

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

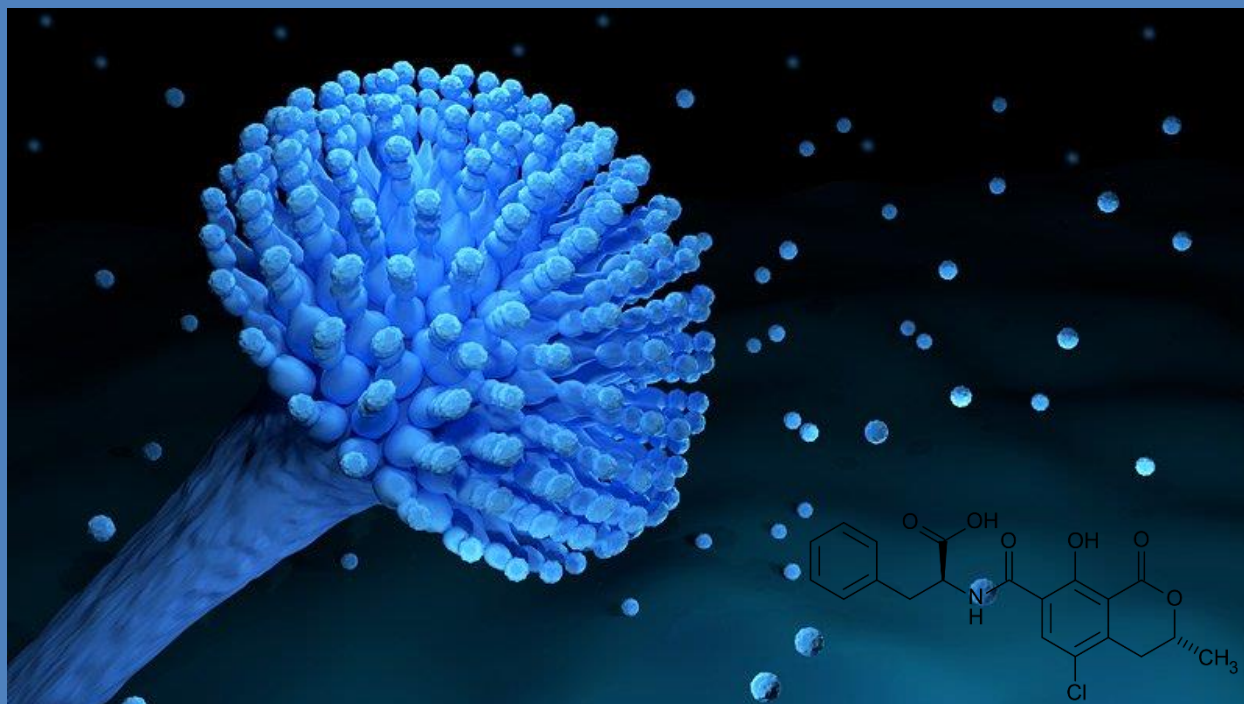
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗΣ Α ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΝΕΦΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ



ΣΟΦΙΑ Ι. ΜΑΡΚΑ

ΓΕΩΡΓΙΑ ΜΟΣΧΟΠΟΥΛΟΥ, ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗΣ Α ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ
ΝΕΦΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΤΗΣ
ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

ΣΟΦΙΑ Ι. ΜΑΡΚΑ

ΓΕΩΡΓΙΑ ΜΟΣΧΟΠΟΥΛΟΥ, ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗΣ Α ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΝΕΦΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

ΣΟΦΙΑ Ι. ΜΑΡΚΑ

ΓΕΩΡΓΙΑ ΜΟΣΧΟΠΟΥΛΟΥ, ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της γενικής συνέλευσης του τμήματος Βιοτεχνολογίας κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική επιτροπή.

Συμβουλευτική και Εξεταστική επιτροπή:

1. Κίντζιος Σπυρίδων, Καθηγητής Εργαστηρίου Κυτταρικής Τεχνολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Πρύτανης Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
2. Μοσχοπούλου Γεωργία, Επίκουρη Καθηγήτρια εργαστηρίου Κυτταρικής Τεχνολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, ΓΠΑ
3. Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, ΓΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ) είναι μια νεφροτοξική μυκοτοξίνη που παράγεται από διάφορα είδη *Aspergillus* και *Penicillium* που μολύνουν συχνά τρόφιμα και ζωοτροφές. Είναι γνωστό καρκινογόνο [Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC), ομάδα 2B] και η χρόνια έκθεσή του σχετίζεται με νεφρικές διαταραχές. Η χρήση αντιοξειδωτικών ενώσεων ως προστατευτικών παραγόντων έναντι της οξειδωτικής βλάβης που επάγεται από την ΟΤΑ έχει αναφερθεί σε αρκετές κυτταρικές σειρές. Σε αυτή τη μελέτη ερευνήσαμε τις *in vitro* κυτταροτοξικές επιδράσεις που επάγονται από την ΟΤΑ και την επίδραση αρκετών αντιοξειδωτικών ουσιών (πρότυπα διαλύματα και αιθανολικά εκχυλίσματα μούρων) σε ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα (HEK293) μετά από 24 και 48ωρη έκθεση. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις ΟΤΑ και διαφορετικά αντιοξειδωτικά (α-Τοκοφερόλη, GSH, Ασκορβικό οξύ και εκχυλίσματα μούρων). Οι τιμές ΟΤΑ EC₅₀ ήταν 2,98 και 2,08 μΜ για 24 και 48 ώρες, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα μετά από προ-επίθεση 3 ωρών με α-Τοκοφερόλη παρουσίασαν σημαντική βελτίωση της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά την έκθεση σε ΟΤΑ, ιδιαίτερα 24 ώρες μετά την αγωγή (40% με 5μΜ ΟΤΑ, 60% με 5μΜ ΟΤΑ + 750 μΜ α-Τοκοφερόλη). Η α-Τοκοφερόλη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό και ο κύριος βιολογικός της ρόλος είναι η προστασία των συστατικών των κυτταρικών μεμβρανών από την οξείδωσή τους λόγω ελεύθερων ριζών. Η α-Τοκοφερόλη μειώνει την παραγωγή ROS από την έκθεση σε ΟΤΑ, ειδικά 24 ώρες μετά τη έκθεση. Περαιτέρω, οι διακυμάνσεις του μεταβολισμού των κυττάρων 24 ώρες μετά από την έκθεση των κυττάρων σε ΟΤΑ παρακολουθήθηκαν πραγματοποιώντας μεταβολομική ανάλυση GC/EI/MS. Τα αποτελέσματά της μελέτης προτείνουν αρκετούς μηχανισμούς κυτταρικής βλάβης λόγω της έκθεσης σε ΟΤΑ. Οι προτεινόμενες μεταβολικές οδοί σε αυτό το μοντέλο νεφρικών κυττάρων θα παράσχουν στην επιστημονική κοινότητα πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την αξιολόγηση της τοξικολογικής ασφάλειας της ΟΤΑ και θα συμβάλλουν στην ανάπτυξη στρατηγικών προστασίας από τοξικολογικές βιο-απειλές.

Λέξεις Κλειδιά: Τοξικολογία, Κυτταροτοξικότητα, Μυκοτοξίνη, Ωχρατοξίνη Α, Αντιοξειδωτικά, Τοκοφερόλη α, Μεταβολομική Ανάλυση

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a nephrotoxic mycotoxin produced by different *Aspergillus* and *Penicillium* species that frequently contaminate human and animal food products. It is a well-known carcinogen [International Agency for Research on Cancer (IARC), group 2B) and its chronic exposure is associated with kidney disorders. The use of antioxidant compounds as counteracting agents against the OTA-induced oxidative damage has been reported in several cell lines. In this study, we have investigated the in vitro cytotoxic effects induced by OTA, and the effect of several antioxidants (standard solutions and ethanolic berry extracts) on human embryonic kidney cells (HEK293) 24 and 48 h following treatments. Cells were exposed to various OTA concentrations and different antioxidants (α -Tocopherol, GSH, Ascorbic acid and berry extracts). The OTA EC₅₀ values were 2.98 and 2.08 μ M for 24 and 48 h, respectively. The results from a 3 h pre-incubation with α -Tocopherol revealed an ameliorative effect on the cell viability following OTA exposure, especially 24h post-treatment (40% with 5 μ M OTA, 60% with 5 μ M OTA+750 μ M α -Tocopherol). α -Tocopherol is a potent antioxidant that functions as a peroxy radical scavenger that terminates chain reactions and has the ability to move within the cellular membrane. α -Tocopherol reduces ROS production due to OTA exposure, especially 24h post-treatment. Furthermore, fluctuations of cells' metabolism 24 h following treatments with OTA were monitored performing GC/EI/MS metabolomics. Our results that will be discussed propose several mechanisms of cellular damage through OTA exposure. The proposed metabolic pathways in this renal cell model will provide the scientific community valuable information on the toxicological safety evaluation of OTA and also for the development of protective against toxicological bio threats strategies.

Key Words: Toxicology, Cell culture, Mycotoxin, Ochratoxin A, Antioxidant, Tocopherol A, Metabolomics

Τα αποτελέσματα αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης παρουσιάστηκαν με τη μορφή αναρτημένης δημοσίευσης στο 69^ο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Βιολογίας και Βιοχημείας που πραγματοποιήθηκε στις 23 Νοεμβρίου 2018 στη Λάρισα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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 τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Κίντζιο Σπυρίδωνα για το ενδιαφέρον και πρωτότυπο θέμα πτυχιακής, καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Γεωργία Μοσχοπούλου του Εργαστηρίου Κυτταρικής Τεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης, για την καθοδήγηση και τη στήριξη κατά τη διάρκεια μεταπτυχιακής μου μελέτης, καθώς και για το χρόνο που διέθεσε για τη διόρθωση και τη παρουσίαση της μελέτης μου.

Τις ευχαριστίες μου εκφράζω και στον Επίκουρο Καθηγητή Εμμανουήλ Φλεμετάκη του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης καθώς και για τον χρόνο που διέθεσε καθ' όλη την διάρκεια της παρουσιάσεως της πτυχιακής μου εργασίας.

Σημαντικότερη ήταν και η συμβολή της Μεταδιδακτορικής Ερευνήτριας Μαυρίκου Σοφίας για τη στήριξη και τη καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης, συγγραφής και παρουσίασης της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στον Δρ. Κωνσταντίνο Α. Αλιφέρη, Λέκτορα του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και στην Υποψήφια Διδάκτορα Μάιρα Λυκογιάννη του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την σημαντικότερη συνεισφορά τους στις πειραματικές διαδικασίες και για τις συμβουλές τους κατά την μεταβολομική ανάλυση.

Ένα ευχαριστώ επίσης, οφείλω να εκφράσω στον Αναπληρωτή Καθηγητή Ρούσσο Πέτρο του εργαστηρίου Δενδροκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Νικολέτα Κλειώ Δεναξά του Εργαστηρίου Δενδροκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τα φαινοτικά εκχυλισματα μούρων και φράουλας που χρησιμοποίησα στη μεταπτυχιακή μου μελέτη.

Σημαντική ήταν και η προσφορά της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του Εργαστηρίου Γενετικής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Ελένης Ντούνη, καθώς μας πρόσφερε τη κυτταρική σειρά HEK 293 που χρησιμοποιήθηκε για την εκπόνηση της μελέτης μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες αξίζουν η οικογένεια μου και οι φίλοι μου, Καραβίδας Ιωάννης Υποψήφιος Διδάκτωρ του Εργαστηρίου Κηπευτικών Καλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Παλιμέρη-Θεοδόση Δήμητρα, Υποψήφια Διδάκτωρ του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Μετσόβιου Πολυτεχνείου Αθηνών και Πρεμέτης Γεώργιος, τελιόφοιτος μεταπτυχιακός φοιτητής της Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την ολόπλευρη στήριξη τους και την ώθηση που μου έδωσαν για να ολοκληρώσω αυτή την προσπάθεια.

Σοφία Μαρκά

Αθήνα, 2018

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ	
Asc	Ασκορβικό οξύ
BAC	βιοδραστικές ενώσεις
BSA	Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης βόειου ορού
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξίδιο
FBS	ορός εμβρύου μύσχου
FLUO-3	2-(2-{2-[Bis(carboxymethyl)amino]-5-(2,7-dichloro-6-hydroxy-3-oxo-3 <i>H</i> -xanthen-9-yl)phenoxy]ethoxy)-4-methylphenyl}(carboxymethyl)amino}acetic acid
GSH	Γλουταθειόνη
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome
LC50	μέση συγκέντρωση θανατηφόρου δόσης
MTT	χρωστική 3-(4,5-διμεθυλοθιαζολ-2-υλ)-2,5-βρωμίδιο του διφαινυλοτετραζολίου
OD	οπτική απορρόφηση
OPLS-DA	Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis
OT	Ωχρατοξίνη
OTA	Ωχρατοξίνη Α
OTB	Ωχρατοξίνη Β
OTC	Ωχρατοξίνη Γ
p	στατιστική σημαντικότητα (p-value)
PBS	αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PCA	Principal Component Analysis
R ²	τυπική απόκλιση
RFU	σχετικές μονάδες φθορισμού
ROS	ενεργές μορφές οξειγόνου
α-Τα	α-Τοκοφερόλη

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1	ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ.....	13
1.1.1	ΓΕΝΙΚΑ.....	13
1.1.2	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ	13
1.1.3	ΤΡΟΠΟΣ ΕΚΘΕΣΗΣ.....	13
1.1.4	ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΕΚΘΕΣΗΣ.....	14
1.1.5	ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ	14
1.1.6	ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΟΝΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	14
1.1.7	ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΟΞΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ	14
1.1.8	ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ.....	15
1.1.9	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΟΙ ΟΡΟΙ (ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ)	15
1.2	ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	17
1.2.1	ΓΕΝΙΚΑ.....	17
1.2.2	ΟΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	17
1.2.3	ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ	18
1.2.4	ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ	19
1.2.5	«ΚΑΛΥΜΜΕΝΕΣ» ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ	20
1.2.6	ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ	21
1.2.7	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	21
1.3	ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΕΣ	22
1.3.1	ΓΕΝΙΚΑ.....	22
1.3.2	ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΩΝ	22
1.3.3	ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α (ΟΤΑ)	23
1.4	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	27
1.4.1	ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΕΣ	27
1.4.2	ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSH).....	31
1.4.3	ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ.....	32
1.5	ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	35
1.5.1	«ΟΜΙΚΕΣ» ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ (Omics).....	35
1.5.2	ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ.....	35
1.5.3	ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ - ΤΟΞΙΚΟΓΕΝΟΜΙΚΗ	36
1.5.4	ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	36

1.5.5	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	38
1.6	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	39
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
2.1	Καλλιέργεια και Διατήρηση Κυττάρων HEK 293	39
2.1.1	Υλικά και Αντιδραστήρια	39
2.1.2	Εξοπλισμός.....	40
2.1.3	Καλλιέργεια και Απομόνωση κυττάρων.....	40
2.1.4	Μέτρηση κυττάρων-Προσδιορισμός βιωσιμότητας	40
2.1.5	Κρυοσυντήρηση κυτταρικών σειρών	41
2.1.6	Απόψυξη κυτταρικών σειρών	41
2.2	Παρασκευή διαλυμάτων ωχρατοξίνης A.....	41
2.2.1	Υλικά και Αντιδραστήρια	41
2.2.2	Εξοπλισμός.....	41
2.2.3	Διαδικασία παρασκευής πρότυπων διαλυμάτων ωχρατοξίνης A.....	41
2.3	Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων αντιοξειδωτικών	42
2.3.1	Υλικά και Αντιδραστήρια	42
2.3.2	Εξοπλισμός.....	42
2.3.3	Τοκοφερόλη (Βιταμίνη E)	42
2.3.4	Ασκορβικό Οξύ (Βιταμίνη C)	42
2.3.5	Γλουταθειόνη (GSH)	42
2.3.6	Φαινολικό Εκχύλισμα Μούρων και Φράουλας.....	42
2.4	Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων	46
2.4.1	Υλικά και Αντιδραστήρια	46
2.4.2	Εξοπλισμός.....	47
2.4.3	Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων HEK 293 με εφαρμογή της μεθόδου εκτίμησης της πρόσληψης της χρωστικής MTT	47
2.5	Δοκιμή επούλωσης πληγής.....	47
2.5.1	Υλικά και Αντιδραστήρια	48
2.5.2	Εξοπλισμός.....	48
2.5.3	Διαδικασία δοκιμής επούλωσης πληγής.....	48
2.6	Προσδιορισμός Ενεργών Μορφών Οξυγόνου (ROS)	49
2.6.1	Υλικά και Αντιδραστήρια	49
2.6.2	Εξοπλισμός.....	50

2.6.3	Προσδιορισμός Ενεργών Μορφών Οξυγόνου (ROS) με τη χρήση της χρωστικής H ₂ DCFDA	50
2.7	Προσδιορισμός συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου	50
2.7.1	Υλικά και Αντιδραστήρια	51
2.7.2	Εξοπλισμός.....	51
2.7.3	Προσδιορισμός συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου με τον φθορισμομετρικό δείκτη ασβεστίου Fluo-3 σε κύτταρα HEK 293	52
2.8	Στατιστική ανάλυση δεδομένων.....	52
2.9	Μεταβολομική ανάλυση για τη μελέτη της επίδρασης ωχρατοξίνης Α, α- Τοκοφερόλης ή συνδυασμών τους στο μεταβολισμό των ανθρώπινων εμβρυϊκών νεφρικών κυττάρων (HEK293)	53
2.9.1	Πειραματικός σχεδιασμός	53
2.9.2	Δειγματοληψία και εκχυλίσεις κυττάρων	53
2.9.3	Μεταβολομική ανάλυση του ενδο- και εξω- μεταβολόματος των ανθρώπινων εμβρυϊκών νεφρικών κυττάρων (HEK293) με αέριο χρωματογράφο-φασματοόμετρο μάζας (GC/EI/MS)	54
2.9.4	Βιοπληροφορική-μεταβολομική ανάλυση και ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης ΟΤΑ, τοκοφερόλης και του μείγματος τους στο μεταβολισμό στελεχών των νεφρικών κυττάρων HEK293.....	54
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	55
3.1	ΑΠΟΤΕΣΜΑΤΑ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΜΟΥΡΩΝ.....	55
3.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΦΡΑΟΥΛΑΣ.....	57
3.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HEK 293.....	58
3.3.1	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ ΜΤΤ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΣΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΩΝ	58
3.3.2	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ ΜΤΤ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΣΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΩΝ.....	60
3.3.3	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ ΜΤΤ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ, ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΜΟΥΡΩΝ ΚΑΙ ΦΡΑΟΥΛΑΣ ΣΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΩΝ	62

3.3.4	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ ΜΤΤ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ ΦΡΑΟΥΛΑΣ ΣΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΩΝ.....	64
3.3.5	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ ΜΤΤ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΤΑ, ΣΥΝΔΙΣΜΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΟΤΑ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΠΡΟ-ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ ΣΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΩΝ.....	66
3.3.6	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ ΜΤΤ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ ΣΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΩΝ	68
3.3.7	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ ΜΤΤ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΠΡΟ-ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ ΣΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΩΝ	70
3.4	ΔΟΚΙΜΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK 293 ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΤΑ, ΟΤΑ ΜΕ ΠΡΟ-ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ.....	73
3.5	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΕΝΕΡΓΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS) ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK 293 ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ Η2DCFDA ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΤΑ, α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΤΟΥΣ ΓΙΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΕΣ	74
3.6	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ Ca ²⁺ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK 293 ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ FLUO-3 ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΤΑ, α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΤΟΥΣ ΓΙΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΕΣ	76
3.7	ΑΠΟΤΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HEK 293 ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΤΑ ΜΕ ΠΡΟ-ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ.....	78
3.7.1	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΕΜΒΑΣΗΣ ΜΕ ΟΤΑ ΣΕ ΕΜΒΡΥΙΚΑ ΝΕΦΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK 293	81
3.7.2	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΕΜΒΑΣΗΣ ΜΕ α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ ΣΕ ΕΜΒΡΥΙΚΑ ΝΕΦΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK 293	83
3.7.3	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΕΜΒΑΣΗΣ ΜΕ ΟΤΑ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΠΡΟ-ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ ΣΕ ΕΜΒΡΥΙΚΑ ΝΕΦΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK 293.....	85
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	87
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	94

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

1.1.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η τοξικολογία είναι επιστημονικός κλάδος που συνδυάζει γνώσεις βιολογίας, χημείας, βιοχημείας, φυσιολογίας, φαρμακολογίας και ιατρικής, με σκοπό τη μελέτη των δυσμενών επιδράσεων των χημικών ουσιών στους ζώντες οργανισμούς και την πρακτική της διάγνωσης και θεραπείας της έκθεσης σε τοξίνες και τοξικές ουσίες. Ιδιαίτερη σημασία στην τοξικολογία έχει η σχέση μεταξύ της δόσης και των επιδράσεων της στον εκτεθειμένο οργανισμό. Ο Φίλιππος Αυρήλιος Θεόφραστος Μπομπάστους Φον Χόχενχάϊμ (1493-1541), γνωστός με το όνομα Παράκελσος, θεωρείται ο πατέρας της τοξικολογίας. Σε αυτόν αποδίδεται ο η ιστορική φράση για την τοξικολογία, «Τι είναι εκείνο που δεν είναι δηλητήριο; Όλες οι ουσίες είναι δηλητήρια και καμία δεν είναι. Μόνο η δόση καθορίζει εάν μία ουσία είναι δηλητήριο» [1, 2]. Ο Mathieu Orfila (1787-1853) θεωρείται ο σύγχρονος πατέρας της τοξικολογίας, έπειτα από την επίσημη αναφορά του στην τοξικολογία το 1813, με τη συγγραφή του *Traité des poisons*, που ονομάζεται επίσης *Toxicologie générale* [3].

1.1.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ

Θεωρητικά, όλες οι ουσίες, φυσικές ή συνθετικές, παραγόμενες από καύση ή άλλη φυσική ή τεχνολογική διεργασία, μπορούν να παρέμβουν στις φυσιολογικές διεργασίες του μεταβολισμού ζωντανών οργανισμών. Η έκθεση των ανθρώπων και άλλων οργανισμών σε τοξικές ουσίες μπορεί να οφείλεται σε πολλές δραστηριότητες, όπως σκόπιμη κατάποση, έκθεση λόγω επαγγέλματος, περιβαλλοντική έκθεση, καθώς και τυχαία ή σκόπιμη (αυτοκτονική ή ανθρωποκτονική) δηλητηρίαση [4]. Οι τοξικές και επικίνδυνες χημικές ουσίες συναντώνται κυρίως σε μορφή μίγματος ή γίνονται παράλληλες εκθέσεις σε περισσότερες της μίας τοξικές ουσίες σε βιολογικά συστήματα. Το αποτέλεσμα της τοξικής δράσης μπορεί να είναι προσθετικό, συνεργιστικό, ενισχυτικό ή ανταγωνιστικό, ανάλογα με το είδος και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τοξικών χημικών ουσιών [5]. Η κλιμάκωση της βλαπτικής ενέργειας σε συνάρτηση με τη δόση μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητη ενέργεια, παροδική διαταραχή λειτουργιών του οργανισμού, μόνιμη διαταραχή ή οριστική κατάλυση θεμελιωδών λειτουργιών του οργανισμού (θάνατος).

Ο βαθμός και το είδος των τοξικολογικών επιδράσεων των διαφόρων ουσιών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως ο τύπος έκθεσης, η έκταση της βλάβης και των παθολογικών αλλαγών, τυχόν μη αναστρέψιμες μεταβολές, το οξειδωτικό στρες, η παροχή αντιδοτού, η υγεία του οργανισμού που εκτέθηκε στην ουσία, το είδος του οργανισμού, ατομικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες [6]. Η συγκέντρωση της ουσίας και ο τρόπος έκθεσης ενός οργανισμού σε μία χημική ουσία αποτελούν τις δύο πιο χαρακτηριστικές παραμέτρους που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τη διερεύνηση της τοξικολογικής της δράσης [5].

1.1.3 ΤΡΟΠΟΣ ΕΚΘΕΣΗΣ

Η τοξικότητα μιας συγκεκριμένης ένωσης μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την οδό εισόδου της στον οργανισμό. Οι κύριοι οδοί απορρόφησης τοξικών ουσιών από τους οργανισμούς είναι το γαστρεντερικό σύστημα, οι πνεύμονες, το δέρμα και παρεντερικά. Η παρεντερική χορήγηση πραγματοποιείται ενδοπεριτοναϊκά, υποδόρια, ενδομυϊκά ή ενδοφλέβια. Η παρεντερική είσοδος προκαλεί ταχύτερη και αποτελεσματικότερη δράση, ενώ η διατροφή τον σημαντικότερο τρόπο έκθεσης. Η τοξικότητα εξαρτάται επίσης και από τον φορέα μεταφοράς της τοξικής ουσίας, ένας λιπόφιλος ή υδρόφιλος φορέας μπορεί να αυξήσει ή να διευκολύνει την απορρόφηση της τοξικής ουσίας. Πειραματικές μέθοδοι χορήγησης, όπως η ένεση, μπορούν να

δώσουν εξαιρετικά μεταβλητά αποτελέσματα ανάλογα με την οδό απορρόφησης που στοχεύουν [4].

1.1.4 ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΕΚΘΕΣΗΣ

Η έκθεση σε μία τοξική ουσία ταξινομείται ανάλογα με τη διάρκεια και τη συχνότητα χορήγησης. Κατά την οξεία έκθεση, ποσότητα ουσίας εισέρχεται εφάπαξ στον οργανισμό και οι τοξικές επιδράσεις (οξεία τοξικότητα) εκδηλώνονται αμέσως ή σε σύντομο χρονικό διάστημα. Αντίθετα, κατά τη χρόνια ή επαναλαμβανόμενη έκθεση, μικρές ποσότητες της ουσίας λαμβανόμενες επανειλημμένα συσσωρεύονται στον οργανισμό και προκαλούν χρόνια τοξικότητα που εκδηλώνεται εβδομάδες, μήνες ή και χρόνια μετά την έκθεση. Η συσσώρευση της τοξικής ουσίας εξαρτάται από τη συχνότητα της χορήγησης [7].

1.1.5 ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Υπάρχουν τοξικές ουσίες που προκαλούν γενικευμένη τοξικότητα και άλλες που προκαλούν τοξικότητα σε ένα όργανο ή ιστό. Έτσι, οι τοξικές ουσίες εμφανίζουν εκλεκτική δράση σε κάποιο συγκεκριμένο όργανο ή ιστό ή οργανισμό (π.χ. αντιβιοτικά). Η εκλεκτική τοξικότητα μπορεί να οφείλεται σε τοξικοκινητικούς λόγους, που σχετίζονται με την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απέκκριση της ουσίας, ή στην εξειδικευμένη δράση της σε κάποιο όργανο-στόχο. Στην αρχή, οι τοξικές χημικές ουσίες απορροφώνται και κατανέμονται σε διάφορα τμήματα του οργανισμού που εκτίθενται στην ουσία, προκαλώντας συστημική βλάβη σε κάποιο συγκεκριμένο όργανο, σύστημα ή βιολογικό ιστό του οργανισμού. Το όργανο-στόχος δεν είναι αναγκαία εκείνο στο οποίο γίνεται και η συσσώρευση της ουσίας, εξαρτάται όμως, από τις φυσικοχημικές ιδιότητες και την τοξικότητα της ουσίας. Το μέγεθος των βλαβών από την τοξική δράση των χημικών ουσιών στους οργανισμούς εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ απορρόφησης από τους ιστούς και απέκκρισης του χημικού παράγοντα. Ο βαθμός τοξικότητας μιας τοξικής ουσίας ορίζεται από το είδος της βλάβης που προκαλεί σε όργανα και ιστούς και από το ρυθμό επούλωσης των βλαβών αυτών [8].

1.1.6 ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΟΝΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Κάποιες χημικές ουσίες είναι ικανές να αντιδρούν με το DNA προκαλώντας τη καταστροφή του κυττάρου. Οι ουσίες που προκαλούν γενετικές αλλοιώσεις ονομάζονται μεταλλαξογόνες, ενώ εκείνες που οδηγούν σε καρκινογένεση ονομάζονται γενετοξικά καρκινογόνα. Αρκετές μεταλλάξεις διορθώνονται μέσω του συστήματος επιδιορθώσεως του DNA, ορισμένες όμως οδηγούν σταδιακά στην ανάπτυξη νεοπλασμάτων. Μερικές ουσίες δεν προκαλούν μεταλλάξεις όμως διεγείρουν τη νεοπλασία δρώντας ως προαγωγείς της νεοπλασίας (αναστέλλουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων) ή ως μιτογόνα (διεγείρουν τον κυτταρικό κύκλο) ή αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς των αναπτυξιακών παραγόντων. Το διατροφικό επίπεδο του βιολογικού οργανισμού και η έλλειψη ορισμένων βιταμινών και ιχνοστοιχείων που προστατεύουν από το οξειδωτικό στρες και ενισχύουν επιδιορθωτικούς και αμυντικούς μεταβολικούς μηχανισμούς, παίζουν σημαντικό ρόλο στη τοξικότητα μιας χημικής ένωσης. [9].

1.1.7 ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΟΞΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Σημαντικότερος παράγοντας είναι ο ρυθμός απορρόφησης και η διαχείριση των τοξικών ουσιών σε κυτταρικό επίπεδο. Βιοσυσσώρευση μιας ουσίας συμβαίνει όταν ένας οργανισμός απορροφά μια ουσία με ρυθμό ταχύτερο από εκείνον που αποβάλλει την ουσία μέσω του μεταβολισμού και της διαδικασίας της απέκκρισης [10]. Έτσι, η βιοσυσσώρευση τοξικών μεταβολιτών σε συγκεκριμένο όργανο προκαλεί ανεπιθύμητες συνέπειες, που επηρεάζουν βασικά βιομόρια (λιπίδια μεμβρανών κυττάρων, υδατάνθρακες, ένζυμα, πρωτεΐνες, DNA), ενώ οι

οξυγονούχες και αζωτούχες ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται προκαλούν οξειδωτικές βλάβες στα βιομόρια και οξειδωτικό στρες.

1.1.8 ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ

Μετά από πολυάριθμες έρευνες και πειραματικά δεδομένα σε διάφορα πειραματόζωα καθιερώθηκε η μεθοδολογία σύγκρισης της σχέσης των τοξικολογικών δόσεων και αποτελέσματος σε πειραματική καμπύλη (dose-response curve) ανά μονάδα βάρους του πειραματόζωου. Η τοξικότητα εκφράζεται συνήθως σε χιλιοστά του γραμμαρίου ανά χιλιόγραμμο βάρους, δηλαδή mg/kg. Σε κάθε τοξικολογικό πείραμα υπάρχουν ομάδες πειραματόζωων που λαμβάνουν διαφορετικές δόσεις και μια ομάδα αναφοράς. Η διάρκεια των πειραμάτων κανονίζεται από πρωτόκολλο δοκιμασίας και από το είδος των πειραματόζωων [11]. Κατά τη διάρκεια του πειράματος καταγράφονται οι θάνατοι και έτσι υπολογίζεται η δόση στην οποία το 50% των πειραματόζωων πεθαίνει, που καλείται θανατηφόρα δόση 50% ή LD50 (Lethal Dose 50%). Η σχέση δόσης-αποτελέσματος εκφράζεται στο διάγραμμα της Εικόνας 1.1. Υπάρχουν και άλλοι παράμετροι που μελετώνται σε μια τοξικολογική έρευνα, όπως τα επίπεδα με τη χαμηλότερη παρατηρούμενη επίδραση ή μη παρατηρούμενη επίδραση [12, 13].

Η κυτταροκαλλιέργεια μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση της τοξικότητας τόσο για την εκτίμηση των βασικών λειτουργιών του κυττάρου (δηλ. διαδικασίες που είναι κοινές σε όλους τους τύπους κυττάρων) ή με δοκιμές για εξειδικευμένες κυτταρικές λειτουργίες [14]. Γενικές δοκιμές τοξικότητας, με κύριο στόχο την ανίχνευση της βιολογικής δραστηριότητας των δοκιμαζόμενων ουσιών, μπορεί να πραγματοποιηθούν σε πολλούς κυτταρικούς τύπους (π.χ. ινοβλάστες, κύτταρα HeLa, κύτταρα HEK 293). Για τη μέτρηση της τοξικότητας χρησιμοποιούνται οι μεταβολές ορισμένων παραμέτρων, όπως η βιωσιμότητα των κυττάρων, η απελευθέρωση ενζύμων στο κυτταρόπλασμα, η κυτταρική ανάπτυξη και η αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης. Η ειδική τοξικότητα σε όργανα στόχους αναλύεται χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα εξειδικευμένα κύτταρα με μέτρηση μεταβολών στην ακεραιότητα της μεμβράνης, του μεταβολισμού και / ή σε συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες (π.χ. μεταβολισμό γλυκογόνου σε πρωτογενή καλλιέργειες ηπατοκυττάρων, ρυθμός σύσπασης σε μικτά μυοκαρδιακά κύτταρα ή μυοκύτταρα και φαγοκυττάρωση σε μακροφάγα). Οι δοκιμές κυτταροτοξικότητας με τη χρήση κυττάρων από συγκεκριμένους ιστούς στόχους έχουν αποδειχθεί πολύ χρήσιμες, ειδικά όταν η *in vivo* τοξικότητα μιας χημικής ουσίας είναι ήδη καλά εδραιωμένη. Αυτές οι δοκιμές έδωσαν επίσης χρήσιμη εικόνα στις παθολογικές ορισμένων ασθενειών του ανθρώπου, όπως ασθένειες του ήπατος [15] και η κοιλιοκάκη [16].

1.1.9 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΟΙ ΟΡΟΙ (ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ)

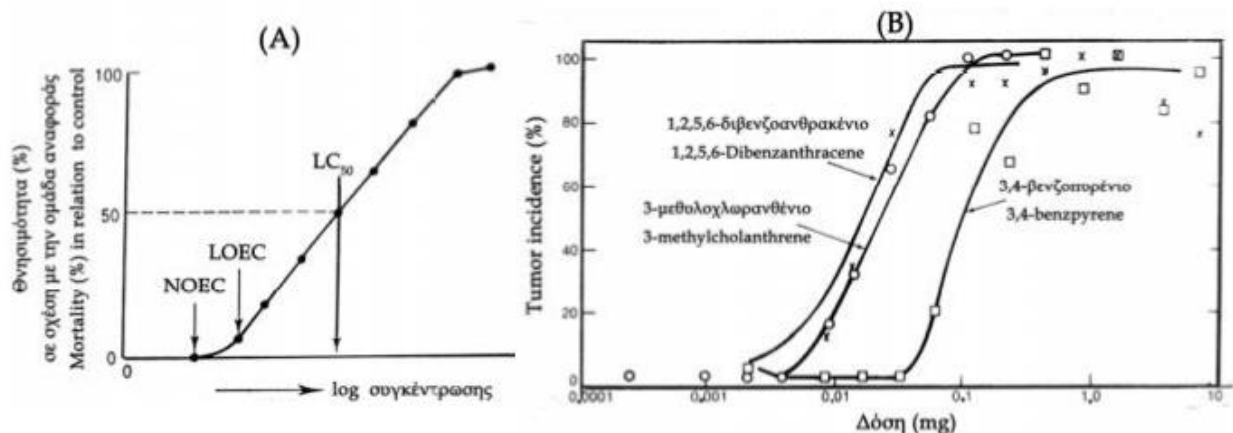
Οι τοξικές χημικές ουσίες χωρίζονται σε 4 κατηγορίες:

- I. Πολύ τοξικές: < 50 mg/kg (LD₅₀ oral), < 200 mg/kg (LD₅₀ dermal, δέρμα).
- II. Μετρίως τοξικές: 51-500 mg/kg (LD₅₀ oral), 200-2000 mg/kg (LD₅₀ dermal, για το δέρμα).
- III. Ελαφρώς τοξικές: > 500 mg/kg (LD₅₀ oral), > 2000 mg/kg (LD₅₀ dermal).
- IV. Μη τοξικές: για υψηλότερες συγκεντρώσεις του ενός γραμμαρίου ανά μονάδα βάρους (συνήθως 1 kg).

Τα τελευταία χρόνια έχουν επικρατήσει διάφοροι τοξικολογικοί όροι:

1. LD₅₀ (mean lethal dose for 50% mortality), θανατηφόρος δόση 50%
2. LC₅₀ (mean lethal concentration for 50% mortality), θανατηφόρος συγκέντρωση 50%
3. EC₅₀ (Effect concentration 50%, concentration that causes an effect, not death, on 50% of tested organism), συγκέντρωση πρόκλησης αποτελέσματος σε 50% του οργανισμού-πειραματόζωου

4. LED₁₀ (Effective dose corresponding to the lower 95% confidence limit on a dose associated with 10% response), αποτελεσματική δόση με 95% όρια αξιοπιστίας για δόση που ανταποκρίνεται σε 10% αποτέλεσμα (θνησιμότητα)
5. IC₅₀ (inhibitory concentration that reduces the normal response, growth rates of algae, bacteria and other organisms by 50%), δόση αναστολής 50%, δοκιμασία για την ανάπτυξη βακτηρίων, φύκους και άλλων οργανισμών
6. NOEC (No observed effects concentration, determined by graphical or statistical methods), συγκέντρωση μη παρατηρούμενου αποτελέσματος
7. NOEL (No observed effects level, parameter as a dose), επίπεδο (mg/kg) μη παρατηρούμενου αποτελέσματος (βλάβη στην υγεία οργανισμού)
8. NOAEC (No observed adverse effects concentration, the effect is usually chosen for its impact upon the species tested), συγκέντρωση με μη παρατηρούμενη επίδραση σε συγκεκριμένο παράγοντα υγείας οργανισμού
9. NOAEL (No observed adverse effects level), επίπεδο με μη παρατηρούμενες αρνητικές συνέπειες
10. LOEC (Lowest observed effects concentration), χαμηλότερη συγκέντρωση όπου παρατηρείται αποτέλεσμα (βλάβη στον ζωντανό οργανισμό)
11. LOEL (Lowest observed effects level), χαμηλότερο επίπεδο όπου παρατηρείται αποτέλεσμα
12. MTC (Minimum Threshold Concentration), ελάχιστη συγκέντρωση κατωφλίου (ουδός)
13. MTD (Maximum tolerated dose), ανώτατη ανεκτή δόση (για τοξικολογικά πειράματα σε καρκινογόνες ουσίες)
14. MATC (Minimum allowable toxicant concentration), ελάχιστη επιτρεπόμενη δόση τοξικής ουσίας
15. TLV (Threshold Limit Value), Οριακή Τιμή Κατωφλίου, για το εργασιακό περιβάλλον (American Conference Governmental Industrial Hygienists)
16. TLV-STEL (TLV-Short Term Exposure Limit), Μικρής Διάρκειας Έκθεση



Εικόνα 1.1 (Α) Καμπύλη τοξικότητας με λογαριθμική συγκέντρωση ($\log \text{mg/kg}$) και θνησιμότητα (%) σε σχέση με την ομάδα αναφοράς. Καθορίζονται οι όροι LC_{50} , LOEC, NOEC. (Β) Καμπύλη τοξικότητας καρκινογόνου δράσης τριών καρκινογόνων σε διαφορετικές δόσεις (σε πειραματόζωα) [5].

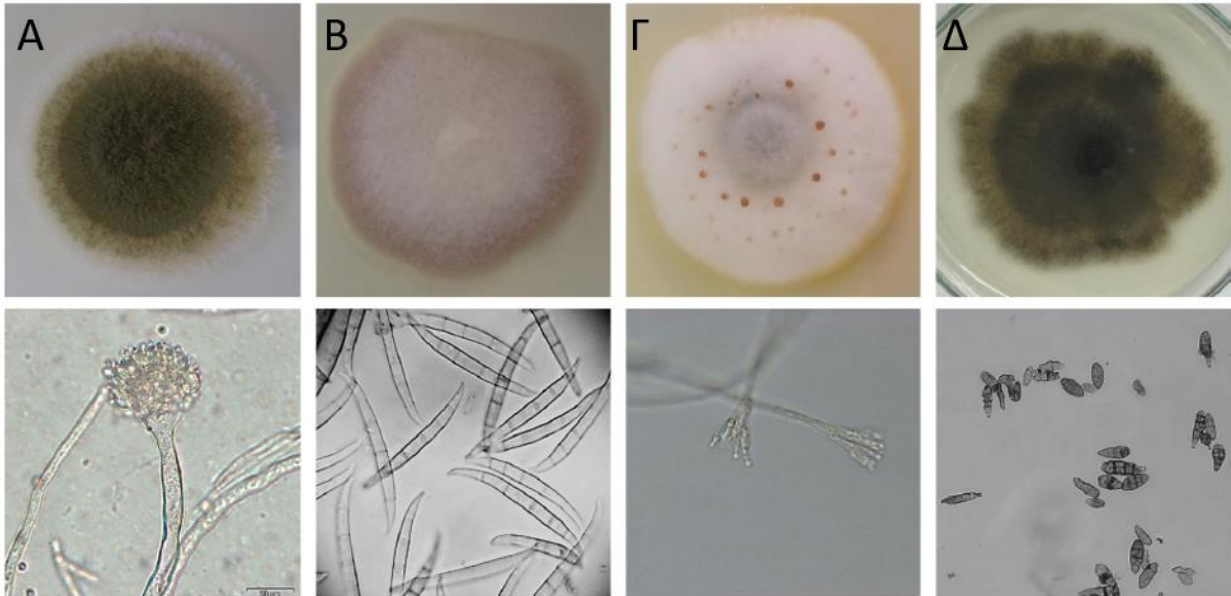
1.2 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

1.2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Οι μύκητες μπορούν να μολύνουν σχεδόν όλα τα αγροτικά προϊόντα σε όλο τον κόσμο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών ή και μετά τη συγκομιδή, όταν βρεθούν σε κατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Πολλά είδη μυκήτων παράγουν μυκοτοξίνες, μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους (κάτω από 1.000 Da) που μπορούν να συσσωρευθούν σε τρόφιμα ή ζωοτροφές σε τοξικές συγκεντρώσεις για τον άνθρωπο και τα ζώα [17]. Η παγκόσμια ανησυχία για τη μόλυνση των γεωργικών προϊόντων από αυτούς τους δευτερογενείς μεταβολίτες μυκήτων έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια [18, 19]. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) και ο Οργανισμός Παγκόσμιας Υγείας εκτιμούν ότι περίπου το 25% των καλλιεργειών παγκοσμίως όπως τα καρύδια, τα δημητριακά και το ρύζι έχουν μολυνθεί με μυκοτοξίνες [18, 20]. Πρόσφατες αναφορές δείχνουν ότι η μόλυνση των βασικών προϊόντων (δημητριακά και ζωοτροφές) είναι πολύ υψηλότερη, και φτάνει περίπου στο 80% [18, 20]. Αν και ο συνολικός αριθμός μυκοτοξινών είναι άγνωστος, εκτιμάται ότι υπάρχουν χιλιάδες δευτερογενείς μεταβολίτες μυκήτων, αλλά μόνο μερικές εκατοντάδες έχουν χαρακτηριστεί ως τοξικές σε χαμηλές ποσότητες. Η χαμηλής συγκέντρωσης τοξικότητα των μυκοτοξινών είναι αυτή που τις διαφοροποιεί από άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως η αιθανόλη. Η αιθανόλη δεν είναι μυκοτοξίνη, αν και είναι δευτερογενής μεταβολίτης μυκήτων [21]. Τα στοιχεία αυτά αναμένεται να αυξηθούν με τη χρήση πιο ευαίσθητων μεθόδων ανίχνευσης και προσδιορισμού.

1.2.2 ΟΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

Τα σημαντικότερα είδη μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες είναι τα ακόλουθα, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* και *Penicillium* [22]. Οι πιο επικίνδυνες μυκοτοξίνες για την υγεία των ζώων και των ανθρώπων παγκοσμίως είναι οι αφλατοξίνες B1 (AFT B1), B2 (AFT B2), G1 (AFT G1), G2 (AFTG2) και M1 (AFTM1), η ωχρατοξίνη A (OTA), η ζεαραλενόνη (ZEN), η δεοξυνιβαλενόλη (DON), οι T-2 και HT-2 τοξίνες, οι φουμονισίνες B1 (FB2) και η πατουλίνη. Οι αφλατοξίνες θεωρούνται ότι μπορούν να επηρεάσουν σε μεγαλύτερο βαθμό από όλες τις υπόλοιπες μυκοτοξίνες την ανθρώπινη υγεία. Ορισμένες μυκοτοξίνες πιθανολογείται ότι ευθύνονται για την εκδήλωση σοβαρών ανθρώπινων και ζωικών ασθενειών, όπως η νόσος του Reye, που προκαλείται από την αφλατοξίνη B1 (AFB1), η λευκοεγκεφαλομαλακία των ιπποειδών και το πνευμονικό οίδημα χοίρου, που προκαλείται από φουμισίνη B1 (FB1), η ανθρώπινη τοξική διατροφική αλευκία, που προκαλείται από την τοξίνη T2, και η ενδημική νεφροπάθεια των Βαλκανίων, που προκαλείται από την ωχρατοξίνη A. Η θετική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης τροφίμων που έχουν μολυνθεί με AFB1 και της αύξησης της συχνότητας εμφάνισης καρκίνου του ήπατος σε αρκετούς ασιατικούς και αφρικάνικους πληθυσμούς οδήγησε στην ταξινόμηση του AFB1 ως μια καρκινογόνο ουσία της ομάδας 1A από τη Διεθνή Υπηρεσία Έρευνας για τον Καρκίνο [23]. Λόγω της σοβαρότητας της κατάστασης η εμφάνιση των σημαντικότερων μυκοτοξινών ρυθμίζεται από νομικά όρια σε όλες τις αναπτυγμένες Χώρες [24]. Η Ευρωπαϊκή Ένωση ρύθμισε τα μέγιστα επίπεδα ουσιών σε ορισμένα τρόφιμα στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής και στη σύσταση της Επιτροπής 2013/165/ΕΕ [25].



Εικόνα 1.1 Οι σημαντικότεροι μύκητες που παράγουν μυκοτοξίνες με την αντίστοιχη μικροφωτογραφία κονιδίων τους: Α) *Aspergillus flavus* Β) *Fusarium verticillioides* Γ) *Penicillium expansum* (CBS 325.48). και Δ) *Alternaria alternata* (wt) καλλιιεργημένοι σε PDA άγαρ για 7 ημέρες [26].

1.2.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Οι μυκοτοξίνες είναι οργανικές χημικές ουσίες, αλειφατικές ή κυκλικές, απλής σχετικά δομής με σχετικά μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα και χαμηλού μοριακού βάρους με παρόμοιες μεταξύ τους χημικές ιδιότητες. Είναι παράγωγα ή συγγενείς ενώσεις με την κουμαρίνη, τα τερπενοειδή, τις ανθρακινόνες, τα μακρολίδια, τα στεροειδή, και τα τετρονικά οξέα. Έχουν διάφορες χημικές δομές και συνεπώς προκαλούν δυσάρεστες βιολογικές επιπτώσεις τόσο στην υγεία των ανθρώπων όσων και των ζώων. Είναι εξαιρετικά επικίνδυνες ενώσεις, που παραμένουν δραστικές για μεγάλο χρονικό διάστημα και μετά την καταστροφή των μυκήτων από τους οποίους προήλθαν. Επιπλέον, επειδή πολλές από αυτές είναι θερμοανθεκτικές, δεν καταστρέφονται σε συνήθεις συνθήκες θερμικής κατεργασίας τροφίμων [27].

Η σύνθεση των μυκοτοξινών από μύκητες καθορίζεται γενετικά και συνδέεται στενά με το πρωτογενή μεταβολισμό και πιο συγκεκριμένα με το μεταβολισμό των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων. Ωστόσο, η πραγματική παραγωγή της τοξίνης ρυθμίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η σύνθεση και η ποιότητα του υποστρώματος, η υγρασία και η θερμοκρασία. Ο πολλαπλασιασμός των μυκήτων και η παραγωγή μυκοτοξινών αυξάνεται λόγω περιβαλλοντικών παραγόντων, ειδικά κατά την επικράτηση τροπικών συνθηκών [28]. Η εμφάνιση μυκοτοξινών στη ζωοτροφή παρουσιάζει γεωγραφικό πρότυπο, για παράδειγμα τα είδη *Aspergillus* βρίσκουν τις βέλτιστες συνθήκες μόνο σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές, ενώ τα είδη *Fusarium* και *Penicillium* είναι προσαρμοσμένα στο μέτριο κλίμα. Επιπλέον, μεταχειρίσεις κατά την επεξεργασία των τροφίμων και ζωοτροφών, όπως κακή πρακτική συγκομιδής, ακατάλληλη αποθήκευση και μη βέλτιστες συνθήκες μεταφοράς, επεξεργασίας και εμπορίας συμβάλλουν στην ανάπτυξη μυκήτων και αυξάνουν τον κίνδυνο αλλοίωσης των τροφίμων που

προκαλείται από την παραγωγή μυκοτοξινών. Το παγκόσμιο εμπόριο με τρόφιμα και ζωοτροφές έχει ως αποτέλεσμα ένα ευρύ φάσμα διανομής του μολυσμένου υλικού [29].

1.2.4 ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Οι μυκοτοξίνες προκαλούν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων, γεγονός που επιβεβαιώνεται από ποικίλα ζωικά μοντέλα και ανθρώπινα επιδημιολογικά δεδομένα [17, 30]. Τα σύνδρομα τοξικότητας που προκύπτουν από την πρόσληψη μυκοτοξινών από ανθρώπους και ζώα είναι γνωστά ως μυκοτοξικές [31, 32]. Οι μυκοτοξίνες έχουν τέσσερα βασικά είδη τοξικότητας (οξεία, χρόνια, μεταλλαξιγόνο και τερατογόνο), ενώ παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα επιδράσεων στα ζώα και στον άνθρωπο περιλαμβάνοντας κυτταροτοξικότητα, νεφροτοξικότητα και νευροτοξικότητα, καρκινογενέσεις, ανοσοκατασταλτικές και οιστρογονικές επιδράσεις [27, 33]. Οι μυκοτοξικές, όπως όλα τα τοξικολογικά σύνδρομα, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως οξείες ή χρόνιες. Η οξεία τοξικότητα γενικά έχει ταχεία έναρξη και προφανή τοξική απόκριση, με πιο συχνά περιγραφείσα επίδραση την επιδείνωση της λειτουργίας του ήπατος ή των νεφρών, η οποία σε ακραίες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο.

Ωστόσο, ορισμένες μυκοτοξίνες δρουν κυρίως παρεμποδίζοντας την πρωτεϊνική σύνθεση με αποτελέσματα που κυμαίνονται από ευαισθησία του δέρματος ή νέκρωση έως ακραία ανοσοανεπάρκεια. Άλλες μυκοτοξίνες παρουσιάζουν νευροτοξική δράση και σε χαμηλές δόσεις μπορεί να προκαλέσουν παρατεταμένη αστάθεια στα ζώα, αλλά σε ελάχιστα υψηλότερες δόσεις προκαλούν εγκεφαλική βλάβη ή θάνατο [34]. Η χρόνια τοξικότητα χαρακτηρίζεται από έκθεση σε χαμηλή δόση για μεγάλο χρονικό διάστημα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση καρκίνου και άλλων γενικά μη αναστρέψιμων επιδράσεων. Ορισμένες τοξίνες επηρεάζουν την αντιγραφή του DNA και συνεπώς μπορούν να προκαλέσουν μεταλλαξιγόνα ή τερατογόνα αποτελέσματα [35-37]. Γενικά, οι μυκοτοξίνες επιδρούν στο DNA, το RNA, τη πρωτεϊνική σύνθεση και έχουν προ-αποπτωτική δράση, προκαλώντας αλλαγές στις φυσιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης, της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής [38]. Συχνά, η μυκοτοξίκωση παραμένει μη αναγνωρίσιμη και συνήθως γίνεται αντιληπτή όταν εμφανίζεται σε πολλά άτομα, χωρίς προφανή σύνδεση με έναν γνωστό αιτιολογικό παράγοντα, όπως μικροοργανισμούς [39].

Η έκθεση σε μυκοτοξίνες οφείλεται κατά κύριο λόγο στην κατάποση, αλλά συμβαίνει επίσης από τις δερματικές και εισπνευστικές οδούς [22]. Η τοξική επίδραση των μυκοτοξινών στην υγεία των ζώων και των ανθρώπων εξαρτάται από τον τύπο της μυκοτοξίνης, το επίπεδο και διάρκεια της έκθεσης, την ηλικία, την υγεία και το φύλο του εκτεθειμένου ατόμου, τη γενετική, τη διατροφική κατάσταση και τις αλληλεπιδράσεις με άλλες τοξικές προσβολές. Έτσι, η σοβαρότητα της μυκοτοξικής τοξικότητας μπορεί να περιπλέκεται από παράγοντες όπως ανεπάρκεια βιταμινών, θερμιδική στέρηση, κατάχρηση αλκοόλ και μόλυνση από μεταδοτική ασθένεια [17, 40-42].

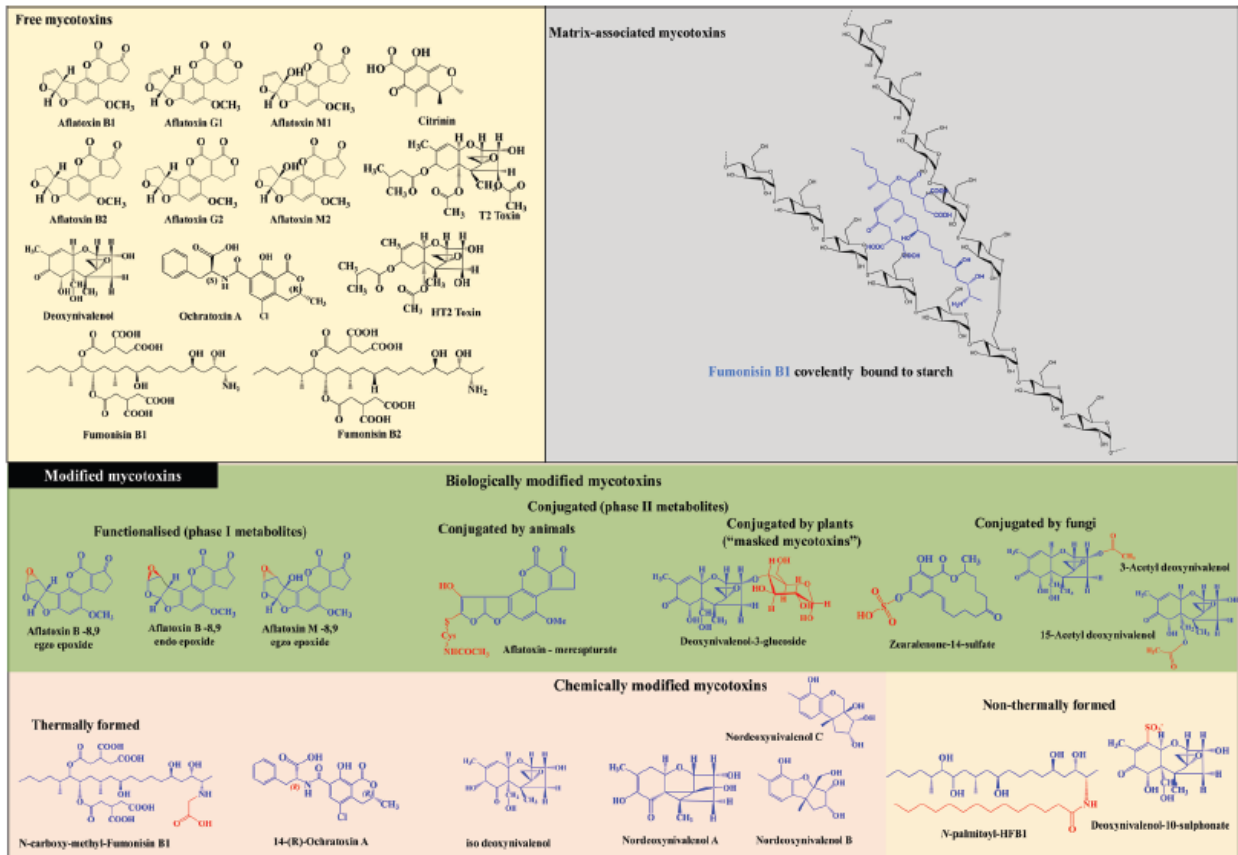
Γενικά, η έκθεση σε μυκοτοξίνες είναι πιθανότερο να συμβεί σε μέρη του κόσμου όπου οι κακές μέθοδοι διατροφής και αποθήκευσης τροφίμων είναι συχνές, όπου ο υποσιτισμός αποτελεί πρόβλημα και όπου λίγοι κανονισμοί υπάρχουν για την προστασία των εκτεθειμένων πληθυσμών [43]. Για παράδειγμα στην Αφρική, όπου η έκθεση σε διατροφικές μυκοτοξίνες είναι κοινό

φαινόμενο [44, 45], η συνεργιστική δράση μεταξύ μυκοτοξινών μπορεί να επηρεάσει την εμφάνιση ασθενειών όπως φυματίωση, ελονοσία, κβασιόρκορ (kwashiorkor) και HIV [45-47]. Αυτό συμβαίνει γιατί οι βασικές δίαιτες σε πολλά αφρικανικά νοικοκυριά βασίζονται στα δημητριακά όπως ο αραβόσιπος που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στη μόλυνση από αφλατοξίνες [44]. Ωστόσο, ακόμη και στις ανεπτυγμένες χώρες, συγκεκριμένες υποομάδες μπορεί να είναι ευάλωτες στην έκθεση σε μυκοτοξίνες. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, για παράδειγμα, οι ισπανικοί πληθυσμοί καταναλώνουν περισσότερα προϊόντα καλαμποκιού από ό,τι ο υπόλοιπος πληθυσμός και οι πληθυσμοί των κεντρικών πόλεων είναι πιο πιθανό να ζουν σε κτίρια που φιλοξενούν υψηλά επίπεδα καλουπιών [48].

1.2.5 «ΚΑΛΥΜΜΕΝΕΣ» ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα εκδηλωμένα κλινικά συμπτώματα της μυκοτοξικότητας είναι σημαντικά μεγαλύτερα από τα αναμενόμενα σχετικά με το επίπεδο μόλυνσης των τροφίμων ή των ζωοτροφών. Αυτό έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη των λεγόμενων καλυμμένων μυκοτοξινών (masked mycotoxins), που, όπως υποδηλώνει το όνομά τους, διαφεύγουν των συμβατικών αναλυτικών μεθόδων ανίχνευσης που είναι σχεδιασμένες για συγκεκριμένες μυκοτοξίνες [49].

Οι αμετάβλητες μυκοτοξίνες (unaltered mycotoxins) ενδέχεται να μην αποτελούν τη μοναδική πηγή κινδύνου για την υγεία των καταναλωτών. Τα ζωντανά φυτά, τα οποία μπορούν τουλάχιστον μερικώς να μεταβολίζουν μυκοτοξίνες (και άλλα ξενοβιοτικά), μπορούν να μολυνθούν από μύκητες στον αγρό (π.χ. *Fusarium* sp.). Κατά την αποθήκευση, το φυτικό υλικό συνήθως έχει χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα και οι ενζυμικοί μηχανισμοί προστασίας του φυτού μπορεί να μην είναι τόσο αποτελεσματικοί. Ακόμα, οι μυκοτοξίνες που σχηματίζονται μπορεί να μεταβάλλονται με τη μεταγενέστερη επεξεργασία των τροφίμων. Και στις δύο περιπτώσεις, οι μυκοτοξίνες που σχηματίζονται από τους μύκητες τροποποιούνται κατά κάποιον τρόπο για να δώσουν διαφορετικές μορφές, συνηθέστερα μέσω συζεύξεως. Αυτές οι συζηγείς μυκοτοξίνες αναφέρονται συχνά ως «καλυμμένες μυκοτοξίνες» για διαλυτές συζεύξεις ή ως «δεσμευμένες μυκοτοξίνες» για αδιάλυτες συζεύξεις [50].



Εικόνα 1.2 Προτεινόμενη συστηματικοποίηση των μυκοτοξινών [51].

1.2.6 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Μία από τις στρατηγικές για τη μείωση της έκθεσης σε μυκοτοξίνες είναι η μείωση της βιοδιαθεσιμότητάς τους με χρήση διαφόρων παραγόντων απορρόφησης μυκοτοξινών στην τροφή, οι οποίες οδηγούν σε μείωση της πρόσληψης μυκοτοξινών καθώς και στη μείωση της κατανομής τους στο αίμα και στα όργανα στόχους. Μια άλλη στρατηγική είναι η αποικοδόμηση των μυκοτοξινών σε μη τοξικούς μεταβολίτες χρησιμοποιώντας παράγοντες βιομετασχηματισμού όπως βακτήρια, μύκητες ή ένζυμα [52].

Η βιοαποικοδόμηση των μυκοτοξινών με μικροοργανισμούς ή ένζυμα θεωρείται ως η καλύτερη μέθοδος για την αποτοξικοποίηση των ζωοτροφών. Η προσέγγιση αυτή θεωρείται περιβαλλοντικά φιλική προσέγγιση σε αντίθεση με τις φυσικοχημικές τεχνικές αποτοξίνωσης. Τα μηρυκαστικά είναι μία πιθανή πηγή μικροβίων ή ενζύμων για τη βιοαποικοδόμηση μυκοτοξινών [53]. Στα σπονδυλωτά, η μυκοτοξίνη μεταβολίζεται από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 σε μεταβολικό πρόσθετο γουανίνης-N7 [54].

1.2.7 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Μέχρι το έτος 2030 εκτιμάται ότι ο παγκόσμιος πληθυσμός θα φθάσει 8,2 δισεκατομμύρια ανθρώπους. Δεδομένου ότι 842 εκατομμύρια υπολογίζονται τα υποσιτισμένα άτομα τη περίοδο 2011-2013, η προσφορά τροφίμων θα αποτελέσει σίγουρα μια αυξανόμενη πρόκληση στις

επόμενες δεκαετίες [55]. Το σενάριο αυτό, με τη σειρά του, έχει τεράστιες αρνητικές επιπτώσεις στην προσφορά τροφίμων [55]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία επικίνδυνων ουσιών (π.χ. μυκοτοξίνες) επίσης περιορίζουν ή μειώνουν την εμπορευσιμότητα των τροφίμων που εμπορεύονται στις διεθνείς αγορές [56].

Επίσης υπάρχει ευρεία συναίνεση ότι η θερμοκρασία της γης αυξάνεται με πρωτοφανή ρυθμό [57]. Η γεωγραφική κατανομή, η παραγωγή των καλλιεργειών, καθώς και η μικροχλωρίδα της φυλλόσφαιρας των καλλιεργειών, αναμένεται να επηρεαστούν έντονα από την κλιματική αλλαγή. Ο μύκητας *Aspergillus flavus* είναι σε θέση να αναπτυχθεί κάτω από ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας και ξηρασίας, γεγονός που αναμένεται να προκαλέσει προβλήματα στις περιοχές της Μεσογείου [58]. Για παράδειγμα, οι επιπτώσεις του παρατεταμένου ζεστού και ξηρού καιρού που παρατηρήθηκε στη Σερβία το 2012 είχε ως αποτέλεσμα το 69% της παραγωγής αραβόσιτου να είναι μολυσμένο από αφλατοξίνες [57]. Μια παρόμοια περίπτωση παρατηρήθηκε επίσης στην Ουγγαρία, όπου πιθανότατα η αύξηση της μόλυνσης από αφλατοξίνες οφείλεται στην κλιματική αλλαγή [59]. Έτσι, από την άποψη της επισιτιστικής ασφάλειας, απαιτείται ακριβέστερη πρόβλεψη των επιπτώσεων της κλιματικής αλλαγής στην περιεκτικότητα των τροφίμων σε μυκοτοξίνες [22].

1.3 ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΕΣ

1.3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η ωχρατοξίνη ανακαλύφθηκε ως μεταβολίτης του είδους *Aspergillus ochraceus* το 1965 κατά τη προσπάθεια εντοπισμού νέων μυκοτοξινών [60]. Λίγο αργότερα, απομονώθηκε από ένα εμπορικό δείγμα καλαμποκιού στις Ηνωμένες Πολιτείες [61] και αναγνωρίστηκε ως ισχυρή νεφροτοξίνη. Πλέον είναι γνωστό ότι οι ωχρατοξίνες (ochratoxins, OT) παράγονται από μύκητες των γενών *Aspergillus* και *Penicillium*. Τα κύρια είδη που εμπλέκονται στην παραγωγή ωχρατοξίνης Α περιλαμβάνουν τα *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus sclerotiorum*, *Aspergillus sulphureus*, *Pichia verrucosum*, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus glaucus*, [62-64]. Οι μύκητες αυτοί ποικίλουν ανάλογα με τις βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης, τις συνθήκες υγρασίας και τον τύπο των προϊόντων που μολύνουν [65]. Τα είδη *Aspergillus niger* και *Pichia purpureus* είναι λιγότερο σημαντικοί παραγωγοί OTA [66]. Επειδή το είδος *Aspergillus niger* χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή ενζύμων και κιτρικού οξέος για ανθρώπινη κατανάλωση, είναι σημαντικό να διασφαλιστεί ότι τα βιομηχανικά στελέχη είναι μη παραγωγικά [67, 68]. Από τις τοξίνες του γένους *Aspergillus*, μόνο η ωχρατοξίνη είναι δυνητικά τόσο σημαντική όσο οι αφλατοξίνες. Ενώ παλαιότερες αναφορές εμπλέκουν διάφορα είδη *Penicillium*, παρόλα αυτά το *Penicillium verrucosum*, ένας κοινός επιμολυντής κριθαριού, είναι ο μόνος επιβεβαιωμένος παραγωγός ωχρατοξίνης σε αυτό το γένος [69, 70].

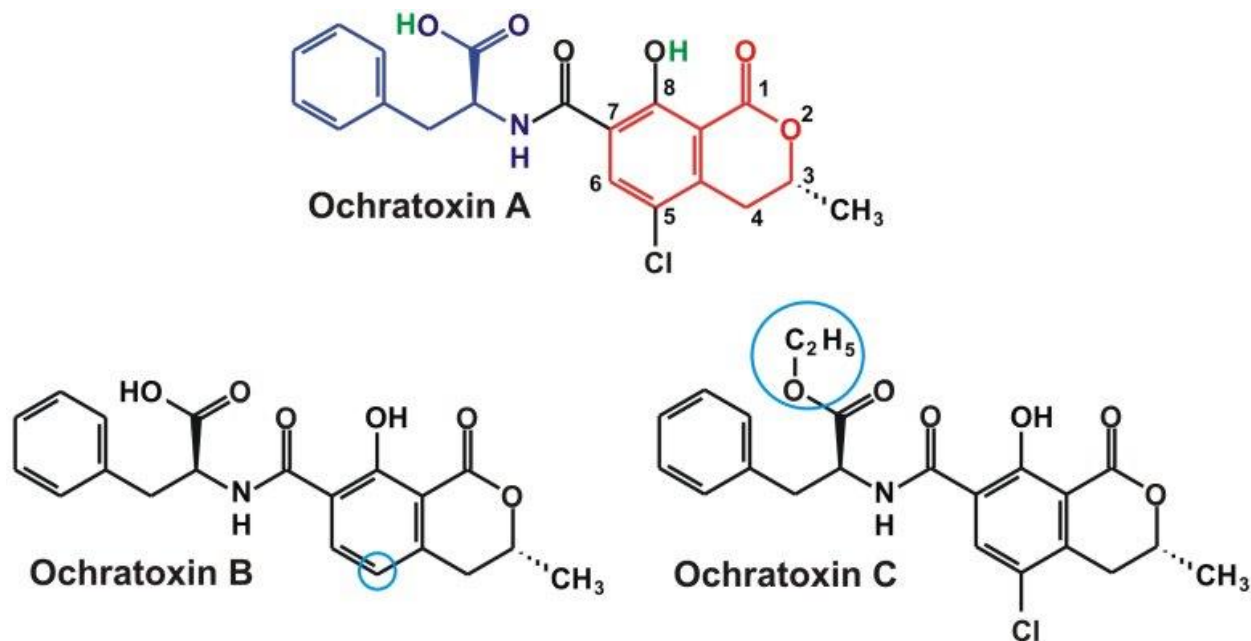
1.3.2 ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΩΝ

Υπάρχουν τρία είδη ωχρατοξινών, οι ωχρατοξίνες Α, Β, και C οι οποίες παράγονται από διάφορα γένη των μυκήτων *Aspergillus* και *Penicillium* (και ιδιαίτερα του μύκητα *Aspergillus ochraceus*) που αναπτύσσονται σε ημιτροπικά και θερμά κλίματα [71]. Γενικά οι ωχρατοξίνες παρμένουν σχετικά σταθερές σε συνθήκες θέρμανσης.

Χημικά, οι ωχρατοξίνες είναι ασθενή οργανικά οξέα που αποτελούνται από μια ομάδα διυδροϊσοκουμαρίνης (dihydroisocumarin) που ενώνεται με πεπτιδικό δεσμό με μια L-Φαινυλαλανίνη. Δομικά, οι τρεις τοξίνες διαφέρουν ελαφρώς μεταξύ τους, εντούτοις, αυτές οι

διαφορές έχουν μεγάλη σημασία στη τοξικότητα της κάθε μιας από αυτές. Η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ), είναι και η πιο συχνά απαντώμενη, αλλά και η πιο τοξική από τις τρεις. Είναι μια φυσικώς υπάρχουσα μυκοτοξίνη διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες, σε υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και ελαφρώς διαλυτή στο νερό. Η αντικατάσταση του χλωρίου με ένα άτομο υδρογόνου στην ωχρατοξίνη Α μας δίνει την ωχρατοξίνη Β (ΟΤΒ), η οποία είναι κατά 10-20 φορές λιγότερο τοξική από την Α, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Περαιτέρω δομικές αλλαγές παράγουν την ωχρατοξίνη C (ΟΤC), η οποία δεν φαίνεται να έχει τοξική δράση. Εντούτοις, μια πρόσφατη δημοσίευση υποστηρίζει ότι η ΟΤC είναι πολύ πιο τοξική από την ΟΤΑ ή την ΟΤΒ στην κυτταρική σειρά THP-1 από ανθρώπινο μονοκύτταρο (μονοπύρηνο, φαγοκυτταρικό λευκοκύτταρο) [72].

Οι μελέτες δομής και τοξικής δράσης της ΟΤΑ έχουν προτείνει ότι η τοξικότητα της μπορεί να αποδοθεί στις ιδιότητές της ισοκουμαρίνης και ότι η καρβονυλομάδα λακτόνης μπορεί να εμπλέκεται στην τοξικότητά της. Χρησιμοποιώντας ως μοντέλο το βακτήριο *Bacillus brevis*, οι Hoehler's et al. έδειξαν ότι η ΟΤΑ συμπεριφέρεται ως κυτταρικός προ-οξειδωτικός παράγοντας, μέσω της κινητοποίησης των οδών Fe^{2+} και Ca^{2+} , εμποδίζοντας την οξειδωτική φωσφορυλίωση και οδηγώντας στην αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών υδροξυλίου [73]. Ωστόσο, σε άλλες μελέτες με ΟΤΑ, μια άμεση συσχέτιση μεταξύ τοξικότητας και ικανότητας χηλώσεως σιδήρου ήταν μόνο μερικώς υποστηριζόμενη [74].



Εικόνα 1.3 Οι χημικές δομές της Ωχρατοξίνης Α (κόκκινο: δακτύλιο διυδροϊσοκουμαρίνης, πράσινο: όξινο υδρογόνο), Β και Γ. Οι επισημασμένες δομές είναι χαρακτηριστικές στα τρία διαφορετικά μόρια ωχρατοξίνης (γαλάζιο) [75].

1.3.3 ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α (ΟΤΑ)

Η κύρια τοξίνη αυτής της κατηγορίας είναι η Ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ). Όπως και με άλλες μυκοτοξίνες, το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσεται ο μύκητας, τα επίπεδα υγρασίας, η θερμοκρασία και η παρουσία ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας είναι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα της παραγόμενης τοξίνης [65]. Η ΟΤΑ είναι μια τροφική μυκοτοξίνη που βρίσκεται σε μεγάλη ποικιλία γεωργικών προϊόντων παγκοσμίως, όπως κακάο, κόκκων καφέ, αλευριού,

δημητριακών, ψαριών, φιστικιών, αποξηραμένων φρούτων, αυγών πουλερικών και γάλατος [76], καθώς επίσης και κρέατος ή τυριού που έχει παραχθεί από ζώα που έχουν καταναλώσει μολυσμένες τροφές. Από τα δημητριακά το κριθάρι παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλό κίνδυνο μόλυνσης. Ωχρατοξίνη επίσης, μπορεί να εντοπιστεί σε ορισμένους οίνους, ιδιαίτερα εκείνους που προέρχονται από σταφύλια μολυσμένα με *Aspergillus carbonarius* [32, 77, 78].

Πίνακας 1.1 Κύριοι μύκητες που παράγουν ωχρατοξίνη A, οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης τους και τα βασικά προϊόντα που επηρεάζονται [65].

Μύκητες που παράγουν ΟΤΑ	Ιδανικό εύρος θερμοκρασιών ανάπτυξης (Min-Max) °C	Ενεργότητα νερού	Εμπορεύματα που μολύνονται
<i>A.ochraceus</i>	24–31 (8–37)	0.95–0.99	καπνιστά και αλατισμένα ξηρά ψάρια, ξηρά όσπρια, σόγια, αποξηραμένο κρέας (Biltong), ρεβίθια, πιπεριά, ξηρούς καρπούς και σουσάμι, δημητριακά ρυζιού, κριθάρι, αραβόσιτο, σιτάρι, αλεύρι και πίτυρα, κόκκους καφέ
<i>A.carbonarius</i>	32–25(N/A-40)	0.82	σταφύλια και προϊόντα σταφυλιών, συμπεριλαμβανομένων επιτραπέζιων σταφυλιών, οίνων και σταφίδων
<i>A. niger</i>	35–37 (6–47)	0.77	ξηροί καρποί, μήλα, αχλάδια, ροδάκινα, εσπεριδοειδή, σταφύλια, σύκα, φράουλες, μάνγκο, ντομάτες, πεπόνια, κρεμμύδια, σκόρδο και γαμ
<i>P. errucosum</i>	20 (0–30)	0.8	δημητριακά, τυριά, προϊόντα κρέατος

1.3.3.1 ΟΔΟΙ ΕΚΘΕΣΗΣ ΟΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

Η κατάποση είναι η κύρια πηγή έκθεσης σε ΟΤΑ μέσω των τροφίμων και των ποτών. Η ΟΤΑ απορροφάται αποτελεσματικά από τη γαστρεντερική οδό, κυρίως στο λεπτό έντερο. Οι πληροφορίες από διάφορα είδη δείχνουν ότι η ΟΤΑ διανέμεται μέσω του αίματος, κυρίως στους νεφρούς, με χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο ήπαρ, στους μυς και το λίπος. Ειδικό μεταφορέας μπορεί να εμπλέκονται στην κυτταρική πρόσληψη ωχρατοξίνης A στα νεφρά, όπου συσσωρεύεται. Η μεταφορά στο γάλα έχει αποδειχθεί σε αρουραίους, κουνέλια και ανθρώπους. Η ποσότητα της ΟΤΑ που μεταφέρεται στο γάλα των μηρυκαστικών είναι μειωμένη λόγω της αποτελεσματικής υδρόλυσης του αμιδικού δεσμού από τη μικροχλωρίδα της μεγάλης κοιλίας.

1.3.3.2 ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ ΚΑΙ ΤΑ ΖΩΑ

Η ΟΤΑ είναι μια χημικά σταθερή ένωση. Ως εκ τούτου, τα συνήθη μέτρα επεξεργασίας τροφίμων δεν μειώνουν σημαντικά την παρουσία της σε τρόφιμα και ποτά [65]. Ο πρωταρχικός στόχος της ΟΤΑ είναι τα νεφρά. Η ωχρατοξίνη A είναι νεφροτοξίνη σε όλα τα ζωικά είδη που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα και είναι πιθανότατα τοξική για τον άνθρωπο, στον οποίο έχει τη μεγαλύτερη διάρκεια ημιζωής για την εξάλειψη της από οποιοδήποτε άλλο οργανισμό [23, 79-83]. Εκτός από τη νεφροτοξική της δράση, μελέτες σε ζώα δείχνουν ότι η ωχρατοξίνη A είναι ηπατική τοξίνη, ανοσοκατασταλτική [84, 85], ισχυρό τερατογόνο και καρκινογόνο [86, 87]. Η ωχρατοξίνη

μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τον καρκίνο των όρχεων [88]. Η ωχρατοξίνη Α διαταράσσει την κυτταρική φυσιολογία με πολλούς τρόπους, αλλά φαίνεται ότι τα κύρια αποτελέσματα σχετίζονται με τα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της φαινυλαλανίνης, κυρίως μέσω αναστολής του ενζύμου που εμπλέκεται στη σύνθεση του συμπλόκου φαινυλαλανίνης και tRNA [77]. Επιπλέον, αναστέλλει τα μιτοχονδριακή παραγωγή ATP και διεγείρει την υπεροξειδωση των λιπιδίων [77, 87]. Άλλες έρευνες επικεντρώνονται στην ικανότητα της ΟΤΑ να διαταράξει την κυτταρική σηματοδότηση και ρύθμιση, που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν εστιάσει στην τοξικότητα που προκαλείται στον μεταβολισμό μέσω της επαγωγής οξειδωτικού στρες, στην ενδοκυτταρική συσσώρευση της ΟΤΑ ως συνάρτηση των μεταφορέων οργανικών ανιόντων και στην ενδο- και εξωκυτταρική μετάδοση σήματος σε νανομοριακές συγκεντρώσεις [89, 90].

Η ωχρατοξίνη έχει ανιχνευθεί στο αίμα, σε ζωικούς ιστούς και στο γάλα, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου γάλακτος [77]. Ανιχνεύεται συχνά σε χοιρινό κρέας που προορίζεται για κατανάλωση από τον άνθρωπο [29]. Η Ωχρατοξίνη θεωρήθηκε υπεύθυνη για τη νεφροπάθεια των χοίρων που έχει μελετηθεί εντατικά στις σκανδιναβικές χώρες. Η νόσος είναι ενδημική στη Δανία, όπου σχετίζονται τα ποσοστά νεφροπάθειας των χοίρων και η μόλυνση των ζωοτροφών με ωχρατοξίνες [71]. Επιπλέον, η ωχρατοξίνη σχετίζεται με ασθένειες και θάνατο σε πουλερικά [91, 92].

1.3.3.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΟΤΑ ΜΕ ΑΣΘΕΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Η ΟΤΑ έχει προταθεί ως αιτία διαφόρων ανθρωπίνων νεφροπαθειών από τη δεκαετία του 1970, συμπεριλαμβανομένης της Βαλκανικής Ενδημικής Νεφροπάθειας (BEN) [93-95] και της χρόνιας διάμεσης νεφρίτιδας (CIN) [96]. Η Βαλκανική Ενδημική Νεφροπάθεια (BEN) είναι μια προοδευτική χρόνια νεφρίτιδα που εμφανίζεται σε πληθυσμούς που ζουν σε περιοχές που συνορεύουν με τον Δούναβη ποταμό σε μέρη της Ρουμανίας, της Βουλγαρίας και της πρώην Γιουγκοσλαβίας. Σε μια βουλγαρική μελέτη, η μόλυνση των τροφίμων με ωχρατοξίνη και η παρουσία ωχρατοξίνης στον ανθρώπινο ορό ήταν περισσότερο συχνές σε οικογένειες με ενδημική βαλκανική νεφροπάθεια και όγκους των ουροφόρων οδών [97]. Εκτός από τη δηλητηρίαση με ωχρατοξίνη, αυτή η περίεργη ασθένεια αποδίδεται σε γενετικούς παράγοντες, βαρέα μέταλλα και πιθανούς μολυσματικούς παράγοντες. Σήμερα, η ενδημική Βαλκανική νεφροπάθεια είναι άγνωστης αιτιολογίας, αλλά πολλές επιστημονικές ανασκοπήσεις τη κατονομάζουν ως ωχρατοξίκωση.

1.3.3.4 ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α ΚΑΙ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

Έχουν διεξαχθεί αρκετές λεπτομερείς αξιολογήσεις των κινδύνων της ωχρατοξίνης Α [87]. Δεδομένων των γνωστών επιπτώσεων της έκθεσης του ανθρώπου σε ΟΤΑ και της αφθονίας των τοξικολογικών δεδομένων από μελέτες σε ζώα, η Επιστημονική Επιτροπή της Ευρωπαϊκής Ένωσης συνέστησε τα επίπεδα πρόσληψης της ωχρατοξίνης Α να μειωθούν κάτω από 5 ng / kg σωματικού βάρους ανά ημέρα [98]. Επιπλέον, αρκετές ευρωπαϊκές χώρες έχουν προτεινόμενους μεμονωμένους κανονισμούς, με μέγιστες ανεκτές συγκεντρώσεις που ποικίλλουν σημαντικά από χώρα σε χώρα [99]. Η Διεθνής Υπηρεσία Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) έχει ταξινομήσει την ΟΤΑ ως πιθανή ανθρώπινη καρκινογόνο ουσία της Ομάδας 2B, βασισμένη στην αποδεδειγμένη

καρκινογένεση στις μελέτες σε ζώα [23, 100], αν και η επαγωγή καρκινογένεσης στους ανθρώπους δεν έχει προσδιοριστεί ολοκληρωτικά [86].

Πίνακας 1.2 Περίληψη του ανεκτού ορίου πρόσληψης ωχρατοξίνης Α (OTA) στον άνθρωπο από διεθνείς οργανισμούς. TDI - ανεκτή ημερήσια πρόσληψη. PTDI - προσωρινή ανεκτή ημερήσια πρόσληψη. PTWI - προσωρινή ανεκτή εβδομαδιαία πρόσληψη. NCRI - αμελητέα πρόσληψη κινδύνου για καρκίνο [65]

Οργανισμός	Tolerable intake metric - Ανεκτός Δείκτης Πρόσληψης	Όριο
European Food Safety Authority (EFSA)	PTWI	120 ng/kg bw/week
Health Canada	PTDI	3 ng/kg bw/day
Health Canada	NCRI	4 ng/kg bw/day
Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) 2007	PTWI	100 ng/kg bw/week
Nordic Expert Group on Food Safety	TDI	5 ng/kg bw/day
Scientific Committee of Food (SCF) of the European Union	PTDI	5 ng/kg bw/day

1.3.3.5 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΑΝΗΣΥΧΙΕΣ

Η ωχρατοξίνη Α έχει αναδειχθεί σε σημαντικό θέμα τα τελευταία χρόνια, ειδικά όταν το υπουργείο Υγείας του Καναδά (Health Canada) πρότεινε ανώτατα όρια (MLs) για την OTA σε μια ποικιλία τροφίμων και ποτών που θα μπορούσαν να έχουν συνέπειες για την εμπορευσιμότητα αυτών των βασικών προϊόντων στον Καναδά και θα μπορούσε επίσης να επηρεάσει τα έθνη που προσπαθούν να εξάγουν τρόφιμα στον Καναδά [101]. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά σχετικά με τις επιπτώσεις στην υγεία του πληθυσμού από την έκθεση σε OTA. Μέχρι στιγμής, οι εκτιμήσεις επικινδυνότητας της OTA, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που οδήγησαν στα πρόσφατα προτεινόμενα MLs στον Καναδά, έχουν βασιστεί σε μεγάλο βαθμό σε μελέτες δοκιμών σε ζώα και σε κυτταροκαλλιέργειες, με σχετικά μικρότερη εστίαση σε έρευνες στον άνθρωπο [65].

Γενικότερα, είναι συνετό για την ιατρική κοινότητα να δίνει μεγαλύτερη προσοχή στη πιθανότητα εμφάνισης τοξικότητας λόγω ωχρατοξίνης Α σε ασθενείς με συμπτώματα νεφρικής παθολογίας. Αν και ο ρόλος της ωχρατοξίνης Α στις ανθρώπινες ασθένειες παραμένει θεωρητικός, η οξεία νεφροτοξικότητα, οι ανοσοκατασταλτικές δράσεις, και τερατογόνες επιδράσεις σε ζωικά μοντέλα, σε συνδυασμό με την ικανότητα να μεταφέρονται μέσω της τροφικής αλυσίδας, εφιστούν τη προσοχή για τη δημόσια υγεία [17].

1.4 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

1.4.1 ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΕΣ

1.4.1.1 ΓΕΝΙΚΑ

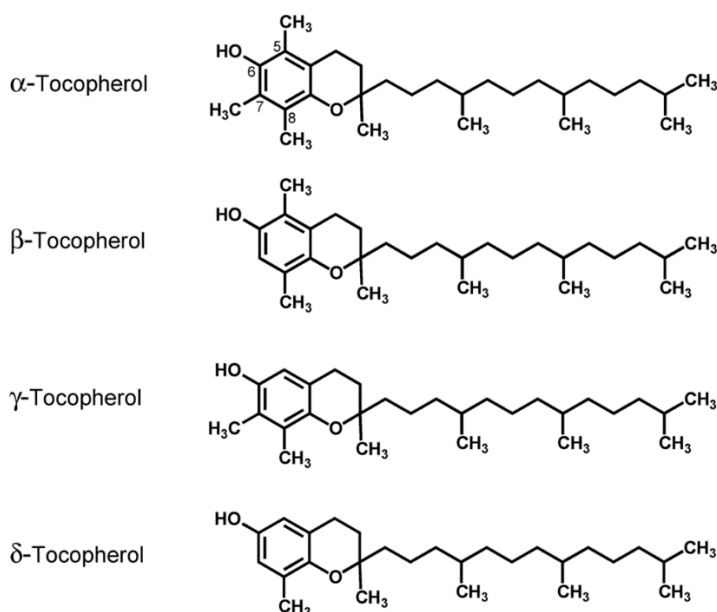
Οι τοκοφερόλες (tocopherols) είναι μια ομάδα λιποδιαλυτών χημικών ενώσεων παρόμοιας χημικής δομής (ομόλογες ενώσεις) με έντονες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Παρουσιάζουν πολλαπλές φυσιολογικές δράσεις και η πρόσληψη τους από τον ανθρώπινο οργανισμό σε μικρές ποσότητες μέσω της τροφής είναι απαραίτητη. Συλλογικά οι τοκοφερόλες είναι γνωστές ως βιταμίνη Ε και συναντώνται σε φυτικά έλαια και γενικά σε φυτικής προέλευσης τροφές. Η ονομασία τους προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις "τόκος" (γέννα, δημιουργία) και "φέρω", επειδή η απουσία τους από νωρίς είχε συσχετισθεί με προβλήματα στην αναπαραγωγική λειτουργία, όπως αποβολές εμβρύων. Το 1936 ο Αμερικανός ιατρός Herbert McLean Evans (1882-1972), καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνιας, απομόνωσε για πρώτη φορά τη τοκοφερόλη από σιτέλαιο, ένα έλαιο από τα φύτρα σιταριού [102]. Αργότερα, το 1938, ο Fernholtz παρουσίασε την πλήρη χημική δομή της ένωσης [103].

1.4.1.2 ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΩΝ

Οι τοκοφερόλες αποτελούν τη κυριότερη μορφή της βιταμίνης Ε και είναι μια ομάδα λιποδιαλυτών φαινολικών ενώσεων. Κοινό χημικό χαρακτηριστικό των τοκοφερολών (α-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλη) είναι η ύπαρξη μια ομάδας χρωμανίου η οποία στη θέση 6 περιέχει ένα (φαινολικό) υδροξύλιο, σχηματίζοντας την 6-χρωμανόλη (6-chromanol), όπως και μια πλευρική αλειφατική αλυσίδα, η οποία αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως ουρά φυτυλίου (phytyl tail), στη θέση 2 [104]. Ο αντιοξειδωτικός χαρακτήρας των τοκοφερολών οφείλεται στο φαινολικό υδροξύλιο του χρωμανίου, ενώ ο έντονα λιπόφιλος χαρακτήρας τους και η ουσιαστική μηδενική διαλυτότητά τους στο νερό οφείλεται στην ουρά φυτυλίου. Η ομάδα αυτή προέρχεται από την άκυκλη διτερπενική αλκοόλη (phytol), η οποία εστεροποιημένη αποτελεί το "λιπόφιλο" τμήμα του μορίου της. Χάρη σε αυτό το λιπόφιλο τμήμα, η χλωροφύλλη είναι ουσιαστικά αδιάλυτη στο νερό και παραμένει στους χλωροπλάστες των φυτών. Ανάλογα με τον αριθμό και τις θέσεις των μεθυλιών στον αρωματικό δακτύλιο της χρωμανόλης οι τοκοφερόλες προσδιορίζονται ως α, β, δ και γ [104]. Η α-τοκοφερόλη (Τ) τριμεθυλιώνεται στις θέσεις 5-, 7- και 8- του δακτυλίου χρωμανόλης, η β-τοκοφερόλη (β-Τ) διμεθυλιώνεται στις θέσεις 5 και 8, ενώ η γ-τοκοφερόλη (γ-Τ) είναι διμεθυλιωμένη στις θέσεις 7- και 8- και η δ-τοκοφερόλη (δ-Τ) μεθυλιώνεται στη θέση 8. Οι μη μεθυλιωμένοι άνθρακες στις θέσεις 5- και 7- είναι ηλεκτρόφιλα κέντρα που μπορούν να παγιδεύσουν αποτελεσματικά τις δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (RONS) [105].

Από τις τέσσερις τοκοφερόλες η α-τοκοφερόλη βρίσκεται συνήθως σε μεγαλύτερη αναλογία (ακολουθούμενη από τη γ-τοκοφερόλη) και είναι η πλέον ενεργή από βιολογική άποψη, ενώ η δ-τοκοφερόλη εμφανίζεται να διαθέτει την εντονότερη αντιοξειδωτική ενεργότητα (ακολουθούμενη και αυτή από τη γ-τοκοφερόλη). Η γ-τοκοφερόλη έχει ελεύθερη τη θέση 5 της χρωμανόλης, η οποία μπορεί εύκολα να δεχθεί τη νιτροομάδα (-NO₂) και έχει αποδειχθεί με

πειράματα *in vitro*, ότι δρα ως "παγίδα" οξειδίων του αζώτου, αζωτούχων ριζών και άλλων ηλεκτρονιόφιλων μεταλλαξιγόνων σωματιδίων και θεωρείται ως η κατ' εξοχήν "αντιγηραντική" από τις τοκοφερόλες [106-108].



Εικόνα 1.4 Χημικές δομές α -, β -, γ - και δ -τοκοφερολών [109].

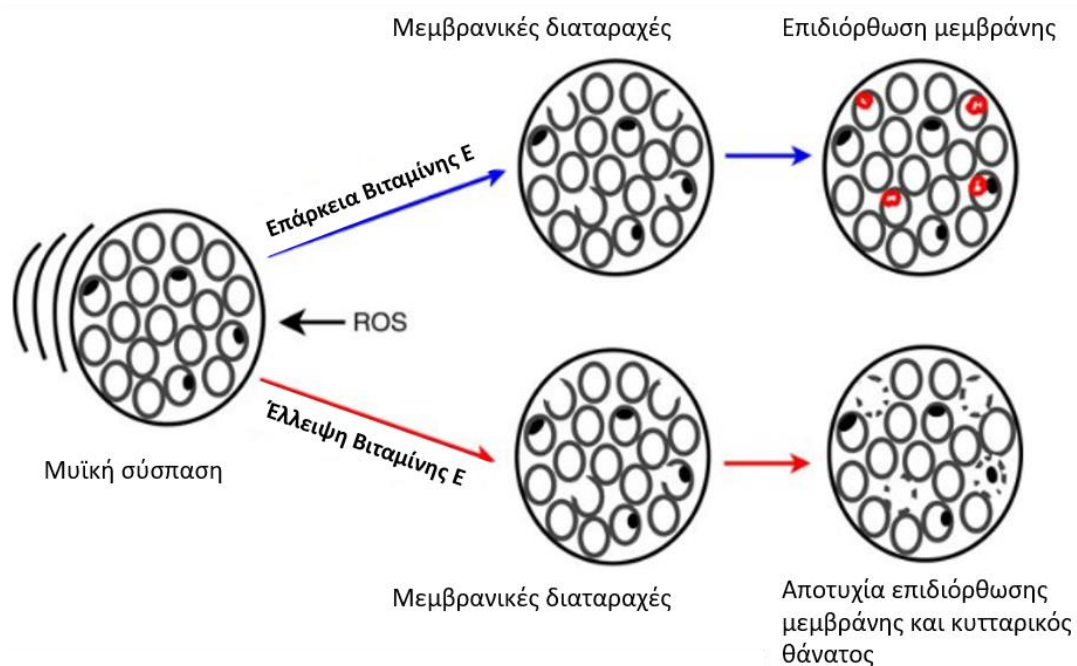
1.4.1.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ

Η βιταμίνη Ε αποτελεί τυπικό παράδειγμα αντιοξειδωτικής ουσίας φαινολικού χαρακτήρα. Οι φαινολικές αντιοξειδωτικές ουσίες αδρανοποιούν τις οξυγονούχες ρίζες προσφέροντάς τους το υδρογόνο της ομάδας του φαινολικού υδροξυλίου (-OH), έτσι στην περίπτωση της βιταμίνης Ε (π.χ. ΤΟΗ) σχηματίζεται μια ρίζα της βιταμίνης Ε (ΤΟ). Η ρίζα της βιταμίνης Ε σταθεροποιείται παρέχοντας μια κινόνη ή επανασχηματίζει την τοκοφερόλη με τη βοήθεια άλλων αναγωγικών ουσιών. Η δέσμευση των ριζών από την τοκοφερόλη τερματίζει την αλυσιδωτή αντίδραση και προστατεύει τα γειτνιάζοντα λιποειδή από την οξείδωση [110].

Ο κύριος βιολογικός ρόλος της βιταμίνης Ε είναι η προστασία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (polyunsaturated fatty acids, PUFA) όπως και άλλων συστατικών των κυτταρικών μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (low-density lipoprotein, LDL) από την οξείδωσή τους από τις ελεύθερες ρίζες [111]. Η χοληστερόλη και τα φωσfolιπίδια στη πλασματική μεμβράνη, καθώς και σε υποκυτταρικές μεμβράνες (π.χ., μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο, κλπ.), έχουν υψηλή συγγένεια με την α -τοκοφερόλη [112]. Λόγω της διαλυτότητάς της σε λιπίδια, η βιταμίνη Ε χωρίζεται στον υδρόφοβο πυρήνα της διπλής στιβάδας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, με επακόλουθες αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες της διπλοστιβάδας, για παράδειγμα αύξηση της ρευστότητας στην επιφάνεια της διπλοστιβάδας των λιποσωμάτων και μείωσης της στο εσωτερικό. Επιπλέον, η ομάδα χρωμανόλης της βιταμίνης Ε δεσμεύεται στην ομάδα κεφαλής των φωσfolιπιδίων, περιορίζοντας την κινητικότητά τους εντός της μεμβράνης [113]. Η κύρια βιολογική απόδειξη για τον ρόλο του «σταθεροποιητή» είναι η

παρεμπόδιση της λύσης των ερυθροκυττάρων από τη προσθήκη βιταμίνης E που προκαλείται από την οξειδωτική καταπόνηση [114, 115] και άλλους παράγοντες καταπόνησης [116]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η αιμολυτική αναιμία σχετίζεται με την ανεπάρκεια βιταμίνης E στον άνθρωπο [117] καθώς και ο τραυματισμός κυτταρικών μεμβρανών, όπως συμβαίνει στην ευαισθησία των ερυθρών αιμοσφαιρίων και τον μυϊκό εκφυλισμό των ζώων. Επιπλέον η τοκοφερόλη βοηθά στην κανονική λειτουργία του επιθηλίου των σπερματοζωαρίων (παραγωγή σπέρματος) και στην εμφύτευση (διατηρώντας το έμβρυο στη μήτρα) [104]. Έχει εκτιμηθεί ότι ένα μόριο βιταμίνης E προσφέρει ικανοποιητική προστασία ακόμη και σε δύο χιλιάδες μόρια φωσφολιπιδίων, γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι μετά την αντίδρασή της με ελεύθερες ρίζες, αναδημιουργείται πιθανώς μέσω άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών [111].

Σημαντικές ενδείξεις, που προέρχονται από πρώιμες μελέτες, δείχνουν ότι η υγεία των μυών εξαρτάται από την επαρκή παροχή βιταμίνης E στη διατροφή τους. Οι δίαιτες που παρουσιάζουν σοβαρή ανεπάρκεια σε α-τοκοφερόλη οδηγούν σε σημαντική νέκρωση μυοκυττάρων και τελικά θανατηφόρο μυϊκή δυστροφία σε διάφορα ζωικά μοντέλα συμπεριλαμβανομένων των αρουραίων [118], ινδικών χοιριδίων [119], κουνελιών [120] και παπιών [121]. Ωστόσο, η ανεπάρκεια βιταμίνης E στους ανθρώπους σχετίζεται με μυϊκή αδυναμία, αυξημένα επίπεδα κρεατινικής κινάσης (CK) και μυοπάθεια [122] και τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης E στο αίμα συνδέονται με απώλεια μυϊκής δύναμης στους ηλικιωμένους [123]. Ένας σκελετικός μύς συσσωρεύει δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης, γεγονός που μειώνεται σημαντικά με την προσθήκη βιταμίνης E [124].



Εικόνα 1.5 Υπόθεση για τη βιολογική δράση της βιταμίνης E στην προαγωγή της ομοιοστάσης των μυών [125].

Λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους, έχει προταθεί ότι οι τοκοφερόλες μειώνουν τους κινδύνους εμφάνισης καρκίνου [126]. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η μειωμένη πρόσληψη βιταμίνης E μέσω της διατροφής σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ορισμένων μορφών

καρκίνου [127]. Η α-Τ θεωρείται ως η «κλασική» βιταμίνη Ε, καθώς είναι η κύρια μορφή τοκοφερόλης που βρίσκεται στο αίμα και στους ιστούς [128]. Ως εκ τούτου, η α-Τ ήταν η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μορφή τοκοφερόλης για την πρόληψη του καρκίνου σε ερευνητικές μελέτες. Παρόλα αυτά η αποτυχία της τοκοφερόλης να αποτρέψει τον καρκίνο σε κάποιες μελέτες οδήγησε σε ασυνεπή συμπεράσματα σχετικά με τις ικανότητες της τοκοφερόλης για την πρόληψη εμφάνισης καρκίνου [129, 130].

1.4.1.4 ΟΔΟΙ ΕΙΣΟΔΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΤΗΣ ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

Η κύρια διατροφική πηγή τοκοφερόλης είναι φυτικά έλαια όπως καλαμποκιού, σόγιας, σουσαμιού, βαμβακέλαιο. Η γ-Τ είναι η πιο άφθονη μορφή τοκοφερόλης στη δίαιτα των ΗΠΑ, και απαντάται τρεις έως πέντε φορές περισσότερο από την α-Τ και την δ-Τα, ενώ η β-Τ υπάρχει μόνο σε μικρές ποσότητες [131].

Η βιταμίνη Ε απορροφάται σε συνδυασμό με άλλες λιποδιαλυτές βιταμίνες στο έντερο, όπου απαιτείται η παρουσία μικκυλίων χολικού οξέος. Κακή απορρόφηση λόγω εντερικής εκτομής, ασθένειας ή δευτερεύουσας ηπατικής νόσου, είναι κοινές αιτίες έλλειψης βιταμίνης Ε. Αυτή η βιταμίνη αρχικά διανέμεται από το έντερο μέσω της λεμφικής κυκλοφορίας ως μέρος των χυλομικρών (CMs), από όπου λέγεται ότι "τρίβεται" πάνω σε κύτταρα, όπως ερυθροκύτταρα. Από το ήπαρ και μετά, η διανομή της βιταμίνης Ε ακολουθεί αυτή των τριγλυκεριδίων και άλλων λιπιδίων, μέσω λιποπρωτεϊνών σε λιπώδη ιστό και κυτταρικές μεμβράνες. Η βιταμίνη Ε θεωρείται ότι παρουσιάζει τη πιο ομοιόμορφη διανομή σε όλο το σώμα από οποιαδήποτε άλλη λιποδιαλυτή βιταμίνη, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να βρίσκονται στο πλάσμα, στο ήπαρ και στον λιπώδη ιστό [112]. Η α-τοκοφερόλη υπάρχει στο πλάσμα του ανθρώπινου αίματος, όπου διαλυτοποιείται εκεί σε σύνδεση με πρωτεΐνες ορού, σε συγκέντρωση 20-30 μΜ [132].

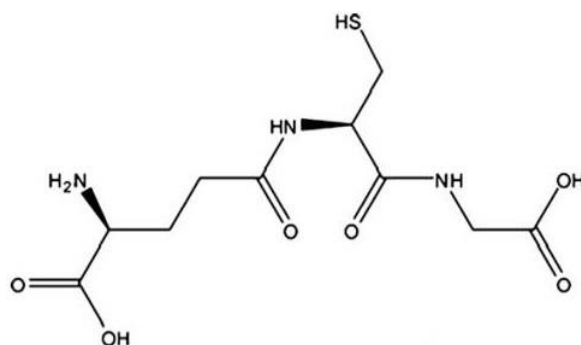
1.4.1.5 α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ ΚΑΙ ΟΤΑ

Σε ερευνητικές μελέτες έχει μελετηθεί η προστατευτική δράση της α-τοκοφερόλης απέναντι στην τοξικότητα της ΟΤΑ σε κυτταρικές σειρές [112]. Μάλιστα έχει παρατηρηθεί ότι τρίωρη προεπίωση των κυττάρων με α-τοκοφερόλη μειώνει σημαντικά την επαγόμενη από ΟΤΑ μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας και την παραγωγή ROS. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην κυτταροτοξικότητα της ΟΤΑ και ότι η α-τοκοφερόλη μπορεί να εξουδετερώνει την κυτταροτοξικότητα της ΟΤΑ. Έτσι, προσφέρονται νέες στρατηγικές για τη μείωση της κυτταροτοξικότητας της ΟΤΑ και ενισχύεται ο αμυντικός ρόλος της α-τοκοφερόλης στην ομοίωση της κυτταρικής μεμβράνης και σε πολλαπλές λειτουργίες του κυτταρικού μεταβολισμού. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι χορήγηση βιταμίνης Ε σε ποντίκια μειώνει τα «πρόσθετα» DNA (DNA-adducts) κατά 80% στους νεφρούς [133].

1.4.2 ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSH)

1.4.2.1 ΔΟΜΗ

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα μικρού μεγέθους φυσικό τριπεπτιδίο (γ -Glu-Cys-Gly) που περιέχει μια ομάδα -SH, μία αμινομάδα και δύο καρβοξυλικές ομάδες. Επιπλέον, αποτελεί το πιο άφθονο είδος θειόλης στο κυτταρόπλασμα και τον κύριο παράγοντα αναγωγής σε βιοχημικές διεργασίες. Αποτελείται από ένα κατάλοιπο κυστεΐνης το οποίο συνδέεται στο ένα άκρο με ένα κατάλοιπο γλυκίνης και στο άλλο άκρο με ένα κατάλοιπο γλουταμινικού, το οποίο ενώνεται στην κυστεΐνη με έναν ισοπεπτιδικό δεσμό μεταξύ της πλευρικής καρβοξυλικής ομάδας του γλουταμινικού και της αμινικής ομάδας της κυστεΐνης [134].



Εικόνα 1.6 Δομή της γλουταθειόνης (GSH) [135].

1.4.2.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Η GSH είναι ένα από τα σημαντικά βιολογικά αντιοξειδωτικά, που χρησιμοποιείται για την πρόληψη βλαβών σε σημαντικά κυτταρικά συστατικά που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες και υπεροξειδία. Η γλουταθειόνη χρησιμοποιείται ευρέως ως συμπλήρωμα σε πολλές ασθένειες όπως ο καρκίνος, το AIDS, σήψεις, αλλά και στη ρύθμιση της ισορροπίας αζώτου που αφορά στον ρυθμό επιβίωσης [136-138]. Επιπλέον, οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της γλουταθειόνης, έχουν όλο και περισσότερο χρησιμοποιηθεί για αισθητική εφαρμογή [139].

1.4.2.3 ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSH) ΚΑΙ ΟΤΑ

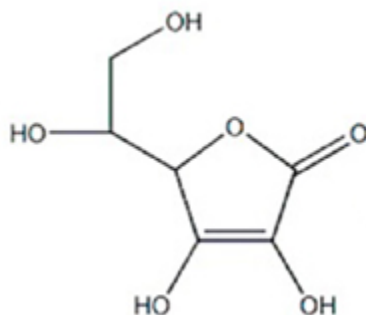
Η GSH είναι ένα βιολογικό αντιοξειδωτικό και το κύριο μη πρωτεϊνικό σουλφιδρύλιο που υπάρχει στα κύτταρα. Ενώ η σύζευξη με ισχυρά ηλεκτρόφιλα θεωρείται μηχανισμός κυτταρικής προστασίας, ορισμένα συζεύγματα δρουν ως τοξικά μέσα σε ιστούς πλούσιους σε γ -γλουταμυλο τρανσπεπτιδάση (γ -GT) [140]. Η ΟΤΑ, καθώς και τα ηλεκτρόφιλα που παράγονται από το μεταβολισμό της αντιδρούν με τη γλουταθειόνη (GSH), σχηματίζοντας συζεύγματα με τη GSH [141]. Στα νεφρά παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα συζεύξεων GSH, υποδηλώνοντας το μεγαλύτερο επίπεδο βιοενεργοποίησης της ΟΤΑ και εμπλέκοντας τη GSH με στη

νεφροτοξικότητα, τη γονιδιοτοξικότητα και την καρκινογένεση της ΟΤΑ. Επιπλέον, στα μικροσώματα νεφρού από κουνέλι, ο βιομετασχηματισμός της ΟΤΑ αύξησε τον σχηματισμό «πρόσθετων» DNA (DNA-adducts) μέσω οδών που εμπλέκουν τη μικροσωμική τρανσφεράση της S-γλουταθειόνης και το CYP2C9. Αντίθετα, στο ήπαρ η γλουταθειόνη δρα προστατευτικά απέναντι στη γονιδιοτοξική δράση της ΟΤΑ και ανιχνεύονται προϊόντα της οδού αποτοξίνωσης της ΟΤΑ [133].

1.4.3 ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ

1.4.3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Το ασκορβικό οξύ είναι μια φυσική υδατοδιαλυτή βιταμίνη (βιταμίνη C). Είναι παράγωγο εξόζης, αποτελείται από ένα πενταμελή δακτύλιο και περιλαμβάνει μια υποκατασκευή ινδιόλης και δύο χειλικά κέντρα στις θέσεις 4 και 5, τα οποία προσδιορίζουν τις 4 στερεοϊσομερείς μορφές [142, 143]. Από τα ισομερή μόνο το L-ασκορβικό οξύ παρουσιάζει βιολογική δραστηριότητα. Απαντάται σε δύο μορφές, την ανηγμένη και οξειδωμένη μορφή ασκορβικού οξέος [143].



Εικόνα 1.7 Δομή ασκορβικού οξέος [144].

Το ασκορβικό οξύ είναι κρυσταλλικό, άχρωμο, υδατοδιαλυτό συστατικό, με σημείο τήξεως 192°C [145] και είναι πολύ ευαίσθητο στην οξείδωση. Καταστρέφεται σε βασικό περιβάλλον, ενώ είναι σχετικά σταθερό σε ελαφρώς όξινα διαλύματα [142]. Σε υδατικά διαλύματα το ασκορβικό οξύ είναι πολύ ασταθές και περνά από διάφορα στάδια οξείδωσης ανάλογα με τις συνθήκες (pH, θερμοκρασία, μεταλλικά ιόντα). Γενικά, η βιταμίνη C είναι η πιο ευαίσθητη βιταμίνη κατά των φυσικών και χημικών παραγόντων, όπως η θερμότητα, η έκθεση στο οξυγόνο και η αντίδραση Maillard [143].

1.4.3.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

Το ασκορβικό οξύ είναι ένας ισχυρός αναγωγικός και αντιοξειδωτικός παράγοντας που λειτουργεί στην υδατική φάση τόσο εντός του κυττάρου όσο και εξωκυτταρικά [146]. Γενικά, η βιταμίνη C λειτουργεί ως σαρωτής των ελεύθερων ριζών, ως συμπαράγοντας για πολλά ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση καρνιτίνης, κολλαγόνου, νευροδιαβιβαστών, στην

καταπολέμηση των βακτηριακών λοιμώξεων, στις αντιδράσεις αποτοξίνωσης και στον σχηματισμό κολλαγόνου σε ινώδη ιστό, δόντια, οστά, συνδετικό ιστό, δέρμα και τριχοειδή αγγεία. Επιπλέον, η βιταμίνη C δρα ως συμπαραγοντας σε πολλές βιολογικές διεργασίες που περιλαμβάνουν τη μετατροπή ντοπαμίνης σε νοραδρεναλίνη, στα στάδια υδροξυλίωσης της σύνθεσης αδρεναλικών στεροειδών ορμονών, στον μεταβολισμό τυροσίνης, στη μετατροπή του φολικού οξέος σε φολινικό οξύ, στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, στη σύνθεση λιπιδίων και πρωτεϊνών, στο μεταβολισμό του σιδήρου και στην κυτταρική αναπνοή [147]. Στοιχεία για *in vivo* αντιοξειδωτικές λειτουργίες του ασκορβικού περιλαμβάνουν τη δέσμευση αντιδρώντων οξειδωτικών σε ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα, πνεύμονα και γαστρικό βλεννογόνο και μειωμένη υπεροξειδωση λιπιδίων όπως μετριέται με απέκκριση ισοπροστανής στα ούρα. Βρίσκεται στα εσπεριδοειδή και άλλα φρούτα και στα λαχανικά, όμως η βιταμίνη C δεν μπορεί να παραχθεί ή να αποθηκευτεί από τον άνθρωπο και πρέπει να ληφθεί στη διατροφή [148].

1.4.3.3 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ C- ΣΚΟΡΒΟΥΤΟ

Η κλασική νόσος της σοβαρής ανεπάρκειας βιταμίνης C είναι το σκορβούτο, το οποίο χαρακτηρίζεται από συμπτώματα που σχετίζονται με ελαττώματα συνδετικού ιστού. Το σκορβούτο εμφανίζεται συνήθως σε συγκέντρωση πλάσματος <11 μmol / L (0,2 mg / dL). Τα σημεία και τα συμπτώματα του σκορβούτου περιλαμβάνουν τα ακόλουθα: υπερκεράτωση των θυλακίων, *retectiae* (μικροσκοπικά, τέλεια στρογγυλά, πορφυρά αιμορραγικά σημεία στο δέρμα), εκχυμώσεις (αιμορραγικές κηλίδες στο δέρμα ή στους βλεννογόνους), υπερκεράτωση των θυλάκων των τριχών, φλεγμονή και αιμορραγία των ούλων, περιφερικές αιμορραγίες, αρθρίτιδα, αρθραλγία, μειωμένη επούλωση πληγών. Άλλα σημεία και συμπτώματα περιλαμβάνουν δύσπνοια, οίδημα, σύνδρομο Sjogren (ξηροί οφθαλμοί και στόμα), αδυναμία, κόπωση και κατάθλιψη [148].

Αν και οι κλινικές ανεπάρκειες είναι συνήθως σπάνιες μπορεί να απαιτούνται αυξημένες απαιτήσεις ή / και συμπληρώματα στις ακόλουθες συνθήκες, αλκοολισμός, εγκαύματα, καρκίνος, παρατεταμένη διάρροια, παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες, παρατεταμένος πυρετός, γαστρεκτομή, χρόνια αιμοκάθαρση, υπερθυρεοειδισμός, βρέφη που λαμβάνουν μη ενισχυμένες φόρμουλες, συνεχιζόμενη λοίμωξη, εντερικές παθήσεις, χειρωνακτική εργασία, πεπτικό έλκος, κάπνισμα, συνεχιζόμενο άγχος, χειρουργική επέμβαση, συνεχιζόμενο τραύμα, φυματίωση [149].

1.4.3.4 ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ ΚΑΙ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α

Η βιταμίνη C (L-ασκορβικό οξύ, VC) έχει αναφερθεί ότι μειώνει την κυτταρογενετική τοξικότητα ορισμένων κοινών φυτοφάρμακων [150-153] καθώς και μυκοτοξινών [154]. Ο συνδυασμός ασκορβικού οξέος με άλλες βιταμίνες και αντιοξειδωτικά, όπως α-τοκοφερόλη, παρείχε προστασία κατά της οξείας τοξικότητας που προκαλείται από μυκοτοξίνες [155]. Επιπλέον η βιταμίνη C αναστέλλει σημαντικά τον σχηματισμό πρόσθετων ΟΤΑ-DNA [156]. Συγκεκριμένα, η προστατευτική επίδραση της αντιοξειδωτικής βιταμίνης C έναντι της γονιδοτοξικότητας της ΟΤΑ σε ποντικούς έχει αποδειχθεί από τους Bose και Sinha [154].

1.4.3.5 ΜΟΥΡΑ ΚΑΙ ΒΙΤΑΜΙΝΗ C

Τα μούρα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς περιέχουν τις καλύτερες διατροφικές πηγές βιοδραστικών ενώσεων (BAC) [157-160]. Τα BAC είναι άφθονα ειδικά σε ποικιλίες πολύχρωμων μούρων. Στα είδη που περιέχουν τα περισσότερα BAC ανήκουν μέλη πολλών οικογενειών, όπως *Rosaceae* (φράουλα, σμέουρο, βατόμουρο) και *Ericaceae* (μύρτιλο, βακκίνιο). Επιπλέον, τα σταφύλια (γένος *Vitis*) και τα προϊόντα τους (χυμός, κρασί) αποτελούν μεγάλες πηγές BAC [161, 162]. Η χημική σύνθεση των αντιπροσωπευτικών μούρων ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία, την τοποθεσία ανάπτυξης και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, τη φυτική διατροφή, το στάδιο ωρίμανσης και τον χρόνο συγκομιδής, καθώς και τις επακόλουθες συνθήκες αποθήκευσης. Επομένως, το περιεχόμενο κάθε μεμονωμένου συστατικού και η ποιότητα των καρπών είναι πολύ μεταβλητά [163].

Τα μούρα, γενικά, είναι πλούσια σε σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη), αλλά χαμηλά σε θερμίδες. Περιέχουν μόνο μικρές ποσότητες λίπους, αλλά υψηλή περιεκτικότητα σε διαιτητικές ίνες (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτίνη), οργανικά οξέα, όπως κιτρικό οξύ, μηλικό οξύ, τρυγικό, οξαλικό και φουμαρικό οξύ, ορισμένα ορυκτά σε ιχνοστοιχεία [164], μερικές βιταμίνες (ασκορβικό οξύ και φολικό οξύ) και φυτοχημικά, όπως φαινολικές ενώσεις. Το ασκορβικό οξύ εμφανίζεται σε σημαντικές ποσότητες σε φρέσκα μούρα. Η βιταμίνη C θεωρείται επίσης ως δείκτης ποιότητας των θρεπτικών συστατικών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης, καθώς είναι γνωστό ότι αν διατηρηθεί καλά το ασκορβικό οξύ, τα άλλα θρεπτικά συστατικά θα μπορούσαν να παραμείνουν σε τρόφιμα με ελάχιστες αλλαγές και απώλειες. Η απώλεια στην περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ είναι επίσης εξαρτώμενη από τη ποικιλία [165]. Αν και αυτή η βιταμίνη είναι ένας μεγάλος αναγωγικός παράγοντας με υψηλή αντιοξειδωτική δράση [166], σε πολλές μελέτες εκτιμήθηκε ότι συνεισφέρει μόνο μια μικρή ποσότητα (μέχρι 10%) στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των καρπών [167-169].

1.4.3.6 ΦΡΑΟΥΛΑ ΚΑΙ ΒΙΤΑΜΙΝΗ C

Οι φράουλες (οικογένεια: *Rosaceae*, γένος *Fragaria*, καλλιεργήσιμη: *F. × ananassa*, άγρια: *F. virginiana*) ανήκουν στα μούρα και είναι δημοφιλή λόγω της επιθυμητής γλυκιάς γεύσης, του ελκυστικού άρώματός και του κόκκινου χρώματος [163].

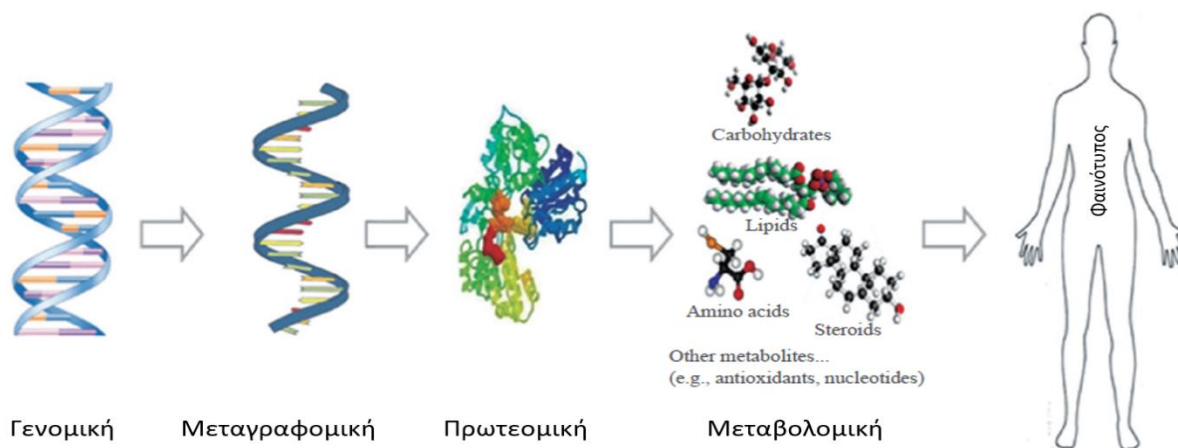
Η αντιοξειδωτική ικανότητα των μούρων, όπως οι φράουλες, εξαρτάται από τη περιεκτικότητα τους σε ενώσεις που δρουν ως καθαριστές των ελευθέρων ριζών. Σε αυτές τις ενώσεις ανήκουν τα φαινολικά, τα περισσότερα εκ των οποίων εκφράζουν σχετικές *in vitro* και *in vivo* αντιοξειδωτικές δραστηριότητες και το ασκορβικό οξύ. Μεταξύ των φρούτων, οι νωπές φράουλες θεωρούνται ότι έχουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ. Μεταξύ των ειδών μούρων, οι φράουλες έχουν παρόμοιο περιεχόμενο με τα σμέουρα, αλλά περίπου τέσσερις φορές περισσότερο ασκορβικό από τα βακκίνια. Η περιεκτικότητα ασκορβικού στις φράουλες είναι πολύ μεταβλητή και στις φρέσκες φράουλες κυμαίνεται γενικά από 5 έως 50 mg / 100 g νωπού βάρους [169, 170], σε ορισμένες ποικιλίες μέχρι 80 mg / 100 g νωπού βάρους [171]. Όπως είναι γνωστό, υπάρχει βαθμιαία μείωση της περιεκτικότητας σε ασκορβικό, καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία αποθήκευσης ή η διάρκεια. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια μίας εβδομάδας αποθήκευσης, δεν

διαπιστώθηκαν απώλειες ασκορβικού στα φράουλες σε διάφορες θερμοκρασίες [169]. Η μεταβλητότητα και το ακριβές περιεχόμενο συγκεκριμένων φαινολικών ενώσεων των φραουλών εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, όπως γενετικές ιδιότητες, συνθήκες καλλιέργειας, στάδιο ωρίμανσης, χρόνος και συνθήκες αποθήκευσης [170, 172-174].

1.5 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

1.5.1 «ΟΜΙΚΕΣ» ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ (Omics)

Ο όρος «omics» αναφέρεται σε κάθε είδους ειδικής μελέτης που παρέχει συλλογική πληροφόρηση για ένα βιολογικό σύστημα. 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 και iv) την μεταβολομική (metabolomics) όπου ερευνάται το σύνολο ή η πλειοψηφία των μεταβολιτών ενός οργανισμού [175]. Νέες τεχνολογίες «omics» προστίθενται συνεχώς, όπως η λιπιδομική ή η γλυκομική. Κάθε τεχνική Omics είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση των διαφόρων βιολογικών συστημάτων και συμπληρώνει πληροφορίες από τις άλλες προσεγγίσεις. Λόγω του μεγάλου όγκου πληροφοριών και της πολυπλοκότητας των δεδομένων που λαμβάνονται από τις «ομικές», απαιτείται προηγμένη ανάλυση τους με χρήση εξελεγμένων λογισμικών βιοπληροφορικής (bioinformatics) [176].



Εικόνα 1.8 Συμβατικές μελέτες omics στη βιολογία [176].

1.5.2 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ

Οι μεταβολίτες είναι συνήθως βιομόρια χαμηλού μοριακού βάρους (<1.500 Da). Είναι τα δομικά στοιχεία του γονιδιώματος, του πρωτεόματος, και των κυτταρικών μεμβρανών και παίζουν βασικούς ρόλους στη βιολογία ως μόρια σηματοδότησης, πηγές ενέργειας και ενδιάμεσα προϊόντα των μεταβολικών διαδικασιών. Τα επίπεδά τους παρέχουν ολοκληρωμένες

πληροφορίες για τις βιολογικές λειτουργίες και καθορίζουν τους φαινοτύπους των βιολογικών συστημάτων ως αποτέλεσμα γενετικών ή περιβαλλοντικών αλλαγών [176]. Η ανάλυση των μεταβολιτών περιλαμβάνει τη χρήση διαφορετικών αναλυτικών τεχνικών για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών μεταβολιτών. Οι επιτυχείς μεταβολικές μελέτες βασίζονται στη σωστή προετοιμασία του δείγματος, στην καινοτόμο οργανολογία και στη βιοπληροφορική ανάλυση [177]. Οι μεταβολίτες παρουσιάζουν μεγάλες διαφοροποιήσεις όσον αφορά τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως η πολικότητα, η οξύτητα και η πτητικότητα. Έτσι, η ταυτόχρονη ανάλυση ενός ευρέος φάσματος μεταβολιτών είναι μια πολύ απαιτητική διαδικασία [178].

Το κύριο πλεονεκτήματα της μεταβολομικής είναι ότι οι μεταβολίτες είναι στενά συνδεδεμένοι με τους φαινότυπους των ζωντανών οργανισμών και παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις βιοχημικές δραστηριότητες αντανάκλωντας τα υποστρώματα και τα προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού. Η μεταγραφική δεν συσχετίζεται πάντοτε με το πρωτέομα και το μεταφρασμένο πρωτέομα μπορεί να μην είναι λειτουργικά ενεργό. Ως εκ τούτου, οι αλλαγές τους δεν έχουν πάντα αποτέλεσμα ως φαινοτυπικές αλλοιώσεις. Σε αντίθεση με το γονιδίωμα ή το πρωτέομα, ο μεταβολισμός συχνά ονομάζεται μοριακός φαινότυπος ζωντανών οργανισμών και εύκολα συνδυάζεται με βιολογικές συνθήκες και καταστάσεις ασθένειας [176].

1.5.3 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ - ΤΟΞΙΚΟΓΕΝΟΜΙΚΗ

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 [179, 180]. Από αναλυτική άποψη, ο στόχος της μεταβολομικής στις μελέτες τοξικότητας είναι να «επιτύχει μια ολοκληρωμένη μέτρηση του μεταβολόματος και να διερευνήσει πώς αυτό αποκρίνεται σε παράγοντες πίεσης, περιγράφοντας τις αλλαγές που συμβαίνουν στη σχέση μεταξύ των βιοχημικών μονοπατιών» [181]. 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.

1.5.4 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Η μεταβολομική αναπτύχθηκε λόγω του σχεδιασμού καινοτόμων αναλυτικών οργάνων. Διάφορες αναλυτικές τεχνικές έχουν εφαρμοστεί για την ανάλυση μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων της φασματομετρίας μάζας (MS), του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), της φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) και της φασματοσκοπίας Raman [182-186]. Η φασματοσκοπία FT-IR και η φασματοσκοπία Raman είναι ταχείς, μη καταστρεπτικές και υψηλής απόδοσης αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για

τον προσδιορισμό διάφορων μεταβολιτών. Αυτές οι φασματοσκοπικές μέθοδοι γενικά εφαρμόζονται για τη κατασκευή μεταβολομικού προφίλ λόγω της ολιστικής τους φύσης και του γεγονότος ότι οι απορροφήσεις σε συγκεκριμένα μήκη κύματος είναι μερικές φορές ικανές να παράσχουν σημαντικές ενδείξεις για την ταυτοποίηση των παρατηρούμενων μεταβολικών συστατικών. Ωστόσο, η ευαισθησία και η επιλεκτικότητα της φασματοσκοπίας FT-IR και της φασματοσκοπίας Raman είναι χαμηλότερες από εκείνες άλλων μεθόδων [187].

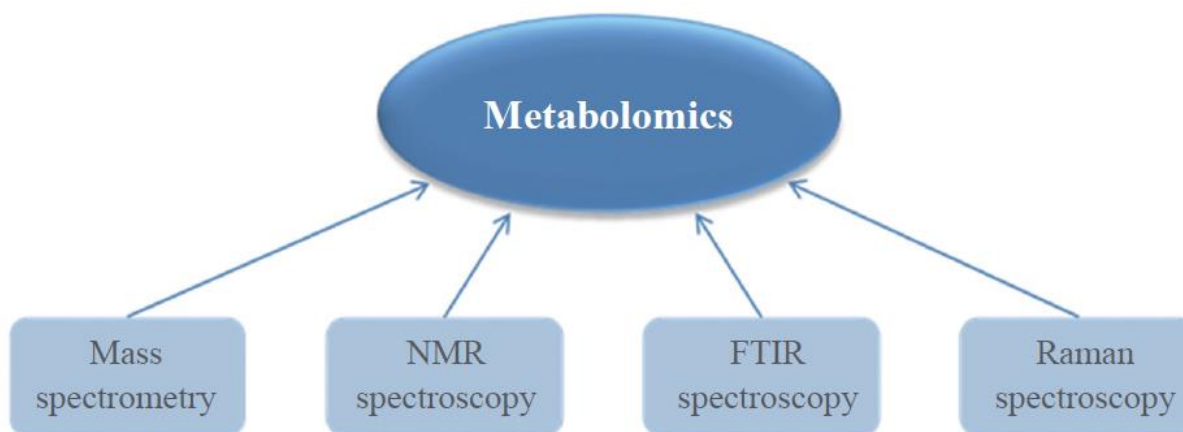
Η φασματοσκοπία NMR, που είναι μια κοινώς χρησιμοποιούμενη στρατηγική στη μεταβολομική, είναι επίσης μια ταχεία και μη καταστρεπτική μέθοδος και χρειάζεται ελάχιστο δείγμα. Οι χημικές μετατοπίσεις στα φάσματα NMR μπορούν να παράσχουν κρίσιμες ενδείξεις για την ταυτοποίηση συγκεκριμένων μεταβολιτών. Ωστόσο, η NMR απαιτεί τουλάχιστον χιλιοστογραμμομοριακές συγκεντρώσεις μεταβολιτών σε δείγματα και η ευαισθησία του είναι χαμηλότερη από αυτή την MS. Γενικότερα, η MS χρησιμοποιείται ευρέως για μεταβολομική ανάλυση, λόγω της ευρείας δυναμικής της εμβέλειας και της καλής ευαισθησίας (nM). Επιπροσθέτως, η MS είναι σε θέση να ανιχνεύσει ένα ευρύ φάσμα μορίων σε σύγκριση με άλλες στρατηγικές [176].

Πρόσφατα, η μεταβολομική με βάση την MS έγινε η πιο δημοφιλής μεταβολομική στρατηγική. Η υγρή χρωματογραφία σε σύζευξη με MS (LC / MS) έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι του MS μόνο. Η καταστολή ιόντων, που αποτελεί συχνό πρόβλημα, μπορεί να εξαλειφθεί με την έκλυση των μεταβολιτών σε διαφορετικούς χρόνους και με κατακράτηση τυχόν διαταραγμένων μεταβολιτών. Επιπροσθέτως, η περιοχή χρωματογραφικής κορυφής παρέχει ένα χρήσιμο εργαλείο για την ποσοτικοποίηση του μεταβολίτη, καθώς η ποσοτικοποίηση δεν μπορεί να επιτευχθεί όταν χρησιμοποιείται αποκλειστικά η MS [176].

Η αέρια χρωματογραφία σε σύζευξη με MS (GC / MS) είναι η πλέον κατάλληλη μέθοδος MS για την ανίχνευση πτητικών μεταβολιτών. Αυτό η τεχνική συχνά απαιτεί χημική τροποποίηση για τη βελτίωση της πτητικότητας και η εφαρμογή της έχει περιορισμό όσον αφορά το μοριακό μέγεθος, την πτητικότητα και την πολικότητα. Ως εκ τούτου, η LC / MS έχει γίνει πιο δημοφιλής επιλογή στη μεταβολομική. Στην LC / MS δεν απαιτείται χημική τροποποίηση του δείγματος και μπορούν να μετρηθούν μεταβολίτες με περισσότερες διαφορετικές χημικές δομές και αυξημένα μοριακά μεγέθη [186-188].

Η μεταβολομική ανάλυση με βάση την MS μπορεί να παρουσιάσει δυσκολίες στην ταυτοποίηση και στον χαρακτηρισμό των μεταβολιτών που παρατηρούνται. Οι βιβλιοθήκες φασμάτων μάζας δεν είναι αρκετά πλήρεις για την ταυτοποίηση όλων των μεταβολιτών που παρατηρούνται. Η μεταβολομική βάση δεδομένων του Golm αποτελείται κυρίως από μεταβολίτες φυτών και η βάση δεδομένων του Εθνικού Ινστιτούτου Προτύπων και Τεχνολογίας περιλαμβάνει μόνο δεδομένα ιονισμού ηλεκτρονίων-MS [189]. Η βάση δεδομένων METLIN περιέχει μια σχολαστική λίστα των δομικών πληροφοριών μεταβολιτών μέσω MS. Ωστόσο, η βάση δεδομένων εξακολουθεί να μην επαρκεί για τον εντοπισμό όλων των μεταβολιτών που παρατηρούνται [190]. Πρόσφατα, δημιουργήθηκε επίσης η Βάση Ανθρώπινων Μεταβολιτών (HMDB) για την παροχή χημικών και μοριακών βιοχημικών δεδομένων για ανθρώπινους μεταβολίτες [191]. Εκτός από τις προαναφερθείσες βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο, η αναγνώριση μεταβολιτών έχει πραγματοποιηθεί από εμπορικά διαθέσιμες ή αυτοσχέδιες βάσεις δεδομένων. Ωστόσο, η ύπαρξη

ισοβαρικών ή ισομερών μεταβολιτών μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένη αναγνώριση. Η MS / MS έχει χρησιμοποιηθεί για τη λήψη δομικών πληροφοριών σχετικά με τους μεταβολίτες [183, 192, 193]. Το χαρακτηριστικό πρότυπο κατακερματισμού ενός μεταβολίτη είναι σημαντικό για την αναγνώριση των άγνωστων μεταβολιτών και για την αναλυτική εξειδίκευση. Επιπλέον, ο χρόνος κατακράτησης σε ορισμένες συνθήκες διαχωρισμού ή τα ισοτοπικά πρότυπα άγνωστων μεταβολιτών θα πρέπει να παρέχουν ενδείξεις για την αναγνώριση μεταβολιτών καθώς και δομικές τους πληροφορίες.



Εικόνα 1.9 Αναλυτικά όργανα που χρησιμοποιούνται στη μεταβολομική ανάλυση [176].

1.5.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η μεταβολομική στηρίζεται στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η οποία σχετίζεται με τη στατιστική προσέγγιση της ανάλυσης 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 Χ ο οποίος είναι κάθετος στον άξονα Υ. 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 πλατφόρμες διαφορετικών αναλυτικών μεθόδων 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 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 [194].

Παράλληλα, η ύπαρξη εργαλείων βιοπληροφορικής όπως η 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.

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η Ωχρατοξίνη Α είναι μυκοτοξίνη που ανιχνεύεται συχνά σε τρόφιμα και ζωοτροφές σε όλο τον κόσμο. Θεωρούνται έντονα τοξικές και έχει αποδειχθεί και η συσχέτιση τους με την εκδήλωση ασθενειών όπως τη Βαλκανικής Ενδημικής Νεφροπάθειας (BEN) και τη χρόνια διάμεσης νεφρίτιδα (CIN), ενώ έχει υπολογιστεί ότι το ¼ των καλλιεργειών παγκοσμίως έχουν μολυνθεί με μυκοτοξίνες. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής είναι η μελέτη των μηχανισμών τοξικότητας της OTA και η παρεμπόδιση της κυτταροτοξικής της δράσης σε κυτταρική σειρά HEK 293. Για το σκοπό αυτό αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση των τοξικών επιδράσεων διαφορετικών συγκεντρώσεων OTA και σε συνδυασμών OTA και διάφορων αντιοξειδωτικών (α-Τοκοφερόλη, Ασκορβικό οξύ, Γλουταθειόνη, φαινολικά εκχυλίσματα μούρων) σε κύτταρα HEK 293 μετά από επώαση για 24 και 48 ώρες, με τη χρήση της χρωστικής βιωσιμότητας MTT και υπολογίστηκε μέση συγκέντρωση θανατηφόρος δόσης LC50. Στη συνέχεια υπολογίστηκε φθορισμομετρικά η επίδραση της OTA και του συνδυασμού OTA και α-Τοκοφερόλης στην οξειδοαναγωγική ισορροπία και στην ισορροπία ασβεστίου των κυττάρων HEK 293. Επιπλέον, ελέγχθηκαν οι επιδράσεις της OTA και συνδυασμών OTA και α-Τοκοφερόλης στο ρυθμό επούλωσης τραύματος. Τέλος, πραγματοποιήθηκε κατασκευή μεταβολομικού προφίλ της επίδρασης της OTA, της α-Τοκοφερόλης και συνδυασμού τους σε κύτταρα HEK 293.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Καλλιέργεια και Διατήρηση Κυττάρων HEK 293

2.1.1 Υλικά και Αντιδραστήρια

1. Κυτταρική σειρά HEK 293
2. 1x DMED (Biochrom AG)
3. 10% (v/v) ορός εμβρύου μόσχου (FBS) (Invitrogen)
4. 1% (w/v) διάλυμα πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Biochrom AG)

5. 1% (v/v) L – γλουταμίνη (Biochrom AG)
6. 0.5% πυρουβικό οξύ (Biochrom AG)
7. NaHCO₃
8. Χρωστική κυανού του τρυπανίου (Trypan Blue)
9. Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (SDS CARLO ERBA)
10. Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

2.1.2 Εξοπλισμός

1. Θάλαμος καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών (HEAL FORCE HF90)
2. Φυγόκεντρος (HERMLE Labortechnik GmbH)
3. Πλαστικές πιπέττες των 15 mL και μηχανικές πιπέττες
4. Φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων 75 cm² (ORANGE SCIENTIFIC)
5. Αιματοκυτταρομετρική πλάκα Neubauer
6. Κρυστάλλινα σωληνάρια των 2 mL

2.1.3 Καλλιέργεια και Απομόνωση κυττάρων

Η διαδικασία που ακολουθείται για την παραλαβή μεμονωμένων ζωικών και κυττάρων είναι η εξής:

Για την παραλαβή μεμονωμένων κυττάρων γίνεται αποκόλληση αυτών από την επιφάνεια της φιάλης στην οποία αναπτύσσονται. Αυτό επιτυγχάνεται με μηχανική αποκόλληση των κυττάρων, χωρίς την προσθήκη ενζυμικού διαλύματος θρυψίνης/EDTA. Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων και φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές για 5 min στους 25°C. Στη συνέχεια γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε πλάκα Neubauer και τα κύτταρα διατηρούνται σε εναιώρημα μέχρι το επόμενο στάδιο.

Το θρεπτικό υπόστρωμα θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ζωικών κυττάρων περιέχει:

- 1x DMED
- 10% (v/v) ορό εμβρύου μόσχου (FCS)
- 1% (w/v) διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομικίνης
- 1% (v/v) L – γλουταμίνη
- 0.5% πυρουβικό οξύ
- 7.5% NaHCO₃

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θάλαμο με 5% CO₂ στους 37 °C

2.1.4 Μέτρηση κυττάρων-Προσδιορισμός βιωσιμότητας

Ως κυτταρική βιωσιμότητα ορίζεται ο λόγος του αριθμού ζωντανών κυττάρων προς το συνολικό αριθμό κυττάρων, όπως μετρούνται σε αιματοκυτταρομετρική πλάκα Neubauer, μετά από προσθήκη διαλύματος χρωστικής κυανού του τρυπανίου. Κύτταρα τα οποία προσλαμβάνουν τη χρωστική κυανού του τρυπανίου θεωρούνται νεκρά.

Στο κυτταρικό εναιώρημα προστίθεται διάλυμα χρωστικής κυανού του τρυπανίου 0,4% w/v (σε PBS), σε αναλογία εννέα προς ένα, ώστε η τελική συγκέντρωση της χρωστικής να είναι 0,04% w/v. Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα τοποθετούνται στο αιματοκυτταρόμετρο και μετρούνται.

Από τον αριθμό των κυττάρων που έχουν βαφεί κυανά λόγω εισόδου της χρωστικής, υπολογίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας σύμφωνα με τη σχέση:

$$\text{Ποσοστό βιωσιμότητας \%} = 100 \times \frac{1 - \text{αριθμός νεκρών κυττάρων (κυανά)}}{\text{αριθμός μετρηθέντων κυττάρων}}$$

Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων στο εναιώρημα υπολογίζεται από τη σχέση:

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

2.1.5 Κρυοσυντήρηση κυτταρικών σειρών

Οι κυτταρικές σειρές που βρίσκονται σε καλλιέργεια γηράσκουν, μεταλλάσσονται και κινδυνεύουν να μολυνθούν. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η ψύξη τους για μακροπρόθεσμη φύλαξη. Αυτό επιτυγχάνεται με αποθήκευσή τους στους -80°C σε απενεργοποιημένο ορό εμβρύου μόσχου (FCS) παρουσία 10 % διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Το DMSO είναι κρυοπροστατευτικός παράγοντας, ο οποίος μειώνει το σημείο πήξεως του θρεπτικού υλικού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αργή πήξη του και άρα την αποφυγή σχηματισμού κρυστάλλων που είναι βλαβεροί για τα κύτταρα [195].

Κυτταροκαλλιέργεια που βρίσκεται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης φυγοκεντρείται σε 1000 rpm επί 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε απενεργοποιημένο FCS και 10% DMSO. Η πυκνότητα των κυττάρων ρυθμίζεται στα 5×10^6 κύτταρα/mL. Από το κυτταρικό εναιώρημα, 1 mL φέρεται σε ειδικά κρυστάλλωτα σωληνάρια των 2 mL, τα οποία καταψύχονται σταδιακά στους 4°C για μία ώρα και στους -20°C . Μετά από μία ώρα μεταφέρονται στους -80°C .

2.1.6 Απόψυξη κυτταρικών σειρών

Η απόψυξη των κυττάρων από τους -80°C για την επαναχρησιμοποίησή τους, είναι μία διαδικασία που τα καταπονεί και προκαλεί το θάνατό τους. Συνεπώς, η ταχεία θέρμανση και η απομάκρυνση του DMSO είναι ουσιώδεις διαδικασίες για την υψηλή αναλογία επιβίωσης των κυττάρων. Το κρυστάλλωτο σωληνάριο, στο οποίο είχαν παγώσει τα κύτταρα, αποσύρεται από τους -80°C και τοποθετείται άμεσα σε υδατόλουτρο στους 37°C . Μόλις το περιεχόμενο υγροποιηθεί, αραιώνεται περίπου είκοσι φορές με προθερμασμένο στους 37°C θρεπτικό υλικό σε φιάλες καλλιέργειας και τοποθετείται στο θάλαμο στους 37°C , 5% CO_2 .

2.2 Παρασκευή διαλυμάτων ωχρατοξίνης A

2.2.1 Υλικά και Αντιδραστήρια

1. Ωχρατοξίνη A (ANALYTICAL STANDARD SOLUTIONS)
2. Διμεθυλοσουλφοξείδιο DMSO (SDS CARLO ERBA)

2.2.2 Εξοπλισμός

1. Θάλαμος νηματικής ροής
2. Μηχανικές πιπέττες

2.2.3 Διαδικασία παρασκευής πρότυπων διαλυμάτων ωχρατοξίνης A

Τα πρότυπα διαλύματα ωχρατοξίνης A έγιναν με διάλυση της σε DMSO (SDS CARLO ERBA) σε συγκεντρώσεις 45mM, 4,5mM, 450μM. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις των πρότυπων διαλυμάτων σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των κυττάρων DMEM και DMSO. Οι τελικές αραιώσεις που έγιναν με βάση τα πρότυπα διαλύματα ήταν οι ακόλουθες: 0,5μM, 0,75μM, 1μM, 2,5μM, 5μM, 10 μM, 25μM, 50 μM.

2.3 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων αντιοξειδωτικών

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας αντιοξειδωτικά για την πιθανή εξουδετέρωση των δυσμενών επιπτώσεων των ριζών οξυγόνου που παράγονται λόγω της OTA [133]. Πραγματοποιήθηκε μελέτη των επιδράσεων της α -Τοκοφερόλης, της γλουταθειόνης, του ασκορβικού οξέος καθώς και αιθανολικού εκχυλίσματος από τρεις διαφορετικές ποικιλίες μούρων και μία φράουλας, *in vitro* σε κύτταρα HEK 293 σε συνδυασμό με συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A.

2.3.1 Υλικά και Αντιδραστήρια

1. Ωχρατοξίνη A (ANALYTICAL STANDARD SOLUTIONS)
2. α -Τοκοφερόλη (SERVA)
3. Ασκορβικό Οξύ (FERAK)
4. Αιθανολικά εκχυλίσματα τριών ποικιλιών μούρων (AUAL, ANS8, Fengchisang)
5. Αιθανολικό εκχύλισμα φράουλας
6. Διμεθυλοσουλφοξείδιο DMSO (SDS CARLO ERBA).
7. Αιθανόλη 99% (MERK)

2.3.2 Εξοπλισμός

1. Θάλαμος νηματικής ροής
2. Μηχανικές πιπέτες

2.3.3 Τοκοφερόλη (Βιταμίνη E)

Το πρότυπο διάλυμα α -Τοκοφερόλης έγινε με διάλυση της σε καθαρή αιθανόλη 99% σε συγκέντρωση 900mM. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις του πρότυπου διαλύματος σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των κυττάρων DMEM, καθαρή αιθανόλη και ενδεχομένως ωχρατοξίνη A, ανάλογα με τον χειρισμό. Οι τελικές αραιώσεις α -Τοκοφερόλης που έγιναν με βάση το πρότυπο διάλυμα ήταν οι ακόλουθες: 200μM, 500μM, 750μM, 1mM.

2.3.4 Ασκορβικό Οξύ (Βιταμίνη C)

Το πρότυπο διάλυμα ασκορβικού οξέος έγινε με διάλυση της σε δις απεσταγμένο νερό σε συγκέντρωση 1M. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις του πρότυπου διαλύματος σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των κυττάρων DMEM και ενδεχομένως ωχρατοξίνη A, ανάλογα με τον χειρισμό. Οι τελικές αραιώσεις ασκορβικού οξέως που έγιναν με βάση το πρότυπο διάλυμα ήταν οι ακόλουθες: 1mM, 2mM.

2.3.5 Γλουταθειόνη (GSH)

Το πρότυπο διάλυμα γλουταθειόνης έγινε με διάλυση της σε δις απεσταγμένο νερό σε συγκέντρωση 500mM. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις του πρότυπου διαλύματος σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των κυττάρων DMEM και ενδεχομένως ωχρατοξίνη A, ανάλογα με τον χειρισμό. Οι τελικές αραιώσεις γλουταθειόνης που έγιναν με βάση το πρότυπο διάλυμα ήταν οι ακόλουθες: 1mM, 2,5mM.

2.3.6 Φαινολικό Εκχύλισμα Μούρων και Φράουλας

2.3.6.1 Φυτικό υλικό Μούρων

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε ένας τυχαίος γονότυπος μουριάς που παράγει λευκούς καρπούς 'AUAL', καθώς και ένας τυχαίος γονότυπος μουριάς που

παράγει καρπούς μαύρου χρώματος 'ANS8' και η γνωστή ποικιλία 'Fengchisang'. Όλα τα δένδρα ήταν της ίδια ηλικίας, 3 ετών που πολλαπλασιάστηκαν και καλλιεργούνται στον πειραματικό αγρό που διαθέτει το εργαστήριο Δενδροκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ). Κατά την διάρκεια του πειράματος δεν υπήρξαν επεμβάσεις με διάφορα σκευάσματα.

2.3.6.2 Δειγματοληψία Μούρων

Πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες καρπών όπου συγκομίζονταν μούρα τα οποία βρίσκονταν πάνω στο δένδρο και ήταν ώριμα. Κριτήριο συγκομιδής των καρπών ήταν η συνεκτικότητα και το χρώμα αυτών. Τα δείγματα αμέσως μετά τη συλλογή τους τοποθετήθηκαν μέσα σε πλαστικά σακουλάκια με κατάλληλη σήμανση αναλόγως του γονοτύπου ή της ποικιλίας και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο μέσα σε πλαστικό φορητό ψυγείο με παγοκύστες. Στο εργαστήριο τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη σε θερμοκρασία μικρότερη των $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως ότου να πραγματοποιηθούν οι βιοχημικές αναλύσεις προσδιορισμού των ολικών φαινολικών ενώσεων και της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

2.3.6.3 Φυτικό υλικό Φράουλας

Το πείραμα διεξήχθη μέσα σε θερμοκηπιακή εγκατάσταση που βρίσκεται στον πειραματικό αγρό που διαθέτει το εργαστήριο Δενδροκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ). Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα φυτά φράουλας της ποικιλίας 'B12', ίδιου μεγέθους και σταδίου ανάπτυξης τα οποία φυτεύτηκαν σε γλάστρες χωρητικότητας 5 L. Το εδαφικό μείγμα που χρησιμοποιήθηκε για τη φύτευση των φυτών αποτελούνταν από καστανή τύρφη $\text{pH} = 5.5-6.3$ και χώμα εκσκαφής, σε αναλογία 2:1.

Παράλληλα εφαρμόστηκαν όλες οι φροντίδες που απαιτεί η καλλιέργεια της φράουλας σύμφωνα με τις προδιαγραφές της συμβατικής καλλιεργητικής τεχνικής, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται φυτοϋγεία, καλή θρέψη και ανάπτυξη των φυτών. Στο πείραμα είχαμε 4 επαναλήψεις με 20 φυτά ανά επανάληψη, χρησιμοποιήθηκαν δηλαδή συνολικά 80 φυτά φράουλας.

2.3.6.4 Δειγματοληψία Φράουλας

Έγιναν τρεις δειγματοληψίες καρπών όπου κάθε μία διαρκούσε ένα μήνα με στόχο να μετρηθούν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των καρπών. Κατά τη δειγματοληψία λαμβάνονταν όλοι οι πλήρως ώριμοι καρποί ανά φυτό (ανάπτυξη έντονου κόκκινου χρώματος σε ολόκληρη την επιφάνεια του καρπού). Τα δείγματα αμέσως μετά τη συλλογή τους τοποθετήθηκαν μέσα σε πλαστικά σακουλάκια με κατάλληλη σήμανση και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο μέσα σε πλαστικό φορητό ψυγείο με παγοκύστες. Στο εργαστήριο τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αριθμημένα πλαστικά σακουλάκια και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη σε θερμοκρασία μικρότερη

των -25 °C έως ότου να πραγματοποιηθούν οι διάφορες βιοχημικές αναλύσεις.

2.3.6.5 Προετοιμασία δειγμάτων Μούρων και Φράουλας για αναλύσεις

Για να πραγματοποιηθούν οι διάφορες βιοχημικές αναλύσεις όλοι οι κατεψυγμένοι καρποί που είχαν συλλεχθεί κατά το χρονικό διάστημα των τριών δειγματοληψιών πολτοποιήθηκαν με τη χρήση οικιακού πολτοποιητή. Το μείγμα που προέκυψε τοποθετήθηκε σε ειδικά πλαστικά σωληνάκια (falcon) όγκου 50 mL και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη σε θερμοκρασία μικρότερη των -25 °C.

2.3.6.6 Εκχύλιση φαινολικών ουσιών από τους φυτικούς ιστούς Μούρων και Φράουλας

Για την εκχύλιση των φαινολικών ουσιών ζυγίστηκαν 7 g κατεψυγμένου δείγματος και εκχυλίστηκαν δύο φορές με 7,5 mL 75% v/v αιθανόλης σε νερό. Από το εκχύλισμα των 15 mL μέρος χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών ενώσεων και της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

2.3.6.7 Μέθοδος προσδιορισμού ολικών φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων έγινε με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (BDH) σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Roussos και Pontikis (2001). Η απορρόφηση μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο (Helios γ, Unicam, UK) σε μήκος κύματος 760 nm. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στο δείγμα έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης γαλλικού οξέος και εκφράστηκαν σε mg ισοδύναμου γαλλικού οξέος ανά g φρέσκου βάρους.

2.3.6.8 Μέθοδος προσδιορισμού ολικών ο-διφαινολών στο εκχύλισμα

Ο προσδιορισμός των ολικών ο-διφαινολών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Roussos και Pontikis [196]. Η απορρόφηση μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 370 nm. Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης καφεϊκού οξέος και εκφράστηκαν σε mg ισοδύναμου καφεϊκού οξέος ανά g φρέσκου βάρους.

2.3.6.9 Μέθοδος προσδιορισμού ολικών φλαβονοειδών στο εκχύλισμα

Ο προσδιορισμός των ολικών φλαβονοειδών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Roussos et al. [197]. Η απορρόφηση μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 510 nm. Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης κατεχίνης και εκφράστηκαν σε mg ισοδύναμου κατεχίνης ανά g φρέσκου βάρους.

2.3.6.10 Μέθοδος προσδιορισμού ολικών φλαβονοειδών στο εκχύλισμα

Ο προσδιορισμός των ολικών φλαβονοειδών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Roussos et al. [197]. Η απορρόφηση μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 640 nm. Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης κατεχίνης και εκφράστηκαν σε mg ισοδύναμου κατεχίνης ανά g φρέσκου βάρους.

2.3.6.11 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP

Η μέθοδος FRAP στηρίζεται στη μείωση του θετικού φορτίου του τρισθενούς σιδήρου στο σύμπλοκο Fe^{3+} -TPTZ [2,4,6-τρι-(2-πυριδύλ)-s-τριαζίνη] κατά την παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού σε όξινο μέσο και στο σχηματισμό του συμπλόκου Fe^{2+} -TPTZ, το οποίο έχει χρώμα μπλε. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Roussos et al. [197]. Η απορρόφηση μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο (Helios γ, Unicam, UK) σε μήκος κύματος 593 nm.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν για κάθε επανάληψη και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε μολ ισοδύναμων Trolox ανά γραμμάριο φρέσκου βάρους (μολ TE g⁻¹ φρέσκου βάρους). Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης Trolox.

2.3.6.12 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH

Η μέθοδος DPPH βασίζεται στη μείωση της απορρόφησης της DPPH (2,2-διφαινύλ-1-πυκνιδραζύλ) όταν έρθει σε επαφή με αντιοξειδωτικές ουσίες. Η μείωση της απορρόφησης του διαλύματος DPPH υποδηλώνει τη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας από τα αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στα υπό μελέτη φυτικά εκχυλίσματα. Η μείωση της απορρόφησης μετρήθηκε στα 517 nm με χρήση φασματοφωτόμετρου (Helios γ, Unicam, UK), σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Roussos et al. (197).

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν για κάθε επανάληψη και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε μολ ισοδύναμων Trolox ανά γραμμάριο φρέσκου βάρους (μολ TE g⁻¹ φρέσκου βάρους). Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης Trolox.

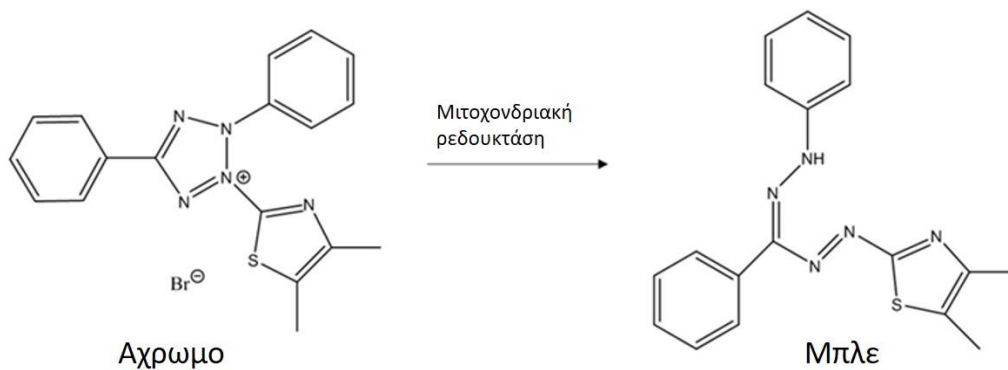
2.3.6.13 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το στατιστικό πακέτο JMP 7 για τα Windows. Η ανάλυση που ακολουθήθηκε ήταν ανάλυση διασποράς με παράγοντες το γονότυπο ή την ποικιλία. Οι σημαντικές διαφορές βρέθηκαν χρησιμοποιώντας το τυπικό σφάλμα της

ανάλυσης διασποράς σύμφωνα με τη δοκιμασία του Tukey's HSD, σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και περιγράφονται αναλυτικά σε πίνακες.

2.4 Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων

Η δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT είναι μια μέθοδος μέτρησης της βιωσιμότητας των κυττάρων και χρησιμοποιείται είτε για έλεγχο του πολλαπλασιασμού είτε για δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας. Το MTT είναι ένα υδατοδιαλυτό άλας τετραζολίου κίτρινου χρώματος που οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και δίνει αδιάλυτους πορφυρού χρώματος κρυστάλλους φορμαζίνης, οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου [198]. Η αναγωγή γίνεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ σε μικρότερο βαθμό στα μιτοχόνδρια και στην κυτταρική μεμβράνη. Ένζυμα και συστατικά του κυττάρου που συμμετέχουν στην αναγωγή είναι τα NADH, NADPH, μιτοχονδριακή ρεδοκτάση του σουκινικού και το κυτόχρωμα C. Το προϊόν της αναγωγής είναι υδρόφοβοι κρύσταλλοι ιώδους χρώματος που διαλυτοποιούνται με οργανικούς διαλύτες (π.χ. ισοπροπανόλη, DMSO, 10% SDS, Nonident P-40, Triton X-100). Η απορρόφηση κανονικά μετρείται σε μήκος κύματος 570-590 nm. Συστήνεται η μέτρηση να γίνεται στα 650nm ή και περισσότερο [199].



Εικόνα 2.1 Η αντίδραση που πραγματοποιείται στο εσωτερικό των κυττάρων κατά τη παρουσία του δείκτη βιωσιμότητας κυττάρων 3-(4,5-διμεθυλοθιαζολ-2-υλ)-2,5-βρωμίδιο του διφαινουλοτετραζολίου (MTT) [200].

2.4.1 Υλικά και Αντιδραστήρια

1. Χρωστική MTT (3-(4,5-διμεθυλοθιαζολ-2-υλ)-2,5-βρωμίδιο του διφαινουλοτετραζολίου) (Sigma).
2. Υλικά για θρεπτικό μέσο ανάπτυξης κυττάρων HEK 293
3. Υλικά για θρεπτικό μέσο ανάπτυξης κυττάρων HEK 293 χωρίς ορό εμβρύου μόσχου (FBS)
4. Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).
5. Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

2.4.2 Εξοπλισμός

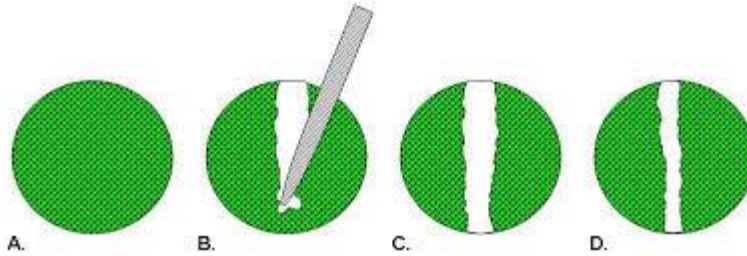
1. Πλακίδια μικροπιλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (96 βοθρίων) (COSTAR).
2. Φωτόμετρο (PowerWave 340).
3. Μηχανικές πιπέτες.
4. Θάλαμος καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών (HEAL FORCE HF90).
5. Θάλαμος νηματικής ροής

2.4.3 Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων HEK 293 με εφαρμογή της μεθόδου εκτίμησης της πρόσληψης της χρωστικής MTT

Σε διάφανο πλακίδιο 96 βοθρίων για κυτταροκαλλιέργεια τοποθετούμε σε κάθε βοθρίο διάλυμα κυττάρων HEK 293 σε θρεπτικό υλικό ανάπτυξης κυττάρων, σε τελική συγκέντρωση 8×10^3 κύτταρα ανά βοθρίο (για 24ωρη επώαση) και 6×10^3 κύτταρα ανά βοθρίο (για 48ωρη επώαση). Το πλακίδιο τοποθετείται στον θάλαμο ανάπτυξης για 24h. Διάλυμα ωχρατοξίνης A, αντιοξειδωτικών ουσιών και συνδυασμός τους σε θρεπτικό υλικό ανάπτυξης κυττάρων HEK 293 χωρίς ορό εμβρύου μόσχου (FBS) προστίθενται στα βοθρία με κύτταρα HEK 293. Το MTT (Sigma) με συγκέντρωση 5 mg/mL σε διάλυμα PBS αναμιγνύεται με το πλήρες θρεπτικό υλικό των κυττάρων σε αναλογία 1:10. Τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο για 2 ώρες. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό με το MTT και προστίθεται DMSO. Σκεπάζονται τα κύτταρα με αλουμινόχαρτο και επωάζονται για δεκαπέντε λεπτά της ώρας υπό ανάδευση. Η μέτρηση έγινε σε φωτόμετρο πλάκας PowerWave 340 σε μήκος κύματος 560nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως οι Μ.Ο. \pm τυπικές αποκλίσεις (SD) 5 διαφορετικών μετρήσεων.

2.5 Δοκιμή επούλωσης πληγής

Η δοκιμή επούλωσης πληγής είναι απλή, φθηνή και μία από τις πρώτες αναπτυσσόμενες μεθόδους για τη μελέτη της κατευθυνόμενης κυτταρικής μετανάστευσης *in vitro*. Αυτή η μέθοδος μιμείται τη μετανάστευση των κυττάρων κατά τη διάρκεια της επούλωσης τραύματος *in vivo*. Τα βασικά βήματα περιλαμβάνουν τη δημιουργία μιας «πληγής» σε μια κυτταρική μονοστοιβάδα, τη λήψη των εικόνων στην αρχή και σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης των κυττάρων μέχρι να κλείσει το τραύμα και τη σύγκριση των εικόνων για να ποσοτικοποιηθεί ο ρυθμός μετανάστευσης των κυττάρων [201].



Εικόνα 2.2 Προσομοίωση διαδικασίας δημιουργίας «πληγής» με τη χρήση ρύγχους πιπέτας σε βοθρίο κυτταροκαλλιέργειας [202].

2.5.1 Υλικά και Αντιδραστήρια

1. Υλικά για θρεπτικό μέσο ανάπτυξης κυττάρων HEK 293
2. Υλικά για θρεπτικό μέσο ανάπτυξης κυττάρων HEK 293 χωρίς ορό εμβρύου μόσχου (FBS)
3. Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).
4. Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

2.5.2 Εξοπλισμός

1. Θάλαμος νηματικής ροής
2. Μηχανικές πιπέτες
3. Πλακίδια μικροπιλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (24 βοθρίων)
4. Φωτόμετρο φθορισμού Tecan Infinite M220 Pro
5. Θάλαμος καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών (HEAL FORCE HF90).

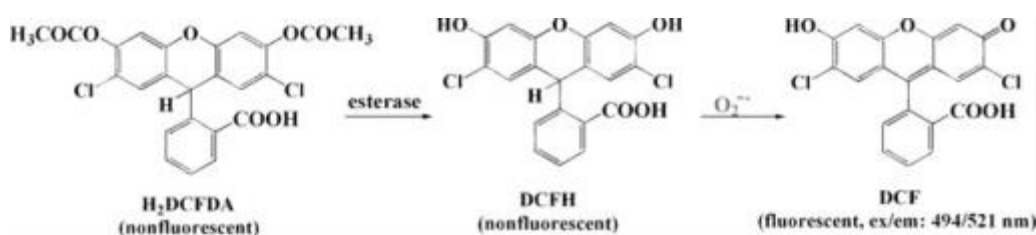
2.5.3 Διαδικασία δοκιμής επούλωσης πληγής

Σε διάφανο πλακίδιο 24 βοθρίων για κυτταροκαλλιέργεια τοποθετούμε σε κάθε βοθρίο διάλυμα κυττάρων HEK 293 σε θρεπτικό υλικό ανάπτυξης κυττάρων, σε τελική συγκέντρωση 5×10^4 κύτταρα ανά βοθρίο. Το πλακίδιο τοποθετείται στον θάλαμο ανάπτυξης για 24h. Διάλυμα ωχρατοξίνης A, αντιοξειδωτικών ουσιών και συνδυασμός τους σε θρεπτικό υλικό ανάπτυξης κυττάρων HEK 293 και DMSO προστέθηκαν στα βοθρία με κύτταρα HEK 293. Η συγκέντρωση ωχρατοξίνης που χρησιμοποιήθηκε είναι 5μM, ενώ οι συγκεντρώσεις α-Τοκοφερόλης 250μM, 500μM, 750μM, 1mM. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη διαλύματος συνδυασμού της συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A με κάθε μια από τις συγκεντρώσεις τοκοφερόλης καθώς και τρίωρη επώαση με κάθε μια από τις συγκεντρώσεις α-Τοκοφερόλης και στη συνέχεια προσθήκης διαλύματος ωχρατοξίνης A. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ρύγχος πιπέτας 200 μl για τη δημιουργία κατακόρυφης πληγής προς τα κάτω μέσα από την κυτταρική μονοστιβάδα σε κάθε βοθρίο. Λήφθηκε μία αρχική εικόνα κάθε βοθρίου σε ανάστροφο μικροσκόπιο και το πλακίδιο τοποθετήθηκε σε θάλαμο ανάπτυξης στους 37°C. Στις επόμενες 0h, 18h, 24h, 42h, 48h, 66h, 72h, 96h τραβήχτηκαν στιγμιότυπα σε ανάστροφο μικροσκόπιο για να ελεγχθεί το κλείσιμο του τραύματος σε κάθε βοθρίο.

2.6 Προσδιορισμός Ενεργών Μορφών Οξυγόνου (ROS)

Μια από τις γρηγορότερες, ευκολότερες, φιλικές προς το χρήστη και προσβάσιμες μεθόδους για τον προσδιορισμό ROS βασίζεται στην ανίχνευση φθορίζοντων μορίων ευαίσθητων στα ROS με τη χρήση ενός φωτομέτρου φθορισμού μικροπλακιδίων. Υπάρχουν αρκετές αναλυτικές προσεγγίσεις που βασίζονται στον φθορισμό και χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό διαφορετικών ROS.

Η μη φθορίζουσα βαφή (H_2DCFDA) είναι μια χημικώς ανηγμένη μορφή φθορεσκεΐνης, διαπερατή από τα κύτταρα. Οι ενδοκυτταρικές εστεράσες διασπούν το τμήμα διοξεικού (DA) που καθιστά το μόριο (H_2DCF) ευαίσθητο στην οξειδωση με ROS. Το H_2DCFDA διαπερνά ελεύθερα τη μεμβράνη του πλάσματος και υδρολύεται στο κυτταρόπλασμα σχηματίζοντας το καρβοξυλικό ανιόν DCFH [203]. Η οξειδωση οδηγεί στο σχηματισμό του φθορίζοντος DCF, το οποίο εμφανίζει μέγιστη διέγερση στα 495 nm και εκπέμπει στα 520 nm [204]. Η οξειδωση του H_2DCF σε DCF είναι μια διαδικασία δύο σταδίων: πρώτον, σχηματίζεται η DCF ρίζα, και μετά οξειδώνεται περαιτέρω σε DCF σε μια αντίδραση με μοριακό οξυγόνο [205]. Στην οξειδωμένη μορφή της, η διχλωροφθορεσκεΐνη (DCF) είναι εξαιρετικά φθορίζουσα και εύκολα ανιχνεύσιμη, π.χ. χρησιμοποιώντας έναν φωτόμετρο φθορισμού. Το H_2O_2 δεν αντιδρά άμεσα με H_2DCF , αλλά απαιτεί την παρουσία υπεροξειδάσεων ή άλλων μεταβολών που περιέχουν μεταβατικά μέταλλα (transition metals). Επιπλέον, μια αλλαγή του σήματος μπορεί να προκληθεί από αντιοξειδωτικά ένζυμα ή υπεροξειδίου που ανταγωνίζεται με τον ανιχνευτή για το ROS [206]. Η ρίζα υπεροξειδίου σχηματίζεται στο δεύτερο βήμα της οξειδωσης του ανιχνευτή και μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί σε υπεροξειδίου του υδρογόνου προκαλώντας αυτοενίσχυση του σήματος [207].



Εικόνα 2.3 Η αντίδραση που πραγματοποιείται στο εσωτερικό των κυττάρων κατά τη παρουσία μη φθορίζουσα βαφή (H_2DCFDA) [208].

2.6.1 Υλικά και Αντιδραστήρια

5. H_2DCFDA (molecular probes)
6. Υλικά για θρεπτικό μέσο ανάπτυξης κυττάρων HEK 293
7. Υλικά για θρεπτικό μέσο ανάπτυξης κυττάρων HEK 293 χωρίς ορό εμβρύου μόσχου (FBS)
8. Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).
9. Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

2.6.2 Εξοπλισμός

6. Θάλαμος νηματικής ροής
7. Μηχανικές πιπέτες
8. Πλακίδια μικροπιλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (96 βοθρίων) μαύρου χρώματος με διαφανή πυθμένα (ibidi)
9. Φωτόμετρο φθορισμού Tecan Infinite M220 Pro
10. Θάλαμος καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών (HEAL FORCE HF90).

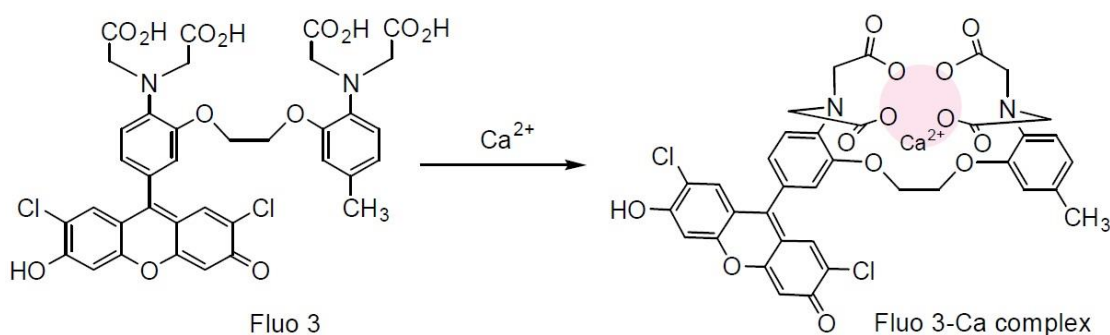
2.6.3 Προσδιορισμός Ενεργών Μορφών Οξυγόνου (ROS) με τη χρήση της χρωστικής H₂DCFDA

Κύτταρα HEK 293 τοποθετήθηκαν σε πλακίδια μικροπιλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (96 βοθρίων) μαύρου χρώματος με διαφανή πυθμένα (ibidi), σε πυκνότητα 10×10^3 ανά βοθρίο (για 24ωρη επώαση) και 8×10^3 (για 48ωρη επώαση) σε θάλαμο στους 37°C με 5% CO₂ ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα στο πιάτο καλλιέργειας. Ο χειρισμός περιελάμβανε προσθήκη ωχρατοξίνης A (OTA) σε συγκέντρωση 1 μM, α-Τοκοφερόλη σε συγκέντρωση 750 μM και αιθανολικό εκχύλισμα φράουλας 8.4 mg/mL. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη διαλύματος συνδυασμού της ωχρατοξίνης A με τη α-Τοκοφερόλη και με το φαινολικό εκχύλισμα φράουλας ξεχωριστά και ακολούθησε επώαση για 24h και 48h. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε και χειρισμός στον οποίον προηγείται τρίωρη επώαση με κάθε μια από τις συγκεντρώσεις α-Τοκοφερόλης και εκχυλίσματος φράουλας και στη συνέχεια προσθήκη διαλύματος ωχρατοξίνης A και ακολούθησε επώαση για 24h και 48h. Το στοκ διάλυμα 10mM του H₂DCFDA (Molecular Probes) παρασκευάστηκε με DMSO. Το διάλυμα στοκ της χρωστικής διαλύθηκε στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων σε τελική συγκέντρωση 1 μM, ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στον θάλαμο ανάπτυξης κυττάρων και πραγματοποιήθηκε η μέτρηση στο φωτόμετρο. Ο φθορισμός της χρωστικής H₂DCFDA μετρήθηκε σε φωτόμετρο φθορισμού Tecan Infinite M220 Pro αμέσως μετά την επώαση. Τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής ήταν 485 nm και 520 nm αντίστοιχα. Για κάθε διαφορετικό χειρισμό πραγματοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε σχετικές μονάδες φθορισμού ± τυπικές αποκλίσεις (SE).

2.7 Προσδιορισμός συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου γίνεται με την χρωστική Fluo-3. Το Fluo-3 είναι δείκτης φθορισμού ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Ca²⁺). Χρησιμοποιείται για τη μέτρηση Ca²⁺ σε ζωντανά κύτταρα μέσω συνεστιακού μικροσκοπίου χρησιμοποιώντας διέγερση ορατού φωτός (συμβατή με πηγές λέιζερ αργού που λειτουργούν στα 488 nm). Το Fluo-3 είναι ουσιαστικά μη φθορίζουσα ένωση, αλλά κατά τη σύνδεση του Ca²⁺ ο φθορισμός αυξάνεται απότομα με ένα μέγιστο εκπομπής στα 525 nm κατάλληλο για συμβατικά χρησιμοποιούμενους

ανιχνευτές σχεδιασμένους για μετρήσεις ισοθειοκυανικής φθορεσκεΐνης (FITC). Αυτή η μεγάλη αλλαγή στον φθορισμό σε συνδυασμό με μια καλή απόδοση φωτονίων παρέχει πολύ μεγάλη αντίθεση που επιτρέπει την ανίχνευση μικροσκοπικών γεγονότων απελευθέρωσης Ca^{2+} μέσα στα κύτταρα που ονομάζονται "σπινθήρες ασβεστίου" [209]. Ενώ τα άλατα του Fluo-3 είναι ανίκανα να διεισδύσουν στα κύτταρα, η φόρτωση μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας τον παράγωγο ακετυλομεθυλεστέρα (AM). Όταν οι ουσίες αυτές εισέλθουν στον ενδοκυτταρικό χώρο υδρολύονται από διάφορες μη εξειδικευμένες εστεράσες που υπάρχουν στο εσωτερικό του κυττάρου, παγιδεύοντας αποτελεσματικά το Fluo-3 [210]. Μετά την υδρόλυση του ακετυλομεθυλεστέρα αποδεσμεύεται η χρωστική και αποκτά ικανότητα φθορισμού (ενεργό μόριο), έτοιμη να ενωθεί με το ιόν-στόχο που θέλουμε να εντοπίσουμε μέσα στο κύτταρο. Η χρωστική αυτή μετά από κατάλληλη διέγερση φθορίζει στα σημεία όπου υπάρχει το ιόν στόχος (Ca^{2+}).



Εικόνα 2.4 Η αντίδραση που πραγματοποιείται στο εσωτερικό των κυττάρων κατά τη παρουσία του φθορισμομετρικός δείκτης ασβεστίου Fluo-3 [211]

2.7.1 Υλικά και Αντιδραστήρια

10. Fluo-3 (Invitrogen)
11. Υλικά για θρεπτικό μέσο ανάπτυξης κυττάρων HEK 293
12. Υλικά για θρεπτικό μέσο ανάπτυξης κυττάρων HEK 293 χωρίς ορό εμβρύου μόσχου (FBS)
13. Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).
14. Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

2.7.2 Εξοπλισμός

11. Θάλαμος νηματικής ροής
12. Μηχανικές πιπέτες
13. Πλακίδια μικροτιλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (96 βοθρίων) μαύρου χρώματος με διαφανή πυθμένα (ibidi)
14. Φωτόμετρο φθορισμού Tecan Infinite M220 Pro
15. Θάλαμος καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών (HEAL FORCE HF90).

2.7.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου με τον φθορισμομετρικό δείκτη ασβεστίου Fluo-3 σε κύτταρα HEK 293

Κύτταρα HEK 293 τοποθετήθηκαν σε πλακίδια μικροπιλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (96 βοθρίων) μαύρου χρώματος με διαφανή πυθμένα (ibidi), σε πυκνότητα 10×10^3 ανά βοθρίο (για 24ωρη επώαση) και 8×10^3 (για 48ωρη επώαση) σε θάλαμο στους 37°C με 5% CO_2 ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα στον πυθμένα του πλακιδίου καλλιέργειας. Ο χειρισμός περιελάμβανε προσθήκη ωχρατοξίνης A (OTA) σε συγκέντρωση $1 \mu\text{M}$, τοκοφερόλη σε συγκέντρωση $750 \mu\text{M}$ και φαινολικό εκχύλισμα φράουλας 8.4 mg/mL . Πραγματοποιήθηκε προσθήκη διαλύματος συνδυασμού της ωχρατοξίνης A με τη α -Τοκοφερόλη και το φαινολικό εκχύλισμα φράουλας ξεχωριστά και ακολούθησε επώαση για 24h και 48h. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε και χειρισμός στον οποίον προηγείται τρίωρη επώαση με κάθε μια από τις συγκεντρώσεις α -Τοκοφερόλης και εκχυλίσματος φράουλας και στη συνέχεια προσθήκη διαλύματος ωχρατοξίνης A και ακολούθησε επώαση για 24h και 48h. Το στοκ διάλυμα 1 mM του Fluo-3 (Invitrogen) παρασκευάστηκε με DMSO. Το διάλυμα στοκ της χρωστικής διαλύθηκε στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων σε τελική συγκέντρωση $4 \mu\text{M}$, ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στον θάλαμο ανάπτυξης κυττάρων και πραγματοποιήθηκε η μέτρηση στο φωτόμετρο. Ο φθορισμός της χρωστικής Fluo-3 μετρήθηκε σε φωτόμετρο φθορισμού Tecan Infinite M220 Pro αμέσως μετά την επώαση. Τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής ήταν 506 nm και 526 nm αντίστοιχα. Για κάθε διαφορετικό χειρισμό πραγματοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε σχετικές μονάδες φθορισμού \pm τυπικές αποκλίσεις (SE).

2.8 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Η στατιστική ανάλυση δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Statgraphics. Η επεξεργασία των εικόνων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος ImageJ-Figi [212]. Ο βαθμός στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων (P) προσδιορίστηκε με τη χρήση της μεθόδου t (student t test).

2.9 Μεταβολομική ανάλυση για τη μελέτη της επίδρασης ωχρατοξίνης A, α-Τοκοφερόλης ή συνδυασμών τους στο μεταβολισμό των ανθρώπινων εμβρυϊκών νεφρικών κυττάρων (HEK293)

2.9.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Για το πείραμα της μεταβολομικής στα HEK293 πραγματοποιήθηκαν τέσσερις επεμβάσεις με πέντε βιολογικές επαναλήψεις η κάθε μία. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε επανάληψη τοποθετήθηκαν περίπου $1,5 \times 10^6$ κύτταρα ανά φλάσκα (T25) και επωάστηκαν με θρεπτικό υλικό με ορό εμβρύου μόσχου 10% για 24 ώρες. Η συγκέντρωση ωχρατοξίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,5μM (EC₅₀=2,98μM) στις 24 ώρες. Η α-Τοκοφερόλη εφαρμόστηκε σε συγκέντρωση 750μM, ενώ κατά τη μελέτη συνδυασμού α-Τοκοφερόλης και ωχρατοξίνης A, προηγήθηκε τρίωρη επώαση με τη βιταμίνη και στη συνέχεια εισαγωγή της μυκοτοξίνης.

2.9.2 Δειγματοληψία και εκχυλίσσεις κυττάρων

Μετά την επώαση των δειγμάτων για 24 ώρες, το θρεπτικό υλικό κάθε φλάσκας μεταφέρθηκε σε σωλήνες (falcon) των 15 mL, φυγοκεντρήθηκε στις 78g για 5 λεπτά και μεταφέρθηκε 1mL από το υπερκείμενο του κάθε falcon σε νέα erpendorfs. Στη συνέχεια, οι φλάσκες με τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε ξηρό πάγο και σε κάθε φλάσκα προστέθηκαν 4mL 80% (vol/vol) μεθανόλης παγωμένης στους -80°C. Ακολούθησε επώαση των φλασκών με τα κύτταρα για 20 λεπτά στους -80°C. Η παραλαβή των κυττάρων από κάθε φλάσκα πραγματοποιήθηκε με ειδική ελαστική ξύστρα κυττάρων (cell scraper) και την προσθήκη 80% (vol/vol) μεθανόλης. Το μίγμα μεθανόλης και σπασμένων κυττάρων μεταφέρθηκε σε erpendorfs των 2mL σε ξηρό πάγο. Τα erpendorfs με τα μείγματα σπασμένων κυττάρων αφού τοποθετήθηκαν για 20 λεπτά σε λουτρό υπερήχων φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000g για 5 λεπτά στους 4-8°C, ώστε να ιζηματοποιηθούν τα κυτταρικά υπολείμματα. Το υπερκείμενο κάθε erpendorf, το οποίο περιέχει τους προς ανάλυση μεταβολίτες, μεταφέρθηκε σε νέο erpendorf των 2mL. Στα ιζήματα που έμειναν στα erpendorfs προστέθηκαν σε κάθε ένα 500μL 80% (vol/vol) μεθανόλη παγωμένη στους -80°C, ακολούθησε ανάδευση για 1 λεπτό, τοποθέτηση για 20 λεπτά σε λουτρό υπερήχων και στη συνέχεια φυγοκέντρωση στις 14.000g για 5 λεπτά στους 4-8°C. Το υπερκείμενο κάθε erpendorf, το οποίο περιέχει πιθανώς μεταβολίτες, μεταφέρθηκε σε νέα erpendorfs των 2mL. Η αποθήκευση και συντήρηση των κυττάρων έγινε στους -80°C.

Στο επόμενο στάδιο εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο των León et al. 2013 [213]. Τα εκχυλίσματα μεταβολιτών κυττάρων και μεμονομένου θρεπτικού υλικού, φιλτραρίστηκαν με φιλτράκι 0.2 μm (Macherey-Nagel, Duren, Germany) και τοποθετήθηκαν σε νέα erpendorfs.

Ακολούθησε εκχύλιση των μεταβολιτών με σύστημα διαλυτών μεθανόλης/ οξικού αιθυλεστέρα 1:1. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η εξάτμιση των δειγμάτων σε συσκευή εξάτμισης [213].

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

2.9.3 Μεταβολομική ανάλυση του ενδο- και εξω- μεταβολόματος των ανθρώπινων εμβρυϊκών νεφρικών κυττάρων (HEK293) με αέριο χρωματογράφο-φασματοόμετρο μάζας (GC/EI/MS)

Για την ανάλυση των μεταβολικών προφίλ των κυττάρων HEK 293 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). 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. Η αρχική θερμοκρασία του κλιβάνου ήταν σταθερή στους 70°C για 5min και ακολούθησε αύξηση με ρυθμό 5°C/min 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.

2.9.4 Βιοπληροφορική-μεταβολομική ανάλυση και ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης OTA, τοκοφερόλης και του μείγματος τους στο μεταβολισμό στελεχών των νεφρικών κυττάρων HEK293

Για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων στη μεταβολομική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MS DIAL [214]. 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/EI/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) [194, 215].

Η ανίχνευση πιθανών ακραίων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με Principal Component Analysis (PCA) και ακολούθησε η ανακάλυψη των βιοσημαντών της επίδρασης της ΟΤΑ, τοκοφερόλης και των μιγμάτων τους στο μεταβολισμό των κυττάρων HEK293 με εφαρμογή Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA, $P < 0.05$) [194, 215]. Επίσης, στα δεδομένα εφαρμόστηκε ιεραρχική ανάλυση σε συστάδες (Hierarchical cluster analysis, HCA) [194].

Η ανακάλυψη των βιοσημαντών πραγματοποιήθηκε 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 [216]. Τέλος σχεδιάστηκε ο μεταβολικός χάρτης (metabolic map) χρησιμοποιώντας ως διακύμανση για τους μεταβολίτες τιμή Coefficient >1 και <-1 .

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΤΕΣΜΑΤΑ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΜΟΥΡΩΝ

Οι ποικιλίες μούρων που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι Fengchisang, AUAL και ο γονότυπος ANS8. Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς φαίνεται ότι υπήρχαν στατιστικά

σημαντικές διαφορές μεταξύ των γονοτύπων μουριάς όσον αφορά τις ολικές φαινολικές ενώσεις και την αντιοξειδωτική ικανότητα των καρπών (Πίνακας 3.1 και 3.3).

Όσον αφορά τις ολικές φαινολικές ενώσεις ο γονότυπος 'ANS8' έχει στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων, ο-διφαινολών, φλαβονοειδών και φλαβανολών σε σχέση με την ποικιλία 'Fengchisang' και το γονότυπο 'AUAL' (Πίνακας 3.2). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι στο γονότυπο 'AUAL' οι συγκεντρώσεις των ολικών ο-διφαινολών και των φλαβανολών ήταν ελάχιστες, σχεδόν μηδενικές.

Πίνακας 3.1 Ανάλυση διασποράς του παραγοντικού πειράματος που αφορά στην επίδραση του γονοτύπου στη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών των καρπών μουριάς. *, $p < 0,05$ – **, $p < 0,01$ – ***, $p < 0,001$ – ρ, πιθανότητα – ns, μη στατιστικά σημαντική επίδραση.

Παράμετρος	Ολικές φαινολικές ενώσεις	Ολικές ο-διφαινόλες	Ολικά φλαβονοειδή	Ολικές φλαβανόλες
Γονότυπος	***	***	***	***

Πίνακας 3.2 Επίδραση του γονοτύπου στη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων, των ολικών ο-διφαινολών, των ολικών φλαβονοειδών και των ολικών φλαβανολών σε καρπούς μουριάς. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ ($n = 8$).

Γονότυπος	Ολικές φαινολικές ενώσεις	Ολικές ο-διφαινόλες	Ολικά φλαβονοειδή	Ολικές φλαβανόλες
mg g ⁻¹ φρέσκου βάρους				
Fengchisang	6.79 b	1.84 b	0.23 ab	0.072 b
ANS8	10.01 a	4.29 a	0.31 a	0.125 a
AUAL	2.3 c	0.001 c	0.16 c	0.001 c

Στον Πίνακα 3.4, παρατηρείται ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του γονοτύπου 'ANS8', όσον αφορά τη FRAP, παρουσιάζεται να έχει 1,5 φορές μεγαλύτερη τιμή από την ποικιλία 'Fengchisang'. Για την DPPH ο γονότυπος 'ANS8' έχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ποικιλία 'Fengchisang', με την αντιοξειδωτική ικανότητα να εμφανίζει 1,2 φορές μεγαλύτερη τιμή από την αντίστοιχη της ποικιλίας 'Fengchisang'. Αντίθετα, οι καρποί της λευκής μουριάς 'AUAL' παρουσίασαν αρκετά χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τις έγχρωμες 'ANS8' και 'Fengchisang'.

Πίνακας 3.3 Ανάλυση διασποράς του παραγοντικού πειράματος που αφορά στην επίδραση του γονοτύπου στην αντιοξειδωτική ικανότητα των καρπών μουριάς. Επεξηγήσεις: *, $p < 0,05$ – **, $p < 0,01$ – ***, $p < 0,001$ – p, πιθανότητα – ns, μη στατιστικά σημαντική επίδραση.

Παράμετρος	FRAP	DPPH
Γονότυπος	***	***

Πίνακας 3.4 Επίδραση του γονοτύπου στην αντιοξειδωτική ικανότητα των καρπών μουριάς. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ ($n = 8$).

Γονότυπος	FRAP	DPPH
	μmol TE g ⁻¹ φρέσκου βάρους	
Fengchisang	57.64 b	15.41 b
ANS8	83.46 a	17.61 a
AUAL	7.96 c	0.32 c

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΦΡΑΟΥΛΑΣ

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων για την ποικιλία 'B12' ήταν 7,32 mg g⁻¹ φρέσκου βάρους, των ο-διφαινολών 3,69 mg g⁻¹ φρέσκου βάρους, των φλαβονοειδών 1,33 mg g⁻¹ φρέσκου βάρους και των ολικών φλαβονολών 2,63 mg g⁻¹ φρέσκου βάρους (Πίνακας 3.5). Επιπλέον, παρατηρούμε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα της ποικιλίας 'B12', όσον αφορά τη FRAP είχε τιμή 32,00 μmol Trolox g⁻¹ φρέσκου βάρους και η DPPH 33,23 μmol Trolox g⁻¹ φρέσκου βάρους (Πίνακας 3.6). Τέλος βρέθηκε ότι οι ολικές ανθοκυάνες κυμάνθηκαν στα 27,32 mg pelargonidin 3-glucoside 100 g⁻¹ φρέσκου βάρους καρπού (Πίνακας 2).

Πίνακας 3.5 Συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων, ολικών ο-διφαινολών, ολικών φλαβονοειδών και ολικών φλαβονολών σε καρπούς φράουλας.

Παράμετρος	Ολικές φαινολικές ενώσεις	Ολικές ο-διφαινόλες	Ολικά φλαβονοειδή	Ολικές φλαβανόλες
	mg g ⁻¹ φρέσκου βάρους			
Ποικιλία 'B12'	7.32	3.69	1.33	2.63

Πίνακας 3.6 Αντιοξειδωτική ικανότητα και συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών σε καρπούς φράουλας.

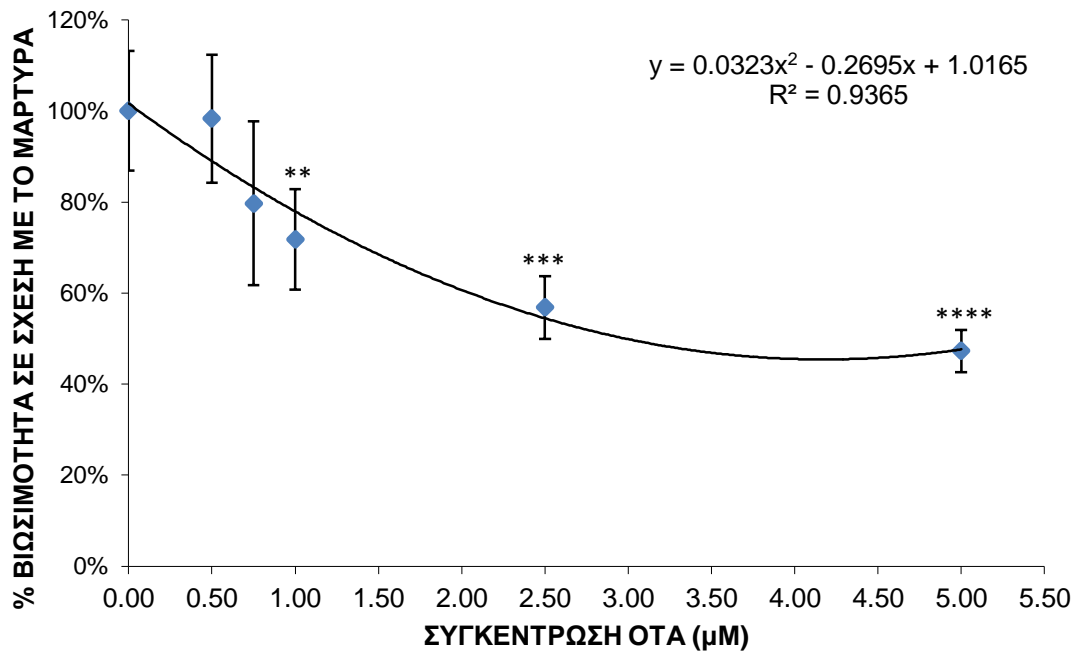
Παράμετρος	FRAP	DPPH	Ολικές Ανθοκυανές
	μmol Trolox g ⁻¹ φρέσκου βάρους	φρέσκου βάρους	mg pelargonidin 3-glucoside 100 g ⁻¹ φρέσκου βάρους
Ποικιλία ‘B12’	32.00	33.23	27.32

3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HEK 293

3.3.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ ΜΤΤ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΣΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΩΝ

Τα αποτελέσματα της δοκιμής βιωσιμότητας των κυττάρων HEK 293 μέσω πρόσληψης της χρωστικής ΜΤΤ παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3.1. και 3.2. Τα κύτταρα που επωάστηκαν με την ΟΤΑ για 24 ώρες απεικονίζονται με μπλε χρώμα (Εικόνα 3.1) και αυτά που επωάστηκαν για 48 ώρες με πορτοκαλί χρώμα (Εικόνα 3.2). Κατά την 24ωρη επώαση των κυττάρων με την ΟΤΑ παρατηρήθηκε μια πτώση της βιωσιμότητας ιδίως μεταξύ των συγκεντρώσεων 0.075 έως 5μM. Η καμπύλη βιωσιμότητας εμφανίζει πολυωνυμική εξίσωση της μορφής $y = 0.0323x^2 - 0.2695x + 1.0165$, με τυπική απόκλιση $R^2=0.9365$. Επιπλέον, η μεταβολή της βιωσιμότητας στις συγκεντρώσεις 1 (P=0.0062), 2.5 (P=0.0002), 5 (P<0.0001) μM εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα. Η μέση συγκέντρωση θανατηφόρου δόσης LC₅₀ είναι 2.98 μM.

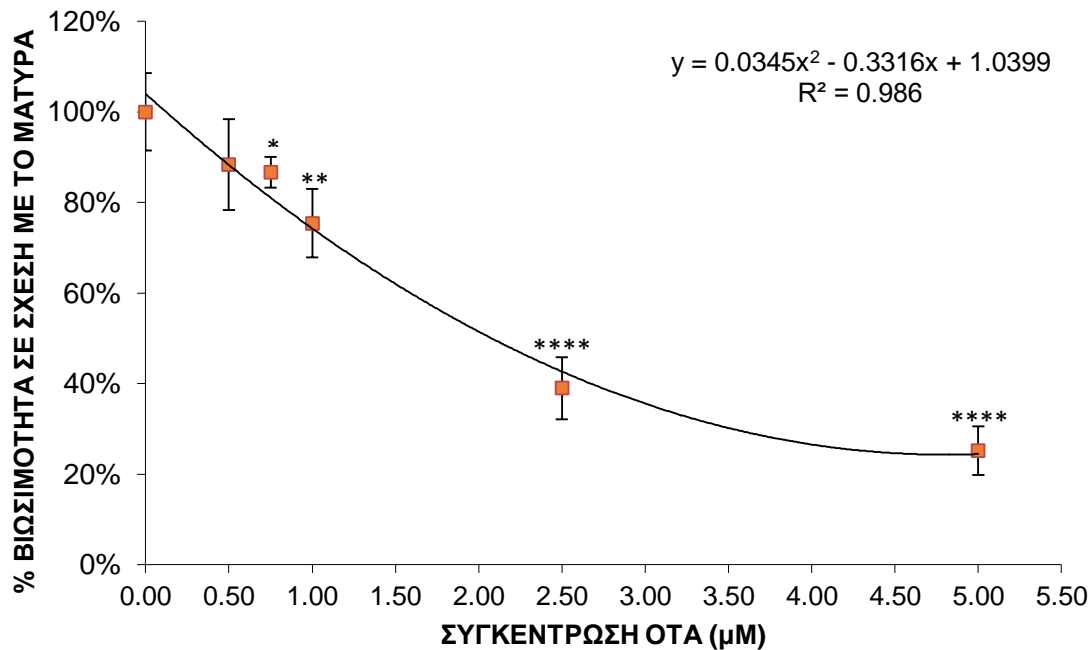
% ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ 24Η



Εικόνα 3.1 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HEK 293 σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Οι συγκεντρώσεις της ΟΤΑ που εφαρμόστηκαν στα κύτταρα για 24 ώρες ήταν οι 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5μM (μπλε ρόμβοι). Εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT με ± % σφάλμα, **0.001<p<0.01, *** 0.0001<p<0.001, ****p<0.0001.

Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε ότι κατά την 48ωρη επώαση των κυττάρων με την ΟΤΑ οι συγκεντρώσεις 0.75 (P=0.0118), 1 (P=0.0013), 2.5 (P<0.0001), 5 (P<0.0001) μM επηρέασαν σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Οι συγκεντρώσεις 2.5 και 5 μM μείωσαν τη βιωσιμότητα στο 39% και 25% σε σχέση με το μάρτυρα, αντίστοιχα. Η καμπύλη βιωσιμότητας εμφανίζει μια πολυωνυμική εξίσωση της μορφής $y=0.0345x^2-0.3316x+1.0399$, με τυπική απόκλιση $R^2=0.986$. Η μέση συγκέντρωση θανατηφόρου δόσης LC_{50} είναι 2.08 μM.

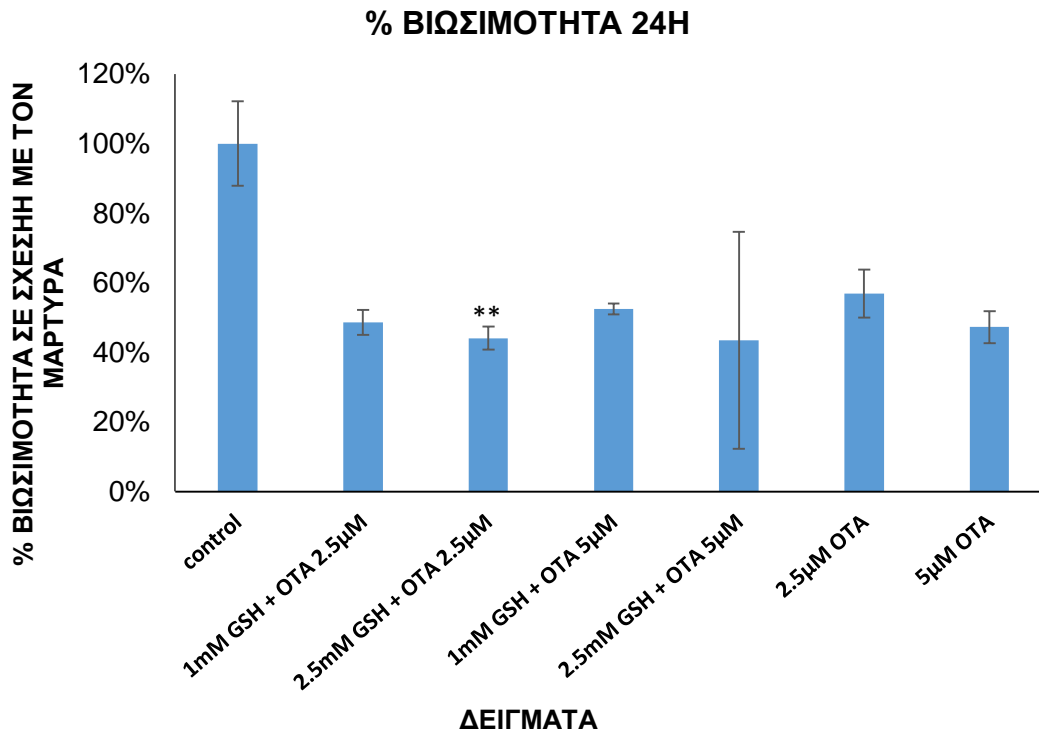
% ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ 48H



Εικόνα 3.2 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HEK 293 σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Οι συγκεντρώσεις της ΟΤΑ που εφαρμόστηκαν στα κύτταρα για 48 ώρες ήταν οι 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5μM (πορτοκαλί ρόμβοι). Εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT με ± % σφάλμα, *0.01<p<0.05, **0.001<p<0.01, *** 0.0001<p<0.001, ****p<0.0001.

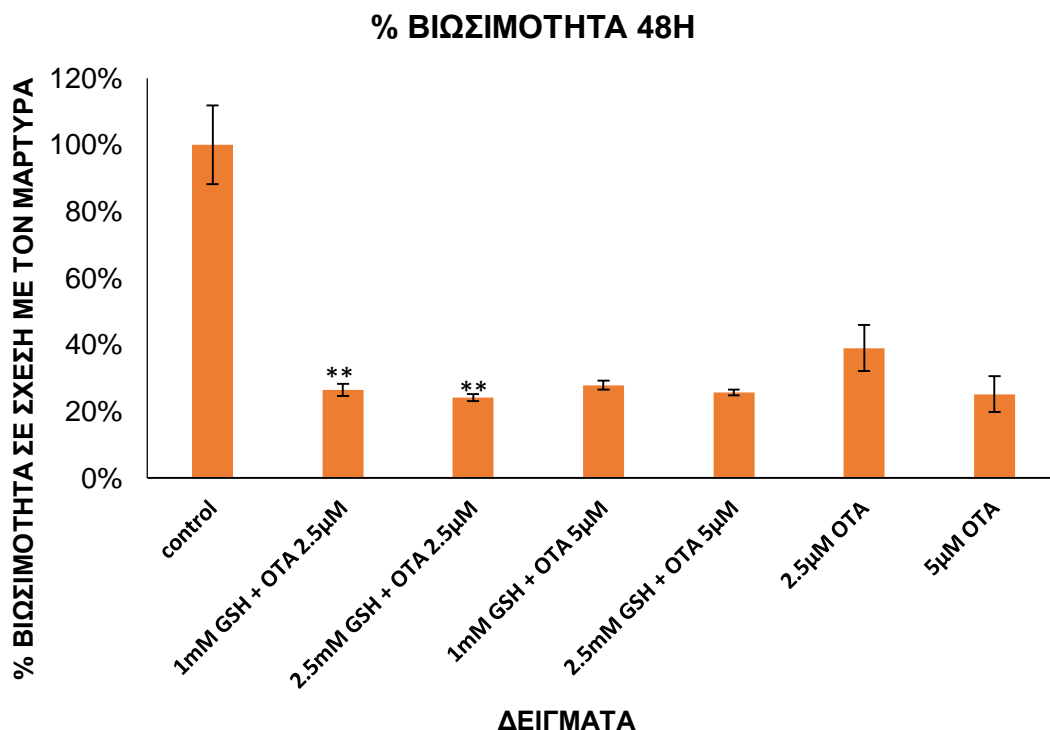
3.3.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ ΜΤΤ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΣΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΩΝ

Τα αποτελέσματα της δοκιμής βιωσιμότητας των κυττάρων HEK 293 μέσω πρόσληψης της χρωστικής MTT παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3.3 και 3.4. Τα κύτταρα που επωάστηκαν με την ΟΤΑ και τους συνδυασμούς ΟΤΑ και GSH για 24 ώρες απεικονίζονται με μπλε χρώμα (Εικόνα 3.3) και αυτά που επωάστηκαν για 48 ώρες με πορτοκαλί χρώμα (Εικόνα 3.4). Κατά την 24ωρη επώαση παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή της βιωσιμότητας των κυττάρων μόνο κατά το συνδυασμό της μεγαλύτερης συγκέντρωσης GSH και της χαμηλότερης συγκέντρωσης ΟΤΑ. Έτσι, ο συνδυασμός 2.5 mM GSH και 2.5 μM ΟΤΑ (P=0.0056) παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων σε σχέση με τη εφαρμογή 5 μM ΟΤΑ στα κύτταρα. Οι υπόλοιποι συνδυασμοί δεν έδειξαν κάποια στατικά σημαντική αύξηση ή μείωση της βιωσιμότητας σε σχέση με τις συγκεντρώσεις ΟΤΑ που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 3.3 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HEK 293 σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Οι συγκεντρώσεις της OTA που εφαρμόστηκαν στα κύτταρα για 24 ώρες ήταν οι 2.5 και 5µM και οι συνδυασμοί γλουταθειόνης (GSH) και OTA ήταν 1mM GSH και 2.5µM OTA ή 5µM OTA και 2.5mM GSH και 2.5 ή 5µM OTA (μπλε στήλες). Εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT με \pm % σφάλμα, *0.01<p<0.05, **0.001<p<0.01 (η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση OTA).

Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε ότι κατά την 48ωρη επώαση των κυττάρων με συνδυασμούς OTA και GSH, ο συνδυασμός 1 mM GSH και 2.5 µM OTA ($P=0.0043$) καθώς και ο συνδυασμός 2.5 mM GSH και 2.5 µM OTA ($P=0.0014$) επηρέασαν αρνητικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Έτσι στις 48 ώρες, όπως και στις 24 ώρες, κανένας συνδυασμός γλουταθειόνης δε βελτίωσε τη βιωσιμότητα των κυττάρων λόγω της εφαρμογής ωχρατοξίνης A στα κύτταρα.

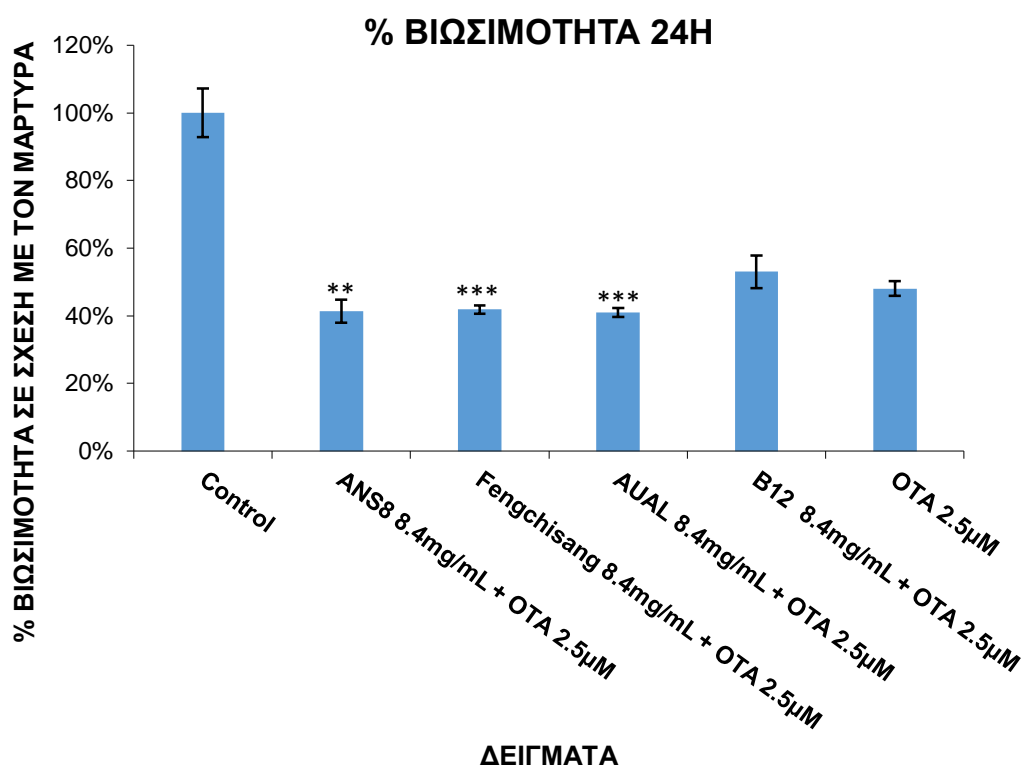


Εικόνα 3.4 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HEK 293 σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής ΜΤΤ. Οι συγκεντρώσεις της OTA που εφαρμόστηκαν στα κύτταρα για 48 ώρες ήταν οι 2,5 και 5µM και οι συνδυασμοί γλουταθειόνης (GSH) και OTA ήταν 1mM GSH και 2.5µM OTA ή 5µM OTA και 2.5 mM GSH και 2.5 ή 5µM OTA (πορτοκαλί στήλες). Εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής ΜΤΤ με \pm % σφάλμα, **0.001<p<0.01 (η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση OTA).

3.3.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ ΜΤΤ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ, ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΜΟΥΡΩΝ ΚΑΙ ΦΡΑΟΥΛΑΣ ΣΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΩΝ

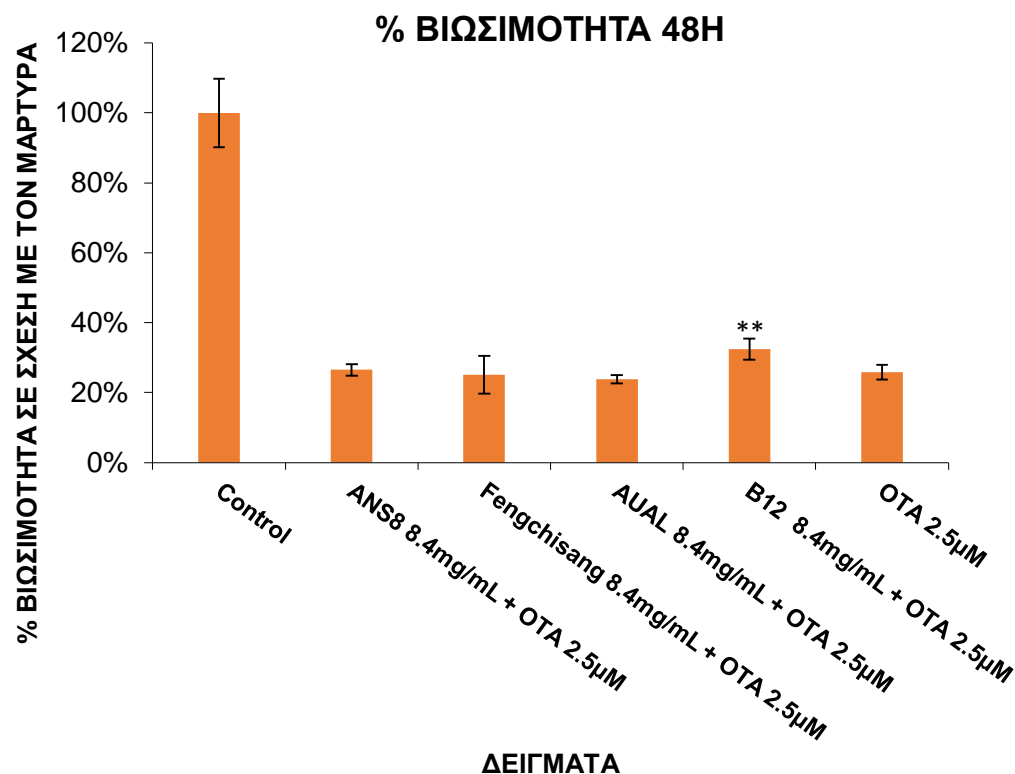
Τα αποτελέσματα της δοκιμής βιωσιμότητας των κυττάρων HEK 293 μέσω πρόσληψης της χρωστικής ΜΤΤ παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3.5 και 3.6. Τα κύτταρα που επωάστηκαν με την ΟΤΑ και τους συνδυασμούς ΟΤΑ και φαινολικών εκχυλισμάτων μούρων και φράουλας για 24 ώρες απεικονίζονται με μπλε χρώμα (Εικόνα 3.5) και αυτά που επωάστηκαν για 48 ώρες με πορτοκαλί χρώμα (Εικόνα 3.6). Κατά την 24ωρη επώαση παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά το συνδυασμό ΟΤΑ (2.5 mM) και των ποικιλιών μούρων ANS8, Fengchisang και AUAL συγκέντρωσης 8.4mg/mL. Έτσι κατά την 24ωρη επώαση, οι συνδυασμοί 8.4 mg/mL φαινολικού εκχυλίσματος από μούρα ποικιλίας ANS8 και ΟΤΑ 2.5 µM

($P=0.0002$), 8.4mg/mL φαινολικού εκχυλίσματος από μούρα ποικιλίας Fengchisang και OTA 2.5 μM ($P=0.0006$) και 8.4 mg/mL φαινολικού εκχυλίσματος από μούρα ποικιλίας AUAL και OTA 2.5 μM ($P=0.0057$) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων σε σχέση με τη εφαρμογή 2.5 μM OTA στα κύτταρα. Το φαινολικό εκχύλισμα φράουλας ποικιλίας B12 8.4 mg/mL δε φαίνεται να οδήγησε σε κάποια στατικά σημαντική αύξηση ή μείωση της βιωσιμότητας σε σχέση με τη συγκέντρωση OTA που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 3.5 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HEK 293 σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Η συγκέντρωση της OTA που εφαρμόστηκε στα κύτταρα για 24 ώρες ήταν 2.5 μM και οι συνδυασμοί αφορούν ίδιας συγκέντρωσης (8.4mg/mL) φαινολικού εκχυλίσματος ποικιλιών μούρων ANS8, Fengchisang, AUAL και φράουλας ποικιλίας B12 σε συνδυασμό με 2.5 μM OTA (μπλε στήλες). Εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT με \pm % σφάλμα, ** $0.001 < p < 0.01$, *** $0.0001 < p < 0.001$ (η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση OTA).

Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε ότι κατά την 48ωρη επώαση των κυττάρων με τους ίδιους συνδυασμούς OTA και φαινολικών εκχυλισμάτων μούρων και φράουλας μόνο ο συνδυασμός 8.4 mg/mL φαινολικού εκχυλίσματος φράουλας B12 και OTA 2.5 μM ($P=0.0040$) αύξησε στατιστικά σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά 6.6% σε σχέση με την εφαρμογή 2.5 μM OTA στα κύτταρα. Συμπερασματικά, μόνο το φαινολικό εκχύλισμα φράουλας φαίνεται να έχει κάποια αντιοξειδωτική δράση έναντι της ωχρατοξίνης A κατά την 48ωρη επώαση σε κύτταρα HEK 293.

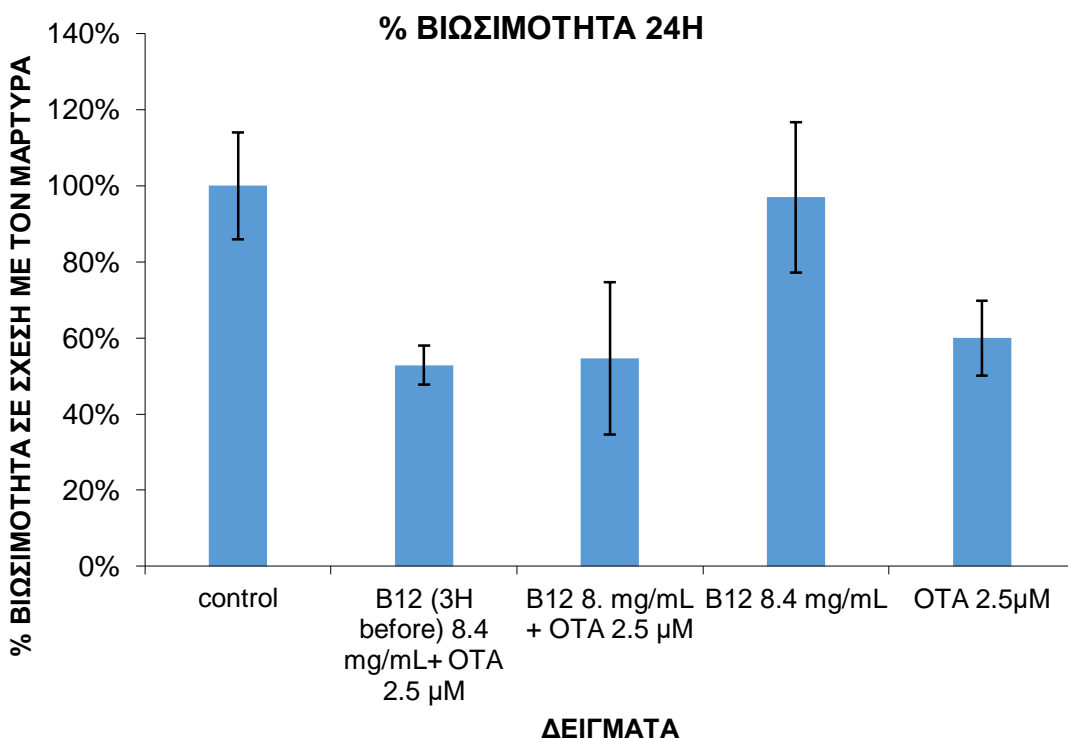


Εικόνα 3.6 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HEK 293 σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Η συγκέντρωση της OTA που εφαρμόστηκε στα κύτταρα για 48 ώρες ήταν 2.5μM και οι συνδυασμοί αφορούν ίδιας συγκέντρωσης (8.4mg/mL) φαινολικού εκχυλίσματος ποικιλιών μούρων ANS8, Fengchisang, AUJAL και φράουλας ποικιλίας B12 σε συνδυασμό με 2.5μM OTA (πορτοκαλί στήλες). Εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT με \pm % σφάλμα, $**0.001 < p < 0.01$ (η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση OTA).

3.3.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ ΜΤΤ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ ΦΡΑΟΥΛΑΣ ΣΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΩΝ

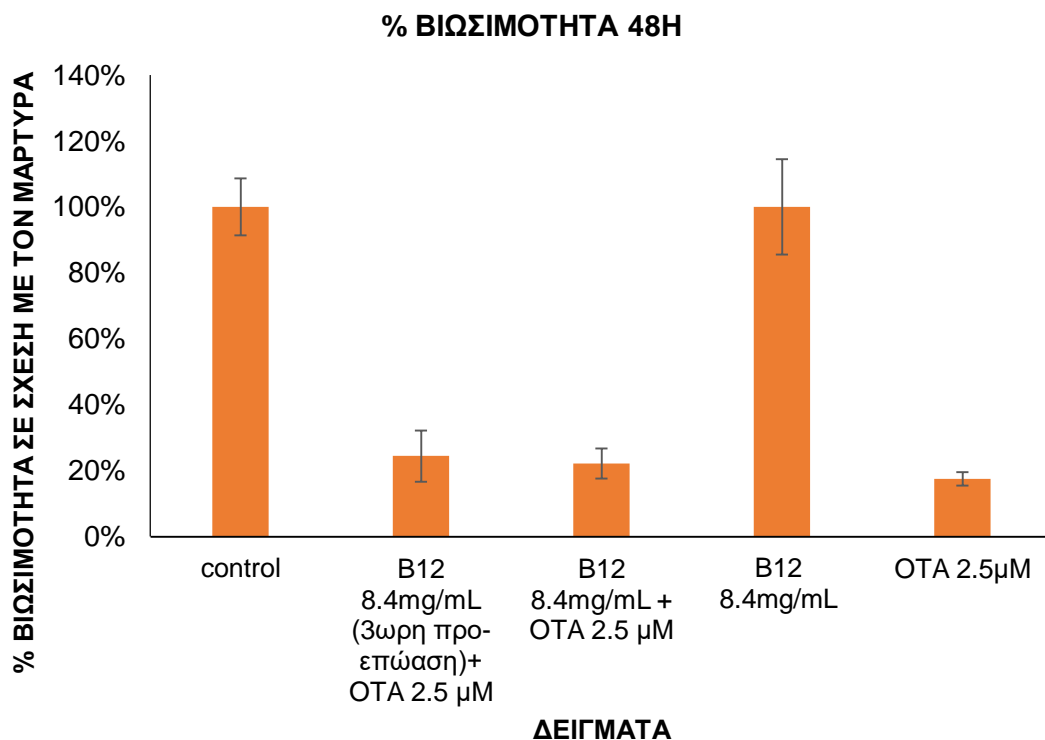
Τα αποτελέσματα της δοκιμής βιωσιμότητας των κυττάρων HEK 293 μέσω πρόσληψης της χρωστικής MTT παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3.7 και 3.8. Τα κύτταρα που επωάστηκαν με 2.5 μM OTA, φαινολικό εκχύλισμα φράουλας ποικιλίας B12 8.4 mg/mL και συνδυασμό OTA και φαινολικού εκχυλίσματος φράουλας για 24 ώρες απεικονίζονται με μπλε χρώμα (Εικόνα 3.7) και αυτά που επωάστηκαν για 48 ώρες με πορτοκαλί χρώμα (Εικόνα 3.8). Από τα αποτελέσματα τόσο της 24ωρης όσο και της 48ωρης επώασης το κυττάρων με το φαινολικό εκχύλισμα φράουλας σε συνδυασμό με την OTA δεν παρατηρήθηκε κάποια στατικά σημαντική αύξηση ή μείωση της

βιωσιμότητας σε σχέση με τη συγκέντρωση OTA που χρησιμοποιήθηκε. Επιπλέον, η τρίωρη προ-επώαση των κυττάρων με το φαινολικό εκχύλισμα φράουλας που προηγήθηκε της εφαρμογής της OTA στα κύτταρα δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντική βελτίωση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά την 24ωρη και 48ωρη επώαση.



Εικόνα 3.7 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HEK 293 σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Η συγκέντρωση της OTA που εφαρμόστηκε στα κύτταρα για 24 ώρες ήταν 2.5μM και οι συνδυασμοί αφορούν ίδιας συγκέντρωσης (8.4mg/mL) φαινολικού εκχυλίσματος φράουλας ποικιλίας B12 σε συνδυασμό με 2.5μM OTA και 3ωρη επώαση των κυττάρων με φαινολικό εκχύλισμα φράουλας (8.4mg/mL) και στη συνέχεια προσθήκη OTA 2.5μM (μπλε στήλες). Εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT με ± % σφάλμα.

Παρά το γεγονός ότι σε προηγούμενη μέτρηση της βιωσιμότητας κυττάρων HEK293 (Εικόνα 3.6) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μικρή βελτίωση της βιωσιμότητας (6.6%) λόγω της προσθήκης του φαινολικού εκχυλίσματος φράουλας σε συνδυασμό με την OTA, τελικά στα αποτελέσματα των εικόνων 3.7 και 3.8 δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική βελτίωση της βιωσιμότητας λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος.



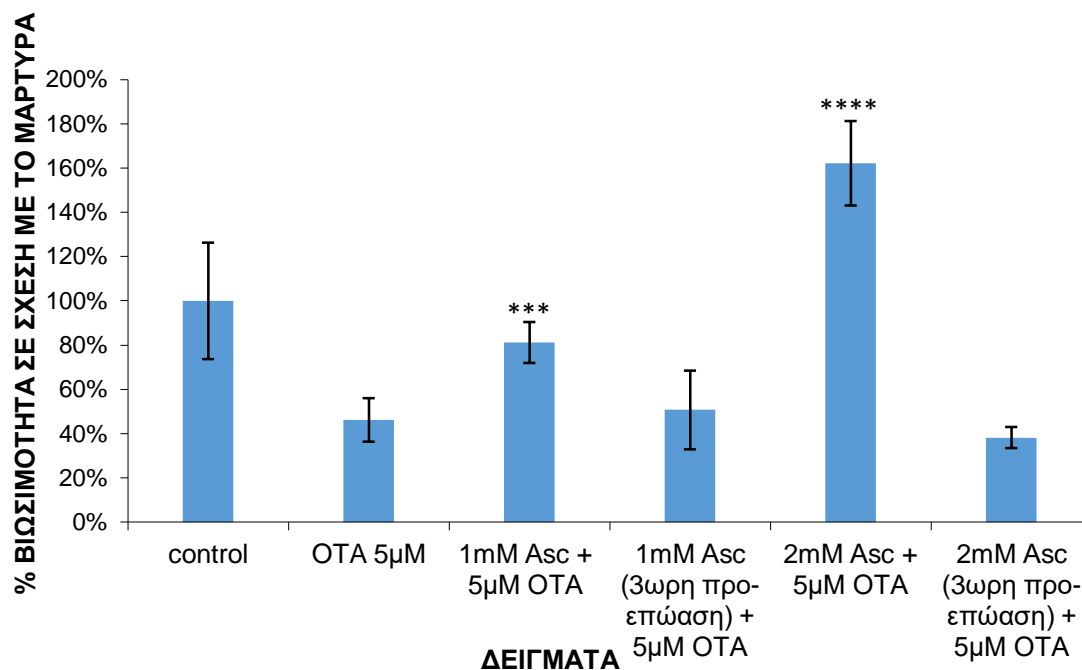
Εικόνα 3.8 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HEK 293 σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Η συγκέντρωση της OTA που εφαρμόστηκε στα κύτταρα για 48 ώρες ήταν 2.5μM και οι συνδυασμοί αφορούν ίδιας συγκέντρωσης (8.4mg/mL) φαινολικού εκχυλίσματος φράουλας ποικιλίας B12 σε συνδυασμό με 2.5μM OTA και 3ωρη επώαση των κυττάρων με φαινολικό εκχύλισμα φράουλας (8.4mg/mL) και στη συνέχεια προσθήκη OTA 2.5μM (πορτοκαλί στήλες). Εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT με \pm % σφάλμα.

3.3.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ ΜΤΤ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΤΑ, ΣΥΝΔΙΣΜΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΟΤΑ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΠΡΟ-ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ ΣΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΩΝ

Τα αποτελέσματα της δοκιμής βιωσιμότητας των κυττάρων HEK 293 μέσω πρόσληψης της χρωστικής MTT παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3.9 και 3.10. Τα κύτταρα είτε προ-επώαστηκαν με τις συγκεντρώσεις Ασκορβικού οξέος για 3 ώρες και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η 24ωρη (Εικόνα 3.9) ή 48ωρη επώαση (Εικόνα 3.10), είτε προστέθηκε στα κύτταρα ταυτόχρονα μίγμα διαφορετικών συγκεντρώσεων Ασκορβικού οξέος και ΟΤΑ και πραγματοποιήθηκε επώαση για 24 (Εικόνα 3.9) ή 48 (Εικόνα 3.10) ώρες. Η συγκέντρωση ΟΤΑ που εφαρμόστηκε στα κύτταρα είναι 5μM, ενώ οι συγκεντρώσεις Ασκορβικού οξέος 1 και 2 mM. Κατά την 24ωρη επώαση παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας των

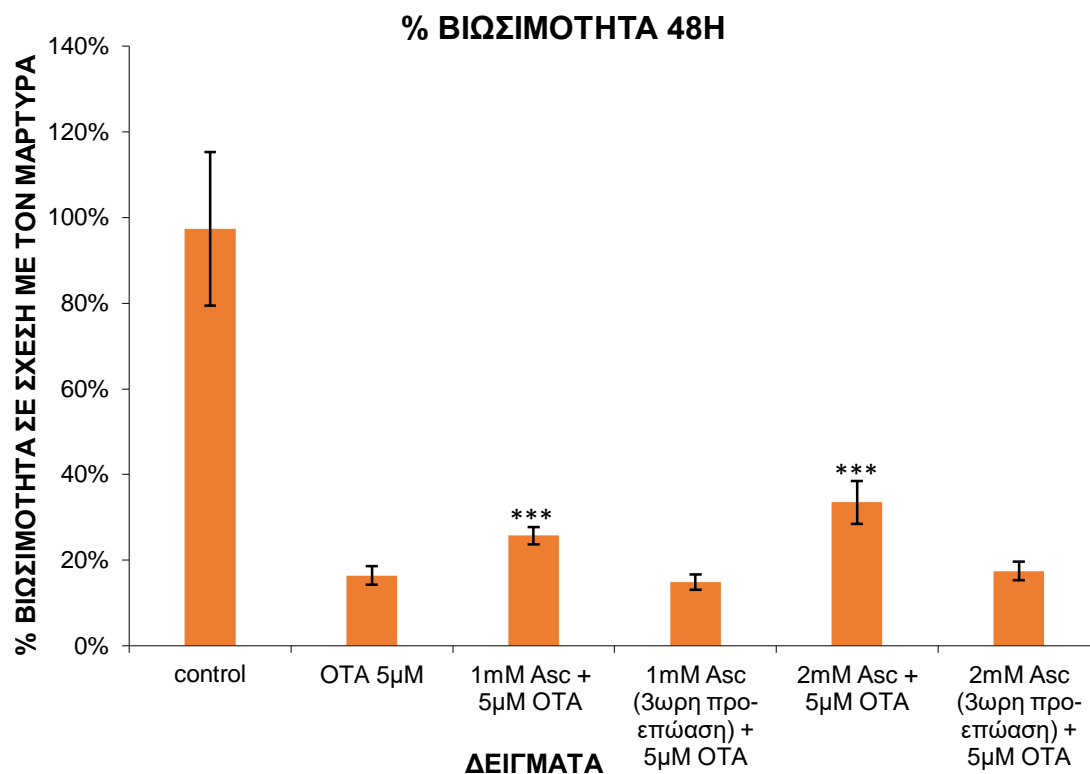
κυττάρων κατά 35% με τη ταυτόχρονη εισαγωγή Ασκορβικού οξέος 1 mM και ΟΤΑ 5μM (P=0.0004) και κατά 116% με την ταυτόχρονη εισαγωγή Ασκορβικού οξέος 2 mM (P<0.0001) και ΟΤΑ 5μM, σε σχέση με την επώαση των κυττάρων μόνο με ΟΤΑ 5μM. Η 3ωρη προ-επώαση με Ασκορβικό οξύ δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με την επώαση των κυττάρων μόνο με ΟΤΑ.

% ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ 24H



Εικόνα 3.9 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HEK 293 σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Η συγκέντρωση της ΟΤΑ που εφαρμόστηκε στα κύτταρα για 24 ώρες ήταν 5μM και οι συνδυασμοί αφορούν Ασκορβικό οξύ (Asc) 1 ή 2mM σε συνδυασμό με 5μM ΟΤΑ και 3ωρη επώαση των κυττάρων με 1 ή 2mM Ασκορβικού οξέος και στη συνέχεια προσθήκη ΟΤΑ 5μM (μπλε στήλες). Εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT με \pm % σφάλμα, *** 0.0001<p<0.001 ****p<0.0001 (η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση ΟΤΑ).

Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε ότι κατά την 48ωρη επώαση των κυττάρων με ΟΤΑ 5 μM, η ταυτόχρονη εισαγωγή Ασκορβικού οξέος και ΟΤΑ είναι επίσης αποτελεσματική στην αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων HEK 293. Έτσι, η ταυτόχρονη εισαγωγή Ασκορβικού οξέος 1 mM και ΟΤΑ 5 μM (P=0.0001) αύξησε τη βιωσιμότητα κατά 9.2% και η ταυτόχρονη εισαγωγή Ασκορβικού οξέος 2 mM (P=0.0001) και ΟΤΑ 5 μM κατά 17% σε σχέση με την επώαση των κυττάρων μόνο με ΟΤΑ 5μM. Η 3ωρη προ-επώαση με Ασκορβικό οξύ κατά την 48ωρη επώαση των κυττάρων με ΟΤΑ, όπως και στην 24ωρη, δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με την επώαση των κυττάρων μόνο με ΟΤΑ.

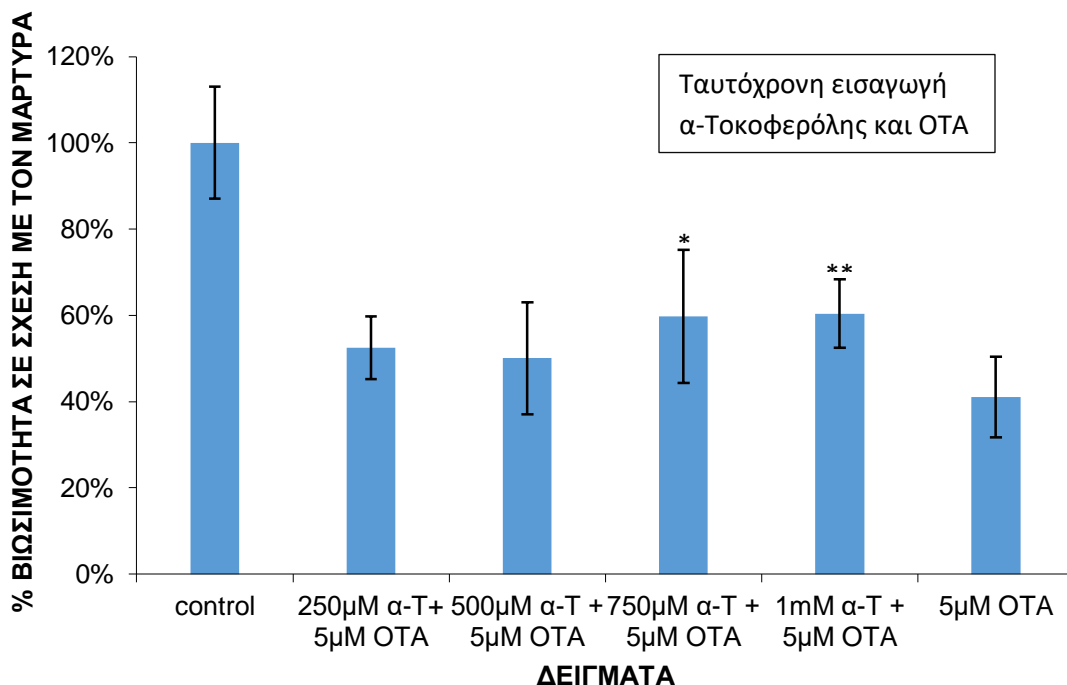


Εικόνα 3.10 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HEK 293 σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Η συγκέντρωση της OTA που εφαρμόστηκε στα κύτταρα για 48 ώρες ήταν 5µM και οι συνδυασμοί αφορούν Ασκορβικό οξύ (Asc) 1 ή 2mM σε συνδυασμό με 5µM OTA και 3ωρη επώαση των κυττάρων με 1 ή 2mM Ασκορβικού οξέος και στη συνέχεια προσθήκη OTA 5µM (πορτοκαλί στήλες). Εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT με \pm % σφάλμα, *** 0.0001 < p < 0.001 (η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση OTA).

3.3.6 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ ΜΤΤ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ OTA ΚΑΙ ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ OTA ΚΑΙ α -ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ ΣΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΩΝ

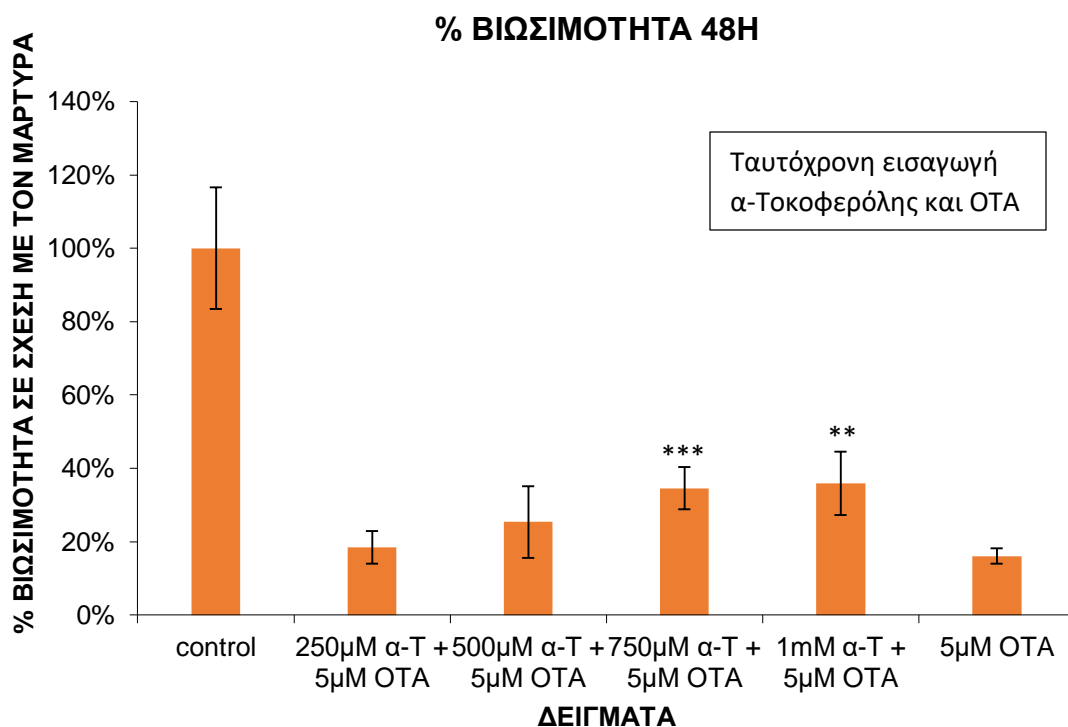
Τα αποτελέσματα της δοκιμής βιωσιμότητας των κυττάρων HEK 293 μέσω πρόσληψης της χρωστικής MTT παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3.11 και 3.12. Τα κύτταρα που επωάστηκαν με την OTA και τους συνδυασμούς OTA και α -Τοκοφερόλης για 24 ώρες απεικονίζονται με μπλε χρώμα (Εικόνα 3.11) και αυτά που επωάστηκαν για 48 ώρες με πορτοκαλί χρώμα (Εικόνα 3.12). Κατά την 24ωρη επώαση παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά το συνδυασμό OTA (5 µM) και α -Τοκοφερόλης 75 0µM (P= 0.0078) κατά 18% και ο συνδυασμός OTA (5µM) και α -Τοκοφερόλης 1 mM (P=0.0494) κατά 19% σε σχέση με την επίδραση μόνο της OTA.

% ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ 24H



Εικόνα 3.11 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HEK 293 σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Η συγκέντρωση της OTA που εφαρμόστηκε στα κύτταρα για 24 ώρες ήταν 5μM και οι συνδυασμοί αφορούν διαφορετικές συγκεντρώσεις α-Τοκοφερόλης (α-T) 250, 500, 750 και 1mM σε συνδυασμό με 5μM OTA (μπλε στήλες). Εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT με \pm % σφάλμα, * $0.01 < p < 0.05$, ** $0.001 < p < 0.01$ (η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση OTA).

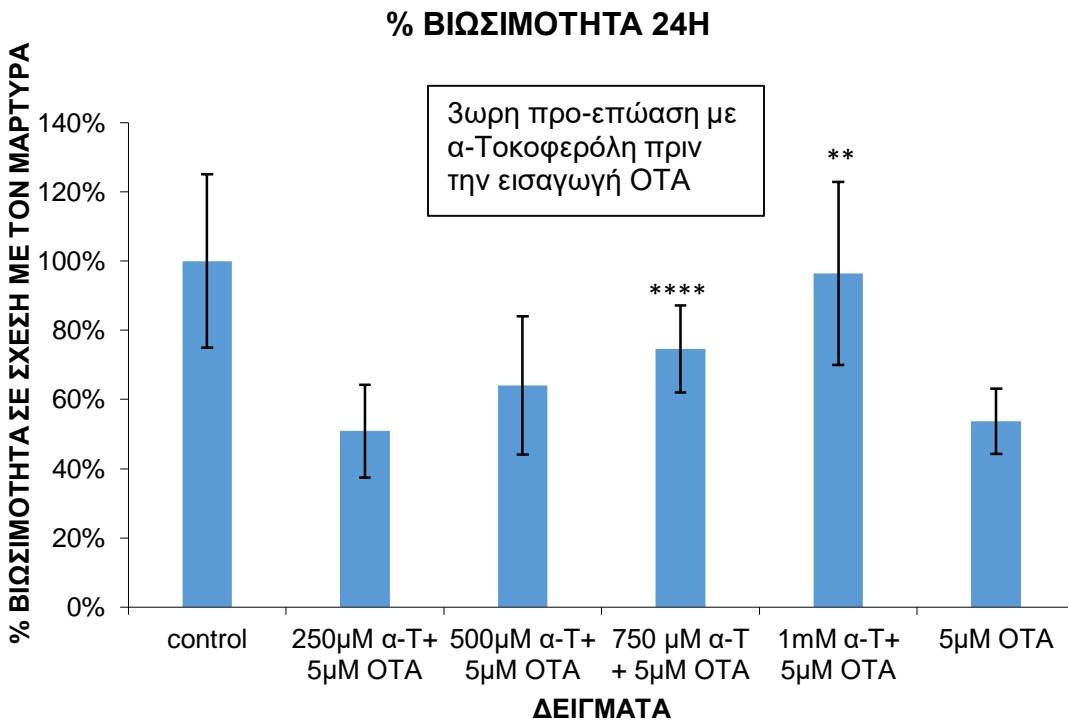
Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε ότι κατά την 48ωρη επώαση των κυττάρων με τους συνδυασμούς OTA και α-Τοκοφερόλης, οι ίδιες συγκεντρώσεις α-Τοκοφερόλης σε συνδυασμό με την εφαρμογή OTA (5 μM) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας. Έτσι, ο ταυτόχρονη προσθήκη OTA (5 μM) και α-Τοκοφερόλης 500 μM ($P = 0.0001$) αύξησε τη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά 18.5% και ο συνδυασμός OTA (5 μM) και α-Τοκοφερόλης 1 mM ($P = 0.0010$) κατά 19.9% σε σχέση με την επίδραση μόνο της OTA. Συμπερασματικά, οι συγκεντρώσεις α-Τοκοφερόλης 750 μM και 1 mM βελτιώνουν σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων όταν εισαχθούν σε συνδυασμό με OTA (5 μM) κατά την 24ωρη και 48ωρη επώαση.



Εικόνα 3.12 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HEK 293 σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Η συγκέντρωση της OTA που εφαρμόστηκε στα κύτταρα για 48 ώρες ήταν 5μM και οι συνδυασμοί αφορούν διαφορετικές συγκεντρώσεις α-Τοκοφερόλης 250, 500, 750 και 1mM σε συνδυασμό με 5μM OTA (πορτοκαλί στήλες). Εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT με \pm % σφάλμα, **0.001$p$$0.01$ (η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση OTA).

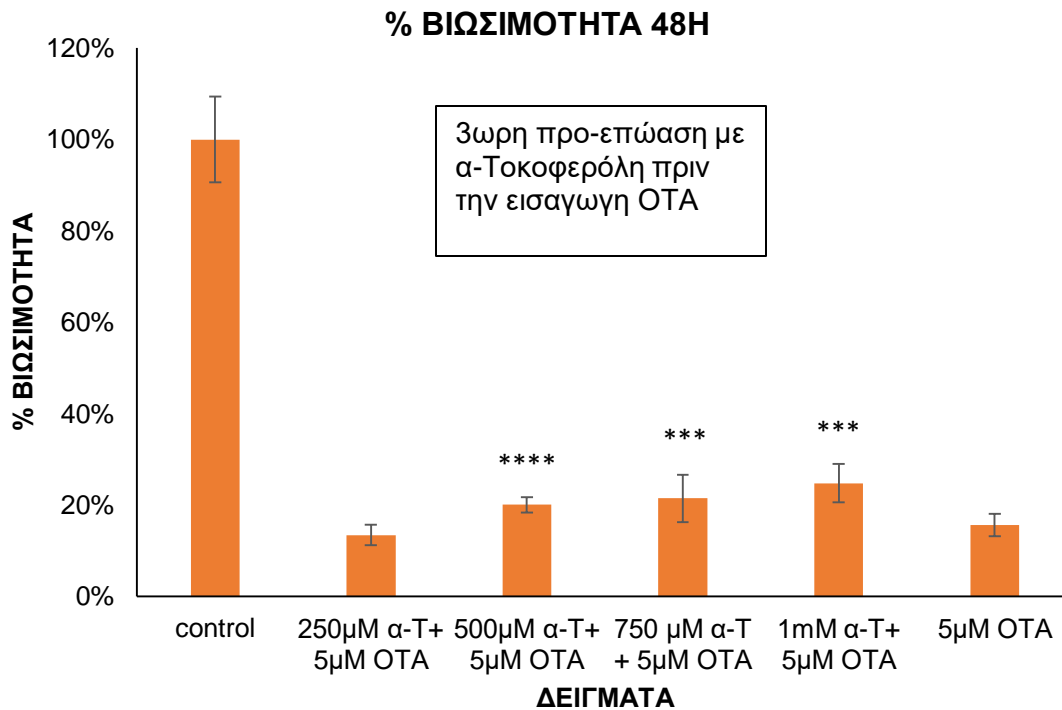
3.3.7 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ ΜΤΤ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΟΤΑ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΠΡΟ-ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ ΣΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΩΝ

Τα αποτελέσματα της δοκιμής βιωσιμότητας των κυττάρων HEK 293 μέσω πρόσληψης της χρωστικής MTT παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3.13 και 3.14. Τα κύτταρα προ-επώαστηκαν με τις συγκεντρώσεις α-Τοκοφερόλης για 3 ώρες, στη συνέχεια αφαιρέθηκε η βιταμίνη και ακολούθησε 24ωρη επώαση με OTA συγκέντρωσης 5 μM απεικονίζονται με μπλε χρώμα (Εικόνα 3.13) και αυτά που επώαστηκαν για με την OTA για 48 ώρες με πορτοκαλί χρώμα (Εικόνα 3.14). Κατά την 24ωρη επώαση παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά 10.3% με τη προ-επώαση με α-Τοκοφερόλη συγκέντρωσης 750 μM ($P<0.0001$) και κατά 54% με α-Τοκοφερόλη 1 mM ($P=0.0010$) σε σχέση με την επώαση των κυττάρων μόνο με OTA 5 μM.



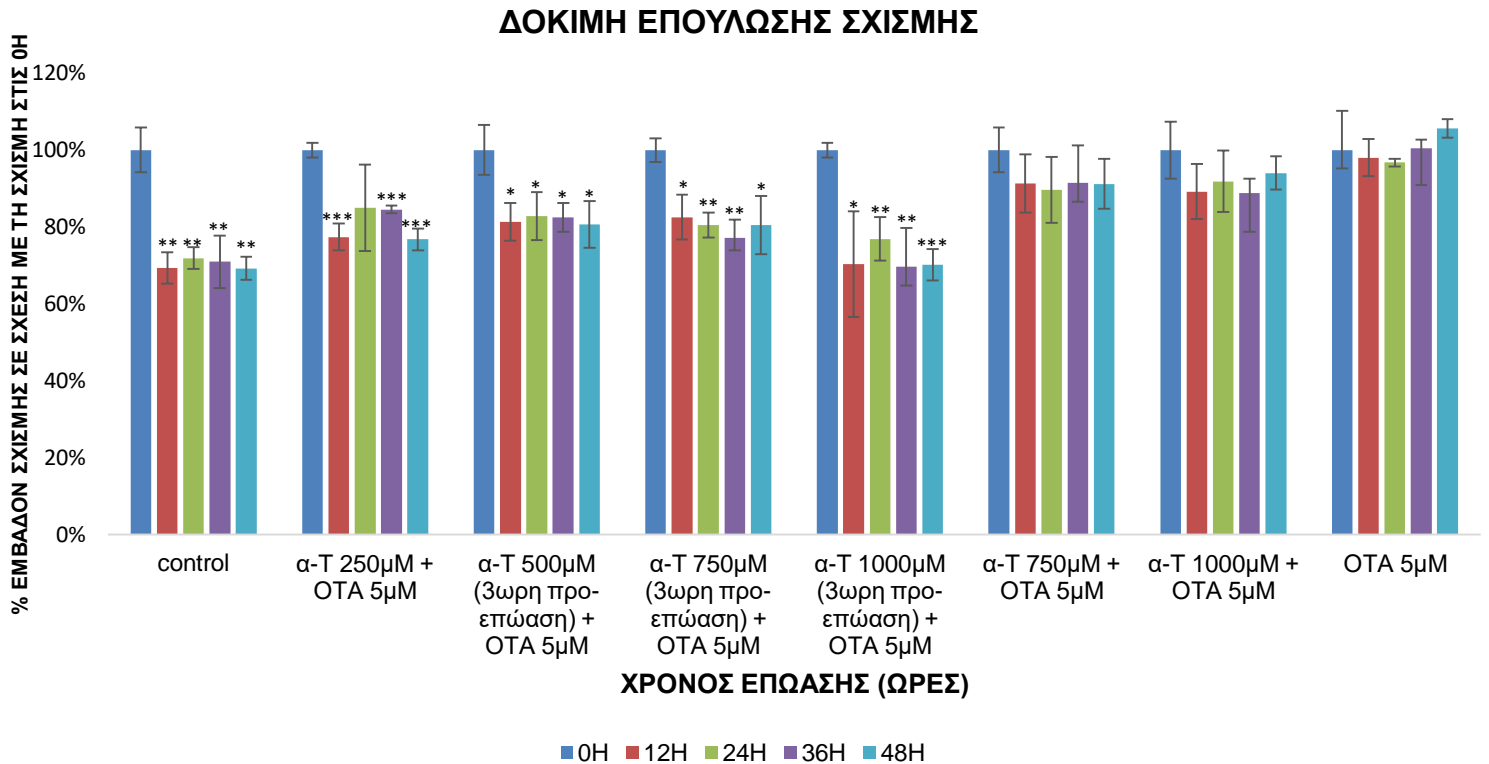
Εικόνα 3.13 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HEK 293 σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Η συγκέντρωση της OTA που εφαρμόστηκε στα κύτταρα για 24 ώρες ήταν 5μM και τα κύτταρα είχαν προ-επωαστεί για 3 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις α-Τοκοφερόλης 250, 500, 750, 1000μM (μπλε στήλες). Εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT με \pm % σφάλμα, $**0.001 < p < 0.01$, $****p < 0.0001$ (η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση OTA).

Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε ότι κατά την 48ωρη επώαση των κυττάρων με OTA 5μM, η 3ωρη προ-επώαση με συγκεντρώσεις α-Τοκοφερόλης 500 μM ($P < 0.0001$), 750 μM ($P = 0.0001$) και 1 mM ($P = 0.0007$) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας. Οι σημαντικότερες αυξήσεις της βιωσιμότητας των κυττάρων σε σχέση με τη επίδραση της επώασης των κυττάρων με 5 μM OTA, παρουσιάζονται κατά τη προ-επώαση με 750 μM (10.1%) και 1 mM (10.6%) α-Τοκοφερόλης. Συμπερασματικά, η 3ωρη προ-επώαση με α-Τοκοφερόλης 750 μM και 1mM πριν την επώαση των κυττάρων με OTA 5 μM βελτιώνουν σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων τόσο κατά τη 24ωρη όσο και τη 48ωρη επώαση.

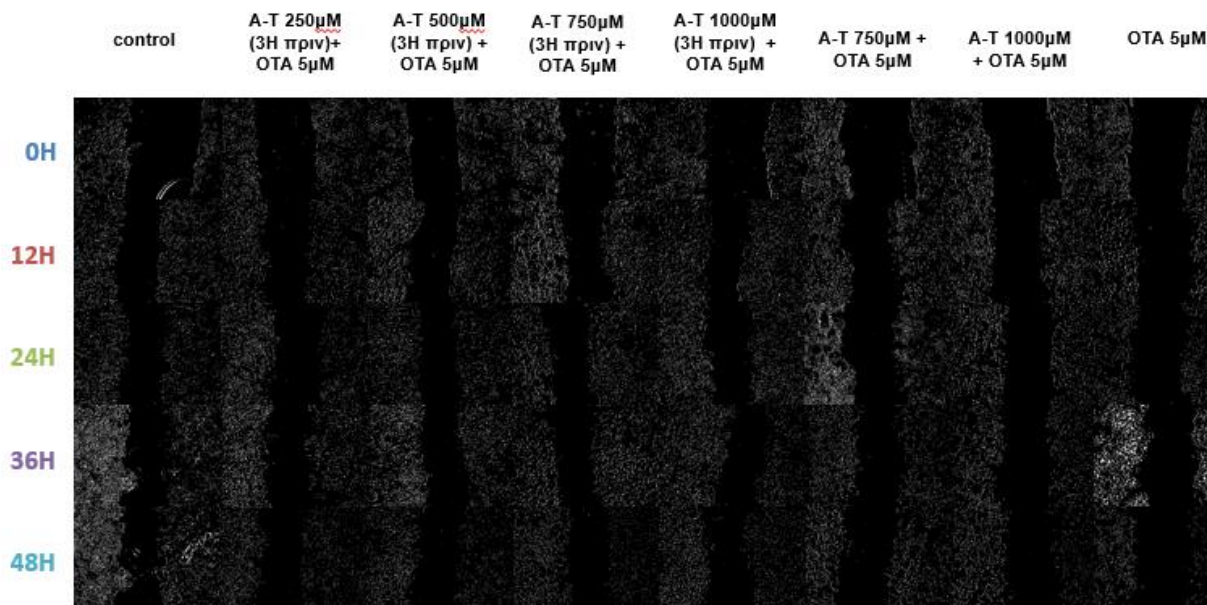


Εικόνα 3.14 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HEK 293 σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής MTT. Η συγκέντρωση της OTA που εφαρμόστηκε στα κύτταρα για 48 ώρες ήταν 5µM και τα κύτταρα είχαν προ-επωαστεί για 3 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις α-Τοκοφερόλης 250, 500, 750, 1000µM (πορτοκαλί στήλες). Εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT με \pm % σφάλμα, *** $0.0001 < p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση OTA).

3.4 ΔΟΚΙΜΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK 293 ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΤΑ, ΟΤΑ ΜΕ ΠΡΟ-ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ α -ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΟΤΑ ΚΑΙ α -ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ



Εικόνα 3.15 Η επούλωση τραύματος εκφράστηκε ως το εμβαδό της σχισμής που προκλήθηκε στον πάτο των βοθρίων πλακιδίου ELISA (24άρων βοθρίων) κατά τη διάρκεια του χρόνου (0 ώρες-μπλε στήλες, 12 ώρες-κόκκινες στήλες, 24 ώρες-πράσινες στήλες, 36 ώρες-μωβ στήλες, 48 ώρες- γαλάζιες στήλες) υπό την επίδραση ΟΤΑ 5 μ M, ΟΤΑ 5 μ M ύστερα από 3ωρη προ-επίπωση με συγκεντρώσεις α -Τοκοφερόλης 250, 500, 750 μ M και 1mM και συνδυασμών ΟΤΑ 5 μ M με α -Τοκοφερόλη συγκεντρώσεως 750 μ M ή 1mM Εκφράζεται το ποσοστό επούλωσης σχισμής των κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα (0 ώρες) με \pm % σφάλμα, *0.01<p<0.05, **0.001<p<0.01, *** 0.0001<p<0.001 (η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε σε σχέση με τη σχισμή στους 0 ώρες).



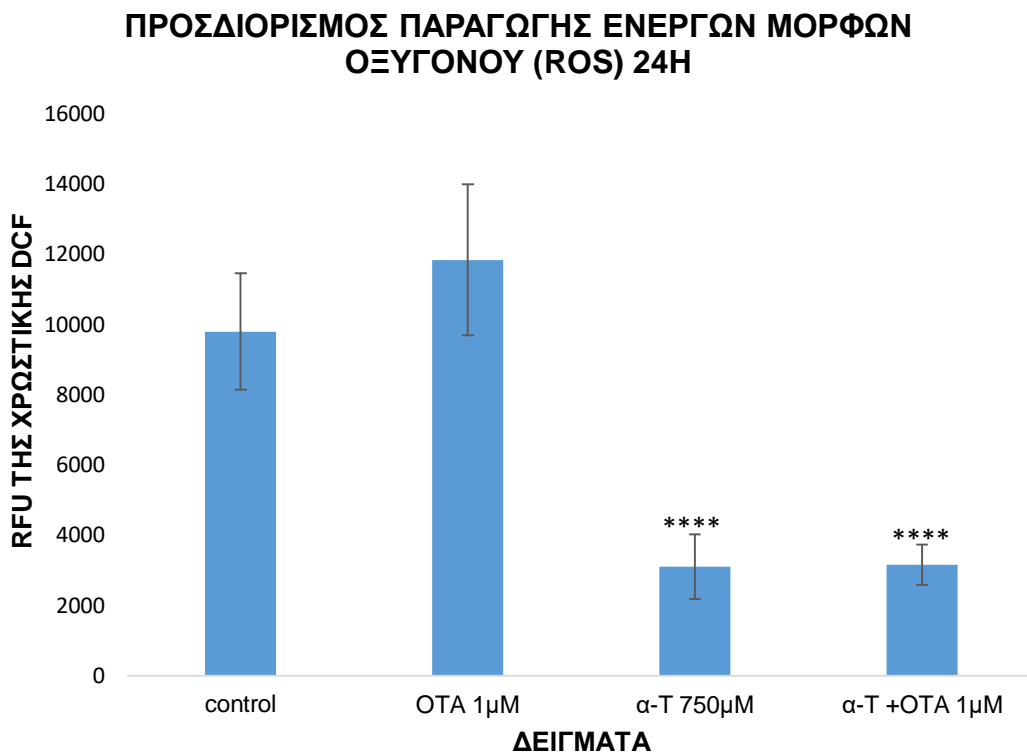
Εικόνα 3.16 Ενδεικτικά στιγμιότυπα δοκιμής επούλωσης τραύματος σε κύτταρα HEK 293 σε 0, 12, 24, 36 και 48 ώρες από ανάστροφο μικροσκόπιο. Η επιδράσεις στα κύτταρα ήταν OTA 1 μ M, OTA 1 μ M με 3ωρη προ-επώαση με α -Τοκοφερόλη 250, 500, 750 μ M ή 1mM, συνδυασμούς OTA και α -Τοκοφερόλης 250, 500, 750 μ M ή 1mM. Bar 50 μ M.

Στην εικόνα 3.16 παρουσιάζονται χαρακτηριστικά στιγμιότυπα από ανάστροφο μικροσκόπιο της δοκιμής επούλωσης τραύματος σε κύτταρα HEK 293 τις χρονικές στιγμές 0, 12, 24, 36 και 48 ώρες. Μελετήθηκε η επίδραση της OTA 5 μ M, OTA 5 μ M ύστερα από 3ωρη προ-επώαση με συγκεντρώσεις α -Τοκοφερόλης 250, 500, 750 μ M και 1 mM και συνδυασμών OTA 5 μ M με α -Τοκοφερόλη συγκέντρωσης 750 μ M ή 1 mM στα κύτταρα.

3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΕΝΕΡΓΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS) ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK 293 ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ Η2DCFDA ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ OTA, α -ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΤΟΥΣ ΓΙΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΕΣ

Τα αποτελέσματα της μεταβολής της συγκέντρωσης των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) μετά από 24ωρη και 48ωρη επώαση των κυττάρων παρουσιάζονται στην εικόνα 3.17 (μπλε στήλες και 3.18 (πορτοκαλί στήλες). Κύτταρα HEK 293 επώαστηκαν με OTA 1 μ M, α -Τοκοφερόλης 750 μ M και συνδυασμού τους σε κύτταρα HEK 293 για 24 και 48 ώρες. Κατά την 24ωρη επώαση με OTA 1 μ M σημειώνονται αυξημένα επίπεδα ενεργών μορφών οξυγόνου, ενώ

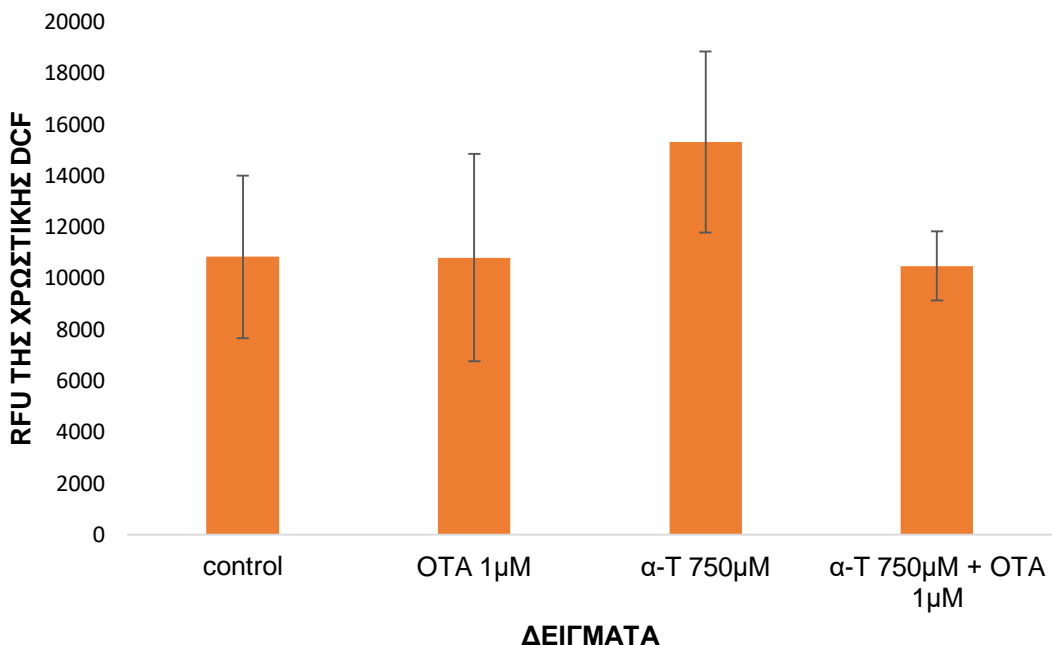
κατά τη προσθήκη συνδυασμού α -Τοκοφερόλης 750 μ M και OTA 1 μ M παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων ROS κατά 73.3%.



Εικόνα 3.17 Συγκέντρωση ROS σε κύτταρα HEK 293 μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής H2DCFDA. Στα κύτταρα εφαρμόστηκε OTA 1 μ M, α -Τοκοφερόλη 750 μ M και συνδυασμός τους και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε 24ωρη επώαση (μπλε στήλες). Εκφράζονται οι σχετικές μονάδες φθορισμού (RFU) της χρωστικής DCFDA (που φθορίζει όταν έρχεται σε επαφή με ROS) \pm % σφάλμα, **** p <0.0001 (η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση OTA).

Κατά την 48ωρη επώαση δε παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων ROS ανάμεσα στους διαφορετικούς χειρισμούς.

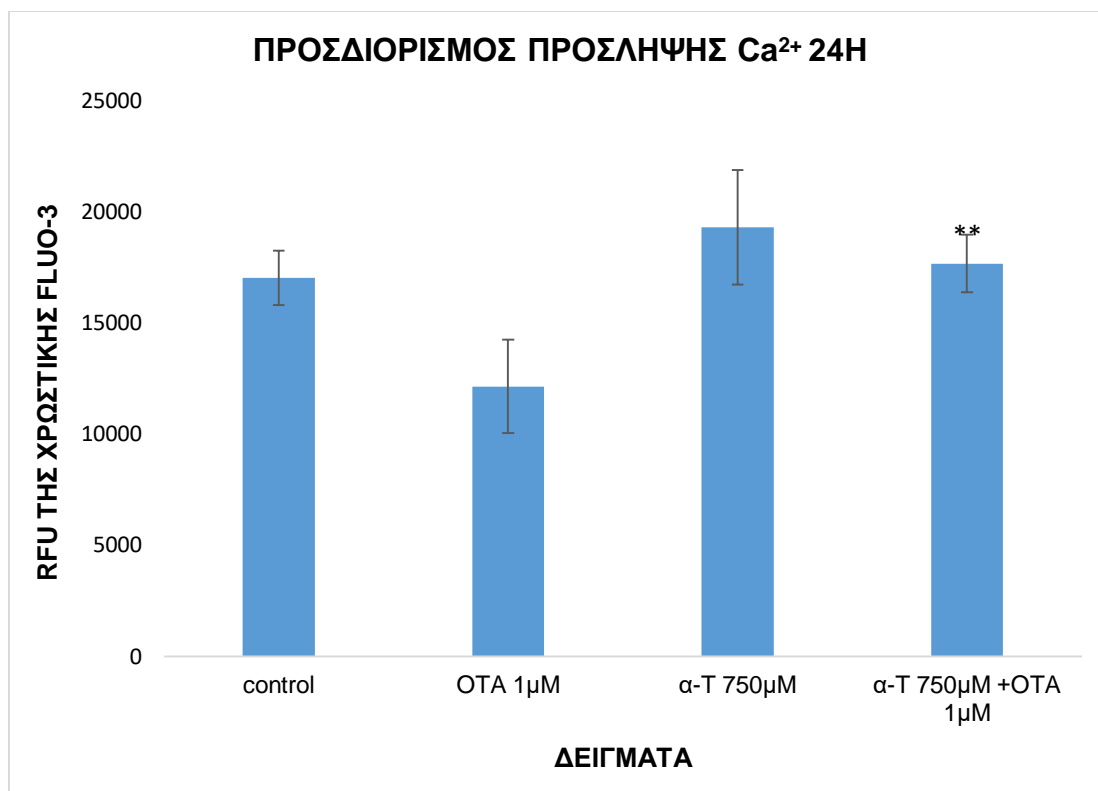
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΝΕΡΓΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS) 48H



Εικόνα 3.18 Συγκέντρωση ROS σε κύτταρα HEK 293 μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής H2DCFDA. Στα κύτταρα εφαρμόστηκε OTA 1µM, α-Τοκοφερόλη 750µM και συνδυασμός τους και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε 48ωρη επώαση (πορτοκαλί στήλες). Εκφράζονται οι σχετικές μονάδες φθορισμού (RFU) της χρωστικής DCFDA (που φθορίζει όταν έρχεται σε επαφή με ROS) ± % σφάλμα.

3.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ Ca²⁺ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK 293 ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ FLUO-3 ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΤΑ, α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΤΟΥΣ ΓΙΑ 24 ΚΑΙ 48 ΩΡΕΣ

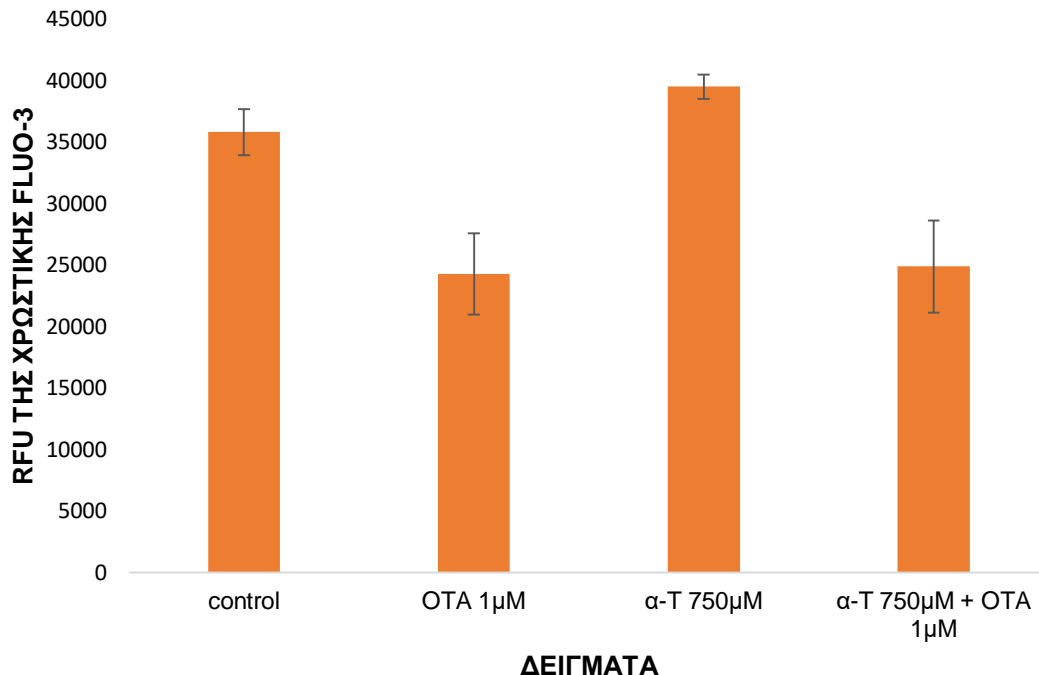
Τα αποτελέσματα της μεταβολής της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου μετά από 24ωρη και 48ωρη επώαση των κυττάρων παρουσιάζονται στην εικόνα 3.19 (μπλε στήλες) και 3.20 (πορτοκαλί στήλες). Κύτταρα HEK 293 επωάστηκαν με OTA 1 µM, α-Τοκοφερόλης 750 µM και συνδυασμού τους σε κύτταρα HEK 293 για 24 και 48 ώρες. Κατά την 24ωρη επώαση με OTA 1 µM σημειώνονται αυξημένα επίπεδα ενδοκυτταρικού ασβεστίου ενώ κατά τη προσθήκη συνδυασμού α-Τοκοφερόλης 750 µM και OTA 1 µM παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου κατά 31.3%.



Εικόνα 3.19 Πρόσληψη Ca²⁺ σε κύτταρα HEK 293 μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής FLUO-3. Στα κύτταρα εφαρμόστηκε OTA 1μM, α-Τοκοφερόλη 750μM και συνδυασμός τους και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε 24ωρη επώαση (μπλε στήλες). Εκφράζονται οι σχετικές μονάδες φθορισμού (RFU) της χρωστικής FLUO-3 ± % σφάλμα, **0.001<p<0.01(η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση OTA).

Κατά την 48ωρη επώαση η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου παραμένει σημαντικά χαμηλότερη στα κύτταρα με OTA 1 μM σε σχέση με το μάρτυρα. Η προσθήκη συνδυασμού OTA 1 μM και α-Τοκοφερόλης 750 μM δεν βελτίωσε σημαντικά την συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου κατά την 48ωρη επώαση των κυττάρων.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ Ca²⁺ 48H

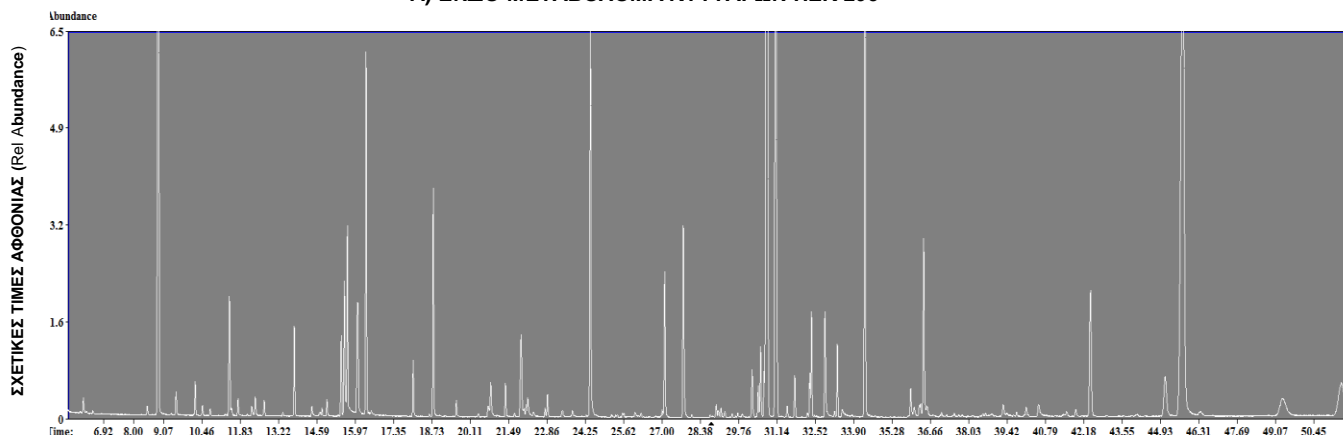


Εικόνα 3.20 Πρόσληψη Ca²⁺ σε κύτταρα HEK 293 μετά από τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής FLUO-3. Στα κύτταρα εφαρμόστηκε OTA 1µM, α-Τοκοφερόλη 750µM και συνδυασμός τους και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε 48ωρη επώαση (πορτοκαλί στήλες). Εκφράζονται οι σχετικές μονάδες φθορισμού (RFU) της χρωστικής FLUO-3 ± % σφάλμα.

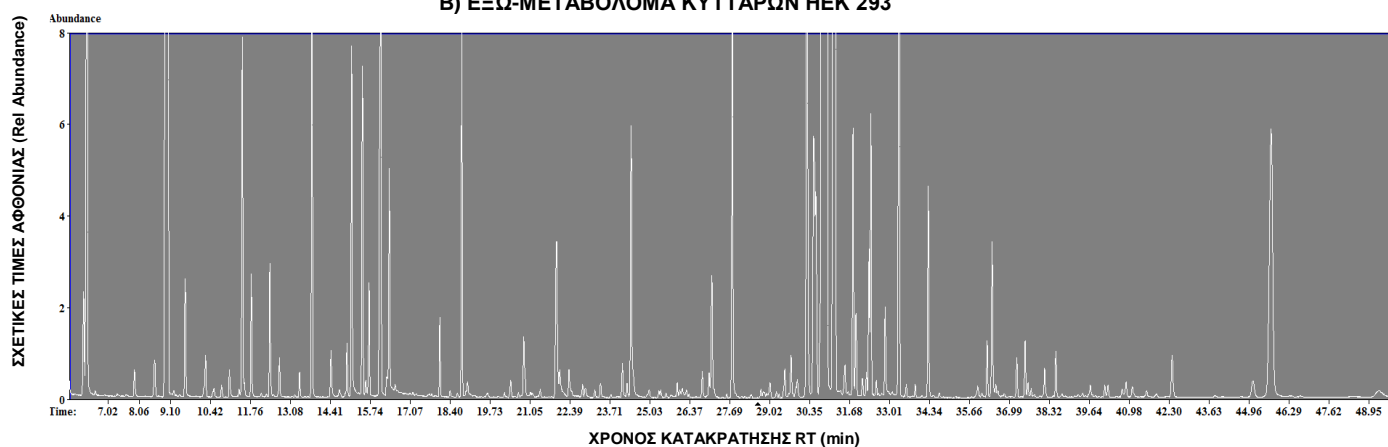
3.7 ΑΠΟΤΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HEK 293 ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΤΑ ΜΕ ΠΡΟ-ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ

Στην Εικόνα 3.21 παρουσιάζονται δύο ενδεικτικά χρωματογραφήματα της μεταβολομικής ανάλυσης. Πιο συγκεκριμένα, το χρωματογράφημα Α ενδεικτικό του ενδο-μεταβολόματος κυττάρων HEK 293 χωρίς καμία μεταχείριση και το χρωματογράφημα Β είναι ενδεικτικό του εξω-μεταβολόματος κυττάρων HEK 293 χωρίς καμία μεταχείριση. Η ποιότητα ανάλυσης ακολουθώντας τη συγκεκριμένη μεθοδολογία φαίνεται στα χρωματογραφήματα (Εικόνα 3.21), καθώς παρουσιάζουν καλό χρωματογραφικό διαχωρισμό των ουσιών, με μεμονωμένες διαδοχικές και οξείες κορυφές με χαμηλή γραμμή βάσης (base line).

ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΡΕΥΜΑΤΟΣ ΙΟΝΤΩΝ (TIC)
Α) ΕΝΔΟ-ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HEK 293



Β) ΕΞΩ-ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HEK 293

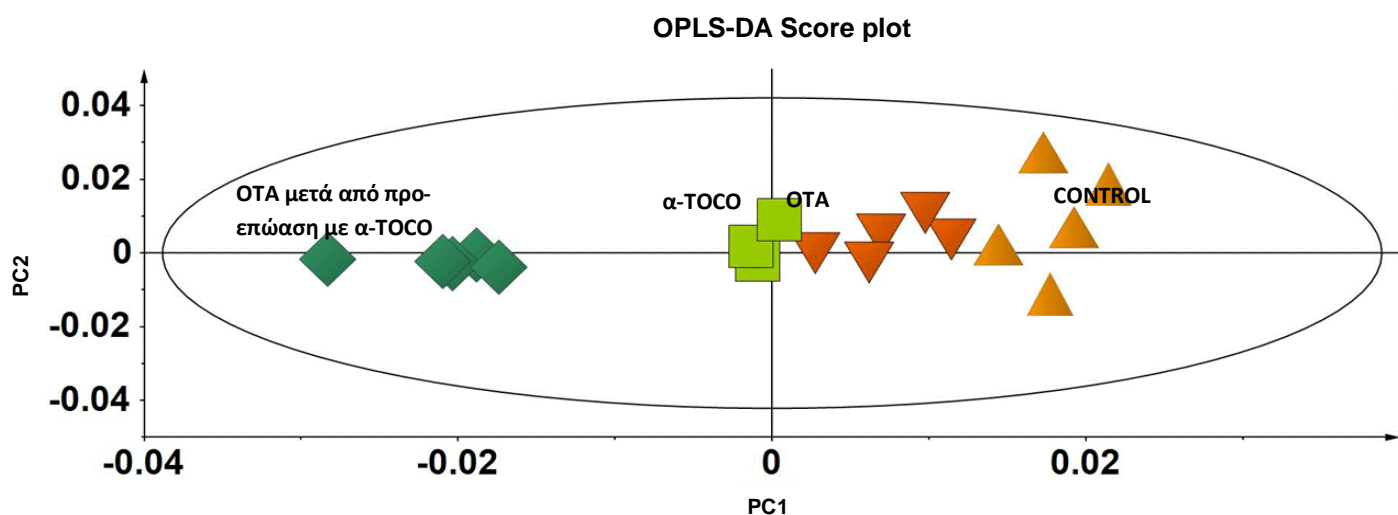


Εικόνα 3.22 Χρωματογραφήματα GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης με εκχύλιση ενδο-μεταβολόματος με αιθανόλη (Α) και εξω-μεταβολόματος με μίγμα μεθανόλη:οξικό αθυλεστέρα 1:1 (Β).

Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα AMDIS, με τη βοήθεια του οποίου ανιχνεύτηκαν τα μεταβολικά χαρακτηριστικά των κυττάρων. Η ολοκλήρωση της ανάλυσης θα οδηγήσει στη δημιουργία μεταβολικής βάσης δεδομένων για τα HEK 293, που θα περιλαμβάνει όλα τα μεταβολικά χαρακτηριστικά των κυττάρων. Μετά την ολοκλήρωση της βάσης μεταβολιτών για τα HEK 293, ακολουθεί η χημική ομαδοποίηση των μεταβολιτών σύμφωνα με τη βάση KEGG.

Τα HEK 293 χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταβολομική ανάλυση της τοξικότητας OTA 0.5 μM , καθώς και της επίδρασης της 3ωρης προ-επάσης με 750 μM α -Τοκοφερόλης στην

τοξικότητα της OTA 0.5 μM . Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν υποβλήθηκαν σε πολυπαραγοντική ανάλυση προκειμένου να μελετηθούν οι αλλαγές στον μεταβολισμό των κυττάρων μετά τις επεμβάσεις σε σχέση με τον αντίστοιχο μεταβολισμό στους μάρτυρες.



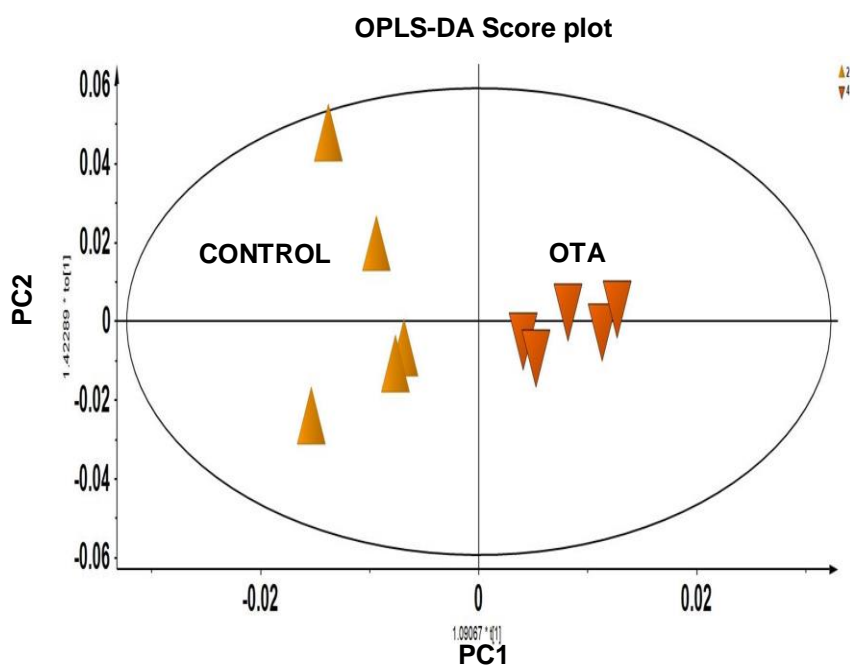
Εικόνα 3.23 OPLS-DA score plot για την επίδραση της OTA, της α -Τοκοφερόλης και της OTA ύστερα από 3ωρη προ-επίπωση των κυττάρων με α -Τοκοφερόλης (Control= μάρτυρας, OTA= ωχρατοξίνη A, α -TOCO= α -Τοκοφερόλη) Μάρτυρας \blacktriangle , OTA 5 μM \blacktriangledown , α -Τοκοφερόλη 750 μM \blacksquare , OTA 0.5 μM ύστερα από 3ωρη προ-επίπωση των κυττάρων με α -Τοκοφερόλη 750 μM \blacklozenge . Η επίπωση των κυττάρων HEK 293 την OTA ή την α -Τοκοφερόλη διήρκεσε 24 ώρες. Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T2 σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Κύριες Συνιστώσες, Principal Component). Η επαναληψιμότητα της πειραματικής διαδικασίας και των αναλύσεων αποδεικνύεται από τις υψηλές τιμές των συντελεστών $R^2X(\text{cum})=0,682$, $R^2Y(\text{cum})=0,796$ και $Q^2=0,709$.

Στο score plot που προέκυψε με εφαρμογή OPLS-DA, οπτικοποιούνται οι μεταβολίτες που ευθύνονται για το διαχωρισμό των επεμβάσεων (Εικόνα 3.22). Κάθε κουκίδα-σημείο αντιπροσωπεύει το καταγεγραμμένο μεταβολικό προφίλ για κάθε επανάληψη κάθε επέμβασης και οι αποστάσεις μεταξύ των σημείων είναι ενδεικτικές των διαφορών που καταγράφηκαν στο σύνολο των μεταβολιτών κάθε επέμβασης. Τα μεταβολομικά προφίλ του μάρτυρα διαχωρίζονται από τις επεμβάσεις των υπόλοιπων επεμβάσεων (Εικόνα 3.22), επιβεβαιώνοντας 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.

Από το score plot της εικόνας 3.22 φαίνεται ότι η μεταχείριση με OTA 0.5 μM είναι πιο κοντά στο μάρτυρα, δηλαδή σε σύγκριση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις η επίδραση της OTA ήταν η μικρότερη στο μεταβολισμό των κυττάρων. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι η επίδραση της OTA κατά την οποία προηγήθηκε 3ωρη προ-επίπωση των κυττάρων με α -Τοκοφερόλη

παρουσίασε την μεγαλύτερη επίδραση στο μεταβολισμό των κυττάρων. Αυτό φαίνεται από τη μεγαλύτερη απόσταση του από το μάρτυρα σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις.

3.7.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΕΜΒΑΣΗΣ ΜΕ ΟΤΑ ΣΕ ΕΜΒΡΥΚΑ ΝΕΦΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK 293



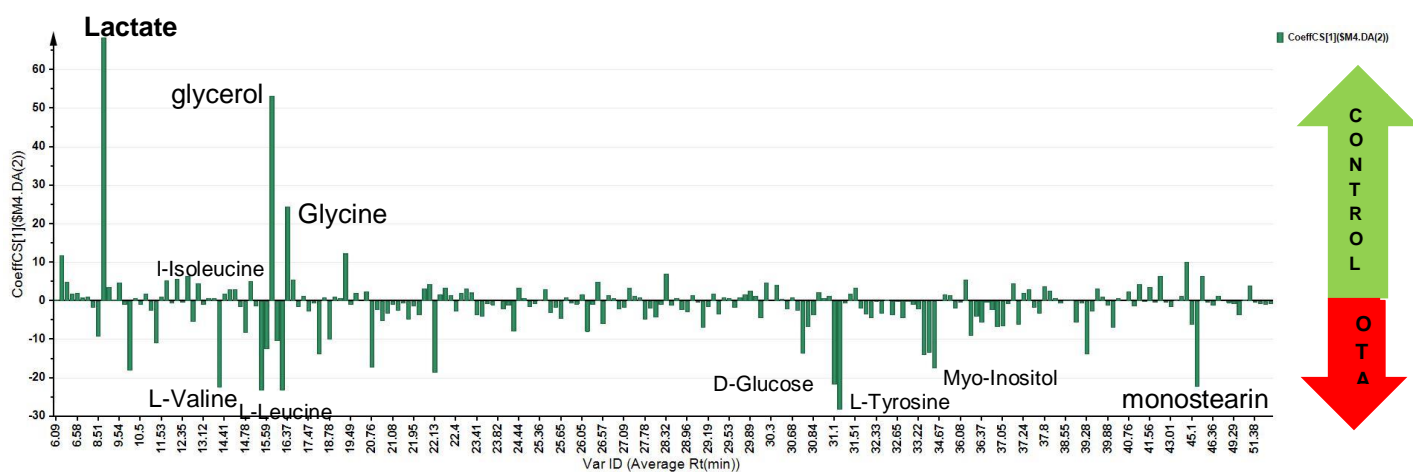
Εικόνα 3.24 OPLS-DA score plot για την επίδραση της ΟΤΑ 0.5μΜ στο μεταβολισμό των HEK 293 24 ώρες μετά τις επεμβάσεις. (Control=μάρτυρας ▲ , ΟΤΑ= ωχρατοξίνη Α ▼). Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T2 σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Κύριες Συνιστώσες, Principal Components). Η επαναληψιμότητα από τη πειραματική διαδικασία έως και τη ανάλυση των δειγμάτων αποδεικνύεται από τις τιμές των συντελεστών $R^2X(cum)=0,721$ (συντελεστής προσδιορισμού), $R^2Y(cum)=0,931$ (προβλεπόμενο ποσοστό απόκρισης), $Q^2=0,715$ (προγνωστική ικανότητα του μοντέλου).

Το OPLS-DA score plot για το μάρτυρα και τις επεμβάσεις με ΟΤΑ 0.5μΜ, έδειξε έναν πολύ καλό διαχωρισμό μεταξύ των καταγεγραμμένων μεταβολικών προφίλ των HEK 293, του μάρτυρα (CONTROL) και των επεμβάσεων με ΟΤΑ, επιβεβαιώνοντας έτσι την επίδραση στο μεταβολισμό των κυττάρων (Εικόνα 3.23).

Τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης (OPLS-DA score plots), αποδεικνύουν την επίδραση της ΟΤΑ στο μεταβολισμό των HEK 293. Επιπρόσθετα, υπογραμμίζουν τις δυνατότητες, την αξιοπιστία και την εφαρμοσιμότητα της μεταβολομικής κυττάρων (cell

metabolomics) για την υψηλής ρυθμοαπόδοσης μελέτη του μεταβολικού υποβάθρου της τοξικότητας μυκοτοξινών 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 HEK 293 στην εφαρμογή 0.5 μM OTA. Παρόλ' αυτά, επειδή η ενδεδειγμένη ανάλυση του μεταβολισμού των HEK 293 δεν αποτέλεσε αντικείμενο της παρούσας μελέτης, παρακάτω αναλύονται τα αποτελέσματα σχετικά με τους πιο σημαντικούς μεταβολίτες-βιοσημαντές (εικόνα 3.24). Στην παρούσα μελέτη, η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών των τοξικοτήτων βασίστηκε στην ανάλυση με coefficient plots [217].

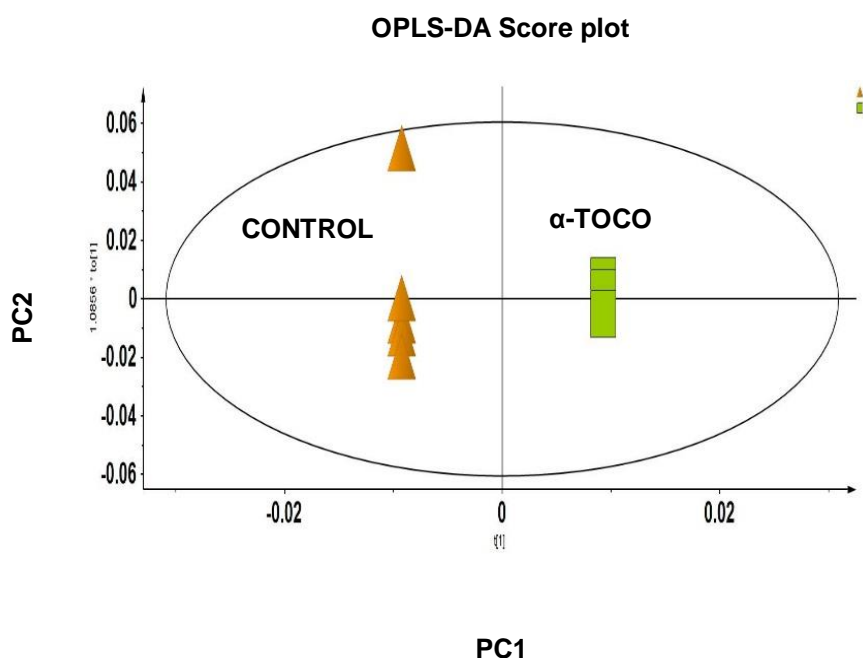


Εικόνα 3.25 Coefficient Plot στο οποίο διακρίνονται οι τιμές των Coefficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ των κυττάρων HEK 293 παρουσία OTA 0.5 μM και απουσία της, 24 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Οι απόλυτες τιμές είναι ανάλογες της βαρύτητας των αντίστοιχων μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης προέρχονται από 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 την OTA.

Στην εικόνα 3.24 παρουσιάζεται το coefficient plot για τη καταζεύγη σύγκριση της επίδρασης 0.5 μM OTA σε κύτταρα HEK 293 ύστερα από 24ωρη επώαση σε σχέση με το μάρτυρα. Ανάμεσα στους μεταβολίτες-βιοσημαντές με τις μεγαλύτερες διακυμάνσεις (υπερ-βιοσύνθεση), μετά την επέμβαση με την OTA, είναι η L-τυροσίνη(L-Tyrosine), η L-βαλίνη (L-Valine), η L-λευκίνη (L-Leucine), η D-γλυκόζη (D-Glucose), η μυοϊνοσιτόλη (Myo-Inositol) και η

μονοστεαρίνη (monostearin). Αντίθετα, οι μεταβολίτες που υπο-βιοσυνθέτονται ως αντίδραση στις επεμβάσεις με την ΟΤΑ είναι το γαλακτικό (Lactate), η γλυκερόλη (Glycerol), η γλυκίνη (Glycine) και η L-ισολευκίνη (L-Isoleucine).

3.7.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΕΜΒΑΣΗΣ ΜΕ α -ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ ΣΕ ΕΜΒΡΥΙΚΑ ΝΕΦΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK 293

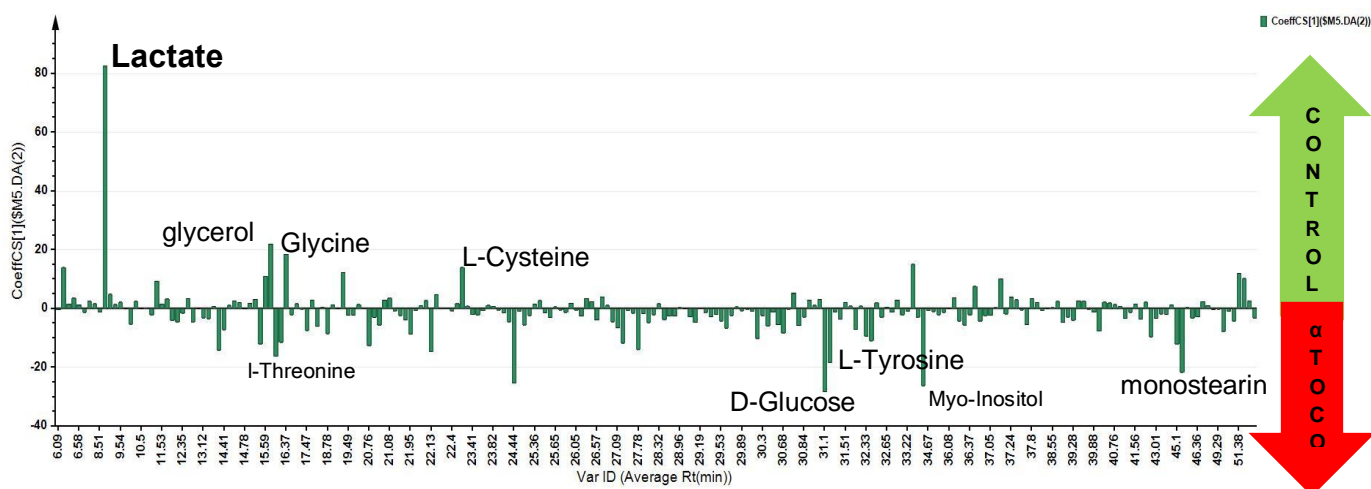


Εικόνα 3.26 OPLS-DA score plot για την επίδραση της α -Τοκοφερόλης 750 μ M στο μεταβολισμό των HEK 293 24 ώρες μετά τις επεμβάσεις. (Control=μάρτυρας \blacktriangle , α -TOCO= α -Τοκοφερόλη \blacksquare). Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T2 σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Κύριες Συνιστώσες, Principal Components). Η επαναληψιμότητα από τη πειραματική διαδικασία έως και τη ανάλυση των δειγμάτων αποδεικνύεται από τις τιμές των συντελεστών $R^2X(cum)=0.756$ (συντελεστής προσδιορισμού), $R^2Y(cum)=0.891$ (προβλεπόμενο ποσοστό απόκρισης), $Q^2=0.737$ (προγνωστική ικανότητα του μοντέλου).

Το OPLS-DA score plot για το μάρτυρα και τις επεμβάσεις με α -Τοκοφερόλη, έδειξε έναν πολύ καλό διαχωρισμό μεταξύ των καταγεγραμμένων μεταβολικών προφίλ των HEK 293 του μάρτυρα (CONTROL) και κυττάρων που είχαν επωαστεί με 750 μ M α -Τοκοφερόλης, δείχνοντας πως η βιταμίνη επιδρά στο μεταβολισμό των κυττάρων (Εικόνα 3.25).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η συσχέτιση των παρατηρούμενων φαινοτύπων με την αντίστοιχη μεταβολική σύνθεση των αναλυόμενων δειγμάτων με σκοπό την ανακάλυψη των

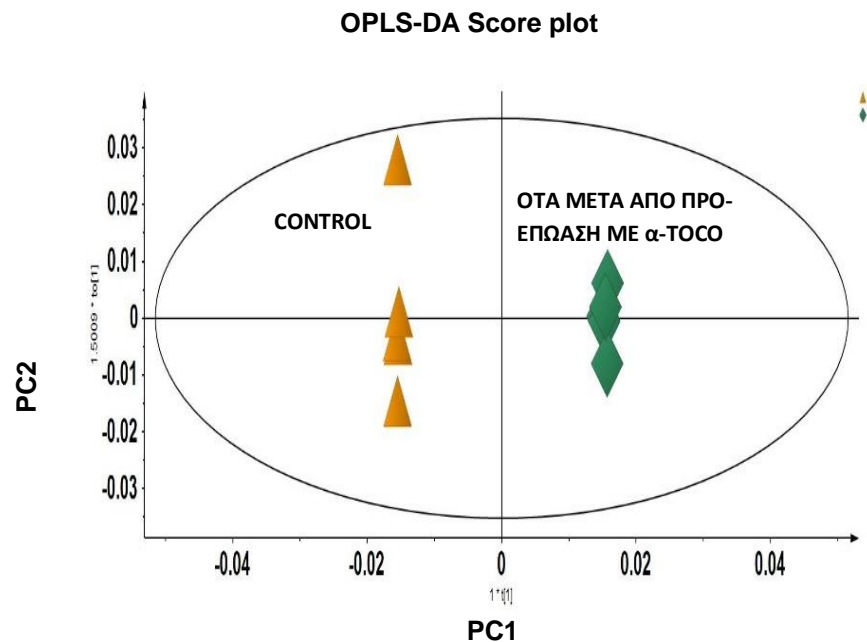
μεταβολιτών-βιοσημαντών (biomarkers). Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες-βιοσημαντές παρουσιάζονται στην εικόνα 3.26. Στην παρούσα μελέτη, η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών των τοξικοτήτων βασίστηκε στην ανάλυση με coefficient plots [217].



Εικόνα 3.27 Coefficient Plot στο οποίο διακρίνονται οι τιμές των Coefficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ των κυττάρων HEK 293 παρουσία α -Τοκοφερόλης 750 μ M και απουσία της, 24 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Οι απόλυτες τιμές είναι ανάλογες της βαρύτητας των αντίστοιχων μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης προέρχονται από 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 την α -Τοκοφερόλη.

Στην εικόνα 3.26 παρουσιάζεται το coefficient plot για τη καταζεύγη σύγκριση της επίδρασης 750 μ M α -Τοκοφερόλης σε κύτταρα HEK 293 ύστερα από 24ωρη επώαση σε σχέση με το μάρτυρα. Ανάμεσα στους μεταβολίτες-βιοσημαντές με τις μεγαλύτερες διακυμάνσεις (υπερ-βιοσύνθεση), μετά την επέμβαση με την OTA, είναι η L-τυροσίνη(L-Tyrosine), η D-γλυκόζη (D-Glucose), η L-θρεονίνη (L-Threonine) η μυοϊνοσιτόλη (Myo-Inositol) και η μονοστεαρίνη (monostearin). Αντίθετα, οι μεταβολίτες που υπο-βιοσυνθέτονται ως αντίδραση στις επεμβάσεις με την OTA είναι το γαλακτικό (Lactate), η γλυκερόλη (Glycerol), η γλυκίνη (Glycine) και η L-κυστεΐνη (L-Cysteine).

3.7.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΕΜΒΑΣΗΣ ΜΕ ΟΤΑ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΠΡΟ-ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ α -ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ ΣΕ ΕΜΒΡΥΙΚΑ ΝΕΦΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK 293

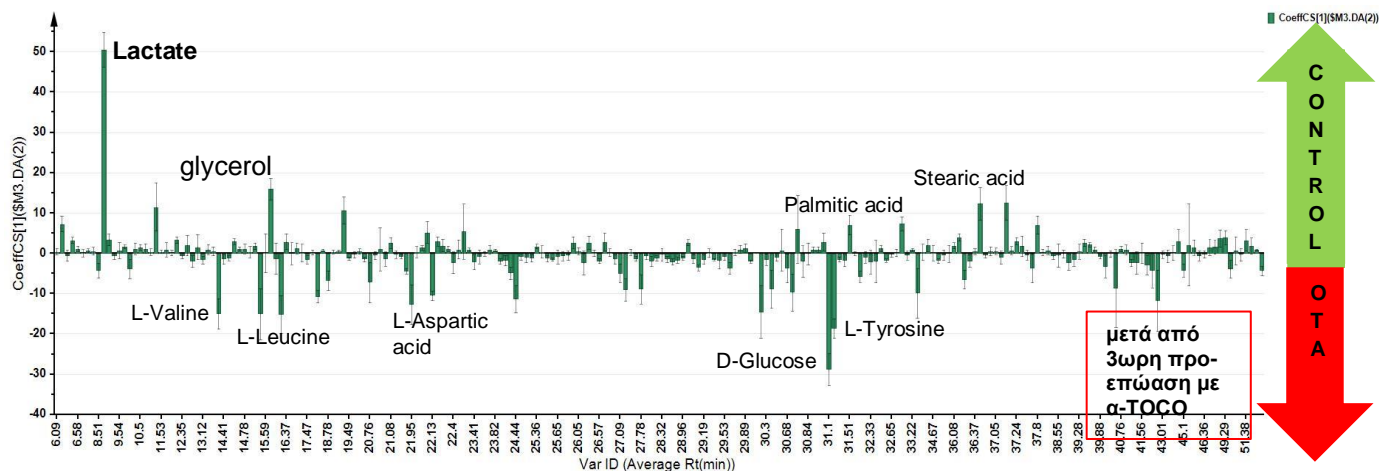


Εικόνα 3.28 OPLS-DA score plot για την επίδραση της ΟΤΑ, ύστερα από την 3ωρη προ-επώαση των κυττάρων με α -Τοκοφερόλη 750 μ M, στο μεταβολισμό των HEK 293 24 ώρες μετά τις επεμβάσεις. (Control=μάρτυρας \blacktriangle , ΟΤΑ μετά από τη προ-επώαση με α -Τοκοφερόλη \blacklozenge). Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T2 σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Κύριες Συνιστώσες, Principal Components).

Το OPLS-DA score plot για το μάρτυρα και τις επεμβάσεις με ΟΤΑ 0.5 μ M έπειτα από 3ωρη προ-επώαση με α -Τοκοφερόλη 750 μ M, έδειξε έναν πολύ καλό διαχωρισμό μεταξύ των καταγεγραμμένων μεταβολικών προφίλ των HEK 293 του μάρτυρα (CONTROL) και κυττάρων που είχαν προ-επωαστεί με 750 μ M α -Τοκοφερόλης και στη συνέχεια υποβλήθει σε 24ωρη επώαση με ΟΤΑ. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως η προ-επώαση με α -Τοκοφερόλη επηρεάζει το μεταβολικό προφίλ των κυττάρων σε σχέση με αυτό που έδειξαν τα κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με ΟΤΑ (Εικόνα 3.27).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η συσχέτιση των παρατηρούμενων φαινοτύπων με την αντίστοιχη μεταβολική σύνθεση των αναλυόμενων δειγμάτων με σκοπό την ανακάλυψη των μεταβολικών-βιοσημαντών (biomarkers). Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες-βιοσημαντές

παρουσιάζονται στην εικόνα 3.28. Στην παρούσα μελέτη, η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών των τοξικοτήτων βασίστηκε στην ανάλυση με coefficient plots [217].



Εικόνα 3.29 Coefficient Plot στο οποίο διακρίνονται οι τιμές των Coefficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ των κυττάρων HEK 293 παρουσία OTA ύστερα από 3ωρη προ-επώαση με α -Τοκοφερόλης 750 μ M και απουσία της, 24 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Οι απόλυτες τιμές είναι ανάλογες της βαρύτητας των αντίστοιχων μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης προέρχονται από 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 OTA μετά από προ-επώαση με α -Τοκοφερόλη.

Στην εικόνα 3.28 παρουσιάζεται το coefficient plot για τη καταζεύγη σύγκριση της επίδρασης της OTA 0.5 μ M μετά από 3ωρη προ-επώαση με 750 μ M α -Τοκοφερόλης σε κύτταρα HEK 293 ύστερα από 24ωρη επώαση σε σχέση με το μάρτυρα. Ανάμεσα στους μεταβολίτες-βιοσημαντές με τις μεγαλύτερες διακυμάνσεις (υπερ-βιοσύνθεση), μετά την επέμβαση, είναι η L-τυροσίνη(L-Tyrosine), η D-γλυκόζη (D-Glucose), η L-βαλίνη (L-Valine), η L-λευκίνη (L-Leucine), και το L-ασπαρτικό οξύ (L-Aspartic acid). Αντίθετα, οι μεταβολίτες που υπο-βιοσυνθέτονται ως αντίδραση στις επεμβάσεις με την OTA είναι το γαλακτικό (Lactate), η γλυκερόλη (Glycerol), το παλμιτικό οξύ (Palmitic acid) και το στεαρικό οξύ (Stearic acid).

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εισπνοή και η διατροφή εκθέτουν τα βιολογικά συστήματα σε μια πληθώρα χημικών ουσιών. Ανάλογα με το βαθμό τοξικότητας, οι χημικές ουσίες προκαλούν βλάβες όταν έρχονται σε επαφή με τους βιολογικούς ιστούς. Οξείες βλάβες προκαλούνται όταν η τοξική ουσία βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση και η επαφή είναι παρατεταμένη. Οι περισσότερες χημικές ουσίες σε μικρές συγκεντρώσεις δεν είναι τοξικές και μετά από σχετικά μικρό διάστημα απορροφώνται, μεταβολίζονται και απεκκρίνονται. Οι κινητικές διεργασίες, σε ιστούς και όργανα, των δράσεων πρόσληψης, απορρόφησης, βιομεταβολισμού, κατανομής των μεταβολιτών, και απέκκρισης μελετώνται από τις διεργασίες της τοξικοκινητικής και τοξικοδυναμικής ξеноβιοτικών χημικών ουσιών. Η δόση και η συσσώρευση των μεταβολιτών σε όργανα στόχους είναι αποτέλεσμα του βιομετασχηματισμού της τοξικής ουσίας [5].

Οι ξеноβιοτικές ουσίες που περιέχουν τοξικά συστατικά οδηγούνται στο πεπτικό σύστημα, από όπου προωθούνται στο ήπαρ για αποτοξίνωση. Η διευκόλυνση της απέκκρισης επιτυγχάνεται με διάφορους βιομετασχηματισμούς των ξеноβιοτικών ουσιών. Στο ήπαρ με μέσω διάφορων ενζυικών μηχανισμών πραγματοποιείται η εκχύλιση του αίματος και η βιομετατροπή του είτε σε χρήσιμα συστατικά, είτε η ταχεία απέκκριση μέσω των νεφρών ή της χολής, στα ούρα ή στα κόπρανα αντίστοιχα. Ο βιομετασχηματισμός των ξеноβιοτικών ουσιών επιτυγχάνεται και σε άλλα όργανα ή ομάδες κυττάρων, όπως τα παρεγχυματικά κύτταρα στο ήπαρ, τα σωληνοειδή κύτταρα των νεφρών, τα Clara και τύπου II κύτταρα στον πνεύμονα, τα επιθηλιακά κύτταρα στο δέρμα, τα κύτταρα του βλεννογόνου των εντέρων και άλλα.

Λαμβάνοντας υπόψη τη νεφροτοξική δράση της ΟΤΑ, η παρούσα μελέτη διεξήχθη για να διερευνηθούν τα αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας της ΟΤΑ σε καλλιέργεια ανθρώπινων εμβρυικών νεφρικών κυττάρων HEK 293, καθώς και η παρεμπόδιση της κυτταροτοξικότητας της με τη χρήση αντιοξειδωτικών παραγόντων. Η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ), είναι και η πιο συχνά απαντώμενη, αλλά και η πιο τοξική ωχρατοξίνη. Η ΟΤΑ είναι νεφροτοξίνη για όλα τα ζωικά είδη που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα και είναι πιθανότατα τοξική για τον άνθρωπο, στον οποίο εμφανίζει τη μεγαλύτερη διάρκεια ημιζωής για την εξάλειψη της σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο οργανισμό [23, 79-83]. Εκτός από τη νεφροτοξική της δράση, μελέτες σε ζώα δείχνουν ότι η ωχρατοξίνη Α είναι ηπατική τοξίνη, ανοσοκατασταλτική [84, 85], ισχυρό τερατογόνο και καρκινογόνο [86, 87]. Επιπλέον, αναστέλλει τη μιτοχονδριακή παραγωγή ATP και διεγείρει την υπεροξειδωση των λιπιδίων [77, 87]. Γενικά, η ΟΤΑ έχει προταθεί ως αιτία διάφορων ανθρωπίνων νεφροπαθειών, συμπεριλαμβανομένης της Βαλκανικής Ενδημικής Νεφροπάθειας (BEN) [93-95]

και της χρόνιας διάμεσης νεφρίτιδας (CIN) [96]. Η Διεθνής Υπηρεσία Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) έχει ταξινομήσει την OTA ως πιθανή ανθρώπινη καρκινογόνο ουσία της Ομάδας 2B, βασισμένη στην αποδεδειγμένη καρκινογένεση σε ζώα [23, 100], αν και η επαγωγή καρκινογένεσης στους ανθρώπους δεν έχει προσδιοριστεί ολοκληρωτικά [86].

Στην πρώτη σειρά πειραματικών δοκιμών που διεξήχθησαν, εκτιμήθηκαν οι επιδράσεις της OTA στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με δοκιμές πρόσληψης της χρωστικής MTT. Η έκθεση των κυτάρων HEK 293 σε αυξανόμενη συγκέντρωση μυκοτοξίνης φάνηκε ότι επάγει κυτταρικό θάνατο με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (Εικόνες 3.1 - 3.2), υποδεικνύοντας ότι η κυτταρική σειρά HEK 293 ήταν ευαίσθητη στις τοξικές επιδράσεις αυτής της μυκοτοξίνης. Διαφορετικές τιμές LC_{50} ελήφθησαν για τις 24 (2.98 μ M) και τις 48 ώρες (2.08 μ M), ωστόσο αποδείχθηκε η κυτταροτοξικότητα της OTA.

Λόγω της εκτεταμένης απειλής για την ανθρώπινη υγεία, η αποτοξίνωση της OTA έχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Έχουν αναπτυχθεί φυσικές, χημικές και βιολογικές μέθοδοι για τη μείωση και / ή την εξάλειψη των τοξικών επιδράσεων των μολυσμένων προϊόντων, τη βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων και την ελαχιστοποίηση των οικονομικών απωλειών [130]. Ένας αυξανόμενος αριθμός *in vitro* και *in vivo* μελετών έχουν πραγματοποιηθεί ώστε να μειωθεί η τοξικότητα και η καρκινογένεση που προκαλεί η OTA [130]. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αντιοξειδωτικά για τη παρεμπόδιση της κυτταροτοξικότητας της OTA στα κύτταρα HEK 293.

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα βιολογικό αντιοξειδωτικό και το κύριο μη πρωτεϊνικό σουλφυδρύλιο που υπάρχει στα κύτταρα. Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί ότι παρουσία OTA η GSH προστατεύει από τη γενετοξικότητα στο ήπαρ, αλλά αυξάνει το τοξικό αποτέλεσμα στα νεφρά [141]. Πράγματι, τα αποτελέσματα βιωσιμότητας μέσω της πρόσληψης της χρωστικής MTT σε ανθρώπινα νεφρικά κύτταρα παρουσία OTA και GSH (Εικόνες 3.3 και 3.4), επιβεβαιώνουν την αύξηση της κυτταροτοξικότητας της OTA παρουσία GSH.

Το Ασκορβικό οξύ είναι ένας ισχυρός αναγωγικός και αντιοξειδωτικός παράγοντας [146], που λειτουργεί ως σαρωτής των ελεύθερων ριζών και εμπλέκεται σε αντιδράσεις αποτοξίνωσης. Η προστατευτική επίδραση της αντιοξειδωτικής βιταμίνης C έναντι της γονιδιοτοξικότητας της OTA σε ποντικούς έχει αποδειχθεί από τους Bose και Sinha [154]. Στη παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας μέσω της πρόσληψης της χρωστικής MTT σε ανθρώπινα νεφρικά κύτταρα κατά τη ταυτόχρονη προσθήκη Ασκορβικού οξέος και OTA (Εικόνες 3.9 και 3.10). Η ταυτόχρονη εισαγωγή Ασκορβικού οξέος 2 mM και OTA 5 μ M οδηγεί σε αύξηση της βιωσιμότητας κατά 116% στην 24ωρη επώαση και κατά 17% στη 48ωρη επώαση των

κυττάρων σε σχέση με την επώαση των κυττάρων μόνο με OTA 5μM. Αντίθετα, η 3ωρη προ-επώαση με Ασκορβικό οξύ δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με την επώαση των κυττάρων μόνο με OTA (Εικόνες 3.9 και 3.10).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των μούρων εξαρτάται από τη περιεκτικότητά τους σε ενώσεις που δρουν ως καθαριστές των ελευθέρων ριζών. Σε αυτές τις ενώσεις ανήκουν τα φαινολικά, τα περισσότερα εκ των οποίων εκφράζουν σχετικές *in vitro* και *in vivo* αντιοξειδωτικές δραστηριότητες και συγκεκριμένα το ασκορβικό οξύ. Το ασκορβικό οξύ εμφανίζεται σε σημαντικές συγκεντρώσεις σε φρέσκα μούρα. Μεταξύ των φρούτων, οι νωπές φράουλες θεωρούνται ότι έχουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ [171]. Παρόλη την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση τα φαινολικά εκχυλίσματα από τις ποικιλίες μούρων AUAL, ANS8, Fengchisang και από τη ποικιλία φράουλας B12 δε παρουσίασαν καμία βελτίωση της κυτταροτοξικότητας της OTA (Εικόνες 3.5, 3.6, 3.7 και 3.8). Πιθανότατα η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε από κάθε ποικιλία (8.4 mg/mL) δεν ήταν αρκετή για την αναστολή της κυτταροτοξικότητας της OTA.

Η βιταμίνη E αποτελεί τυπικό παράδειγμα αντιοξειδωτικής ουσίας φαινολικού χαρακτήρα [110]. Ο κύριος βιολογικός ρόλος της βιταμίνης E είναι η προστασία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (polyunsaturated fatty acids, PUFA) όπως και άλλων συστατικών των κυτταρικών μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (low-density lipoprotein, LDL) από την οξειδωσή τους από τις ελεύθερες ρίζες [111]. Σε ερευνητικές μελέτες έχει διερευνηθεί η προστατευτική δράση της α-Τοκοφερόλης απέναντι στην τοξικότητα της OTA σε κυτταρικές σειρές [112]. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην κυτταροτοξικότητα της OTA και ότι η α-Τοκοφερόλη μπορεί να εξουδετερώνει την κυτταροτοξικότητα της OTA. Στη συγκεκριμένη μελέτη επιβεβαιώθηκε η προστατευτική δράση της α-Τοκοφερόλης απέναντι στην τοξικότητα της OTA σε ανθρώπινα νεφρικά κύτταρα HEK 293. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας μέσω της πρόσληψης της χρωστικής MTT σε ανθρώπινα νεφρικά κύτταρα κατά τη ταυτόχρονη προσθήκη α-Τοκοφερόλης και OTA (Εικόνες 3.9 και 3.10). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά το συνδυασμό OTA (5 μM) και α-Τοκοφερόλης 750 μM κατά 18% στην 24ωρη επώαση των κυττάρων και κατά 18.5% στην 48ωρη επώαση σε σχέση με την επίδραση μόνο της OTA. Η α-Τοκοφερόλη αποτελεί το μόνο αντιοξειδωτικό από αυτά που δοκιμάστηκαν, που κατά την 48ωρη επώαση των κυττάρων με OTA και ουσία με αντιοξειδωτική δράση διατηρεί παρόμοια προστατευτική δράση με αυτή που επιδεικνύει κατά την 24ωρη επώαση. Σύμφωνα με σχετική βιβλιογραφία έχει παρατηρηθεί ότι τριώρη προ-επώαση των κυττάρων με α-Τοκοφερόλη μειώνει σημαντικά την επαγόμενη από OTA μείωση της κυτταρικής

βιωσιμότητας [133]. Πράγματι, τρίωρη προ-επώαση α-Τοκοφερόλης 750 μ M πριν την εισαγωγή OTA στα κύτταρα αύξησε σημαντικά τη βιωσιμότητας των κυττάρων κατά 10.3% στην 24ωρη επώαση και κατά 10.1% στη 48ωρη επώαση (Εικόνες 3.11 και 3.12). Η σημαντικότερη βελτίωση της βιωσιμότητας κυττάρων HEK 293, κατά 54%, παρατηρήθηκε κατά τη 3ωρη προ-επώαση με διάλυμα α-Τοκοφερόλης συγκέντρωσης 1 mM πριν την 24ωρη επώαση των κυττάρων με OTA.

Στο επόμενο σετ πειραμάτων, μελετήθηκε ο μηχανισμός μετανάστευσης των κυττάρων, ο οποίος παίζει κεντρικό ρόλο στην πορεία του καρκίνου και αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό κλειδί της μετάστασης. Η δοκιμή επούλωσης τραύματος χρησιμοποιείται συνήθως για να μελέτη της μετανάστευσης των κυττάρων *in vitro*. Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι μιμείται σε κάποιο βαθμό τη μετανάστευση των κυττάρων *in vivo* [218]. Τα αποτελέσματά έδειξαν ότι η OTA σε υψηλή συγκέντρωση (5 μ M) αύξησε το χρόνο πλήρωσης της σχισμής (Εικόνες 3.13 και 3.14). Το αποτέλεσμα αυτό δικαιολογείται και από το γεγονός ότι η συγκέντρωση OTA που χρησιμοποιήθηκε είναι αρκετά υψηλότερη από το LC₅₀ που υπολογίστηκε. Η ταυτόχρονη εφαρμογή α-Τοκοφερόλης και OTA στα κύτταρα HEK 293 μειώνει στατιστικά σημαντικά το χρόνο επούλωσης του τραύματος. Σε αντίθεση με τις δοκιμές βιωσιμότητας η προ-επώαση των κυττάρων με α-Τοκοφερόλη πριν τη εισαγωγή της OTA στα κύτταρα δε φαίνεται να επηρεάζει στατιστικά σημαντικά τον χρόνο επούλωσης της πληγής (Εικόνες 3.13 και 3.14).

Το οξειδωτικό στρες είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην κυτταροτοξικότητα της OTA. Έχει αναφερθεί ότι η α-Τοκοφερόλη μπορεί να εξουδετερώνει την κυτταροτοξικότητα της OTA λόγω της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), ενώ έχει παρατηρηθεί ότι τρίωρη προ-επώαση των κυττάρων με α-τοκοφερόλη μειώνει σημαντικά την επαγόμενη από OTA μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας και την παραγωγή ROS [133]. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης επιβεβαιώνουν τα παραπάνω, καθώς παρατηρήθηκε ότι η επώαση των κυττάρων με OTA αυξάνει σημαντικά την παραγωγή ROS, ενώ η προσθήκη α-Τοκοφερόλης και OTA οδηγεί στη μείωση των ROS. Έτσι, Κατά την 24ωρη επώαση με OTA 1 μ M σημειώνονται αυξημένα επίπεδα ROS, ενώ κατά τη προσθήκη συνδυασμού α-Τοκοφερόλης 750 μ M και OTA 1 μ M παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων ROS κατά 73.3%.

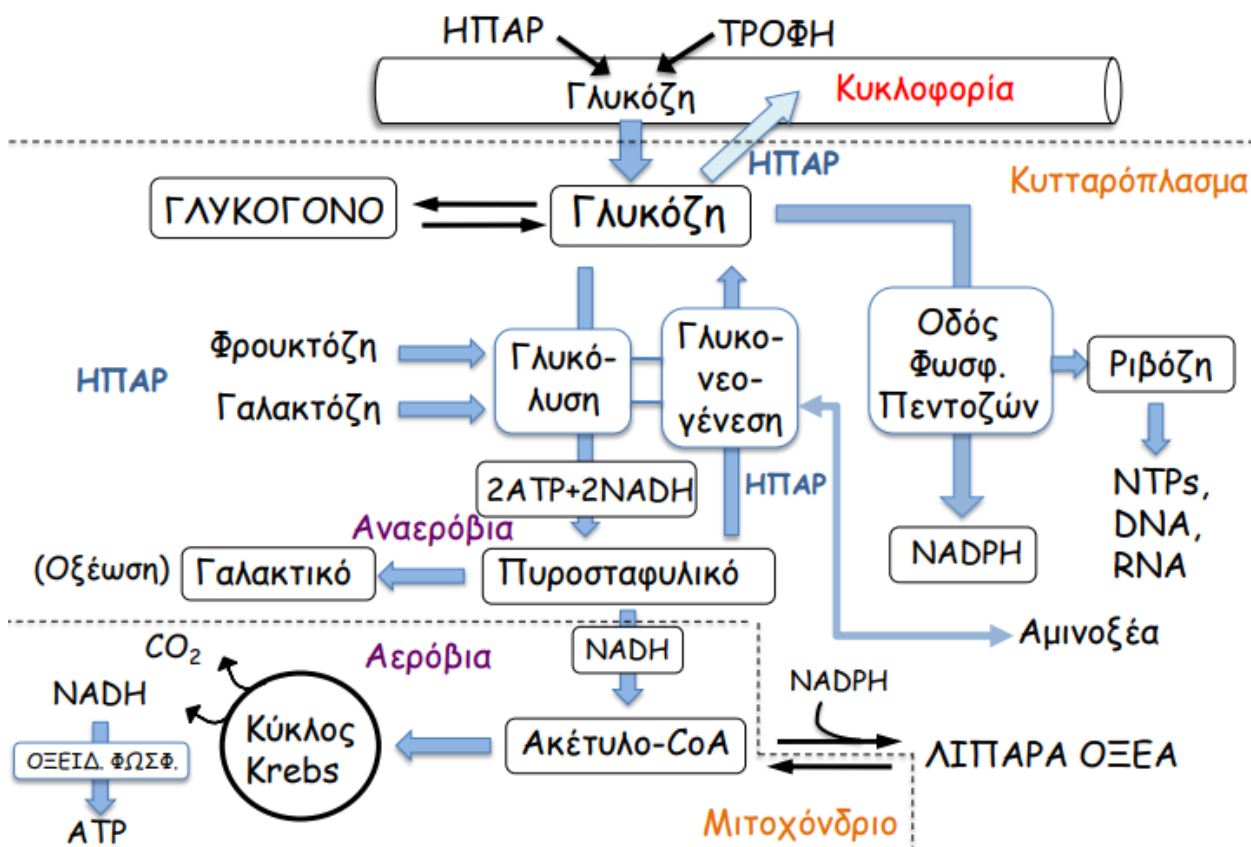
Η διαταραχή της ομοιόστασης του ασβεστίου, που οδηγεί σε μια συνεχή αύξηση του επιπέδου του κυτταροπλασματικού ασβεστίου, έχει συσχετισθεί με τη κυτταροτοξικότητα και αποτελεί απόκριση σε μια ποικιλία παραγόντων σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων [219]. Η Ωχρατοξίνη A αυξάνει τη δραστηριότητα του κυτταροπλασματικού Ca²⁺, γεγονός που πιθανόν προκύπτει από την είσοδο Ca²⁺ από τον εξωκυτταρικό χώρο. Έτσι, η ωχρατοξίνη A πιθανότατα ενεργοποιεί διαπερατά κανάλια κατιόντων Ca²⁺ [220]. Παρόλα αυτά, στη παρούσα μελέτη,

παρατηρήθηκε μείωση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου με τη προσθήκη 1 μM OTA στα κύτταρα ύστερα από 24ωρη και 48ωρη επώαση, και ανάκαμψη του κυτταροπλασματικού ασβεστίου στα φυσιολογικά επίπεδα του μάρτυρα κατά τη ταυτόχρονη εισαγωγή α -Τοκοφερόλης και OTA, ύστερα από 24ωρη επώαση.

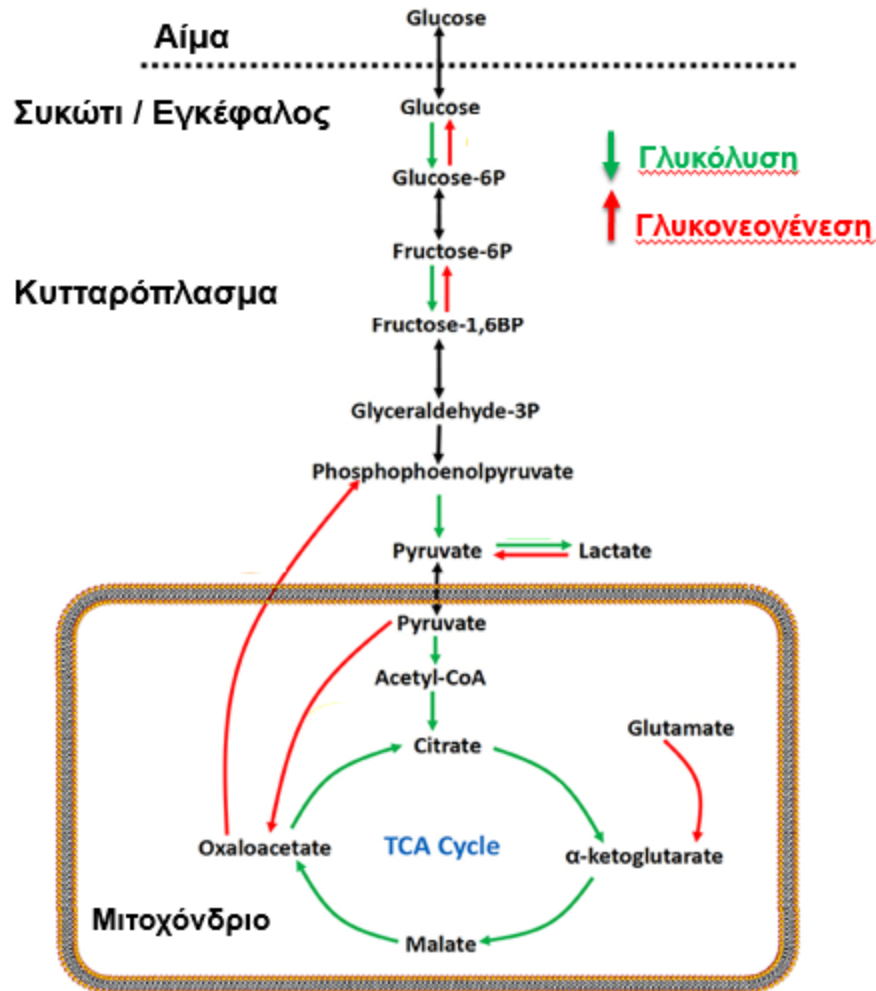
Η κατασκευή μεταβολικού προφίλ είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της τοξικότητας καθώς παρέχει μια μοναδική μηχανιστική προοπτική όσον αφορά τις τοξικές προσβολές. Τα τελευταία χρόνια, η μεταβολική έχει εφαρμοστεί ευρέως στην ανακάλυψη βιοδεικτών [221] και μεταβολικών δακτυλικών αποτυπωμάτων στην ανακάλυψη φαρμάκων και στην κλινική τοξικολογία [222], ειδικά όσον αφορά τη διερεύνηση των συστηματικών μεταβολικών αποκρίσεων σε τοξίνες [223] και άλλους συναφείς μηχανισμούς [224]. Οι διαφοροποιήσεις που λαμβάνουν χώρα σε διάφορες μεταβολικές οδούς λόγω της επίδρασης της OTA εξακολουθούν να μην είναι σαφείς. Έχει πραγματοποιηθεί σειρά μελετών για τη διερεύνηση των επιπτώσεων της έκθεσης σε OTA από πρωτεομικής, μεταγραφομικής και μεταβολομικής σκοπιάς [225]. Μεταβολομική ανάλυση της επίδρασης της OTA σε ποντίκια έδειξε ότι οι μεταβολικές διαφορές μεταξύ ποντικών μαρτύρων και ποντικών υπό την επίδραση OTA περιλαμβάνουν κυρίως γλυκοπρωτεΐνες, γλυκόζη, αμινοξέα και καρβοξυλικά οξέα, όπως γαλακτικό, ισοβουτυρικό, αλανίνη, ΤΜΑΟ, θρεονίνη και κρεατινίνη. Οι μεταβολικές οδοί που είναι γνωστό ότι τροποποιούνται λόγω της έκθεσης σε OTA έχουν σχέση με το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης (Pentose Phosphate Pathway–PPP), τον κύκλο του Krebs (Tricarboxylic acid cycle, Krebs cycle ή TCA), την οδό κρεατίνης και τη γλυκονεογένεση [225].

Στη παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μεταβολομική ανάλυση της επίδρασης της OTA σε κύτταρα HEK 293 ύστερα από 24ωρη επώαση. Τα πρώιμα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης του ενδομεταβολώματος των κυττάρων έδειξαν πως ανάμεσα στους μεταβολίτες-βιοσημαντές με τις μεγαλύτερες διακυμάνσεις (υπερ-βιοσύνθεση), μετά την επέμβαση με την OTA, είναι η L-τυροσίνη(L-Tyrosine), η L-βαλίνη (L-Valine), η L-λευκίνη (L-Valine), η D-γλυκόζη (D-Glucose), η μυοϊνοσιτόλη (Myo-Inositol) και η μονοστεαρίνη (monostearin). Αντίθετα, οι μεταβολίτες που υπο-βιοσυνθέτονται ως αντίδραση στις επεμβάσεις με την OTA είναι το γαλακτικό οξύ (Lactate), η γλυκερόλη (Glycerol), η γλυκίνη (Glycine) και η L-ισολευκίνη (L-Isoleucine) (Εικόνα 3.24). Έτσι, τα επίπεδα των γλυκογονικών αμινοξέων, όπως βαλίνης και τυροσίνης, ήταν σημαντικά αυξημένα στις ομάδες που εκτέθηκαν σε OTA και σε συνδυασμό με τη σημαντική μείωση του γαλακτικού, της γλυκερόλης και της γλυκίνης, η OTA πιθανότατα ρυθμίζει θετικά τη γλυκονεογένεση. Συνεπώς η έκθεση σε OTA οδηγεί στην τροποποίηση του μεταβολισμού της γλυκόζης, ώστε να ικανοποιηθούν οι απαιτήσεις του μεταβολισμού της OTA

και να ενισχυθεί ο ενεργειακός μεταβολισμός [225]. Η αυξημένη λευκίνη που παρατηρήθηκε κατά τη μεταβολική ανάλυση είναι ένα από τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας, και αποτελεί βιοδείκτη που εμπλέκεται στο μοντέλο που προβλέπει πρόωρα φαινόμενα νεφροτοξικότητας. Μελέτες σε ανθρώπους και ζώα δείχνουν ότι η νεφρική δυσλειτουργία είναι συνδεδεμένη με εκτεταμένες αλλαγές στην αποικοδόμηση, στη σύνθεση, ή στην έκκριση των αρωματικών αμινοξέων, φαινυλαλανίνης και τυροσίνης, καθώς και στη σύνθεση, στο μεταβολισμό ή στην απέκκριση μεταβολιτών αυτών των αμινοξέων. Έτσι, τα αυξημένα επίπεδα τυροσίνης που παρατηρήθηκαν πιθανότατα συνδέονται με τη νεφρική τοξικότητα που προκαλεί η ΟΤΑ. Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα μυο-ινοσιτόλης που ανιχνεύτηκαν επιβεβαιώνονται και από προηγούμενες μελέτες της επίδρασης της ΟΤΑ σε ποντίκια. Γενικά, η μυοϊνοσιτόλη είναι ένα από τους πιο άφθονους οσμολύτες και είναι βιοδείκτης πρώιμης τοξικής επίδρασης [226]. Τέλος, η αυξημένη παρατηρούμενη μονοστεαρίνη είναι ένα μόριο μακριάς αλυσίδας που τυπικά απαντάται στο σώμα ως υποπροϊόν της διάσπασης των λιπών. Αποτελεί ένα μεταβολικό βιολογικό δείκτη για ανίχνευση και διάγνωση καρκίνου.



Εικόνα 4.1 Μεταβολικό δίκτυο των υδατανθράκων των θηλαστικών.



Εικόνα 4.2 Μεταβολική διαδικασία της γλυκονογένεσης [224].

Γενικά παρατηρείται σημαντική έλλειψη κατανόησης της πολυπλοκότητας του μεταβολισμού της βιταμίνης E. Στη παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μεταβολομική ανάλυση της επίδρασης της α-Τοκοφερόλης σε κύτταρα HEK 293 ύστερα από 24ωρη επώαση. Τα πρώιμα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης του ενδομεταβολόματος των κυττάρων έδειξαν πως ανάμεσα στους μεταβολίτες-βιοσημαντές με τις μεγαλύτερες διακυμάνσεις (υπερ-βιοσύνθεση), μετά την επέμβαση με την α-Τοκοφερόλη, είναι η L-τυροσίνη(L-Tyrosine), η D-γλυκόζη (D-Glucose), η L-θρεονίνη (L-Threonine) η μυοϊνσιτόλη (Myo-Inositol) και η μονοστεαρίνη (monostearin). Αντίθετα, οι μεταβολίτες που υπο-βιοσυνθέτονται ως αντίδραση στις επεμβάσεις με την OTA είναι το γαλακτικό (Lactate), η γλυκερόλη (Glycerol), η γλυκίνη (Glycine) και η L-κυστεΐνη(L-Cysteine) (Εικόνα 3.25). Δυστυχώς τα πρώιμα αποτελέσματα σε αυτή τη περίπτωση δεν επιτρέπουν την εξαγωγή βάσιμης υπόθεσης για την επίδραση της α-Τοκοφερόλης στον μεταβολισμό των ανθρώπινων νεφρικών κυττάρων HEK 293. Η μείωση του γαλακτικού οξέος, της γλυκερόλης και της γλυκίνης ίσως οδηγεί σε αυξημένη γλυκονογένεση λόγω της εφαρμογής α-Τοκοφερόλης, σε πολύ μικρότερο βαθμό από ότι η OTA όπως φαίνεται στις εικόνες 3.24 και 3.25.

Τέλος, κατασκευάστηκε το μεταβολομικό προφίλ των κυττάρων HEK 293 υπό την 24ωρη επίδραση OTA, ύστερα από τρίωρη προ-επώαση των κυττάρων με α-Τοκοφερόλη. Ανάμεσα

στους μεταβολίτες-βιοσημαντές με τις μεγαλύτερες διακυμάνσεις (υπερ-βιοσύνθεση), μετά την επέμβαση, είναι η L-τυροσίνη(L-Tyrosine), η D-γλυκόζη (D-Glucose), η L-βαλίνη (L-Valine), η L-λευκίνη (L-Leucine), και το L-ασπαρτικό οξύ (L-Aspartic acid). Αντίθετα, οι μεταβολίτες που υποβιοσυνθέτονται ως αντίδραση στις επεμβάσεις με την ΟΤΑ είναι το γαλακτικό (Lactate), η γλυκερόλη (Glycerol), το παλμιτικό οξύ (Palmitic acid) και το στεαρικό οξύ (Stearic acid) (Εικόνα 3.28). Η προ-επώαση με α-Τοκοφερόλη φαίνεται να μετρίασε τη κυτταροτοξικότητα λόγω της επίδρασης της ΟΤΑ, καθώς οι αποκλίσεις όσον αφορά τους μεταβολίτες, σε σχέση με τον μάρτυρα φαίνεται να μειώθηκαν μειώθηκαν ποσοτικά (Εικόνες 3.24 και 3.28).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά της μελέτης επιβεβαιώνουν τη κυτταροτοξικότητα και την επαγωγή οξειδωτικού στρες της ΟΤΑ σε ανθρώπινα νεφρικά κύτταρα HEK 293. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η προστατευτική δράση της α-Τοκοφερόλης έναντι της ΟΤΑ όταν χορηγείται ταυτόχρονα με τη μυκοτοξίνη στα κύτταρα ή πριν από αυτή. Δοκιμάστηκαν κι άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες, Γλουταθειόνη, Φαινολικά Εκχυλίσματα από ποικιλίες μούρων και Ασκορβικό οξύ χωρίς την ίδια επιτυχία με την α-Τοκοφερόλη. Τέλος, η μεταβολομική ανάλυση οδήγησε στη συσχέτιση της κυτταροτοξικής δράσης της ΟΤΑ με βιολογικά μεταβολικά μονοπάτια στα κύτταρα. Τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης που παρουσιάστηκαν στην μελέτη είναι πρώιμα και αναμένεται η πλήρης ανάλυση του εξω- και ενδο- μεταβολόματος των κυττάρων.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Duffus, J., Worth, H., *Fundamental Toxicology for Chemists*. 1996, Cambridge:: Royal Society of Chemistry.
2. Ottoboni, A., *The dose makes the poison : a plain-language guide to toxicology*. 1991, New York: Van Nostrand Reinhold.
3. Orfila, M., *Traité des poisons*. 1814.
4. Hodgson, E., *A Textbook of Modern Toxicology*. Third Edition ed. 2004, Hoboken: John Wiley & Sons.
5. Βαλαβανίδης, Α. and Θ. Βλαχογιάννη, *Περιβαλλοντική Χημεία και Οικοτοξικολογία. Διαχείριση Οικοσυστημάτων – Εκτίμηση Οικολογικού Κινδύνου*. 2008, Αθήνα: Εκδοση του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
6. Ballantyne, B., Marrs, T., Turner, P., *General and Applied Toxicology*. 1993, London: Macmillan.
7. Klaassen, C.D., Casarett, L. J., Doull, J., *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons* 8th ed. 2013, New York: McGraw-Hill Education / Medical.
8. Μαρσέλος, Μ., Λεονταρίτης, Γ., Αντωνίου, Α., Κωνσταντή, Μ., Μανωλόπουλος, Ε., Παππάς, Π., Χαρκίτης, Π., *Βιοχημική φαρμακολογία*. 2015, Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών.
9. Campbell, T., *Modern concepts in nutritional status and foreign*, in *Advances in Modern Toxicology*, M. Mehlman, Shapiro, R., Blumenthal, H. , Editor. 1976: Washington.
10. Alexander, D.E., *Bioaccumulation, Bioconcentration, Biomagnification*, in *Encyclopedia of Environmental Science*, D.E. Alexander, Fairbridge, R.W., Editor. 1999, Springer: Dordrecht, Netherlands.

11. Chanter, D.O. and R. Heywood, *The LD50 test: some considerations of precision*. Toxicol Lett, 1982. **10**(2-3): p. 303-7.
12. Gad, S., Weil, C., *Statistics for toxicologists.*, in *Principles and Methods of Toxicology*, A. Wallace, Editor. 1982, Raven Press: New York.
13. Vouk VB, B.G., Hoel DG, Peckall DB, *Methods for Estimating Risk of Chemical Injury: Human and Non-Human Biota and Ecosystems*. 1985, Chichester: Wiley.
14. Ekwall, B., *Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures*. Ann N Y Acad Sci, 1983. **407**: p. 64-77.
15. Klaassen, D., Stacey, N.H., *Use of isolated hepatocytes in toxicity assessment*, in *Toxicology of the Liver*, G. Plaa, Hewitt, W.R. , Editor. 1982, Raven Press: New York.
16. Auricchio, S., et al., *Toxicity mechanisms of wheat and other cereals in celiac disease and related enteropathies*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1985. **4**(6): p. 923-30.
17. Bennett, J.W. and M. Klich, *Mycotoxins*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(3): p. 497-516.
18. Kovalsky, P., et al., *Co-Occurrence of Regulated, Masked and Emerging Mycotoxins and Secondary Metabolites in Finished Feed and Maize-An Extensive Survey*. Toxins (Basel), 2016. **8**(12).
19. Righetti, L., et al., *Recent Advances and Future Challenges in Modified Mycotoxin Analysis: Why HRMS Has Become a Key Instrument in Food Contaminant Research*. Toxins (Basel), 2016. **8**(12).
20. Streit, E., et al., *Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia*. J Sci Food Agric, 2013. **93**(12): p. 2892-9.
21. Bennett, J.W., *Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia*. Mycopathologia, 1987. **100**(1): p. 3-5.
22. Liew, W.P. and S. Mohd-Redzwan, *Mycotoxin: Its Impact on Gut Health and Microbiota*. Front Cell Infect Microbiol, 2018. **8**: p. 60.
23. IARC, *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally.*, in *International Agency for Research on Cancer*; 1993: Lyon. p. 489-521.
24. Reverberi, M., et al., *Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010. **87**(3): p. 899-911.
25. EC, *2013/165/EU Commission Recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products Text with EEA relevance*. 2013.
26. Kovac, M., et al., *Yesterday masked, today modified; what do mycotoxins bring next?* Arh Hig Rada Toksikol, 2018. **69**(3): p. 196-214.
27. Steyn, P.S., *Mycotoxins, general view, chemistry and structure*. Toxicol Lett, 1995. **82-83**: p. 843-51.
28. Mohd-Redzwan, S., et al., *A mini review on aflatoxin exposure in Malaysia: past, present and future*. Front Microbiol, 2013. **4**: p. 334.
29. Fink-Gremmels, J., *Mycotoxins: their implications for human and animal health*. Vet Q, 1999. **21**(4): p. 115-20.
30. Creppy, E.E., *Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe*. Toxicol Lett, 2002. **127**(1-3): p. 19-28.
31. van Egmond, H.P., R.C. Schothorst, and M.A. Jonker, *Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context*. Anal Bioanal Chem, 2007. **389**(1): p. 147-57.
32. Egmond, H.P., Speijers, A., *Survey of data on the incidence and levels of ochratoxin A in food and animal feed worldwide* Nat. Toxins 1994. **3**: p. 125-144.
33. Rai, M. and A. Varma, *Mycotoxins in food, feed and bioweapons*. 2010, Heidelberg ; New York: Springer. xviii, 405 : ill. (some col.) ; 25 cm.
34. Pitt, J.I., *Toxigenic fungi and mycotoxins*. Br Med Bull, 2000. **56**(1): p. 184-92.
35. Hussain, A.M., *Mycotoxins as carcinogens*. Basic Life Sci, 1985. **34**: p. 87-96.

36. Shotwell, O.L., et al., *Survey of 1975 wheat and soybeans for aflatoxin, zearalenone, and ochratoxin*. J Assoc Off Anal Chem, 1977. **60**(4): p. 778-83.
37. Tashiro, F., et al., *Zearalenone reductase from rat liver*. J Biochem, 1983. **93**(6): p. 1557-66.
38. Quispe, X., et al., *Genetic basis of mycotoxin susceptibility differences between budding yeast isolates*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 9173.
39. Viegas, S., et al., *Environmental microbiology for public health--capturing international developments in the field*. Res Microbiol, 2015. **166**(7): p. 555-6.
40. Peraica, M., et al., *Toxic effects of mycotoxins in humans*. Bull World Health Organ, 1999. **77**(9): p. 754-66.
41. Bryden, W.L., *Mycotoxins in the food chain: human health implications*. Asia Pac J Clin Nutr, 2007. **16 Suppl 1**: p. 95-101.
42. Gajecka, M., et al., *The expression of type-1 and type-2 nitric oxide synthase in selected tissues of the gastrointestinal tract during mixed mycotoxicosis*. Toxins (Basel), 2013. **5**(11): p. 2281-92.
43. Hussein, H.S. and J.M. Brasel, *Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals*. Toxicology, 2001. **167**(2): p. 101-34.
44. Wagacha, J.M. and J.W. Muthomi, *Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies*. Int J Food Microbiol, 2008. **124**(1): p. 1-12.
45. Williams, J.H., et al., *Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(5): p. 1106-22.
46. Gong, Y., et al., *Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa*. Environ Health Perspect, 2004. **112**(13): p. 1334-8.
47. Turner, P.C., *The molecular epidemiology of chronic aflatoxin driven impaired child growth*. Scientifica (Cairo), 2013. **2013**: p. 152879.
48. Barrett, J.R., *Mycotoxins: of molds and maladies*. Environ Health Perspect, 2000. **108**(1): p. A20-3.
49. Berthiller, F., et al., *Masked mycotoxins: a review*. Mol Nutr Food Res, 2013. **57**(1): p. 165-86.
50. Berthiller, F., et al., *Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins*. Anal Bioanal Chem, 2009. **395**(5): p. 1243-52.
51. Rychlik, M., et al., *Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including "masked" mycotoxins*. Mycotoxin Res, 2014. **30**(4): p. 197-205.
52. EFSA, *Annual Report of European Food Safety Authority*. 2009.
53. Upadhaya, S., Park, M., Ha, J., *Mycotoxins and Their Biotransformation in the Rumen. A review*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2010. **23**(9): p. 1250-1260.
54. Eaton, D.L. and E.P. Gallagher, *Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1994. **34**: p. 135-72.
55. FAO, *Economic Analysis of Supply and Demand for Food up to 2030, in Focus on Fish and Fishery Products*. 2014: Rome.
56. Anater, A., Manyes, L., Meca, G., Ferrer, E., Luciano, F. B., Pimpão, C. T., *Mycotoxins and their consequences in aquaculture: a review*. Aquaculture, 2016. **451**: p. 1-10.
57. Medina, Á., Rodríguez, A., and Magan, N., *Climate change and mycotoxigenic fungi: impacts on mycotoxin production*. Curr. Opin. Food Sci., 2015. **5**: p. 99-104.
58. Banati, H., et al., *Determination of Mycotoxin Production of Fusarium Species in Genetically Modified Maize Varieties by Quantitative Flow Immunocytometry*. Toxins (Basel), 2017. **9**(2).
59. Dobolyi C., S.F., Varga J., Kocsubé S., Szigeti G., Baranyi N., Szécsi A., Tóth B., Varga M., Kriszt B., Szoboszlay S., Krifaton C., Kukolya J., *Occurrence of aflatoxin producing Aspergillus flavus isolates in maize kernel in Hungary* Acta Alimentaria, 2013. **42**: p. 421-459.
60. Wei, D.L. and S.C. Jong, *Production of aflatoxins by strains of the Aspergillus flavus group maintained in ATCC*. Mycopathologia, 1986. **93**(1): p. 19-24.

61. Shotwell, L.L., C. W. Hesseltine, and M. L. Goulden., *Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample*. Appl. Microbiol., 1969. **17**: p. 765–766.
62. Abarca, M.L., et al., *Ochratoxin A production by strains of Aspergillus niger var. niger*. Appl Environ Microbiol, 1994. **60**(7): p. 2650-2.
63. Bayman, P., et al., *Ochratoxin production by the Aspergillus ochraceus group and Aspergillus alliaceus*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(5): p. 2326-9.
64. Ciegler, A., et al., *Ochratoxin synthesis by Penicillium species*. Naturwissenschaften, 1972. **59**(8): p. 365-6.
65. Bui-Klimke, T.R. and F. Wu, *Ochratoxin A and human health risk: a review of the evidence*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2015. **55**(13): p. 1860-9.
66. Benford, D., Boyle, C., Dekant, W., Fuchs, E., Gaylor, D.W., Hard, G., McGregory, D.B., Pitt, J.I., Plestina, R., Shephard, G., Solfrizzo, M., Verger, P.J.P., Walker, R., *Ochratoxin A Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Food Additives Series 47*. FAO Food and Nutrition Paper, 2001. **74**: p. 281–415.
67. Heenan, C.N., K. J. Shaw, J. I. Pitt., *Ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius and A. niger isolates and detection using coconut cream agar*. J. Food Mycol. , 1998. **1**: p. 67–72.
68. Teren, J., et al., *Immunochemical detection of ochratoxin A in black Aspergillus strains*. Mycopathologia, 1996. **134**(3): p. 171-6.
69. Chu, F.S., *Mycotoxins—occurrence and toxic effect*, in *Encyclopedia of human nutrition*, J.J.S. Sadler, B. Caballero, Editor. 1998, Academic Press: New York. p. 858–869.
70. Pitt, J.I., *Penicillium viridicatum, Penicillium verrucosum, and production of ochratoxin A*. Appl Environ Microbiol, 1987. **53**(2): p. 266-9.
71. Krogh, P., *Mycotoxins in Food*. Academic Press,, 1987.
72. Lombaert, G.A., et al., *Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market*. Food Addit Contam, 2003. **20**(5): p. 494-504.
73. Hoehler, D., et al., *Free radical generation as induced by ochratoxin A and its analogs in bacteria (Bacillus brevis)*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27388-94.
74. Xiao, H., Madhyastha, S., Marquardt, R.R., Li, S.; Vodela, J.K., Frohlich, A.A., Kemppainen, B.W.I. , *Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: Structure-activityrelationships*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1996. **137**: p. 182–192.
75. Koszegi, T. and M. Poor, *Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level*. Toxins (Basel), 2016. **8**(4): p. 111.
76. Weidenborner, M., *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. 2001, Berlin: Springer-Verlag.
77. Marquardt, R.R. and A.A. Frohlich, *A review of recent advances in understanding ochratoxicosis*. J Anim Sci, 1992. **70**(12): p. 3968-88.
78. Pitt, J.I., *Toxigenic fungi: which are important?* Med Mycol, 2000. **38 Suppl 1**: p. 17-22.
79. Duarte, S., et al., *Monitoring of ochratoxin A exposure of the Portuguese population through a nationwide urine survey--Winter 2007*. Sci Total Environ, 2010. **408**(5): p. 1195-8.
80. Hagelberg, S., Hult, K, Fuchs, R. , *Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasmabinding properties*. J Appl Toxicol., 1989. **9**: p. 91–96.
81. Krogh, P., *Mycotoxic porcine nephropathy: A possible model for Balkan endemic nephropathy*, in *Endemic Nephropathy*, A. Puhlev, Editor. 1974, Publishing House of the Bulgarian Academy of Science: Sofia. p. 266-270.
82. Kuiper-Goodman, T., *Risk assessment and risk management of mycotoxins in food.*, in *Mycotoxins in Food. Detection and Control.*, N. Magan, Olsen, M., Editor. 2004, CRC Press: Boca Raton. p. 3-31.

83. WHO, *Evaluation of certain mycotoxins in food*, in *Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, W.H. Organization, Editor. 2002: Geneva. p. 27-35.
84. Bondy, G.S. and J.J. Pestka, *Immunomodulation by fungal toxins*. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2000. **3**(2): p. 109-43.
85. Pestka, J., Bondy, GS. . *Mycotoxin-induced immunomodulation*, in *Immunotoxicology and immunopharmacology*, J. Dean, Luster, Ml., Munson, AE., Kimber, I.,, Editor. 1994, Raven Press: New York. p. 163-182.
86. Beardall, J.M., Miller, J. D., *Disease in humans with mycotoxins as possible causes*, in *Mycotoxins in grains. Compounds other than aflatoxin*, J.D. Miller, Trenholm, H. L., Editor. 1994, Eagan Pres: St.Paul
87. Kuiper-Goodman, T. and P.M. Scott, *Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A*. *Biomed Environ Sci*, 1989. **2**(3): p. 179-248.
88. Schwartz, G.G., *Hypothesis: does ochratoxin A cause testicular cancer?* *Cancer Causes Control*, 2002. **13**(1): p. 91-100.
89. Boesch-Saadatmandi, C., et al., *Effect of ochratoxin A on redox-regulated transcription factors, antioxidant enzymes and glutathione-S-transferase in cultured kidney tubulus cells*. *Food Chem Toxicol*, 2008. **46**(8): p. 2665-71.
90. Malekinejad, H., A.A. Farshid, and N. Mirzakhani, *Liquorice plant extract reduces ochratoxin A-induced nephrotoxicity in rats*. *Exp Toxicol Pathol*, 2011. **63**(1-2): p. 125-30.
91. Burns, R.P., Dwivedi., P. , *The natural occurrence of ochratoxin A and its effects in poultry. A review. Part II. Pathology and immunology*. *World Poultry Sci.* , 1982. **42**: p. 48–62.
92. Hamilton, P.B., et al., *Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry*. *Poult Sci*, 1982. **61**(9): p. 1832-41.
93. Barnes, J.M., et al., *Balkan (endemic) nephropathy and a toxin-producing strain of *Penicillium verrucosum* var *cyclopium*: An experimental model in rats*. *Lancet*, 1977. **1**(8013): p. 671-5.
94. Castegnaro, M., et al., *Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers*. *Mol Nutr Food Res*, 2006. **50**(6): p. 519-29.
95. Pfohl-Leszkowicz, A., et al., *Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins*. *Food Addit Contam*, 2002. **19**(3): p. 282-302.
96. Abid, S., et al., *Ochratoxin A and human chronic nephropathy in Tunisia: is the situation endemic?* *Hum Exp Toxicol*, 2003. **22**(2): p. 77-84.
97. Castegnaro, M., Barsch, H., Chernozemsky, I. , *Endemic nephropathy and urinary tract tumors in the Balkans*. *Cancer Res.*, 1987. **47**: p. 3606–3609.
98. Sweeney, M.J., White, S., Dobson, A. D. W. , *Mycotoxins in agriculture and food safety*. *Irish J. Agric. Food. Res.* , 2000. **39**: p. 235–244.
99. Jelinek, C.P.A., Pohland, E., Wood, G. E., *Worldwide occurrence of mycotoxins in food and feeds, an update*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1989. **72**: p. 223–247.
100. Fazekas, B., A. Tar, and M. Kovacs, *Ochratoxin a content of urine samples of healthy humans in Hungary*. *Acta Vet Hung*, 2005. **53**(1): p. 35-44.
101. Canada, H., *Information Document on Health Canada’s Proposed Maximum Limits (Standards) for the Presence of the Mycotoxin Ochratoxin A in Foods.*, S. B., Editor. 2009: Ottawa.
102. Evans, H.M., Bishop, K.S., *On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction*. *Science* 1922. **56**: p. 650-651.
103. Fernholz, E., *On the Constitution of α -Tocopherol*. *J. Am. Chem. Soc.* , 1938. **60**(3): p. 700-705.
104. Litwack, G., *Vitamins and Hormones*. 2007: Academic Press.

105. Constantinou, C., A. Papas, and A.I. Constantinou, *Vitamin E and cancer: An insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(4): p. 739-52.
106. Christen, S., et al., *gamma-tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO(X) and complements alpha-tocopherol: physiological implications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(7): p. 3217-22.
107. Cooney, R.V., et al., *Gamma-tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to alpha-tocopherol*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(5): p. 1771-5.
108. Patel, A., et al., *Vitamin E chemistry. Nitration of non-alpha-tocopherols: products and mechanistic considerations*. *J Org Chem*, 2007. **72**(17): p. 6504-12.
109. Smolarek, A.K. and N. Suh, *Chemopreventive activity of vitamin E in breast cancer: a focus on gamma- and delta-tocopherol*. *Nutrients*, 2011. **3**(11): p. 962-86.
110. Engin, K.N., *Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant*. *Molecular vision*, 2009. **15**: p. 855-60.
111. Preedy, V.R., Watson, R.R., *The Encyclopedia of Vitamin E*. 2007, Cambridge: CABI Publishing.
112. Engelking, L., *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*. 2014: Academic Press.
113. Urano, S., et al., *Mobility and molecular orientation of vitamin E in liposomal membranes as determined by 19F NMR and fluorescence polarization techniques*. *Arch Biochem Biophys*, 1993. **303**(1): p. 10-4.
114. Jaja, S.I., Aigbe, P. E., Gbeneditise, S., Temiye, E. O. , *Changes in erythrocytes following supplementation with alpha-tocopherol in children suffering from sickle cell anaemia*. *Niger. Postgrad. Med. J.* , 2005. **12**: p. 110–114.
115. Krishnamurthy, S., Bai, N. J. & George, T, *Mechanism of oxidative lysis and lipid peroxidation of vitamin E-deficient erythrocytes*. *Indian J. Biochem. Biophys.* , 1984. **21**: p. 361–364
116. Ahmad, I., Suhail, M. , *Protective role of vitamin E on mefenamic acid-induced alterations in erythrocytes*. *Biochemistry (Mosc)*, 2002. **67**: p. 945–948.
117. Oski, F.A. and L.A. Barness, *Hemolytic anemia in vitamin E deficiency*. *Am J Clin Nutr*, 1968. **21**(1): p. 45-50.
118. Pillai, S.R., et al., *Concomitant brainstem axonal dystrophy and necrotizing myopathy in vitamin E-deficient rats*. *J Neurol Sci*, 1994. **123**(1-2): p. 64-73.
119. Hill, K.E., Motley, A. K., May, J. M., Burk, R. F. , *Combined selenium and vitamin C deficiency causes cell death in guinea pig skeletal muscle*. *Nutr. Res.* , 2009. **29**: p. 213–219
120. Goettsch, M., Pappenheimer, A. M. , *Nutritional muscular dystrophy in the guinea pig and rabbit*. *J. Exp. Med.* , 1931. **54**: p. 145–165.
121. Rigdon, R.H., *Effect of Vitamin E on spontaneous-occurring necroses in striated muscle of ducks*. *J. Comp. Pathol.* , 1964. **74**: p. 85–89.
122. Lazaro, R.P., Dentinger, M. P., Rodichok, L. D., Barron, K. D., Satya-Murti, S., *Muscle pathology in Bassen-Kornzweig syndrome and vitamin E deficiency*. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1986. **86**: p. 378–387
123. Tomasi, L.G., *Reversibility of human myopathy caused by vitamin E deficiency*. *Neurology*, 1979. **29**(8): p. 1182-6.
124. Meydani, M., Evans, W., Handelman, G., Fielding, R. A., Meydani, S. N., Fiatarone, M.A., Blumberg, J. B., Cannon, J.G., *Antioxidant Response to Exercise-induced Oxidative Stress and Protection by Vitamin E*. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1992. **669**: p. 363–364
125. Howard, A.C., A.K. McNeil, and P.L. McNeil, *Promotion of plasma membrane repair by vitamin E*. *Nat Commun*, 2011. **2**: p. 597.
126. Ju, J., Picinich, S.C., Yang, Z., Zhao, Y., Suh, N., Kong, A.N., Yang C.S., *Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols*. *Carcinogenesis*, 2010. **31**: p. 533–542.
127. Mahabir, S., Schendel, K., Dong, Y.Q., Barrera, S.L., Spitz, M.R., Forman, M.R. , *Dietary alpha-, beta-, gamma- and delta-tocopherols in lung cancer risk*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(5): p. 1173-80.

128. Brigelius-Flohé, R., Kelly, F.J., Salonen, J.T., Neuzil, J., Zingg, J.M., Azzi, A., *The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research*. Am J Clin Nutr. , 2002. **76**(4): p. 703-16.
129. Alpha-Tocopherol, B.C.C.P.S.G., *The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers*. N Engl J Med, 1994. **330**(15): p. 1029-35.
130. Lippman, S.M., et al., *Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)*. JAMA, 2009. **301**(1): p. 39-51.
131. Jiang, Q., Christen, S., Shigenaga, M.K., Ames, B.N. , *gamma-tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention*. Am J Clin Nutr. , 2001. **74**: p. 714–722.
132. Longnecker, M.P., et al., *Serum alpha-tocopherol concentration in relation to subsequent colorectal cancer: pooled data from five cohorts*. J Natl Cancer Inst, 1992. **84**(6): p. 430-5.
133. Sorrenti, V., et al., *Toxicity of ochratoxin a and its modulation by antioxidants: a review*. Toxins (Basel), 2013. **5**(10): p. 1742-66.
134. Lim, H., et al., *Homocysteine-mediated reactivity and assembly of gold nanoparticles*. Langmuir, 2007. **23**(2): p. 826-33.
135. Forman, H.J., H. Zhang, and A. Rinna, *Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(1-2): p. 1-12.
136. Herzenberg, L.A., et al., *Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1967-72.
137. Otis, J.S., et al., *Effect of HIV-1-related protein expression on cardiac and skeletal muscles from transgenic rats*. AIDS Res Ther, 2008. **5**: p. 8.
138. Pompella, A., et al., *The changing faces of glutathione, a cellular protagonist*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(8): p. 1499-503.
139. Ikeno, H., et al., *Decrease in glutathione may be involved in pathogenesis of acne vulgaris*. J. Cosmet. Dermatol., 2011. **10**(3): p. 240–244.
140. Dai, J., et al., *Detection and characterization of a glutathione conjugate of ochratoxin A*. Chem Res Toxicol, 2002. **15**(12): p. 1581-8.
141. Tozlovanu, M., et al., *Glutathione conjugates of ochratoxin A as biomarkers of exposure*. Arh Hig Rada Toksikol, 2012. **63**(4): p. 417-27.
142. Orten, J.M. and O.W. Neuhaus, *Human biochemistry*. 9th ed. 1987: Mosby.
143. Moser, U.K., *Physiology and Metabolism of Ascorbic Acid in Proceedings of the 2nd Symposium Ascorbic Acid in Domestic Animals*, C. Wenk, Fenster, R., Volker, L., Editor. 1990: Switzerland. p. 3-16.
144. Figueroa-Mendez, R. and S. Rivas-Arancibia, *Vitamin C in Health and Disease: Its Role in the Metabolism of Cells and Redox State in the Brain*. Front Physiol, 2015. **6**: p. 397.
145. Duncan, G., G. , *Diseases of Metabolism. Detailed Methods of Diagnosis and Treatment: a Text for the Practitioner*. 1947, Philadelphia: W.B. Saunders Co.
146. NAS, F.a.N.B., Institute of Medicine, in *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. 2000, National Academy Press: Washington (DC).
147. IPCS. *Poisons Information Monograph 046: Ascorbic acid*. 2006 March 9, 2010]; Available from: <http://www.inchem.org/pages/pims.html>
148. Otten, J.J., J. Hellwig, and L.D. Meyers, *Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements*. 2006, Washington: The National Academies Press.
149. Thomson, P. and Micromedex. *USP DI. Drug information for the health care provider*. in *USP Convention*. 1994. Rockville, Maryland.
150. Hoda, Q. and S.P. Sinha, *Minimization of cytogenetic toxicity of malathion by vitamin C*. Journal of Nutrition Science and Vitaminology, 1991. **34**: p. 329-339.

151. Hoda, Q. and S.P. Sinha, *Protective role of ascorbic acid and vitamin B-complex against pesticide-induced clastogeny in bone marrow cells of mice*. . International Journal of Vitamin and Nutrition Research 1991. **61**: p. 155-158.
152. Khan, P.K. and S.P. Sinha, *Dose-dependent minimisation of cytogenetic toxicity of endosulfan by vitamin C*. . Cytologia, 1992. **57**: p. 217-221.
153. Khan, P.K. and S.P. Sinha, *Antimutagenic efficacy of higher doses of vitamin C*. Mutation Research 1993. **298**: p. 157-161.
154. Bose, S. and S.P. Sinha, *Modulation of ochratoxin-produced genotoxicity in mice by vitamin C*. Food Chem Toxicol, 1994. **32**(6): p. 533-7.
155. Hoehler, D. and R.R. Marquardt, *Influence of vitamins E and C on the toxic effects of ochratoxin A and T-2 toxin in chicks*. Poultr Sci, 1996. **75**(12): p. 1508-15.
156. Grosse, Y., et al., *Retinol, ascorbic acid and alpha-tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone*. Cancer Lett, 1997. **114**(1-2): p. 225-9.
157. de Souza, V.R., et al., *Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits*. Food Chem, 2014. **156**: p. 362-8.
158. Halvorsen, B.L., et al., *A systematic screening of total antioxidants in dietary plants*. J Nutr, 2002. **132**(3): p. 461-71.
159. Namiesnik, J., et al., *In vitro studies on the relationship between the antioxidant activities of some berry extracts and their binding properties to serum albumin*. Appl Biochem Biotechnol, 2014. **172**(6): p. 2849-65.
160. Slatnar, A., et al., *The effect of bioactive compounds on in vitro and in vivo antioxidant activity of different berry juices*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47880.
161. Toaldo, I.M., et al., *Bioactive potential of Vitis labrusca L. grape juices from the Southern Region of Brazil: phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects*. Food Chem, 2015. **173**: p. 527-35.
162. Yoo, Y.J., et al., *Assessment of some Australian red wines for price, phenolic content, antioxidant activity, and vintage in relation to functional food prospects*. J Food Sci, 2011. **76**(9): p. C1355-64.
163. Skrovankova, S., et al., *Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(10): p. 24673-706.
164. Nile, S.H. and S.W. Park, *Edible berries: bioactive components and their effect on human health*. Nutrition, 2014. **30**(2): p. 134-44.
165. Koyuncu, M.A. and T. Dilmacunal, *Determination of Vitamin C and Organic Acid Changes in Strawberry by HPLC during Cold Storage*. Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj., 2010. **38**: p. 95-98.
166. Proteggente, A.R., et al., *The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition*. Free Radic Res, 2002. **36**(2): p. 217-33.
167. Battino, M., et al., *Bioactive compounds in berries relevant to human health*. Nutr Rev, 2009. **67 Suppl 1**: p. S145-50.
168. Giampieri, F., et al., *The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health*. Nutrition, 2012. **28**(1): p. 9-19.
169. Kalt, W., et al., *Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits*. J Agric Food Chem, 1999. **47**(11): p. 4638-44.
170. Odriozola-Serrano, I., et al., *Kinetic study of anthocyanins, vitamin C, and antioxidant capacity in strawberry juices treated by high-intensity pulsed electric fields*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(18): p. 8387-93.
171. Franke, A.A., et al., *Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii*. J. Food Comp. Anal., 2004. **17**: p. 1-35.

172. Fernandes, V.C., et al., *Strawberries from integrated pest management and organic farming: phenolic composition and antioxidant properties*. Food Chem, 2012. **134**(4): p. 1926-31.
173. Fredericks, C.H., et al., *High-anthocyanin strawberries through cultivar selection*. J Sci Food Agric, 2013. **93**(4): p. 846-52.
174. Tulipani, S., et al., *Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(3): p. 696-704.
175. Hall, R.D., *Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic*. New Phytol, 2006. **169**(3): p. 453-68.
176. Kim, S.J., et al., *Understanding Metabolomics in Biomedical Research*. Endocrinol Metab (Seoul), 2016. **31**(1): p. 7-16.
177. Fernie, A.R., et al., *Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(9): p. 763-9.
178. Yoo, H.J., H. Liu, and K. Hakansson, *Infrared multiphoton dissociation and electron-induced dissociation as alternative MS/MS strategies for metabolite identification*. Anal Chem, 2007. **79**(20): p. 7858-66.
179. Craig, A., et al., *Systems toxicology: integrated genomic, proteomic and metabolomic analysis of methapyrilene induced hepatotoxicity in the rat*. J Proteome Res, 2006. **5**(7): p. 1586-601.
180. Heijne, W.H., et al., *Systems toxicology: applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology*. Expert Rev Proteomics, 2005. **2**(5): p. 767-80.
181. Robertson, D.G., *Metabolomics in toxicology: a review*. Toxicol Sci, 2005. **85**(2): p. 809-22.
182. Boskey, A.L. and R. Mendelsohn, *Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues*. Vib Spectrosc, 2005. **38**(1-2): p. 107-114.
183. Brown, S.C., G. Kruppa, and J.L. Dasseux, *Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry*. Mass Spectrom Rev, 2005. **24**(2): p. 223-31.
184. Defernez, M. and I.J. Colquhoun, *Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using 1H NMR spectra*. Phytochemistry, 2003. **62**(6): p. 1009-17.
185. Villas-Boas, S.G., et al., *Mass spectrometry in metabolome analysis*. Mass Spectrom Rev, 2005. **24**(5): p. 613-46.
186. Want, E.J., B.F. Cravatt, and G. Siuzdak, *The expanding role of mass spectrometry in metabolite profiling and characterization*. Chembiochem, 2005. **6**(11): p. 1941-51.
187. Dunn, W.B. and D.I. Ellis, *Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies*. Trends Analyt Chem, 2005. **24**: p. 285-94.
188. Metz, T.O., et al., *The future of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in metabolic profiling and metabolomic studies for biomarker discovery*. Biomark Med, 2007. **1**(1): p. 159-185.
189. Bino, R.J., et al., *Potential of metabolomics as a functional genomics tool*. Trends Plant Sci, 2004. **9**(9): p. 418-25.
190. Smith, C.A., et al., *METLIN: a metabolite mass spectral database*. Ther Drug Monit, 2005. **27**(6): p. 747-51.
191. Wishart, D.S., et al., *HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D801-7.
192. Britz-McKibbin, P., *Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry (CE-ESI-MS)-based metabolomics*. Methods Mol Biol, 2011. **708**: p. 229-46.
193. Triolo, A., et al., *In vivo metabolite detection and identification in drug discovery via LC-MS/MS with data-dependent scanning and postacquisition data mining*. J Mass Spectrom, 2005. **40**(12): p. 1572-82.
194. Aliferis, K.A., Chrysayi-Tokousbalides, M., *Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives*. Metabolomics, 2011. **7**: p. 35-53.

195. Best, B.P., *Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions*. Rejuvenation Res, 2015. **18**(5): p. 422-36.
196. Roussos, P., Pontikis, C.A., *Phenolic compounds in olive explants and their contribution to browning during the establishment stage in vitro*. . Gartenbauwissenschaft, 2001. **66**: p. 298-303.
197. Roussos, P., Denaxa, N.-K., Damvakaris, T., *Strawberry fruit quality attributes after application of plant growth stimulating compounds*. . Scientia Horticulturae, 2009. **119**: p. 138-146.
198. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
199. Riss, T.L., et al., *Cell Viability Assays*, in *Assay Guidance Manual*, G.S. Sittampalam, et al., Editors. 2004: Bethesda (MD).
200. Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., Hübner, H., *Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin*, in *Cell Viability Assays. Methods in Molecular Biology*, D. Gilbert, Friedrich, O., Editor. 2017, Humana Pres: New York.
201. Rodriguez, L.G., X. Wu, and J.L. Guan, *Wound-healing assay*. Methods Mol Biol, 2005. **294**: p. 23-9.
202. Hulkower, K.I. and R.L. Herber, *Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery*. Pharmaceutics, 2011. **3**(1): p. 107-24.
203. Gomes, A., E. Fernandes, and J.L. Lima, *Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species*. J Biochem Biophys Methods, 2005. **65**(2-3): p. 45-80.
204. Kalyanaraman, B., et al., *Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(1): p. 1-6.
205. Wardman, P., *Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(7): p. 995-1022.
206. Winterbourn, C.C., *The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(2): p. 730-8.
207. Grisham, M.B., *Methods to detect hydrogen peroxide in living cells: Possibilities and pitfalls*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2013. **165**(4): p. 429-38.
208. Lu, J.M., et al., *Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(4): p. 840-60.
209. Cheng, H., W.J. Lederer, and M.B. Cannell, *Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle*. Science, 1993. **262**(5134): p. 740-4.
210. Haugland, R.P., *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. Molecular Probes, 2010.
211. Jones, B.J.P., A.D. McDonald, and D.R. Nygren, *Single Molecule Fluorescence Imaging as a Technique for Barium Tagging in Neutrinoless Double Beta Decay*. Vol. 11. 2016.
212. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.
213. Leon, Z., et al., *Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation*. Electrophoresis, 2013. **34**(19): p. 2762-75.
214. Tsugawa, H., et al., *MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis*. Nat Methods, 2015. **12**(6): p. 523-6.
215. Aliferis, K. and S. Abaji, *¹H NMR and GC-MS metabolic fingerprinting of developmental stages of Rhizoctonia solani sclerotia*. Metabolomics, 2010. **6**: p. 96-108.
216. Wiklund, S., et al., *Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models*. Anal Chem, 2008. **80**(1): p. 115-22.
217. Aliferis, K.A., D. Faubert, and S. Jabaji, *A metabolic profiling strategy for the dissection of plant defense against fungal pathogens*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e111930.

218. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nat Protoc, 2007. **2**(2): p. 329-33.
219. Rahimtula, A.D. and X. Chong, *Alterations in calcium homeostasis as a possible cause of ochratoxin A nephrotoxicity*. IARC scientific publications, 1991. **115**: p. 207-14.
220. Jilani, K., et al., *Enhanced apoptotic death of erythrocytes induced by the mycotoxin ochratoxin A*. Kidney Blood Press Res, 2012. **36**(1): p. 107-18.
221. Boudonck, K.J., et al., *Discovery of metabolomics biomarkers for early detection of nephrotoxicity*. Toxicol Pathol, 2009. **37**(3): p. 280-92.
222. Beger, R.D., J. Sun, and L.K. Schnackenberg, *Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 2010. **243**(2): p. 154-66.
223. Zhang, L., et al., *Systems responses of rats to aflatoxin B1 exposure revealed with metabonomic changes in multiple biological matrices*. J Proteome Res, 2011. **10**(2): p. 614-23.
224. Huang, Q., et al., *Metabolic characterization of hepatocellular carcinoma using nontargeted tissue metabolomics*. Cancer Res, 2013. **73**(16): p. 4992-5002.
225. Xia, K., et al., *Discovery of systematic responses and potential biomarkers induced by ochratoxin A using metabolomics*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2014. **31**(11): p. 1904-13.
226. Waters, N.J., et al., *Metabonomic deconvolution of embedded toxicity: application to thioacetamide hepato- and nephrotoxicity*. Chem Res Toxicol, 2005. **18**(4): p. 639-54.