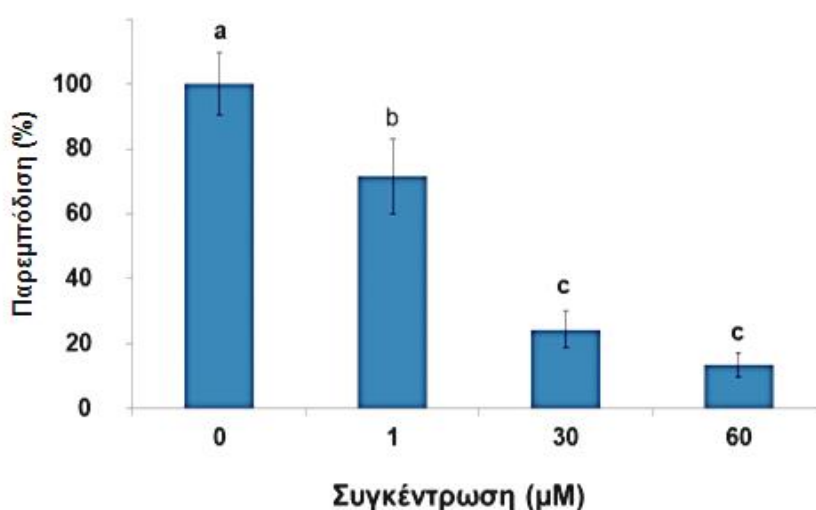
4.2 Κυτταροτοξικότητα των clothianidin, imidacloprid και diazinon στα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs) – προσδιορισμός των τιμών IC₅₀

Οι αναλύσεις μεταβολομικής για να είναι αποτελεσματικές και τα εξαγόμενα συμπεράσματα αξιόπιστα, απαιτείται η διατάραξη του μεταβολισμού του υπό μελέτη βιολογικού συστήματος και όχι η πλήρης κατάρρευσή του. Για το λόγο αυτό, σε ένα πρώτο στάδιο υπολογίστηκαν οι τιμές IC_{50} των τριών υπό μελέτη δ.ο., οι οποίες στη συνέχεια θα εφαρμόζονταν στα πειράματα μεταβολομικής.

Μετά την επώαση των κυττάρων σε ένα εύρος συγκεντρώσεων των clothianidin, imidacloprid και diazinon για 48 ώρες, μετρήθηκε το ποσοστό της παρεμπόδισης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής trypan blue. Ύστερα από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, διαπιστώθηκε ότι το diazinon ήταν πολύ τοξικό στα κύτταρα στη συγκέντρωση των 4,65 μM , παρατήρηση που επιβεβαίωσε την αποτελεσματικότητα της μεθόδου (θετικός μάρτυρας) (*Εικόνες 45 & 46*). Οι τιμές IC_{50} για τα clothianidin και imidacloprid υπολογίστηκαν στα 710 και 510 μM αντίστοιχα, με τη μέθοδο probit στο MS Excel®.



Εικόνα 45. Παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των NSCs μετά από έκθεσή τους για 48h στα εντομοκτόνα clothianidin (A) και imidacloprid (B) σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις, σε σχέση με το μάρτυρα. Η ζωτικότητα των κυττάρων προσδιορίζονται με τη χρήση της χρωστικής trypan blue. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 επαναλήψεων. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Student's t-test ($P < 95\%$)



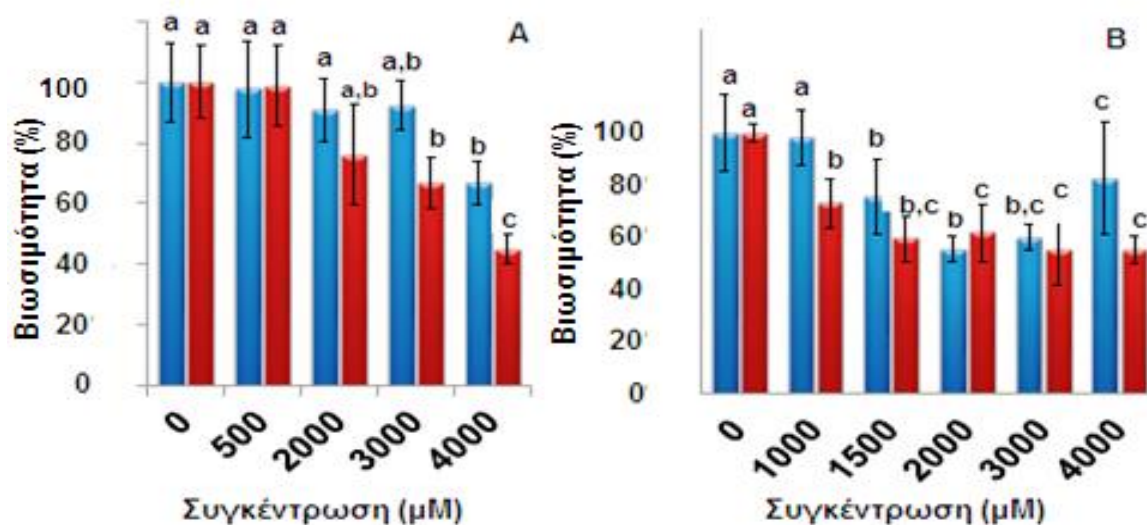
Εικόνα 46. Παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των NSCs μετά από έκθεσή τους για 48h στο εντομοκτόνο diazinon στις συγκεντρώσεις 1, 30 και 60 μM , σε σχέση με το μάρτυρα. Η ζωτικότητα των κυττάρων προσδιοριζόταν με τη χρήση της χρωστικής trypan blue. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 επαναλήψεων. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Student's t-test ($P < 95\%$)

4.3 Τα clothianidin, imidacloprid και diazinon έχουν διαφορετική επίδραση στη βιωσιμότητα διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κύτταρων N2a

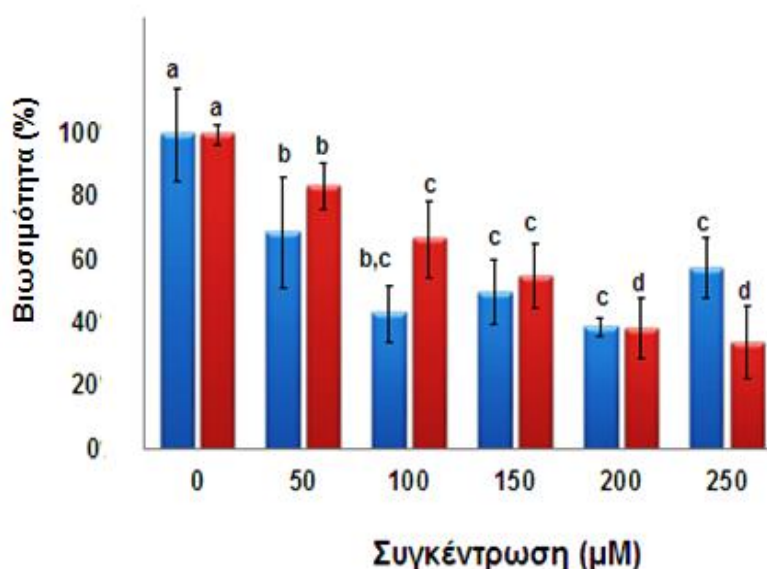
Η επίδραση των εντομοκτόνων στη βιωσιμότητα διαφοροποιημένων και μη κύτταρων N2a στις διάφορες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκε φωτομετρικά μετά από επώαση 48 ωρών (**Εικόνα 47 & 48**). Ο φωτομετρικός προσδιορισμός έγινε με βάση τη μέτρηση πρόσληψης της χρωστικής MTT. Η δοκιμή MTT εκτιμά τη βιωσιμότητα των κυττάρων μέσω της καταγραφής της μιτοχονδριακής δραστηριότητας (Mossman, 1983).

Μετά από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, διαπιστώθηκε ότι στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a οι δ.ο. clothianidin, imidacloprid και diazinon δεν παρουσίασαν αξιόλογη επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων και δεν προσδιορίστηκε η τιμή IC_{50} για καμία δ.ο. Αντίθετα, στα διαφοροποιημένα κύτταρα, το diazinon ήταν πολύ τοξικό με τιμή IC_{50} 160 μM , παρατήρηση που επιβεβαίωσε την αποτελεσματικότητα της μεθόδου (θετικός μάρτυρας). Η τιμή IC_{50} για το clothianidin υπολογίστηκε στα 3550 μM , ενώ για το imidacloprid δεν προέκυψε

τιμή IC_{50} . Με βάση τις μετρήσεις εκτιμάται ότι η IC_{50} του imidacloprid υπερβαίνει τα 4000 μM .



Εικόνα 47. Βιωσιμότητα των κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db cAMP και μη διαφοροποιημένων, μετά από επώαση με τα εντομοκτόνα clothianidin (**A**), imidacloprid (**B**) σε διάφορες συγκεντρώσεις για 48h (■ διαφοροποιημένα και ■ μη διαφοροποιημένα). Στα διαγράμματα εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT



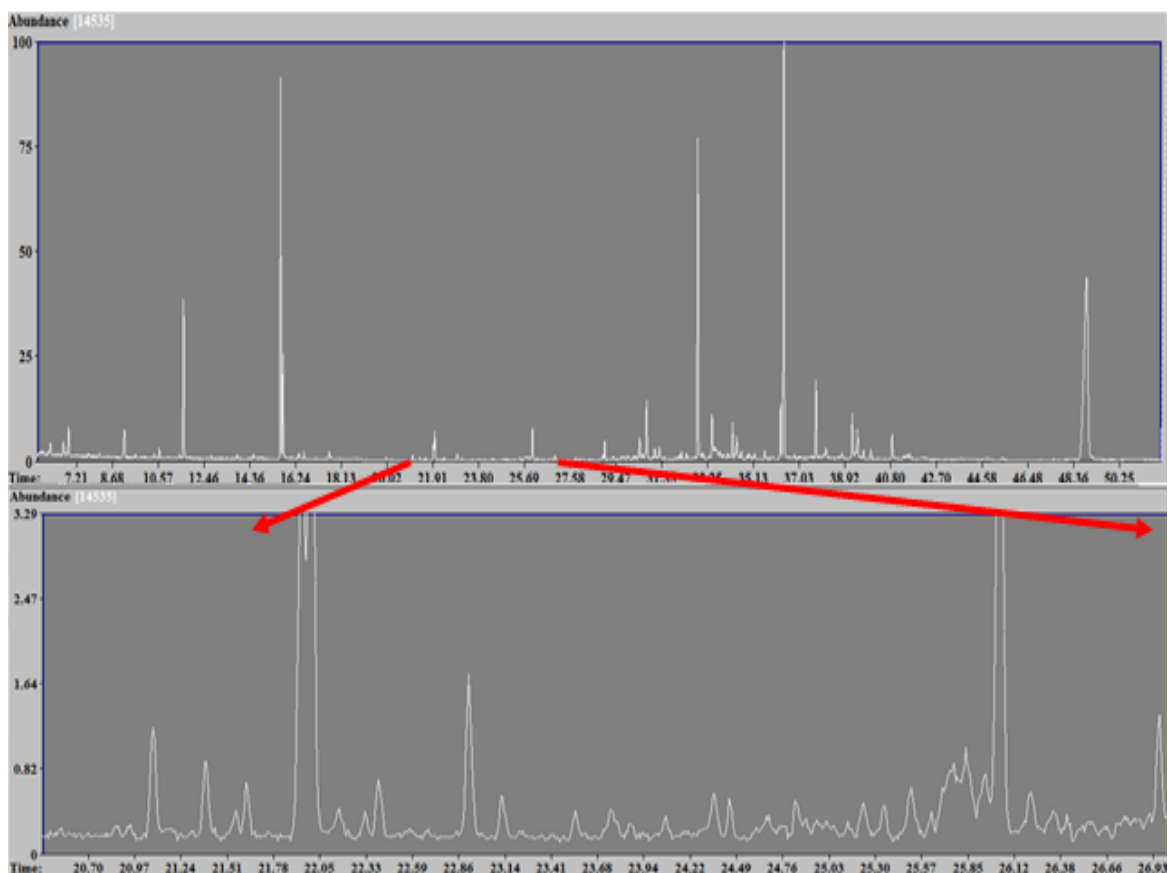
Εικόνα 48. Βιωσιμότητα των κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db cAMP και μη διαφοροποιημένων μετά από επώαση με το εντομοκτόνο diazinon σε συγκεντρώσεις 50, 100, 150, 200 και 250 μM για 48h (■ διαφοροποιημένα και ■ μη διαφοροποιημένα). Στο διάγραμμα εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT

4.4 Ανάπτυξη πρωτοκόλλου εκχύλισης του ενδο-μεταβολόμα-τος (endo-metabolome) νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε (**Παράγραφος 3.10.2**) για την εκχύλιση των μεταβολιτών από τα κύτταρα έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, όπως αναλύεται παρακάτω. Επίσης, η πυκνότητα 10^7 κύτταρα·mL⁻¹, ήταν ικανοποιητική για την καταγραφή μεγάλου αριθμού μεταβολιτών.

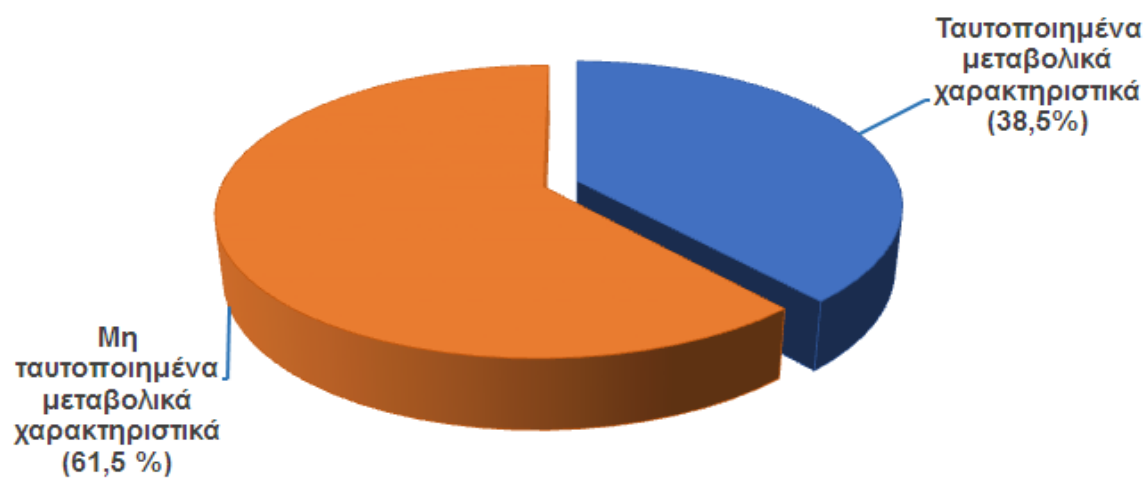
4.4.1 Ανάλυση μεταβολικού προφίλ των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)

Η ποιότητα ανάλυσης ακολουθώντας τη συγκεκριμένη μεθοδολογία φαίνεται στα χρωματογραφήματα (**Εικόνα 49**) τα οποία παρουσιάζουν καλό χρωματογραφικό διαχωρισμό, με μεμονωμένες διαδοχικές και οξείες κορυφές με χαμηλή γραμμή βάσης (base line).



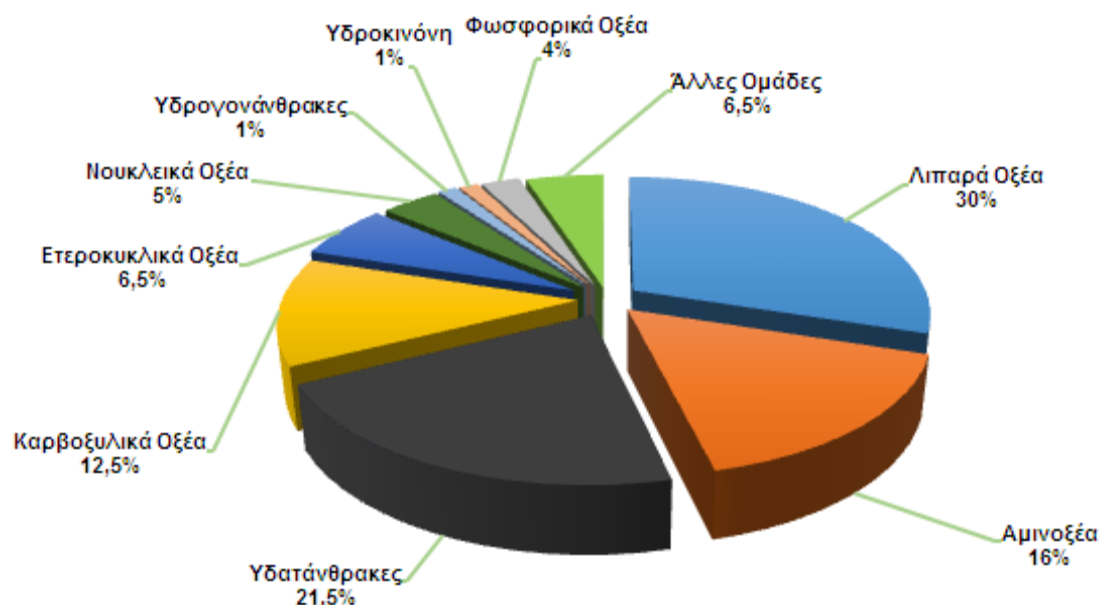
Εικόνα 49. **A)** Χρωματογράφημα GC/ΕΙ/MS μεταβολομικής ανάλυσης καλλιιεργειών NSCs πυκνότητας κυττάρων 10^7 κύτταρα mL^{-1} . **B)** Μεγέθυνση χρωματογραφήματος στο σημείο που οι κορυφές του χρωματογραφήματος ήταν μικρές (RT, χρόνο κατακράτησης 20.70 - 26.93)

Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα AMDIS, με τη βοήθεια του οποίου ανιχνεύθηκαν 124 μεταβολικά χαρακτηριστικά. Από αυτά, τα 54 ταυτοποιήθηκαν με την βοήθεια της βάσης δεδομένων NIST 08 και της βάσης δεδομένων MASS BANK (**Εικόνα 50**). Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργήθηκε η μεταβολική βάση δεδομένων για τα NSCs, που περιλαμβάνει όλα μεταβολικά χαρακτηριστικά των κυττάρων (**Πίνακας 7, Παράρτημα Α**).



Εικόνα 50. Μεταβολικά χαρακτηριστικά (124) που ανιχνεύθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος AMDIS, εκ των οποίων 54 ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων NIST 08 και MASS BANK

Με την ολοκλήρωση της βάσης μεταβολιτών για τα NSCs και την ταυτοποίηση των μεταβολιτών των κυττάρων, ακολούθησε η χημική ομαδοποίησή τους με βάση την βάση KEGG (**Εικόνα 51**). Οι κύριες χημικές ομάδες που ανιχνεύθηκαν ήταν τα λιπαρά οξέα (30%), οι υδατάνθρακες (21,5%), τα αμινοξέα 16% και τα καρβοξυλικά οξέα (12,5%). Οι υπόλοιπες χημικές ομάδες όπως τα ετεροκυκλικά, νουκλειικά, φωσφορικά οξέα, η υδροκινόνη και οι υδρογονάνθρακες είχαν ποσοστό μικρότερο του (10%). Αντίστοιχα, η χημική κατηγορία που περιλαμβάνει άλλες ομάδες όπως νιτρίλια, αμίδια, θειικό οξύ και παράγωγα λιπιδίων στερόλης βρίσκεται στο (6,5 %). Η μήτρα που δημιουργήθηκε παρατίθεται στο **Παράρτημα Α. Πίνακας 7**).



Εικόνα 51. Οι κύριες χημικές ομάδες μεταβολιτών των NSCs όπως ταυτοποιήθηκαν από τη βάση δεδομένων Kegg (Πηγή: <https://www.kegg.jp/>)

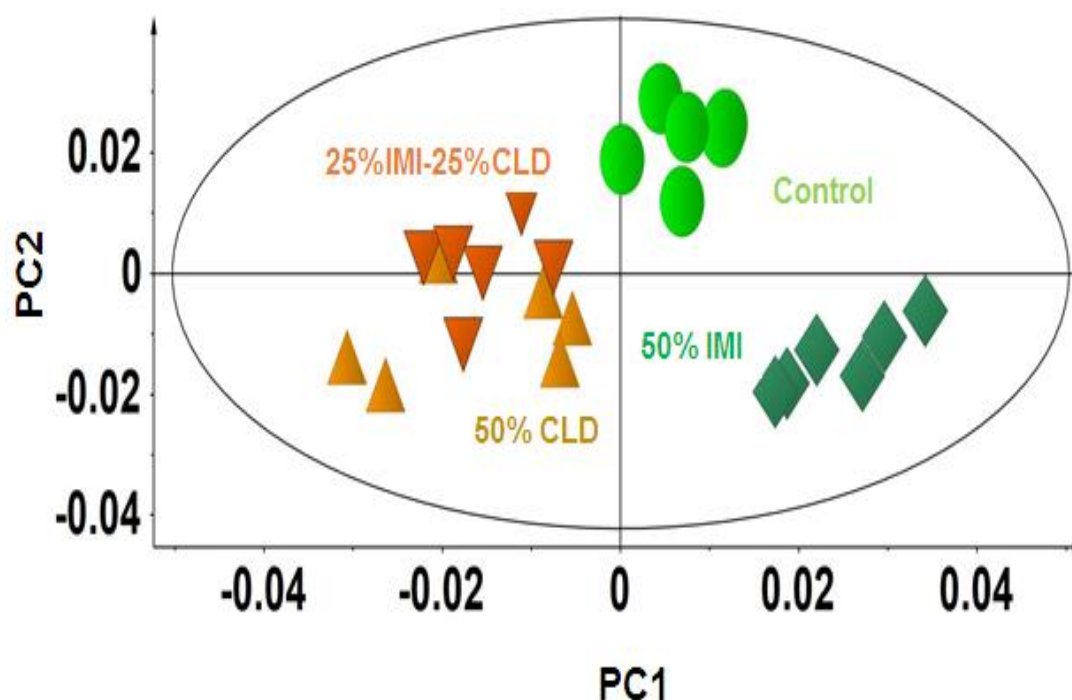
4.5 Επισκόπηση της επίδρασης επεμβάσεων Clothianidin, Imidacloprid και του μείγματος τους στο μεταβολισμό νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs) με εφαρμογή GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης

Τα NSCs χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταβολομική μελέτη της τοξικότητας των clothianidin, imidacloprid και της συνδυαστικής τοξικότητας του μείγματος τους σε

διάφορες συγκεντρώσεις. Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν υποβλήθηκαν σε πολυπαραγοντική ανάλυση προκειμένου να μελετηθούν οι αλλαγές στο μεταβολισμό των κυττάρων μετά τις επεμβάσεις σε σχέση με τον αντίστοιχο μεταβολισμό στους μάρτυρες.

Στο score plot που προέκυψε με εφαρμογή OPLS-DA, οπτικοποιούνται οι μεταβολίτες που ευθύνονται για το διαχωρισμό των επεμβάσεων (**Εικόνα 52**). Με βάση την εφαρμογή OPLS-DA (**Εικόνα 52**) έγινε κατάταξη των δεδομένων σε ομάδες και βρέθηκαν οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης $R^2X_{(cum)}=0,682$ και $R^2Y_{(cum)}=0,796$ και η τιμή της προγνωστικής ικανότητας του μοντέλου $Q^2=0,709$

Τα μεταβολικά προφίλ του μάρτυρα διαχωρίζονται από τις επαναλήψεις των υπόλοιπων επεμβάσεων (**Εικόνα 52**), επιβεβαιώνοντας έτσι την επίδραση των επεμβάσεων στον μεταβολισμό των κυττάρων. Η καλή ομαδοποίηση των βιολογικών επαναλήψεων και η απουσία ακραίων τιμών, επιβεβαιώνουν την καλή απόδοση και την επαναληψιμότητα των πειραματικών, βιοαναλυτικών και βιοπληροφορικών πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν. Επιπλέον, διαπιστώνεται ότι οι επεμβάσεις με clothianidin και το μείγμα των εντομοκτόνων clothianidin-imidacloprid προκαλούν παρόμοιες μεταβολές στο μεταβολισμό των NSCs, γιατί είναι πολύ κοντά μεταξύ τους σε αντίθεση με αυτές του imidacloprid που βρίσκονται σε μεγαλύτερη απόσταση (**Εικόνα 52**). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η επίδραση του clothianidin στο μεταβολισμό των NSCs είναι κυρίαρχη σε σχέση με αυτή του imidacloprid, στις συγκεντρώσεις στις οποίες εφαρμόστηκαν.

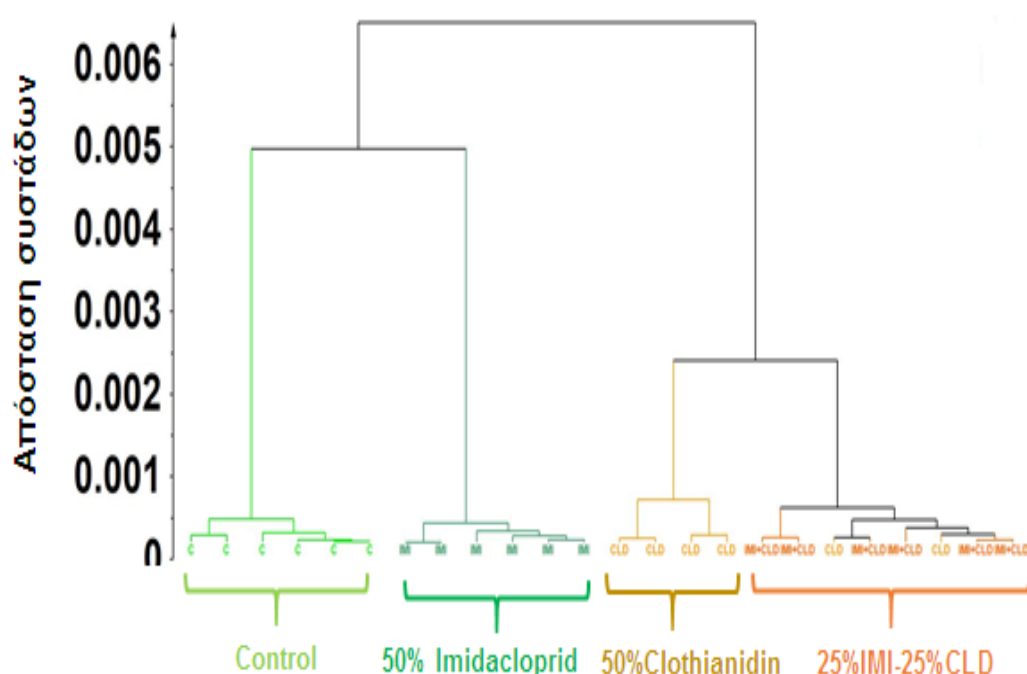


Εικόνα 52. OPLS-DA score plot για την επίδραση των εντομοκτόνων clothianidin, imidacloprid και του μείγματος τους στο μεταβολισμό των NSCs 48 ώρες μετά τις επεμβάσεις (Control= μάρτυρας, CLD= clothianidin, IMI= imidacloprid) Μάρτυρας ●, 50% clothianidin ▲, 50% imidacloprid ◆, 25% clothianidin-25% imidacloprid ▼, τα ποσοστά αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των δ. ο. ως προς τις αντίστοιχες τιμές IC_{50}). Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T^2 σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Κύριες Συνιστώσες, Principal Components). Η επαναληψιμότητα από τη πειραματική διαδικασία έως και τη ανάλυση των δειγμάτων αποδεικνύεται από τις τιμές των συντελεστών $R^2X_{(cum)}=0,682$ (συντελεστής προσδιορισμού), $R^2Y_{(cum)}=0,796$ (προβλεπόμενο ποσοστό απόκρισης), $Q^2=0,709$ (προγνωστική ικανότητα του μοντέλου)

Τα αποτελέσματα του OPLS-DA score plot επιβεβαιώνει η ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες (Hierarchical Cluster Analysis, HCA) (**Εικόνα 53**). Η λειτουργία των αλγόριθμων ταξινόμησης στηρίζεται στη συνένωση στοιχείων (παρατηρήσεων) σε ολοένα μεγαλύτερες ομάδες και χρησιμοποιεί ως μέτρο σύνδεσης την ομοιότητα ή την απόσταση μεταξύ των στοιχείων (Petrides, 2016). Στον οριζόντιο άξονα του γραφήματος, κάθε στοιχείο αποτελεί και μία ιεραρχική κλάση (ομάδα). Στη συνέχεια, τα στοιχεία συνδέονται όλο και περισσότερο μεταξύ τους και παρατηρείται ότι συγχωνεύονται σταδιακά σε τέσσερις μεγαλύτερες ομάδες. Ο κάθετος άξονας περιγράφει την κλίμακα σύνδεσης για κάθε σημείο συνένωσης δύο ομάδων και δείχνει την τιμή της σύνδεσης στην οποία τα συγκεκριμένα στοιχεία

συνδέθηκαν μαζί για να δημιουργήσουν μία νέα ομάδα. Όταν τα στοιχεία έχουν μία ξεκάθαρη δομή σχετικά με ομάδες ομοειδών στοιχείων τότε αυτή η δομή απεικονίζεται στο ιεραρχικό δέντρο με τη μορφή διακριτών κλάδων (Petridis, 2016).

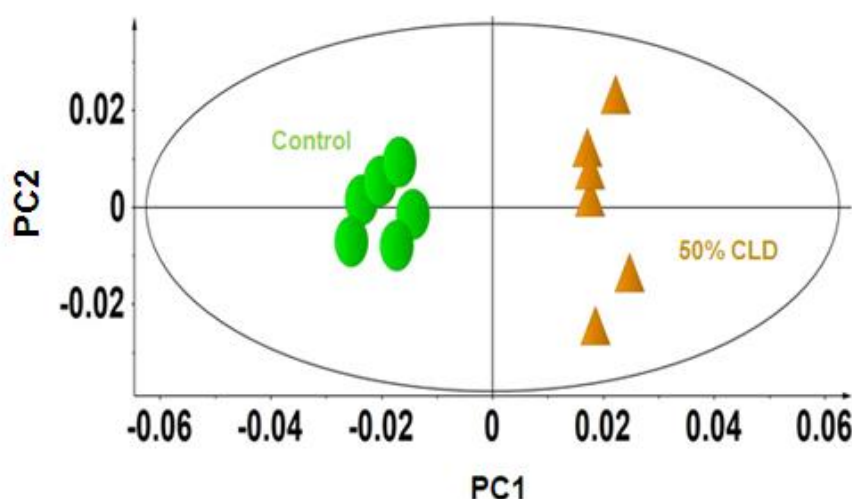
Με τον τρόπο αυτό διακρίνουμε τον πλήρη διαχωρισμό μεταξύ των τεσσάρων επεμβάσεων του μάρτυρα, του 50% imidacloprid, του 50% clothianidin και του μείγματος τους 25% imidacloprid-25% clothianidin. Για την κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις οι οποίες ομαδοποιούνται και φαίνεται με μεγαλύτερη ευκρίνεια οι αποστάσεις των ομάδων επεμβάσεις



Εικόνα 53. Δενδρόγραμμα ιεραρχικής ανάλυσης κατά συστάδες (Hierarchical cluster analysis, HCA dendrogram) των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ των NSCs 48 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Απεικονίζεται η ομαδοποίηση των επεμβάσεων και οι αποστάσεις μεταξύ τους (Control=μάρτυρας, IMI=imidacloprid, CLD=clothianidin). Τα ποσοστά αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των δ. ο. ως προς τις αντίστοιχες τιμές των IC_{50})

4.5.1 Επίδραση της επέμβασης με Clothianidin στο μεταβολισμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)

Το OPLS-DA score plot για το μάρτυρα και τις επεμβάσεις του εντομοκτόνου clothianidin, έδειξε έναν πολύ καλό διαχωρισμό μεταξύ των καταγεγραμμένων μεταβολικών προφίλ των NSCs, του μάρτυρα (C) και των επεμβάσεων με clothianidin, επιβεβαιώνοντας έτσι την επίδραση στο μεταβολισμό των κυττάρων (**Εικόνα 54**). Οι συνιστώσες PC1 και PC2 στο διάγραμμα εξηγούν το ..% και το..% διαφοροποίησης ή διαχωρισμού των δειγμάτων [μάρτυρας: $R^2X_{(cum)}=0.608$ (συντελεστής προσδιορισμού), $R^2Y_{(cum)}=0.951$ Αντίστοιχα].

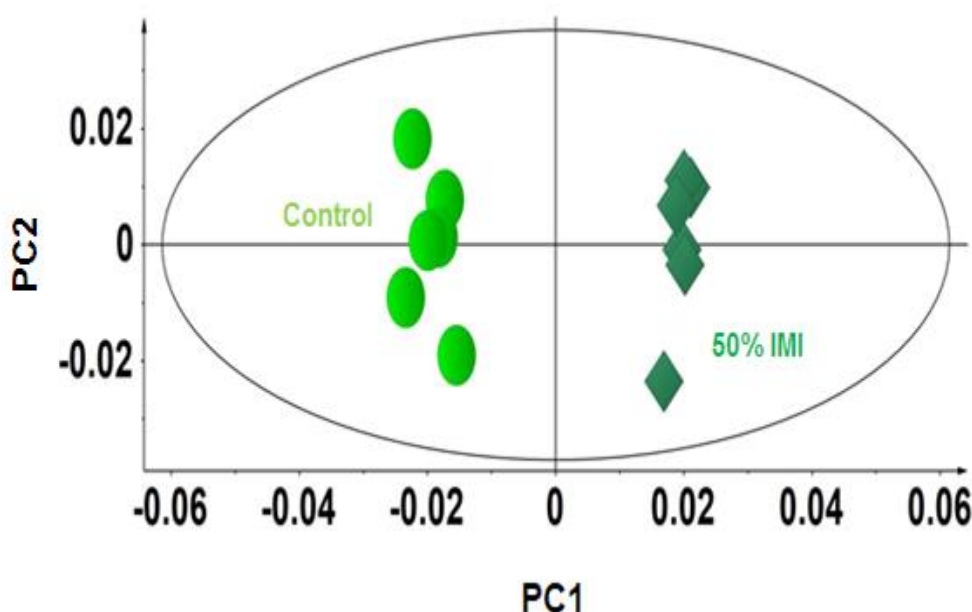


Εικόνα 54. OPLS-DA score plot για την επίδραση του εντομοκτόνου clothianidin στο μεταβολισμό των NSCs 48 ώρες μετά τις επεμβάσεις. (Control=μάρτυρας, CLD =clothianidin. μάρτυρας ●, 50% clothianidin ▲). Τα ποσοστά αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των δ. ο. ως προς τις αντίστοιχες τιμές των IC_{50} . Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T^2 σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Κύριες Συνιστώσες, Principal Components). Η επαναληψιμότητα από τη πειραματική διαδικασία έως και τη ανάλυση των δειγμάτων αποδεικνύεται από τις τιμές των συντελεστών $R^2X_{(cum)}=0,608$ (συντελεστής προσδιορισμού), $R^2Y_{(cum)}=0,951$ (προβλεπόμενο ποσοστό απόκρισης), $Q^2=0,865$ (προγνωστική ικανότητα του μοντέλου)

4.5.2 Επίδραση της επέμβασης του Imidacloprid στο μεταβολισμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)

Το OPLS-DA score plot για το μάρτυρα και τις επεμβάσεις του εντομοκτόνου imidacloprid, έδειξε ότι υπήρξε πολύ καλός διαχωρισμός μεταξύ των καταγεγραμμένων μεταβολικών προφίλ των NSCs του μάρτυρα (C) από τις επαναλήψεις της επέμβασης με imidacloprid, επιβεβαιώνοντας έτσι την επίδραση των επεμβάσεων (τοξικότητα) στο μεταβολισμό των κυττάρων (**Εικόνα 55**).

$$R^2X_{(cum)}=0,58, R^2Y_{(cum)}=0.987$$

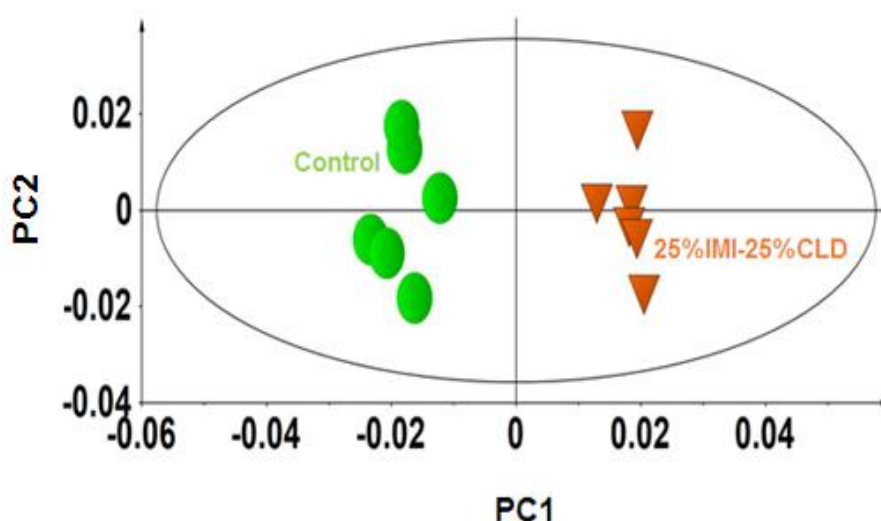


Εικόνα 55. OPLS-DA score plot για την επίδραση του εντομοκτόνου imidacloprid στο μεταβολισμό των NSCs και ο αντίστοιχος μάρτυρας 48 ώρες μετά τις επεμβάσεις (Control=μάρτυρας, IMI =imidacloprid. μάρτυρας ●, 50% imidacloprid ◆). Τα ποσοστά αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των δ. ο. ως προς τις αντίστοιχες τιμές IC_{50}). Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T^2 σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Κύριες Συνιστώσες, Principal Components). Η επαναληψιμότητα από τη πειραματική διαδικασία έως και τη ανάλυση των δειγμάτων αποδεικνύεται από τις τιμές των συντελεστών $R^2X_{(cum)}=0,58$ (συντελεστής προσδιορισμού), $R^2Y_{(cum)}=0,987$ (προβλεπόμενο ποσοστό απόκρισης), $Q^2=0,953$ (προγνωστική ικανότητα του μοντέλου)

4.5.3 Επίδραση της επέμβασης των μιγμάτων Clothianidin και Imidacloprid στο μεταβολισμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)

Το OPLS-DA score plot για το μάρτυρα και τις επεμβάσεις των μιγμάτων των εντομοκτόνων clothianidin – imidacloprid, έδειξε έναν πολύ καλό διαχωρισμό μεταξύ των καταγεγραμμένων μεταβολικών προφίλ των NSCs του μάρτυρα C από τις επαναλήψεις της επέμβασης των μιγμάτων clothianidin -imidacloprid, επιβεβαιώνοντας έτσι την επίδραση των επεμβάσεων στον μεταβολισμό των κυττάρων (**Εικόνα 56**).

$$R^2X_{(cum)}=0,56, R^2Y_{(cum)}=0,97$$



Εικόνα 56. OPLS-DA score plot για την επίδραση των μιγμάτων των εντομοκτόνων clothianidin και imidacloprid στο μεταβολισμό των NSCs 48 ώρες μετά τις επεμβάσεις (control=μάρτυρας, CLD =clothianidin, IMI=imidacloprid. μάρτυρας ●, μείγματα, 25% clothianidin-25% imidacloprid ▼ ή 25% imidacloprid και ισομοριακή ποσότητα clothianidin). Τα ποσοστά αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των δ. ο. ως προς τις αντίστοιχες τιμές των IC₅₀. Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T² σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Κύριες Συνιστώσες, Principal Components). Η επαναληψιμότητα από τη πειραματική διαδικασία έως και τη ανάλυση των δειγμάτων αποδεικνύεται από τις τιμές των συντελεστών $R^2X_{(cum)}=0,555$ (συντελεστής προσδιορισμού), $R^2Y_{(cum)}=0,97$ (προβλεπόμενο ποσοστό απόκρισης), $Q^2=0,896$ (προγνωστική ικανότητα του μοντέλου)

4.6 Μεταβολίτες-βιοσημαντές της επίδρασης των εντομοκτόνων Clothianidin, Imidacloprid και του μείγματος τους στα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs)

Τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης (OPLS-DA score plots), αποδεικνύουν την επίδραση των εντομοκτόνων και του μείγματος τους στο μεταβολισμό των NSCs. Επιπρόσθετα, υπογραμμίζουν τις δυνατότητες, την αξιοπιστία και την εφαρμοσιμότητα της μεταβολομικής κυττάρων (cell metabolomics) για την υψηλής ρυθμοαπόδοσης μελέτη του μεταβολικού υποβάθρου της τοξικότητας Φ.Π. σε κυτταρικές καλλιέργειες.

Για το τελευταίο, είναι απαραίτητη η συσχέτιση των παρατηρούμενων φαινοτύπων με την αντίστοιχη μεταβολική σύνθεση των αναλυόμενων δειγμάτων με σκοπό την ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών (biomarkers) των παρατηρούμενων τοξικοτήτων.

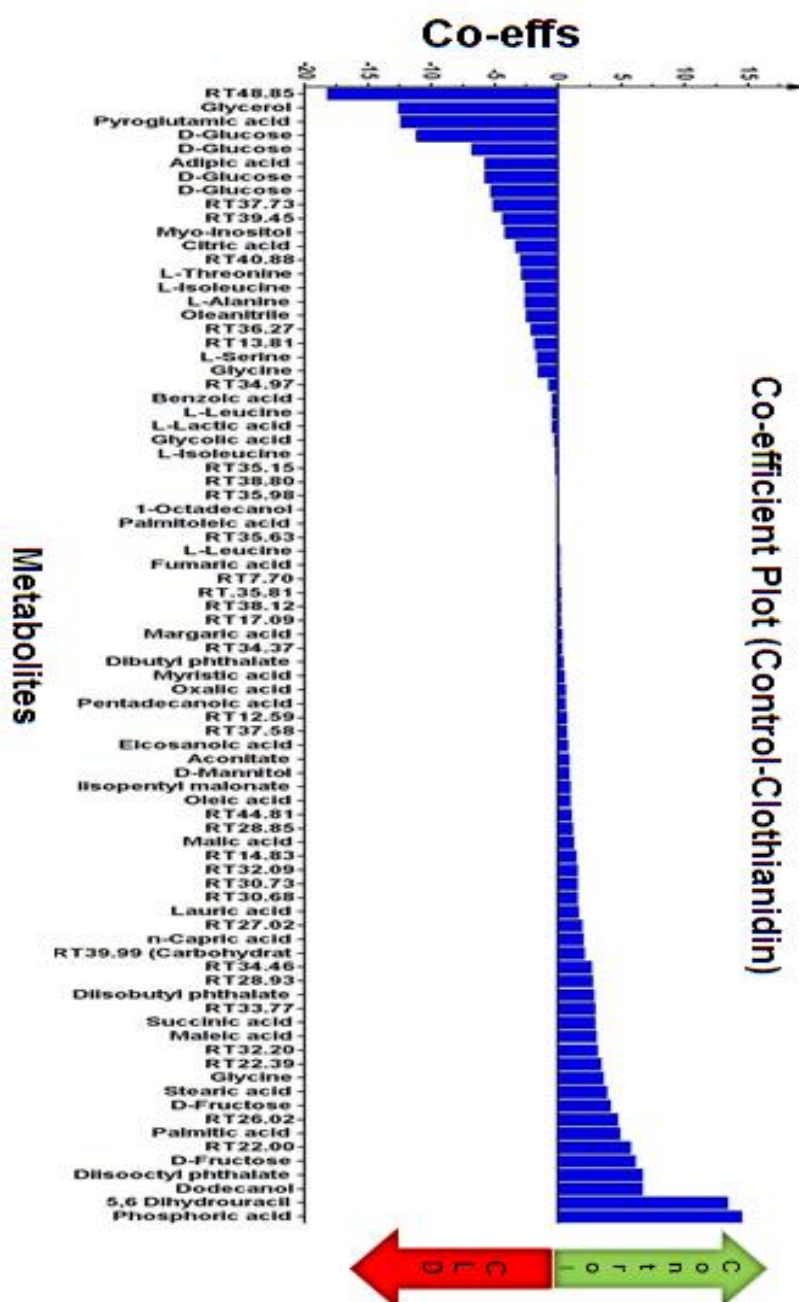
Ένας μεγάλος αριθμός μεταβολιτών παρουσίασε σημαντικές διακυμάνσεις ως αντίδραση του μεταβολισμού των NSCs στις διάφορες επεμβάσεις. Παρόλ' αυτά, επειδή η ενδεδειγμένη ανάλυση του μεταβολισμού των NSCs δεν αποτέλεσε αντικείμενο της παρούσας μελέτης, παρακάτω αναλύονται τα αποτελέσματα σχετικά με τους πιο σημαντικούς μεταβολίτες-βιοσημαντές των τοξικοτήτων.

Στην παρούσα μελέτη, η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών των τοξικοτήτων βασίστηκε στην ανάλυση με coefficient plots (Aliferis et al., 2014).

4.6.1 Μεταβολίτες-βιοσημαντές της τοξικότητας του εντομοκτόνου clothianidin στα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs)

Οι επεμβάσεις με το εντομοκτόνο clothianidin είχαν σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό των NSCs σε σύγκριση με το μάρτυρα C (**Εικόνες 52, 53, 54 & 57**). Μεγάλος αριθμός μεταβολιτών τους ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερες σχετικές συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ επίσης ένας μεγάλος αριθμός μεταβολιτών δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τις επεμβάσεις με το εντομοκτόνο. Η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης του clothianidin βασίστηκε στη χρήση Coefficient plots (**Εικόνες 54 & 57**) (**Πίνακας 7**) (Aliferis et al., 2014).

Ανάμεσα στους μεταβολίτες-βιοσημαντές με τις μεγαλύτερες διακυμάνσεις (υπερ-βιοσύνθεση) μετά την επέμβαση με το εντομοκτόνο clothianidin είναι η γλυκερόλη (Glycerol), το πυρογλουταμικό οξύ (Pyroglutamic acid), η D-γλυκόζη (D-Glucose), το αδιπικό οξύ (Adilpic acid) και η D-γλυκόζη (D-Glucose). Αντίθετα, οι μεταβολίτες που υπο-βιοσυνθέτονται ως αντίδραση στις επεμβάσεις με το clothianidin είναι το φωσφορικό οξύ (phosphoric acid), η 5,6 διυδροουρακίλη (5,6 Dihydrouracil), η δωδεκανόλη (Dodecanol), ο δισοοκτύλιο φθαλικός εστέρας (Diisooctly phthalate), η D-φρουκτόζη (D-Fructose) και το παλμιτικό οξύ (Palmitic acid).



Εικόνα 57. Co-efficient Plot στο οποίο διακρίνονται οι τιμές των Co-efficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ των NSCs του μάρτυρα με τις επεμβάσεις clothianidin (Control=μάρτυρας, CLD=clothianidin), 48 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Οι απόλυτες τιμές είναι ανάλογες τις βαρύτητας των αντίστοιχων μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης υπολογίστηκαν με jack-knifing (95%). Θετικές τιμές αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που υπο-βιοσυντέθηκαν (πράσινο βέλος) ενώ αρνητικές τιμές σε αυτούς που υπερ-βιοσυντέθηκαν (κόκκινο βέλος), ως αντίδραση στις επεμβάσεις με το εντονοκτόνο

Πίνακας 11. Παρατίθενται οι κυριότεροι μεταβολίτες-βιοσημαντές σε σύγκριση με το clothianidin, το imidacloprid και του μείγματος τους με βάση τις τιμές των Coefficient για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) (κόκκινο χρώμα: υπερ-βιοσύνθεση, πράσινο χρώμα υπο βιοσύνθεση)

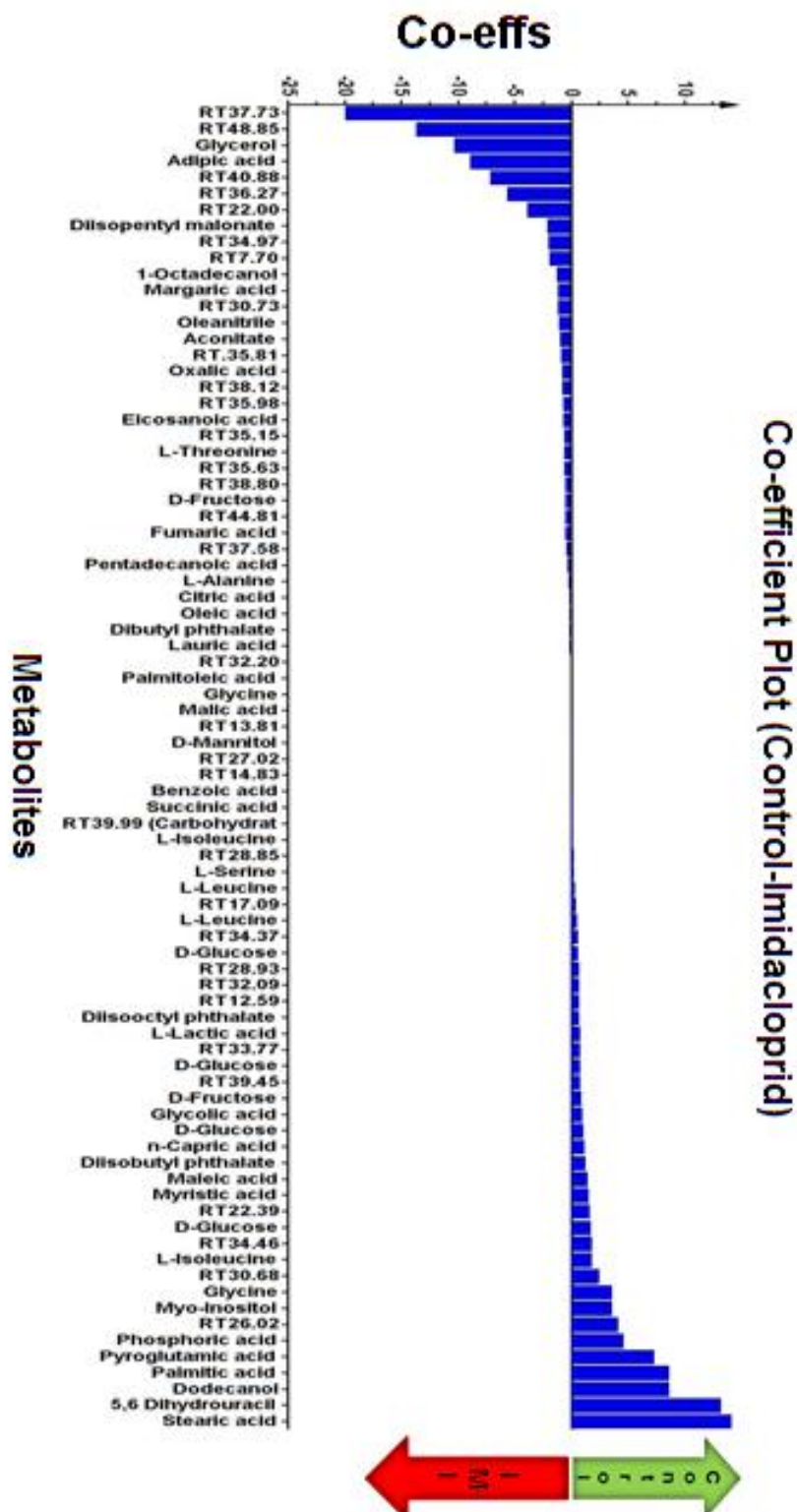
Όνομα Μεταβολίτη	Σύγκριση	Μεταβολίτες
1-Octadecanol	C vs CLD	
1-Octadecanol	C vs IMI+CLD	
Benzoic acid	C vs CLD	
Benzoic acid	C vs IMI	
Citric acid	C vs IMI	
D-Fructose	C vs IMI	
D-Glucose	C vs IMI	
D-Glucose	C vs IMI	
D-Glucose	C vs IMI+CLD	
Diisooctly phthalate	C vs CLD	
Diisooctly phthalate	C vs IMI	
Diisooctly phthalate	C vs IMI	
Diisooctly phthalate	C vs IMI+CLD	
D-Mannitol	C vs IMI	
Eicosanoic acid	C vs CLD	
Eicosanoic acid	C vs IMI	
Eicosanoic acid	C vs IMI+CLD	
Foumaric acid	C vs CLD	
Foumaric acid	C vs IMI	
Glycine	C vs IMI	
Glycolic acid	C vs CLD	
L-Alanine	C vs IMI	
L-Alanine	C vs IMI+CLD	
Lauric acid	C vs IMI	
L-Isoleucine	C vs CLD	
L-Isoleucine	C vs IMI	
L-Isoleucine	C vs IMI+CLD	
L-Isoleucine	C vs IMI+CLD	
L-Lactic acid	C vs CLD	
L-Lactic acid	C vs IMI	
L-Lactic acid	C vs IMI+CLD	
L-Leucine	C vs CLD	
L-Leucine	C vs CLD	
L-Leucine	C vs IMI	
L-Leucine	C vs IMI	
L-Leucine	C vs IMI+CLD	
L-Serine	C vs IMI	
L-Serine	C vs IMI+CLD	

L-Threonine	C vs IMI	
Malic acid	C vs IMI	
Margaric acid	C vs CLD	
Margaric acid	C vs IMI+CLD	
Myristic acid	C vs CLD	
n-Capric acid	C vs IMI+CLD	
Oleic acid	C vs IMI	
Oxalic acid	C vs CLD	
Palmitoleic acid	C vs CLD	
Palmitoleic acid	C vs IMI	
Palmitoleic acid	C vs IMI+CLD	
Pentadecanoic acid	C vs CLD	
Pentadecanoic acid	C vs IMI	
Pentadecanoic acid	C vs IMI+CLD	
Succinic acid	C vs IMI	

4.6.2 Μεταβολίτες-βιοσημαντές της τοξικότητας του εντομοκτόνου imidacloprid στα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs)

Οι επεμβάσεις με το εντομοκτόνο imidacloprid είχαν σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό των NSCs σε σύγκριση με το μάρτυρα C (**Εικόνες 52, 53, 55 & 58**). Μεγάλος αριθμός μεταβολιτών τους ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερες σχετικές συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ επίσης ένας μεγάλος αριθμός μεταβολιτών δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τις επεμβάσεις με το εντομοκτόνο. Η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης του imidacloprid βασίστηκε στη χρήση Coefficient plots (**Εικόνες 58 & 60**) (**Πίνακας 7**) (Aliferis et al., 2014).

Ανάμεσα στους μεταβολίτες-βιοσημαντές με τις μεγαλύτερες διακυμάνσεις (υπερ-βιοσύνθεση) μετά την επέμβαση με το εντομοκτόνο imidacloprid είναι η γλυκερόλη (Glycerol), το αδιπικό οξύ (Adilpic acid), το διισοπεντύλ μηλονικό, (Diisopentyl malonate), η 1-οκταδεκανόλη (1-Octadecanol), το μαργαρικό οξύ (Margaric acid) και το ολεανιτρίλιο (Oleanitrile). Αντίθετα, οι μεταβολίτες που υπο-βιοσυνθέτονται ως αντίδραση στις επεμβάσεις με το imidacloprid είναι το στεαρικό οξύ (Stearic acid), η 5,6 διυδροουρακίλη (5,6 Dihydrouracil), η δωδεκανόλη (Dodecanol), το παλμιτικό οξύ (Palmitic acid), το πυρογλουταμικό οξύ (Pyroglutamic acid) και το φωσφορικό οξύ (phosphoric acid).



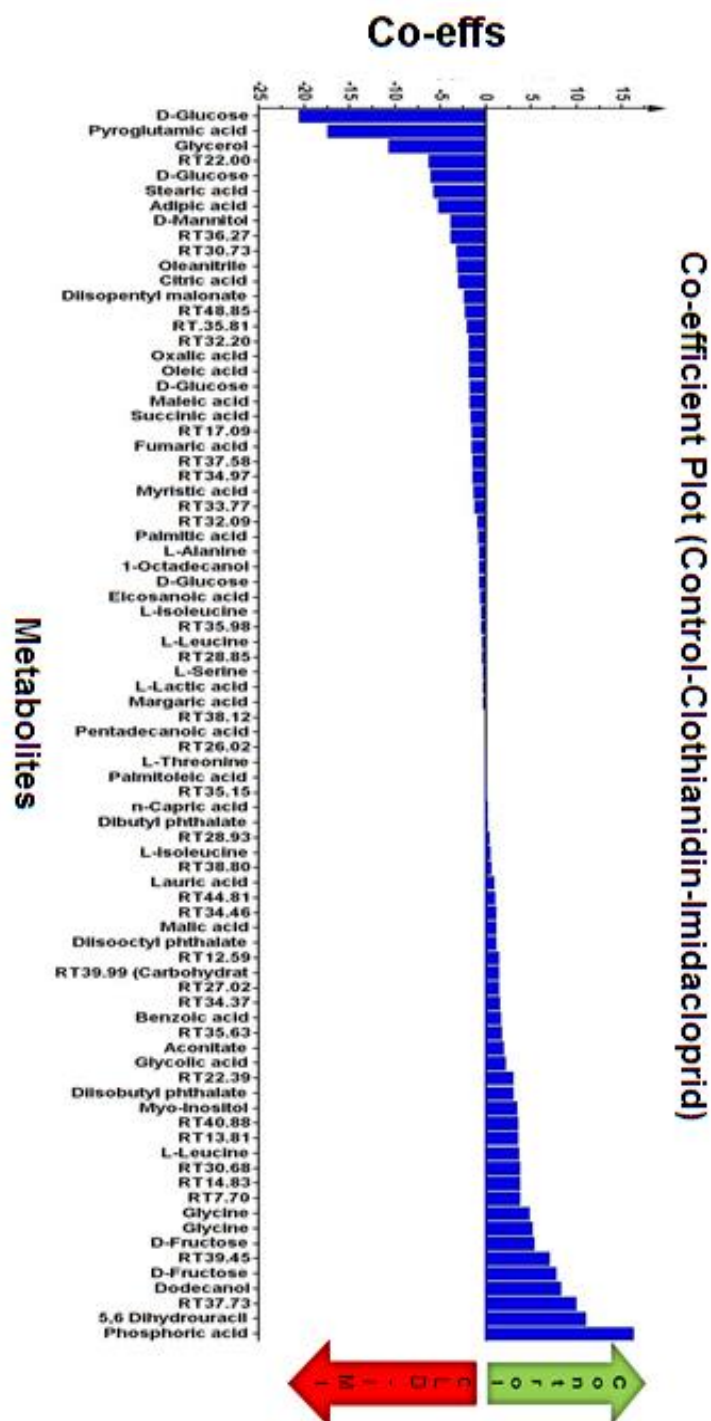
Εικόνα 58. Co-efficient Plot στο οποίο διακρίνονται οι τιμές των Co-efficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ των NSCs του μάρτυρα με τις επεμβάσεις imidacloprid (Control=μάρτυρας, IMI=imidacloprid), 48 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Οι απόλυτες τιμές είναι ανάλογες τις βαρύτητας των αντίστοιχων μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης υπολογίστηκαν με jack-knifing (95%). Θετικές τιμές αντιστοιχούν σε

μεταβολίτες που υπο-βιοσυντέθηκαν (πράσινο βέλος) ενώ αρνητικές τιμές σε αυτούς που υπερ-βιοσυντέθηκαν (κόκκινο βέλος), ως αντίδραση στις επεμβάσεις με το εντομοκτόνο

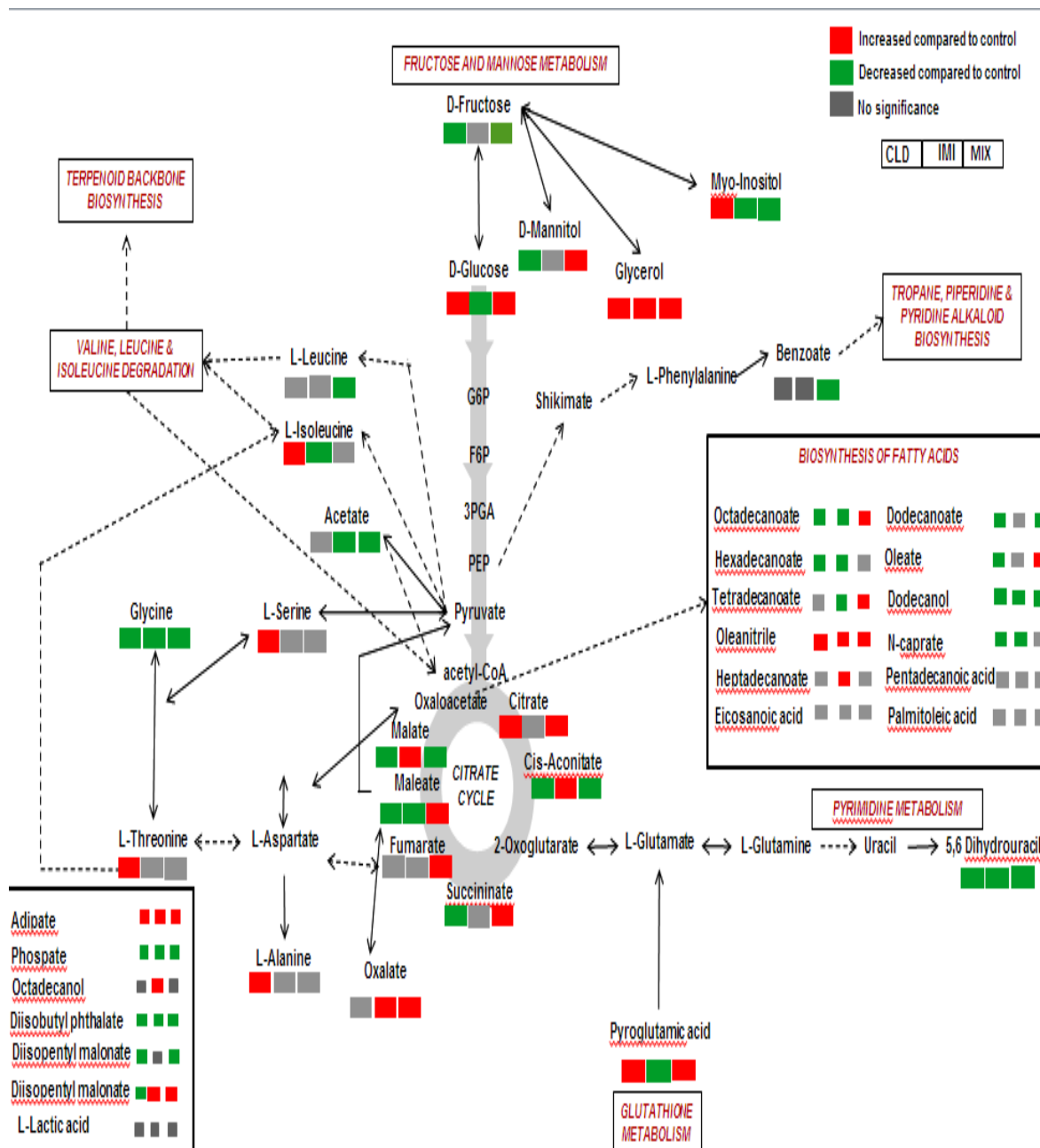
4.6.3 Μεταβολίτες-βιοσημαντές της τοξικότητας του εντομοκτόνου clothianidin-imidacloprid στα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs)

Οι επεμβάσεις με το μείγμα των εντομοκτόνων clothianidin-imidacloprid είχαν σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό των NSCs σε σύγκριση με το μάρτυρα C (**Εικόνες 52, 53, 56 & 59**). Μεγάλος αριθμός μεταβολιτών τους ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερες σχετικές συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ επίσης ένας μεγάλος αριθμός μεταβολιτών δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τις επεμβάσεις με το μείγμα των εντομοκτόνων. Η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης του μείγματος clothianidin-imidacloprid βασίστηκε στη χρήση Coefficient plots (**Εικόνες 59 & 60**) (**Πίνακας 7**) (Aliferis et al., 2014).

Ανάμεσα στους μεταβολίτες-βιοσημαντές με τις μεγαλύτερες διακυμάνσεις (υπερ-βιοσύνθεση) μετά την επέμβαση με το μείγμα των εντομοκτόνων clothianidin-imidacloprid είναι η D-γλυκόζη (D-Glucose), το πυρογλουταμικό οξύ (Pyroglutamic acid), η γλυκερόλη (Glycerol), η D-γλυκόζη (D-Glucose), το στεαρικό οξύ (Stearic acid) και το αδιπικό οξύ (Adilpic acid). Αντίθετα, οι μεταβολίτες που υπο-βιοσυνθέτονται ως αντίδραση στις επεμβάσεις με τα δύο εντομοκτόνα είναι το φωσφορικό οξύ (phosphoric acid), η 5,6 διυδροουρακίλη (5,6 Dihydrouacil), η δωδεκανόλη (Dodecanol), η D-φρουκτόζη (D-Fructose), η D-φρουκτόζη (D-Fructose) και η γλυσίνη (Glycine).



Εικόνα 59. Co-efficient Plot στο οποίο διακρίνονται οι τιμές των Co-efficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ των NSCs του μάρτυρα με τις επεμβάσεις clothianidin-imidacloprid (Control=μάρτυρας, CLD=clothianidin-IMI=imidacloprid), 48 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Οι απόλυτες τιμές είναι ανάλογες τις βαρύτητας των αντίστοιχων μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης υπολογίστηκαν με jack-knifing (95%). Θετικές τιμές αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που υποβιοσυντέθηκαν (πράσινο βέλος) ενώ αρνητικές τιμές σε αυτούς που υπερβιοσυντέθηκαν (κόκκινο βέλος), ως αντίδραση στις επεμβάσεις με τα μείγματα των εντονοκτόνων CLD-IMI



Εικόνα 60. Μεταβολικό δίκτυο των NSCs. Κάτω από κάθε μεταβολίτη απεικονίζονται από αριστερά προς δεξιά οι συγκρίσεις στο μεταβολισμό του μάρτυρα σε σχέση με τις επεμβάσεις με το clothianidin, το imidacloprid και τα μείγματα τους (■ υπερβιοσύνθεση του μεταβολίτη, ■ υποβιοσύνθεση του μεταβολίτη, ■ καμία μεταβολή). Το συμπαγές βέλος μεταξύ μεταβολιτών σημαίνει ότι η παραγωγή ενός μεταβολίτη οδηγεί στην παραγωγή του επόμενου, ενώ το διακεκομμένο βέλος ότι εμπλέκονται επιπλέον μεταβολικές διεργασίες για την παραγωγή του μεταβολίτη. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των δ. ο. ως προς τις αντίστοιχες τιμές IC₅₀

4.7 Ρόλος επιλεγμένων μεταβολιτών-βιοσημαντών της τοξικότητας των clothianidin, imidacloprid και του μείγματος τους στο μεταβολισμό και τη φυσιολογία νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs)

Με βάση τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης (*Εικόνες 52, 57, 58, 59, & 60*), διαπιστώθηκε η διαταραχή του μεταβολισμού των NSCs μετά από τις επεμβάσεις με τα clothianidin και imidacloprid όσο και τα μείγματά τους. Μεγάλος αριθμός μεταβολιτών υπέρ- ή υπο-βιοσυντέθηκε, με τις κυριότερες ομάδες μεταβολιτών, οι οποίες εμφάνισαν τις σημαντικότερες διακυμάνσεις, να είναι οι υδατάνθρακες, τα λιπαρά οξέα και τα αμινοξέα. Ο ρόλος επιλεγμένων μεταβολιτών στο μεταβολισμό των NSCs συζητείται με συντομία παρακάτω.

4.7.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες διαδραματίζουν καίριο ρόλο στο μεταβολισμό των βιολογικών συστημάτων λειτουργώντας είτε πηγές ενέργειας, είτε ως αρχικά δομικά στοιχεία για τη σύνθεση πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών και πρωτεϊνών. Σημαντικές ομάδες αποτελούν οι μονοσακχαρίτες, όπως η γλυκόζη, η οποία ανήκει στις αλδόζες και αποτελείται από έξι άτομα άνθρακα και η φρουκτόζη η οποία ανήκει στις κετοεξόζες. Και τα δύο αυτά μόρια απαντώνται σε αφθονία στη φύση. (Pimentel and Greiner, 1997).

Στις αναλύσεις που διεξήχθησαν, παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση των επεμβάσεων με τις δ.ο. και τα μείγματά τους στην περιεκτικότητα των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ που καταγράφηκαν σε υδατάνθρακες. Ανάμεσα σε αυτούς, η glucose, η fructose και η glycerol ήταν οι μεταβολίτες που σημείωσαν τις πιο σημαντικές μεταβολές (υπερ- ή υπο-βιοσύνθεση) (*Εικόνα 60*).

Η **γλυκόζη** είναι ο σημαντικότερος υδατάνθρακας, αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τον εγκέφαλο των θηλαστικών και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού τους. Επίσης, αποτελεί το θεμέλιο για τη νευρωνική και μη-νευρωνική κυτταρική συντήρηση, όπως είναι η δημιουργία νευροδιαβιβαστών (Mergenthaler et al., 2013). Ο μεταβολισμός της γλυκόζης είναι στενά συνδεδεμένος με τη φυσιολογία και τη λειτουργία του εγκεφάλου. Σε προηγούμενη μελέτη (Fu et al., 2006) αναφέρεται ότι η υψηλή γλυκόζη καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό NSCs και διαφοροποιημένων κυττάρων. Η υψηλή

περιεκτικότητα γλυκόζης επιταχύνει επίσης τη νευρωνική και γλοιακή διαφοροποίηση NSCs (Fu et al., 2006). Η έκθεση σε υψηλή γλυκόζη μπορεί να αλλάξει τα επίπεδα έκφρασης mRNA σε διαφοροποιημένα κύτταρα (Tekki-Kessaris et al., 2001). Υψηλά επίπεδα γλυκόζης καταγράφηκαν στις επεμβάσεις με το clothianidin και τα μείγματα του με imidacloprid, ενώ στις επεμβάσεις με το imidacloprid βρέθηκαν μειωμένα. Η διαφοροποίηση αυτή αποδεικνύει την επίδραση των επεμβάσεων στο γενικό μεταβολισμό των κυττάρων, με την επίδραση του clothianidin να είναι η δεσπόζουσα. Η υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη είναι πιθανό να συνδέεται με μειωμένη κατανάλωσή της στις βιοσυνθέσεις μεταβολιτών και πρωτεϊνών και να υποδεικνύει μειωμένες ανάγκες του συστήματος σε ενέργεια.

Η **φρουκτόζη** είναι το μοναδικό σάκχαρο που αυξάνει τις συγκεντρώσεις του ουρικού οξέος και αυτό έχει αποδειχθεί στους ανθρώπους και στα τρωκτικά (Stavric et al., 1976). Η φρουκτόζη εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα και στα υπόλοιπα κύτταρα (όπως είναι τα σωληνοειδή κύτταρα, τα λιποκύτταρα και τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα), και μεταβολίζεται πλήρως από το ένζυμο φρουκτοκινάση με την κατανάλωση ATP, μετατρέπεται σε φωσφορική-1-φρουκτόζη η οποία στη συνέχεια διασπάται σε γλυκεραλδεϋδη και διυδροξυ-ακετόνη (Perheentupa and Raivio, 1967). Οι μεταβολίτες αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τους ιστούς ως πηγή ενέργειας. Σε αντίθεση με τον μεταβολισμό της **γλυκόζης**, στη **φρουκτόζη** δεν υπάρχει αρνητικός ρυθμιστικός μηχανισμός που να εμποδίζει την μείωση της ATP (Johnson et al., 2007). Στις επεμβάσεις με το clothianidin και τα μείγματά τους υπο-βιοσυντέθηκαν. Αυτό δείχνει την επίδραση των επεμβάσεων στο γενικό μεταβολισμό των κυττάρων, με την επίδραση του clothianidin να παίζει ενεργό ρόλο στα κύτταρα.

Ο μεταβολίτης **γλυκερόλη** ανακαλύφθηκε ως ένας επίσης σημαντικός βιοσημαντής της τοξικότητας του clothianidin, imidacloprid και του μείγματος τους στα νευρικά βλαστικά κύτταρα ο οποίος υπερ-βιοσυντέθηκε σε όλες τις επεμβάσεις. Η **γλυκερόλη** έχει βρεθεί σε οργανισμούς (*Dunaliella parva*) να είναι υπεύθυνη για την εξισορρόπηση της εξωτερικής συγκέντρωσης αλάτων στα κύτταρα της και να διδραματίζει ενεργό ρόλο στην ωσμωρύθμιση των κυττάρων (Ben-Amotz and Avron, 1973).

4.7.2 Αμινοξέα

Τα αμινοξέα είναι χημικές ενώσεις και αποτελούν τα βασικά δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών που καθορίζουν τις χαρακτηριστικές ιδιότητές τους (Wu, 2009). Τα αμινοξέα είναι μια από τις σημαντικότερες ομάδες των ενδιάμεσων προϊόντων για τη βιοσύνθεση και μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση του πολλαπλασιασμού και μεταβολικών καταστάσεων των βλαστικών κυττάρων και στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Sander et al., 2013). Ανάμεσα σε αυτά τα αμινοξέα κατατάσσεται η glycine.

Η **γλυκίνη** επηρεάζει τη μεταβίβαση των νευρικών διεγέρσεων στο κεντρικό νευρικό σύστημα των οργανισμών και δρα ως αναστολέας (επιβραδυντής) της μεταβίβασης της νευρικής διέγερσης μεταξύ των κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος (Tretter et al., 2016). Σε όλες τις επεμβάσεις με τα εντομοκτόνα clothianidin, imidacloprid και με τα μείγματά τους, η glycine υπο-βιοσυντέθηκε.

4.7.3 Καρβοξυλικά οξέα

Το **φουμαρικό οξύ** είναι ένα (dicarboxylic acid) που παράγεται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, πρόκειται για ένα πρόδρομο L-malate στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος του Krebs (TCA), που δημιουργείται με την οξείδωση του ηλεκτρικού οξέος (succinic acid) από ηλεκτρική αφυδρογονάση. Το φουμαρικό οξύ μετατρέπεται από το ένζυμο φουμαράση σε μηλικό άλας pubchem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/fumaric_acid). Στις επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν τα μείγματα των εντομοκτόνων υπερ-βιοσυντέθηκαν.

Το **pyroglutamic acid** είναι επίσης γνωστό ως (PCA, 5-oxoproline pyrrolidone 2-carboxylic acid) και είναι η κυκλική λακτάμη του γλουταμικού οξέος. Αυτό βρίσκεται σε όλα τα ζωντανά κύτταρα και είναι φυσικό παράγωγο του amino acid (Kumar and Bachhawat, 2012). Αυτός ο μεταβολίτης βρίσκεται στον κύκλο της γλουταθειόνης και μετατρέπεται σε γλουταμικό με 5-οξοπρολινάση. Στις επεμβάσεις με το clothianidin και τα μείγματά τους υπερ-βιοσυντέθηκε.

4.7.4 Λιπαρά οξέα

Τα λιπαρά οξέα είναι μονοκαρβοξυλικά οξέα με μια μη διακλαδισμένη αλειφατική αλυσίδα μονάδων $-CH_2-$ και λόγω του μηχανισμού βιοσύνθεσής τους έχουν γενικά άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα. Υπάρχουν δύο ειδών λιπαρά οξέα, τα κορεσμένα και τα ακόρεστα. Τα σημαντικότερα λιπαρά οξέα που βρέθηκαν στα NSCs είναι τα κορεσμένα (Ben-David et al., 2013).

Το **στεαρικό οξύ** (octadecanoic acid, C18:0), είναι το κύριο λιπαρό οξύ των λιπών στα μηρυκαστικά ζώα βρίσκεται σε πολλά ζωικά και φυτικά λίπη και έλαια, ωστόσο είναι πιο άφθονο στο ζωικό λίπος (Beare-Rogers et al., 2001). Στις επεμβάσεις με τα εντομοκτόνα μεμονωμένα το stearic acid υπο-βιοσυντέθηκε ενώ στις επεμβάσεις με τα μείγματα τους υπερ-βιοσυντέθηκε.

Το **ηλεκτρικό οξύ** βρίσκεται στους ζωντανούς οργανισμούς, παίρνει τη μορφή ανιόντος. Το succinate έχει πολλαπλούς βιολογικούς ρόλους στο μεταβολισμό, καθώς μετατρέπεται σε φουμαρικό άλας από το ένζυμο ηλεκτρική αφυδρογονάση στο σύμπλεγμα 2 της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων που εμπλέκεται στην παραγωγή ATP. Επίσης, είναι μόριο σηματοδότησης (signaling molecule) που αντανακλά την κυτταρική μεταβολική κατάσταση (Tretter et al., 2016). Η ηλεκτρική ενέργεια που παράγεται στα μιτοχόνδρια μέσω του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA), είναι μια διαδικασία που δίνει ενέργεια σε όλους τους οργανισμούς (Kleinstreuer et al., 2011). Στη παρούσα μελέτη φαίνεται ότι στην επέμβαση με το clothianidin η παραγωγή του succinic acid μειώθηκε. Οι επεμβάσεις της συνδυαστικής τοξικότητας προκάλεσαν την υπεριοσύνθεση αυτού του μεταβολίτη ως αντίδραση στην καταπόνηση των κυττάρων από τα εντομοκτόνα.

Το **μαργαρικό οξύ** (heptadecanoic acid C15:1) είναι επίσης, ένα κορεσμένο λιπαρό οξύ το οποίο εμφανίζεται ως συστατικό ιχνοστοιχείων στο λίπος και κυρίως στο λίπος γάλακτος των μηρυκαστικών (Kumar and Bachhawat, 2012). Στις επεμβάσεις με το imidacloprid υπερ-βιοσυντέθηκε.

Το **αδιπικό οξύ** (hexanedioic acid C4:2) στις επεμβάσεις με το imidacloprid, το clothianidin και τα μείγματά τους υπερ-βιοσυντέθηκε.

Ο βιολογικός ρόλος των λιπαρών οξέων είναι διπλός, συμμετέχουν με τη μορφή των φωσφολιπιδίων και των γλυκολιπιδίων στη δομή των μεμβρανών και με τη μορφή των τριακυλογλυκερολών τους επιτρέπουν στο κύτταρο να αποθηκεύει την περίσσεια της παραγόμενης μεταβολικής τους ενέργειας και την περίσσεια των

ατόμων άνθρακα. Στα ζωικά κύτταρα είναι κυρίως φωσφολιπίδια ενώ στα φυτά είναι γλυκοζυλογλυκερίδια και φωσφογλυκερίδια

4.7.5 Λοιποί μεταβολίτες-βιοσημαντές

Ανάμεσα στους λοιπούς μεταβολίτες των οποίων τα επίπεδα επηρεάστηκαν σημαντικά μετά την επέμβαση είναι **aconitate**. Το **aconitate** hydratase είναι ένα ένζυμο που καταλύει το στερεοειδικό ισομερισμό του κιτρικού προς ισοκυτταρίνη μέσω cis-aconitate στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (κύκλο Krebs). Το σύμπλεγμα III ή σύμπλοκο κυτοχρώματος b-c₁ αποτελεί το κεντρικό συστατικό της αναπνευστικής αλυσίδας (ETC), η οποία καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων της ουμπικινόλη σε οξειδωμένο κυτόχρωμα (Zhang et al., 2017). Τόσο η ETC όσο και ο κύκλος του Krebs εμπλέκονται στην οξείδωση των υποστρωμάτων με αποτέλεσμα την παραγωγή ενέργειας ATP. Επίσης, η μείωση της ATP μπορεί να επιβραδύνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, με αποτέλεσμα τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου (Kalluri and Dempsey, 2014) Στις επεμβάσεις με το imidacloprid υπερ-βιοσύνθεση ενώ με τα μείγματά τους υπο-βιοσυντέθηκαν.

5. Συμπεράσματα

Η έγκαιρη αξιολόγηση της τοξικότητας Φ.Π. στα πρώτα στάδια έρευνας και ανάπτυξης καθώς και η συνδυαστική τοξικότητα Φ.Π., αποτελούν σήμερα δύο από τα πιο σημαντικά και επίκαιρα θέματα της Γεωργικής Φαρμακολογίας, τα οποία σχετίζονται τόσο με την ασφάλεια του ανθρώπου όσο και άλλων οργανισμών μη-στόχων. Ο τεράστιος αριθμός των δ.ο. που κάθε χρόνο πρέπει να αξιολογούνται, απαιτεί την ανάπτυξη υψηλής ακρίβειας και ρυθμοαπόδοσης με ταυτόχρονη μείωση του απαιτούμενου κόστους και χρόνου καθώς και μείωση του αριθμού των πειραματοζώων που θα πρέπει να θανατώνονται.

Η Ε.Ε. προκρίνει μεθόδους για τη μελέτη της συνδυαστικής τοξικότητας ή τη κατάλληλων πρότυπων βιολογικών συστημάτων, τα οποία θα να αντικαταστήσουν τη χρησιμοποίηση πειραματόζων.

Στο πλαίσιο αυτό, οι σύγχρονες «ομικές» τεχνικές, σε συνδυασμό με τη χρήση αξιόπιστων βιολογικών συστημάτων όπως NSCs παρουσιάζουν μεγάλες δυνατότητες, τις οποίες η παρούσα έρευνα ανέδειξε. Πολύ σημαντική παρατήρηση αποτέλεσε το γεγονός ότι τα NSCs αποτελούν πιο ευαίσθητο σύστημα σε σχέση με τα N2a στην τοξικότητα των εφαρμοζόμενων δ.ο. Πιο συγκεκριμένα στη περίπτωση του clothianidin παρατηρήθηκε ότι τα NSCs ήταν 5 φορές πιο ευαίσθητα από τα N2a αντίστοιχα, στη περίπτωση του imidacloprid ήταν 8 φορές πιο ευαίσθητα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα NSCs σε συνδυασμό με την GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση και τα βιοαναλυτικά πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν, να μπορούν να εφαρμοστούν ως μία υψηλής ρυθμοαπόδοσης μέθοδος συμπληρωματική των ήδη εφαρμοζόμενων μεθόδων για την αξιολόγηση της τοξικότητας και συνδυαστικής τοξικότητας δ.ο. Φ.Π. Παράλληλα, δίνει πολύ σημαντικές πληροφορίες για το μεταβολικό υπόβαθρο της παρατηρούμενης τοξικότητας. Με τον τρόπο μπορεί όλη η διαδικασία ο χρόνος που απαιτείται να μειωθεί σημαντικά και τα αντίστοιχα κόστη.

Παρόλ' αυτά απαιτείται μια πιο ευρείας κλίμακας μελέτη για την ανάπτυξη ενός αξιόπιστου μοντέλου και αξιόπιστων μεταβολικών βιοσημαντών της συνδυασμένης τοξικότητας δ.ο. με σκοπό την περαιτέρω αυτοματοποίηση της διαδικασίας και την ενίσχυση της αξιοπιστίας τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ALIFERIS, K. & JABAJI, S. 2010. ¹H NMR and GC-MS metabolic fingerprinting of developmental stages of *Rhizoctonia solani* sclerotia. *Metabolomics*, 6, 96-108.
- ALIFERIS, K. A. & CHRYSAYI-TOKOUSBALIDES, M. 2011. Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives. *Metabolomics*, 7, 35-53.
- ALIFERIS, K. A., FAUBERT, D. & JABAJI, S. 2014. A metabolic profiling strategy for the dissection of plant defense against fungal pathogens. *PLoS One*, 9, e111930.
- ALIFERIS, K. A. & JABAJI, S. 2011. Metabolomics—A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. *Pesticide Biochemistry and physiology*, 100, 105-117.
- ALIFERIS, K. A. & JABAJI, S. 2012. FT-ICR/MS and GC-EI/MS metabolomics networking unravels global potato sprout's responses to *Rhizoctonia solani* infection. *PLoS One*, 7, e42576.
- ARANÍBAR, N., SINGH, B. K., STOCKTON, G. W. & OTT, K.-H. 2001. Automated mode-of-action detection by metabolic profiling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286, 150-155.
- AUTHORITY, E. F. S. 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid considering all uses other than seed treatments and granules. *EFSA Journal*, 13, 4211.
- BACANDRITSOS, N., GRANATO, A., BUDGE, G., PAPANASTASIOU, I., ROINIOTI, E., CALDON, M., FALCARO, C., GALLINA, A. & MUTINELLI, F. 2010. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105, 335-340.
- BATEMAN, R., CARRUTHERS, R., HOYES, J., JONES, C., LANGRIDGE, J., MILLAR, A. & VISSERS, J. 2002. A novel precursor ion discovery method on a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer for studying protein phosphorylation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13, 792-803.
- BEARE-ROGERS, J., DIEFFENBACHER, A. & HOLM, J. 2001. Lexicon of lipid nutrition (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 73, 685-744.
- BECKER, A. J., MCCULLOCH, E. A. & TILL, J. E. 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.
- BEN-AMOTZ, A. & AVRON, M. 1973. The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiology*, 51, 875-878.
- BEN-DAVID, U., GAN, Q.-F., GOLAN-LEV, T., ARORA, P., YANUKA, O., OREN, Y. S., LEIKIN-FRENKEL, A., GRAF, M., GARIPPA, R. & BOEHRINGER, M. 2013. Selective elimination of human pluripotent stem cells by an oleate synthesis inhibitor discovered in a high-throughput screen. *Cell stem cell*, 12, 167-179.
- BOND, A. M., MING, G.-L. & SONG, H. 2015. Adult mammalian neural stem cells and neurogenesis: five decades later. *Cell stem cell*, 17, 385-395.

- BRUNS, H. A. 2003. Controlling aflatoxin and fumonisin in maize by crop management. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 22, 153-173.
- CALDAS, E., JARDIM, A., AMBRUS, A. & SOUZA, L. C. 2006. Variability of organophosphorus insecticide residues in large size crops grown in commercial farms in Brazil. *Food additives and contaminants*, 23, 148-158.
- CALDAS, E. D. & DE SOUZA, L. C. K. R. 2000. Chronic dietary risk assessment for pesticide residues in Brazilian food. *Revista de Saúde Pública*, 34, 529-537.
- CARVALHO, F. P. 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental science & policy*, 9, 685-692.
- COOPER, J. & DOBSON, H. 2007. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection*, 26, 1337-1348.
- COUNCIL, N. R. 2007. *Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy*, National Academies Press.
- CRAIG, A., SIDAWAY, J., HOLMES, E., ORTON, T., JACKSON, D., ROWLINSON, R., NICKSON, J., TONGE, R., WILSON, I. & NICHOLSON, J. 2006. Systems toxicology: integrated genomic, proteomic and metabonomic analysis of methapyrilene induced hepatotoxicity in the rat. *Journal of proteome research*, 5, 1586-1601.
- DEN HOND, F., GROENEWEGEN, P. & VAN STRAALEN, N. M. 2003. *Questions around the persistence of the pesticide problem*, Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts.
- DOETSCH, F., CAILLE, I., LIM, D. A., GARCÍA-VERDUGO, J. M. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97, 703-716.
- EPA. Interim reregistration eligibility decision. Diazinon. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency. EPA738R04006. [Online]. Available: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/diazinon_ired.pdf. March 27, 2006.
- EUROSTAT 2014. Archive:Pesticide sales statistics. [Online]. Available: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Archive:Pesticide_sales_statistics&oldid=327059.
- EVANGELOPOULOS, M. E., WEIS, J. & KRITZGEN, A. 2005. Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal: HDL blocks neuroblastoma differentiation by inhibition of EGFR. *Oncogene*, 24, 3309.
- EVANS, M. J. & KAUFMAN, M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *nature*, 292, 154.
- FERNÁNDEZ-ALBA, A. R., GUIL, L. H., LÓPEZ, G. D. A. & CHISTI, Y. 2001. Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. *Analytica chimica acta*, 426, 289-301.
- FIEHN, O. 2002. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Functional Genomics*. Springer.
- FIEHN, O., KOPKA, J., DÖRMANN, P., ALTMANN, T., TRETHEWEY, R. N. & WILLMITZER, L. 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature biotechnology*, 18, 1157.
- FORTIER, L. A. 2005. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery*, 34, 415-423.
- FRAC. FRAC Code List 2018: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering) [Online]. Available: .

- [http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac_code_list_2018-final.pdf?sfvrsn=6144b9a_2-2018].
- FRITSCHI, L., MCLAUGHLIN, J., SERGI, C., CALAF, G., LE CURIEUX, F., FORASTIERE, F., KROMHOUT, H., EGEHY, P., JAHNKE, G. & JAMESON, C. 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Red*, 114.
- FU, J., TAY, S., LING, E. & DHEEN, S. 2006. High glucose alters the expression of genes involved in proliferation and cell-fate specification of embryonic neural stem cells. *Diabetologia*, 49, 1027-1038.
- FUCHS, E. & SEGRE, J. A. 2000. Stem Cells. *Cell*, 100, 143-155.
- GAGE, F. H., RAY, J. & FISHER, L. J. 1995. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annual review of neuroscience*, 18, 159-192.
- GENSCHOW, E., SCHOLZ, G., BROWN, N., PIERSMA, A., BRADY, M., CLEMAN, N., HUUSKONEN, H., PAILLARD, F., BREMER, S. & BECKER, K. 2000. Development of prediction models for three in vitro embryotoxicity tests in an ECVAM validation study. *In vitro & molecular toxicology*, 13, 51-66.
- GIANESSI, L. P. 1999. Beneficial impacts of pesticide use for consumers. ACS Publications.
- GRIFFITHS, C. E., STROBER, B. E., VAN DE KERKHOF, P., HO, V., FIDELUS-GORT, R., YEILDING, N., GUZZO, C., XIA, Y., ZHOU, B. & LI, S. 2010. Comparison of ustekinumab and etanercept for moderate-to-severe psoriasis. *New England Journal of Medicine*, 362, 118-128.
- GUYTON, K. Z., LOOMIS, D., GROSSE, Y., EL GHISSASSI, F., BENBRAHIM-TALLAA, L., GUHA, N., SCOCCIANI, C., MATTOCK, H. & STRAIF, K. 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology*, 16, 490-491.
- HADI, M., LEMRASKI, Q. & FAKHR, M. 2016. Study of the chlorpyrifos neurotoxicity using neural differentiation of adipose tissue derived stem cells. *Environmental toxicology*.
- HALL, R. D. 2006. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New phytologist*, 169, 453-468.
- HARTMAN, W. A. & MARTIN, D. B. 1985. Effects of four agricultural pesticides on *Daphnia pulex*, *Lemna minor*, and *Potamogeton pectinatus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 35, 646-651.
- HEIJNE, W. H., KIENHUIS, A. S., VAN OMMEN, B., STIERUM, R. H. & GROTEN, J. P. 2005. Systems toxicology: applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology. *Expert review of proteomics*, 2, 767-780.
- HOPE, J. L., SINHA, A. E., PRAZEN, B. J. & SYNOVEC, R. E. 2005. Evaluation of the DotMap algorithm for locating analytes of interest based on mass spectral similarity in data collected using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1086, 185-192.
- HRAC. Classification of herbicides according to site of action [Online]. Available: . http://hos.ufl.edu/sites/default/files/users/curtisr/Classification%20of%20Herbicides%20According%20to%20Site%20of%20Action_Apr%2006.pdf-2018].
- JHA, D. & CHAND, R. 1999. National Centre for Agricultural Economics and Policy Research (ICAR). *New Delhi, India from Agro-chemicals News in Brief Special Issue*.

- JOHNSON, R. J., SEGAL, M. S., SAUTIN, Y., NAKAGAWA, T., FEIG, D. I., KANG, D.-H., GERSCH, M. S., BENNER, S. & SÁNCHEZ-LOZADA, L. G. 2007. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease—. *The American journal of clinical nutrition*, 86, 899-906.
- KALAMPOKIS, I. F., KAPETANAKIS, G. C., ALIFERIS, K. A. & DIALLINAS, G. 2018. Multiple nucleobase transporters contribute to boscalid sensitivity in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 115, 52-63.
- KALLURI, H. S. & DEMPSEY, R. J. 2014. D609 mediated inhibition of ATP synthesis in neural progenitor cells. *Neuroreport*, 25, 777.
- KIRKLAND, D., ZEIGER, E., MADIA, F., GOODERHAM, N., KASPER, P., LYNCH, A., MORITA, T., OUEDRAOGO, G., MORTE, J. M. P. & PFUHLER, S. 2014. Can in vitro mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or in vivo genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 775, 55-68.
- KIRKMAN-BROWN, J. & BJÖRNDAHL, L. 2009. Evaluation of a disposable plastic Neubauer counting chamber for semen analysis. *Fertility and Sterility*, 91, 627-631.
- KLEINSTREUER, N., SMITH, A., WEST, P., CONARD, K., FONTAINE, B., WEIR-HAUPTMAN, A., PALMER, J., KNUDSEN, T., DIX, D. & DONLEY, E. 2011. Identifying developmental toxicity pathways for a subset of ToxCast chemicals using human embryonic stem cells and metabolomics. *Toxicology and applied pharmacology*, 257, 111-121.
- KOLIOS, G. & MOODLEY, Y. 2013. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85, 3-10.
- KONSTANTINOOU, I. K., HELA, D. G. & ALBANIS, T. A. 2006. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environmental Pollution*, 141, 555-570.
- KRISTANC, L. & KREFT, S. 2016. European medicinal and edible plants associated with subacute and chronic toxicity part I: Plants with carcinogenic, teratogenic and endocrine-disrupting effects. *Food and Chemical Toxicology*, 92, 150-164.
- KRTOLICA, A. 2005. Stem cell: balancing aging and cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37, 935-941.
- KUMAR, A. & BACHHAWAT, A. K. 2012. Pyroglutamic acid: throwing light on a lightly studied metabolite. *Current Science*, 288-297.
- LASKER, G. A. 2012. *The Association of Organochlorine Pesticide Concentration With Migraine Headaches, Body Mass Index, Gender, and Age*. Walden University.
- LEÓN, Z., GARCÍA-CAÑEVERAS, J. C., DONATO, M. T. & LAHOZ, A. 2013. Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation. *Electrophoresis*, 34, 2762-2775.
- MARSHALL, A. G. & HENDRICKSON, C. L. 2002. Fourier transform ion cyclotron resonance detection: principles and experimental configurations. *International Journal of Mass Spectrometry*, 215, 59-75.

- MERGENTHALER, P., LINDAUER, U., DIENEL, G. A. & MEISEL, A. 2013. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in Neurosciences*, 36, 587-597.
- MESNAGE, R., DEFARGE, N., SPIROUX DE VENDÔMOIS, J. & SÉRALINI, G.-E. 2014. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed research international*, 2014.
- MITCHELL, E. A., MULHAUSER, B., MULOT, M., MUTABAZI, A., GLAUSER, G. & AEBI, A. 2017. A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science*, 358, 109-111.
- MOHLER, R. E., DOMBEK, K. M., HOGGARD, J. C., YOUNG, E. T. & SYNOVEC, R. E. 2006. Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry analysis of metabolites in fermenting and respiring yeast cells. *Analytical chemistry*, 78, 2700-2709.
- MORRISON, S. J., SHAH, N. M. & ANDERSON, D. J. 1997. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 88, 287-298.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, 55-63.
- MURTHY, K. S., KIRAN, B. & VENKATESHWARLU, M. 2013. A review on toxicity of pesticides in Fish. *International Journal of Open Scientific Research*, 1, 15-36.
- NOUGADÈRE, A., SIROT, V., KADAR, A., FASTIER, A., TRUCHOT, E., VERGNET, C., HOMMET, F., BAYLÉ, J., GROS, P. & LEBLANC, J.-C. 2012. Total diet study on pesticide residues in France: levels in food as consumed and chronic dietary risk to consumers. *Environment international*, 45, 135-150.
- OERKE, E.-C. 2006. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144, 31-43.
- OLETTE, R., COUDERCHET, M., BIAGIANTI, S. & EULLAFFROY, P. 2008. Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants. *Chemosphere*, 70, 1414-1421.
- OLIVER, S. G., WINSON, M. K., KELL, D. B. & BAGANZ, F. 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in biotechnology*, 16, 373-378.
- PARK, M. V., NEIGH, A. M., VERMEULEN, J. P., DE LA FONTEYNE, L. J., VERHAREN, H. W., BRIEDÉ, J. J., VAN LOVEREN, H. & DE JONG, W. H. 2011. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32, 9810-9817.
- PECHLIVANIS, A., KOSTIDIS, S., SARASLANIDIS, P., PETRIDOU, A., TSALIS, G., MOUGIOS, V., GIKA, H. G., MIKROS, E. & THEODORIDIS, G. A. 2010. ¹H NMR-based metabonomic investigation of the effect of two different exercise sessions on the metabolic fingerprint of human urine. *Journal of proteome research*, 9, 6405-6416.
- PERHEENTUPA, J. & RAIVIO, K. 1967. Fructose-induced hyperuricaemia. *The Lancet*, 290, 528-531.
- PERRY, R. H., COOKS, R. G. & NOLL, R. J. 2008. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass spectrometry reviews*, 27, 661-699.

- PETERS, A. 1991. The fine structure of the nervous system. *Neurons and their supporting cells*.
- PETRIDIS, D. Π., Δ. 2016. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ.
- PETRUSHEVA, N. Protection of horticultural crops in the USSR and future perspectives. Papers at Sessions, VIII International Congress of Plant Protection, Moscow, USSR, 1975. 124.
- PIMENTEL, D. & GREINER, A. 1997. Environmental and socio-economic costs of pesticide use, chapter 4. *Techniques for reducing pesticide use: economic and environmental benefits*. John Wiley and Sons, New York.
- PORADA, C. D., ZANJANI, E. D. & ALMEIDA-PORADA, G. 2006. Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications. *Current stem cell research & therapy*, 1, 365-369.
- POTTEN, C. S. & LOEFFLER, M. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, 110, 1001-1020.
- RALSTON-HOOPER, K., HOPF, A., OH, C., ZHANG, X., ADAMEC, J. & SEPÚLVEDA, M. S. 2008. Development of GCxGC/TOF-MS metabolomics for use in ecotoxicological studies with invertebrates. *Aquatic Toxicology*, 88, 48-52.
- RIQUELME, P. A., DRAPEAU, E. & DOETSCH, F. 2008. Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363, 123-137.
- ROBERTSON, D. G. 2005. Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicological Sciences*, 85, 809-822.
- ROHWEDER, J., GUAN, K., HEGERT, C. & WOBUS, A. 2001. Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. *Toxicology in vitro*, 15, 741-753.
- SAVI, M. K., MANGAMANA, E. T., DEGUENON, J. M. & GBÈMEMALI, C. 2017. Determination of Lethal Concentrations Using an R Software Function Integrating the Abbott Correction. *Journal of Agricultural Science and Technology A*, 25.
- SCHÖLER, H. R. 2016. The potential of stem cells: An inventory. *Humanbiotechnology as social challenge*. Routledge.
- SCHOLZ, G., POHL, I., GENSCHOW, E., KLEMM, M. & SPIELMANN, H. 1999. Embryotoxicity screening using embryonic stem cells in vitro: correlation to in vivo teratogenicity. *Cells Tissues Organs*, 165, 203-211.
- SEBAUGH, J. 2011. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical statistics*, 10, 128-134.
- SOLOMON, K. R., BAKER, D. B., RICHARDS, R. P., DIXON, K. R., KLAINE, S. J., LA POINT, T. W., KENDALL, R. J., WEISSKOPF, C. P., GIDDINGS, J. M. & GIESY, J. P. 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environmental toxicology and Chemistry*, 15, 31-76.
- STAVRIC, B., JOHNSON, W., CLAYMAN, S., GADD, R. & CHARTRAND, A. 1976. Effect of fructose administration on serum urate levels in the uricase inhibited rat. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 32, 373-374.
- STROBER, W. 2015. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, 111, A3. B. 1-A3. B. 3.

- TAYLOR, M. D., KLAINE, S. J., CARVALHO, F. P., BARCELO, D. & EVERAARTS, J. 2003. *Pesticide residues in coastal tropical ecosystems: distribution, fate and effects*, CRC Press.
- TEKKI-KESSARIS, N., WOODRUFF, R., HALL, A. C., GAFFIELD, W., KIMURA, S., STILES, C. D., ROWITCH, D. H. & RICHARDSON, W. D. 2001. Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development*, 128, 2545-2554.
- THE EUROPEAN FOOD INFORMATION COUNCIL 2006. Diet, Lifestyle and Life Expectancy. [Online]. Available: <http://www.eufic.org/fr/heal/heal04.htm>.
- TILL, J. E., & MC, C. E. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research*, 14, 213-222.
- TIMOFEEVA, O. A., ROEGGE, C. S., SEIDLER, F. J., SLOTKIN, T. A. & LEVIN, E. D. 2008. Persistent cognitive alterations in rats after early postnatal exposure to low doses of the organophosphate pesticide, diazinon. *Neurotoxicology and teratology*, 30, 38-45.
- TOMIZAWA, M. & CASIDA, J. E. 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 247-268.
- TOMLIN, C. D. 2009. *The pesticide manual: a world compendium*, British Crop Production Council.
- TREMBLAY, R. G., SIKORSKA, M., SANDHU, J. K., LANTHIER, P., RIBECCO-LUTKIEWICZ, M. & BANI-YAGHOUB, M. 2010. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *Journal of neuroscience methods*, 186, 60-67.
- TRETTER, L., PATOCS, A. & CHINOPOULOS, C. 2016. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857, 1086-1101.
- TSUGAWA, H., CAJKA, T., KIND, T., MA, Y., HIGGINS, B., IKEDA, K., KANAZAWA, M., VANDERGHEYNST, J., FIEHN, O. & ARITA, M. 2015. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature methods*, 12, 523.
- WARREN, G. 1998. Spectacular increases in crop yields in the United States in the twentieth century. *Weed Technology*, 12, 752-760.
- WEISSMAN, I. L. 2000. Stem cells. *cell*, 100, 157-168.
- WELTHAGEN, W., SHELLIE, R. A., SPRANGER, J., RISTOW, M., ZIMMERMANN, R. & FIEHN, O. 2005. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC× GC-TOF) for high resolution metabolomics: biomarker discovery on spleen tissue extracts of obese NZO compared to lean C57BL/6 mice. *Metabolomics*, 1, 65-73.
- WIKLUND, S., JOHANSSON, E., SJÖSTRÖM, L., MELLEROWICZ, E. J., EDLUND, U., SHOCKCOR, J. P., GOTTFRIES, J., MORITZ, T. & TRYGG, J. 2008. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Analytical chemistry*, 80, 115-122.
- WU, G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*, 37, 1-17.
- ZADOKS, J. 2003. Fifty years of crop protection, 1950-2000. *NJAS wageningen journal of life sciences*, 50, 181-193.

- ZAFIROPOULOS, A., TSAROUHAS, K., TSITSIMPIKOU, C., FRAGKIADAKI, P., GERMANAKIS, I., TSARDI, M., MARAVGAKIS, G., GOUTZOURELAS, N., VASILAKI, F. & KOURETAS, D. 2014. Cardiotoxicity in rabbits after a low-level exposure to diazinon, propoxur, and chlorpyrifos. *Human & experimental toxicology*, 33, 1241-1252.
- ZHANG, X.-M., ZHAO, Y.-Q., YAN, H., LIU, H. & HUANG, G.-W. 2017. Inhibitory effect of homocysteine on rat neural stem cell growth in vitro is associated with reduced protein levels and enzymatic activities of aconitase and respiratory complex III. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 49, 131-138.
- ZUBAREV, R. A. & MAKAROV, A. 2013. Orbitrap mass spectrometry. ACS Publications.
- ΕΛΕΥΘΕΡΟΧΩΡΙΝΟΣ, Η. Γ. Μ.-Σ., ΟΥΡΑΝΙΑ 1996. Οι επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων στον άνθρωπο και το περιβάλλον. *Γεωργία -Κτηνοτροφία*, 8, 36-47.
- IPAC. The IRAC Mode of Action Classification [Online]. Available:.. <http://www.irac-online.org/modes-of-action-2017>

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ΕΛΕΥΘΕΡΟΧΩΡΙΝΟΣ, Η. Γ. ΜΕΝΚΙΣΟΓΛΟΥ.-ΣΠΥΡΟΥΔΗ., Ο. 1996. Οι επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων στον άνθρωπο και το περιβάλλον. *Γεωργία -Κτηνοτροφία*, 8, 36-47.
- ΖΙΩΓΑΣ, Β. & ΜΑΡΚΟΓΛΟΥ, Α. 2010. *Γεωργική Φαρμακολογία*, Ελληνικής Έκδοσης, 2010
- ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ-ΜΟΥΡΚΙΔΟΥ,Ε. 2008. *Γεωργικά Φάρμακα*. Εκδόσεις Μέθεξεις. Θεσσαλονίκη 2008
- ΧΑΡΙΖΑΝΗΣ ΠΑΣΧΑΛΗΣ ΧΡ.2014.*Μέλισσα και Μελισσοκομική Τεχνική*. Εκδότης Μελισσοκομική Επιθεώρηση 2014

Παράρτημα

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α. Δημιουργία μεταβολικής βάσης δεδομένων (matrix) για τα Neural Stem Cells. Ανιχνεύθηκαν 124 μεταβολικά χαρακτηριστικά, εκ των οποίων 54 ταυτοποιήθηκαν.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
Average 1. R(tmin)	Quant. mass	Metabolites (Raw)	Metabolites (Common name)	Metabolites (Derivatives)	Synonym(s)	KEGG ID	GoM Metabolome	PubChem ID	CAS Registry Number	Biosynthetic pathway(s)	Abbreviated Biosynthetic	Monoisotopic mass (Da)	Average Molecular	Molecular Formula	Chemical group
2	6.15	RT6.15	RT6.15	RT6.15	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
3	7.70	RT7.70	RT7.70	RT7.70	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
4	9.17	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
5	9.82	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
6	10.46	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
7	10.87	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
8	11.36	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
9	11.82	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
10	11.71	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
11	11.88	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
12	12.83	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
13	12.59	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
14	13.82	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
15	14.49	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
16	14.84	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
17	15.61	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
18	15.62	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
19	15.72	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
20	16.11	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
21	16.35	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
22	16.39	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
23	16.59	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
24	17.09	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
25	21.55	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
26	21.94	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
27	22.00	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
28	22.39	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
29	22.92	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
30	23.55	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
31	23.72	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
32	23.78	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
33	23.88	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
34	24.36	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
35	24.66	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
36	24.84	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na

	Average Rt(min)	Quant. mass	Metabolites (Raw)	Metabolites (Common name)	Metabolites (Deriv)	Synonym(s)	KEGG ID	GoM Metabol	PubChem ID	CAS Registry	Biosynthetic path	Abbreviated Biot	Monoisotopic m/z	Average Molec	Molecular Form	Chemical group
37	24.89	85	RT24.89	RT24.89	RT24.89	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
38	24.98	217	RT24.98	RT24.98	RT24.98	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
39	25.23	57	RT25.23 (Hydrocar)	RT25.23 (Hydrocarbon)	RT25.23 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
40	25.35	57	RT25.35 (Hydrocar)	RT25.35 (Hydrocarbon)	RT25.35 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
41	25.61	71	1,1-Dimethylpropyl	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
42	25.75	56	RT25.75 (Hydrocar)	RT25.75 (Hydrocarbon)	RT25.75 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
43	25.83	85	RT25.83	RT25.83	RT25.83	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
44	26.02	71	RT26.02	RT26.02	RT26.02	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
45	26.21	71	RT26.21 (Hydrocar)	RT26.21 (Hydrocarbon)	RT26.21 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
46	26.34	71	RT26.34	RT26.34	RT26.34	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
47	27.02	87	RT27.02	RT27.02	RT27.02	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
48	27.15	57	Hexane, 3,3-dimethyl	Hexane	Hexane	n/a	n/a	n/a	n/a	553-18-8	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
49	27.25	254	Cyclohexanecarboxylic acid	Cyclohexanecarboxylic acid	Cyclohexanecarboxylic acid	n/a	12010	n/a	n/a	98-98-5	map000362Benzos	map000362	128.169	1.280.837	CTH1202	n/a
50	27.93	57	RT27.93 (Hydrocar)	RT27.93 (Hydrocarbon)	RT27.93 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
51	28.03	71	Tripropylamine	1-Propanamine, N,N-dipropyl	1-Propanamine, N,N	n/a	n/a	n/a	n/a	102-89-2	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
52	28.07	73	RT28.07	RT28.07	RT28.07	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
53	28.13	57	RT28.13	RT28.13	RT28.13	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
54	28.85	247	RT28.85	RT28.85	RT28.85	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
55	28.93	57	RT28.93	RT28.93	RT28.93	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
56	28.95	273	Citric acid, tetraakis	Citric acid	Citric acid (4TMS)	Citrate, Citric acid	C00158	A182004	311	77-92-9	map00020Citrate	map00020	192.027	192.1235	C6H8O7	Carboxylic acid
57	29.02	285	Tetradecanoic acid	Myristic acid	Myristic acid (TMS)	Tetradecanoic acid	C06424	A185004	11005	544-83-8	map00061Fatty ac	map00061	228.2089	228.3709	C14H28O2	Fatty acids, Fa
58	29.38	149	1,3-Benzenedicarb	Diisobutyl phthalate	Diisobutyl phthalat	DIBP	C15205	n/a	17395202	84-89-5	n/a	n/a	278.1518	278.3435	C16H22O4	Carboxylic acid
59	29.71	57	RT29.71 (Hydrocar)	RT29.71 (Hydrocarbon)	RT29.71 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
60	29.82	71	RT29.82 (Hydrocar)	RT29.82 (Hydrocarbon)	RT29.82 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
61	29.98	57	RT29.98 (Hydrocar)	RT29.98 (Hydrocarbon)	RT29.98 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
62	30.15	148	RT30.15 (Hydrocar)	RT30.15 (Hydrocarbon)	RT30.15 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
63	30.25	73	D-Fructose, 1,3,4,5	D-Fructose	D-Fructose (1MEO)	D-Glucose o-met	C00095	A187002	439163	57-48-7	map00051Fructos	map00051	180.0634	180.1559	C6H12O6	Carbohydrates
64	30.31	57	RT30.31 (Hydrocar)	RT30.31 (Hydrocarbon)	RT30.31 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
65	30.45	71	RT30.45 (Hydrocar)	RT30.45 (Hydrocarbon)	RT30.45 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
66	30.47	103	D-Fructose, 1,3,4,5	D-Fructose	D-Fructose (1MEO)	D-Glucose o-met	C00095	A187002	439163	57-48-7	map00051Fructos	map00051	180.0634	180.1559	C6H12O6	Carbohydrates
67	30.55	204	D-Glucose, 2,3,4,5	D-Glucose	D-Glucose (TMS)	Grape sugar, De	C00031	A191001	5793	50-99-7	map00010Glycol	map00010	180.0634	180.1559	n/a	Carbohydrates
68	30.88	148	RT30.88	RT30.88	RT30.88	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
69	30.73	245	1H-Indene-4-acetic	AC1LDH7	AC1LDH7	AC1LDH7	n/a	n/a	618585	n/a	n/a	n/a	260.178	260.377	C17H24O2	n/a
70	30.75	73	D-Glucose, 2,3,4,5	D-Glucose	D-Glucose (TMS)	Grape sugar, De	C00031	A191001	5793	50-99-7	map00010Glycol	map00010	180.0634	180.1559	C6H12O6	Carbohydrates
71	30.98	117	n-Pentadecanoic acid	Pentadecanoic acid	Pentadecanoic acid	n/a	n/a	n/a	13849	74397-22-9	n/a	n/a	242.2246	242.3975	C15H30O2	Fatty acids, Fat
72	31.08	73	D-Glucose, 2,3,4,5	D-Glucose	D-Glucose (1MEO)	Grape sugar, De	C00031	A191001	5793	50-99-7	map00010Glycol	map00010	180.0634	180.1559	C6H12O6	Carbohydrates
73	31.24	149	Dibutyl phthalate	Dibutyl phthalate	Dibutyl phthalate	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

	Average RT(min)	Quant mass	Metabolites (Raw)	Metabolites (Common name)	Metabolites (Deriv)	Synonym(s)	KEGG ID	GoM Metabol	PubChem ID	CAS Registry	BioSynthetic path	Abbreviated Bod	Monoisotopic m	Average Molec	Molecular Form	Chemical group
74	31.27	71	RT31.27 (Hydrocar)	RT31.27 (Hydrocarbon)	RT31.27 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
75	31.51	73	D-Mannitol, 1,2,3,4-D-Mannitol	D-Mannitol	D-Mannitol (RTMS)	Mannitol	C00392	A193002	8251	89-85-8	map00051Fructose	map00051 map0	182.0780	182.1718	C6H14O6	Carbohydrates
76	32.09	212	RT32.09	RT32.09	RT32.09	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
77	32.20	205	RT32.20	RT32.20	RT32.20	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
78	32.38	204	D-Glucose, 2,3,4,6, D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose (RTMS)	Grape sugar, De	C00031	A191001	5793	50-99-7	map00010Glycoly	map00010 map0	180.0634	180.1559	C6H12O6	Carbohydrates
79	32.47	117	ds-8-Hexadecenoic(Palmitoleic acid	Palmitoleic acid	Palmitoleic acid (1 (9Z)-Hexadecenoic	C00382	A203002	445838	373-45-9	map00061Fatty ac	map00061	254.2248	254.4082	C18H30O2	Fatty ac/Ls, Fa	
80	32.86	313	Palmitic acid, trim	Palmitic acid	Palmitic acid (RTMS)	Palmitic acid	C00249	A205001	985	57-10-3	map00061Fatty ac	map00061 map0	256.2402	256.4241	C18H32O2	Fatty ac/Ls, Fa
81	33.06	57	RT33.06 (Hydrocar)	RT33.06 (Hydrocarbon)	RT33.06 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
82	33.46	122	OLENITRILE	OLENITRILE	OLENITRILE	OLENITRILE	n/a	n/a	8420241	n/a	n/a	n/a	263.2612	263.4690	C18H33N	Fatty ac/Ls, Fa
83	33.77	57	RT33.77	RT33.77	RT33.77	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
84	34.11	188	RT34.11	RT34.11	RT34.11	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
85	34.16	117	Heptadecanoic acid	Heptadecanoic acid	Heptadecanoic acid	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
86	34.29	217	Myo-Inositol, 1,2,3, Myo-Inositol	Myo-Inositol	Myo-Inositol (RTMS)	Myo-Inositol	C00137	A209002	892	87-89-8	map00052Galact	map00052 map0	180.0634	180.1559	C6H12O6	Carbohydrates
87	34.37	146	RT34.37	RT34.37	RT34.37	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
88	34.46	71	RT34.46	RT34.46	RT34.46	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
89	34.64	328	Heptadecanoic acid	Heptadecanoic acid	Heptadecanoic acid (RTMS)	Heptadecanoic acid	C16638	A214005	10465	104255-81-4	n/a	n/a	268.2402	268.4348	C17H32O2	Fatty ac/Ls, Fa
90	34.88	327	RT34.87	RT34.87	RT34.87	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
91	34.90	57	RT34.90	RT34.90	RT34.90	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
92	34.97	262	RT34.97	RT34.97	RT34.97	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
93	35.05	57	Undecane, 3,8-dim	Undecane	Undecane	n/a	n/a	n/a	n/a	17301-30-3	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
94	35.15	160	2,3,4-Trifluorobenz 2,3,4-Trifluorobenz	2,3,4-Trifluorobenz	2,3,4-Trifluorobenz	n/a	n/a	n/a	n/a	61079-72-9	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
95	35.20	71	RT35.20 (Hydrocar)	RT35.20 (Hydrocarbon)	RT35.20 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
96	35.63	328	RT35.63	RT35.63	RT35.63	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
97	35.70	240	RT35.70	RT35.70	RT35.70	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
98	35.81	188	RT35.81	RT35.81	RT35.81	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
99	35.93	339	Oleic acid, trimet	Oleic acid	Oleic acid (RTMS)	Oleic acid	C00712	A222001	445639	112-80-1	map00061Fatty ac	map00061 map0	282.2559	282.4614	C18H34O2	Fatty ac/Ls, Fa
100	35.98	328	RT35.98	RT35.98	RT35.98	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
101	36.27	328	RT36.27	RT36.27	RT36.27	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
102	36.40	341	Stearic acid, trimet	Stearic acid	Stearic acid (RTMS)	Stearic acid	C01630	A225002	5281	57-11-4	map00061Fatty ac	map00061 map0	284.2715	284.4772	C18H36O2	Fatty ac/Ls, Fa
103	36.84	57	RT36.84 (Hydrocar)	RT36.84 (Hydrocarbon)	RT36.84 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
104	37.53	262	RT37.53	RT37.53	RT37.53	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
105	37.58	188	RT37.58	RT37.58	RT37.58	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
106	37.73	328	RT37.73	RT37.73	RT37.73	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
107	37.89	71	RT37.89 (Hydrocar)	RT37.89 (Hydrocarbon)	RT37.89 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
108	38.06	57	RT38.06 (Hydrocar)	RT38.06 (Hydrocarbon)	RT38.06 (Hydrocar)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
109	38.12	262	RT38.12	RT38.12	RT38.12	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
110	38.15	71	RT38.15	RT38.15	RT38.15	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

▲	Average Rt (min)	Quant. mass	Metabolites (Raw)	Metabolites (Common)	Metabolites (Der.)	Synonyms	KEGG ID	GoM Metabolite	PubChem ID	CAS Registry	Biosynthetic	Abbreviated	Monoisot	Average M _r	Molecular	Chemical group
110	38.15	71	RT38.15	RT38.15	RT38.15	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
111	38.80	366	RT38.80	RT38.80	RT38.80	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
112	38.83	71	RT38.83 (Hydrocarb)	RT38.83 (Hydrocarbon)	RT38.83 (Hydrocarb)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
113	39.21	188	RT39.21	RT39.21	RT39.21	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
114	39.45	366	RT39.45	RT39.45	RT39.45	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
115	39.71	117	Eicosanoic acid, trim	Eicosanoic acid	Eicosanoic acid (17)	icosanoic acid; EIC06425	n/a	n/a	8660	55530-70-6	map01040Biosy	map01040	312,3028	312,5304	C20H40O2	Fatty acyls; Fatty
116	39.99	217	RT39.99 (Carbohydr)	RT39.99 (Carbohydrate)	RT39.99 (Carbohydr)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
117	40.36	57	RT40.36 (Hydrocarb)	RT40.36 (Hydrocarbon)	RT40.36 (Hydrocarb)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
118	40.88	366	RT40.88	RT40.88	RT40.88	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
119	41.38	149	1,2-Benzenedicarbo	Disoochyl phthalate	Disoochyl phthalate	Disoochyl phthalate C14577	n/a	n/a	33934	27554-26-3	n/a	n/a	390,2770	390,5561	C24H38O4	Carboxylic acids;
120	41.48	71	RT41.48 (Hydrocarb)	RT41.48 (Hydrocarbon)	RT41.48 (Hydrocarb)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
121	41.60	71	RT41.60 (Hydrocarb)	RT41.60 (Hydrocarbon)	RT41.60 (Hydrocarb)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
122	43.99	361	RT43.99	RT43.99	RT43.99	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
123	44.81	71	RT44.81	RT44.81	RT44.81	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
124	44.95	71	Phosphoric acid, die	Diethyl Octyl Phosphate	Diethyl Octyl Phosphr	diethyl octyl phos	n/a	n/a	209698	20195-13-5	n/a	n/a	266,165	266,318	C12H27O4P	n/a
125	48.85	183	RT48.85	RT48.85	RT48.85	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

