A grayscale microscopic image of plant roots, showing a central taproot and numerous lateral roots branching out. The roots are light-colored against a darker background, highlighting their intricate structure.

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και Ανάπτυξης
Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ
ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΕ
ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ**

**Διδακτορική Διατριβή
Σοφία Μαυρίκου**

Αθήνα 2014



Η αποδοχή για την εκπόνηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνθεσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (ΓΣΕΣ 12η/20-03-2008). Ο ορισμός της τριμελούς επιτροπής και η ανάθεση του θέματος έγιναν με αποφάσεις των ΓΣΕΣ (14η/18-04-2008 και 8η/09-05-2008, αντίστοιχα), ενώ η τριμελής εξεταστική επιτροπή εγκρίθηκε κατά τη 6η/15-01-2014 ΓΣΕΣ.

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

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Σπυρίδων Κίντζιος, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Ιωάννης Κλώνης, Καθηγητής (Μέλος)

Νικόλαος Λάμπρου, Αναπληρωτής Καθηγητής (Μέλος)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Σπυρίδων Κίντζιος	Καθηγητής Κυτταροιστοκαλλιέργειας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστημίο Αθηνών.
Ιωάννης Κλώνης	Καθηγητής Ενζυμικής Τεχνολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστημίο Αθηνών.
Ηλίας Ηλιόπουλος	Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστημίο Αθηνών.
Νικόλαος Λάμπρου	Αναπληρωτής Καθηγητής Ενζυμικής Τεχνολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστημίο Αθηνών.
Ελένη Ντούνη	Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστημίο Αθηνών.
Παναγιώτης Σκανδάμης	Επίκουρος Καθηγητής Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστημίο Αθηνών.
Φωτεινή Φλουρή	Λέκτορας Γεωργικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστημίο Αθηνών.

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής έτυχε χορήγηση υποτροφίας από το Πρόγραμμα Ηράκλειτος ΙΙ: Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής διατριβής».

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



Μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχει δημοσιευθεί ως εξής:

Ανακοινώσεις σε Συνέδρια:

- Sophie Mavrikou, Kelly Flampouri, Spyridon Kintzios, Costas Yalouris. «*Multiple cell array biosensors based on membrane engineered cells: A revolutionary technology for the detection of pesticide residues*». 1st Biosensing Technology Conference, 10-12 Νοεμβρίου 2009, Μπρίστολ.
- Σοφία Μαυρίκου, Ευαγγελία Φλαμπούρη, Σπυρίδων Κίντζιος. «*Επιδράσεις in vitro αμιδίων του τετρονικού οξέος και νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων σε κυτταρική σειρά ποντικού N2a*». 2ο Συνέδριο Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, 4-5 Οκτωβρίου 2012, Αθήνα.
- Sophia Mavrikou, Evangelia Flampouri, Spiridon Kintzios. «*Effects of neonicotinoids and tetronic acid amides on membrane potential and intracellular calcium concentration in neuroblastoma N2a cell line*». 35^o Επιστημονικό Συνέδριο ΕΕΒΕ, 23-25 Μαΐου 2013, Ναύπλιο.
- Sophia Mavrikou, Evangelia Flampouri, Spiridon Kintzios. «*Comparative study of the electrochemical signal of neonicotinoids and tetronic acid amides on screen printed electrodes with and without the use of N2a cells*». 2nd Conference on Bio-Medical Instrumentation and related Engineering and Physical Sciences, 21-22 Ιουνίου 2013, Αθήνα.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κίντζιου Σπυρίδωνα. Από τη θέση αυτή θέλω να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της.

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Κίντζιο Σπυρίδωνα που μου πρόσφερε την ευκαιρία να ασχοληθώ με την έρευνα στο πεδίο των κυτταρικών βιοαισθητήρων. Επίσης τον ευχαριστώ θερμά για τις ουσιαστικές διορθώσεις κατά τη συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Τον Καθηγητή Κλώνη Ιωάννη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Λάμπρου Νικόλαο για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Θέλω επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στα άλλα μέλη της επταμελούς επιτροπής τον Καθηγητή Ηλία Ηλιόπουλο, την Επίκουρη Καθηγήτρια Ελένη Ντούνη, τον Επίκουρο Καθηγητή Παναγιώτη Σκανδάμη και τη Λέκτορα Φωτεινή Φλουρή για την πρόθυμη συμμετοχή τους στη επταμελή εξεταστική επιτροπή, καθώς και για τις εύστοχες υποδείξεις τους κατά την συγγραφή της διατριβής.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εθνικό Στρατηγικό Πλαίσιο Αναφοράς (ΕΣΠΑ) –Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II, για τη χορήγηση υποτροφίας για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εκλιπόντα Επίκουρο Καθηγητή Αναστάσιο Μαρκόγλου και όλα τα μέλη του εργαστηρίου γεωργικής φαρμακολογίας καθώς και την Κωνσταντίνα Ασπρακά, ΕΤΕΠ για τη βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των αναλύσεων μου.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις κυρίες Μαρία Καπάνταη από το εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών και Ουρανία Καλαντζή από το εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για τη βοήθεια τους κατά την πραγματοποίηση των εκχυλίσεων των δειγμάτων.

Πολλά ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στους φίλους και συνεργάτες, που πραγματικά ομόρφυναν την κάθε στιγμή στο εργαστήριο, Κέλλυ Φλαμπούρη, Γεωργία Μοσχοπούλου, Teresa Valero, Ελένη Βικελή, Θεοφύλακτο Αποστόλου, αλλά και στις Χαρά Παξινού και Νάντια Μασέλου του εργαστηρίου Οικολογίας & Προστασίας Περιβάλλοντος, για την άψογη συνεργασία, το φιλικό περιβάλλον αλλά και τη συμπαράσταση σε στιγμές που ήταν απαραίτητη! Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη και πολύπλευρη υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου.

Αθήνα, Μάιος 2014

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AChE	Ακετυλοχολινεστεράση
AMC	7-άμινο-4-μεθύλιο-κουμαρίνη (7-amino-4-methyl Coumarin)
ATCI	Ιωδιούχος ακετυλοχολίνη
BERA	Βιοηλεκτρική Μέθοδος Αναγνώρισης (Bioelectric Recognition Assay)
[Ca²⁺]cyt	Συγκέντρωση ενδοκυτταρικού ασβεστίου
CANARY	Κυτταρική ανάλυση και κοινοποίηση των κινδύνων αντιγόνου και των αποδόσεων (Cellular Analysis and Notification of Antigen Risks and Yields)
CHAPS	Ρυθμιστικό διάλυμα CHAPS (3[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-propanesulfonic acid)
CICR	Ασβέστιο που προκαλείται από απελευθέρωση ασβεστίου (Calcium-induced calcium release)
Cyt C	Κυτόχρωμα C (Cytochrome C)
db-cAMP	Κυκλική μονοφωσφορική διβουτυλοαδενοσίνη (Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate)
DiSC3(5)	3,3 Ιωδιούχος διπροπυλο-θειαδικαυβόκυανίνη (3,3 dipropylthiadicarbocyanine iodide)
DMEM	Θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας ζωικών κυττάρων (Dulbecco's Medium)
DMSO	Διμέθυλο σουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide)
DTT	Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol)
ECIS	Αισθητήρας Εμπέδησης
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediaminetetraacetic acid)
ESI	Ιονισμός ηλεκτροδιάχυσης
ESR	Μέθοδος λήψης φάσματος συντονισμού του spin των ηλεκτρονίων (Electron Spin Resonance)
FET	Κυκλολυχνία Επίδρασης Πεδίου

Fluo-3	Φθορισμομετρικός δείκτης ασβεστίου
GR	Αναγωγή του Γλουταθείου (Glutathione Reductase)
GSH	Ανηγμένο Γλουταθείο
GSSG	Οξειδωμένο Γλουταθείο
GST	S- μεταφοράση του γλουταθείου
H2DCFDA	2,7 Διοξική διχλωρό-διυδροφλουορεσκεΐνη - (2,7 dichlorodihydrofluorescein diacetate)
HEPES	Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	Υγρή χρωματογραφία
IONO	Ιονομυκίνη
LC-MS	Υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών
LOD	Όριο ανίχνευσης
LOQ	Όριο ποσοτικοποίησης
MEA	Συστοιχία Μικροηλεκτροδίων
MeOH	Μεθανόλη
MIME	Μοριακή Αναγνώριση μέσω Μεμβρανικής Μηχανικής (Molecular identification through Membrane Engineering)
MTT	Βρωμιούχο Διμεθυλ-θιαζολ-διφαινυλτετραζόλιο (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NBT	Νιτρομπλέ του τετραζολίου (Nitro blue tetrazolium)
NGF	Παράγοντας αύξησης νευρικών απολήξεων (Nerve Growth Factor)
PB	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffer)
PBS	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων με χλωριούχο νάτριο (Phosphate Buffer Saline)
PI	Ιωδιούχο προπίδιο
PIPES	Πιπεραζίνη (piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid))

QCM	Μικροζυγός Κρυστάλλου Χαλαζία
RT	Χρόνος κατακράτησης
SERCA	Ca ⁺² -ATPase σαρκο/ενδοπλασματικού δικτύου (Sarco/endoplasmic reticulum Ca ⁺² -ATPase)
SOD	Δισμουτάση του O ² - (Superoxide Dismutase)
SPR	Συντονισμός Επιφανειακού Πλασμονίου
Tris	Τρις(υδροξυμεθυλ-)αμινομεθάνιο (tris(hydroxymethyl)aminomethane)
XOD	Οξειδάση της ξανθίνης (Xanthine Oxidase)
2-VP	2-βινυλοπυριδίνη (2-vinilpyridine)
[Ca²⁺]cyt	Συγκέντρωση ενδοκυτταρικού ασβεστίου

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	1
Abstract	2
1. Εισαγωγή	3
1.1. Κυτταρικοί βιοαισθητήρες.....	4
1.1.1. Χαρακτηριστικά κυτταρικών βιοαισθητήρων.....	6
1.1.2. Τύποι κυτταρικών βιοαισθητήρων.....	9
1.2. Υγρή χρωματογραφία.....	21
1.2.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	21
1.2.2. Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας.....	22
1.2.3. Δοχεία κινητής φάσης και συστήματα επεξεργασίας διαλυτών.....	23
1.2.4. Στήλες υγρής χρωματογραφίας.....	23
1.2.5. Ανιχνευτές υγρής χρωματογραφίας.....	25
1.3. Φασματομετρία μαζών (MS).....	28
1.4. Διασύνδεση Συστημάτων Υγρής Χρωματογραφίας με Φασματόμετρο Μαζών.....	29
1.5. Αξιολόγηση αναλυτικών δεδομένων.....	31
1.5.1. Μέση τιμή πληθυσμού (μ).....	31
1.5.2. Τυπική απόκλιση (σ) και μεταβλητότητα (σ^2) πληθυσμού.....	32
1.5.3. Μέση τιμή δείγματος (x).....	32
1.5.4. Σχετική τυπική απόκλιση (RSD) και συντελεστής μεταβλητότητας (CV).....	33
1.5.5. Επαναληψιμότητα.....	33
1.5.6. Ακρίβεια.....	33
1.5.7. Ευαισθησία.....	34
1.5.8. Όριο ανίχνευσης.....	34
1.5.9. Δυναμική περιοχή.....	35
1.6. Βαθμονόμηση ενόργανων μεθόδων.....	36
1.6.1 Καμπύλες βαθμονόμησης.....	36
1.6.2. Μέθοδοι προσθήκης προτύπου.....	37
1.6.3. Μέθοδος εσωτερικού προτύπου.....	37
1.7. Κυκλική Βολταμετρία.....	38
1.7.1. Αρχή της Μεθόδου.....	39
1.7.2. Αντιστρεπτές ηλεκτροχημικές αντιδράσεις.....	41
1.7.3. Μη αντιστρεπτές αντιδράσεις.....	43
1.7.4. Ημι-αντιστρεπτές αντιδράσεις.....	44
1.8. Παλμική Πολαρογραφία.....	44
1.9. Μελετώμενα Εντομοκτόνα.....	50

1.9.1. Νεονικοτινοειδή	50
1.9.1.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες νεονικοτινοειδών	50
1.9.1.2. Τρόπος Δράσης	53
1.9.1.3. Αλληλεπιδράσεις των Νεονικοτινοειδών με το Νικοτινικό Υποδοχέα της Ακετυλοχολίνης	54
1.9.1.3.1. Εκλεκτικότητα για τους nAChRs των Εντόμων σε Σχέση με τους nAChRs των Σπονδυλωτών	54
1.9.1.4. Φαρμακοκινητική και Μεταβολισμός	55
1.9.1.5. Μεταβολικά Μονοπάτια Εμπορικών Νεονικοτινοειδών	57
1.9.2. Αμίδια του τετρονικού και τετραμικού οξέος	61
2. Υλικά και Μέθοδοι	64
2.1. Καλλιέργεια και Διατήρηση Κυττάρων N2a	65
2.1.1. Υλικά και Αντιδραστήρια	65
2.1.2. Εξοπλισμός	65
2.1.3. Καλλιέργεια και Απομόνωση κυττάρων	65
2.1.4. Μέτρηση κυττάρων-Προσδιορισμός βιωσιμότητας	65
2.1.5. Κατάψυξη κυτταρικών σειρών	66
2.1.6. Απόψυξη κυτταρικών σειρών	66
2.2. Παρασκευή διαλυμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων και προσθήκη τους στις κυτταροκαλλιέργειες	66
2.2.1. Υλικά και Αντιδραστήρια	66
2.2.2. Εξοπλισμός	66
2.2.3. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και των διαλυμάτων εργασίας	67
2.2.4. Εφαρμογή διαλυμάτων των εντομοκτόνων σε κυτταροκαλλιέργειες	67
2.3. Μελέτη διαφοροποίησης κυττάρων N2a	68
2.3.1. Υλικά και Αντιδραστήρια	68
2.3.2. Εξοπλισμός	68
2.3.3. Μικροσκοπική μελέτη της ανάπτυξης των νευρικών αξόνων	68
2.4. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων	69
2.4.1. Υλικά και Αντιδραστήρια	69
2.4.2. Εξοπλισμός	69
2.4.3. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων N2a με εφαρμογή της μεθόδου εκτίμησης της πρόσληψης της χρωστικής MTT	69
2.4.4. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων N2a με εφαρμογή της μεθόδου εκτίμησης της πρόσληψης της χρωστικής ουδέτερο ερυθρό (Neutral red)	69
2.4.5. Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας των κυττάρων N2a με εφαρμογή της μεθόδου εκτίμησης της πρόσληψης της χρωστικής ιωδιούχο προπίδιο (PI)	70
2.5. Προσδιορισμός μεμβρανικού δυναμικού και ενδοκυτταρικού ασβεστίου	70

2.5.1. Υλικά και Αντιδραστήρια	70
2.5.2. Εξοπλισμός	70
2.5.3. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός μεμβρανικού δυναμικού και ενδοκυτταρικού ασβεστίου των κυττάρων N2a	71
2.6. Προσδιορισμός Ολικών Πρωτεϊνών	72
2.6.1. Υλικά και Αντιδραστήρια	72
2.6.2. Εξοπλισμός	72
2.6.3. Προσδιορισμός Ολικών Πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (Bradford assay)..	72
2.7. Προσδιορισμός ενεργότατος του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE)	72
2.7.1. Υλικά και Αντιδραστήρια	73
2.7.2. Εξοπλισμός	73
2.7.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός της ενεργότατος του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE) σε κύτταρα N2a	73
2.8. Προσδιορισμός της δραστικότητας του ενζύμου Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) σε κύτταρα N2a	74
2.8.1. Υλικά και Αντιδραστήρια	74
2.8.2. Εξοπλισμός	74
2.8.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός της δραστικότητας του ενζύμου Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) σε κύτταρα N2a	74
2.9. Προσδιορισμός της δραστικότητας του ενζύμου μεταφοράση του γλουταθείου (GST) σε κύτταρα N2a	75
2.9.1. Υλικά και Αντιδραστήρια	75
2.9.2. Εξοπλισμός	75
2.9.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός της δραστικότητας του ενζύμου μεταφοράση του γλουταθείου (GST) σε κύτταρα N2a	75
2.10. Προσδιορισμός του δείκτη GSH/GSSG σε κύτταρα N2a	76
2.10.1. Υλικά και Αντιδραστήρια	76
2.10.2. Εξοπλισμός	77
2.10.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός του δείκτη GSH/GSSG σε κύτταρα N2a	77
2.11. Μέθοδος προσδιορισμού της υπεροξειδωσις λιπιδίων	77
2.11.1. Υλικά και Αντιδραστήρια	78
2.11.2. Εξοπλισμός	78
2.11.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός της MDA σε κύτταρα N2a	78
2.11.4. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός της MDA σε κύτταρα N2a	79
2.12. Εισαγωγή του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE) στη μεμβράνη κυττάρων Vero	79
2.12.1. Υλικά και Αντιδραστήρια	79
2.12.2. Εξοπλισμός	79
2.12.3. Ηλεκτροπόρωση κυττάρων	80
2.12.4. Οσμωτική ένθεση κυττάρων	80

2.13. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	81
2.14. Επικύρωση της μεθόδου QuEChERS για τον προσδιορισμό δύο κατηγοριών φυτοπροστατευτικών προϊόντων (νεονικοτινοειδών, αμιδίων του τετρονικού οξέος) σε αγγούρι και τομάτα με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με συζευγμένη φασματομετρία μάζας.....	81
2.14.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.....	82
2.14.2. Εξοπλισμός.....	82
2.14.3. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων παρακαταθήκης	82
2.14.4. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας (matrix matched standards)	83
2.14.5. Εκχύλιση των οχτώ φυτοπροστατευτικών προϊόντων	83
2.14.6. Προσδιορισμός με υγρή χρωματογραφία–φασματομετρία.....	84
2.14.7. Προσδιορισμός των οχτώ φυτοπροστατευτικών προϊόντων.....	84
2.14.8. Ταυτοποίηση	84
2.14.9. Προσδιορισμός.....	85
2.15. Βολταμετρικός προσδιορισμός νεονικοτινοειδών και αμιδίων του τετρονικού οξέος .	
.....	85
2.15.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.....	86
2.15.2. Εξοπλισμός.....	86
2.15.3. Κυκλική βολταμετρία για τον προσδιορισμό των νεονικοτινοειδών και αμιδίων του τετρονικού οξέος	87
2.15.4. Διαφορική παλμική βολταμετρία για τον προσδιορισμό των νεονικοτινοειδών και αμιδίων του τετρονικού οξέος	87
3. Αποτελέσματα	89
3.1. Επίδραση της MeOH στις κυτταροκαλλιέργειες N2a και N2a+db cAMP.....	90
3.2. Επίδραση των εντομοκτόνων στη βιωσιμότητα διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κύτταρων N2a	91
3.3. Επίδραση των εντομοκτόνων στην κυτταρική διαφοροποίηση μετά από επώαση 24 και 48 ωρών	106
3.4. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός μεμβρανικού δυναμικού και ενδοκυτταρικού ασβεστίου των κυττάρων N2a.....	112
3.5. Προσδιορισμός της επίδρασης των εντομοκτόνων στην αναλογία GSH/GSSG σε διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a	121
3.6. Προσδιορισμός της επίδρασης των εντομοκτόνων στην υπεροξειδωση των λιπιδίων κυττάρων N2a με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος	127
3.7. Προσδιορισμός της επίδρασης των εντομοκτόνων στη δραστικότητα του ενζύμου S μεταφοράση του γλουταθείου (GST) σε κύτταρα N2a	132
3.8. Προσδιορισμός της επίδρασης των εντομοκτόνων στη δραστικότητα του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) σε κύτταρα N2a	137
3.9. Προσδιορισμός της επίδρασης των εντομοκτόνων στη δραστικότητα του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE) κυττάρων N2a.....	142

3.10. Μεμβρανική τροποποίηση κυττάρων Vero μέσω των μεθόδων της ηλεκτροπόρωσης και της οσμωτικής ένθεσης για την εισαγωγή του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE)	147
3.11. Επικύρωση της μεθόδου QuEChERS για τον προσδιορισμό δύο κατηγοριών φυτοπροστατευτικών προϊόντων (νεονικοτινοειδών, αμιδίων του τετρονικού οξέος) σε αγγούρι και τομάτα με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με συζευγμένη φασματομετρία μάζας	148
3.11.1. Γραμμικότητα	148
3.11.2. Ορθότητα – Πιστότητα	150
3.11.3. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)	151
3.12. Βολταμετρικός προσδιορισμός νεονικοτινοειδών και αμιδίων του τετρονικού οξέος.	152
3.12.1. Προσδιορισμός των νεονικοτινοειδών και αμιδίων του τετρονικού οξέος με τη μέθοδο της κυκλικής βολταμετρίας	152
3.12.2. Προσδιορισμός των νεονικοτινοειδών και αμιδίων του τετρονικού οξέος με τη μέθοδο της διαφορικής παλμικής βολταμετρίας	153
3.12.2.1. Γραμμικότητα	153
3.12.2.2. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)	155
4. Συζήτηση	157
5. Βιβλιογραφία	174
Παράρτημα	193

Περίληψη

Η σύγχρονη βιομηχανία φυτοπροστατευτικών προϊόντων για να καταπολεμήσει τα προβλήματα που έχουν δημιουργηθεί από την αύξηση της ανθεκτικότητας των εντόμων στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα καταβάλλει τεράστιες προσπάθειες για την έρευνα νέων εντομοκτόνων που στοχεύουν σε διαφορετικά βιοχημικά και φυσιολογικά ενεργά κέντρα. Σε αυτή τη μελέτη μελετώνται οι επιδράσεις 8 εντομοκτόνων με διαφορετικές χημικές δομές, 3 αμιδίων του τετρονικού οξέος (spiromesifen, spiroticlofen, spirotetramat) και 5 νεονικοτινοειδών (imidacloprid, clothianidin, thiacloprid, acetamiprid, thiamethoxam) σε διαφοροποιημένα και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα νευροβλαστώματος (N2a). Τα κύτταρα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας εκτέθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις του κάθε εντομοκτόνου (3, 10, 30 και 100 μM) για 24 και 48 ώρες σε συνθήκες που ευνοούσαν και που δεν ευνοούσαν τη διαφοροποίησή τους. Κατόπιν, για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας/βιωσιμότητας των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν οι βιοχημικές δοκιμές πρόσληψης των χρωστικών MTT, ουδέτερου ερυθρού (NR) και ιωδιούχου προπιδίου (PI) όπου τα αμιδία του τετρονικού οξέος προκάλεσαν αυξημένη μείωση της βιωσιμότητας στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM. Παράλληλα μελετήθηκε μικροσκοπικά η παρεμπόδιση της προέκτασης των νευρικών αξόνων με χρώση των κυττάρων με Coomassie Brilliant Blue. Ο προσδιορισμός του μεμβρανικού δυναμικού και της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου ($[Ca^{2+}]_i$) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των χρώσεων DiSC3(5) και Fluo-3 αντίστοιχα σε φωτόμετρο φθορισμού. Τα εντομοκτόνα προκάλεσαν αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και αύξηση της πρόσληψης του ενδοκυτταρικού $[Ca^{2+}]_i$ κυρίως στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM και στις δυο κατηγορίες κυττάρων. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές μελέτες για την επίδραση των εντομοκτόνων στους ενζυμικούς και βιολογικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν η δραστηριότητα των ενζύμων S-μεταφοράση του γλουταθείου (GST), δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) με τη μέθοδο του νιτρο-μπλε τετραζολίου (NBT), η υπεροξειδωση των λιπιδίων με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) καθώς και η μεταβολή της συγκέντρωσης του ανηγμένου και του οξειδωμένου γλουταθείου με τη μέθοδο Ellman. Παρατηρήθηκε ότι τα εντομοκτόνα αύξησαν την ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων και της MDA μειώνοντας ταυτόχρονα τα επίπεδα του γλουταθείου, κυρίως στις υψηλές συγκεντρώσεις. Με την ίδια μέθοδο πραγματοποιήθηκε και προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE) η οποία φάνηκε να αυξάνεται τόσο από την επίδραση των νεονικοτινοειδών όσο και από την επίδραση των αμιδίων του τετρονικού οξέος. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μεμβρανική τροποποίηση κυττάρων Vero με το ένζυμο AChE μέσω των μεθόδων της ηλεκτροπόρωσης και της οσμωτικής ένθεσης και εκτιμήθηκε κατόπιν η βιωσιμότητα των κυττάρων καθώς και η ενεργότητα του ενζύμου στα κύτταρα. Κατά την εκπόνηση της διατριβής αναπτύχθηκε επίσης μία μέθοδος ανίχνευσης υπολειμμάτων νεονικοτινοειδών και αμιδίων του τετρονικού οξέος σε υποστρώματα αγγουριού και τομάτας μετά από εξεργασία των δειγμάτων με τη μέθοδο QuEChERS. Τέλος αναπτύχθηκε μέθοδος προσδιορισμού των εντομοκτόνων σε ποτενσιοστάτη σε εκτυπωμένα ηλεκτρόδια άνθρακα με/και χωρίς τη χρήση κυττάρων N2a με τη μέθοδο της διαφορικής παλμικής βολταμετρίας. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα διαφοροποιημένα κύτταρα αποτελούν ένα εξαιρετικό εργαλείο μελέτης της νευροβιολογίας και της νευροτοξικότητας αφού παρουσιάζουν σημαντι-

κές διαφορές στα επίπεδα ευαισθησίας τους σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα και ξενοβιοτικά και μελλοντικά αναμένεται να έχουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη κυτταρικών βιοαισθητήρων πολύ υψηλής εκλεκτικότητας και ευαισθησίας.

Abstract

Modern crop protection industry puts considerable efforts in the search for new pesticides (insecticides, acaricides) acting on novel biochemical and physiological targets, primarily due to the seriously increasing problem of pest resistance to pesticides. This study is focused on investigating the effects of eight insecticides with different chemical structures, three tetrone acid amides (spiromesifen, spirotetramat, spirotetramat) and five neonicotinoids (imidacloprid, clothianidin, thiacloprid, acetamiprid, thiamethoxam) on differentiating and non-differentiating mouse N2a neuroblastoma cells. The cells were exposed to four different concentrations of each insecticide (3, 10, 30 and 100 μM) for 24 and 48 hours under differentiating and non-differentiating conditions. Cytotoxicity and cell viability were estimated by the MTT, neutral red uptake (NRU) assays, propidium iodide (PI) uptake assays. Tetrone acid amides caused an increased cytotoxicity at the two highest concentrations (30 and 100 μM). In addition, the axon outgrowth impairment was measured microscopically after a coomassie brilliant blue staining. Membrane potential and intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]$), were measured using the dye probes DiSC3(5) and Fluo-3, respectively with a fluorescence plate reader. Both pesticide classes increased cellular depolarization and $[\text{Ca}^{2+}]$ uptake in both cell types at the two highest concentrations. Furthermore, the effects of the insecticides on the enzymatic and biological antioxidative cell mechanisms were studied. More specifically, Glutathione S Transferase (GST) and Superoxide dismutase (SOD) activities were measured photometrically, lipid peroxidation was measured by the thiobarbituric acid assay (TBA) and the change at the levels of GSH and GSSG concentrations were measured by the Ellman method. The results showed an increase in the antioxidant enzymes specific activities as well as an increase at the malondialdehyde's (MDA) concentration. The insecticides also reduced GSH levels at the highest concentrations. The same assay was used for the determination of Acetylcholinesterase (AChE) activity. The total protein concentration was determined by the Bradford method. In addition, AChE was inserted to Vero cell membranes through electroinsertion and osmotic insertion. Afterwards, Vero cell viability and AChE have been assessed. In the framework of the current thesis an analytical method was developed for the determination of neonicotinoids and tetrone acid amides in cucumber and tomato matrices after extraction by the QuEChERS method. Both pesticide classes increased AChE activity. Finally, a potentiometric method (differential pulse voltametry) employing carbon screen printed electrodes for the determination of the insecticides has been developed, with or without N2a- based cellular biorecognition elements. Our results suggest that differentiated N2a cells are more sensitive to pesticides than non-differentiated cells and represent a very important tool for neurobiology and neurotoxicity studies. In the near future they will play a key role in the field of cellular biosensors of high selectivity and specificity.

ΕΝΟΤΗΤΑ Α

Εισαγωγή

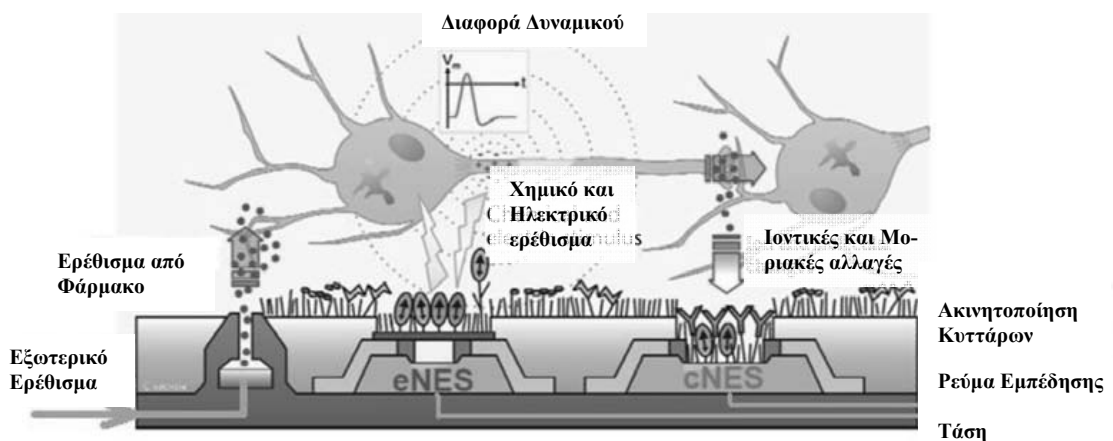
1.1. Κυτταρικοί βιοαισθητήρες.

Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες είναι εξειδικευμένες συσκευές που χρησιμοποιούν ως αισθητήρια στοιχεία ζωντανά κύτταρα, σε συνδυασμό με αισθητήρες ή μεταγωγείς, για να ανιχνεύσουν την κατάσταση του ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού περιβάλλοντος και φυσιολογικές παραμέτρους, παράγοντας αποκρίσεις μέσω της αλληλεπίδρασης μεταξύ του ερεθίσματος και των κυττάρων.

Το κύριο χαρακτηριστικό των κυτταρικών βιοαισθητήρων είναι ότι σε αντίθεση με άλλους τύπους βιοαισθητήρων που περιέχουν μόνο στοιχεία που έχουν εκχυλιστεί από ζωντανούς οργανισμούς, χρησιμοποιούν ως υποδοχείς ζωντανά κύτταρα. Αποτελούνται από δύο κύρια μέρη: α) τα ζωντανά κύτταρα, που είναι ο κύριος μεταγωγέας που χρησιμοποιείται ως αρχικό στοιχείο πρόσληψης και αναμετάδοσης σημάτων, και β) τους δευτερεύοντες μεταγωγείς, που χρησιμοποιούνται στη μετατροπή των φυσιολογικών σημάτων σε ηλεκτρικά.

Μέσα σε μία δεκαετία, οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες έγιναν κεντρικό σημείο έρευνας στους τομείς των βιοαισθητήρων και της βιοηλεκτρονικής, επειδή μπορούν να ανιχνεύσουν τη λειτουργική πληροφορία των ενεργά βιολογικών αναλυτών. Χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία, εκλεκτικότητα, γρήγορη απόκριση, και έχουν εφαρμογή σε πολλά πεδία όπως η βιοιατρική, η περιβαλλοντική παρακολούθηση και ο φαρμακολογικός έλεγχος (Kintzios 2006; Kintzios 2008).

Το βασικό διάγραμμα των κυτταρικών βιοαισθητήρων απεικονίζεται στην Εικόνα 1.1. Αποτελείται κυρίως από δύο μέρη: α) ζωντανά κύτταρα ή νευρωνικό δίκτυο που έχουν καλλιεργηθεί επάνω στην επιφάνεια του μεταγωγέα και β) μεταγωγέα για χημική ανίχνευση ή ανίχνευση δυναμικού. Τα ζωντανά κύτταρα ενεργούν ως το αισθητήριο στοιχείο ή ο κύριος μεταγωγέας που ανταποκρίνεται σε ένα εξωτερικό ερέθισμα όπως ηλεκτρικό ή χημικό, αντικά φάρμακα και διάφοροι δεσμευτές υποδοχέων. Στη συνέχεια ανταποκρίνεται παράγοντας κάποιες μεταβολές, εξωκυτταρικές, μόρια ή ιόντα, μεταβολές δυναμικού ή εμπέδησης που επάγεται από το μεταβολισμό των κυττάρων κλπ. Οι μεταγωγείς ή δευτερεύοντες μεταγωγείς, όπως συσκευές διατάξεων πυριτίου που μπορούν να ανιχνεύσουν αυτές τις αποκρίσεις και να τις μετατρέψουν σε ηλεκτρικά σήματα.



Εικόνα 1.1. Σχηματικό διάγραμμα κυτταρικού βιοαισθητήρα.

Γενικά, όταν κάποιο εξωτερικό ερέθισμα, όπως φάρμακα και χημικά, ηλεκτρικά ερεθίσματα, προστίθενται στον κυτταρικό βιοαισθητήρα, τα κύτταρα θα παράγουν μία διαφορά δυναμικού καθώς και ιονικές ή μοριακές μεταβολές που μπορούν να ανιχνευθούν από συσκευές που βρίσκονται κάτω από μια λεπτή επίστρωση ηλεκτρολύτη. Έτσι, μεταβολές του δυναμικού και της έντασης του ρεύματος, από εξωκυτ-

ταρικές περιβαλλοντικές μεταβολές, μετατρέπονται από τους μεταγωγείς σε ηλεκτρικά σήματα. Αυτοί οι αισθητήρες έχουν τη δυνατότητα να μετρήσουν την εξωκυτταρική διαφορά δυναμικού, εμπέδηση, τη μετάδοση του ερεθίσματος στα ιονικά κανάλια και την ταχύτητα μετάδοσης των βιολογικών σημάτων μεταξύ των νευρώνων (Bickerstaff 1997) (D'Souza 2001).

Τα ζωντανά κύτταρα, καλλιεργούμενα σε συσκευές, προσδιορίζουν καθοριστικά την απόδοση των κυτταρικών βιοαισθητήρων. Αυτό είναι ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των περιπτώσεων όπου τα κύτταρα καλλιεργούνται απευθείας σε ένα τριβλίο Petri, μια καλυπτρίδα ή κάποια άλλη πλάκα καλλιέργειας κυττάρων. Εξαιτίας της καλής υδροφιλικότητας και του αρνητικά φορτισμένου υλικού του, τα περισσότερα κύτταρα μπορούν να απλωθούν σε μία πλάκα καλλιέργειας κυττάρων. Εξάλλου, υπάρχουν πολλά πρωτόκολλα για τους διαφορετικούς τύπους κυττάρων όπως τα καρδιακά μυοκύτταρα, οι νευρώνες, τα γλία, τα επιθηλιακά, τα εμβρυονικά κ.λπ. Η καλλιέργεια κυττάρων με chip που έχουν κατασκευαστεί από πυρίτιο ή κάποιο άλλο αγώγιμο μέταλλο, και να επιτευχθεί καλή επαφή μεταξύ του υποστρώματος και της κυτταρικής μεμβράνης. Παρόλα αυτά, το κύριο πρόβλημα είναι ότι το υλικό από μόνο του δεν είναι ελκυστικό για τα κύτταρα λόγω τραχύτητας, υδροφιλικότητας, λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια του και ιξώδους. Έτσι απαιτείται να γίνει περισσότερη δουλειά για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών της επιφάνειας των μεταγωγέων.

Για να βελτιωθεί η σύζευξη και η μετάδοση του σήματος των ζωντανών κυττάρων, απαιτείται να γίνει έρευνα για το μηχανισμό και τα μοντέλα σύζευξης μεταξύ των κυττάρων και των μεταγωγέων. Όταν τα κύτταρα χρησιμοποιούνται ως μεταγωγείς, χρειάζεται να είναι γνωστός ο τρόπος με τον οποίο τα κύτταρα αισθάνονται τα ερεθίσματα, πως τα κύτταρα αντιδρούν στα εξωτερικά ερεθίσματα και πως τα κύτταρα συζευγνύονται με τους μεταγωγείς. Επιπλέον, η ανάπτυξη νέων chip μεταγωγέων, απαιτεί σημαντική έρευνα σε διάφορες τεχνικές ανίχνευσης προκειμένου να ολοκληρωθούν μετρήσεις μεταβολισμού, διαφορών δυναμικού, εμπέδησης κ.λπ.

Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες έχουν το πλεονέκτημα της αυξημένης σταθερότητας, της μεγάλης βιοκαταλυτικής δραστηριότητας, ενώ το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητά τους να παρέχουν σχετικές κυτταρικές πληροφορίες σε απόκριση με το δείγμα και να μετρούν τη δραστηριότητά του. Με άλλα λόγια οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες, οι οποίοι εκτελούν λειτουργίες όπως τα κύτταρα, όχι μόνο ανιχνεύουν την παρουσία ενός στοιχείου, αλλά είναι ακόμη ικανοί να αποκρίνονται με έναν τρόπο που προσφέρει επίγνωση της φυσιολογικής επίδρασης του δείγματος στα κύτταρα (Stenger et al. 2001; Gilchrist et al. 2005).

Επιπλέον η ανάγκη για βιοαισθητήρες με χρόνο ζωής εβδομάδων ή μηνών αποκλείει τη χρήση ηλικιωμένων κυττάρων, κάτι που απαιτεί κατανάλωση χρόνου για συλλογή και προετοιμασία των κυττάρων. Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες επίσης παρέχουν ένα περισσότερο πολύπλοκο – σύνθετο αισθητήριο σύστημα το οποίο περιλαμβάνει πολλαπλά ολοκληρωμένα μοριακά συστατικά και έχουν το πλεονέκτημα της οικονομικής βιομηχανοποίησής τους.

Παρόλα αυτά, όπως και με άλλους βιοαισθητήρες, η ευαισθησία και η αξιοπιστία αυτών των αισθητήρων είναι συχνά περιορισμένη λόγω των μη εξειδικευμένων παρεμβάσεων οφειλόμενων στο δείγμα και στις εξωτερικές, περιβαλλοντικές μεταβολές (όπως το pH και η θερμοκρασία). Παρουσιάζουν επίσης φτωχή επιλεκτικότητα επειδή οι ιστοί περιέχουν πολλά διαφορετικά ένζυμα και υποδοχείς και ο βιοαισθητήρας μπορεί να αποκρίνεται και σε άλλες ουσίες εκτός της επιθυμητής. Ένα ακόμη μειονέκτημά των βιοαισθητήρων που βασίζονται σε φυτικά κύτταρα ή σε κύτταρα μικροοργανισμών είναι η διάχυση του δείγματος και των προϊόντων δια μέσου του κυτ-

ταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα την αργή απόκριση σε αντίθεση με τους ενζυμικούς βιοαισθητήρες όπου η απόκριση είναι άμεση (Rainina et al. 1996). Με άλλα λόγια αυξάνεται ο χρόνος που χρειάζεται ο βιοαισθητήρας για να αποκριθεί, αφού η προς ανάλυση ουσία πρέπει να διαχυθεί διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών για να γίνει η κατάλυση από τα αντίστοιχα ένζυμα.

Αν και υπάρχουν μόνο λίγα εμπορικά βιοαισθητηριακά συστήματα βασισμένα σε ζωικά κύτταρα, όπως έχει αναφερθεί πρόσφατα στη βιβλιογραφία, το 8% των τεχνολογιών βασίζεται σε κύτταρα σε σύνολο περίπου 2000 (Science Direct, PubMed, Scopus). Από την άλλη μεριά, οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες φαίνονται να είναι ελκυστικοί ως αντικείμενα προστασίας πνευματικής ιδιοκτησίας όσον αφορά την ανίχνευση φυτοπροστατευτικών προϊόντων και άλλων ξενοβιοτικών, ενώ είναι επίσης πολύ σημαντικό το γεγονός ότι έχει κατοχυρωθεί πνευματικά η εφαρμογή τους στη μικροβιολογία τροφίμων. Στην πραγματικότητα, όπως τεκμηριώνεται από τον πίνακα 2, οι τεχνολογίες που βασίζονται σε κύτταρα έχουν συνεισφέρει στην πλειονότητα των πατεντών για βιοαισθητηριακά συστήματα ανίχνευσης υπολειμμάτων (Kintzios 2014).

Πίνακας 1.1. Ταξινόμηση Διεθνών, Αμερικανικών και Ευρωπαϊκών πατεντών στην ασφάλεια τροφίμων (2000-2012) .

Τύπος Βιοαισθητήρα	Πεδίο Εφαρμογής	
	Φυτοπροστατευτικά προϊόντα/ Ξενοβιοτικά	Παθογόνα Τροφίμων
Όλοι οι τύποι	710	282
Κυτταρικοί	575	31

Επιπρόσθετα, 8% των Ευρωπαϊκών χρηματοδοτούμενων προγραμμάτων για την ασφάλεια τροφίμων από το 2000, επικεντρώθηκαν στα ζωικά κύτταρα σαν στοιχείο βιοαναγνώρισης, καθώς και το ένα τέταρτο των χρηματοδοτούμενων προγραμμάτων βασίζονται σε κυτταρικούς βιοαισθητήρες (<http://cordis.europa.eu>).

1.1.1. Χαρακτηριστικά κυτταρικών βιοαισθητήρων.

Ένα κοινό χαρακτηριστικό όλων των κυτταρικών βιοαισθητήρων είναι ότι σε αντίθεση με άλλους τύπους βιοαισθητήρων, χρησιμοποιούν ζωντανά κύτταρα ως υποδοχείς. Στα κύτταρα υπάρχουν μοναδικοί συνδυασμοί ενζύμων ή υπερβολικά ευαίσθητων φυσιολογικών μηχανισμών υποδοχέων μπορεί να είναι αδύνατο να αναπαραχθούν κατά τη χρήση απομονωμένων ενζύμων σε ένα βιοαισθητήρα. Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι ότι οι διάφορες βιολογικές λειτουργίες μπορούν να πραγματοποιηθούν σε φυσικό βιολογικό περιβάλλον. Σε αυτές τις συνθήκες, οι βιοενεργές ενώσεις μπορούν να έχουν τη μέγιστη δραστηριότητα τους ή μπορεί να αναγεννηθούν ή ανασυντεθούν στα ζωντανά κύτταρα. Έτσι, αναμένεται μεγαλύτερη σταθερότητα από τους αισθητήρες. Αν τα ζωντανά κύτταρα φθαρούν, θα συμβούν αιφνίδιες μεταβολές στη συμπεριφορά του αισθητήρα αντί για μια ανεπαίσθητη κίνηση που οφείλεται στη φθορά του υποδοχέα, χαρακτηριστικό των άλλων τύπων βιοαισθητήρων.

Τα ζωικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν σε βιοαισθητήρες για πρώτη φορά από τους Giaever και Keese (1993), οι οποίοι χρησιμοποίησαν ένα σύστημα μέτρησης ηλεκτρικής κυτταρικής εμπέδησης (ECIS) για την ανίχνευση τους αλλαγών στην κυτταρική μορφολογία. Τα ζωικά κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί ως επί το πλείστον σε τοξικολογικές/περιβαλλοντικές αναλύσεις, ένα πεδίο εφαρμογής παρόμοιο με τον έλεγχο τροφίμων. Συνεπώς ορισμένες τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται στην ασφάλεια τροφίμων βασίζονται σε ζωικά κύτταρα. Στον Πίνακα 1.2. φαίνονται συγκεντρωτικά οι πρόσφατες εξελίξεις σε αυτόν το τομέα, οι οποίες έχουν κατηγοριοποιηθεί

με βάση είτε την κυτταρική σειρά ή την τεχνολογία που εφαρμόστηκε για τη μέτρηση (Kintzios 2014).

Πίνακας 1.2. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα ζωικών κυττάρων που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές με βιοαισθητήρες στην ασφάλεια τροφίμων.

Κυτταρικό Υλικό	Τεχνολογία	Στόχος	Όριο Ανίχνευσης	Ποσοτικός Προσ/μός	Βιβλιογραφική Αναφορά
Καρδιακά Κύτταρα	Ηλεκτροφυσιολογία	Πυρεθροϊδή Εντομοκτόνα	-	-	(Natarajan et al. 2006)
- Vero ινοβλάστες νεφρικών κυττάρων - N2a Νευροβλάστωμα	Ηλεκτροφυσιολογία (BERA)	Οργανοφωσφορικά & Καρβαμιδικά Εντομοκτόνα	ppt	+	(Flampouri et al. 20 Zhang) (Mavrikou et al. 2008)
-B Λεμφοκύτταρα -Red-2E9	Φωτομέτρηση	Παθογόνα τροφίμων & οι τοξίνες τους	10 ³ CFU/mL (Listeria) 10-40 ng (τοξίνης)	+	(Banerjee & Bhunia 2009)
-B Λεμφοκύτταρα -Red-2E9	Βιοφωταύγεια	Πολυαλογονωμένοι Αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs)	fmol	-	(Sanderson et al. 1996) (Murk et al. 1996)

Τα πιο κοινά προβλήματα των κυτταρικών βιοαισθητήρων συνοψίζονται ως εξής (Otto et al., 2004):

- Οι συνθήκες του φυσικού περιβάλλοντος όπου το κύτταρο μπορεί να παραμείνει ζωντανό για μεγάλο χρονικό διάστημα, πρέπει να διατηρούνται συνεχώς και αυτό απαιτεί αυστηρό έλεγχο των φυσικών και χημικών παραμέτρων του περιβάλλοντος.
- Ο μεταβολισμός των κυττάρων δεν πρέπει να διαταράσσεται και πρέπει να ταΐζονται συνεχώς.
- Τα κύτταρα πρέπει να ακινητοποιούνται γύρω ή πάνω από την επιφάνεια του μεταγωγέα χωρίς να περιορίζονται οι βιολογικές τους λειτουργίες. Στο μέλλον θα έπρεπε να ερευνηθούν η υπερμοριακή οργανική χημεία και η κυτταρική προσομοίωση.
- Η χρόνος ζωής των αισθητήρων καθορίζεται από το χρόνο ζωής των κυττάρων.

Τα ιδιαίτερα πλεονεκτήματα της χρήσης των κυτταρικών αισθητήρων είναι:

- Είναι λιγότερο ευαίσθητοι στην παρεμπόδιση από διαλύματα και πιο ανθεκτικοί από τα ηλεκτρόδια με ένζυμα σε συνθήκες pH και θερμοκρασίας κάτω από τις ευνοϊκές αν και δεν πρέπει να ξεπερνούν το κρίσιμα σημεία που πεθαίνουν τα κύτταρα.
- Έχουν μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής από τους ενζυμικούς αισθητήρες.
- Είναι πιο φθηνοί επειδή τα ζωντανά κύτταρα δε χρειάζεται να απομονωθούν.

Επειδή οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες έχουν πολλά πλεονεκτήματα (π.χ. γρήγορη απόκριση, εύκολη κατασκευή), έχουν εκτεταμένο αριθμό εφαρμογών, που περιλαμβάνουν ανίχνευση φαρμάκων, ανάλυση της φυσιολογίας των κυττάρων, ανίχνευση τοξινών, ανάπλαση των περιφερειακών νευρικών κυττάρων καθώς και καταγραφές *in vivo*. Έτσι, αποτελούν πεδία πολλά υποσχόμενα για την ανακατασκευή τραυματισμένων αισθητήριων οργάνων.

Τα ζωικά κύτταρα έχουν επίσης ελκύσει την προσοχή των ειδικών στους βιοαισθητήρες όχι τουλάχιστον λόγω του γεγονότος ότι η χρήση τους παρουσιάζει μία σημαντική πρόκληση, αυτή της ελαττωμένης ζωτικότητας (τουλάχιστον όταν τα κύττα-

ρα μετακινούνται από τις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας) και την επακόλουθη περιορισμένη δυνατότητα διατήρησης. Επίσης, αν και τα κύτταρα αποκρίνονται σε συγκεκριμένους αναλύτες με έναν φυσιολογικά συναφή τρόπο, το πρότυπο της απόκρισης δεν είναι πάντα αναπαραγωγίμο ως προς το σήμα προέλευσης. Με άλλα λόγια, το μέγεθος της απόκρισης μπορεί να κυμαίνεται στο βαθμό ότι η έλλειψη επαναληψιμότητας θα εμποδίσει την πρακτική εφαρμογή των κυτταρικών βιοαισθητήρων. Αυτό μπορεί να έχει ιδιαίτερα σημαντικές επιπτώσεις στην περίπτωση των ζωικών κυττάρων: σε σύγκριση με τα βακτηριακά κύτταρα, το μεγαλύτερο μέγεθός τους υπαγορεύει τη μειωμένη πυκνότητα αποθήκευσης τους σε ένα βιοαισθητηριακό στοιχείο (π.χ. ένα αναλώσιμο φυσίγγιο ακινητοποιημένων κυττάρων σε επαφή με μία συσκευή μέτρησης) (Kintzios 2014). Αυτό μπορεί να έχει σαν συνέπεια την αύξηση του στατιστικού σφάλματος της απόκρισης σε ένα μοναδιαίο δείγμα.

Οι Natarajan et al. (2006) ανέπτυξαν μία υψηλής απόδοσης μέθοδο για την ανίχνευση πυρεθροειδών χρησιμοποιώντας σύστημα πολλαπλών ηλεκτροδίων για εξωκυτταρικές μετρήσεις από καρδιακά μυϊκά κύτταρα καλλιεργούμενα πάνω σε συστοιχίες μικρο-ηλεκτροδίων (MicroElectrode Array, MEA). Αυθόρμητη δραστηριότητα των κυττάρων παρήγαγε εξωκυτταρικά ένα δυναμικό εύρους από 100 μV μέχρι 1200 μV με συχνότητα 0.5–4 Hz. Όλα τα πυρεθροειδή που δοκιμάστηκαν: a-cypermethrin, tetramethrin και tefluthrin, προκάλεσαν παρόμοιες αλλαγές στις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των καρδιακών μυϊκών κυττάρων, δηλαδή μειωμένη συχνότητα και ένταση παλμών.

Οι Banerjee and Bhunia (2009) χρησιμοποίησαν ακινητοποιημένα λεμφοκύτταρα Ped-2E9 για την ανίχνευση *Listeria monocytogenes*, εντεροτοξικού *Bacillus*, *Vibrio*, *Micrococcus* και *Serratia*, και τοξίνες, όπως αιμολυσίνη από *Staphylococcus aureus*, φωσφολιπάση C από *Clostridium perfringens*, κυτολυσίνη από την θαλάσσια ανεμώνη *Stoichactis helianthus*, λιστεριολυσίνη από *L. monocytogenes*, και εντεροτοξίνη από *Bacillus*. Τα όρια ανίχνευσης για τις τοξίνες ήταν 10–40 ng σε 2 ώρες, ενώ για το μοντέλο του βακτηριακού παθογόνου, *L. monocytogenes*, 10^3 – 10^4 CFU/mL σε 4–6 ώρες, ακόμα και με την παρουσία μείγματος μεγαλύτερης συγκέντρωσης μη παθογόνων ειδών του ίδιου γένους ή μικροχλωρίδας με κοινό υπόβαθρο. Γραμμικότητα αναφέρθηκε στα 10^3 – 10^8 CFU/mL.

Κύτταρα ηπατώματος, τα οποία εκφράζουν φυσικά τον αρωματικό υδρογονανθρακικό υποδοχέα (AhR), μετασχηματίστηκαν εισάγοντας ένα πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της διοξίνης και το γονίδιο αναφοράς luc που κωδικοποιεί τη λουσιφεράση. Ο βιοαισθητήρας είχε σαν όριο ανίχνευσης τα 5×10^{-12} mol/L 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Επίσης υπήρξε απόκριση και σε άλλα χημικά μόρια παρόμοια με τη διοξίνη ακόμα και αν τα όρια ανίχνευσης ήταν υψηλότερα και σε μείγματα διαφορετικών ενώσεων. (Murk et al. 1996; Michelini et al. 2006).

Αν και οι πρακτικές εφαρμογές των κυτταρικών βιοαισθητήρων έχουν αναπτυχθεί πολύ γρήγορα, το θεωρητικό υπόβαθρο της λειτουργίας τους δεν έχει ξεκαθαριστεί ακόμα σε πολλές περιπτώσεις. Υπάρχουν διαφωνίες σχετικά με τους μηχανισμούς εκπομπής του σήματος, τις μεθόδους εξομάλυνσης του σήματος και της ερμηνείας των μετρούμενων και αναμενόμενων αποτελεσμάτων. Παράλληλα, η ανάπτυξη των κυτταρικών βιοαισθητήρων σημαίνει και την ταυτόχρονη διεξαγωγή εκτεταμένης έρευνας. Αυτό αποτελεί ένα από τα προβλήματα εμπορευματοποίησης των κυτταρικών βιοαισθητήρων. Αν και υπάρχουν επιτυχημένα αποτελέσματα ερευνών, οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες έχουν κάποια μειονεκτήματα πέρα από αυτά τα γενικά προβλήματα. Αυτά είναι τα ακόλουθα:

- Μερικοί τύποι κυτταρικών βιοαισθητήρων μπορεί να έχουν πιο αργή απόκριση σε σχέση με τους ενζυμικούς αισθητήρες.

- Χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να επανέρθουν στην αρχική τους κατάσταση μετά τη χρήση.
- Τα κύτταρα περιέχουν ένζυμα, επομένως χρειάζεται προσοχή ώστε να εξασφαλιστεί η εκλεκτικότητα.

1.1.2. Τύποι κυτταρικών βιοαισθητήρων.

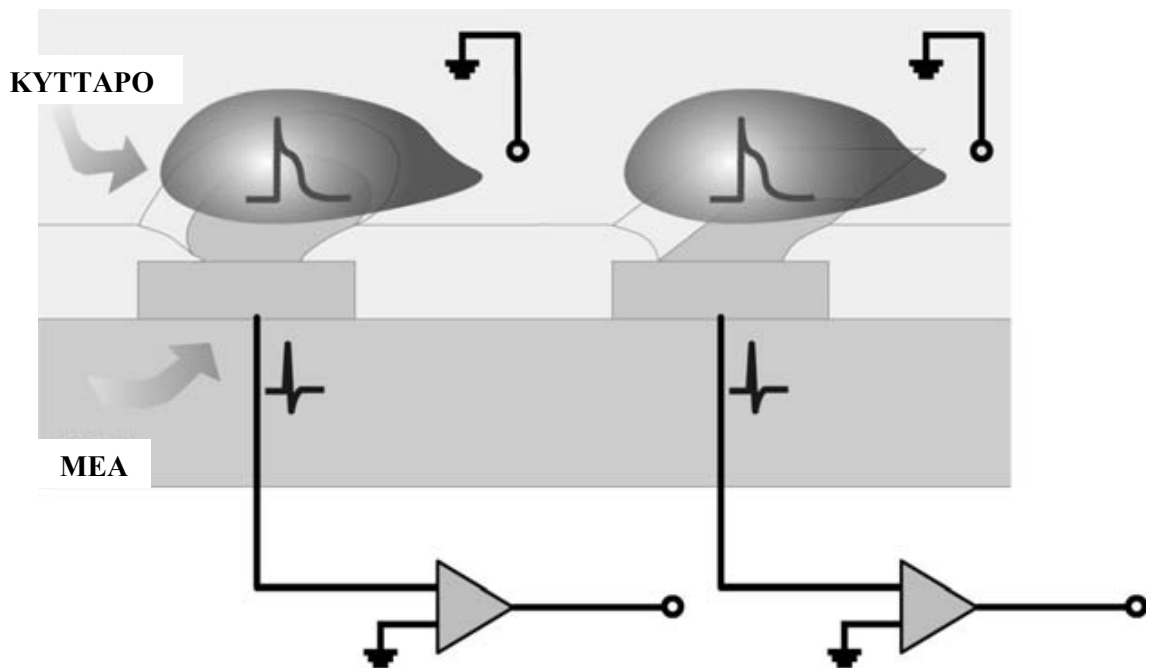
Ηλεκτρικά ενεργά κύτταρα ή ιστοί, μπορούν να διασυνδεθούν με μικροηλεκτρόδια που επιτρέπουν τη σύλληψη εξωκυτταρικών σημάτων συσχετιζόμενων με την κυτταρική απόκριση ή την απόκριση ολόκληρου ιστού. Η αλληλεπίδραση αυτή κατηγοριοποιείται σε τρεις ομάδες:

- Άμεση αλληλεπίδραση των μικροηλεκτροδίων με την κυτταρική μεμβράνη
- Αλληλεπίδραση με στοιχεία-αναλύτες παρόντα στο εξωκυτταρικό μικροπεριβάλλον
- Αλληλεπίδραση με άλλα μέρη του στόχου, όπως το στερεό κολλοειδές και το διάλυμα που είναι συγκεντρωμένο στους πόρους της μήτρας (ακινητοποιημένοι κυτταρικοί βιοαισθητήρες) ή με το διάλυμα καλλιέργειας (εναιώρημα κυτταρικών βιοαισθητήρων).

Προς το παρόν, οι δευτερεύοντες μεταγωγείς που χρησιμοποιούνται σε κυτταρικούς βιοαισθητήρες περιλαμβάνουν κυρίως συστοιχία μικροηλεκτροδίων (MEA), κρυσταλλολυχνία επίδρασης πεδίου (FET), ποτενσιομετρικό αισθητήρα φωτός (LAPS), αισθητήρα εμπέδησης (ECIS), τσιπ για patch clamp, κρύσταλλου χαλαζία (QCM), συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR) κλπ.

Η γενική αρχή λειτουργίας των μεθόδων που βασίζονται σε ηλεκτρόδια είναι η εξής: κατασκευάζεται ένα ηλεκτρόδιο το οποίο αποτελείται από αγωγίμο σύρμα (π.χ. άργυρο, χρυσό ή πλατίνα) τοποθετημένο σε πιπέττα γεμάτη από ηλεκρολυτικό διάλυμα. Με το σύστημα αυτό, όταν η άκρη της πιπέττας έρθει σε επαφή με το βιολογικό υλικό, δημιουργείται μια αγωγίμη γέφυρα, μέσα από την οποία μπορεί να συνδεθεί μια συσκευή καταγραφής ρεύματος ή δυναμικού. Εκτός από το ηλεκτρόδιο μέτρησης υπάρχει και το ηλεκτρόδιο αναφοράς σε μια σταθερή τιμή ρεύματος ή δυναμικού. Συνήθως χρησιμοποιείται σύστημα δυο ζευγών ηλεκτροδίων (μέτρησης – αναφοράς) έτσι ώστε, να είναι δυνατή η μέτρηση του ρεύματος ή του δυναμικού μετά από εξωγενή εφαρμογή ρεύματος ή δυναμικού (αμπερομετρία – βολταμετρία) (Guilbault 1991).

Η συστοιχία μικροηλεκτροδίων που έχει σχεδιαστεί για τη μεταφορά και καταγραφή του κυτταρικού δυναμικού και περιλαμβάνει τη συχνότητα, το σχήμα του κύματος, την ταχύτητα και πλάτος παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.2. Με τη χρήση της μικρομηχανικής, Η ΜΕΑ κατασκευάστηκε με την εναπόθεση Au, Ir, Pt, ή άλλων μετάλλων σε υπόστρωμα γυαλιού ή σιλικόνης για το σχηματισμό ηλεκτροδίων, της σύνδεσης των αγωγών και της έκθεσης των σημείων του ηλεκτροδίου όπου τα ηλεκτρόδια επικοινωνούν με τα κύτταρα ή τους ιστούς. Συνήθως, η ΜΕΑ αποτελείται από ηλεκτρόδια που έχουν τοποθετηθεί γύρω από μια μήτρα, συνδέσεις αγωγών και συγκολλημένα πλαίσια. Χάρη στην απλή κατασκευή, καλή βιοσυμβατότητα και την ευκολία να παρατηρηθεί σε μικροσκόπιο και να ανιχνευθούν κυτταρικές πολυπαραμετρικότητα, οι ΜΕΑ έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε κυτταρικούς βιοαισθητήρες. Η ΜΕΑ, επειδή είναι αισθητήρας συστοιχίας, είναι κυρίαρχη για τη μακρά της διάρκεια, πραγματικό χρόνο, μη παρεμβατικές μετρήσεις και μεταφορές μεταξύ των κυττάρων σε σύγκριση με την τεχνολογία patch-clamp (Brischwein et al., 2003).



Εικόνα 1.2. Σχηματικό διάγραμμα MEA για κυτταρικούς βιοαισθητήρες.

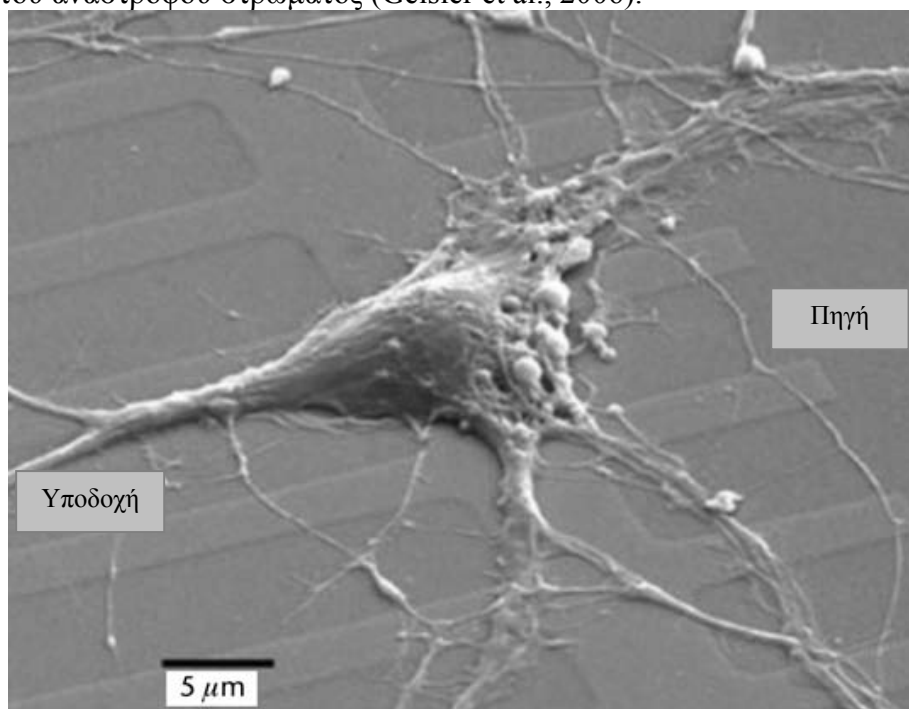
Ορισμένες τεχνολογίες κλειδιά της MEA για κυτταρικούς βιοαισθητήρες βρίσκονται ακόμα καθυδόν. Πρέπει να λυθούν ακόμη πολλά προβλήματα. Για παράδειγμα, η επιφάνεια του υποστρώματος φθείρεται εύκολα όταν παραμένει μέσα σε διάλυμα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Το κενό μεταξύ των κυττάρων και των ηλεκτροδίων είναι δύσκολο να καλυφθεί από τα κύτταρα όταν βρίσκονται σε MEA. Αυτό θα επηρεάσει το αποτέλεσμα των μετρήσεων. Η MEA είναι πολύ αποτελεσματική, όχι μόνο για τον εντοπισμό της ηλεκτροφυσιολογικής δραστηριότητας των κυττάρων αλλά και για την ανίχνευση και αξιολόγηση της φαρμακολογίας και τοξικολογίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρατήρηση μετάδοσης σημάτων σε καρδιακά μυοκύτταρα και φάρμακα της καρδιάς. Μπορεί να καταγράψει επίσης εξωκυτταρικές διαφορές δυναμικού και αποκρίσεις νευρικών κυττάρων σε διάφορες ουσίες, που είναι πολύ σημαντικό για τη φαρμακολογική έρευνα. Για παράδειγμα, ορισμένοι ερευνητές καλλιέργησαν ένα νευρωνικό δίκτυο της σπονδυλικής στήλης ποντικού σε μια MEA 64 καναλιών (ηλεκτρόδια ITO) και μέτρησαν τη νευρική απόκριση μετά τη ν προσθήκη TMPP (ένα φάρμακο που επάγει τις συσπάσεις) (Keefter et al., 2001).

Το FET κατασκευάζεται με τεχνολογία ημιαγωγών. Αυτός ο τύπος αισθητήρα, δίνει έμφαση σε ένα άλλο μεταγωγέα που χρησιμοποιείται για την καταγραφή των εξωκυτταρικών σημάτων όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.3. (Otto et al., 2003). Ως μια πολύ οργανωμένη δομή, το κύτταρο εκφράζει πολλές πληροφορίες ανάλογα με τις αλλαγές στο περιβάλλον στο εξωτερικό του. Έως σήμερα, η κλασική διαδικασία MOS έχει εφαρμοστεί για την κατασκευή κυτταρικών αισθητήρων FET με μικρές αλλαγές σε σχέση με μια μονωμένη κρυσταλλολυχνία εφαρμογής πεδίου (IGFET). Η μεταλλική σύνδεση της κατασκευής FET αντικαταστάθηκε από ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς στο διάλυμα. Ευαίσθητα φιλμ όπως διοξείδιο του πυριτίου και διοξείδιο του νιτριδίου εναποτέθηκαν στην περιοχή της γέφυρας που καλύπτεται από διαφορετικούς τύπους ηλεκτρογενετικών κυττάρων. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν τα κύτταρα και μπορούν να εξομοιωθούν μέσω ενός συστήματος έγχυσης υγρών. Η απόκριση του κυττάρου μετά από ένα ερέθισμα από το θάλαμο του ηλεκτρολύτη μοιάζει προς το παρόν με ένα μαύρο κουτί σε σχέση με την παράλληλη ενεργοποίηση των διαφόρων μονοπατιών σηματοδότησης. Ο πιο απλός τρόπος για να αναλυθεί η

κυτταρική απόκριση είναι η αποκωδικοποίηση της πληροφορίας από το μεταβολισμό του κυττάρου που εκφράζεται εξωκυτταρικά.

Τα FETs έχουν την ικανότητα να μετρούν μεταβολές της συσσώρευσης φορτίων στην επιφάνειά τους. Συνεπώς, εάν η επιφάνεια τροποποιηθεί με ειδικά εκλεκτικά υλικά, το FET μετατρέπεται σε διάταξη ευαίσθητη στις μεταβολές της συσσώρευσης πρωτονίων ή άλλων ιόντων. Δηλαδή, το FET είναι δυνατόν να μετατραπεί σε ISFET (Ion-selective FET). Το αναπτυσσόμενο δυναμικό είναι ανάλογο προς τη συγκέντρωση των εξωτερικών ιόντων ή, γενικότερα των φορτισμένων μορίων έναντι των οποίων το συγκεκριμένο ISFET είναι εκλεκτικό (Martinoia et al. 2005). Η επικάλυψη ενός ISFET (π.χ. πρωτονιο-εκλεκτικού FET) με ανθεκτική λεπτή μεμβράνη, η οποία φέρει ακινητοποιημένο το κατάλληλο ένζυμο και η οποία έρχεται σε επαφή με το προς ανάλυση δείγμα αποτελεί εξελιγμένο ενζυμικό μικροβιοαισθητήρα τύπου ENFET (Enzyme field effect transistor). Η μεταβολή της συγκέντρωσης ιόντων (π.χ. πρωτονίων) στην επιφάνεια του ENFET, λόγω της ενζυμικής αντιδράσεως, επηρεάζει το αναπτυσσόμενο δυναμικό, φαινόμενο το οποίο τελικώς μετράται (Luo et al. 2004). Τέτοιες διατάξεις εμφανίζουν αξιοπιστία και ανθεκτικότητα, ταχεία απόκριση λόγω της λεπτής επιφάνειας ανιχνεύσεως (μεμβράνης) και ευκολία μαζικής παραγωγής (Κλώνης 1997).

Οι κυτταρικοί αισθητήρες FET εστιάζουν στις παραλλαγές της ιονικής συγκέντρωσης κοντά στη γέφυρα σύνδεσης και το δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης. Αν υπάρξει κάποια αλλαγή, το δυναμικό της επιφάνειας του διηλεκτρικού στρώματος μπορεί να ανυψωθεί επάγοντας τη μεταβολή της πυκνότητας των κινητών ηλεκτρονίων. Η αλληλεπίδραση κυττάρων-πυριτίου προκαλεί συντονισμό του ρεύματος κατά μήκος του αναστροφου στρώματος (Geisler et al., 2006).



Εικόνα 1.3. Σχηματικό διάγραμμα κυτταρικών βιοαισθητήρων FET (Αναπαραγωγή από το Solid State Electronics, 2008, με την άδεια της Elsevier B.V.)

Η πρώτη απόπειρα εφαρμογής ενός ISFET για νευροφυσιολογικές μετρήσεις έγινε το 1970. Ακολούθησαν ένας νευρώνας ασπόνδυλου και ένας νευρώνας σπονδυλωτού, καθώς και μονοστοιβάδες μυοκυττάρων και μια τομή εγκεφάλου, που καλλιεργήθηκαν σε γέφυρα κυτταρικών αισθητήρων FET για βιολογικές μετρήσεις. Ο μηχανο-

νισμός εξήγησης μοντελοποιήθηκε και περιγράφηκε σε αρκετές δημοσιεύσεις. Οι Yates et al. περιέγραψαν τις διπλές ηλεκτρικές στοιβάδες των κolloειδών συνδέσεων οξειδίου-νερού με το μοντέλο του σημείου πρόσδεσης (Becker et al. 2008). Οι Bergveld et al. (Wu et al. 2001) συζήτησαν τους παράγοντες που προσδιορίζουν τη δυνατότητα σύνδεσης με εξισώσεις πυκνωτών διπλής στοιβάδας. Οι Fromherz et al. (Otto et al., 2003) ανέπτυξαν ένα μοντέλο δύο διαστάσεων επαφής εμβαδού και ένα μοντέλο επαφής σημείου για να αξιολογήσουν τη μεταφορά του σήματος ac με βάση τη θεωρία της γραμμικής απόκρισης. Προς το παρόν, η εξωκυτταρική οξειδοποίηση και αναπνοή ανιχνεύονται από κρυσταλλολυχνίες εφαρμογής πεδίου ευαίσθητους για ιόντα (ISFET). Η σύγχρονη έρευνα έχει επικεντρωθεί επίσης σε υψηλής πυκνότητας συστοιχίες κυτταρικών FET. Το χωρητικό εξωκυτταρικό ερέθισμα ενός κυττάρου σε συνδυασμό με ένα επιπλέον σημείο πυριτίου, φαίνεται να είναι εφικτό. Αυτή η ιδέα αναπτύσσει ένα chip διπλής επικοινωνίας μεταξύ κυττάρου και chip πυριτίου που θα μπορούσε ταυτόχρονα να επιφέρει το ερέθισμα και να καταγράφει τις δραστηριότητες της σύνδεσης κυττάρου-πυριτίου. Το σύστημα παρακολούθησης του κυττάρου (CMS) συνδυάζει ακόμα διαφορετικούς μικροαισθητήρες που περιλαμβάνει συστοιχίες διαφορετικών ιοντο-ευαίσθητων FETs και FETs κυτταρικού δυναμικού με διαφορετικές γέφυρες και υλικά. Με την ταχύτερη ανάπτυξη της βιομηχανίας ημιαγωγών, μπορούν να επιτευχθεί υψηλή πυκνότητα συστοιχιών κυτταρικών αισθητήρων FET, καλύτερης ανάλυσης. Πριν πολύ καιρό, αυτός ο τύπος αισθητήρα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση φαρμάκων και στην έρευνα μετάδοσης των νευρωνικών δικτύων έχοντας ως πλεονεκτήματα τη γρήγορη απόκριση, το χαμηλό κόστος και τις μη-επεμβατικές καταγραφές μακράς χρονικής διάρκειας.

Ο LAPS είναι μία συσκευή ημιαγωγού που προτάθηκε από τους Hafeman et al. το 1988 (Zhang et al. 2001). Οι Hafeman et al. ανίχνευαν το εξωκυτταρικό pH με LAPS αντί με συμβατικά ηλεκτρόδια προκειμένου να προσδιορίσουν τον κυτταρικό μεταβολισμό. Με βάση τον LAPS, το 1990 βγήκε στην αγορά το πρώτο κυτταροαισθητηριακό μικροφυσιόμετρο από την εταιρία Molecular Device. Αυτό μπορεί να εντοπίσει μικρές αλλαγές στην οξειδοποίηση στο εξωκυτταρικό μικροπεριβάλλον πυκνότητας κυττάρων 10^4 - 10^6 . Στις μέρες μας, το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας έχει πραγματοποιηθεί στα μικροφυσιόμετρα.

Το μικροφυσιόμετρο είναι μια τυπική εφαρμογή της τεχνικής του πυριτίου στη βιολογία. Τα κύτταρα καλλιεργούνται στο μικροπεριβάλλον του αισθητήρα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.4. Στη συνέχεια εντοπίζονται παραλλαγές συγκεκριμένων μορίων κατά την καταγραφή των βιολογικών αποκρίσεων των κυττάρων. Το μικροφυσιόμετρο διαφέρει από τις περισσότερες συσκευές ανάλυσης. Αντί να προσδιορίζει τα χαρακτηριστικά των αναλυτών, ανιχνεύει το αποτέλεσμα που επάγει ο αναλύτης στα κύτταρα. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα όξινα προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού σχετίζονται με την κατανάλωση του ATP. Κατά τη διάρκεια σημαντικά μεταβολικά διεργασιών (π.χ. μεταβολισμός της γλυκόζης, αμινοφαινόλη και λιπαρά οξέα), η επαγόμενη απελευθέρωση πρωτονίων στο μικροπεριβάλλον προκαλεί μεταβολή στο εξωκυτταρικό pH. Το μικροφυσιόμετρο μπορεί να μετρήσει τέτοιες μικρές μεταβολές και μπορεί να υποδείξει τον κυτταρικό μεταβολισμό. Το μικροφυσιόμετρο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιολογία, φαρμακολογία, τοξικολογία κλπ.

Ένα άλλο επίτευγμα των κυτταρικών βιοαισθητήρων LAPS είναι η συσκευή υβρίδιο ημι-αγωγού με LAPS. Κύτταρα, όπως τα καρδιακά μυοκύτταρα ή οι νευρώνες καλλιεργούνται και προσδένονται ισχυρά στην επιφάνεια του αισθητήρα. Στη συνέχεια, μέσω της ανίχνευσης του φωτός, μπορούν να μετρηθούν τα εξωκυτταρικά σήματα των κυττάρων. Η συσκευή υβρίδιο ημι-αγωγού με LAPS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση ενός μόνο κυττάρου (Yu et al., 2009).

Προηγμένη τεχνολογία ποτενσιομετρικών βιοαισθητήρων αποτελούν οι μικρο-βιοαισθητήρες με τα επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων ή ISEs (Ion selective electrons). Στα ISEs καταγράφεται το δυναμικό που αναπτύσσεται στην επιφάνεια μιας μεμβράνης (στερεής ή υγρής) συναρτήσεως ενός συστήματος αναφοράς (ημιστοιχείο με γνωστό και σταθερό δυναμικό). Συνήθως στην επιφάνεια της μεμβράνης/διαλύματος λαμβάνει χώρα μια ισορροπία ανταλλαγής ή ιοντοανταλλαγής. Το δυναμικό που αναπτύσσεται εξαρτάται κυρίως από τη μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια που σχετίζεται με τη μεταφορά μάζας διαμέσου της επιφάνειας μεμβράνης/διαλύματος ανάλυσης. Η λειτουργία των βιοαισθητήρων επαγόμενου πεδίου βασίζεται στην επιλεκτική αλληλεπίδραση μιας επιφάνειας με ιόντα που βρίσκονται στο διάλυμα. Αυτή η αλληλεπίδραση αλλάζει το δυναμικό της επιφάνειας και μέσω φαινομένων επαγόμενου πεδίου, επηρεάζεται η αντίσταση ενός ημιαγωγού που βρίσκεται σε κοντινή απόσταση με την επιφάνεια. Το μέγεθος της αλλαγής στην αντίσταση του ημιαγωγού υπολογίζεται από το δυναμικό που χρειάζεται να εφαρμοστεί κατά μήκος του αγωγού για τη διέλευση σταθερής έντασης ρεύματος.

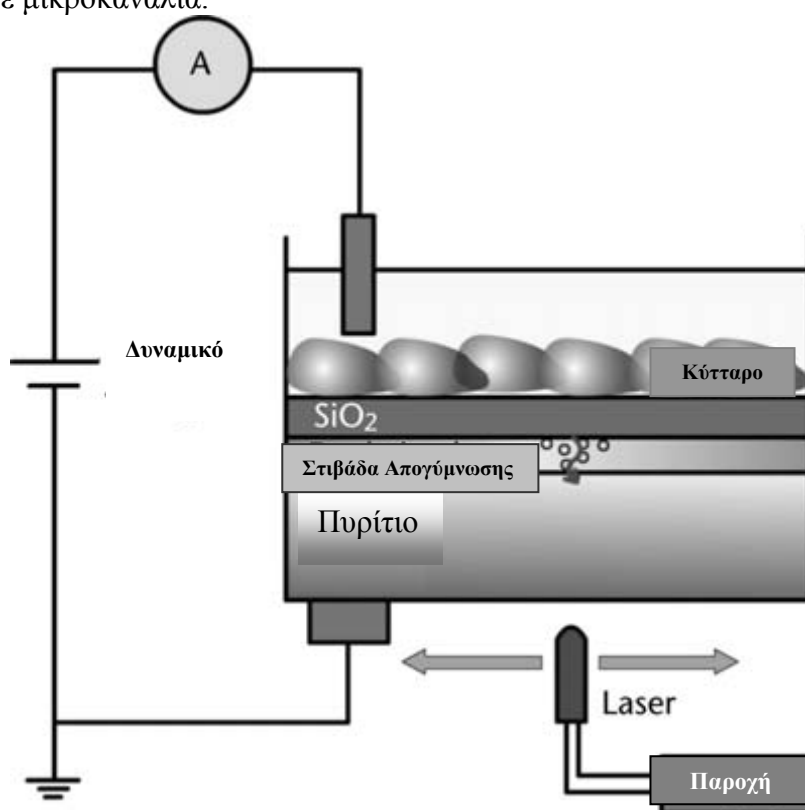
Ο ECIS μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις τεχνικές της ηλεκτρικής φασματοσκοπικής εμπέδησης και της χημικής ανάλυσης ώστε να διερευνηθούν οι βιοηλεκτρικές ιδιότητες των κυτταρικών μεμβρανών και μηχανισμών των αποκρίσεων στα χημικά ή ηλεκτρικά ερεθίσματα όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.5. Σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους όπως η patch-clamp και η μικροσκοπία φθορισμού, οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι έχουν τα προαναφερθέντα πλεονεκτήματα. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του μικροηλεκτρομηχανικού συστήματος και των τεχνολογιών νανοκλίμακας, δημιουργήθηκαν μεγάλες ευκαιρίες για αυτόματες απλοποιημένες και μεγάλης κλίμακας προσεγγίσεις έρευνας στα κύτταρα. Επιπλέον, αυτές οι τεχνικές έχουν τη δυνατότητα να καταγράφουν μετρήσεις με διαφορετικές παραμέτρους σε ένα μόνο chip. Έτσι, υποτίθεται ότι μειώνεται ο χρόνος καθώς καταγράφονται περισσότερες πληροφορίες για τα κύτταρα (Chen et al., 2004).

Τα συστήματα εμπέδησης απαιτούν ένα χρόνο απόκρισης εύρους ωρών (τέσσερις ή περισσότερο), το οποίο είναι πιο γρήγορο από τις παραδοσιακές βιοδοκιμές σε καλλιέργεια κυττάρων. Αυτό δεν έχει να κάνει με την ταχύτητα της φασματομετρίας εμπέδησης αλλά με το χρόνο που απαιτείται για την αλληλεπίδραση του τοξικού παράγοντα με το κυτταρικό σύστημα έτσι ώστε να δώσουν μετρήσιμα αποτελέσματα. Αυτός είναι ένας από τους λόγους που οι κατασκευαστές δίνουν έμφαση ότι τα προϊόντα τους είναι σχεδιασμένα για ερευνητική χρήση μόνο και όχι για διαγνωστική εφαρμογή. Ευτυχώς, έχουν αναφερθεί βελτιώσεις προς αυτή την κατεύθυνση.

Πολύ πρόσφατα, οι Brennan *et al.* (2012) κατάφεραν να βελτιώσουν τόσο την ταχύτητα της δοκιμής όσο και την δυνατότητα διατήρησης του κυτταρικού 43 στοιχείου βιοαναγνώρισης χρησιμοποιώντας επιθηλιακά κύτταρα από βράγχια πέστροφας (RTgill-W1) σε συνδυασμό με ECIS. Πρέπει να αναφερθεί ότι τα κύτταρα RTgill-W1 είναι ποικιλόθερμα και όχι ζωικής προέλευσης, άρα η ικανότητά τους να διατηρούνται ζωντανά χωρίς ανανέωση υλικού 6°C για 78 εβδομάδες. Η δυσκολία της διατήρησης της κυτταρικής ζωτικότητας και αποστειρωμένων συνθηκών χωρίς μία επιτόπια εγκατάσταση καλλιέργειας κυττάρων είναι ο κύριος περιορισμός στη χρήση των κυτταρικών βιοαισθητήρων με ζωικά κύτταρα σε δοκιμές στον αγρό.

Οι Curtis *et al.* (2009) χρησιμοποίησαν ένα βιοαισθητήρα εμπέδησης προκειμένου να αξιολογήσουν την απόκριση δέκα ζωικών κυτταρικών σειρών (οι περισσότερες από αυτές, όπως Vero, Caco-2 και Hep-G2 χρησιμοποιούνται συνήθως στις κυτταρικές βιοδοκιμές) έναντι του καρβαμιδικού φυτοφαρμάκου aldicarb και του γενικού απολυμαντικού πενταχλωροφαινικού νατρίου. Τα δεδομένα συλλέγονταν επί μία ώρα και αξιολογήθηκαν μέσα σε 15 λεπτά. Με αυτόν τον τρόπο η διάρκεια της δοκι-

μής μειώθηκε δραστικά. Επίσης, οι διαφορετικές κυτταρικές σειρές συγκρίθηκαν για άλλες ιδιότητες, όπως η ικανότητα να κάνουν σταθερή μονοστοιβάδα, η υψηλή τους εμπέδηση ($> 1000 \Omega$) και ευκολία προσκόλλησης. Τέσσερις κυτταρικές σειρές σχημάτισαν σταθερές μονοστοιβάδες πάνω στα ECIS ηλεκτρόδια, και επιλέχθηκαν για πειράματα σάρωσης. Η ευαισθησία τους στο aldicarb και το sodium pentachlorophenate μεταβαλλόταν σημαντικά, με τις σειρές Vero και HUVEC να δείχνουν μια μεγαλύτερη ευαισθησία στην χαμηλότερη αποτελεσματική συγκέντρωση λίγο πάνω από 1 mM και 0,38 mM για τους δύο τοξικούς παράγοντες αντίστοιχα. Οι άλλες δύο κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκαν επίσης για σάρωση άλλων φυτοπροστατευτικών προϊόντων όπως το metamidophos και paraquat. Οι κυτταρικές μονοστοιβάδες μπορούν να αποθηκευτούν για 37 ημέρες σε συστοιχίες ηλεκτροδίων ECIS με ελάχιστη αλλαγή της εμπέδησης. Επομένως, υπάρχει μια ικανοποιητική δυνατότητα διατήρησης (για έναν κυτταρικό αισθητήρα βασισμένο σε κύτταρα θηλαστικών), η οποία μπορεί να βελτιωθεί χρησιμοποιώντας ένα ενσωματωμένο σύστημα ροής σε μικροκανάλια.



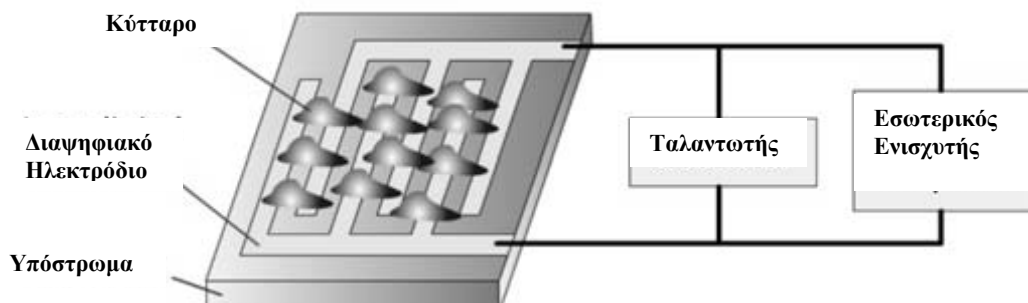
Εικόνα 1.4. Σχηματικό διάγραμμα κυτταρικών βιοαισθητήρων LAPS.

Οι Dittami και Ayliffe σχεδίασαν και κατασκεύασαν μία πλατφόρμα EIS μικρών περιοχών της κυτταρικής μεμβράνης και η μέτρηση της συγκέντρωσης του χημικού που βρίσκεται δίπλα στην κυτταρική μεμβράνη (Helmke and Minerick, 2006). Ανέφεραν ότι η απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή ρυθμίστηκε με τη φάση της θετικής κορυφής του ημιτόνου του ερεθίσματος που επισήμανε το δυναμικό της συσκευής που λύει της ηλεκτρικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και τα ενδοκυτταρικά στοιχεία.

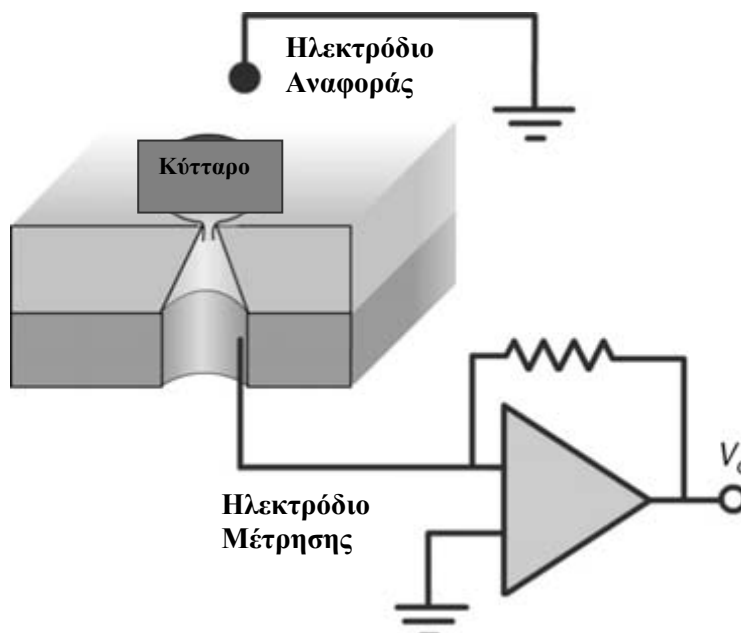
Σήμερα υπάρχει ένας αξιοσημείωτος αριθμός βιοαισθητηριακών μεθόδων που βασίζονται σε ηλεκτροφυσιολογικές επιδράσεις. Μερικές από αυτές χρησιμοποιούν κύτταρα, άλλες χρησιμοποιούν αναλύσεις ηλεκτρικών ιδιοτήτων ή ακινητοποιημένα στοιχεία. Η κυριότερη εκδοχή και η συνηθέστερη ηλεκτροφυσιολογική μέθοδος μέτ-

ρησης αλληλεπιδράσεων είναι αυτή, όπου ο βιοαισθητήρας περιλαμβάνει το κυτταρικό μέρος, που συνδέεται με το άκρο ενός μικροηλεκτροδίου και επικοινωνεί με ένα μετασχηματιστή που μετρά ηλεκτρικό ρεύμα σε picoampere. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο (patch-clamp) ένα μόνο κύτταρο ή μέρος της κυτταρικής μεμβράνης, έρχεται σε άμεση επαφή με κάποιο ηλεκτρόδιο. Συνήθως εφαρμόζεται τάση στο τμήμα αυτό και στη συνέχεια αποτιμάται η μεταβολή στη τιμή του μεμβρανικού ρεύματος σε picoampere (Pantoja et al. 2004).

Η τεχνολογία του chip της patch clamp χρησιμοποιείται ευρέως στα πεδία της ηλεκτροφυσιολογίας και της νευροεπιστήμης όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.6. Αποτελεί ένα χρυσό σημείο για την έρευνα στην ηλεκτροφυσιολογία. Παρόλα αυτά, η τεχνολογία patch clamp έχει ορισμένους αναπόφευκτους περιορισμούς όπως ο χαμηλός ρυθμός απόδοσης. Πολύ δύσκολα μπορεί να εφαρμοστεί στην ανίχνευση φαρμάκων και στην κυτταρική επικοινωνία των νευρικών δικτύων. Η εμφάνιση της διασδιάστατης τεχνολογίας patch clamp καθιστά δυνατή την παράλληλη και αυτόματη ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή των ιονικών καναλιών. Οι επιστήμονες έκαναν μεγάλες προσπάθειες για να βελτιώσουν την τεχνολογία της συμβατικής patch clamp αναπτύσσοντας μια νέα διάταξη του συμβατικού ηλεκτροδίου ή μια νέα γενιά μικροηλεκτροδίου. Οι προσπάθειες που έχουν γίνει για την βελτίωση της διάταξης βασίστηκαν σε ένα μικροηλεκτρόδιο και δε μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για εφαρμογές μεγάλης κλίμακας.



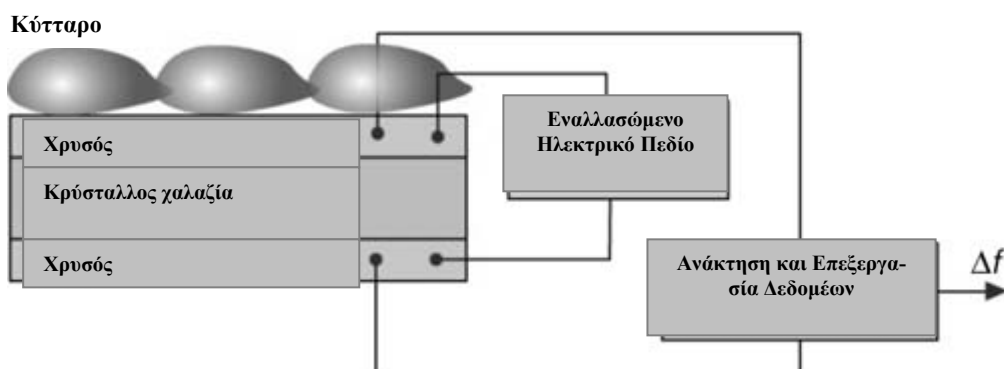
Εικόνα 1.5. Το βασικό σχηματικό διάγραμμα κυτταρικών αισθητήρων ECIS.



Εικόνα 1.6. Σχηματικό διάγραμμα κυτταρικού βιοαισθητήρα σε chip patch clamp.

Στο τέλος της δεκαετίας του 90, οι επιστήμονες ανέπτυξαν ένα chip patch clamp και αντικατέστησαν το γυάλινο μικροηλεκτρόδιο με μια δισδιάστατη κατασκευή. Αυτό το καινοτόμο chip μπορεί να καταγράψει πολλά κύτταρα ταυτόχρονα και μπορεί να συνδυαστεί εύκολα με πολλαπλές μεθόδους μέτρησης. Η τεχνολογία της δισδιάστατης patch clamp αποτελεί μια αποτελεσματική προσέγγιση για τη μελέτη των ιοντικών καναλιών και την ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Η τεχνική κλειδί είναι ο τρόπος κατασκευής ενός λείου chip με μία οπή και διάμετρο 1 μM ή και μικρότερη. Μέχρι τώρα, για την κατασκευή των chip patch clamp έχουν χρησιμοποιηθεί κάποια υλικά όπως το πυρίτιο, οι κρύσταλλοι χαλαζία, το γυαλί και κάποια πολυμερή. Στην αρχή, είχε επιλεγεί το πυρίτιο λόγω της εφαρμογής του στην τεχνολογία των ημιαγωγών, ενώ το γυαλί είχε επιλεγεί λόγω της εφαρμογής του στη συμβατική patch clamp. Πολυμερή όπως το PDMS είναι γνωστά ως Sylgard και εφαρμόζονται ευρέως στη μικρορευστονική. Το καθένα έχει διαφορετικά μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα και χρησιμοποιούνται σε διαφορετικές εφαρμογές.

Οι QCM και SPR επίσης είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές κατάλληλες για την ανίχνευση βιομοριακών αντιδράσεων όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.7. Πρόσφατα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κύτταρα που έχουν προσκολληθεί στο chip του αισθητήρα και ανταποκρίνονται σε διεγερτικά μπορούν να εισάγουν μεταβολές στις αποκρίσεις αισθητήρων και των δύο τύπων, QCM και SPR.



Εικόνα 1.7. Το βασικό σχηματικό διάγραμμα κυτταρικών βιοαισθητήρων QCM.

Με βάση το πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο, η τεχνική QCM είναι πολύ ευαίσθητη για την ανίχνευση μοριακών μεταβολών στο πεδίο των βιοαισθητήρων. Στα κύρια πλεονεκτήματα της QCM έναντι των παραδοσιακών μεθόδων, περιλαμβάνονται η υψηλή ευαισθησία (σε εύρος νανογραμμαρίων), η μη-επεμβατικότητα, μετρήσεις μακράς χρονικής διάρκειας και το γεγονός ότι δε σημαίνονται μόρια με ραδιενέργεια. Η τεχνική κατέχει ένα υψηλό εύρος ανίχνευσης από μια στοιβάδα έως μικρά μόρια σε πολύ μεγαλύτερες μάζες που προσδένονται στην επιφάνεια, όπως περίπλοκες συστοιχίες και ολόκληρα κύτταρα. Ο μηχανισμός μετάδοσης του σήματος στα QCM βασίζεται στο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο σε κρύσταλλο χαλαζία. Όταν μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται κατά μήκος κρυστάλλου χαλαζία μέσω των ηλεκτροδίων που καλύπτουν την επιφάνεια του, παράγεται μέσα στον κρύσταλλο μια μηχανική ταλάντωση χαρακτηριστικής συχνότητας. Έτσι, οι μεταβολές μάζας μπορούν να προκαλέσουν μεταβολές των πιέσεων στην επιφάνεια του κρυστάλλου και ακολούθως, να οδηγήσουν στη συχνότητα συντονισμού του κρυστάλλου. Χρησιμοποιούνται πολλές επιτυχημένες εφαρμογές των QCMs όπως η ανάλυση φαρμάκων, η κυτταρική προσκόλληση, η εξωκύτωση και η αλληλεπίδραση επιθηλιακού κυττάρου-μικροσωματιδίου.

Το SPR είναι μια οπτική τεχνική που χρησιμοποιεί για τη μέτρηση των μεταβολών του δείκτη διάθλασης πολύ κοντά στην επιφάνεια του αισθητήρα, το φαινόμενο του αποσβενόμενου κύματος. Πρόσφατα, οι βιοαισθητήρες SPR έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη μελέτη των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων. Ο SPR είναι μια οπτική διαδικασία ανίχνευσης που συμβαίνει όταν πολωμένο φως χτυπήσει ένα πρίσμα επικαλυμμένο με μια στρώση χρυσού. Τα ελεύθερα ηλεκτρόνια στην επιφάνεια της χρυσής στρώσης απορροφούν φωτόνια και τα μετατρέπουν σε επιφανειακά πλασματικά κύματα. Αναταράξεις στη χρυσή επιφάνεια των SPR, όπως μια αλληλεπίδραση μεταξύ μορίων ιχνευτών που έχουν ακινητοποιηθεί πάνω στο chip και μορίων στόχων που έχουν εγκλωβιστεί, επάγουν μια μετατροπή των συνθηκών συντονισμού, η οποία στη συνέχεια εμφανίζεται ως μεταβολή της ανάκλασης και μπορεί να μετρηθεί. Αυτή είναι η βάση των μετρήσεων μορίων SPR. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται στην επιφάνεια του SPR, η πρόσδεση και εξάπλωση μπορούν να μελετηθούν σε πραγματικό χρόνο με μέτρηση των ενδοκυτταρικών μεταγωγικών σημάτων.

Σε μια σειρά από δημοσιεύσεις, ο Wolf και οι συνεργάτες του αναφέρθηκαν στην ανάπτυξη μίας αυτόματης πλατφόρμας ανάλυσης υψηλής αποδοτικότητας με βιοϋβριδικούς αισθητήρες για τη καταγραφή μεταβολικών παραμέτρων ζωντανών κυττάρων (Wolf et al. 1998; Wiest et al. 2006; Lob et al. 2007; Wolf et al. 2011). Η βάση της πλατφόρμας είναι ένα τροποποιημένο πιάτο καλλιέργειας κυττάρων 24 πηγαδιών, κάθε πηγαδάκι εξοπλισμένο με οπτικοχημικούς αισθητήρες για την διαλυόμενη συγκέντρωση οξυγόνου και τη τιμή pH. Υπάρχει επίσης η επιλογή της διάταξης πλέγματος πολλαπλών ηλεκτροδίων (interdigitated electrodes structures- IDES) για την μέτρηση βιοηλεκτρικής εμπέδησης η οποία προκαλείται από προσκολλημένα κύτταρα. Οι οπτικοχημικοί αισθητήρες χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό κυτταρικής κατανάλωσης οξυγόνου και εξωκυτταρικής οξίνισης με την πάροδο του χρόνου. Οι πιο απλές προσεγγίσεις στην τεχνολογία των κυτταρικών βιοαισθητήρων χρησιμοποιούν σαν κορμό τις βιοδοκιμές (Kintzios 2014). Για παράδειγμα, πολλοί κυτταρικοί αισθητήρες για εκτίμηση τοξικότητας με απλή καταμέτρηση είτε αριθμού συνολικών κυττάρων ή αριθμού ζωντανών κυττάρων μετά την εφαρμογή ενός τοξικού παράγοντα. Άλλοι αισθητήρες μετράνε ζωτικότητα κυττάρων μέσω έμμεσων μετρήσεων της αναπνευστικής δραστηριότητας. Σε μια πρόσφατη ανασκόπηση, οι Eltzov and Marks (2011) περιγράφουν συνοπτικά τη μέτρηση της κυτταρικής κινητικότητας σαν τρόπο για τον καθορισμό της τοξικότητας περιβαλλοντικών δειγμάτων. Η κυτταρική κινητικότητα μπορεί να συσχετιστεί με αλλαγές πολλών φυσιολογικών λειτουργιών, π.χ. κυτταρική διαίρεση και ανάπτυξη, νέκρωση, νευροδιαβιβαστές (Sombors et al. 2004), απόπτωση (Bortner and Cidlowski 2004), και κυτταρική διόγκωση (αλλαγή όγκου) (Grover and Woldringh 2001). Αλλαγές στην κυτταρική κινητικότητα έχουν μελετηθεί με διάφορες μεθόδους, όπως είναι η φθορισμομετρία (Sato et al. 1996), οπτική ή ηλεκτρονική μικροσκοπία (Grover and Woldringh 2001), ατομικής δύναμης (Schneider et al. 2000), ηλεκτροφυσιολογία (Marks et al. 2007) μικροσκοπία και συντονισμό μικροδακτυλίου (MR) (Wang et al. 2009). Τα περισσότερα από τα διαθέσιμα εμπορικά συστήματα βασίζονται με παρόμοιες αρχές λειτουργίας, μετρήσεις κίνησης και/ή ζωτικότητας. Μερικά από αυτά τα προϊόντα αναφέρονται στο Πίνακα 1.3. (Kintzios 2014).

Πίνακας 1.3. Συστήματα εμπορικών κυτταρικών βιοαισθητήρων βασισμένων σε ζωικά κύτταρα.

Εταιρεία	Όνομα Προϊόντος	Μετρούμενη Παράμετρος	Αρχή Λειτουργίας Βιβλιογραφική	Αναφορά
Bionas	2500 Analyzing System	<ul style="list-style-type: none"> Κατανάλωση οξυγόνου Εξωκυτταρικό pH Αριθμός κυττάρων 	<ul style="list-style-type: none"> Ηλεκτρόδια τύπου Clark Ιοντοεκλεκτικά ηλεκτρόδια μέτρησης πεδίου (Ion-sensitive field effect Transistors ISFETs) Εμπέδηση 	(Ceriotti et al. 2007) (Bohrn et al. 2011) (Kubisch et al. 2012)
- ACEA Biosciences & Roche	xCELLigence E-Plate (a version of xCELLigence) RT-CES	Αριθμός κυττάρων	Εμπέδηση	(Huang and Xing 2006) (Xi et al. 2008)
Molecular Devices	Cytosensor Microphysiometer* *Η παραγωγή της συσκευής έχει διακοπεί	Εξωκυτταρικό pH	Οπτική ποτενσιομετρία καθορισμένη από το φώς (Lightaddressable Optical potentiometry - LAPs)	(Owicki and Parce 1992) (Poghossian et al. 2009)
Applied BioPhysics	Σύστημα Μέτρησης Ηλεκτρικής Κυτταρικής Εμπέδησης (ECIS)	<ul style="list-style-type: none"> Αριθμός κυττάρων Κυτταρική πρόσφυση 	Εμπέδηση	(Wegener et al. 2000) (Curtis et al. 2009; Curtis et al. 2009)
EMBIO Diagnostics	FoodAlert	Μεμβρανικό κυτταρικό δυναμικό	Βιοηλεκτρική Μέθοδος Αναγνώρισης (BERA)	(Gramberg et al. 2012) (Mavrikou et al. 2008; Flampouri et al. 2010; Varelas et al. 2010)

Τέλος, το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα από τα πιο πολύπλοκα βιολογικά συστήματα. Προστατεύει ενάντια των ασθενειών αναγνωρίζοντας και αντιδρώντας στα αντιγόνα με μεγάλη ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Ένας μεγάλος αριθμός ανοσοκυττάρων έχει μελετηθεί για να διερευνηθεί η πιθανότητα τα ανοσοκύτταρα να χρησιμοποιηθούν ως αισθητήρια στοιχεία σε κυτταρικούς βιοαισθητήρες. Ως παραδείγματα κυτταρικών βιοαισθητήρων ανοσοκυττάρων έχουν χρησιμοποιηθεί σιτευτικά κύτταρα και Β κύτταρα και έχουν δώσει πολλά υποσχόμενες εφαρμογές για την ανίχνευση παθογόνων. Ταυτόχρονα, αυτοί οι βιοαισθητήρες συστοιχιών κυττάρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες που είναι θεμελιώδεις για τις πολυκυτταρικές αλληλεπιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος και άλλων τομέων της βιολογίας.

Ένας άλλος κυτταρικός βιοαισθητήρας χρησιμοποιεί την ανασυνδεμένη φθορίζουσα κυτταρική σειρά ωθηκών κινέζικου χάμστερ για την καταγραφή διάφορων τοξικών παραγόντων, ειδικά των EDCs, σε ποικίλα υδατικά περιβάλλοντα (Kim et al. 2002). Θα μπορούσαμε να παρατηρήσουμε ότι οι βιοαισθητήρες εμπέδησης και τα ζωικά κύτταρα φτιάχτηκαν το ένα για το άλλο, μιας και τα ζωικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε υποστρώματα χωρίς περαιτέρω ακινητοποίηση, επιτ-

ρέποντας έτσι τη χρήση ηλεκτροδίων μέτρησης εμπέδησης (Kintzios 2014). Ωστόσο η ιδιότητα αυτή έχει και το κόστος της, καθώς έχει εκτρέψει σημαντικό μέρος της ανάπτυξης της οργανολογίας στην κατεύθυνση του σχεδιασμού συσκευών εμπεδομέτρησης σε βάρος άλλων τεχνικών μέτρησης.

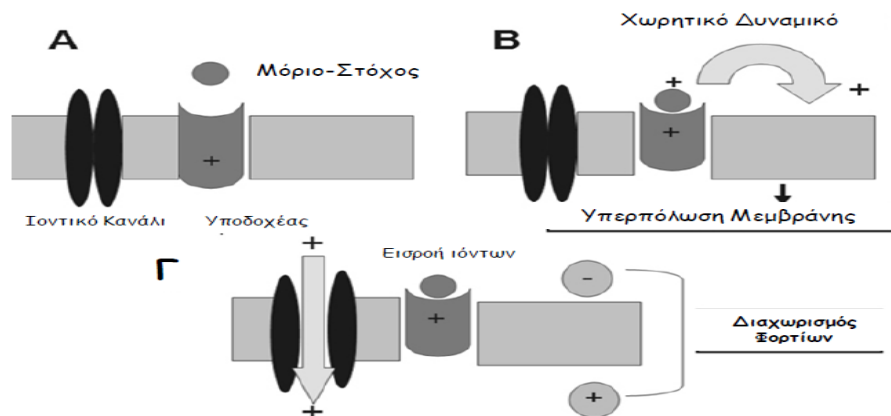
Την τελευταία δεκαπενταετία αναπτύχθηκε ένα σύστημα μέτρησης της μεταβολής του ηλεκτρικού δυναμικού (ή άλλων ηλεκτρικών ιδιοτήτων) (Kintzios et al. 2001) όχι ενός μεμονωμένου τμήματος της κυτταρικής μεμβράνης ή ενός μόνο κυττάρου, αλλά σε επίπεδο ιστού. Η μέθοδος Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης (BERA) είναι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

Έως σήμερα έχουν αναπτυχθεί έξι γενιές κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA. Επιγραμματικά, στην 1η γενιά ο βιοαισθητήρας περιείχε ακινητοποιημένα κύτταρα σε 0,8% αγαρόζη και είχε τη μορφή σωλήνα 15 mL (Kintzios et al. 2001). Η 2η γενιά είχε, επίσης, τη μορφή σωλήνα και τα κύτταρα ήταν ακινητοποιημένα σε αγαρόζη, με τη διαφορά ότι είχε πολύ μικρότερο όγκο (1 mL), οπότε απαιτείτο μικρότερη ποσότητα υλικών (Kintzios et al. 2004). Η 3η και 4η γενιά κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA είχαν τη μορφή επίπεδης στοιβάδας και στη μεν 3η γενιά τα κύτταρα ήταν ακινητοποιημένα σε «φλούδα» αλγινικού ασβεστίου, στη δε 4η γενιά δημιουργήθηκε ένα αγωγίμο πλέγμα αλγινικού ασβεστίου με πηγαδάκια στον πυθμένα των οποίων υπήρχαν τα ηλεκτρόδια και γινόταν εφαρμογή των κυττάρων μέσα σε αυτά τα πηγαδάκια. Οι βιοαισθητήρες BERA 3ης γενιάς είναι κατάλληλοι για τη μελέτη της κυτταροδιαίρεσης (Kintzios et al. 2006) και της 4ης γενιάς για τη μελέτη επικοινωνίας των κυττάρων και αλληλεπίδρασης με διάφορες ουσίες. Τέλος, οι βιοαισθητήρες BERA 5ης και 6ης γενιάς είχαν τη μορφή σφαιριδίων, ακινητοποιημένα κύτταρα σε αλγινικό ασβέστιο (Moschoroulou and Kintzios 2006). Η διαφορά μεταξύ αυτών των δύο γενεών είναι ότι στους βιοαισθητήρες 6ης γενιάς τα ακινητοποιημένα κύτταρα είναι μεμβρανικώς τροποποιημένα (MIME) χρησιμοποιώντας τη τεχνική της μεμβρανικής μηχανικής μέσω της ηλεκτροεισαγωγής μορίων στις κυτταρικές μεμβράνες, με σκοπό την εκλεκτικότητα του συστήματος. Αξίζει εδώ να αναλυθεί λίγο διεξοδικότερα η συγκεκριμένη τεχνολογία και η συνεισφορά της στην εξέλιξη των κυτταρικών αισθητήρων. Ένα χαρακτηριστικό που κάνει τους κυτταρικούς βιοαισθητήρες ελκυστικούς σαν ένα κλινικό αναλυτικό εργαλείο είναι η ευαισθησία τους, που σε κάποιες περιπτώσεις αγγίζει το επίπεδο ενός μόνο μορίου-στόχου. Αυτή η θεωρητική υπόθεση είναι βασισμένη στην περίπλοκη αλληλεπίδραση η οποία έχει προκύψει ως αποτέλεσμα της συνεξέλιξης των κυττάρων με διάφορα μόρια στο περιβάλλον τους, σε βαθμό που επιτρέπει στα κύτταρα να ανταποκρίνονται στα μόρια και οργανισμούς με ακριβείς και αναπαραγόμενους τρόπους. Όμως, αυτή η ικανότητα εξισορροπείται από ένα εξελικτικό «κόστος» (εν είδει συμβιβασμού) γιατί τα κύτταρα μπορούν να αντιδράσουν με τον ίδιο χονδρικά τρόπο ενάντια σε ένα εκπληκτικό μεγάλο αριθμό διαφορετικών μορίων, οπότε οι κυτταρικοί αισθητήρες παρουσιάζουν φτωχή εκλεκτικότητα. Αυτό είναι ένα πολύ κοινό πρόβλημα σε τοξικολογικές μεθόδους, όπου οι αισθητήρες επιτυχώς ανιχνεύουν την παρουσία ενός τοξικού παράγοντα αλλά γενικά αποτυγχάνουν να καθορίσουν την ακριβή φύση του τοξικού αναλύτη (Kaiser and Palabrica 1991; vanderLelie et al. 1997; Riska et al. 1999).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι κυτταρικής τροποποίησης, με σκοπό την αύξηση της εκλεκτικότητας των κυττάρων, με σχετική επιτυχία. Οι μέθοδοι κυτταρικής τροποποίησης είναι βασισμένες στην κυτταρική αναρρόφηση ξένου DNA κυρίως από Β ανθρώπινα λεμφοκύτταρα και κατά συνέπεια οδηγούν στην έκφραση μεμβρανικώς προσφώμενων υποδοχέων (Falsey et al. 2001; Ziauddin and Sabatini 2001; Andrews J.S. 2004; Delehanty et al. 2004). Μία γνωστή εφαρμογή είναι το σύστημα CANARY αναπτυγμένο από το εργαστήριο Lincoln Lab του MIT. Η μέθοδος CANARY έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του *Yersinia pestis* και άλλων παθογόνων (Rider et al. 2003). Όμως, η εφαρμογή της κυτταρικής τροποποίησης είναι περιορισμένη λόγω της έλλειψης σταθερότητας και της ανεπιθύμητης φαινοτυπικής παραλλακτικότητας.

Μια εναλλακτική προσέγγιση της κυτταρικής τροποποίησης είναι η τελευταίως ανεπτυγμένη τεχνολογικά μέθοδος της μεμβρανικής μηχανικής (Kintzios 2008). Είναι μια γενική μεθοδολογία εισαγωγής δεκάδων χιλιάδων υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια μηχανικά, έτσι ώστε το κύτταρο να μπορεί να αποκριθεί εκλεκτικά στον αναλύτη μετά την αλληλεπίδραση υποδοχέα-αναλύτη. Τα μόρια του υποδοχέα μπορούν να ποικίλουν από αντισώματα ως ένζυμα και πολυσακχαρίτες. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στη σύνδεση του μορίου-στόχου με τον αντίστοιχο υποδοχέα του, η οποία προκαλεί αλλαγή στην κυτταρική μεμβρανική δομή και μπορεί να μετρηθεί με την αλλαγή του μεμβρανικού δυναμικού. Αυτή η διαδικασία παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.8, παρουσιάζοντας μια περιοχή της μεμβρανικά τροποποιημένης μεμβράνης. Στην αρχή, η κυτταρική μεμβράνη έχει ένα σταθερό δυναμικό λόγω της ροής ιόντων μέσω των παρακείμενων ιοντικών καναλιών στον τεχνικώς εισαχθέντα υποδοχέα (Α). Μετά την ειδική σύνδεση του αναλύτη, ο υποδοχέας αναδιαμορφώνεται δομικά, έτσι μέρος του φορτίου του μεταφέρεται εντός της κυτταρικής μεμβράνης (Β). Με αυτόν τον τρόπο, ιόντα συσσωρεύονται στη μια πλευρά της μεμβράνης (π.χ. ιόντα K⁺), έτσι συμβάλλουν στο διαχωρισμό φορτίου, δημιουργώντας χωρητικό δυναμικό και την συνεπαγόμενη υπερπόλωση της μεμβράνης. Ακολουθώντας, το άνοιγμα των παρακείμενων ιοντικών καναλιών δημιουργεί μια ιοντική ροή η οποία είναι μετρήσιμη σαν ρεύμα (C), οδηγώντας σε ένα νέο διαχωρισμό φορτίου κατά μήκος της μεμβράνης (στο παράδειγμα της εικόνας, μία εξωκυτταρική αύξηση αρνητικών ιόντων).

Ένας συνδυασμός BERA και τεχνολογίας μεμβρανικής μηχανικής έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ανθρώπινων ιών (Ηπατίτιδα Β), φυτικών ιών (του καπνού και του αγγουριού), μεταβολικών ασθενειών, υπεροξειδίου, prions, του ιού αφθώδους πυρετού (foot-and-mouth disease virus -FMDV) και του ιού της κυανής γλώσσας (blue-tongue virus BTV).



Εικόνα 1.8. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου μοριακής αναγνώρισης (BERA) μέσω της μεμβρανικής μηχανικής.

Σήμερα έχουν αναπτυχθεί βιοαισθητήρες 6ης γενιάς για διάφορες εφαρμογές όπως είναι για ανίχνευση φυτοπαθογόνων και ζωικών ιών, φυτοπροστατευτικών προϊόντων αλλά και μορίων που εμπλέκονται στην ασφάλεια τροφίμων (Mavrikou et al. 2008; Moschopoulou et al. 2008; Perdikaris et al. 2009; Flampouri et al. 2010; Varelas et al. 2010; Perdikaris et al. 2011; Apostolou et al., 2014).

1.2. Υγρή χρωματογραφία.

Η χρωματογραφία συμπεριλαμβάνει μια ποικιλία αναλυτικών τεχνικών, με την εφαρμογή των οποίων επιτυγχάνεται διαχωρισμός λόγω της διαφορετικής ταχύτητας μετατόπισης των συστατικών όταν αυτά περνάνε δια μέσω πορώδους υλικού. Στην υγρή χρωματογραφία ειδικότερα, ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνάφειας των ουσιών σε μία στατική φάση στερεή είτε υγρή ακινητοποιημένη σε αδρανές υπόστρωμα και σε μια υγρή κινητή φάση. Οι κύριοι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την εκλεκτική συνάφεια των αναλυτών είναι η κατανομή, η προσρόφηση, η ανταλλαγή ιόντων, η διάλυση σε μια στατική μήτρα ή διαλύτη και η στερεοπαρεμπόδιση. Οι διάφορες μορφές υγρής χρωματογραφίας περιλαμβάνουν τουλάχιστον έναν από αυτούς τους μηχανισμούς, αν και στη πραγματικότητα, κατά τη διάρκεια μιας χρωματογραφικής ανάλυσης λαμβάνουν χώρα δυο ή περισσότεροι μηχανισμοί μαζί (Clark et al., 1992).

1.2.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

Η τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) αναπτύχθηκε μέσα από τις συνεχείς προσπάθειες βελτίωσης της απλής χρωματογραφίας στήλης. Η τεχνολογία κατασκευής χαλύβδινων στηλών πολύ μικρής διαμέτρου με υψηλή ανθεκτικότητα σε μεγάλες πιέσεις, η εξέλιξη της επιστήμης των πληρωτικών υλικών, η χρήση αντλιών υψηλής πίεσης καθώς και η ανάπτυξη διαφόρων τύπων ανιχνευτών κατέστησαν την τεχνική αυτή πολύ ισχυρό εργαλείο στα χέρια του αναλυτή. Η HPLC είναι μια πολύ σημαντική μέθοδος διαχωρισμού με μεγάλη ευαισθησία, εύκολη προσαρμογή σε ακριβείς ποσοτικούς διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και με ευρύτατες εφαρμογές στην ανάλυση αμινοξέων, πρωτεϊνών, νουκλεϊνικών οξέων, υδρογονανθράκων, υδατανθράκων, φαρμακευτικών ουσιών, τερπενοειδών, φυτοφαρμάκων, αντιβιοτικών, στεροειδών, οργανομεταλλικών ενώσεων και ποικιλία άλλων ανόργανων ουσιών.

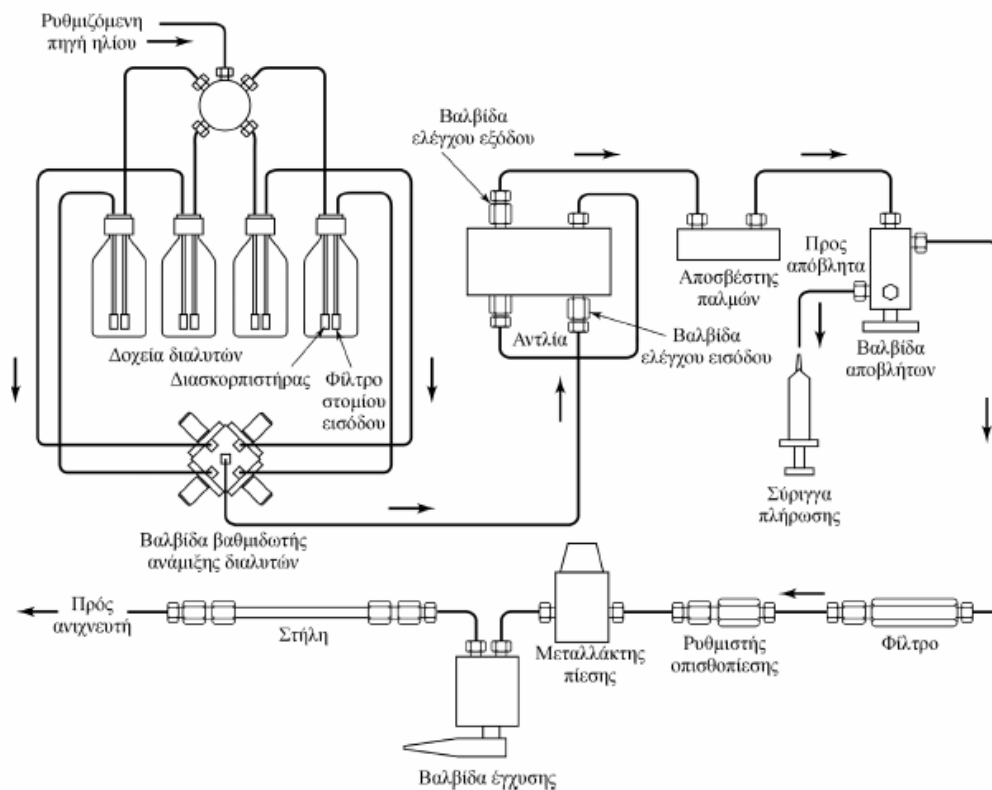
Στην HPLC διακρίνουμε δυο φάσεις α) Τη στατική φάση, που αποτελείται είτε από κάποιο στερεό πορώδες υλικό με ενεργή επιφάνεια και μικροσωματιδιακή μορ-

φή, ή από ένα λεπτό υμένιο υγρού καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα πολύ μικρής διαμέτρου, που βρίσκεται εντός της στήλης, β) την κινητή φάση που αποτελείται από ένα διαλύτη, ή μίγμα διαλυτών. Κάθε συστατικό μετακινείται μέσα στη στήλη με διαφορετική ταχύτητα και αυτό αποτελεί τη βάση κάθε χρωματογραφικού διαχωρισμού. Η μετακίνηση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική, πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης και έτσι επιτυγχάνονται δύσκολοι διαχωρισμοί εντός λίγων λεπτών. Ανάλογα με την πολικότητα της στατικής φάσης, η υγρή χρωματογραφία διακρίνεται σε χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase) ή σε ανάστροφης φάσης (reverse phase). Στην περίπτωση της χρωματογραφίας κανονικής φάσης, η στατική φάση επιλέγεται σχετικώς πολική και η κινητή φάση σχετικώς μη πολική. Σε αυτό το είδος διαχωρισμού οι πολικές ενώσεις οι οποίες είναι υδρόφιλες εκκλούνται αργότερα από τις μη πολικές που θεωρούνται λιπόφιλες.

Αντίθετα, στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης η στατική φάση είναι σχετικώς μη πολική και η κινητή φάση σχετικώς πολική (Snyder *et al.*, 1997). Πιο αναλυτικά, στη χρωματογραφία αντιστροφής φάσης η στατική φάση αποτελείται από ένα αλκάνιο με 18 άτομα άνθρακα $R = C_{18}H_{37}$ - προσδεδεμένο χημικά στην επιφάνεια του SiO_2 ή ODS (octadecylsilane). Οι αντίστοιχες στήλες ονομάζονται C_{18} και χρησιμοποιούνται ευρύτατα στις περισσότερες εφαρμογές της υγρής χρωματογραφίας, ενώ πολύ συχνά σήμερα χρησιμοποιούνται και οι στήλες C_8 όπου σε αυτές η ομάδα του αλκυλίου περιλαμβάνει 8 άτομα άνθρακα. Η κινητή φάση περιλαμβάνει υδατικά συστήματα ή υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα με υδατοδιαλυτούς οργανικούς διαλύτες όπως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, ισοπροπανόλη, τεραυδροφουράνιο, διμεθυλοφορμαμίδιο κ.α. Στη χρωματογραφία αντιστροφής φάσης οι λιγότερο πολικοί αναλύτες συγκρατώνται περισσότερο στη μη πολική στατική φάση και εκκλούνται αργότερα σε σχέση με τις πιο πολικές ουσίες. Ο χρόνος συγκράτησης (RT) ενός αναλύτη μειώνεται κατά την ακόλουθη σειρά: αλειφατικές ενώσεις > επαγόμενα δίπολα (π.χ. CCl_4) > μόνιμα δίπολα (π.χ. $CHCl_3$) > ασθενείς βάσεις κατά Lewis (αιθέρες, αλδεύδες, κετόνες) > ισχυρές βάσεις κατά Lewis (αμίνες) > ασθενή οξέα κατά Lewis (αλκοόλες, φαινόλες) > ισχυρά οξέα κατά Lewis (καρβοξυλικά οξέα) (Meyer, 1994).

1.2.2. Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας.

Για να αναπτυχθούν ικανοποιητικές ταχύτητες ροής του υγρού έκλουσης όταν χρησιμοποιούνται υλικά πλήρωσης αποτελούμενα από σωματίδια μεγέθους 2 έως 10 μm , που είναι συνηθισμένα στη σύγχρονη υγρή χρωματογραφία, οι απαιτούμενες πιέσεις από τις αντλίες φθάνουν τις μερικές χιλιάδες psi (pounds per square inch, 1 atm = 14,696 psi) (Parris, 1984) (Haisa *et al.*, 1974). Συνέπεια αυτών των υψηλών πιέσεων, είναι η πολυπλοκότερη και δαπανηρότερη οργανολογία της HPLC σε σχέση την οργανολογία άλλων ειδών χρωματογραφίας. Στην Εικόνα 1.9. παρουσιάζονται τα σημαντικότερα μέρη μιας διάταξης HPLC.



Εικόνα 1.9. Σχηματική αναπαράσταση μιας διάταξης HPLC (Parris, 1984).

1.2.3. Δοχεία κινητής φάσης και συστήματα επεξεργασίας διαλυτών.

Ένα σύγχρονο σύστημα HPLC αποτελείται από ένα ή περισσότερα υάλινα ή ανοξείδωτα δοχεία, καθένα εκ των οποίων περιέχει 200 έως 100 mL διαλύτη. Τα δοχεία έχουν εφοδιαστεί με μέσα απομάκρυνσης των διαλυμένων αερίων, συνήθως οξυγόνου και αζώτου, τα οποία παρεμποδίζουν τον σχηματισμό φυσαλίδων στη στήλη και στον ανιχνευτή των συστημάτων, διότι οι φυσαλίδες προκαλούν διεύρυνση των κορυφών. Επίσης, εμποδίζουν συχνά τη σωστή λειτουργία του ανιχνευτή. Οι απαερωτές αποτελούνται ακόμα από ένα σύστημα άντλησης κενού, ένα σύστημα απόσταξης, διατάξεις που θερμαίνουν και αναδεύουν τους διαλύτες ή από συστήματα εισαγωγής μικρών φυσαλίδων αδρανούς αερίου χαμηλής διαλυτότητας, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.9.. Πολλές φορές, αυτά τα συστήματα περιλαμβάνουν φίλτρα απομάκρυνσης σκόνης και αιωρούμενων σωματιδίων από τους διαλύτες για να προληφθούν πιθανές βλάβες στις αντλίες ή στα συστήματα έγχυσης, όπως και η έμφραξη της στήλης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.9., δεν είναι απαραίτητο οι απαερωτές και τα φίλτρα να είναι ενσωματωμένα τμήματα ενός συστήματος HPLC. Για παράδειγμα, ένας εύκολος τρόπος επεξεργασίας διαλυτών, πριν την εισαγωγή τους στο δοχείο, είναι η διήθηση τους μέσω μικροπορώδους φίλτρου (millipore filter) με εφαρμογή κενού. Αυτή η επεξεργασία απομακρύνει αέρια και αιωρούμενα σωματίδια.

Ο διαχωρισμός στον οποίο χρησιμοποιείται ένας διαλύτης σταθερής σύστασης ονομάζεται ισοκρατική έκλυση (isocratic elution), όμως πολλές φορές η απόδοση διαχωρισμού ενισχύεται σημαντικά με τη βαθμιδωτή έκλυση (gradient elution). Σε αυτήν την περίπτωση, χρησιμοποιούνται δύο ή τρία συστήματα διαλυτών, που διαφέρουν σημαντικά ως προς την πολικότητα. Όταν αρχίσει η έκλυση, ο λόγος των διαλυτών μεταβάλλεται με τρόπο προγραμματισμένο άλλες φορές συνεχώς και άλλες φορές με μια διαδοχική σειρά βημάτων. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC είναι εφοδι-

ασμένα συχνά με διατάξεις, που εισάγουν διαλύτες από δύο ή περισσότερα δοχεία σε θάλαμο ανάμιξης με συνεχώς μεταβαλλόμενους ρυθμούς και ο λόγος των όγκων των διαλυτών μπορεί να μεταβάλλεται ως προς τον χρόνο γραμμικά ή λογαριθμικά.

1.2.4. Στήλες υγρής χρωματογραφίας.

Οι στήλες της υγροχρωματογραφίας συνήθως κατασκευάζονται από σωλήνες μικρής διαμέτρου από ανοξείδωτο χάλυβα και σε πιέσεις μικρότερες από 600 psi χρησιμοποιούνται και παχύτοιχοι υάλινοι σωλήνες. Κατηγοριοποιούνται σε αναλυτικές και προστατευτικές (Majors, 1995).

Οι περισσότερες αναλυτικές στήλες υγρής χρωματογραφίας έχουν μήκος από 10 έως 30 cm και είναι ευθύγραμμες. Όταν απαιτείται επιμήκυνσή τους, αυτή επιτυγχάνεται με σύζευξη δύο ή περισσότερων στηλών σε σειρά. Περιστασιακά χρησιμοποιούνται σπειροειδείς στήλες όμως λόγω του εξεζητημένου τους σχήματος η αποτελεσματικότητά τους δεν είναι καλή. Η εσωτερική διάμετρος των στηλών είναι συνήθως 4 έως 10 mm και το μέγεθος σωματιδίων του υλικού πλήρωσης είναι 5 ή 10 μm. Σήμερα, η πιο συνηθισμένη στήλη έχει μήκος 25 cm, εσωτερική διάμετρο 4,6 mm και υλικό πλήρωσης με σωματίδια μεγέθους 5 μm. Στήλες αυτού του τύπου διαθέτουν 40.000 έως 60.000 πλάκες/m.

Πρόσφατα, ορισμένοι κατασκευαστές προσφέρουν στήλες υγρής χρωματογραφίας υψηλής ταχύτητας, με μικρότερες διαστάσεις από αυτές που ήδη περιγράφηκαν (Kucera, 1984) (Scott, 1984) (Novotny, 1988). Οι στήλες αυτές έχουν εσωτερικές διαμέτρους από 1 έως 4,6 mm και μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης 3 έως 5 μm. Το μήκος τους είναι μικρό (3 έως 7,5 cm). Οι στήλες του τύπου αυτού διαθέτουν μέχρι και 100.000 πλάκες/m και προσφέρουν το πλεονέκτημα της ταχύτητας και της ελάχιστης κατανάλωσης διαλύτη. Αυτή η τελευταία ιδιότητα έχει ιδιαίτερη σημασία, επειδή οι διαλύτες υψηλής καθαρότητας, που απαιτούνται στην υγρή χρωματογραφία είναι δαπανηροί τόσο στην αγορά όσο και στη διάθεσή τους ως εργαστηριακά απόβλητα.

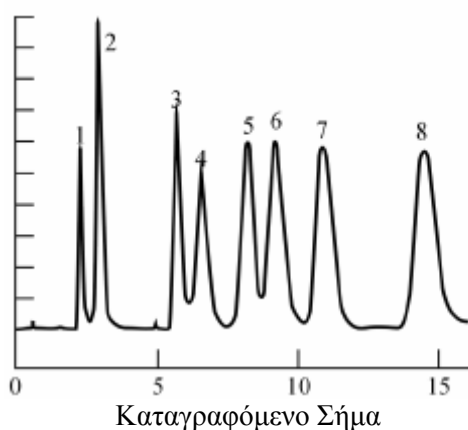
Σε πολλές εφαρμογές ο αυστηρός έλεγχος της θερμοκρασίας της στήλης δεν είναι αναγκαίος και οι στήλες λειτουργούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, όμως συχνά λαμβάνονται καλύτερα χρωματογραφήματα διατηρώντας τη θερμοκρασία της στήλης σταθερή εντός μερικών δεκάτων του βαθμού Κελσίου. Σήμερα, τα σύγχρονα όργανα είναι εφοδιασμένα με θερμοστάτες, που ελέγχουν τη θερμοκρασία της στήλης στην περιοχή θερμοκρασιών δωματίου μέχρι 100 ή 150 °C με ακρίβεια μερικών δεκάτων του βαθμού. Παράλληλα, οι στήλες μπορεί να συνδέονται με μανδύες ύδατος που τροφοδοτούνται από υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας για τον ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας.

Στην υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιούνται δύο βασικοί τύποι υλικών πλήρωσης, α) σφαιροειδή σωματίδια (pellicular) και β) πορώδη σωματίδια. Τα σφαιροειδή σωματίδια αποτελούνται από σφαιρικά, μη πορώδη σωματίδια από ύαλο ή πολυμερές με τυπικές διαμέτρους 30 έως 40 μm, στην επιφάνεια των οποίων αποτίθεται λεπτό πορώδες στρώμα όπως SiO₂, αλουμίνα, συνθετική ρητίνη πολυστυρενίου-διβινυλοβενζολίου ή μια ιονανταλλακτική ρητίνη. Σε ορισμένες εφαρμογές προστίθεται ένα επιπλέον στρώμα, αποτελούμενο από μια υγρή στατική φάση, που συγκρατείται με προσρόφηση. Εναλλακτικά, τα σφαιρίδια μπορεί να υποστούν χημική επεξεργασία προκειμένου να παραχθεί ένα οργανικό επιφανειακό στρώμα. Αυτό το είδος υλικού πλήρωσης χρησιμοποιείται συνήθως για την κατασκευή προστηλών κι όχι αναλυτικών στηλών.

Το υλικό πλήρωσης με βάση τα πορώδη σωματίδια αποτελείται από μικροσωματίδια διαμέτρου 3 έως 10 μm και υπάρχει η τάση να μειωθούν ακόμα περισσότερο.

Τα σωματίδια αποτελούνται από SiO₂, αλουμίνα, συνθετικές ρητίνες πολυστυρενίου-διβινυλοβενζολίου ή ιονανταλλακτική ρητίνη με συνηθέστερο αυτών το SiO₂. Τα σωματίδια του SiO₂ παρασκευάζονται με συσσωμάτωση σωματιδίων SiO₂ μεγέθους μικρότερου από 1 μm σε συνθήκες, που οδηγούν στο σχηματισμό μεγαλύτερων σωματιδίων με περιορισμένο εύρος τιμών διαμέτρου. Τα σχηματιζόμενα σωματίδια συχνά καλύπτονται με λεπτά οργανικά στρώματα, που συνδέονται με την επιφάνεια με χημικό ή φυσικό τρόπο.

Στην Εικόνα 1.10. απεικονίζεται η ταχύτητα με την οποία πραγματοποιείται ο διαχωρισμός με τις στήλες αυτού του τύπου. Η στήλη έχει μήκος 4 cm, εσωτερική διάμετρο 4 mm και μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης 3 μm ενώ διαχωρίζει οκτώ διαφορετικά συστατικά σε περίπου 15 s.



Εικόνα 1.10. Ισοκρατικός διαχωρισμός υψηλής ταχύτητας. Κινητή φάση: 4,1% οξικός αιθυλεστέρας σε n-εξάνιο. Ενώσεις: (1) p-ξυλένιο, (2) ανισόλη, (3) οξικός βενζυλεστέρας, (4) φθαλικός διοκτυλεστέρας, (5) φθαλικός διπεντυλεστέρας, (6) φθαλικός διβουτυλεστέρας, (7) φθαλικός διπροπυλεστέρας, (8) φθαλικός διαιθυλεστέρας.

Συνήθως πριν από την αναλυτική στήλη, παρεμβάλλεται μια μικρή προστατευτική στήλη (guard column) ή προ-στήλη (pre-column), για να αυξήσει τον χρόνο ζωής της απομακρύνοντας τα αιωρούμενα σωματίδια, τις προσμίξεις από τον διαλύτη αλλά και συστατικά του δείγματος που συνδέονται με τη στατική φάση μη αντιστρεπτά. Επίσης, στη χρωματογραφία υγρού-υγρού, η προστήλη προκαλεί κορεσμό της κινητής φάσης με τη στατική και ελαχιστοποιούνται οι απώλειες του διαλύτη της αναλυτικής στήλης. Η σύσταση του υλικού της προστήλης πρέπει να είναι παρόμοια με αυτό της αναλυτικής στήλης, όμως το μέγεθος των σωματιδίων είναι συνήθως μεγαλύτερο για να ελαχιστοποιείται η πτώση πίεσης. Όταν η προστήλη ρυπαίνεται αναγομώνεται ή απορρίπτεται και αντικαθίσταται με νέα του ίδιου τύπου, δηλαδή θυσιάζεται για την προστασία της δαπανηρότερης αναλυτικής στήλης.

1.2.5. Ανιχνευτές υγρής χρωματογραφίας.

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι ανιχνευτών υγρής χρωματογραφίας. Αυτοί που ανταποκρίνονται σε μια βασική ιδιότητα της κινητής φάσης (bulk property detectors), όπως ο δείκτης διάθλασης, η διηλεκτρική σταθερά ή η πυκνότητα, οι τιμές των οποίων επηρεάζονται από την παρουσία των εκλουόμενων συστατικών. Αντίθετα, υπάρχουν ανιχνευτές που αποκρίνονται σε ιδιότητα του εκλουόμενου συστατικού (solute property detectors), όπως είναι η απορρόφηση στο υπεριώδες, ο φθορισμός ή το ρεύμα διάχυσης. Την ιδιότητα αυτή δεν πρέπει να διαθέτει η κινητή φάση.

Στον Πίνακα 1.4. αναφέρονται οι συνηθέστεροι ανιχνευτές HPLC και μερικές από τις πιο σημαντικές ιδιότητές τους. Μια καταγραφή του 1982, 365 δημοσιευμένες

εργασιών στις οποίες έπαιζε σημαντικό ρόλο η HPLC, αποκάλυψε ότι στο 71% γινόταν χρήση ανιχνευτή απορρόφησης UV, στο 15% φθορισμού, στο 5,4% δείκτη διάθλασης, στο 4,3% γινόταν χρήση ηλεκτροχημικού ανιχνευτή και στο 4,7% χρησιμοποιήθηκαν διάφορα άλλα συστήματα μέτρησης (Scott, 1986) (Yeung and Synovec, 1986) (Dorschel et al., 1989). Από τους ανιχνευτές απορρόφησης UV, το 39% βασίστηκε σε μια από τις γραμμές εκπομπής υδραργύρου, το 13% σε επιλεγμένη ακτινοβολία από πηγή δευτερίου και το 48% σε ακτινοβολία επιλεγμένη με μονοχρωμάτορα.

Πίνακας 1.4. Αποδόσεις ανιχνευτών υγρής χρωματογραφίας

Ανιχνευτής υγροχρωματογραφίας	Διαθεσιμότητα στο εμπόριο	Όριο ανίχνευσης μάζας (LOD) (εμπορικοί ανιχνευτές) ^α	Όριο ανίχνευσης μάζας (LOD) (υπάρχουσα κατάσταση) ^β
Απορρόφησης	Ναι ^γ	100 pg – 1 ng	1 pg
Φθορισμού	Ναι ^γ	1 – 10 pg	10 fg
Ηλεκτροχημικός	Ναι ^γ	10 pg – 1 ng	100 fg
Δείκτη διάθλασης	Ναι	100 ng – 1 μg	10 ng
Αγωγιμότητας	Ναι	500 pg – 1 ng	500 pg
Φασματομετρίας μαζών	Ναι ^δ	100 pg – 1 ng	1 pg
FT-IR	Ναι ^δ	1 μg	100 ng
Σκέδασης φωτός ^ε	Ναι	10 μg	500 ng
Οπτικής ενεργότητας	Όχι	-	1 ng
Επιλογής στοιχείου	Όχι	-	10 ng
Φωτοϊόντισμού	Όχι	-	1 pg – 1 ng

^α Το όριο ανίχνευσης μάζας (LOD) υπολογίζεται ως η εγγεόμενη μάζα που αποδίδει σήμα ίσο με το πενταπλάσιο του θορύβου (σ), χρησιμοποιώντας γραμμομοριακό βάρος 200 g/mol. Έγχυση 10 μL για συνήθη ή 1 μL για μικροσωληνώδη LC.

^β Ορίζεται όπως στο α, αλλά ο όγκος έγχυσης είναι μικρότερος.

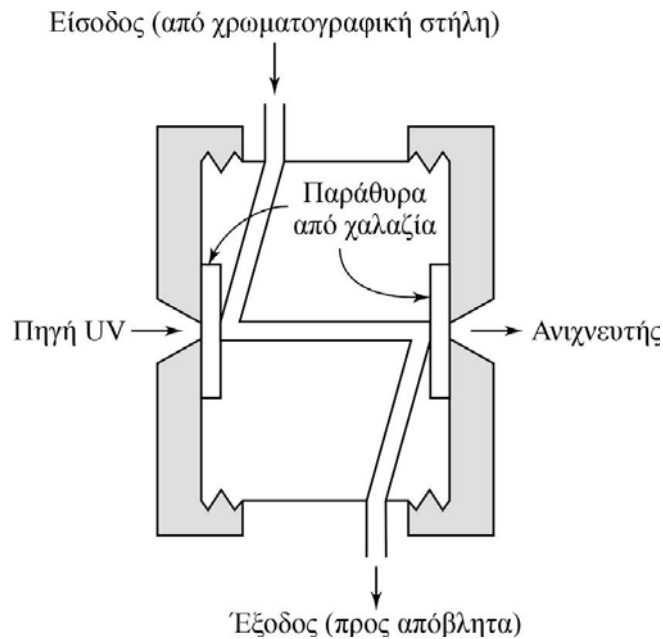
^γ Εμπορικά διαθέσιμοι για μικροσωληνώδη LC.

^δ Εμπορικά διαθέσιμοι, υψηλού κόστους.

^ε Συμπεριλαμβανομένης της σκέδασης φωτός μικρής γωνίας και της νεφελομετρίας.

Η Εικόνα 1.11. απεικονίζει μια αντιπροσωπευτική κυψελίδα ροής σχήματος Z, για μετρήσεις απορρόφησης του εκλούσματος χρωματογραφικής στήλης. Για να μειωθεί η διεύρυνση κορυφών που οφείλεται σε αίτια εκτός στήλης, ο όγκος μιας τέτοιας κυψελίδας πρέπει να είναι ο ελάχιστος δυνατός. Άρα οι όγκοι των κυψελίδων περιορίζονται από 1 έως 10 μL και το μήκος τους από 2 έως 10 mm. Οι περισσότερες κυψελίδες αυτού του τύπου λειτουργούν σε πιέσεις που δεν ξεπερνούν τα 600 psi. Επομένως απαιτείται συχνά ένας τρόπος μείωσης της πίεσης.

Ένας μεγάλος αριθμός ανιχνευτών απορρόφησης αποτελεί διατάξεις διπλής δέσμης, στις οποίες η μια δέσμη διέρχεται από την κυψελίδα έκλουσης και η άλλη μέσω ενός φίλτρου για μείωση της έντασής της. Στη συνέχεια χρησιμοποιούνται όμοιοι φωτοηλεκτρικοί ανιχνευτές για σύγκριση των εντάσεων των δύο δεσμών. Το χρωματογράφημα είναι μια καταγραφή του λογαρίθμου του λόγου των σημάτων των δύο μεταλλακτών ως συνάρτηση του χρόνου. Συχνά χρησιμοποιούνται και όργανα απλής δέσμης. Στη μνήμη ενός υπολογιστή αποθηκεύονται οι απορροφήσεις του συστήματος διαλυτών και ανακαλούνται για τον υπολογισμό της απορρόφησης του κλάσματος έκλουσης.



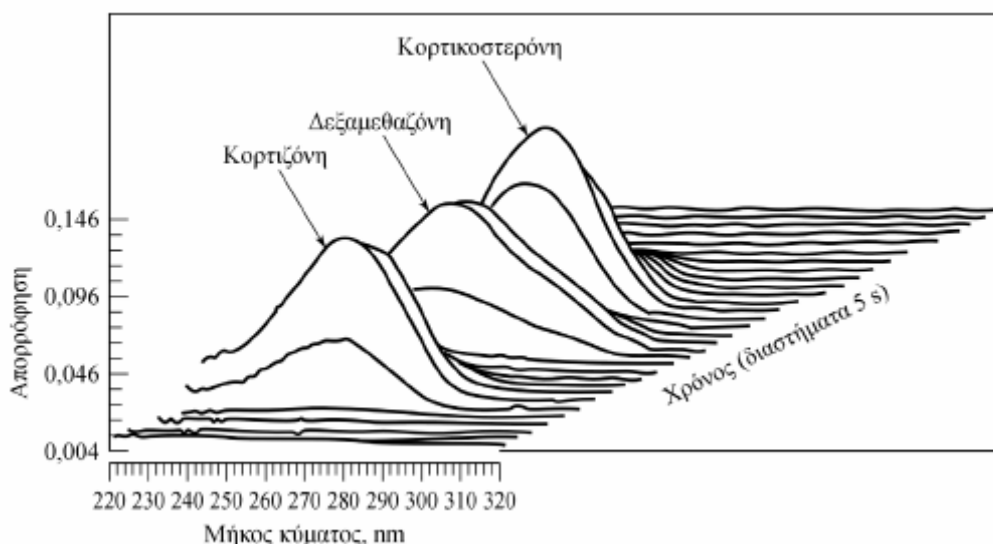
Εικόνα 1.11. Κυψελίδα ανιχνευτή υπεριώδους για υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Οι απλούστατοι ανιχνευτές απορρόφησης UV είναι τα φωτόμετρα φίλτρου με πηγή λυχνία υδραργύρου. Πιο συχνά, απομονώνεται από τα φίλτρα η γραμμή έντασης στα 254 nm. Σε ορισμένα όργανα επιλέγονται οι γραμμές 250, 334 και 365 nm με επιλογή κατάλληλου φίλτρου. Επομένως, ο τύπος ανιχνευτή περιορίζεται σε ενώσεις που απορροφούν σε ένα από τα προαναφερθέντα μήκη κύματος.

Πολλές χαρακτηριστικές οργανικές ομάδες και ένας αριθμός ανόργανων ουσιών παρουσιάζουν ευρείες περιοχές απορρόφησης που περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερα από αυτά τα μήκη κύματος. Οι λυχνίες δευτερίου ή πυράκτωσης βολφραμίου με φίλτρα συμβολής παρέχουν επίσης έναν απλό τρόπο προσδιορισμού συστατικών που απορροφούν καθώς εκλούνται από τη στήλη. Άλλα σύγχρονα όργανα είναι εφοδιασμένα με τροχούς επιλογής φίλτρων, τα οποία μπορούν να εναλλάσσονται για τον προσδιορισμό διαφόρων συστατικών καθώς αυτά εκλούνται. Οι διατάξεις αυτές είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για επαναλαμβανόμενες, ποσοτικές αναλύσεις όπου η ποιοτική σύσταση του δείγματος είναι γνωστή έτσι, ώστε να μπορεί να επιλεγεί μια αλληλουχία κατάλληλων φίλτρων. Συνήθως, οι αλλαγές φίλτρων πραγματοποιούνται με τη βοήθεια υπολογιστή.

Πολλοί κατασκευαστές συστημάτων HPLC προσφέρουν ανιχνευτές απορρόφησης υπεριώδους με μονοχρώματες που αποτελούνται από φασματοφωτόμετρα σάρωσης με οπτικό φράγμα. Μερικά περιορίζονται στην περιοχή υπεριώδους, ενώ άλλα περιλαμβάνουν ορατό και υπεριώδες. Υπάρχουν διάφορες επιλογές στη λειτουργία τους όπως για παράδειγμα, ένα πλήρες χρωματογράφημα μπορεί να ληφθεί σε ένα μόνο μήκος κύματος ή, όταν τα εκλουόμενα συστατικά διαχωρίζονται ικανοποιητικά, μπορούν να επιλεγούν διαφορετικά μήκη κύματος για κάθε κορυφή. Για ακόμα μία φορά η επιλογή του καλύτερου μήκους κύματος για κάθε εκλουόμενο συστατικό, γίνεται συχνά με υπολογιστή. Όταν για λόγους ταυτοποίησης των εκλουόμενων συστατικών απαιτείται λήψη όλου του φάσματος, η ροή διακόπτεται για αρκετό χρονικό διάστημα, ώστε να πραγματοποιηθεί σάρωση στην περιοχή μήκους κύματος που ενδιαφέρει. Οι διατάξεις με ανιχνευτές συστοιχιών διόδων (Miller et al., 1982) (Borman, 1983) (Huber & George, 1993) αποτελούν τους αποδοτικότερους φασματοφωτομετρικούς ανιχνευτές υπεριώδους. Τέτοιες διατάξεις προσφέρονται από πολ-

λούς κατασκευαστές και με αυτές πραγματοποιείται συλλογή δεδομένων ενός πλήρους φάσματος σε χρόνο περίπου ενός δευτερολέπτου. Έτσι συλλέγονται και αποθηκεύονται φασματικά δεδομένα για κάθε χρωματογραφική κορυφή κατά την έξοδο από τη στήλη. Ένας τύπος παρουσίασης φασματικών δεδομένων, που είναι χρήσιμος για την ταυτοποίηση συστατικών και την επιλογή των συνθηκών για τον ποσοτικό προσδιορισμό, είναι ένα τρισδιάστατο γράφημα όπως αυτό που εμφανίζεται στην Εικόνα 1.12. με φάσματα που ελήφθησαν σε διαδοχικά διαστήματα των 5 δευτερολέπτων. Η εμφάνιση και η εξαφάνιση από το υγρό έκλουσης καθενός από τα τρία στεροειδή είναι εμφανής.



Εικόνα 1.12. Φάσματα απορρόφησης έκλουσης μίγματος τριών στεροειδών που έχουν ληφθεί σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα 5 sec.

Επίσης, στο εμπόριο διατίθενται δύο τύποι ανιχνευτών υπερύθρου. Ο πρώτος με σάρωση μήκους κύματος που παρέχεται από τρία ημικυκλικά σφηνοειδή φίλτρα, καταλαμβάνει μια περιοχή από 2,5 έως 14,5 μm ή 4.000 έως 690 cm^{-1} , ενώ ο δεύτερος και περισσότερο εξελιγμένος τύπος ανιχνευτή υπερύθρου βασίζεται σε οργανολογίες μετασχηματισμού Fourier. Οι κατασκευαστές οργάνων μετασχηματισμού Fourier προσφέρουν συμπληρωματικά εξαρτήματα, που επιτρέπουν τη χρήση τους ως ανιχνευτών HPLC. Οι κυψελίδες ανιχνευτών υπερύθρου είναι παρόμοιες στην κατασκευή με εκείνες που χρησιμοποιούνται στην υπεριώδη ακτινοβολία, με μόνη διαφορά ότι τα παράθυρα είναι κατασκευασμένα από χλωριούχο νάτριο ή φθοριούχο ασβέστιο. Το μήκος των κυψελίδων κυμαίνεται από 0,2 έως 1,0 mm και ο όγκος τους από 1,5 έως 10 μL . Τα πιο απλά όργανα υπερύθρου μπορούν να λειτουργήσουν σε ένα ή περισσότερα απλά μήκη κύματος. Εναλλακτικά, τα φάσματα των κορυφών μπορούν να ληφθούν με αναχαίτιση της ροής τη στιγμή της έκλουσης. Τα όργανα μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιούνται με ανάλογο τρόπο όπως τα όργανα με διατάξεις συστοιχιών διόδων για μετρήσεις απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους, όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο τμήμα. Ένας σημαντικός περιορισμός στη χρήση ανιχνευτών υπερύθρου είναι η χαμηλή διαπερατότητα πολλών χρήσιμων διαλυτών, όπως για παράδειγμα, οι ευρείες ζώνες απορρόφησης του ύδατος και των αλκοολών στο υπέρυθρο αποκλείει τη χρήση του συγκεκριμένου ανιχνευτή για πολλές εφαρμογές.

Στους περισσότερους ανιχνευτές φθορισμού, ο φθορισμός παρατηρείται με φωτοηλεκτρικό ανιχνευτή τοποθετημένο σε γωνία 90° σε σχέση με τη δέσμη διέγερσης. Οι πιο απλοί ανιχνευτές χρησιμοποιούν πηγή υδραργύρου για διέγερση και ένα ή πε-

ρισσότερα φίλτρα για απομόνωση μιας ζώνης από την εκπεμπόμενη ακτινοβολία, ενώ τα καλύτερα όργανα βασίζονται σε πηγή αερίου ξένου και χρησιμοποιούν μονοχρωμάτορα για απομόνωση της ακτινοβολίας φθορισμού. Μελλοντικές εξελίξεις στους ανιχνευτές φθορισμού πιθανόν να βασισθούν σε ρυθμιζόμενες πηγές λέιζερ, που μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένη ευαισθησία και εκλεκτικότητα. (Green, 1983) (Yeung & Sepaniak, 1980). Ένα εγγενές πλεονέκτημα των φθορισμομετρικών μεθόδων είναι η μεγάλη τους ευαισθησία, η οποία κατά κανόνα είναι μεγαλύτερη από μία τάξη μεγέθους από τις περισσότερες μεθόδους απορρόφησης.

Το πλεονέκτημα αυτό εκμεταλλεύεται η υγρή χρωματογραφία για τον διαχωρισμό και προσδιορισμό των συστατικών δειγμάτων που φθορίζουν. Κατά την ανάλυση υλικών συναντώνται συχνά φθορίζουσες ενώσεις, όπως είναι οι φαρμακευτικές ουσίες, τα φυσικά προϊόντα, τα κλινικά δείγματα και τα πετρελαιοειδή. Συχνά, ο αριθμός των φθορίζόντων συστατικών μπορεί να αυξηθεί με προκαταρκτική επεξεργασία των δειγμάτων με αντιδραστήρια που σχηματίζουν φθορίζοντα παράγωγα. Για παράδειγμα, το δανσυλοχλωρίδιο (5-διμεθυλοαμινοναφθαλινο-1-σουλφονυχλωρίδιο), το οποίο αντιδρά με πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες, αμινοξέα και φαινόλες προς σχηματισμό φθορίζουσών ενώσεων, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση των αμινοξέων σε υδρολύματα πρωτεϊνών.

1.3. Φασματομετρία Μαζών (MS).

Η φασματομετρία μαζών είναι μια ιδιαίτερη τεχνική μεταξύ των φασματομετρικών μεθόδων ανάλυσης των μορίων, αφενός μεν λόγω της αρχής μεθόδου στην οποία στηρίζεται, αφετέρου δε λόγω της χρησιμοποιούμενης οργανολογίας κατά την εφαρμογή της τεχνικής. Οι κυριότερες φασματοσκοπικές τεχνικές ανάλυσης είναι η φασματοσκοπία UV/VIS, IR, Raman και η τεχνική NMR και όλες βασίζονται στην ίδια θεμελιώδη αρχή: τα υπάρχοντα μόρια βρίσκονται αρχικά στη θεμελιώδη ενεργειακή στάθμη και όταν προσπέσει επάνω τους ποσότητα ενέργειας συγκεκριμένης συχνότητας, τα μόρια την απορροφούν και μεταβαίνουν σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες. Σε κάθε περίπτωση, τα μόρια επανέρχονται τελικά στη θεμελιώδη κατάσταση τους και η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί (Fearson *et al.*, 1987 και Van Bramer *et al.*, 1998).

Στη φασματομετρία μαζών, τα μόρια ιονίζονται με διάφορες τεχνικές και τελικά εξετάζονται τα σχηματιζόμενα ιόντα. Το φασματόμετρο μαζών διαχωρίζει τα ταχέως κινούμενα ιόντα με βάση το λόγο μάζας / φορτίου (m/z) όπως ακριβώς θα έκανε ο μονοχρωμάτορας στα οπτικά φασματόμετρα. Τα περισσότερα ιόντα που εξετάζονται έχουν φορτίο +1, συνεπώς ο διαχωρισμός τους γίνεται ουσιαστικά με βάση τη μάζα τους. Σε σχέση με τις τεχνικές ατομικής οπτικής φασματομετρίας, η φασματομετρία μαζών προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως όρια ανίχνευσης τουλάχιστον τρεις τάξεις μεγέθους χαμηλότερα σε σχέση με τις υπόλοιπες οπτικές μεθόδους, απλότητα φασμάτων και ευκολία στην ερμηνεία τους ακόμη και δυνατότητα μέτρησης ατομικών ισοτόπων, αυξημένη ευαισθησία και υψηλή εξειδίκευση κατά την ταυτοποίηση ουσιών καθώς και την επιβεβαίωση της παρουσίας υπόπτων ουσιών σε ένα δείγμα (Skoog *et al.*, 1998).

1.4. Διασύνδεση Συστημάτων Υγρής Χρωματογραφίας με Φασματόμετρο Μαζών.

Η προσπάθεια συνδυασμού LC με MS ξεκίνησε το 1970 και αυτή η σύνδεση επιδίωκε να αναλύσει θερμοευαίσθητες ενώσεις που δεν μπορούσαν να αναλυθούν με GC-MS, να αναλύσει μη πτητικές ενώσεις, την αυξημένη ευαισθησία του ανιχνευτή MS, την αξιολόγηση της καθαρότητας της χρωματογραφικής κορυφής και την ταυτο-

ποίηση των αναλυόμενων ουσιών. Ο συνδυασμός της υγρής χρωματογραφίας (LC) σε σειρά με τη φασματομετρία μαζών (MS) εξελίσσεται συνεχώς με αποτέλεσμα η τεχνική αυτή να εφαρμόζεται πλέον σε πολλές αναλύσεις ρουτίνας καθώς και σε πιο σύνθετες αναλύσεις ανίχνευσης και ταυτοποίησης ενώσεων. Το φασματόμετρο μαζών δρα ως ανιχνευτής εξαιρετικής εκλεκτικότητας για το χρωματογραφικό σύστημα. Πλέον ο θερμοψεκασμός (Thermo Spray, TS), έχει αντικατασταθεί από το χημικό ιονισμό (Chemical Ionization, CI) και τον ηλεκτροψεκασμό (Electron Spray, ES) οδηγώντας στην ανάπτυξη της τεχνικής της διαδοχικής φασματομετρίας μαζών (Tandem mass spectrometry, MS-MS), η οποία αποτελεί σήμερα την κυριότερη μέθοδο βιοανάλυσης των μορίων που απαντώνται σε βιολογικά δείγματα (Niessen, 1998). Η υγρή χρωματογραφία (LC) σε σύζευξη με τη φασματομετρία μαζών (MS) έχει πάρα πολλές εφαρμογές όπως περιβαλλοντικές αναλύσεις, εγκληματολογικές αναλύσεις, ο έλεγχος φαρμακοδιέγερσης, ο προσδιορισμός της δομής μεγαλομορίων, θερμοευαίσθητων μη πτητικών ενώσεων, ταυτοποίηση δομής αγνώστων ενώσεων (π.χ. μεταβολιτών φαρμάκων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών κ.α.). Πολύ σημαντικές εξελίξεις έχουν συμβεί στην ανίχνευση και επιβεβαίωση των αντιβιοτικών και αντιμικροβιακών ενώσεων και ξеноβιοτικών ουσιών ιδιαίτερα στον τομέα της ανάλυσης των τροφίμων (Corcia *et al.*, 2002; Lee, 2003; Douglas, 1999), στον τομέα της έρευνας φυσικών προϊόντων, σε τομείς της οικολογίας καθώς και στην ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταβολικών προϊόντων που παράγονται από βακτηριακά στελέχη (Warwick και Ellis, 2005; Strege, 1999; Barofsky, 1999).

Προκειμένου να επιτευχθεί ο ιονισμός με την τεχνική LC-MS, χρησιμοποιούνται δυο τύποι πηγών. Οι πηγές αέριας φάσης, όπου τα δείγματα πρώτα εξαερώνονται και μετά ιονίζονται (πηγές πρόσκρουσης ηλεκτρονίων, Electron Impact, πηγές χημικού ιοντισμού, Chemical Ionization) και οι πηγές εκρόφησης, όπου το δείγμα σε υγρή ή στερεή κατάσταση μετατρέπεται σε αεριώδη ιόντα (Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό ESI, βομβαρδισμός με άτομα μεγάλης ταχύτητας FAB, ιονισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας, MALDI) (Watson *et al.*, 2007).

Ένας τρόπος διασύνδεσης, που διατίθεται στο εμπόριο, είναι ο θερμοψεκασμός (thermospray) (Yergey *et al.*, 1990) (Brown *et al.*, 1990) (Covey *et al.*, 1986) (Vestal, 1984). Η διασύνδεση αυτή επιτρέπει την κατευθείαν εισαγωγή όλου του υγρού έκλουσης από τη στήλη με ταχύτητες ροής έως και 2mL/min. Στη διασύνδεση αυτή το υγρό ατμοποιείται καθώς διέρχεται μέσα από ένα ανοξειδωτο, θερμαινόμενο τριχοειδή σωλήνα σχηματίζοντας νέφος σωματιδίων αποτελούμενα από τον διαλύτη και μόρια του μετρούμενου συστατικού. Στο σχηματιζόμενο νέφος, το συστατικό ιοντίζεται μέσω ενός μηχανισμού ανταλλαγής φορτίου με ένα άλας, όπως το οξικό αμμώνιο, που προστίθεται στον διαλύτη έκλουσης. Συνεπώς, θερμοψεκασμός δεν είναι μόνο ένας τρόπος διασύνδεσης αλλά και μια πηγή ιοντισμού. Τα φάσματα που προκύπτουν είναι γενικά απλά και παρέχουν στοιχεία για το μοριακό βάρος αλλά στερούνται των λεπτομερειών που επιτυγχάνονται με τα αντίστοιχα φάσματα πρόσκρουσης ηλεκτρονίων, που είναι τόσο χρήσιμα σε περιπτώσεις ταυτοποίησης. Επίσης η διασύνδεση θερμοψεκασμού μπορεί να εφαρμοσθεί μόνο σε πολικά μόρια και κινητές πολικές φάσεις, που μπορούν και διαλύουν ένα άλας όπως το οξικό αμμώνιο. Κάτω από αυτούς τους περιορισμούς η διασύνδεση θερμοψεκασμού παρέχει φάσματα για ευρεία περιοχή μη πτητικών και θερμικά σταθερών ενώσεων, όπως πεπτίδια και νουκλεοτίδια με όρια ανίχνευσης μέχρι 1 έως 10 pg.

Ο ιονισμός με ηλεκτροδιάχυση (ESI) είναι η τεχνική που μετατρέπει τα μόρια ή τα ιόντα που βρίσκονται σε διάλυμα, σε ιόντα στην αέρια φάση, με εξάτμιση των φορτισμένων σταγονιδίων του διαλύματος. Τα φορτισμένα σταγονίδια παράγονται από μια τριχοειδή ακίδα με επίδραση ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου. Με τη βοήθεια ε-

νός αερίου εκνέφωσης το οποίο είναι συνήθως το N₂ επιτυγχάνεται η δημιουργία νέφους σταγονιδίων (spray). Αναλόγως της πολικότητας του δυναμικού που εφαρμόζεται στο τριχοειδές, η επιφάνεια των σταγόνων περιέχουν την ιονιζόμενη ένωση και που σχηματίζονται στο άκρο του τριχοειδούς φορτίζεται είτε θετικά είτε αρνητικά και στη συνέχεια εξατμίζονται. Η εξατμική των σταγονιδίων απαιτεί θέρμανση και ένα αέριο ξήρανσης το οποίο είναι επίσης το N₂. Καθώς μειώνεται το μέγεθος των σταγόνων, αυξάνεται η πυκνότητα των φορτίων στην επιφάνεια της κάθε σταγόνας. Τελικά οι απωστικές δυνάμεις των φορτίων υπερνικούν τις δυνάμεις συνοχής (όριο Rayleigh) και προκαλούν την έκρηξη της σταγόνας, που ονομάζεται κουλομπική έκρηξη-Coulombic explosion). Αυτή η διαδικασία απελευθερώνει στην αέρια φάση τα ιόντα της ιονιζόμενης ένωσης τα οποία εισέρχονται στον αναλυτή μαζών μέσα από ένα τριχοειδές στόμιο (CDL) (Gaskell, 1997).

Ο χημικός ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI) βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μόρια του αναλύτη και ενός αερίου αντιδραστήριου, όταν και τα δυο βρίσκονται σε αέρια φάση. Το αέριο αντιδραστήριο είναι το μεθάνιο, η αμμωνία και το ισοβουτάνιο ή η κινητή φάση της υγρής χρωματογραφίας στο χημικό ιονισμό με μεσολάβηση διαλύτη (Solvent mediated Chemical Ionization), που βομβαρδίζεται με ηλεκτρόνια σχηματίζονται ιόντα του αερίου. Τα ιόντα αυτά δρουν ως δότες πρωτονίων, αντιδρούν με τα μόρια του αναλύτη M και σχηματίζουν μοριακά ιόντα MH⁺. Ο χημικός ιονισμός κατατάσσεται στις ήπιες τεχνικές ιονισμού με μεγάλη ευαισθησία η οποία συνήθως δίνει το μοριακό ιόν του αναλύτη και όταν λαμβάνει χώρα σε ατμοσφαιρική πίεση η τεχνική ονομάζεται APCI (Atmospheric pressure chemical ionization). Η νεφελοποίηση και τελικά η εξαέρωση του δείγματος επιτυγχάνεται με το συνδυασμό αερίου αζώτου (nebulizer gas) και θέρμανσης. Το άκρο του ανιχνευτή του APCI είναι μεταλλική ακίδα με δυναμικό 2.5-3.0 KV που προκαλεί τον ιονισμό των μορίων με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία πρωτονιομένων μορίων (Van Bramer *et al.*, 1998).

Ένα βασικό πρόβλημα στη σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μάζας είναι η ασυμβατότητα μεταξύ των σχετικά μεγάλων όγκων διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία και του κενού που απαιτείται στη φασματομετρία μαζών. Σήμερα σε ένα εμπορικά διαθέσιμο σύστημα, το υγρό έκλουσης από τη στήλη διαχωρίζεται και μόνο ένα μικρό κλάσμα εισάγεται κατευθείαν στον ανιχνευτή μαζών όμως ακόμα και η περίπτωση της άμεσης εισαγωγής του υγρού στο σύστημα είναι εφικτή στην περίπτωση χρήσης στηλών μικρής διαμέτρου με ταχύτητες ροής από 10 έως 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Σε ένα δεύτερο εμπορικά διαθέσιμο τύπο διασύνδεσης, το υγρό έκλουσης αποτίθεται σε έναν συνεχώς κινούμενο ιμάντα ή σύρμα, που μεταφέρει τον διαλύτη με το προσδιοριζόμενο συστατικό σε έναν θερμαινόμενο θάλαμο για απομάκρυνση του διαλύτη με ατμοποίηση. Μετά την ατμοποίηση το προς ανάλυση συστατικό που βρίσκεται επάνω στον ιμάντα ή στο σύρμα εισέρχεται στην περιοχή της πηγής ιονισμού, όπου πραγματοποιείται εκρόφηση και ιοντισμός.



Εικόνα 1.13. Υγρός χρωματογράφος συζευμένος με φασματοόμετρο μάζας.

1.5. Αξιολόγηση αναλυτικών δεδομένων

Κατά τη στατιστική επεξεργασία δεδομένων στις βιολογικές επιστήμες, υποτίθεται ότι τα λιγιστά αποτελέσματα, τα οποία προκύπτουν από επαναλαμβανόμενες εργαστηριακές αναλύσεις, αποτελούν ένα ασήμαντο κλάσμα του απείρου αριθμού των αποτελεσμάτων, που θα μπορούσαν να ληφθούν, εάν υπήρχε άπειρος χρόνος και άπειρη ποσότητα δείγματος. Τα λιγιστά αυτά δεδομένα οι στατιστικολόγοι τα αποκαλούν δείγμα (sample), το οποίο θεωρείται ως υποσύνολο του απείρου πληθυσμού (population) ή του σύμπαντος (universe) όλων των δεδομένων, που υπάρχουν στην πραγματικότητα. Οι νόμοι της στατιστικής ισχύουν αυστηρά μόνο για πληθυσμούς και όταν εφαρμόζονται σε δείγματα εργαστηριακών δεδομένων, πρέπει να υποθέσουμε ότι το δείγμα αυτό είναι πραγματικά αντιπροσωπευτικό του πληθυσμού. Επειδή δεν υπάρχει εγγύηση ότι η υπόθεση αυτή ισχύει, οι δηλώσεις για τυχαία σφάλματα είναι εκ των πραγμάτων αβέβαιες και πρέπει να εκφραστούν με πιθανότητες (Calcutt R. & Boddy, 1983) (Mandel, 1978) (Anderson, 1987).

1.5.1. Μέση τιμή πληθυσμού (μ)

Η μέση τιμή του πληθυσμού (population mean) ή η οριακή μέση τιμή (limiting mean) μιας ομάδας επαναλαμβανόμενων δεδομένων ορίζεται από την εξίσωση:

$$\mu = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{\sum_{i=0}^N x_i}{N} \quad (1)$$

όπου x_i η τιμή της μέτρησης i . Όπως φαίνεται από την εξίσωση 1, η μέση τιμή μιας ομάδας προσεγγίζει τη μέση τιμή του πληθυσμού καθώς ο αριθμός των μετρήσεων N , προσεγγίζει το άπειρο. Είναι σημαντικό να τονισθεί, ότι λόγω απουσίας στατιστικής μεροληψίας, το μ είναι η αληθής τιμή της μετρούμενης ποσότητας.

1.5.2. Τυπική απόκλιση (σ) και μεταβλητότητα (σ^2) πληθυσμού.

Η τυπική απόκλιση και η μεταβλητότητα του πληθυσμού αποτελούν στατιστικά σημαντικά μέτρα της επαναληψιμότητας ενός πληθυσμού δεδομένων. Η τυπική απόκλιση του πληθυσμού δίνεται από την εξίσωση 2:

$$\sigma = \sqrt{\lim_{N \rightarrow \infty} \frac{\sum_{i=0}^N (x_i - \mu)^2}{N}} \quad (2)$$

όπου x_i είναι και πάλι η τιμή της μέτρησης i . Να σημειωθεί ότι η τυπική απόκλιση του πληθυσμού είναι η τετραγωνική ρίζα της μέσης τιμής του αθροίσματος των τετραγώνων των επιμέρους αποκλίσεων κάθε τιμής από τον μέσο του πληθυσμού. Οι στατιστικοί προτιμούν να εκφράζουν την επαναληψιμότητα των δεδομένων ως μεταβλητότητα (variance) ή διακύμανση, που είναι απλά το τετράγωνο της τυπικής απόκλισης (σ^2), επειδή οι μεταβλητότητες είναι αθροιστικές ενώ οι χημικοί προτιμούν να περιγράφουν την επαναληψιμότητα των μετρήσεων ως τυπική απόκλιση παρά ως μεταβλητότητα, επειδή η τυπική απόκλιση εκφράζεται στις ίδιες μονάδες με τη μετρούμενη ποσότητα.

1.5.3. Μέση τιμή δείγματος (\bar{x})

Η τυπική απόκλιση (s) των δεδομένων ενός δείγματος περιορισμένου μεγέθους δίνεται από την εξίσωση 3:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (3)$$

Η τυπική απόκλιση του δείγματος (δειγματική τυπική απόκλιση) διαφέρει σε τρία διαφορετικά σημεία από την τυπική απόκλιση του πληθυσμού (πληθυσμιακή τυπική απόκλιση), όπως ορίζεται από την Εξίσωση 2. Α) το σ αντικαθίστανται από το s με σκοπό να δοθεί έμφαση στη διαφορά μεταξύ των δυο όρων. Β) η αληθής τιμή μ αντικαθίσταται από τη μέση τιμή \bar{x} του δείγματος και Γ) αντί του N στον παρονομαστή εμφανίζεται η διαφορά $(N - 1)$ η οποία ορίζεται ως αριθμός των βαθμών ελευθερίας.

Εξ ορισμού, ο αριθμός των βαθμών ελευθερίας είναι ο αριθμός των δεδομένων που παραμένουν ανεξάρτητα όταν υπολογίζεται το s , επομένως η τυπική απόκλιση μιας ομάδας πειραματικών δεδομένων υπολογίζεται με $N - 1$ βαθμούς ελευθερίας, επειδή για τον υπολογισμό χρησιμοποιείται η μέση τιμή \bar{x} . Με αντικατάσταση της μέσης τιμής και κάθε υποομάδας δεδομένων $(N - 1)$ στην αλγεβρική εξίσωση για τη μέση τιμή, μπορεί να υπολογισθεί η αριθμητική τιμή ενός εξαιρούμενου δεδομένου. Δεδομένου ότι η αριθμητική τιμή κάθε δεδομένου μπορεί να υπολογισθεί από τα υπόλοιπα δεδομένα και τη μέση τιμή, δείχνει ότι ένας βαθμός ελευθερίας χάνεται κάθε φορά που χρησιμοποιείται μια μέση τιμή για τον υπολογισμό ενός στατιστικού στοιχείου.

1.5.4. Σχετική τυπική απόκλιση (RSD) και συντελεστής μεταβλητότητας (CV)

Η σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD) πολλές φορές παρέχει καλύτερη πληροφόρηση σε σχέση με την απόλυτη τυπική απόκλιση. Η σχετική τυπική απόκλιση ενός δείγματος αναλυτικών δεδομένων δίνεται από την εξίσωση 4:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 10^2 \quad (4)$$

Όταν $z = 2$, η σχετική τυπική απόκλιση εκφράζεται επί τοις εκατό, ενώ για όταν $z = 3$ η απόκλιση εκφράζεται επί τοις χιλίοις. Όταν η σχετική τυπική απόκλιση εκφράζεται ως επί τοις εκατό (%) ονομάζεται και συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of variation, CV) των δεδομένων. Δηλαδή (5),

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \% \quad (5)$$

Όταν έχουμε να κάνουμε με δεδομένα όλου του πληθυσμού, τα s και x αντικαθίστανται στις εξισώσεις 4 και 5, από τα σ και μ , αντίστοιχα.

1.5.5. Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα περιγράφει τη συγκέντρωση των μετρήσεων γύρω από μια κεντρική τιμή, με άλλα λόγια τη συμφωνία μεταξύ των αριθμητικών τιμών για δυο ή περισσότερες επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ή για μετρήσεις, που έχουν ληφθεί υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες. Συνήθως η επαναληψιμότητα της αναλυτικής μεθόδου λαμβάνεται με απλή επανάληψη της μέτρησης. Για την περιγραφή της επαναληψιμότητας μιας ομάδας πειραματικών δεδομένων τρεις όροι χρησιμοποιούνται: η τυπική απόκλιση (standard deviation), η μεταβλητότητα ή διακύμανση (variance) και ο συντελεστής μεταβλητότητας ή διακύμανσης (coefficient of variation), έχουν στατιστική σημασία και ορίστηκαν παραπάνω.

1.5.6. Ακρίβεια

Η ακρίβεια περιγράφει την ορθότητα του πειραματικού αποτελέσματος. Αυστηρώς οριζόμενη, το μόνο είδος μέτρησης που μπορεί να είναι απόλυτα ακριβές είναι αυτό που περιλαμβάνει απαριθμούμενα αντικείμενα. Όλες οι υπόλοιπες μετρήσεις περιλαμβάνουν σφάλματα και δίνουν μόνο μια προσέγγιση της αλήθειας.

Η ακρίβεια είναι ένας σχετικός όρος με την έννοια ότι μια ακριβής ή ανακριβής μέθοδος εξαρτάται από τις ανάγκες του αναλυτή και τη δυσκολία του αναλυτικού προβλήματος. Για παράδειγμα, μια αναλυτική μέθοδος που δίνει αποτελέσματα με σφάλμα $\pm 10\%$ ή ένα μέρος στο δισεκατομμύριο, της ορθής ποσότητας υδραργύρου σε δείγμα ιστού από ψάρια, το οποίο περιέχει 10 μέρη στο δισεκατομμύριο υδράργυρο, συνήθως θεωρείται ως αρκετά ακριβής. Αντίθετα, μια πορεία εργασίας που δίνει σφάλμα $\pm 10\%$ της ορθής ποσότητας υδραργύρου σε ένα ορυκτό που περιέχει 20% υδράργυρο συνήθως κρίνεται ως ανακριβής.

1.5.7. Ευαισθησία

Ως ευαισθησία (sensitivity) ενός οργάνου ή μιας μεθόδου, προσδιορίζεται το μέτρο της ικανότητάς τους να διακρίνουν μικρές διαφορές στη συγκέντρωση του αναλύτη. Η ευαισθησία καθορίζεται από δύο παράγοντες: α) την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης και β) την επαναληψιμότητα της συσκευής μέτρησης. Μεταξύ δύο

μεθόδων που παρουσιάζουν την ίδια επαναληψιμότητα, η πιο ευαίσθητη είναι εκείνη η οποία έχει τη μεγαλύτερη κλίση στην καμπύλη βαθμονόμησης της. Ανάλογα, με το εάν δύο μέθοδοι έχουν καμπύλες βαθμονόμησης ίσων κλίσεων, η πιο ευαίσθητη είναι εκείνη με την μεγαλύτερη επαναληψιμότητα. Ο ποσοτικός ορισμός της ευαισθησίας που έχει γίνει δεκτός από τη Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC), αφορά την ευαισθησία βαθμονόμησης, και εκφράζεται από την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης στην περιοχή συγκέντρωσης που μας ενδιαφέρει. Οι περισσότερες καμπύλες βαθμονόμησης στην αναλυτική χημεία, είναι γραμμικές και μπορούν να περιγραφούν με την εξίσωση (6):

$$S = mc + S_{bl} \quad (6)$$

όπου S είναι το μετρούμενο σήμα, c η συγκέντρωση του αναλύτη, m η κλίση της ευθείας S_{bl} και το σήμα του τυφλού (blank). Η ποσότητα S_{bl} αντιστοιχεί στην τομή της ευθείας γραμμής στην τεταγμένη. Στις καμπύλες αυτές, η ευαισθησία βαθμονόμησης είναι ανεξάρτητη της συγκέντρωσης c και είναι ισούται με m . Ως βαθμός αξιολόγησης, η ευαισθησία βαθμονόμησης έχει το εξής μειονέκτημα: δεν εξαρτάται από την επαναληψιμότητα των επιμέρους μετρήσεων. Οι Mandel και Stiehler (Mandel & Stiehler, 1964) συμπεριέλαβαν την επαναληψιμότητα σε ένα μαθηματικώς πληρέστερο ορισμό της ευαισθησίας και πρότειναν την αναλυτική ευαισθησία, γ :

$$\gamma = m / s_s \quad (7)$$

Εδώ το m είναι και πάλι η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης και s_s είναι η τυπική απόκλιση της μέτρησης. Πλεονέκτημα της αναλυτικής ευαισθησίας είναι ότι δεν εξαρτάται ιδιαίτερα από διάφορους ενισχυτικούς παράγοντες. Για παράδειγμα ο πενταπλασιασμός της απολαβής (του συντελεστή ενίσχυσης) ενός οργάνου θα προκαλέσει πενταπλασιασμό του m . Αυτή η αύξηση όμως θα συνοδεύεται και από την αντίστοιχη αύξηση του s_s , οπότε η αναλυτική ευαισθησία θα παραμείνει σχεδόν η ίδια. Ένα ακόμα πλεονέκτημα της αναλυτικής ευαισθησίας αποτελεί το γεγονός ότι είναι ανεξάρτητη από τις μονάδες μέτρησης του S . Μειονέκτημα της αναλυτικής ευαισθησίας είναι η εξάρτησή της από τη συγκέντρωση, επειδή οι τιμές s_s μπορεί να εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση.

1.5.8. Όριο ανίχνευσης

Ως όριο ανίχνευσης (detection limit) ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση ή μάζα του αναλύτη, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με καθορισμένη στάθμη (ή επίπεδο) εμπιστοσύνης. Το όριο είναι ανάλογο της τιμής του αναλυτικού σήματος προς το μέγεθος των στατιστικών διακυμάνσεων του σήματος του τυφλού. Εάν το αναλυτικό σήμα δεν είναι μεγαλύτερο από το σήμα του τυφλού κατά ένα πολλαπλάσιο της μεταβλητότητας του τυφλού k , λόγω τυχαίων σφαλμάτων, η ανίχνευση αναλυτικού σήματος με βεβαιότητα είναι αδύνατη. Άρα το αναλυτικό σήμα και η τυπική του απόκλιση πλησιάζουν το σήμα και την τυπική του απόκλιση του τυφλού S_{bl} , καθώς προσεγγίζεται το όριο ανίχνευσης. Συνεπώς ως ελάχιστο αναλυτικό σήμα S_m που μπορεί να γίνει αντιληπτό, θεωρείται το άθροισμα του μέσου τυφλού σήματος S_m και του πολλαπλασίου ($x k$) της τυπικής απόκλισης του τυφλού, δηλαδή είναι ίσο με:

$$S_m = \bar{S}_{bl} + k s_{bl} \quad (8)$$

Το S_{bl} μπορεί να προσδιορισθεί πειραματικά με την πραγματοποίηση 20 έως 30 μετρήσεων τυφλού, κατά προτίμηση κατά τη διάρκεια μιας ευρείας χρονικής περιόδου. Τα δεδομένα που προκύπτουν υφίστανται στατιστική επεξεργασία για να υπολογισθούν οι τιμές s_{bl} και S_{bl} και έτσι, η κλίση από την Εξίσωση 8 χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του S_m σε c_m , το οποίο ορίζεται ως όριο ανίχνευσης. Συμπερασματικά το όριο ανίχνευσης υπολογίζεται από την εξίσωση (9):

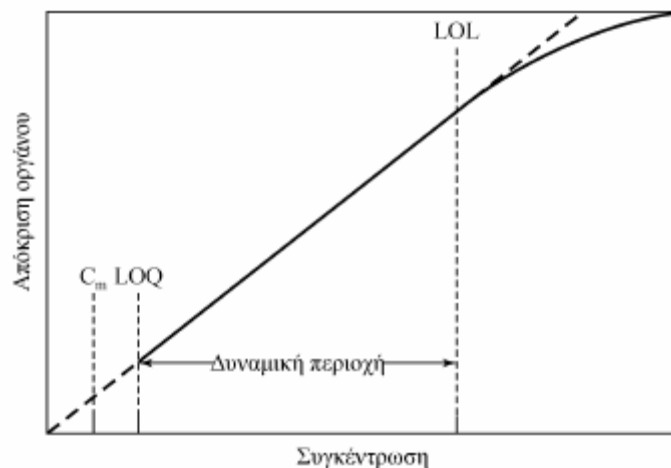
$$c_m = \frac{S_m - S_{bl}}{m} \quad (9)$$

Όπως έχει τονισθεί από τον Ingle (Ingle, 1970), για τον προσδιορισμό της τιμής k της Εξίσωσης 8, έχει χρησιμοποιηθεί ένας αριθμός εναλλακτικών μεθόδων οι οποίες βασίζονται σωστά ή εσφαλμένα στα στατιστικά στοιχεία t και z . Ο Kaiser (Kaiser, 1987) υποστηρίζει ότι μια λογική τιμή για τη σταθερά αυτή είναι $k = 3$. Επισημαίνει ότι η παραδοχή της κανονικής κατανομής των αποτελεσμάτων των τυφλών μετρήσεων είναι λανθασμένη. Για $k = 3$ ο βαθμός εμπιστοσύνης για την ανίχνευση θα είναι 95% στις περισσότερες των περιπτώσεων. Αναφέρει επίσης ότι η χρήση μεγαλύτερης τιμής k (και επομένως υψηλότερης στάθμης εμπιστοσύνης) δεν προσφέρει ουσιαστικό αποτέλεσμα. Οι Long και Winefordner (Long & Winefordner, 1983) σε μια αναφορά για τα όρια ανίχνευσης συνιστούν επίσης τη χρήση της τιμής $k = 3$.

1.5.9. Δυναμική περιοχή

Στην Εικόνα 1.9 απεικονίζεται γραφικά ο ορισμός της δυναμικής περιοχής μιας αναλυτικής μεθόδου. Δυναμική περιοχή καλείται η περιοχή η οποία εκτείνεται από τη μικρότερη συγκέντρωση στην οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί ποσοτική μέτρηση, που ονομάζεται όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantitation, LOQ), έως τη συγκέντρωση στην οποία η καμπύλη βαθμονόμησης αποκλίνει από τη γραμμικότητα, που ονομάζεται ως όριο γραμμικότητας (limit of linearity, LOL). Το κατώτερο όριο ποσοτικών μετρήσεων θεωρείται γενικά ότι είναι το δεκαπλάσιο της τυπικής απόκλισης του τυφλού ($10s_{bl}$). Στο σημείο αυτό η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) είναι περίπου 30% και ελαττώνεται με γρήγορους ρυθμούς καθώς αυξάνονται οι συγκεντρώσεις. Στο όριο ανίχνευσης η σχετική τυπική απόκλιση είναι 100%.

Για να είναι αποδεκτή μια αναλυτική μέθοδος θα πρέπει να διαθέτει δυναμική περιοχή που να καλύπτει δύο τάξεις μεγέθους. Πολλές φορές, υπάρχουν μέθοδοι, οι οποίες μπορούν να εφαρμοστούν σε δυναμική περιοχή συγκεντρώσεων, που καλύπτει πέντε έως έξι τάξεις μεγέθους (Scott, 1994).



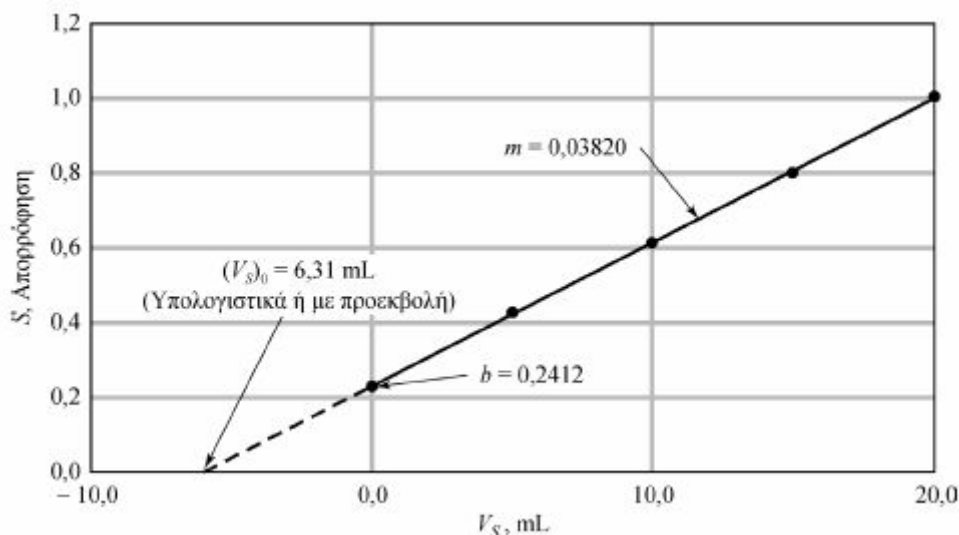
Εικόνα 1.9. Εύρος των ορίων μιας αναλυτικής μεθόδου. LOQ = όριο ποσοτικοποίησης, LOL = όριο γραμμικής απόκρισης

1.6. Βαθμονόμηση ενόργανων μεθόδων

1.6.1 Καμπύλες βαθμονόμησης

Κατά τη χρήση της τεχνικής της καμπύλης βαθμονόμησης (calibration curve) εισάγονται στο όργανο αρκετά πρότυπα διαλύματα με γνωστές συγκεντρώσεις ακριβείας του αναλύτη και καταγράφεται η ένδειξη του οργάνου. Ακολουθεί διόρθωση των ενδείξεων αυτών ως προς την ένδειξη του τυφλού ενώ σε ιδανική περίπτωση το τυφλό περιέχει όλα τα συστατικά του δείγματος εκτός από τον αναλύτη. Με τα προκύπτοντα δεδομένα σχεδιάζεται το διάγραμμα της διορθωμένης ένδειξης του οργάνου ως προς τη συγκέντρωση του αναλύτη, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.10. όπου παρουσιάζεται μια τυπική καμπύλη βαθμονόμησης (ονομάζεται και καμπύλη εργασίας ή αναλυτική καμπύλη ή καμπύλη αναφοράς).

Πολλές φορές λαμβάνονται διαγράμματα τα οποία είναι γραμμικά σε μια αρκετά ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων (δυναμική περιοχή). Τα διαγράμματα αυτά είναι επιθυμητό να είναι γραμμικά, επειδή υπόκεινται σε μικρότερο βαθμό σε σφάλματα σε σχέση με τις μη γραμμικές καμπύλες, όμως δεν είναι ασυνήθιστο να προκύπτουν μη γραμμικά διαγράμματα, τα οποία απαιτούν μεγαλύτερο αριθμό δεδομένων βαθμονόμησης (περισσότερα πρότυπα διαλύματα) για να εξακριβωθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η σχέση μεταξύ ένδειξης οργάνου και συγκέντρωσης. Τελικά, από την καμπύλη βαθμονόμησης προκύπτει μια εξίσωση με τη μέθοδο ελάχιστων τετραγώνων ώστε να είναι δυνατός ο άμεσος υπολογισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων (Gilbert, 1987).



Εικόνα 1.10. Γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης για τη μέθοδο των γνωστών προσθηκών. Η συγκέντρωση του αγνώστου υπολογίζεται από την κλίση m και την τομή στον άξονα των τεταγμένων b , ή από την προεκβολή της ευθείας

Η επιτυχημένη χρήση της καμπύλης βαθμονόμησης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ακρίβεια των συγκεντρώσεων του αναλύτη στα πρότυπα και από την ομοιότητα της μήτρας των προτύπων με αυτήν των προσδιοριζόμενων αγνώστων, αν και το ταίριασμα του υποστρώματος των προτύπων με υπόστρωμα των δειγμάτων πολύπλοκης σύνθεσης συχνά είναι δύσκολο ως αδύνατο και αυτό οδηγεί σε σφάλματα από παρεμποδίσεις. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση υποστρώματος, είναι συχνά απαραίτητος ο διαχωρισμός του αναλύτη από τον παρεμποδιστή πριν από τη διαδικασία μέτρησης (Brown, 1989).

1.6.2. Μέθοδοι προσθήκης προτύπου

Οι μέθοδοι προσθήκης προτύπου (standard addition) είναι ιδιαίτερα χρήσιμες σε περιπτώσεις αναλύσεων πολύπλοκων δειγμάτων, όπου υπάρχει μεγάλη πιθανότητα επίδρασης του υποστρώματος. Υπάρχουν αρκετές παραλλαγές της μεθόδου της γνωστής προσθήκης (Bader, 1980).

Σε μια από τις πιο συνηθισμένες προβλέπεται η προσθήκη μιας ή περισσότερων συγκεντρώσεων πρότυπης ένωσης σε ίσες ποσότητες δείγματος. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται εμβολιασμός (spiking) του δείγματος. Εν συνεχεία, κάθε διάλυμα αραιώνεται σε ορισμένο όγκο πριν από τη μέτρηση. Όταν η ποσότητα του δείγματος είναι περιορισμένη, τα πρότυπα μπορούν να προστεθούν με διαδοχικές δόσεις προτύπου σε δεδομένο όγκο του αγνώστου. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στο αρχικό δείγμα και στη συνέχεια πάλι στο δείγμα μετά από κάθε προσθήκη. Στις περισσότερες παραλλαγές της μεθόδου προσθήκης προτύπου το υπόστρωμα του δείγματος παραμένει αναλλοίωτο μετά από κάθε προσθήκη και διαφέρει μόνο η συγκέντρωση του αναλύτη. Σε άλλες περιπτώσεις το υπόστρωμα του δείγματος αλλοιώνεται επειδή θα πρέπει να προστεθεί περίσσεια ενός αντιδραστήριου. Όλα τα άλλα συστατικά του μίγματος της αντίδρασης θα παραμένουν ίδια, εφόσον τα πρότυπα παρασκευάζονται σε κλάσματα του δείγματος.

1.6.3. Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

Το εσωτερικό πρότυπο (internal standard) είναι μια ένωση που προστίθεται σε σταθερή ποσότητα σε όλα τα δείγματα, τα τυφλά και τα πρότυπα βαθμονόμησης πριν από την ανάλυση. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να είναι ένα κύριο συστατικό των δε-

ιγμάτων και των προτύπων, το οποίο βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα, ώστε η συγκέντρωσή του να μπορεί να θεωρείται ίδια σε όλες τις περιπτώσεις. Η βαθμονόμηση πραγματοποιείται με την κατασκευή διαγράμματος του λόγου (σήμα αναλύτη)/(σήμα εσωτερικού προτύπου) ως προς τη συγκέντρωση του αναλύτη στα πρότυπα. Ο ίδιος λόγος μετρείται σε κάθε δείγμα και από την καμπύλη βαθμονόμησης υπολογίζεται η αντίστοιχη συγκέντρωση του αναλύτη.

Το εσωτερικό πρότυπο έχει το πλεονέκτημα ότι, εάν επιλεγεί και χρησιμοποιηθεί σωστά, μπορεί να αντισταθμίσει αρκετά τυχαία και συστηματικά σφάλματα. Έτσι, εάν τα σήματα του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου αποκρίνονται αναλογικά σε τυχαίες οργανολογικές και μεθοδολογικές διακυμάνσεις, ο λόγος των σημάτων παραμένει σταθερός και ανεξάρτητος των διακυμάνσεων αυτών. Εάν και τα δύο σήματα επηρεάζονται το ίδιο από τη δράση του υποστρώματος, πάλι η δράση αυτή όσον αφορά τον λόγο των σημάτων αντισταθμίζεται. Στις περιπτώσεις που το εσωτερικό πρότυπο αποτελεί κύριο συστατικό δειγμάτων και προτύπων, συμβαίνει πάλι αντιστάθμιση σφαλμάτων που προκύπτουν κατά την προετοιμασία των δειγμάτων και των διαλυμάτων.

Η κυριότερη δυσκολία κατά την εφαρμογή της μεθόδου εσωτερικού προτύπου είναι η εύρεση κατάλληλης ουσίας, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο και η εισαγωγή της τόσο στα δείγματα, όσο και στα πρότυπα με τον πιο επαναλήψιμο τρόπο. Το εσωτερικό πρότυπο θα πρέπει να παρέχει σήμα με παρόμοια χαρακτηριστικά με το σήμα του αναλύτη (π.χ. να υφίσταται την ίδια επίδραση από άλλες ουσίες και από διακυμάνσεις οργανολογικών παραμέτρων), και επιπλέον θα πρέπει να διακρίνεται από αυτό έτσι, ώστε κάθε σήμα (αναλύτη και εσωτερικού προτύπου) να μπορεί να μετρηθεί ξεχωριστά. Επιπρόσθετα, πρέπει να είναι βέβαιο ότι η ουσία που χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο δεν βρίσκεται στο υπόστρωμα του δείγματος έτσι, ώστε η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου να υπολογίζεται αποκλειστικά από τις προστιθέμενες ποσότητές του. Για παράδειγμα το λίθιο αποτελεί ένα εσωτερικό πρότυπο κατάλληλο για τον προσδιορισμό νατρίου και καλίου στον ορό του αίματος, επειδή η χημική συμπεριφορά του λιθίου είναι παρόμοια με εκείνη των δύο αναλυτών και συγχρόνως δεν αποτελεί φυσιολογικό συστατικό του αίματος. Οι λόγοι των εντάσεων θα πρέπει να επηρεάζονται ελάχιστα από τα αίτια που αναγκάζουν το δείγμα να εκπέμψει ακτινοβολία. Συνεπώς κατά την ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου εσωτερικού προτύπου, θα πρέπει να επαληθεύεται ότι αλλαγές στις συγκεντρώσεις του αναλύτη δεν επιδρούν στην ένταση του σήματος του εσωτερικού προτύπου.

1.7. Κυκλική Βολταμετρία

Η κυκλική βολταμετρία κατέχει εξέχουσα θέση μεταξύ των ποτενσιοδυναμικών τεχνικών, στη μελέτη των ηλεκτροχημικών αντιδράσεων τόσο σε σταθερά ηλεκτρόδια, π.χ. υγρό μέταλλο (κρεμασμένη σταγόνα Hg), έλασμα ή σύρμα μετάλλου, ίνες άνθρακα, κ.α.) όσο και σε περιστρεφόμενα ηλεκτρόδια.

Η σημασία της κυκλικής βολταμετρίας με γραμμική σάρωση (cyclic linear sweep voltametry) είναι ιδιαίτερη, διότι εκτός του ότι πραγματοποιείται γρήγορα, προσφέρεται για μια πρώτη μελέτη μιας ηλεκτροχημικής αντίδρασης παρέχοντας τόσο ποιοτικά όσο και ημι-ποσοτικά χαρακτηριστικά.

Θα μπορούσε κανείς να πει ότι αν και η κυκλική βολταμετρία δεν ανήκει στις αναλυτικές ηλεκτροχημικές τεχνικές, παρόλα αυτά, όμως, αποτελεί μια διαγνωστική μέθοδο για τη μελέτη του μηχανισμού των ηλεκτροχημικών αντιδράσεων.

Με τη μέθοδο αυτή μπορεί κανείς να προσδιορίσει:

- την ηλεκτροχημική συμπεριφορά του ηλεκτροδραστικού συστατικού

- την αντιστρεπτότητα ή μη μιας ηλεκτροχημικής αντίδρασης
- τη διεξαγωγή της σε ένα ή περισσότερα στάδια
- την πιθανή παραγωγή ενδιάμεσων προϊόντων
- αν στο ηλεκτρόδιο συμβαίνουν φαινόμενα προσρόφησης ή εκρόφησης
- αν λαμβάνουν χώρα φαινόμενα κατάλυσης ή παρεμπόδισης
- αν η ηλεκτροχημική αντίδραση συνοδεύεται από ομογενείς χημικές αντιδράσεις κλπ.

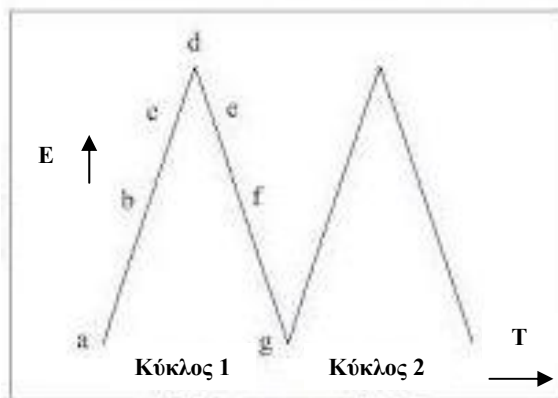
Για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, η κυκλική βολταμετρία αποτελεί την καταλληλότερη ηλεκτροχημική τεχνική για τη μελέτη πολύπλοκων ηλεκτροχημικών αντιδράσεων ιδιαίτερα όταν συνδυάζεται με οπτικές τεχνικές, όπως η φασματοσκοπία απορρόφησης οπότε μπορεί να ανιχνευθούν ασταθή ενδιάμεσα προϊόντα της ηλεκτροχημικής αντίδρασης (Μουμτζής και Σαζού, 1997) (Κατσάνος, 1981) (Κοκκινίδης, 1992) (Bard and Faulkner, 1980).

1.7.1. Αρχή της Μεθόδου

Στην κυκλική βολταμετρία, για την κινητική μελέτη των ηλεκτροχημικών αντιδράσεων χρησιμοποιείται μια ηλεκτροχημική κυψέλη (σύστημα δύο ή τριών ηλεκτροδίων). Ένα βασικό χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι η γραμμική μεταβολή του δυναμικού του ηλεκτροδίου και η καταγραφή της αντίστοιχης τιμής του ρεύματος με αποτέλεσμα τη λήψη διαγραμμάτων τάσης-έντασης (καμπύλες E-I) (Μουμτζής και Σαζού, 1997).

Η γραμμική σάρωση του δυναμικού γίνεται ανάμεσα σε δυο ακραίες τιμές, οι οποίες τις πιο πολλές φορές ορίζονται από τα δυναμικά ανοδικής έκλυσης του O₂ και καθοδικής έκλυσης του H₂ σε υδατικά κυρίως διαλύματα. Η σάρωση είναι συνεχής και κάθε φορά που το δυναμικό του ηλεκτροδίου φθάνει σε οριακά σημεία, η σάρωση αλλάζει φορά. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η ηλεκτροδιακή επιφάνεια αναγεννάται και ενεργοποιείται συνεχώς, αφού τα κατάλοιπα των ενδιάμεσων ηλεκτροχημικών αντιδράσεων απομακρύνονται / αντιδρούν με την έκλυση των αερίων H₂ και O₂.

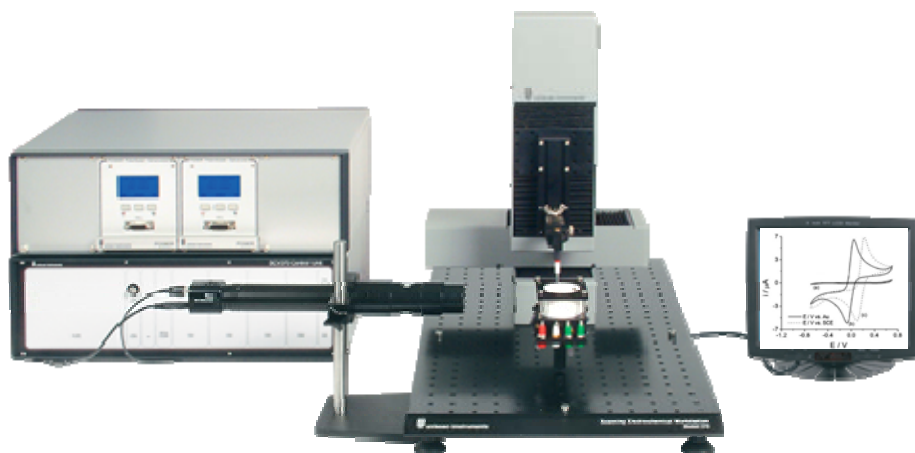
Στην Εικόνα 1.11. απεικονίζεται η γραμμική μεταβολή του δυναμικού με το χρόνο, με σημεία αντιστροφής της σάρωσης τις τιμές του δυναμικού της ανοδικής (EO₂) και καθοδικής (EH₂) έκλυσης του O₂ και του H₂ αντίστοιχα. Λόγω της τριγωνικής μορφής της καμπύλης E-t, η μέθοδος αυτή λέγεται και ποτενσιοστατική μέθοδος τάσης (potentiostatic voltage method) ((Κοκκινίδης, 1992)). Τα τμήματα 1-2-1', 1'-2'-1" κ.τ.λ. αποτελούν τον πρώτο, δεύτερο κ.τ.λ. κύκλο σάρωσης δυναμικού, ενώ τα ανερχόμενα (1-2, 1'-2') και κατερχόμενα (2-1', 2'-1") τμήματα κάθε κύκλου αντιστοιχούν στην ανοδική σάρωση (anodic sweep) και καθοδική σάρωση (cathodic sweep) δυναμικού του ηλεκτροδίου, που διαδέχονται η μια την άλλη. Κατά τη διάρκεια των ανοδικών σαρώσεων πάνω στο ηλεκτρόδιο συμβαίνουν οξειδωτικές αντιδράσεις, ενώ κατά τη διάρκεια των καθοδικών σαρώσεων συμβαίνουν αναγωγικές αντιδράσεις. Τα τμήματα 1-2-1', 1'-2'-1" κ.τ.λ. αποτελούν τον πρώτο, δεύτερο κ.τ.λ. κύκλο σάρωσης δυναμικού, ενώ τα ανερχόμενα (1-2, 1'-2') και κατερχόμενα (2-1', 2'-1") τμήματα κάθε κύκλου αντιστοιχούν σε ανοδική σάρωση (anodic sweep) και καθοδική σάρωση (cathodic sweep) δυναμικού του ηλεκτροδίου, που διαδέχονται η μια την άλλη. Κατά τις ανοδικές σαρώσεις πάνω στο ηλεκτρόδιο συμβαίνουν οξειδωτικές αντιδράσεις, ενώ οι καθοδικές σαρώσεις συνοδεύονται από αναγωγικές αντιδράσεις.



Εικόνα 1.11. Διάγραμμα τριγωνικής μεταβολής του δυναμικού του ηλεκτροδίου

Η πυκνότητα ρεύματος (ένταση ρεύματος ανά μονάδα επιφάνειας) που διέρχεται από τη μονάδα επιφάνειας του ηλεκτροδίου είναι συνάρτηση της ταχύτητας σάρωσης ή του χρόνου. Αυτό συμβαίνει επειδή η ταχύτητα σάρωσης δυναμικού (potential scanning ή sweep rate) δηλ. η παράγωγος $dE/dt=u$ (Vs^{-1} ή mVs^{-1}) πρέπει να είναι σταθερή. Όταν η ταχύτητα σάρωσης είναι μικρή (0,1 μέχρι 1 mV/sec), το ηλεκτρόδιο βρίσκεται κάτω από περίπου σταθερή τιμή δυναμικού για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα. Τότε, η αντίδραση διεξάγεται κάτω από συνθήκες ισορροπίας. Σε αυτήν ανήκει κυρίως η απλή μέθοδος της πολαρογραφίας. Όταν η ταχύτητα σάρωσης είναι σχετικά μεγάλη, μεγαλύτερη από 10 mV/s τότε το ηλεκτρόδιο βρίσκεται κάτω από συνθήκες μη ισορροπίας (Κοκκινίδης, 1992). Η τριγωνική τάση που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας, παρέχεται από μια γεννήτρια τάσης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.12, όπου δίνεται διαγραμματικά μια πειραματική διάταξη Κυκλικής Βολταμετρίας.

Προκειμένου η μεταβολή του δυναμικού του ηλεκτροδίου εργασίας με το χρόνο να είναι αυστηρά γραμμική, πρέπει να συγκρίνεται αδιάκοπα και να εξισώνεται η πραγματική διαφορά δυναμικού (E_a), ανάμεσα στο ηλεκτρόδιο εργασίας (WE) και στο ηλεκτρόδιο αναφοράς (RE), με την ονομαστική τιμή δυναμικού (E_n) που προμηθεύει στο ηλεκτρόδιο εργασίας η γεννήτρια. Η εξίσωση των δυναμικών E_a και E_n γίνεται με τη βοήθεια ποτενσιοστάτη με ένα χρόνο απόκρισης μικρότερο από $10^{-5} sec$.



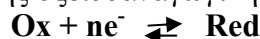
Εικόνα 1.12. Σχηματική παράσταση διάταξης Κυκλικής Βολταμετρίας

Οι καμπύλες τάσης - έντασης που καταγράφονται στη διάταξη της Εικόνας 1.13. ονομάζονται κυκλικά βολταμογραφήματα. Αυτά παρέχουν την απόκριση του ηλεκ-

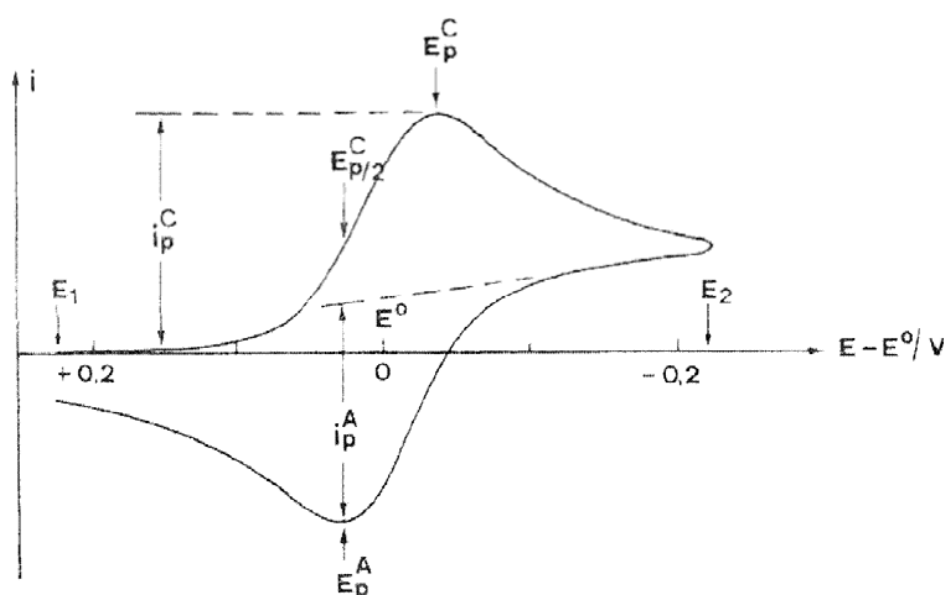
τροχημικού συστήματος κατά τη συνεχή, χρονική γραμμική αύξηση του δυναμικού του ηλεκτροδίου. Στο διάστημα αυτό λαμβάνουν χώρα ηλεκτροχημικές αντιδράσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης του ρεύματος. Συγκεκριμένα κάθε ανοδική ή καθοδική κορυφή σε ένα γράφημα κυκλικής βολταμετρίας μπορεί ν' αντιστοιχηθεί σε μια ηλεκτροχημική οξειδωτική ή αναγωγική αντίδραση. Η ένταση του ρεύματος είναι ενδεικτική για το ρυθμό της αντίδρασης (αύξηση του ρυθμού οδηγεί σε αύξηση της έντασης του ρεύματος) (Μουμτζής και Σαζού, 1997).

1.7.2. Αντιστρεπτές ηλεκτροχημικές αντιδράσεις

Στην περίπτωση αντιστρεπτής οξειδοαναγωγικής αντίδρασης με μορφή:



το γράφημα της κυκλικής βολταμετρίας έχει τη μορφή που φαίνεται στο Σχήμα 1.3



Εικόνα 1.13. Κυκλικό βολταμογράφημα αντιστρεπτής αντίδρασης

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.13, η σάρωση του δυναμικού αρχίζει από το E_1 όπου δεν πραγματοποιείται καμία αντίδραση και τελειώνει στο E_2 όπου η αναγωγή του συστατικού Ox προς το συστατικό Red ρυθμίζεται από τη διάχυση. Καθώς το δυναμικό αρχίζει να πλησιάζει το κανονικό δυναμικό E_0 της αντίδρασης, αρχίζει να λαμβάνει χώρα η αναγωγική αντίδραση. Το ρεύμα αυξάνεται λόγω της ελάττωσης της επιφανειακής συγκέντρωσης του Ox , με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ροή ($d\text{COx}/dx(x=0)$) του Ox στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Έπειτα από το χρόνο όπου το δυναμικό ισούται με E_0 η επιφανειακή συγκέντρωση του Ox προοδευτικά τείνει στο μηδέν, ενώ η ροή πλησιάζει σε μια μέγιστη τιμή και στη συνέχεια αρχίζει να ελαττώνεται καθώς η περιοχή κοντά στο ηλεκτρόδιο κενώνεται από το συστατικό Ox και εξελίσσεται η στιβάδα διάχυσης (Μουμτζής και Σαζού, 1997).

Αυτή η συμπεριφορά οδηγεί σε καμπύλες τάσης - έντασης, που παρουσιάζουν μέγιστη τιμή της έντασης του ρεύματος λίγο μετά το κανονικό δυναμικό E_0 . Φαίνεται ότι, όσο ταχύτερη είναι η σάρωση του δυναμικού, τόσο πιο απότομη θα είναι η άνοδος και η πτώση του ρεύματος. Επιπρόσθετα, όσο λιγότερο διαρκεί η σάρωση του δυναμικού ανάμεσα στις ακραίες τιμές του, τόσο η τιμή του μέγιστου ρεύματος γίνεται μεγαλύτερη. Όταν ελαττωθεί πολύ η ταχύτητα μεταβολής του δυναμικού, η καμ-

πύλη τάσης - έντασης αποκτά την κανονική σιγμοειδή μορφή μιας στατικής καμπύλης. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι καμπύλες βρίσκονται σε ισορροπία, σε ταχύτητες $u = dE/dt < 0.1 \text{ mV/s}$.

Εάν μετά από χρόνο λ , δηλαδή στο δυναμικό E_2 , αντιστραφεί η φορά σάρωσης του δυναμικού προς την αρχική τιμή του δυναμικού E_1 , η σάρωση θα γίνει πάλι γραμμική με την ίδια ταχύτητα όπως και πριν (Εικόνα 1.13.). Τη στιγμή που αντιστρέφεται η φορά σάρωσης του δυναμικού, στο δυναμικό E_2 , κοντά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση του προϊόντος της αναγωγής. Το συστατικό Red εξακολουθεί να παράγεται και κατά την αντίθετη σάρωση του δυναμικού. Καθώς πλησιάζει ξανά το κανονικό δυναμικό E_0 , η ταχύτητα σχηματισμού του Red ελαττώνεται, ενώ αυτό αρχίζει να οξειδώνεται προς το αρχικό συστατικό Ox .

Σταδιακά, το ρεύμα από καθοδικό μετατρέπεται σε ανοδικό και φθάνει σε μια μέγιστη τιμή αμέσως μετά το δυναμικό E_0 . Κατόπιν, ελαττώνεται κανονικά μέχρι το αρχικό δυναμικό E_1 . Σε αυτό το δυναμικό το ανοδικό ρεύμα είναι μικρότερο από ότι είναι το αντίστοιχο καθοδικό στο δυναμικό E_2 , επειδή το συστατικό Red δεν υπάρχει στο διάλυμα και ένα μέρος από αυτό που δημιουργήθηκε κατά την αναγωγή του Ox δεν επιστρέφει στο ηλεκτρόδιο, αλλά διαχέεται στον κυρίως όγκο του διαλύματος.

Καθώς επιστρέφει το δυναμικό στην αρχική τιμή συμπληρώνεται ένας κύκλος. Τα i_p^C και i_p^A που διακρίνονται στο παραπάνω διάγραμμα παριστάνουν αντίστοιχα το μέγιστο καθοδικό και μέγιστο ανοδικό ρεύμα, ενώ με E_p^C και E_p^A συμβολίζονται τα δυναμικά που αντιστοιχούν στα δυο αυτά μέγιστα και επιτρέπουν το χαρακτηρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαφόρων ουσιών, που οξειδώνονται ή ανάγονται στα ηλεκτρόδια (Κατσάνος, 1981).

Η μέγιστη τιμή του ρεύματος (το ρεύμα στην κορυφή) είναι:

$$I_p = (2.69 \cdot 10^5)^{3/2} n^2 A D_0^{1/2} u^{1/2} C_0^* \quad (10)$$

όπου,

I_p : κορυφή ανοδικού ρεύματος, [A]

n : αριθμός ηλεκτρονίων που εναλλάσσονται

A : γεωμετρική επιφάνεια, [cm^2]

D_0 : συντελεστής διάχυσης, [cm^2 / s]

C_0^* : Συγκέντρωση, [mol / cm^3]

u : Ρυθμός σάρωσης, [V/s]

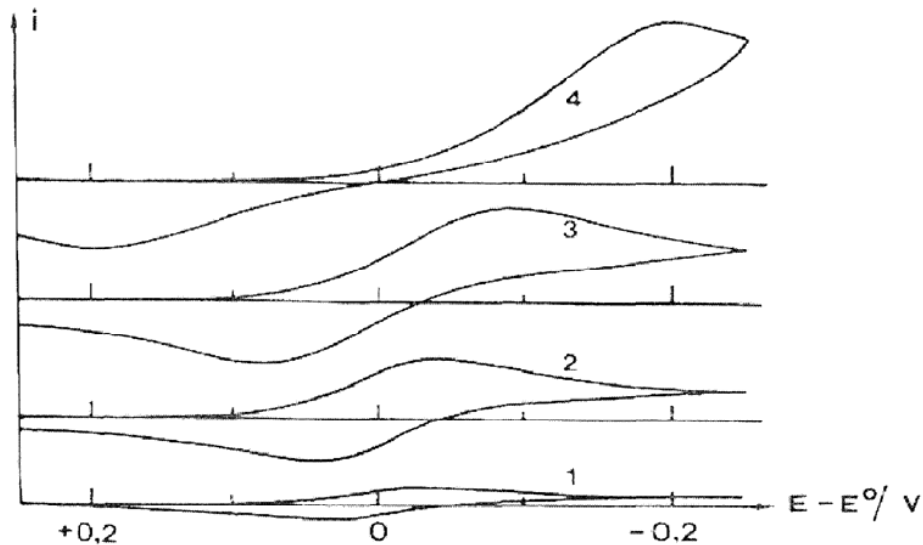
Η σχέση αυτή είναι γνωστή ως εξίσωση Randles – Sevcik (Bard and Faulkner, 1980). Τα διαγνωστικά κριτήρια που είναι χαρακτηριστικά μιας αντιστρεπτής ηλεκτροχημικής αντίδρασης, στους 25°C είναι:

- Το i_p να είναι ανάλογο του $u^{1/2}$
- Το E_p να είναι ανεξάρτητο από το u
- $i_p^A / i_p^C = 1$
- $\Delta E_p = E_p^A - E_p^C = 56,5 / n \text{ mV}$
- $|E_p - E_p/2| = 56,5 / n \text{ mV}$

Συμπερασματικά, σε περίπτωση αντιστρεπτής πορείας το γράφημα της κυκλικής βολταμετρίας θα έχει τη μορφή καμπύλης η οποία αποτελείται από δύο περίπου συμμετρικά κύματα, από τα οποία το ένα αντιστοιχεί στην ανοδική και το άλλο στην καθοδική σάρωση (Μουμτζής και Σαζού, 1997).

1.7.3. Μη αντιστρεπτές αντιδράσεις

Σε μικρές ταχύτητες σάρωσης δυναμικού, η μεταφορά μάζας είναι μικρότερη από την ταχύτητα μεταφοράς φορτίου, με αποτέλεσμα το γράφημα κυκλικής βολταμετρίας να είναι αντιστρεπτό. Καθώς αυξάνεται η ταχύτητα μεταβολής δυναμικού, αυξάνεται και η ταχύτητα μεταφοράς μάζας, με συνέπεια να γίνεται κάποια στιγμή συγκρίσιμη με την ταχύτητα μεταφοράς φορτίου. Συνεπώς, η αντίδραση από αντιστρεπτή γίνεται προοδευτικά μη αντιστρεπτή, και τα δύο κύματα, καθοδικό και ανοδικό, απομακρύνονται το ένα απ' το άλλο (Κοκκινίδης, 1992). Αυτό παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.14., όπου δίνονται τα κυκλικά βολταμογραφήματα για μια μη-αντιστρεπτή αντίδραση για διάφορες ταχύτητες μεταβολής του δυναμικού.



Εικόνα 1.14. Κυκλικά βολταμογραφήματα για μια μη αντιστρεπτή αντίδραση (παρουσία μόνο του O_2 στο διάλυμα για διαφορετικές ταχύτητες μεταβολής του δυναμικού (η αντιστοιχεί στην πιο μικρή ταχύτητα)

Στην περίπτωση των μη αντιστρεπτών αντιδράσεων, όσο αυξάνεται η ταχύτητα μεταβολής του δυναμικού, τόσο περισσότερο απομακρύνονται τα E_p^C και E_p^A από το κανονικό δυναμικό E_0 της αντίδρασης. Παράλληλα, παρατηρείται και μια μικρή μείωση του ρεύματος στην κορυφή (I_p) σε σχέση με το ρεύμα της αντιστρεπτής αντίδρασης. Η σχέση που δίνει το I_p στις αντιστρεπτές αντιδράσεις είναι:

$$(I_p)_{irr} = (2,99 \times 10^5) n (\alpha_c n_a)^{1/2} A D_0^{1/2} u^{1/2} C_0^* \quad (11)$$

όπου,

I_p : κορυφή ανοδικού μη-αντιστρέψιμου ρεύματος, [A]

n : ολικός αριθμός ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αντίδραση

n_a : αριθμός ηλεκτρονίων

α_c : παράγοντας διέλευσης ρεύματος

A : γεωμετρική επιφάνεια, [cm^2]

D_0 : συντελεστής διάχυσης, [cm^2 / s]

C_o : συγκέντρωση, [mol / cm³]

u : ρυθμός σάρωσης, [V/s]

Παρατηρείται δηλαδή ότι, όπως και στις αντιστρεπτές αντιδράσεις, το I_p μεταβάλλεται γραμμικά με το $u^{1/2}$ και τη συγκέντρωση του ηλεκτροδραστικού συστατικού στο διάλυμα. Η μόνη διαφορά που παρατηρείται στις αντιστρεπτές αντιδράσεις είναι ότι το I_p στις μη αντιστρεπτές εξαρτάται από τον παράγοντα διέλευσης α_c και την τιμή n_a , η οποία πολλές φορές διαφέρει από την τιμή n του ολικού αριθμού των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αντίδραση. Ο παράγοντας, που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο για τις μη αντιστρεπτές αντιδράσεις, είναι το δυναμικό στο μέγιστο ρεύμα. Το E_p στις αντιστρεπτές αντιδράσεις είναι σταθερό και ανεξάρτητο από την ταχύτητα μεταβολής του δυναμικού, ενώ στις μη αντιστρεπτές αντιδράσεις το E_p μετατοπίζεται προς μεγαλύτερες υπερτάσεις με την αύξηση της ταχύτητας μεταβολής του δυναμικού. Τα κριτήρια των μη αντιστρεπτών αντιδράσεων στους 25 °C είναι:

- $\Delta E^p = |(E_p)^A - (E_p)^C| > 57/n$, mV
- $|E_p - E_p/2| = 48/\alpha_c n_a$, mV
- Μετατόπιση E_p προς θετικά (οξειδωση) ή αρνητικά (αναγωγή) δυναμικά κατά 30 / αn mV, όταν δεκαπλασιάζεται η u
- Το I_p είναι ανάλογο του u

1.7.4. Ημι-αντιστρεπτές αντιδράσεις

Μια αντίδραση, η οποία χαρακτηρίζεται ως αντιστρεπτή σε πολύ χαμηλές ταχύτητες μεταβολής του δυναμικού μετατρέπεται σε μη αντιστρεπτή σε μεγάλες ταχύτητες. Για τη μετάβαση από μια αντιστρεπτή σε μια μη αντιστρεπτή συμπεριφορά (κι αντιστρόφως), το σύστημα περνάει από μια περιοχή ενδιάμεσων ταχυτήτων, όπου λέγεται ότι παρουσιάζει ημι-αντιστρεπτή συμπεριφορά. Στο μεταβατικό αυτό διάστημα, στο ολικό ρεύμα συνεισφέρουν τόσο η καθοδική, όσο και η ανοδική αντίδραση (Κατσάνος, 1981).

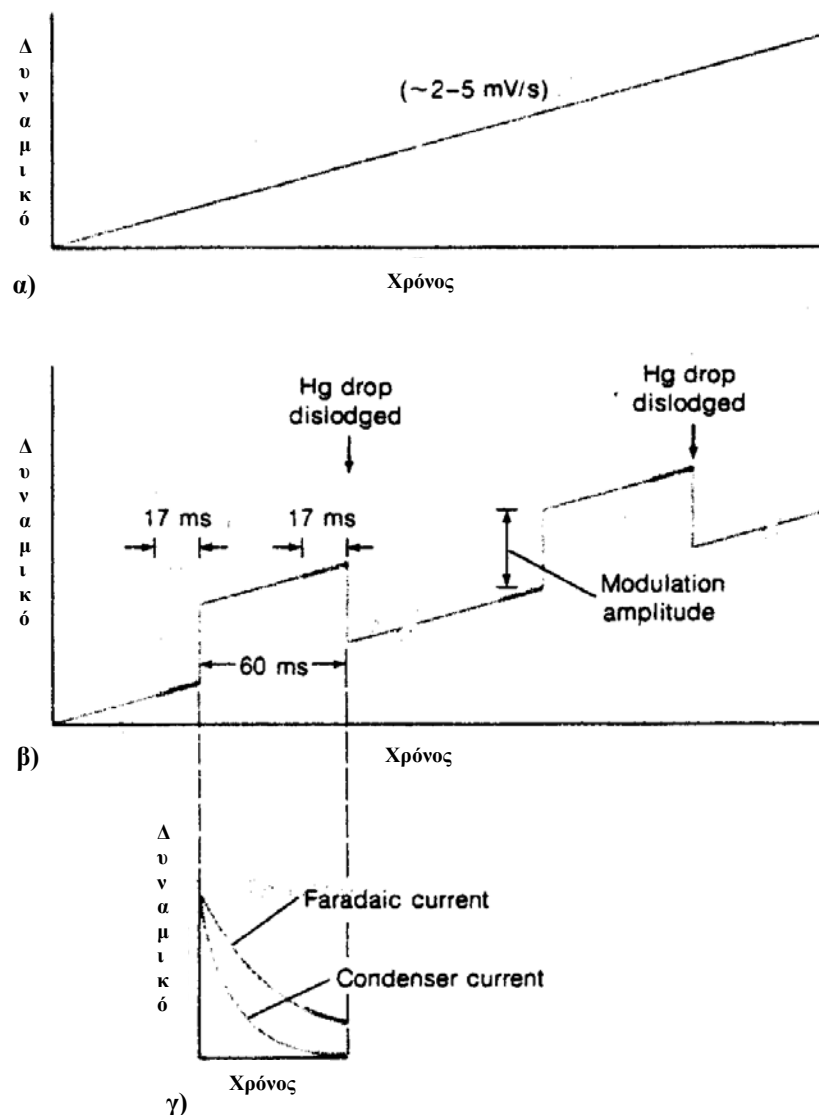
Τα διαγνωστικά κριτήρια των ημι-αντιστρεπτών αντιδράσεων στους 25 °C είναι τα εξής:

- Το I_p αυξάνεται με το $u^{1/2}$, όχι όμως γραμμικά
- $I_p^A / I_p^C = 1$ με την προϋπόθεση ότι $\alpha_c = \alpha_A = 0,5$
- Το ΔE_p^c είναι μεγαλύτερο από 56,5/n mV και αυξάνει με την αύξηση του u
- Το E_p μετατοπίζεται προς αρνητικότερες τιμές με την αύξηση του u

1.8. Παλμική Πολαρογραφία

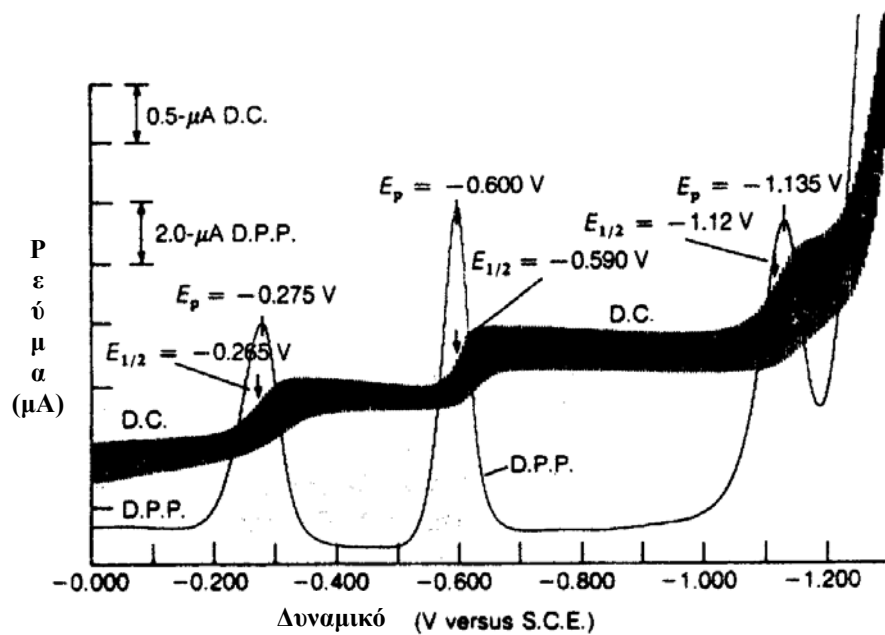
Η άμεση πολαρογραφία ρεύματος, μετά από βελτιώσεις έχει αντικατασταθεί από τη διαφορική παλμική πολαρογραφία. Σε εξαιρετικές συνθήκες, η απλή παλμική πολαρογραφία έχει όριο ανίχνευσης περίπου 10^{-5} και έχει τη δυνατότητα να αποδομήσει ουσίες με δυναμικά ημικύματος μεγαλύτερα ή ίσα των 0.2 V. Η τάση που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας αυξάνει γραμμικά σε σχέση με το χρόνο, όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 6.11α. Το ρεύμα καταγράφεται συνεχώς, και το αποτέλεσμα είναι ένα πολαρογράφημα σαν αυτό που απεικονίζεται στην Εικόνα 1.15. Το γράφημα του Διαγράμματος 6.11^α ονομάζεται ράμπα τάσης. Η διαφορική παλμική πολα-

ρογραφία δίνει ένα γράφημα που ομοιάζει με τη παράγωγο του γραφήματος της κλασσικής πολαρογραφίας (Bard and Faulkner, 1980).



Εικόνα 1.15. α) Γραμμική ράμπα απλής πολαρογραφίας, β) Παλμική ράμπα διαφορικής παλμικής βολταμετρίας, γ) Καμπύλες φαρανταικού και ολικού ρεύματος κατά τη διάρκεια κάθε παλμού.

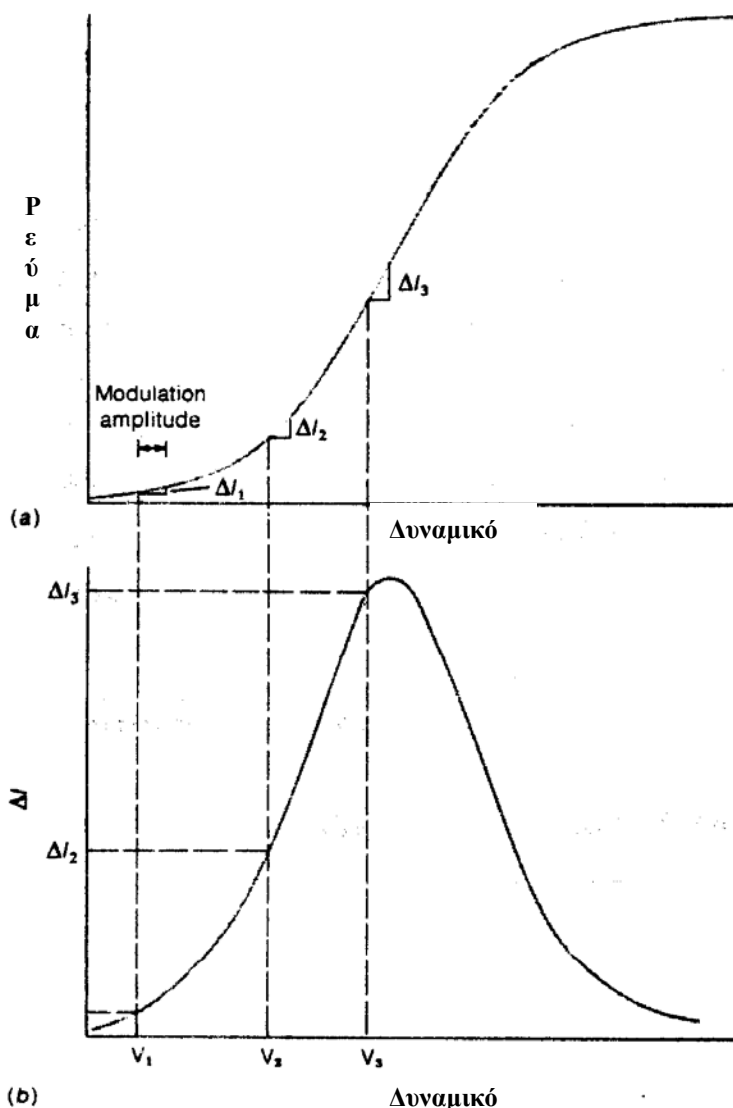
Στη διαφορική παλμική βολταμετρία, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.15.β, μικροί παλμοί τάσης υπερτίθενται στη ράμπα τάσης. Το ύψος τους ονομάζεται ύψος παραμόρφωσης. Κάθε παλμός της τάξης 5-100 mV εμφανίζεται κατά τη διάρκεια των τελευταίων 60 ms της ζωής κάθε σταγόνας Hg. Στη συνέχεια, η σταγόνα απομακρύνεται μηχανικά. Έτσι το ρεύμα δεν μετρείται συνεχώς, αλλά μία φορά πριν από τον παλμό και μία ακόμα στα τελευταία 17 ms του παλμού. Το όργανο αφαιρεί το πρώτο από το δεύτερο σήμα, και παρουσιάζει τη διαφορά ως προς το δυναμικό που εφαρμόζεται (έχει μετρηθεί ακριβώς πριν από τον παλμό του δυναμικού). Τα αποτελέσματα του διαφορικού παλμικού πολαρογραφήματος ομοιάζουν με την παράγωγο του παλμικού πολαρογραφήματος (βλ. Εικόνα 1.16.). Με την αύξηση του πλάτους, αυξάνεται και το ύψος του σήματος, όμως ελαττώνεται η διαχωριστικότητα των γειτονικών κορυφών (Kolthoff and Lingane, 1952).



Εικόνα 1.16. Σύγκριση κλασσικής άμεσης πολαρογραφίας και διαφορικής παλμικής πολαρογραφίας του 1.2×10^{-4} M chloridiazepoxide σε 3 mL 0.05M H_2SO_4 . Ύψος παραμόρφωσης= 50 mV. (Hackman et al. 1974).

Έστω, ότι το ιδανικό πολαρογραφικό κύμα της Εικόνας 1.17. Περιοδικά, η τάση αυξάνει και μετριέται η αύξηση του ρεύματος.

Στο δυναμικό V_1 στην Εικόνα 1.17., η αύξηση του ρεύματος είναι ελάχιστη (ΔI_1). Στο δυναμικό V_2 , η αύξηση ΔI_2 είναι μεγαλύτερη, και στο δυναμικό V_3 , το ΔI_3 , είναι ακόμα μεγαλύτερο. Σχεδιάζοντας το ΔI σε συνάρτηση με το V , η διαφορική πολαρογραφία παράγει ένα σχεδιάγραμμα που είναι πολύ κοντά στην παράγωγο του άμεσου πολαρογραφήματος (Bard and Faulkner, 1980).

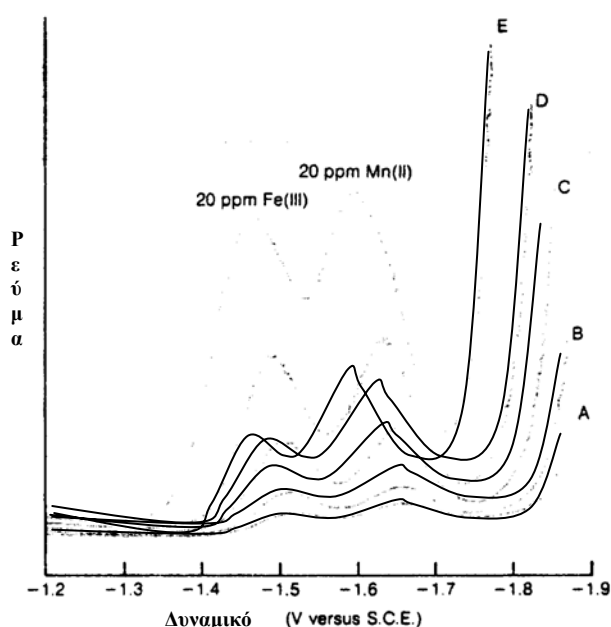


Εικόνα 1.17. Απεικόνιση της αιτίας που το διαφορικό παλμικό πολαρογράφημα (β), είναι πολύ κοντά στο παραγωγισμένο πολαρογράφημα της άμεσης πολαρογραφίας (α) (Jacobsen et al, 1971).

Στην Εικόνα 1.18. φαίνεται η επίδραση της αύξησης του ύψους παραμόρφωσης στην ανάλυση του μείγματος Fe(III) και Mn(II). Όταν το ύψος παραμόρφωσης αυξάνει, αλλά η διαχωριστικότητα των κορυφών (διαφορά των διπλανών κορυφών) μειώνεται, εάν το ύψος παραμόρφωσης αυξάνεται υπερβολικά, η διαφορική πολαρογραφία δε δίνει πλέον το αναμενόμενο παραγωγισμένο σχήμα.

Η αυξημένη ευαισθησία της παλμικής πολαρογραφίας σε σύγκριση με αυτή της άμεσης πολαρογραφίας, οφείλεται κυρίως σε αύξηση του φαρανταϊκού ρεύματος και σε ελάττωση του ρεύματος φόρτισης. Έστω διάλυμα δείγματος, όταν το δυναμικό καθόδου ισούται με 0.2 V. Η επιφανειακή συγκέντρωση της ηλεκτρενεργού ουσίας παραμένει σταθερή στα -0.2 V. Με την ξαφνική εμφάνιση ενός παλμού, η τάση μεταβάλλεται στα -0.25 V. Εάν η τάση μεταβαλλόταν σταδιακά από τα -0.2 V στα -0.25 V, η συγκέντρωση του αναλύτη κοντά στο ηλεκτρόδιο θα μειωνόταν. Αντίθετα, όταν εμφανίζεται ο παλμός, η συγκέντρωση του αναλύτη παραμένει σταθερή στα υψηλότερα επίπεδα στα -0.2 V. Από τη στιγμή εμφάνισης κάθε παλμού, υπάρχει ένα κύμα ηλεκτρενεργών στοιχείων που κατευθύνονται στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Το φαραντα-

ικό ρεύμα αυξάνει ξαφνικά καθώς αντιδρούν οι ενώσεις, και κάθε συγκέντρωση τους πλησιάζει μια καινούρια σταθερή τιμή σε ένα νέο δυναμικό. Καθώς η συγκέντρωση της ηλεκτρενεργού ουσίας μειώνεται, το φαρανταϊκό ρεύμα ελαττώνεται, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.15.γ. Τη στιγμή που εμφανίζονται οι παλμοί, αυξάνεται το ρεύμα φόρτισης ώστε να φορτίσει τη σταγόνα σε ένα νέο δυναμικό ισορροπίας. Καθώς η σταγόνα αρχίζει να φορτίζεται, ελαττώνεται επίσης το ρεύμα φόρτισης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.15.γ. Το ρεύμα φόρτισης ελαττώνεται γρηγορότερα από το φαρανταϊκό. Έως ότου το συνολικό ρεύμα μετρηθεί (~40 ms αφού εμφανιστεί ο παλμός), το ρεύμα φόρτισης έχει ελαττωθεί κοντά στο μηδέν, αλλά το φαρανταϊκό ρεύμα παραμένει σημαντικό. Το ρεύμα φόρτισης μειώνεται εκθετικά με το χρόνο, ενώ το φαρανταϊκό μειώνεται ανάλογα με $F(1, \text{χρόνος})$. Η εκθετική πτώση είναι γρηγορότερη. Η διαφορική παλμική πολαρογραφία δίνει μεγαλύτερη ευαισθησία και καλύτερη ανάλυση από την κλασσική πολαρογραφία (Kolthoff and Lingane, 1952).



Εικόνα 1.18. Αποτέλεσμα της αλλοίωσης του πλάτους στο ύψος μιας κορυφής και της διακριτικότητας σε πολαρογράφημα διαφορικών παλμών. Πλάτος κύματος: A=5 mV, B=10 mV, C=25 mV, D=50 mV, E=100 mV. (Courtesy Princeton Applied Research Corp., Application Note 151).

Καθώς συγκρίνεται με την άμεση πολαρογραφία, η απαρίθμηση των παλμών αυξάνει το φαρανταϊκό ρεύμα και σχεδόν εξαφανίζει το ρεύμα φόρτισης. Και οι δύο παράγοντες επηρεάζουν την ευαισθησία της τεχνικής. Άλλος λόγος για την αυξημένη ευαισθησία είναι ότι το ρεύμα μετρείται μόνο κατά τη διάρκεια των τελευταίων 17 ms της ζωής της σταγόνας, έτσι μεγάλη επιφάνεια της σταγόνας προσφέρεται για τη μεταφορά ηλεκτρονίων. Η διαφορική παλμική πολαρογραφία παρέχει επίσης καλύτερη ανάλυση γειτονικών σημάτων επειδή είναι πιο εύκολο να διαχωριστούν τα με παραγωγή τα μέγιστα από ότι σε ένα άμεσο πολαρογραφικό κύμα (Bard and Faulkner, 1980).

Τα όργανα της κλασσικής άμεσης πολαρογραφίας έχουν αντικατασταθεί από πιο περίπλοκο εξοπλισμό όπως αυτό της Εικόνας 1.19. Το στοιχείο και το ηλεκτρόδιο περιέχονται στην αριστερή μονάδα. Αυτή η συσκευή χρησιμοποιεί ένα ηλεκτρικά ε-

λεγχόμενο μηχανισμό για να σταματήσει μια στατική σταγόνα Hg στη βάση του ηλεκτροδίου. Αφού καταγραφεί το ρεύμα και το δυναμικό, η σταγόνα απομακρύνεται μηχανικά και δημιουργείται μια καινούρια φρέσκια σταγόνα. Καταγράφεται ένα καινούριο ρεύμα καθώς και καινούριο δυναμικό για τη νέα σταγόνα. Επειδή το μέγεθος της σταγόνας του Hg δεν αλλάζει κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, δεν παρατηρούνται ανωμαλίες στο πολαρογράφημα. Επιπλέον, το ρεύμα φόρτισης υποβαθμίζεται στο μηδέν (Εικόνα 1.15.γ) μετά από ένα μικρό χρονικό διάστημα αναμονής και η αναλογία σήματος-θορύβου αυξάνει (Kolthoff and Lingane, 1952).



Εικόνα 1.19. Οργανολογία παλμικής πολαρογραφίας α) Η μονάδα περιλαμβάνει το σύστημα ηλεκτρονικού υπολογιστή και το πολαρογραφικό στοιχείο, β) ο αναλύτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κλασσική ή παλμική πολαρογραφία, γ) τα αποτελέσματα καταγράφονται σε καταγραφέα χ-ψ.

1.9. Μελετούμενα Εντομοκτόνα

1.9.1. Νεονικοτινοειδή

1.9.1.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες νεονικοτινοειδών

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες μιας ουσίας σχετίζονται με τη δομή της. Η συμπεριφορά μιας ουσίας δεν είναι δυνατό να προβλεφθεί μόνο από τη δομή της και από τις φυσικοχημικές της ιδιότητες. (Stupp and Fahl, 2003).

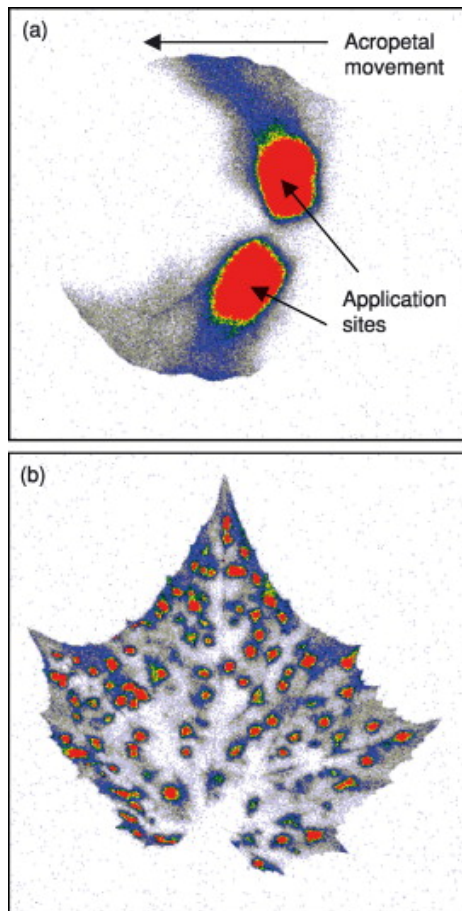
Imidacloprid

Εξαιτίας ιδιαίτερων τμημάτων όπως το κατάλοιπο CPM και το σύστημα των 5 δακτυλίων του 2-(N-νιτοροϊμινο-)ιμιδαζολιδινίου, το imidacloprid έχει πολύ ασθενείς βασικές ιδιότητες σε περιβαλλοντικές συνθήκες. Η διαλυτότητά του στο νερό καθώς και ο χαμηλός συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού δεν επηρεάζονται από pH που κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 4-9, σε θερμοκρασία 20 °C (Krohn and Hellpointer, 2002) (Table 3). Ο χαμηλός συντελεστής κατανομής του imidacloprid δείχνει ότι δεν είναι δυνατό να συσσωρευτεί σε βιολογικούς ιστούς και να περάσει στη συνέχεια στην τροφική αλυσίδα. Η παρουσία του imidacloprid στον αέρα προσδιορίζεται από τη χαμηλή του τάση ατμών, 4×10^{-10} Pa με αποτέλεσμα να μην είναι πτητικό σε επιφάνειες που έχουν υποστεί κατεργασία με αυτό. Σε πειράματα που έγιναν σε λάχανο (Elbert *et al.*, 1991) καθώς και σε ρύζι και σε αγγούρι (Ishii *et al.*, 1994) παρατηρήθηκε ότι το imidacloprid έχει την ιδιότητα να προσροφάται και να μετακινείται γρήγορα από την πάνω επιφάνεια του φύλλου προς την κάτω. Όμως παρουσιάζει και μια αξιοσημείωτη ακροπέταλη κίνηση στο ξύλο των φυτών. Σε αντίθεση, αυτοραδιογραφία φύλλων βαμβακιού έδειξε ποιοτικά μειωμένη διείσδυση και μετατόπιση του (Buchholz and Nauen, 2001). Η κίνηση στο ξύλο καθιστά το imidacloprid ιδιαίτερα χρήσιμο για το χειρισμό σπόρων και εφαρμογές στο έδαφος, αλλά είναι εξίσου αποτελεσματικό και για εφαρμογές στο φύλλωμα (Elbert *et al.*, 1991).

Όπως φάνηκε σε διάφορες μελέτες, επειδή δεν έχει όξινα υδρογόνα, η pK_a του imidacloprid είναι >14 , και η μεταφορά του μέσα στον ηθμό είναι απίθανη (Stein-Dönecke 1992 and Tröltgsch 1994). Οι συστημικές ιδιότητες του έχουν εξετασθεί με τη χρήση του imidacloprid σημασμένου με ^{14}C . Η μετατόπισή του σε χειμερινό σιτάρι, καθώς και η πρόσληψη και μετατόπιση του κατά τη διάρκεια ανάπτυξης επικαλυμμένων σπόρων βαμβακιού σε φυτό περιγράφηκε από τους Elbert *et al.* (1998). Εγγεγραμμένοι τρόποι χρήσης του imidacloprid στη γεωργία περιλαμβάνουν την παραδοσιακή εφαρμογή με ψεκασμό του φυλλώματος και του εδάφους, με το σύστημα άρδευσης, με ενέσεις κορμών δέντρων, με επικάλυψη σπόρων καθώς και με κοκκώδεις μορφές. Το imidacloprid χρησιμοποιείται τόσο στα νεαρά όσο και σε μεγαλύτερης ηλικίας φυτά εξαιτίας των συστημικών του ιδιοτήτων (Elbert 1991 and Elbert 1998).

Thiacloprid

Είναι σταθερό στην υδρόλυση ακόμα και σε συνθήκες δυνατής βροχόπτωσης. Από τη στιγμή που θα εφαρμοσθεί στο φύλλωμα, το thiacloprid παρουσιάζει καλή αντοχή στην έκπλυση από τη βροχή και φωτοσταθερότητα, και παραμένει μέσα ή πάνω στα φύλλα για αρκετό χρονικό διάστημα, επιτρέποντας μία συνεχή διείσδυση της δραστικής ουσίας μέσα στο φύλλο. Ο χρόνος ημιζωής του στο νερό σε pH 5, 7, και 9 είναι περισσότερος από 500 h. Η φωτόλυση στο νερό (σει pH 7) εμφανίζει χρόνο ημιζωής >100 ημέρες. Σε εδαφικές επιφάνειες το thiacloprid είναι σταθερό και κάτω από ηλιακό φως (Jeschke *et al.*, 2001). Η διείσδυση και μετατόπιση του thiacloprid σε λάχανο ήταν συγκρίσιμη με αυτή που παρουσίασε και το imidacloprid (Buchholz and Nauen, 2002). Η ποσότητες του imidacloprid που απομονώθηκαν από τα σημεία εφαρμογής του στο λάχανο ήταν 23% and 17% 1 ημέρα και 7 ημέρες μετά το χειρισμό, αντίστοιχα. Τα επίπεδα σε πραγματικό φύλλο αυξήθηκαν από το 63% στο 77% όπως μετρήθηκαν κατά την 1^η και 7^η ημέρα μετά την εφαρμογή, αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το thiacloprid προσλαμβάνεται άμεσα από τα φύλλα του λάχανου, παρουσιάζοντας καλό συστημικό έλεγχο σε μυζητικά έντομα φύλλων. Η οπτικοποίηση του τρόπου μετατόπισης των αναλόγων του σημασμένου με [^{14}C] thiacloprid μέσω απεικονιστικής τεχνολογίας αποκάλυψε κινητικότητα του ξύλου, για παράδειγμα, μετατόπιση της δραστικής ουσίας με κατεύθυνση προς τα πάνω, ακόμα και μια μέρα μετά την εφαρμογή σε φύλλα λάχανου (Εικόνα 1.20.a). Η κινητικότητα του ξύλου επισημαίνεται στην εικόνα Εικόνα 1.20.β, δείχνοντας άριστη κατανομή του thiacloprid σε φύλλα αγγουριού μετά από εφαρμογή του με ψεκασμό.



Εικόνα 1.20. (α) Μετατόπιση του σημασμένου με [¹⁴C] thiacloprid σε φυτά λάχανου 1 μέρα μετά την εφαρμογή 2 × 5 μl σταγόνων στο πρώτο πραγματικό φύλλο. Η ραδιοενεργότητα στην επιφάνεια της εφυμενίδας (κατάλοιπο) απομακρύνθηκε μέσω της μεθόδου απογύμνωσης οξικής κυτταρίνης, (β) σχέδιο μετατόπισης του thiacloprid μετά από ψεκάσμο σε φύλλο αγγουριού (Buchholz and Nauen, 2002).

Thiamethoxam

Είναι μια κρυσταλλική, άοσμη ουσία με σημείο τήξης τους 139.1 °C. Αυτό το νεονικοτινοειδές έχει σχετικά χαμηλή διαλυτότητα στο νερό 4.1 g l⁻¹ στους 25 °C και χαμηλό συντελεστή κατανομής (log P_{OW} = -0.13 at pH 6.8). Σε εύρος pH από 2 έως 12 δεν παρατηρείται αποσύνθεση (Maienfisch *et al.*, 2001a). Αυτές οι ιδιότητες ευνοούν τη γρήγορη και αποτελεσματική πρόσληψη από τα φυτά και τη μεταφορά μέσω του ξύλου (Widmer *et al.*, 1999) (Table 3). Μέσω αυτής της συστημικής δραστηριότητας όλα τα φυτικά μέρη που βρίσκονται ακροπέταλα μπορούν να προστατευθούν κατά την εφαρμογή του (Maienfisch 1999a and Maienfisch 2001a). Το thiamethoxam σε pH 5 είναι πολύ σταθερό υδρολυτικά με χρόνο ημιζωής σε θερμοκρασία δωματίου μεγαλύτερο από 1 χρόνο (έχει εκτιμηθεί σε 200-300 ημέρες) (Maienfisch *et al.*, 2001a). Αυτό το νεονικοτινοειδές είναι πιο ευμετάβλητο σε pH 9, όπου ο χρόνος ημιζωής είναι μερικές ημέρες. Παρουσιάζει γρήγορη φωτολυτική αποδόμηση με χρόνο ημιζωής περίπου 1 ώρα ως σταγόνα τοποθετημένη σε Teflon. Καμία αποσύνθεση δεν παρατηρήθηκε μετά από αποθήκευση της δραστικής ουσίας ή του εμπορικού σκευάσματος στους 54 °C για 2 μήνες, παρόλα αυτά όμως σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 150 °C, γίνεται εξωθερμική αποσύνθεση (Maienfisch *et al.*, 1999a). Σε εργαστηριακά εδάφη, το thiamethoxam αποδομείται με μέτριους προς χαμηλούς ρυθμούς. Σε συνθήκες αγρού η αποδόμηση γενικά είναι γρηγορότερη εξαιτίας κυρίως δύο πολύ σημαντικών αποδημητικών μονοπατιών, του μεγάλου μικροβιακού φορτίου και της έκθεσης στο φως (Maienfisch *et al.*, 1999a).

Nitenpyram

Εμφανίζει υψηλή διαλυτότητα στο νερό (840 g l⁻¹), και έχει μια καλή συστημική δράση (Kashiwada, 1996) και κανένα χαρακτηριστικό που να υποδηλώνει φυτοτοξικότητα, συνεπώς υπάρχει η δυνατότητα χρήσης ποικίλων τρόπων εφαρμογής του (Akayama and Minamida, 1999). Ο συντελεστής κατανομής του είναι χαμηλός (log P_{OW} = -0.64) (Πίνακας 1.5).

Acetamiprid

Είναι σταθερό σε διαλύματα με pH 4, 5, και 7 και κάτω από φως. Αποδομείται αργά σε pH 9 στους 45 °C. Η υδρόλυση του acetamiprid σε διαλύματα 0.5–1 N υδροξειδίου του νατρίου στους 90–95 °C για 2 h έδωσε ποσοτικά το προϊόν *N*-μεθυλο-(6-χλωρο-πυριδ-3-υλ)-μεθυλαμίνη (Tokieda *et al.*, 1997). Επειδή είναι πολύ υδατοδιαλυτό (Πίνακας 1.5.), το acetamiprid είναι πολύ αποτελεσματικό κατά των εντόμων εξαιτίας της ιδιότητας του να διακινείται από τη μία επιφάνεια του φύλλου στην άλλη (Yamada *et al.*, 1999) και χρησιμοποιείται επί το πλείστον στο φύλλωμα.

Clothianidin

Δεν έχει όξινες ή βασικές ιδιότητες στο σχετικό pH (Stupp and Fahl, 2003). Έτσι το pH του υδατικού συστήματος δεν έχει επίδραση στις φυσικοχημικές του ιδιότητες. Είναι σταθερό στην υδρόλυση σε ένα εύρος pH από 4 έως 9, αλλά η φωτόλυση συμβάλλει σημαντικά στην αποδόμηση του στο περιβάλλον οδηγώντας σε αυξημένο ρυθμό μετατροπής σε ανόργανες ουσίες. Η διαλυτότητα του clothianidin στο νερό είναι σχετικά χαμηλή (0.327 g l⁻¹ στους 20 °C) σε σύγκριση με των άλλων νεονικοτινοειδών τα οποία φέρουν ομάδα νιτρογουανιδυλίου. Αυτό αντικατοπτρίζεται επίσης από το συντελεστή κατανομής νερού-οκτανόλης, ο οποίος δείχνει μεγαλύτερη απορρόφηση από το έδαφος (log P_{OW} = 0.7 at 25 °C). Με βάση αυτές τις φυσικοχημικές ιδιότητες δεν αναμένεται βιοσυσσωρευση ή πτητικότητα και έτσι στην ατμόσφαιρα δεν ανιχνεύονται σημαντικές ποσότητες της ουσίας (Stupp and Fahl, 2003).

1.9.1.2. Τρόπος Δράσης

Ο βιοχημικός τρόπος δράσης των νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων έχει μελετηθεί και χαρακτηριστεί εκτενώς τα τελευταία 10 χρόνια. Δρουν εκλεκτικά σε nAChRs εντόμων, μια οικογένεια προσδετο-ελεγχόμενων ιοντικών καναλιών που βρίσκονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων και είναι υπεύθυνα για τη γρήγορη νευροδιείγξη. Ο nAChR είναι ένα πενταμερές διαμεμβρανικό σύμπλοκο, και κάθε υπομονάδα αποτελείται από μία εξωκυτταρική περιοχή που περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης του δεσμευτή και τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές (Nauen 2001 and Tomizawa 2003). Τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα προσδένονται στην περιοχή πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης που βρίσκεται στην υδρόφιλη εξωκυτταρική περιοχή των α-υπομονάδων. Η ικανότητα τους να εκτοπίζουν το πρωτονωμένο imidacloprid από την περιοχή πρόσδεσης του συσχετίζεται με την εντομοκτόνα αποτελεσματικότητά τους (Liu 1993a and Liu 1993b). Το [³H]imidacloprid προσδένεται με νανομοριακή συγγένεια σε nAChRs απομονωμένους από ιστούς εντόμων και μαζί με την α-μπουγκαροτοξίνη είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ουσία για μελέτες ραδιενεργά σημασμένων δεσμευτών (Lind 1998 and Nauen 2001). Επιπλέον, ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες αποκάλυψαν ότι τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα δρουν αγωνιστικά σε nAChRs και αυτή η αλληλεπίδραση είναι για άλλη μια φορά συσχετισμένη με την πιθανότητα να ελέγχουν στοχευόμενα είδη εντόμων. Σε αντίθεση, ανταγωνιστικές ουσίες των nAChRs θηλαστικών φαίνεται ότι είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματικές ως εντομοκτόνα (Nauen *et al.*, 1999a). Όλα τα νεονικοτινοειδή δρουν με νανομοριακή συγγένεια εναντίον των nAChRs μύγας και άλλων εντόμων, εκτός από το thiamethoxam, που παρουσιάζει μια σχετικά χαμηλή συγγένεια για την περιο-

χή πρόσδεσης του [³H]imidacloprid. Αυτές οι χαμηλές συγγένειες αποδίδονται στη προνεονικοτινοειδή φύση του, αφού αποδείχθηκε ότι ενεργοποιείται σε clothianidin στα έντομα και στα φυτά (Nauen et al., 2003).

Ο τρόπος δράσης των νεονικοτινοειδών έχει περιγραφεί σε πολλά άρθρα όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές για περαιτέρω πληροφορίες (Kagabu 1997a, Matsuda 2001, Nauen 2001 and Tomizawa 2003). Αυτά τα άρθρα περιγράφουν την πιθανή δομή και λειτουργία των nAChRs των εντόμων, οι οποίοι έχουν χαρακτηριστεί από μελέτες πρόσδεσης του υποδοχέα, φυλλογενετική ανάλυση που αφορά στις ομοιότητες των υποδοχέων μεταξύ ορθολόγων από διαφορετικά είδη ζώων και ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες, καθώς και την περιγραφή ενός τεράστιου εύρους δεσμευτών διαφορετικής δομής, με έμφαση στα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα.

1.9.1.3. Αλληλεπιδράσεις των Νεονικοτινοειδών με το Νικοτινικό Υποδοχέα της Ακετυλοχολίνης

1.9.1.3.1. Εκλεκτικότητα για τους nAChRs των Εντόμων σε Σχέση με τους nAChRs των Σπονδυλωτών

Οι ηλεκτροφυσιολογικές μετρήσεις που αναφέρονται σε πολλές μελέτες αποκάλυψαν ότι οι nAChRs εκφράζονται ευρέως στο νευρικό σύστημα των εντόμων τόσο σε μετασυναπτικές όσο και σε προσυναπτικές νευρικές απολήξεις, σε κύτταρα αισθητικών νευρώνων, ενδιάμεσων νευρώνων και κινητικών νευρώνων (Goodman 1980, Harrow 1983, Sattelle 1983, Breer 1988 and Restifo 1990). Οι Schröder and Flattum (1984) ήταν οι πρώτοι που προσδιόρισαν το σημείο δράσης του νιτρομεθυλενο νιθιαζινίου στη χολινεργική σύναψη χρησιμοποιώντας εξωκυτταρικές ηλεκτροφυσιολογικές μετρήσεις. Μία σειρά επαναλαμβανόμενων ηλεκτροφυσιολογικών και βιοχημικών μελετών πρόσδεσης αποκάλυψε ότι ο κύριος στόχος των νεονικοτινοειδών είναι οι nAChRs (Benson 1989, Sattelle 1989, Bai 1991, Leech 1991, Cheung 1992, Tomizawa 1992, Tomizawa 1993, Zwart 1992, Liu 1993a and Tomizawa 1996). Πρόσφατες ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι το imidacloprid δρα ως αγωνιστής σε δύο ξεχωριστούς υποτύπους nAChRs σε κινητικούς νευρώνες κατσαρίδας (DUM) (Buckingham *et al.*, 1997), ένα nAChR ευαίσθητο στην αμπουγκαροτοξίνη με συνδυασμένη φαρμακολογία νικοτινικού /μουςκαρινικού υποδοχέα και ένα nAChR που δεν είναι ευαίσθητος στην α-μπουγκαροτοξίνη. Τέτοιες ηλεκτροφυσιολογικές παρατηρήσεις υποστηρίχθηκαν από μελέτες πρόσδεσης με το [³H]imidacloprid σε υποδοχείς από τη *M. persicae*. Αυτές οι μελέτες ανταγωνισμού των δεσμευτών αποκάλυψαν την παρουσία σημείων χαμηλής και υψηλής συγγένειας του imidacloprid στον nAChR της *M. Persicae* (Lind *et al.*, 1998).

Η επιβεβαίωση των πολλαπλών πιθανών υπομονάδων των nAChR που έγινε με τη μέθοδο της μοριακής κλωνοποίησης έδειξε μια ποικιλομορφία στους nAChRs των εντόμων (Gundelfinger, 1992). Προς το παρόν έχουν κλωνοποιηθεί τουλάχιστον πέντε διαφορετικές υπομονάδες από τη *Drosophila melanogaster* (Schulz *et al.*, 1998), από την ακρίδα *Locusta migratoria* (Hermsen *et al.*, 1998), και από την αφίδα *M. persicae* (Huang *et al.*, 1999). Παρά τον αξιόλογο αριθμό υπομονάδων που έχουν ταυτοποιηθεί, μόνο ένας μικρός αριθμός λειτουργικών υποδοχέων εκφράστηκε από διαφορετικούς συνδυασμούς υπομονάδων σε ωκύτταρα του *Xenopus* ή κυτταρικές σειρές. Η αρχική μελέτη έδειξε ότι ορισμένες υπομονάδες μπορούν να σχηματίσουν ομοολιγομερικά λειτουργικούς υποδοχείς όταν εκφράζονται σε ωκύτταρα του *Xenopus*. Αυτό αποδείχθηκε για την La1 από την ακρίδα *Schistocerca gregaria* (Marshall 1990 and Amar 1995), και για τις Mpa1 and Mpa2 from *M. persicae* (Sgard *et al.*, 1998). Παρόλα αυτά η έκφραση αυτών των υπομονάδων δεν ήταν πολύ αποτε-

λεσματική και παρήγαγε μόνο μικρής έντασης εσωτερικό ρεύμα (5–50 nA) μετά από εφαρμογή νικοτίνης ή ακετυλοχολίνης. Εναλλακτικά, και οι 3 α υπομονάδες από τη *Drosophila* (ALS, SAD, and Da2) μπορούν να σχηματίσουν λειτουργικούς υποδοχείς σε ωοκύτταρα *Xenopus* μαζί με τη β2 υπομονάδα από νευρώνες κοτόπουλου (Bertrand, 1994) (Matsuda, 1998) (Schulz, 1998), υποδηλώνοντας ότι υπάρχουν και άλλες υπομονάδες από nAChRs εντόμων που μπορούν να κλωνοποιηθούν. Μελέτες πρόσδεσης ραδιενεργά σημασμένων δεσμευτών με τη χρήση διαφόρων α υπομονάδων από *M. persicae* που εκφράστηκαν μαζί με τη β2 υπομονάδα από ποντίκι σε κυτταρική σειρά S2 από *Drosophila* επίσης δείχνουν φαρμακολογική ποικιλομορφία στη *M. persicae* (Huang *et al.*, 1999). Σε αυτές τις μελέτες πρόσδεσης φάνηκε ότι εκλεκτικοί στόχοι του imidacloprid σχηματίστηκαν από τις υπομονάδες Mρα2 και Mρα3, αλλά όχι από την Mρα1. Αυτά τα παραδείγματα δείχνουν ότι προς το παρόν υπάρχει περιορισμένη κατανόηση της πολυπλοκότητας των nAChRs και ότι η ηλεκτροφυσιολογία θα παίξει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της σημασίας συγκεκριμένων συνδυασμών υπομονάδων στον τρόπο δράσης των νεονικοτινοειδών και άλλων εντομοκτόνων δεσμευτών.

1.9.1.4. Φαρμακοκινητική και Μεταβολισμός

Τα νεονικοτινοειδή έχουν μέτριες και διαφορετικές διαλυτότητες στο νερό. Δεν ιονίζονται και δεν υδρολύονται σε φυσιολογικές τιμές pH (Πίνακας 1.5.). Οι ουσίες δεν είναι βιοαποικοδομήσιμες συνεπώς δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση στα θηλαστικά ή στα τρόφιμα μέσω της τροφικής αλυσίδας (Roberts and Hutson, 1999). Ο μεταβολισμός των νεονικοτινοειδών περιλαμβάνει αντιδράσεις αποτοξίνωσης που εμφανίζονται σε τρία μονοπάτια (Tomizawa and Casida, 2003): (1) τη βραχεία περίοδο δηλητηρίασης σε υποθανατηφόρες δόσεις σε έντομα και θηλαστικά, (2) τις συνεργιστικές επιδράσεις των αποτοξινωτικών παρεμποδιστών της στην εντομοκτόνο δράση, και (3) τη δραστηριότητα των μεταβολιτών που σχετίζονται με τις μητρικές ενώσεις στους nAChRs. Η φαρμακοκινητική των νεονικοτινοειδών και του imidacloprid έχει μελετηθεί στο *S. littoralis*, και τα προφίλ που ανακαλύφθηκαν βρισκόταν σε αρμονία με τον υψηλό μεταβολισμό και έναν σημαντικό ρόλο σε ιστούς που δεν ήταν στόχοι (Greenwood *et al.*, 2002).

Πίνακας 1.5. Φυσικοχημικές Ιδιότητες εμπορικών Νεονικοτινοειδών

Φυσικές και χημικές ιδιότητες	Συστήματα Δακτυλίου			Μη Κυκλικές Δομές			
	Imidacloprid	Thiacloprid	Thiamethoxam	Nitenpyram	Acetamiprid	Clothianidin	(±)Dinotefuran
Χρόμα και Φυσική Κατάσταση	Άχρωμοι Κρύσταλλοι	Κίτρινη Κρυσταλλική Σκόνη	Ελαφρώς Κρεμώδης/Κρυσταλλική Σκόνη	Άχνοκίτρινοι Κρύσταλλοι	Άχρωμοι Κρύσταλλοι	Καθαρή/Άχρωμη Σκόνη	
Σημείο Τήξης (°C)	144	136	139.1	83084	98.9	176.8	94.5-101.5
Σταθερά του Νόμου Henry (Ραxη ³ mol ⁻¹) (στους 20 °C)	2x10 ⁻¹⁰				<5.3x10 ⁻⁸ (calc)	2.9x10 ⁻¹¹	
Πυκνότητα (gmL ⁻¹) (στους 20°C)	1.54	1.46		1.40 (στους 26 °C)	1.330	1.61	1.33
Τάση Ατμών (Pa)							
(στους 25 °C)			6.6x10 ⁻⁹		<1x10 ⁻⁶	1.3x10 ⁻¹⁰	
(στους 20 °C)	4x10 ⁻¹⁰			1.1x10 ⁻⁹		3.8x10 ⁻¹¹	
Διαλυτότητα στο Νερό (g L ⁻¹) (στους 20 °C)	0.61	0.185	4.1 (στους 25 °C)	840 (pH 7.0)	4.20 (στους 25 °C)	0.327	54.3x1.3
Διαλυτότητα σε Οργανικούς Διαλύτες (g L ⁻¹) (στους 25 °C)							
Διγλωρομεθάνιο	67 (στους 20 °C)	160 (στους 20 °C)	43.0	μ.π.		1.32	
N-εξάνιο	<0.1	μ.π.	0.00018				
N-επτάνιο	μ.π.	<0.1 (στους 20 °C)	μ.π.	μ.π.		<0.00104	
Μεθανόλη	10 (στους 20 °C)	μ.π.	10.2	670 (στους 20 °C)		6.26	
Αιθανόλη							
Ξυλένιο	μ.π.	0.3(στους 20 °C)	μ.π.	4.5 (στους 20 °C)		0.0128	
Τολουένιο	0.68		0.63				
I-οκτανόλη	μ.π.	1.4 (στους 20 °C)	0.63	μ.π.		0.938	
Ακετόνη	50 (στους 20 °C)	64 (στους 20 °C)	42.5	290 (στους 20 °C)		15.2	
Ακετονιτρίλιο		52 (στους 20 °C)	78.0	430 (στους 20 °C)			
Οξικός Αιθυλεστέρας	μ.π.	9.4 (στους 20 °C)	5.74	33 (στους 20 °C)		2.03	
Συντελεστής Κατανομής Οκτανόλης-Νερού (στους 25 °C)	3.72 (στους 21 °C)						
log Pow	0.57(at 22°C)	1.26 (at 20 °C)		-0.64	0.8	0.7	-0.644
log Pow (pH 4.7) (στους 20 °C)			-0.13(σε pH 6.8)		Όχι σημαντικές μεταβολές σε pH 0.9		
log Pow (pH 9.0) (στους 20 °C)						0.9	
Σταθερά Διάστασης pKa (στους 20 °C)			Δε δίσταται σε pH 2-12	3.1 και 11.5	0.7 (στους 25 °C) Ασθενής βάση	11.09	Δε δίσταται σε pH 1.4 -12.3
Ευφλεκτότητα		Όχι Υψηλή				Όχι Υψηλή	
Επιφανειακή Τάση (mNm ⁻¹) (στους 20 °C)		66				79.6	

μ.π. Μη προσδιορισμένο

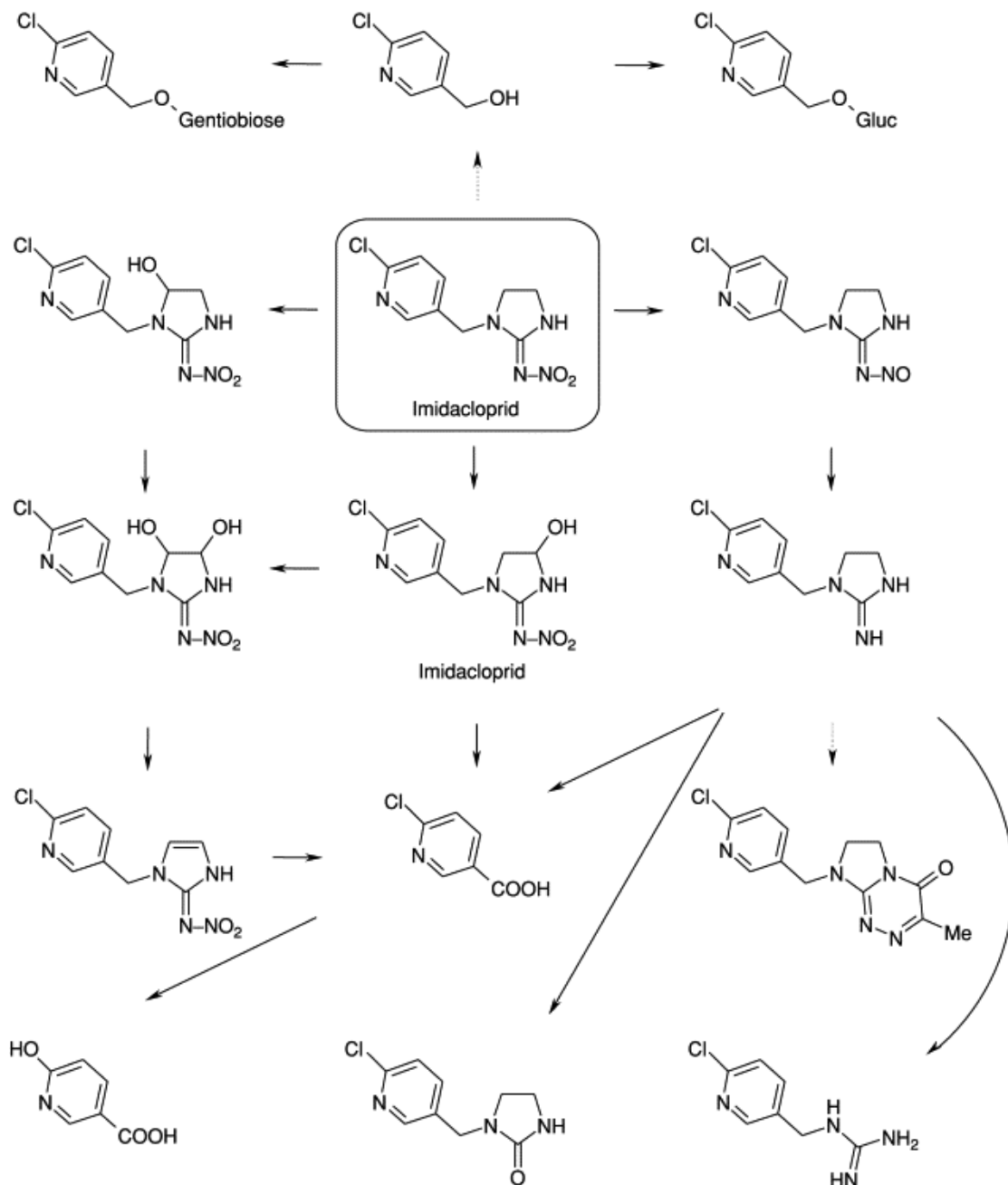
1.9.1.5. Μεταβολικά Μονοπάτια Εμπορικών Νεονικοτινοειδών

Imidacloprid

Ο μεταβολισμός του imidacloprid επηρεάζεται σημαντικά από τη μέθοδο εφαρμογής του (Nauen *et al.*, 1998b). Συγκριτικές μελέτες έδειξαν ότι, ανάλογα με το χρόνο και το φυτικό είδος, το imidacloprid αποδομείται ολικώς ή μερικώς (Araki *et al.*, 1994). Η πρόσληψη και μετακίνηση του [¹⁴C]imidacloprid μελετήθηκε σε βαμβάκι μετά από εφαρμογή στο φύλλωμα. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι το imidacloprid προσλαμβάνεται γρήγορα όταν έχει αναμιχθεί με το βελτιωτικό Silwet L-77, μετά μετατοπίζεται ακροπέταλα, και στη συνέχεια μεταβολίζεται γρήγορα (Nauen *et al.*, 1999b). Τα πειράματα σε υπενδεδυμένους σπόρους σπόρους αποκάλυψαν ότι μόνο το 5% του εφαρμοσμένου imidacloprid προσλήφθηκε από το νεαρό φυτό, και ότι 27 ημέρες μετά τη φύτευση, σχεδόν το 95% της μητρικής ουσίας είχε μεταβολισθεί (Tröltzsch *et al.*, 1994).

Από τα αποτελέσματα μελετών του μεταβολισμού στο έδαφος βρέθηκε ότι το imidacloprid είναι υποβαθμίζεται ολικώς. Σε εργαστηριακές συνθήκες, η αεροβική αποδόμηση του imidacloprid εμφανίζει χρόνο ημιζωής (DT₅₀) 156 ημέρες. Η *ab initio* ένωση αποδομείται σε διοξείδιο του άνθρακα και τυχόν υπολείμματα προσδένονται στο υπόστρωμα του εδάφους (Krohn and Hellpointer, 2002). Σημασμένο ραδιενεργά imidacloprid δείχνει ότι δεν προκύπτουν άλλα προϊόντα αποδόμησης με ραδιοενεργότητα >10%. Συνθήκες φωτός και αεροβικές συνθήκες επιταχύνουν την αποδόμηση του imidacloprid. Τα αποδομητικά μονοπάτια δείχνουν ότι στο έδαφος υπάρχει το ίδιο το νεονικοτινοειδές και όχι τα προϊόντα αποδόμησης της μητρικής ένωσης (Krohn and Hellpointer, 2002). Το imidacloprid δεν είναι σταθερό σε υδατικό περιβάλλον, και σε ένα τέτοιο περιβάλλον το φως επιταχύνει περισσότερο την αποδόμηση.

Ο μεταβολισμός του imidacloprid έχει μελετηθεί σε τομάτες, πατάτες και καλαμπόκι (Roberts and Hutson, 1999) (Εικόνα 1.21.). Σε πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν τομάτες, εφαρμόστηκε στους καρπούς το [¹⁴C-pyridinyl]imidacloprid. Οι κύριοι μεταβολίτες ήταν το *N*-desnitro-imidacloprid τα παράγωγα του 4- and 5-hydroxy. Ταυτοποιήθηκαν μικρές ποσότητες της *N*-nitroso κυκλικής ουρίας. Ένα παρόμοιο μοτίβο μεταβολιτών περιγράφηκε και για τα αμπέλια μαζί με ένα ίχνος της δικυκλικής τριαζόνης. Στους κονδύλους ανιχνεύθηκαν ίχνη του μητρικού imidacloprid και του 6-χλωρο-νικοτινικού οξέος (6-CNA). Ο Koester (1992) έκανε μια συγκριτική μελέτη του μεταβολισμού του imidacloprid σε καλλιέργειες κυττάρων σε εναιώρημα διαφορετικών φυτικών ειδών όπως η σόγια και το βαμβάκι, και βρήκε ότι το αρχικό μονοπάτι αποδόμησης προέκυψε κυρίως από τη μονουδροξυλίωση του δακτυλίου του ιμιδαζολιδίου και αφυδάτωση της ολεφίνης. Σχηματίστηκαν μικρές ποσότητες 6-CNA και 6-χλωρο-πικολυλ-αλκοόλης (6-CPA) και γλουκοπυρανοσιδίου. Αυτά οι ταυτοποιημένοι μεταβολίτες βρίσκονταν σε συμφωνία με αυτούς που βρέθηκαν σε ολόκληρα τα φυτά.



Εικόνα 1.21. Προτεινόμενο μονοπάτι του μεταβολισμού του imidacloprid στα φυτά (Αναπαραγωγή με την άδεια των Roberts, T.R., Hutson, D.H. (Eds.), 1999. *Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 2, Insecticides and Fungicides*. Cambridge University Press, Cambridge.)

Thiacloprid

Το μεταβολικό μονοπάτι του συστηματικού thiacloprid, σε ποσοτικούς και ποιοτικούς όρους είναι παρόμοιο σε όλες τις καλλιέργειες (καρποφόρες, βαμβάκι) που ερευνήθηκαν (Klein, 2001). Η μητρική ένωση σημασμένη με [μεθυλενο-¹⁴C] είναι πάντα το κύριο στοιχείο. Η παρουσία υψηλών ποσοτήτων 6-CNA σε σπόρους βαμβακιού οφείλεται στη συσσώρευση αυτού του οξέος, μετά από τη έκκριση του από το απόπλασμα στο φλοιώμα που είναι διαμέρισμα παγίδα για τα ασθενή οξέα (Klein, 2001). Προήλθε από το μεταβολισμό των φύλλων, όπου επίσης έχει ανιχνευθεί (Klein, 2001). Όλοι οι κύριοι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν στα φυτά, ανιχνεύθηκαν επίσης σε μελέτη του μεταβολισμού του αρουραίου και εκτρεφόμενων ζώων. Με τη χρήση δύο διαφορετικών σημειωμένων σημείων ([μεθυλενο-¹⁴C] and [θιαζολιδινο-¹⁴C]), εκτός της μητρικής ένωσης ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν άλλοι 25 μεταβολίτες σε περιτώματα αρουραίου. Σε κατσίκες και κότες τα επίπεδα των υπολειμμάτων σε ιστούς και όργανα, καθώς και σε γάλα και αυγά, ήταν χαμηλά ε-

ξαιτίας της γρήγορης απέκκρισης. Δεν υπήρξε βιοσυσώρευση υπολειμμάτων σε κανέναν ιστό. Γενικά, ο μεταβολισμός του thiacloprid εξελίχθηκε μέσω των ακόλουθων μονοπατιών (Klein, 2001):

- Υδροξυλίωση της μητρικής ουσίας στη θέση 4 του 1,3-θιαζολιδινικού δακτυλίου και οξειδωτική διάσπαση στη γέφυρα του μεθυλενίου οδηγώντας σε 6-CPA και 6-CNA και στη συνέχεια σύζευξη αυτών των δύο αγλυκονών με σάκχαρα
- Των αντίστοιχων μεταβολιτών του 1,3-θιαζολιδινικού δακτυλίου που αποτελούνται κυρίως από το ελεύθερο 1,3-θιαζολιδίνιο, το 4-υδροξυλιωμένο 1,3-θιαζολιδίνιο και 4,5 αφυδρο (ολεφινικό) παράγωγα καθώς και τα σύμπλοκα
- Της *N*-νιτριλο ομάδας που υδρολύεται στα αντίστοιχα παράγωγα του *N*-αμιδίου, που στη συνέχεια υδροξυλιώθηκε
- Του συστήματος του 1,3-θιαζολιδινικού δακτυλίου που έσπασε στη θέση 1 και το θείο που οξειδώθηκε ή μεθυλιώθηκε, σχημάτισε το σουλφονικό οξύ ή την ομάδα του *S*-μεθυλοσουφοξυλίου και του *S*-μεθυλο-σουφονυλίου αντίστοιχα.

Thiamethoxam

Σε μελέτες μεταβολισμού το μεγαλύτερο μέρος του thiamethoxam (84–95%) απεκκρίθηκε στα ούρα με μία μικρή ποσότητα (2.5–6%) στα περιττώματα μέσα σε 24 h, κυρίως ως μητρική ουσία που δεν έχει υποστεί μεταβολές. Αυτό παρατηρήθηκε επίσης σε αρουραίους, ποντίκια, μηρυκαστικά και πουλερικά. Η υδρόλυση του συστήματος του περυδρο-1,3,5-οξαδιζινικού δακτυλίου στο thiamethoxam ακολουθείται από *N*-απομεθυλίωση περιγράφεται ως το κύριο μεταβολικό μονοπάτι· δύο άλλες ενώσεις σχηματίζονται από την απώλεια της *N*-νιτρο ομάδας από κάθε μεταβολίτη. Αναγωγή της *N*-νιτρο ομάδας σε υδραζίνη, και η ακόλουθη συμπλοκοποίηση με 2-οξοπροπιονικά ή οξικά οξέα οδηγεί σε διάφορους κυρίως μεταβολίτες. Ο μεταβολισμός του thiamethoxam ερευνήθηκε εκτενώς σε φυτά όπως το καλαμπόκι, το ρύζι, τα αχλάδια και τα αγγούρια. Το ενεργό συστατικό παρουσιάζει συστηματική συμπεριφορά, π.χ. μεταφέρεται μέσω των ριζών σε ολόκληρο το φυτό. Παρατηρήθηκε συσώρευση στα περιγράμματα των φύλλων, σε πολύ χαμηλά επίπεδα υπολειμμάτων. Οι ίδιοι μεταβολίτες βρέθηκαν σε δημητριακά και φρούτα. Μία μελέτη φωτόλυσης σε νερό με ραδιοσημασμένο thiamethoxam έδειξε ότι το νεονικοτινοειδές αποδομείται σημαντικά σε φωτολυτικές συνθήκες (Schwartz *et al.*, 2000).

Nitenpyram

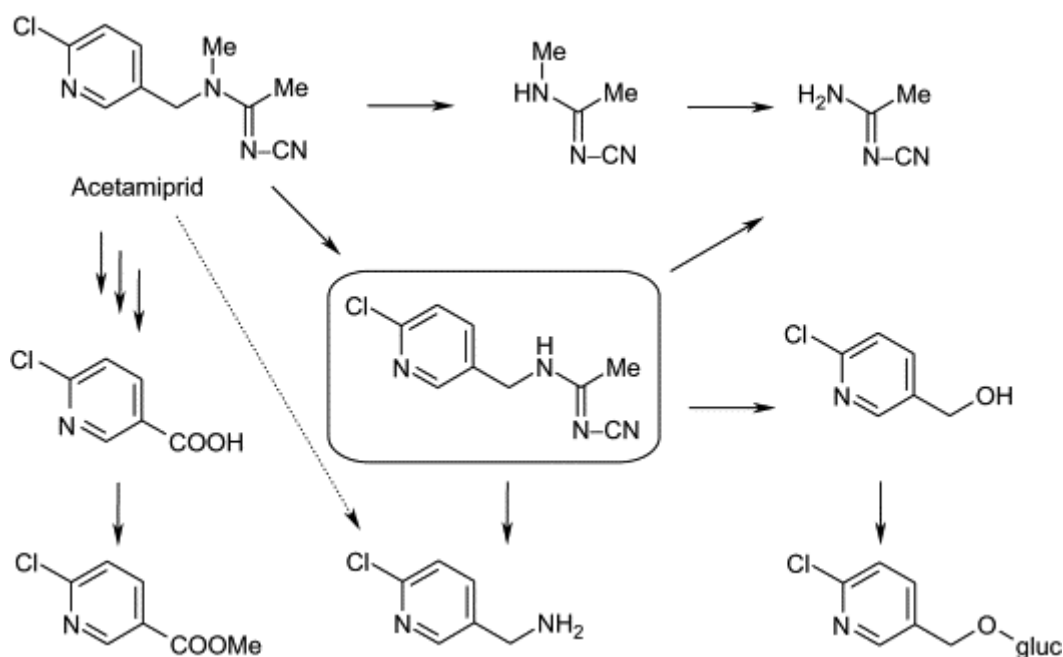
Το πολικό nitenpyram εμφανίζει σχετικά μικρό χρόνο παραμονής στο έδαφος (DT₅₀ 1–15 ημέρες), που πιθανόν αντισταθμίζει την ασθενή του απορρόφηση που θα οδηγούσε σε κινητικότητα του μέσα στα εδάφη. Στα φυτά σχηματίστηκαν οι μεταβολίτες 2-[*N*-(6-χλωρο-3-πυριδιλμεθυλ)-*N*-εθυλ]αμινο-2-μεθυλιμινοξικό οξύ (CPMA) και *N*-(6-χλωρο-3-πυριδιλμεθυλ)-*N*-εθυλ-*N*-μεθυλφορμαμίδίνη (CPMF). Το CPMF σχηματίστηκε πιθανώς από την αποκαρβοξυλίωση της CPMF (Tsumura *et al.*, 1998). Ο μεταβολισμός στα ζώα μελετήθηκε με τη δια του στόματος χορήγηση nitenpyram σημασμένου με ¹⁴C σε αρουραίους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 95-98% που χορηγήθηκε, απεκκρίθηκε με τα ούρα μέσα σε 2 ημέρες και δεν παρατηρήθηκε συσώρευση του ¹⁴C στα εσωτερικά όργανα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η υψηλή διαλυτότητα στο νερό (840 g Γ⁻¹), και ο χαμηλός συντελεστής κατανομής (log P_{ow} = -0.64 at 25 °C) του nitenpyram, μπορεί να συμβάλλουν στη χαμηλή του τοξικότητα στα θηλαστικά (Akayama and Minamida, 1999).

Acetamiprid

Το acetamiprid είναι μία κινητή, πολύ γρήγορα αποδομήσιμη ένωση στα περισσότερα εδάφη. Το κύριο αποδομητικό μονοπάτι είναι ο αερόβιος μεταβολισμός του εδάφους. Το acetamiprid είναι σχετικά σταθερό στην υδρόλυση σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος και φωτοαποδομείται σχετικά αργά στο νερό ενώ αποδομείται γρήγορα στα εδάφη ώστε να σχηματίσει την *N*-(6-χλωρο-πυρι-3-υλ-μεθυλ)-*N*-μεθυλ-αμίνη και το 6-CNA. Οι τιμές DT₅₀ του acetamiprid σε πηλό ή σε ελαφρώς πηλώδη εδάφη κυμαίνονταν μεταξύ 1-2 ημερών. Σε έδαφος αγρού ή σε αυτό που χρησιμοποιείται σε μελέτες εμπορευματοκιβωτίων, το acetamiprid αποδομήθηκε πολύ γρήγορα (χρόνος ημιζωής 12 ημέρες). Το κύριο μονοπάτι ήταν η οξείδωση του νιτριλίου του acetamiprid σε *N*-αμιδινικό παρά-

γαγο, που έσπασε, δίνοντας *N*-(6-χλωρο-πυριδ-3-υλμεθυλ)-*N*-μεθυλ-αμίνη και τελικά το 6-CNA. Ακολουθεί η ανοργανοποίηση σε διοξείδιο του άνθρακα.

Το acetamiprid είναι υπεύθυνο για την πλειονότητα των υπολειμμάτων στις καλλιέργειες ενώ οι μεταβολίτες του υπήρχαν σε αμελητέες ποσότητες. Η κύρια ουσία που βρέθηκε σε μελέτες μεταβολισμού των φυτών ήταν το acetamiprid. Σχηματίστηκαν μικρές ποσότητες του *N*-demethylacetamiprid που έσπασαν και έδωσαν 6-CNA και σε μικρότερο βαθμό οξειδώθηκαν σε 6-CPA. Το τελευταίο είτε σχημάτισε ένα σύμπλοκο με γλυκόζη ή παρουσιάστηκε να σχηματίζει μια *N*-(6-χλωρο-πυριδ-3-υλμεθυλ)-*N*-μεθυλαμίνη ως δευτερεύον μεταβολίτη (Tokieda 1998 and Roberts 1999) (Εικόνα 1.22.). Η μεταβολική πορεία του [2,6-¹⁴C-*pyridine*]acetamiprid ερευνήθηκε σε μελιτζάνες και μήλα μετά από εφαρμογή στο φύλλωμα ή στα φρούτα και σε φυτά λάχανου μετά από εφαρμογή στο φύλλωμα και στο έδαφος. Το acetamiprid μεταβολίστηκε με αργό ρυθμό σε παρεμφερή προϊόντα σε όλα τα φυτά. Το acetamiprid απορροφήθηκε από το φύλλωμα το οποίο διαπέρασε αλλά μετακινήθηκε σε μικρό βαθμό (Roberts and Hutson, 1999).



Εικόνα 1.22. Προτεινόμενο μονοπάτι του μεταβολισμού του acetamiprid στα φυτά. (Αναπαραγωγή με την άδεια των Roberts, T.R., Hutson, D.H. (Eds.), 1999. Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 2, Insecticides and Fungicides. Cambridge University Press, Cambridge.)

Clothianidin

Μελέτες του μεταβολικού μονοπατιού του clothianidin σε καλαμπόκι και σακχαρότευτλα δείχνουν μία ξεκάθαρη εικόνα (Klein, 2003). Η ένωση αυτή είναι πάντα το κύριο στοιχείο των υπολειμμάτων στα εδάδια μέρη των φυτών. Πέντε μεταβολίτες έχουν αναγνωριστεί αλλά οι περισσότεροι από αυτούς δεν ξεπερνούν το 10% του συνόλου των ραδιενεργών υπολειμμάτων. Επιπρόσθετα, όλοι οι κύριοι μεταβολίτες που αναγνωρίστηκαν στα φυτά ανιχνεύθηκαν επίσης και σε μελέτες μεταβολισμού του αρουραίου (Klein 2003 and Yokota 2003). Γενικά, οι ακόλουθες αντιδράσεις εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι του clothianidin στο καλαμπόκι και στα σακχαρότευτλα μετά από εφαρμογή του σε σπόρους:

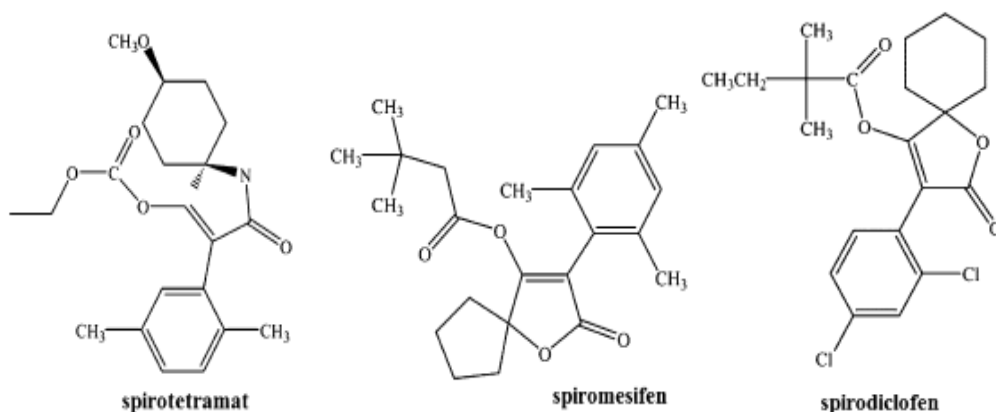
- *N*-απομεθυλίωση για να σχηματιστεί το *N*-απομεθυλο clothianidin και έπειτα υδρόλυση για να παραχθεί *N*-(2-χλωρο-1,3-θειαζολ-5-υλμεθυλ)ουρία
- Υδρόλυση της *N'*- νιτροιμινο ομάδας για να σχηματίσει *N*-(2-χλωρο-1,3-θειαζολ-5-υλ)-*N'*-μεθυλουρία και στη συνέχεια, *N*-απομεθυλίωση για να σχηματίσει *N*-(2-χλωρο-1,3-θειαζολ-5-υλ)ουρία

- Απονιτροποίηση (αναγωγή) για να σχηματίσει *N*-(2-χλωρο-1,3-θιαζολ-5-υλ)-*N*-μεθυλγουανιδίνη και σπάσιμο του δεσμού C-N στην ουσία για να σχηματίσει *N*-μεθυλογουανιδίνη
- Σπάσιμο του δεσμού C-N (απώλεια της 1,3-θιαζολ-5-υλμεθυλολ ομάδας) για να σχηματίσει *N*-μεθυλ-*N'*-νιτρο γουανιδίνη
- *N*-απομεθυλίωση της *N*-μεθυλ-*N'*-νιτρογουανιδίνης
- Απονιτροποίηση (αναγωγή της *N*-μεθυλ-*N'*-νιτρο-γουανιδίνης για να σχηματίσει *N*-μεθυλογουανιδίνη)
- Σπάσιμο του δεσμού C-N της *N*-(2-χλωρο-1,3-θιαζολ-5-υλ)-*N'*-νιτρογουανιδίνης για να σχηματίσει νιτρογουανιδίνη και
- Σπάσιμο του δεσμού C-N (απώλεια της *N'*-νιτροιμινο ομάδας) και έπειτα οξείδωση του ενδιάμεσου προϊόντος για να σχηματίσει 2-χλωρο-1,3-θιαζολ-5-καρβοξυλικό οξύ.

Η μητρική ένωση είναι το κύριο στοιχείο που ανιχνεύεται ως υπόλειμμα στη σοδειά. Το κύριο μεταβολικό μονοπάτι περιλαμβάνει *N*-απομεθυλίωση του clothianidin για να παράγει *N*-(2-χλωρο-1,3-θιαζολ-5-υλμεθυλ)-*N'*-νιτρογουανιδίνη. Σε μερικά φυτικά μέρη η *N*-μεθυλγουανιδίνη παρήγαγε το 20% των υπολειμμάτων της σοδειάς (Klein, 2003).

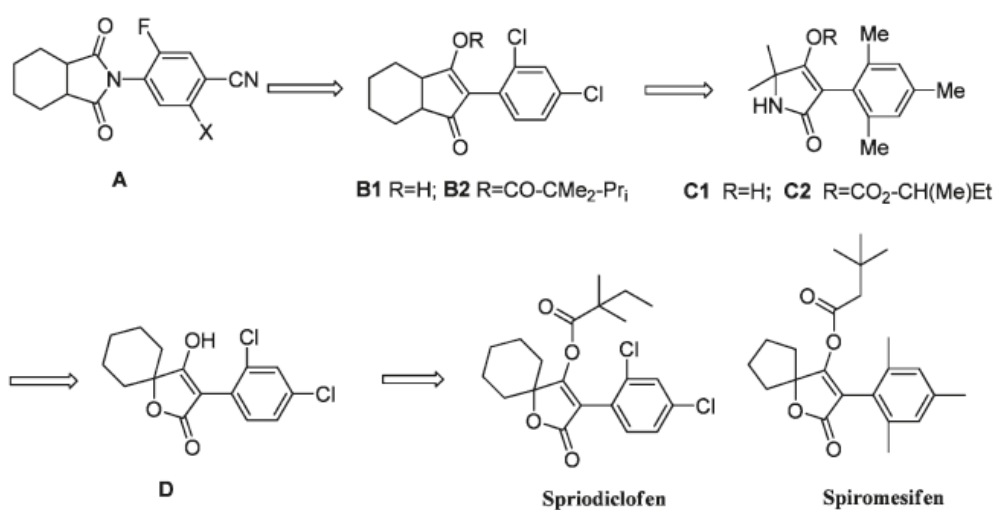
1.9.2. Αμίδια του τετρονικού και τετραμικού οξέος

Η ανακάλυψη των αμιδίων του τετρονικού και τετραμικού οξέος που έγινε το διάστημα 2002-2004, διεύρυνε τη βιοχημική ποικιλομορφία των ακαρεοκτόνων επειδή εισήγαγε έναν καινούριο τρόπο δράσης (Εικόνα 1.23.). Αυτές οι ουσίες δρουν ως παρεμποδιστές της καρβοξυλάσης του ακετυλο συνενζύμου A (acetyl-CoA-carboxylase), ένα ένζυμο κλειδί στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων. Τα Spirodiclofen και spiromesifen είναι εξαιρετικά τοξικά στα αυγά και στα ανώριμα άτομα, ενώ στα ενήλικα θηλυκά ασκούν επίδραση στη γονιμότητα και στην εκκόλαψη των αυγών. (Nauen 2005; Bretschneider et al. 2007; Marcic 2007; van Pottelberge et al. 2009a; Marcic et al. 2010, 2011a).



Εικόνα 1.23. Αμίδια του τετρονικού οξέος (Spiromesifen, Spirodiclofen), αμίδια του τετραμικού οξέος (Spirotetramat).

Η διαδικασία της ανακάλυψης των spirodiclofen and spiromesifen παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.24. (Bretschneider et al., 2005). Η ένωση A μελετήθηκε στην αρχή ως ζιζανιοκτόνο, ενώ όταν το κεντρικό άτομο αζώτου αντικαταστάθηκε από ένα άτομο άνθρακα οδήγησε στις δομές B1 και B2, όπου το B2 παρουσίασε ακαρεοκτόνο δράση. Περαιτέρω έρευνα έδωσε τις δομές C1 και C2 που είχαν καλή ακαρεοκτόνο δράση αλλά μικρή συμβατότητα με τα φυτά. Τέλος βρέθηκε η ουσία D, που παρουσίασε καλή ακαρεοκτόνο και δράση και συμβατότητα με όλες τις σχετικές καλλιέργειες. Με τη χρήση της ένωσης D συντέθηκε μια σειρά αναλόγων του σπυροκυκλικού τετρονικού οξέος με υψηλή ακαρεοκτόνο δράση, εκ των οποίων επιλέχθηκαν για εμπορική χρήση τα spirodiclofen and spiromesifen (Wachemdorff-Neumann, 2002).



Εικόνα 1.24. Η ανακάλυψη των spirodiclofen και spiromesifen.

Spiromesifen

Το spiromesifen ανήκει στη χημική κλάση των σπироκυκλικών φαινυλο-υποκατεστημένων τετρονικών οξέων, και κυκλοφορεί στο εμπόριο με την ονομασία Oberon που περιέχει ποσοστό δραστικής 24% (SC 240) (Nauen et al. 2002). Είναι ιδιαίτερα δραστικό για τους αλευρώδεις (*Bemisia* spp. και *Trialeurodes* spp.) και τετράνυχους/ακάρεα μετά από εφαρμογή στο φύλλωμα των φυτών (Nauen et al. 2002; Liu 2004; Elbert et al. 2005; Nauen et al. 2005). Θεωρείται ότι έχει καλό οικοτοξικολογικό προφίλ (Nicolaus et al. 2005). Το spiromesifen παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα στις μέλισσες honeybees (Nauen et al. 2002; Nicolaus et al. 2005) και στους βομβίνους (Bielza et al. 2005). Αν και έχει παρατηρηθεί κάποια τοξικότητα σε ορισμένα είδη ακάρεων θηρευτών, ο κίνδυνος για τα αρθρόποδα που δεν είναι στόχοι, θεωρείται μηδαμινός (Nicolaus et al. 2005), συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων νέων ακάρεων θηρευτών, όπως το *Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot) (Koppert Biological Systems Side effects database, <http://www.koppert.nl>). Το spiromesifen ήταν εξαιρετικά αποτελεσματικό στους αλευρώδεις τύπου Q σε αντίθεση με τα pyriproxyfen και νεονικοτινοειδή, για τα οποία έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα (Nauen and Konanz 2005). Συνεπώς αποτελεί ένα εξαιρετικό εργαλείο αντιμετώπισης σε συνδυασμό με στρατηγικές εναλλαγής φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Guthrie et al. 2003; Nauen and Konanz 2005).

Spirodiclofen

Το spirodiclofen (Envidor) είναι ένα νέο, εκλεκτικό, μη-συστημικό ακαρεοκτόνο που ανήκει χημικά στα παράγωγα του σπироκυκλικού τετρονικού οξέος και ανακαλύφθηκε από την εταιρία Bayer CropScience (Wachendorff et al., 2000). Βγήκε στο εμπόριο για τον έλεγχο των οικονομικά σημαντικών φυτοφάγων ακάρεων των γενών *Tetranychus*, *Panonychus*, *Brevipalpus*, *Phyllocoptruta* and *Aculus* (Rauch και Nauen, 2002). Το spirodiclofen δεν παρουσιάζει νευροτοξική δράση, όμως δρα στην ανάπτυξη του ακάρεου. Ενεργεί σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια ακόμα και στα αυγά. Τα νεαρά άτομα που ήρθαν σε επαφή με το εντομοκτόνο μετά από ψεκασμό σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια πέθαναν. Επιπλέον, το ακαρεοκτόνο επηρεάζει σημαντικά τη γονιμότητα των θηλυκών ενήλικων. Τα θηλυκά αδυνατούν να αποθέσουν τα αυγά και μπορεί να πεθάνουν μετά από μερικές ημέρες εξαιτίας στον υψηλό αριθμό αυγών που έχει συσσωρευτεί στο σώμα τους. Επιπρόσθετα επηρεάζεται η γονιμοποίηση, π.χ. εκείνα τα αυγά που έχουν αποθέσει τα θηλυκά που είχαν εκτεθεί σε υποθανάτιες δόσεις δεν ήταν γονιμοποιημένα (Nauen, 2005) (Wachendorff et al., 2000). Παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση των λιπιδίων σε εκτεθειμένα θηλυκά *T. urticae* είχε μειωθεί σημαντικά, υποδηλώνοντας μία παρέμβαση στην βιοσύνθεση των λιπιδίων μέσω εκλεκτικής παρεμπόδισης της καρβοξυλάσης του ακετυλο-CoA (ACCase) (Bretschneider et al., 2007). Συ-

νεπώς, η ένωση κατατάχθηκε από την IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) στην ομάδα 23 όσον αφορά τον τρόπο δράσης της (McKenzie et al., 1998).

Spirotetramat

Το spirotetramat, ένα παράγωγο του τετραμικού οξέος (Εικ. 3), και έχει τον ίδιο τρόπο δράσης με τα spirodiclofen και spiromesifen. Συνεπώς έχει καταταχθεί και αυτό στην ομάδα 23 της IRAC (IRAC, 2012). Προκαλεί το θάνατο του εντόμου στόχου σε 2-10 ημέρες μετά την έκθεση, όταν αυτό βρίσκεται σε ανώριμα στάδια (Nauen et al. 2008). Αν και αρχικά είχε χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση των ομόπτερων (Bretschneider et al. 2007; Brück et al. 2009), περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι είναι ένα εξίσου αποτελεσματικό ακαρεοκτόνο (Kramer και Nauen 2011; Marcic et al. 2011b, 2012). Το spirotetramat χρησιμοποιείται κατά του *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae) και άλλων μυζητικών εντόμων όπως αφίδες, ψώρες, ψευδόκοκκων, αλευρώδων, ψύλλων και μερικών ειδών θρίπων στα εσπεριδοειδή Καλιφόρνιας (Grafton-Cardwell et al. 2007; Grafton-Cardwell and Scott 2008). Το 2011, εγκρίθηκε η χρήση του spirotetramat σε διάφορες χώρες της Ε.Ε. (π.χ. Ηνωμένο Βασίλειο, Βέλγιο και Ελβετία) σε διάφορες καλλιέργειες όπως τα λάχανα και τα μαρούλια, για τον έλεγχο των μυζητικών εντόμων (Bayer Crop Science 2012). Παρά την ευρεία χρήση του στην Καλιφόρνια, και τη πιθανή χρήση του σε άλλες περιοχές που παράγουν εσπεριδοειδή, δεν έχουν γίνει ακόμα γνωστές οι παρενέργειες που έχει στα *Coccinellidae* (Brück et al. 2009).

ΕΝΟΤΗΤΑ Β

Υλικά & Μέθοδοι

2.1. Καλλιέργεια και Διατήρηση Κυττάρων N2a.

2.1.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.

1. Κυτταρική σειρά N2a (από την ATCC).
2. 1x DMED (Biochrom AG).
3. 10% (v/v) ορός εμβρύου μόσχου (FCS) (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.
9. Διμεθυλοσουλφοξείδιο DMSO (SDS CARLO ERBA).

2.1.2. Εξοπλισμός.

1. Θάλαμος καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών (HEAL FORCE HF90).
2. Φυγόκεντρος (HERMLE Labortechnik GmbH).
3. Πλαστικές πιπέτες των 13 mL και μηχανικές πιπέτες.
4. Φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων 75 cm² (ORANGE SCIENTIFIC).
5. Αιματοκυτταρομετρική πλάκα Neubauer.
6. Κρυοάντοχα 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 πρέπει να γίνει αποκόλληση αυτών από την επιφάνεια της φιάλης όπου αναπτύσσονται. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη ενζυμικού διαλύματος θρυψίνης/EDTA στα κύτταρα για 5 min στους 37°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 4 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) ορός εμβρύου μόσχου (FCS)
- 1% (w/v) διάλυμα πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη
- 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 μετρώνται 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 μετρώνται.

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

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

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

Σύνολο κυττάρων/mL = αριθμός μετρηθέντων κυττάρων $\times 10^4$ \times αραιώση

2.1.5. Κατάψυξη 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 % διμεθυλσουλφοξειδίου (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.

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 κρυοάντοχα 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 της DMSO είναι ουσιώδεις διαδικασίες για την υψηλή αναλογία επιβίωσης των κυττάρων.

Το κρυοάντοχο 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 στους 37°C , 5% CO_2 .

2.2. Παρασκευή διαλυμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων και προσθήκη τους στις κυτταροκαλλιέργειες.

2.2.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.

1. Μεθανόλη, καθαρότητας analytical grade (Fisher Chemical).
2. Υπεροξειδίου του Υδρογόνου H_2O_2 9,79 M (Merck).
3. Διβουτυλο κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (db-camp) (SIGMA)
4. Οχτώ πρότυποι αναλύτες αναφοράς γνωστής καθαρότητας (PESTANAL[®], analytical standard): Acetamiprid, clothianidin, carbofuran, imidacloprid, thiacloprid, thiamethoxam, spiroticlofen, spiromesifen, spirotetramat.

2.2.2. Εξοπλισμός.

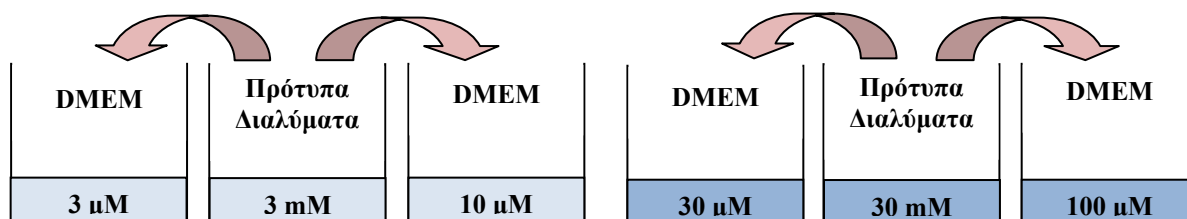
1. Πλάκες καλλιέργειας ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (6 και 96 βοθρίων) (COSTAR).

2. Υδατόλουτρο υπερήχων.
3. Μηχανικές πιπέττες.

2.2.3. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και των διαλυμάτων εργασίας.

Τα πρότυπα διαλύματα των εντομοκτόνων έγιναν με διάλυση τους σε μεθανόλη (MeOH, Chemi-Lab, >99,95% LC-MS) σε συγκεντρώσεις 3 mM και 30 mM. Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα: acetamiprid (mw=222,68), clothianidin (mw=249,70), imidacloprid (mw=255,66), thiacloprid (mw=252,72) και thiamethoxam (mw=291,71), καθώς και τα αμίδια του τετρονικού οξέος: spiromesifen (mw=370,48), spirodiclofen (mw=411,32) και spirotetramat (mw=373,45). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις των πρότυπων διαλυμάτων σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των κυττάρων DMEM και προστέθηκαν στις φλάσκες καλλιέργειας όπου είχαν αναπτυχθεί τα κύτταρα N2a.

Οι αραιώσεις που έγιναν με βάση τα πρότυπα διαλύματα ήταν οι ακόλουθες: 3 μM, 10 μM, 30 μM, 100 μM. Παρασκευάστηκαν όπως φαίνεται στο διάγραμμα που ακολουθεί στην Εικόνα 2.1.



Εικόνα 2.1. Διάγραμμα παρασκευής αραιώσεων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

2.2.4. Εφαρμογή διαλυμάτων των εντομοκτόνων σε κυτταροκαλλιέργειες.

Για την επιλογή της συγκέντρωσης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων πάνω στις οποίες θα γίνουν τα οριστικά πειράματα, καλλιεργήθηκαν κύτταρα σε πλάκα 96 βοθρίων για 24 h σε θάλαμο στους 37°C με 5% CO₂. Όταν πλησίαζαν στο 70-80% σε συρρέουσα ανάπτυξη, το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και αντικαταστάθηκε α) από νέο θρεπτικό υλικό και β) από θρεπτικό υλικό που περιείχε 300 μM κυκλική μονοφωσφορική διβουτυλοαδενοσίνη (db-cAMP) αντί 10% FBS, για να βρεθούν σε κατάσταση αποστέρησης. Στα υλικά είχαν προστεθεί και οι διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 30 min, 24 h και 48 h και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι βιοχημικές δοκιμές που ακολουθούν. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε υπεροξείδιο του υδρογόνου σε τελικές συγκεντρώσεις 10 μM και 100 μM. Επιπλέον, εφαρμόστηκαν στα κύτταρα δύο συγκεντρώσεις MeOH 0,1% και 0,3%. Αυτές είναι οι τελικές συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων των εντομοκτόνων στα θρεπτικό υλικό καλλιέργειας. Οι τελικές συγκεντρώσεις φαίνονται στον Πίνακα 2.1. που ακολουθεί. Παράλληλα, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της MeOH του αρχικού διαλύματος των εντομοκτόνων στα κύτταρα, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων και σε θρεπτικό υλικό που περιείχε τις τελικές συγκεντρώσεις της MeOH των διαλυμάτων των εντομοκτόνων.

Πίνακας 2.1. Τελικές συγκεντρώσεις φυτοπροστατευτικών προϊόντων και θετικών μαρτύρων στο θρεπτικό υλικό DMEM.

Αρχική συγκέντρωση ου- σίας	Τελική συγκέντρωση (σε θρεπτικό υλικό DMEM)
-	Control 1
MeOH (99.9%)	Control 2: 0,1% MeOH
MeOH (99.9%)	Control 3: 0,3% MeOH
H ₂ O ₂ 9.79 M	10 μM
H ₂ O ₂ 9.79 M	100 μM
3 mM	3 μM
3 mM	10 μM
30 mM	30 μM
30 mM	100 μM

2.3. Μελέτη διαφοροποίησης κυττάρων N2a.

2.3.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.

1. Μεθανόλη (MeOH), καθαρότητας analytical grade (Fisher Chemical).
2. Χρωστική coomassie brilliant blue R-250 (MP BIOMEDICALS).
3. Διβουτυλο κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (db-camp) (SIGMA).
4. Οξικό οξύ (CH₃COOH) (MERCK).

2.3.2. Εξοπλισμός.

1. Πλακίδια μικροτιλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (6 βοθρίων) (COSTAR).
2. Ανάστροφο μικροσκόπιο (KRUSSE MBL 3200).
3. Μηχανικές πιπέττες.

2.3.4. Μικροσκοπική μελέτη της ανάπτυξης των νευρικών αξόνων.

Προκειμένου να σημανθούν τα διαφοροποιημένα κύτταρα N2a εφαρμόστηκε η μέθοδος της χρώσης με coomassie brilliant blue (Flaskos et al. 1998). Έτσι τοποθετήθηκαν 100.000 κύτταρα ανά πηγάδι δίσκου καλλιέργειας (έξι πηγαδιών) και την επόμενη μέρα εφαρμόστηκε ο χειρισμός και 0.3 mM db-cAMP, χωρίς ορό εμβρύου μόσχου με στόχο την πρόκληση διαφοροποίησης στα κύτταρα με την προσθήκη ή χωρίς την προσθήκη των εντομοκτόνων. Μετά από 24 και 48 h καλλιέργειας εφαρμόστηκε η τεχνική της μελέτης διαφοροποίησης των κυττάρων. Ένα κύτταρο θεωρείται διαφοροποιημένο όταν έχει αναπτύξει άξονες μεγαλύτερους κατά 1,5 φορά το σώμα του.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται παρακάτω:

1. Διάλυμα μονιμοποίησης:
 - 90% (v/v) μεθανόλη
 - 10% PBS
2. Διάλυμα χρωστικής:
 - 1.25% (w/v) coomassie brilliant blue R-250
 - 40% (v/v) μεθανόλη
 - 20% (v/v) οξικό οξύ

Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υλικό καλλιέργειας και προστέθηκαν 2 σταγόνες διαλύματος μονιμοποίησης. Τα πλακίδια τοποθετήθηκαν στους -20°C για 20 min. Κατόπιν απομακρύνθηκε το διάλυμα καθήλωσης και προστέθηκαν 2 σταγόνες δια-

λύματος χρωστικής. Μετά από 5 sec απομακρύνθηκε το διάλυμα χρωστικής και ακολούθησε έκπλυση των βοθρίων με PBS. Τέλος προστέθηκαν μερικές σταγόνες PBS και έγινε παρατήρηση και φωτογράφιση στο ανάστροφο μικροσκόπιο.

2.4. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων.

2.4.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.

1. Χρωστική MTT (3-(4,5-διμεθυλοθιαζολ-2-υλ)-2,5-βρωμίδιο του διφαινυλοτετραζολίου).
2. Χρωστική NRU (ουδέτερο ερυθρό).
3. Χρωστική PI (ιωδιούχο προπίδιο).
4. Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).

2.4.2. Εξοπλισμός.

1. Πλακίδια μικροτιλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (96 βοθρίων) (COSTAR).
2. Πλακίδια μικροτιλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (96 βοθρίων) μαύρου χρώματος με διαφανή πυθμένα (ibidi)
3. Φωτόμετρο (PowerWave 340).
4. Μηχανικές πιπέττες.

2.4.3. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων N2a με εφαρμογή της μεθόδου εκτίμησης της πρόσληψης της χρωστικής MTT .

Η δοκιμή MTT είναι μια μέθοδος μέτρησης της βιωσιμότητας των κυττάρων και χρησιμοποιείται είτε για έλεγχο του πολλαπλασιασμού είτε για δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας. Το MTT είναι άλας τετραζολίου κίτρινου χρώματος. Η δοκιμασία στηρίζεται στην αναγωγή του κίτρινου άλατος στην ένωση formazan μπλε χρώματος. 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 αναγωγή 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 μετريέται σε μήκος κύματος 570-590nm. Συστήνεται η μέτρηση να γίνει στα 650nm ή και περισσότερο (Chiesa et al., 2004).

Αναλυτική πορεία :

Το MTT (Sigma) με συγκέντρωση 5 mg/mL σε PBS αναμιγνύεται με το πλήρες θρεπτικό υλικό των κυττάρων σε αναλογία 1:10. Τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο για 3 ώρες. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό με το MTT και προστίθεται DMSO. Σκεπάζονται τα κύτταρα με αλουμινόχαρτο και επωάζονται για πέντε λεπτά της ώρας υπό ανάδευση. Η μέτρηση έγινε σε φωτόμετρο πλάκας PowerWave 340. Η μέτρηση έγινε σε μήκος κύματος 560nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως οι M.O. ± τυπικές αποκλίσεις (SD) 3 διαφορετικών μετρήσεων.

2.4.4. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων N2a με εφαρμογή της μεθόδου εκτίμησης της πρόσληψης της χρωστικής ουδέτερο ερυθρό (Neutral red).

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, βασίζεται στην αντίχνευση της χρωστικής ουδέτερο ερυθρό (neutral red) που προσλαμβάνεται από κύτταρα N2a. Η πρόσληψη της χρωστικής πραγματοποιείται από τα ζωντανά κύτταρα. Ανάλογα με την ένταση της χρωστικής που έχει προσληφθεί εκτιμάται η βιωσιμότητα των

κυττάρων μετά από την έκθεσή τους σε κάποιο τοξικό παράγοντα (φωτομετρικός προσδιορισμός σε μήκη κύματος 550 nm) (Dailianis, 2009).

Σύμφωνα με τη μέθοδο, στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων προστέθηκαν η χρωστική ουδέτερο ερυθρό NR σε τελική συγκέντρωση 50 µg/mL. Τα δείγματα παρέμειναν στο σκοτάδι στους 4°C για 3 ώρες ώστε να εισχωρήσει η χρωστική στα ζωντανά κύτταρα. Μετά το τέλος της έκθεσης αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό με το NR και τα κύτταρα εκπλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα PBS ώστε να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα και όλη η παραπανίσια χρωστική που δεν απορροφήθηκε. Η απελευθέρωση της χρωστικής πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος 1% οξικού οξέος και 50% αιθανόλης και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 540 nm και 620 nm (μήκος αναφοράς). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως οι Μ.Ο. ± τυπικές αποκλίσεις (SD) 3 διαφορετικών μετρήσεων και εκφράζονται ως OD/mg πρωτεΐνης.

2.4.5. Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας των κυττάρων N2a με εφαρμογή της μεθόδου εκτίμησης της πρόσληψης της χρωστικής ιωδιούχο προπίδιο (PI).

Το ιωδιούχο προπίδιο (PI) έχει την ιδιότητα να προσδένεται στο DNA (Waring, 1965). Από τη στιγμή που το PI θα προσδεθεί στα νουκλεϊκά οξέα ο φθορισμός του ενισχύεται κατά 20 με 30 φορές, το μήκος κύματος απορρόφησης του μετατοπίζεται κατά 30 με 40 nm προς το κόκκινο χρώμα και το μήκος κύματος εκπομπής του μετατοπίζεται κατά 15 nm προς το μπλε χρώμα. Αν και έχει σχετικά χαμηλή μοριακή απορρόφηση με τα κατάλληλα φίλτρα είναι δυνατό να προσδιοριστούν ταυτόχρονα πυρηνικό DNA καθώς και σημασμένα φθορίζοντα αντισώματα.

Σε γενικές γραμμές δεν μπορεί να περάσει τη μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των νεκρών κυττάρων ενός πληθυσμού. Όταν προσδένεται στα νουκλεϊκά οξέα το μέγιστο μήκος κύματος φθορισμού απορρόφησης είναι 535 nm και εκπομπής 617 nm (Arndt-Jovin & Jovin, 1989).

Το ιωδιούχο προπίδιο διαλύθηκε σε νερό σε συγκέντρωση 1 mg/mL και διατηρήθηκε στο ψυγείο στους -20 °C. Αρχικά αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό των κυττάρων και εκπλύθηκαν με PBS. Στη συνέχεια προστέθηκε PBS στο οποίο είχε προστεθεί PI από το στοκ σε τελική συγκέντρωση 10 µg/mL. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 30 min στους 37°C με 5% CO₂. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε η χρωστική και τα κύτταρα εκπλύθηκαν ξανά με PBS. Τέλος προστέθηκαν 200 µL PBS ανά βιοθρίο και έγινε μέτρηση του φθορισμού στο φωτόμετρο με μήκος κύματος φθορισμού απορρόφησης στα 535 nm και εκπομπής στα 617 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως οι Μ.Ο. ± τυπικές αποκλίσεις (SD) 3 διαφορετικών μετρήσεων.

2.5. Προσδιορισμός μεμβρανικού δυναμικού και ενδοκυτταρικού ασβεστίου.

2.5.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.

1. NaCl
2. KCl
3. MgCl₂
4. Γλυκόζη
5. HEPES
6. CaCl₂
7. 3,3 Ιωδιούχος διπροπυλο-θειαδικαρβοκυανίνη DiSC3(5) (Invitrogen)
8. Fluo 3 (Invitrogen)
9. Ιονομυκίνη
10. Βαλινομυκίνη

2.5.2. Εξοπλισμός.

1. Πλακίδια μικροπιλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (96 βοθρίων) μαύρου χρώματος με διαφανή πυθμένα (ibidi).
2. Φωτόμετρο φθορισμού (TECAN infinite M200 Pro).
3. Μηχανικές πιπέττες.

2.5.3. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός μεμβρανικού δυναμικού και ενδοκυτταρικού ασβεστίου των κυττάρων N2a.

Η εκτίμηση του μεμβρανικού δυναμικού έγινε με την χρωστική 3,3 Ιωδιούχος διπροπυλο-θειαδικαρβοκυανίνη (DiSC3(5)) και της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου με την χρωστική Fluo 3 (Dajas-Bailador et al. 2002; Kho et al. 2003).

Η DiSC3(5) είναι λιπόφιλη κατιονική χρωστική και δεν ανήκει στην κατηγορία των συνήθων φθορισμομετρικών ποτενσιομετρικών ουσιών, οι οποίες περνούν μέσα από το πλασμάλλημα ως εστέρες (μη φθορίζουσα μορφή) και στη συνέχεια διασπώνται από τις εστεράσες του κυτταροπλάσματος στην ελεύθερη, φθορίζουσα μορφή. Αντίθετα, η συγκεκριμένη ουσία φθορίζει όσο βρίσκεται στο (κυρίως εξωκυτταρικό) διάλυμα, και χάνει την ιδιότητα του φθορισμού όταν βρεθεί μέσα στη διαμεμβρανική περιοχή. Αντιθέτως η χρωστική Fluo-3 ανήκει στους ακετυλομεθυλεστέρες (AM), που χρησιμοποιούνται ως δείκτες φθορισμού σε ζωντανά κύτταρα. Όταν οι ουσίες αυτές εισέλθουν στον ενδοκυτταρικό χώρο υδρολύονται από διάφορες μη εξειδικευμένες εστεράσες που υπάρχουν στο εσωτερικό του κυττάρου. 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+}).

Κύτταρα N2a τοποθετήθηκαν σε πιάτο καλλιέργειας ELISA 96 θέσεων, σε πυκνότητα 5×10^4 ανά βοθρίο και επώαστηκαν για 24 ώρες σε θάλαμο στους 37°C με 5% CO_2 ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα στο πιάτο καλλιέργειας. Στη συνέχεια έγινε επώαση των κυττάρων με προσθήκη 3 μM DiSC3(5) από στοκ 300 μM και 10 μM Fluo 3 από στοκ 1 mM, για 45 min και 1 ώρα στους 37°C , αντιστοίχως (η κάθε χρωστική εφαρμόστηκε σε διαφορετικά βοθρία). Ακολούθησε ξέπλυμα με διάλυμα Krebs's-Hepes δύο φορές και έγινε μέτρηση του φθορισμού στο φωτόμετρο στα 651/675 nm και στα 492/520 nm, μετά από προσθήκη διαλύματος KCL 100 mM αντιστοίχως για 3 min. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε προσθήκη των εντομοκτόνων στις διαφορετικές συγκεντρώσεις τους και πραγματοποιήθηκαν νέες μετρήσεις για 5 min και τέλος ακολούθησε η προσθήκη του πυκνού διαλύματος του ιονοφόρου βαλινομυκίνη ή ιονομυκίνη, αντίστοιχα και πραγματοποιήθηκαν νέες μετρήσεις για ακόμα 2 min.

Το ρυθμιστικό διάλυμα Krebs's-Hepes, που χρησιμοποιήθηκε περιείχε τα παρακάτω:

- 144 mM NaCl
- 5.9 mM KCl
- 1.2 mM MgCl_2
- 10 mM Γλυκόζη
- 10 mM Hepes
- 2 mM CaCl_2
- pH 7.4

Στη συνέχεια για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$\frac{\text{ODmax}_{(\text{δείγματος})} - \text{ODmin}_{(\text{δείγματος})}}{\text{ODmax}_{(\text{θετικού μάρτυρα})} - \text{ODmin}_{(\text{θετικού μάρτυρα})}}$$

Όπου $\text{ODmax}_{(\text{δείγματος})}$ η απορρόφηση του δείγματος στα 480 min, $\text{ODmin}_{(\text{δείγματος})}$ η απορρόφηση του δείγματος στα 181 min, $\text{ODmax}_{(\text{θετικού μάρτυρα})}$ η απορρόφηση της ιονομυκίνης ή της βαλινομυκίνης στα 600 min και $\text{ODmin}_{(\text{θετικού μάρτυρα})}$ η απορρόφηση της ιονομυκίνης ή της βαλινομυκίνης στα 481 min.

2.6. Προσδιορισμός Ολικών Πρωτεϊνών.

Η μέθοδος Bradford είναι μια χρωματομετρική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την γρήγορη ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών. Βασίζεται στην αλλαγή του χρώματος του αντιδραστήριου, όταν δεσμεύεται με πρωτεΐνες. Όταν δεσμευτεί, υπάρχει μια άμεση αλλαγή της μέγιστης απορρόφησης από 465 σε 595nm με μία ταυτόχρονη αλλαγή του χρώματος σε μπλε (Bradford, 1976).

2.6.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.

1. Διάλυμα εργασίας Bradford.
2. Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) (Fluka).
3. Μεθανόλη MeOH (FISHER).
4. Φωσφορικό οξύ H_3PO_4 85% (Chem-Lab).
5. Coomassie Blue G.

2.6.2. Εξοπλισμός.

1. Πλακίδια μικροτιλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (96 βοθρίων) (COSTAR).
2. Φωτόμετρο (PowerWave 340).
3. Μηχανικές πιπέττες.

2.6.3. Προσδιορισμός Ολικών Πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (Bradford assay).

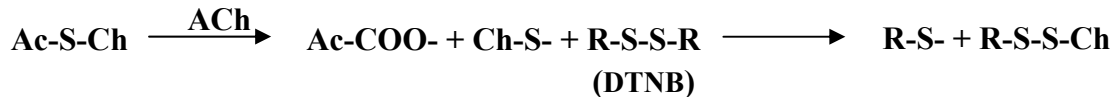
Αρχικά παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με διαφορετικές συγκεντρώσεις του διαλύματος αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, μετά από αραιώση 1:4 του διαλύματος εργασίας Bradford με νερό. Η αντίδραση ξεκίνησε με την ταυτόχρονη προσθήκη 50 μl διαλύματος εργασίας Bradford. Το διάλυμα εργασίας Bradford περιείχε τα ακόλουθα (200 mL):

- Coomassie Blue G (100 mg)
- MeOH 50 mL
- H_3PO_4 85% 100 mL

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία και για τα κύτταρα όπου προστέθηκαν στα βοθρία μαζί με το αραιωμένο διάλυμα εργασίας Bradford. Τα πρότυπα και τα δείγματα που προστέθηκαν ήταν τριπλά. Αφού γίνει ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετείται το plate για φωτομέτρηση στα 595nm.

2.7. Προσδιορισμός ενεργότητας του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE).

Το ένζυμο AChE, το οποίο μελετήθηκε σ' αυτή την μελέτη, υδρολύει την ACh σε χολίνη και ακετυλοCoA. Σύμφωνα με την αντίδραση:



Συναντάται σε δυο ισομορφές: τις ασύμμετρες και τις σφαιρικές. Οι σφαιρικές μορφές (globula forms, G) απαντώνται ως μονομερή (G1), διμερή (G2) και τετραμερή (G4). Η G1 μορφή βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ενώ η G4 είναι δεσμευμένη με γλυκοφωσφολιπίδια ή αμινοξικές υδροφοβικές ακολουθίες στη μεμβράνη των κυττάρων. Παράλληλα έχει αποδειχθεί ότι το διαλυτό σε απορρυπαντικό (Detergent-soluble fraction, DS) και το διαλυτό σε άλας (Salt-soluble fraction, SS) κλάσμα της AChE περιέχουν κυρίως τις G4 και G1 ισομορφές του ενζύμου αντιστοίχως (Rieger F. et al., 1976).

2.7.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.

1. Ιωδιούχος ακετυλοθειοχολίνη (ATCI) (ALFA AESAR).
2. 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) DTNB (SIGMA).
3. Ακετυλοχολινεστεράση από ηλεκτρικό χέλι (AChE) (SIGMA).
4. NaH₂PO₄.
5. Na₂HPO₄.

2.7.2. Εξοπλισμός.

1. Πλακίδια μικροτιτλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (96 βοθρίων) (COSTAR).
2. Φωτόμετρο (PowerWave 340).
3. Μηχανικές πιπέττες.

2.7.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE) σε κύτταρα N2a.

Η ανάλυση της ενεργότητας της AChE in vitro πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της χρωματομετρικής μεθόδου του Ellman (Ellman, 1961), όπως αναφέρθηκε προηγουμένως με την ιωδιούχο ακετυλοθειοχολίνη (acetylthiocholine iodide, ATCI) ως υπόστρωμα.

Σε μικρόπλακα 96 κελιών όπου έχει αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό των κυττάρων τα οποία προηγουμένως είχαν επωαστεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων για 30 min, 24 h και 48 h, προστέθηκαν 140μL 0.1 M διάλυμα φωσφορικού νατρίου, pH 7.4, 25μL 20mM ATCI (σε νερό), 25μL 4mM DTNB και 10μL συμπυκνωμένων κυττάρων τα οποία είχαν επωαστεί με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις εντομοκτόνων για 24 και 48 h. Το διάλυμα φωσφορικού νατρίου περιείχε τα εξής (1 L):

- 3.1 g NaH₂PO₄•H₂O
- 10.9 g of Na₂HPO₄ (άνυδρο)
- pH 7.4

Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 405nm μετά από 5min επώασης σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση AChE από ηλεκτρικό χέλι. Η απορρόφηση μετρήθηκε και πάλι στα 405nm μετά από 5min επώασης σε θερμοκρασία δωματίου. Η ενζυμική δραστηριότητα της AChE υπολογίστηκε σε U όπου 1U= μετατροπή 1μM ATCI-DTNB σε 1min σύμφωνα με την εξίσωση:

$$U = \frac{(\text{mOD min}^{-1} 1000^{-1}) \times 1.36 \text{ mM min}^{-1} \text{ mL}^{-1} \times \text{αραιώση}}{\text{Συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB} \times \text{μήκος διαδρομής} \times \text{συγκέντρωση πρωτεΐνης}}$$

Όπου ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB= $1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ και το μήκος της διαδρομής είναι 0.6 cm.

2.8. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) σε κύτταρα N2a.

Οι δισμουτάσες του υπεροξειδίου είναι μια οικογένεια μεταλλοενζύμων που καταλύουν τη δισμουτίωση των ριζών του υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και μοριακό οξυγόνο (McCord & Fridovich, 1969) σύμφωνα με την αντίδραση:



Ο προσδιορισμός του ενζύμου γίνεται έμμεσα και βασίζεται στην ικανότητα της SOD να παρεμποδίζει την αντίδραση που προκαλεί το υπεροξείδιο. Ο βαθμός παρεμπόδισης της αντίδρασης από τη SOD ορίζεται ως ενζυμική δραστηριότητα.

2.8.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.

1. Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) από ερυθροκύτταρα μόσχων (SIGMA).
2. Χρωστική μπλε νιτρο-τετραζόλιο NBT (SIGMA)
3. L-Μεθειονίνη (MERCK)
4. Ριβοφλαβίνη (SERVA)
5. $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.
6. KH_2PO_4 .
7. EDTA (SIGMA)

2.8.2. Εξοπλισμός.

1. Πλακίδια μικροτιλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (96 βοθρίων) (COSTAR).
2. Πλακίδια μικροτιλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (96 βοθρίων) μαύρου χρώματος με διαφανή πυθμένα (ibidi).
3. Φωτόμετρο (PowerWave 340).
4. Φωτόμετρο φθορισμού (TECAN infinite M200 Pro).
5. Μηχανικές πιπέτες.

2.8.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) σε κύτταρα N2a.

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Beyer και Fridovich (1987). Αρχικά έγινε παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων SOD διαφορετικών συγκεντρώσεων για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν 100 U/mL, 10 U/mL, 1 U/mL, 0.1 U/mL, 0.01 U/mL και 0.001 U/mL.

Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση παρασκευάστηκε διάλυμα αντίδρασης όπου σε 25 mL από 50 mM διαλύματος φωσφορικού καλίου προστέθηκαν L-μεθειονίνη,

EDTA και NBT με τελικές συγκεντρώσεις στο διάλυμα 10 mM, 1.27 mM και 57 μM αντίστοιχα. Το διάλυμα φωσφορικού καλίου περιείχε τα εξής (1 L):

- 3.40 g KH_2PO_4
- 5.71 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- pH 7.4

Σε μικρόπλακα 12 κελιών όπου έχει αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό των κυττάρων ($5 \cdot 10^5$) τα οποία προηγουμένως είχαν επωαστεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων για 30 min, 24 h και 48 h, προστέθηκαν 2 ml από το διάλυμα ανά βοθρίο και ριβοφλαβίνη σε τελική συγκέντρωση 440 μM). Το πλακίδιο επώαστηκε για 15 min υπό ανάδευση στο φως. Στη συνέχεια, η απορρόφηση από 250 μL μετρήθηκε σε μικρόπλακα 96 βοθρίων στα 560 nm. Η ενζυμική δραστηριότητα υπολογίστηκε από τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής του ενζύμου ανά λεπτό. Το 50 % της παρεμπόδισης θεωρήθηκε ανάλογο με 1 Unit SOD.

2.9. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου μεταφοράση του γλουταθειού (GST) σε κύτταρα N2a.

Η GST καταλύει τη συμπλοκοποίηση του αντιδραστηρίου CDNB με μια θειολική ομάδα του γλουταθειού σύμφωνα με την αντίδραση:



Ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου μεταφοράση του γλουταθειού (GST) είναι φωτομετρικός και βασίζεται στη μέτρηση της παραγωγής του συμπλόκου S-(DNP)GS που απορροφά στα 340 nm (1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB) (Mannervik and Guthenberg, 1981; Tang, Lin and Chang, 1996).

2.9.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.

1. Γλουταθείο GSH (FLUKA)
2. 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζενιο CDNB
3. KH_2PO_4 .
4. K_2HPO_4 .
5. Αιθανόλη

2.9.2. Εξοπλισμός.

1. Πλακίδια μικροτιτλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (96 βοθρίων) (COSTAR).
2. Φωτόμετρο (PowerWave 340).
3. Μηχανικές πιπέττες.

2.9.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου μεταφοράση του γλουταθειού (GST) σε κύτταρα N2a.

Σε μικρόπλακα 96 κελιών όπου έχει αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό των κυττάρων τα οποία προηγουμένως είχαν επωαστεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων για 30 min, 24 h και 48 h, προστέθηκαν 180 μl από το διάλυμα φωσφορικού καλίου, διάλυμα GSH 40 mM και διάλυμα CDNB 20 mM (σε αιθανόλη) σε τελικές συγκεντρώσεις 2 mM και 1 mM αντίστοιχα. Το πλακίδιο τοποθετήθηκε αμέσως στο φωτόμετρο όπου μετρήθηκε η απορρόφηση στα 340 nm για 3 min. Η ενζυμική δραστηριότητα μέσω της μεταβολής της απορρόφησης της ευθείας (ΔA_{340})/min. Η μεταβολή αυτή υπολογίζεται μέσω της εξίσωσης:

$$(\Delta A_{340}/\text{min}) = \frac{A_{340}(\text{τελική μέτρηση}) - A_{340}(\text{αρχική μέτρηση})}{\text{Χρόνος αντίδρασης (min)}}$$

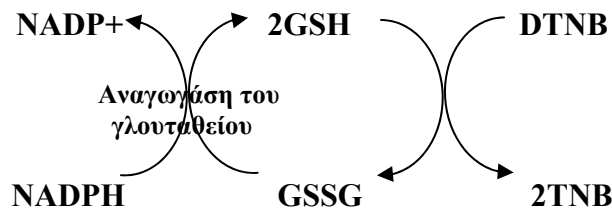
Για τον υπολογισμό της δραστηριότητας της GST χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω εξίσωση:

$$\frac{(\Delta A_{340}/\text{min}) \times V \text{ (mL)} \times \text{αραίωση}}{\epsilon_{\text{mM}} \times V_{\text{ενζ}} \text{ (mL)}} = \mu\text{mol/mL/min}$$

Το ϵ_{mM} είναι ο συντελεστής απόσβεσης του συμπλόκου του CDNB στα 340 nm και για βοθρία πλακιδίων ELISA 96 θέσεων είναι: 5.3 mM^{-1} (Mannervik and Guthenberg, 1981). Ο V της αντίδρασης είναι 0.2 mL και ο $V_{\text{ενζ}}$ είναι 0.01 mL.

2.10. Προσδιορισμός του δείκτη GSH/GSSG σε κύτταρα N2a.

Ο ενζυμικός προσδιορισμός του GSSG (Tietze, 1969) έχει σαν βάση την αντίδραση του αντιδραστήριου Ellman [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB] με την ελεύθερη σουλφυδρυλομάδα (-SH) της GSH, η οποία σχηματίζεται ύστερα από την ενζυμική διάσπαση του GSSG σε δύο μόρια GSH από το ένζυμο αναγωγάση του γλουταθείου (glutathione reductase, GR). Για τον προσδιορισμό του γλουταθείου (GSH) με τη συγκεκριμένη μέθοδο, χρησιμοποιείται η αναγωγάση του γλουταθείου. Η σουλφυδρυλομάδα του γλουταθείου αντιδρά με το DTNB (5,5-διθειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ) και παράγει TNB (5-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ) χρώματος κίτρινου. Το δισουλφίδιο που παράγεται (GSSG) μειώνεται από την αναγωγάση του γλουταθείου για να ανακυκλώσει το γλουταθείο και να παράγει περισσότερο TNB, όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση:



Το ποσοστό παραγωγής του TNB είναι ανάλογο με την ανακύκλωση της αντίδρασης, η οποία με τη σειρά της είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του γλουταθείου στο δείγμα. Για να μετρηθούν μόνο τα επίπεδα του GSSG επωάζονται τα δείγματα με βινυλοπιριδίνη η οποία δεσμεύει το GSH. Μέτρηση της απορρόφησης της TNB στα 405-414 nm παρέχει μια ακριβή εκτίμηση του γλουταθείου στο δείγμα.

2.10.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.

1. 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) DTNB (SIGMA).
2. Αναγωγάση του γλουταθείου (GR) ($\geq 0.08 \text{ U/mg πρωτ.}$) (type II, SIGMA).
3. GSSG (SERVA).
4. GSH (FLUKA).
5. NADPH: 0,05 mg σε 20 μl PBS pH 7 .
6. 2-βινυλοπιριδίνη (2-VP, 97%) (SIGMA).
7. Σουλφοσαλικυλικό Οξύ SSA.
8. NaH_2PO_4 .

9. Na₂HPO₄.
10. EDTA (SIGMA).

2.10.2. Εξοπλισμός.

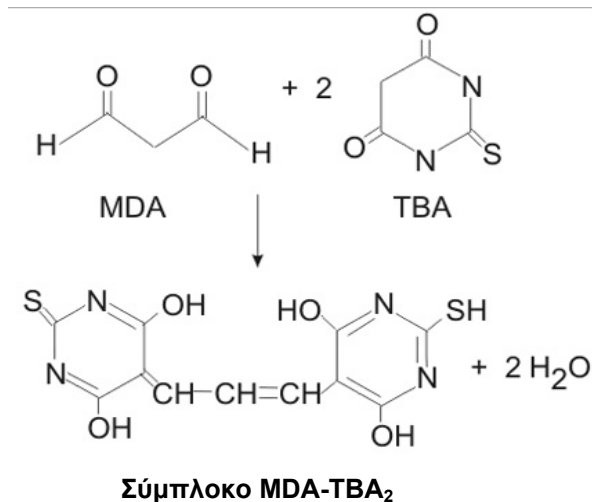
1. Πλακίδια μικροτιτλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (6 και 96 βοθρίων) (COSTAR).
2. Φωτόμετρο (PowerWave 340).
3. Μηχανικές πιπέττες.

2.10.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός του δείκτη GSH/GSSG σε κύτταρα N2a.

Κύτταρα N2a που είχαν επωαστεί με τα εντομοκτόνα για 24 και 48 h σε πλακίδια μικροτιτλοδότησης ELISA 6 βοθρίων (2x10⁵/ βοθρίο), αποκολλήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 1000 rpm για 5 min. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων του γλουταθείου ενδο-και εξωκυτταρικά (GSH+GSSG), τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 3% w/v σουλφοσαλικυλικό οξύ (10 mM) (5 min, 4°C), φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του γλουταθείου ενώ το ίζημα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών. Το ολικό GSH των κυττάρων μετρήθηκε με ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο του Griffith (Griffith, 1980) με τη χρήση μιας διαδικασίας ενζυμικής ανακύκλωσης κατά την οποία το ανηγμένο γλουταθείο οξειδώθηκε με το 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic-acid) (DTNB) σε GSSG που στη συνέχεια μετά από αναγωγή με το NADPH έγινε ξανά GSH παρουσία της αναγωγάσης του γλουταθείου που αντιδρά ξανά με το DTNB. Συγκεκριμένα, Σε διάλυμα φωσφορικού νατρίου pH 7.4 όπου είχε προστεθεί EDTA σε τελική συγκέντρωση 0,005 M προστέθηκαν σε τελικές συγκεντρώσεις 15 μM DTNB, 20 μM NADPH και 1 μg/mL GR. Ο βαθμός σχηματισμού του DTNB μετρήθηκε στα 412 nm για 6 min και η παρουσία του γλουταθείου προσδιορίστηκε από πρότυπη καμπύλη με συγκεντρώσεις 1, 5, 15 και 25 μM. Το GSSG προσδιορίστηκε αρχικά με την κάλυψη του ανηγμένου GSH με τη 2-βινυλοπυριδίνη (2 % v/v τελική συγκέντρωση) και στη συνέχεια αφού τα δείγματα επώαστηκαν για 1 h στον πάγο μετρήθηκε το GSSG όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η πρότυπη καμπύλη για το GSSG κατασκευάστηκε με τις συγκεντρώσεις 0.25, 0.5, 2.5 και 7.5 μM. Όλα τα δεδομένα εκφράστηκαν σε mg πρωτεΐνης. Ο οξειδοαναγωγικός δείκτης εκφράστηκε ως ο λόγος του GSH μετά από αφαίρεση του GSSG από το ολικό GSH προς το GSSG.

2.11. Μέθοδος προσδιορισμού της υπεροξειδωσής λιπιδίων.

Η μηλονική διαλδεύδη (MDA) θεωρείται ο πιο σημαντικός και καλύτερα μελετημένος δείκτης για τον έλεγχο της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Ο προσδιορισμός της MDA πραγματοποιείται μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Η αντίδραση της MDA με το TBA όπως φαίνεται παρακάτω οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλόκου MDA-TBA₂, το οποίο έχει χαρακτηριστικό έντονο ροζ χρώμα και παρουσιάζει ισχυρή απορρόφηση στα 532nm.



Το MDA αποτελεί ένα δευτερογενές προϊόν της οξείδωσης των λιπιδίων των φωσφολιπιδίων. Με την ποσοτικοποίηση του MDA μπορεί να προσδιοριστεί η υπεροξείδωση των λιπιδίων των μεμβρανών.

2.11.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.

1. Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) (SIGMA).
2. Δωδεκυλο θεικο νατριο (SDS) (SISCO)
3. Βουτυλο- υδροξυ- τολουένιο (BHT)
4. Οξικό οξύ (MERCK)
5. 1, 1, 3, 3-Τετραεθοξύ προπάνιο (TEP) (FLUKA)
6. Τριχλωροξικό οξύ (TCA) (Panreac)

2.11.2. Εξοπλισμός.

1. Πλακίδια μικροτιτλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (96 βοθρίων) (COSTAR).
2. Πλακίδια μικροτιτλοδότησης ELISA για κυτταροκαλλιέργεια (96 βοθρίων) μαύρου χρώματος με διαφανή πυθμένα (ibidi).
3. Φωτόμετρο (PowerWave 340).
4. Φωτόμετρο φθορισμού (TECAN infinite M200 Pro).
5. Μηχανικές πιπέττες.

2.11.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός της MDA σε κύτταρα N2a.

Αρχικά αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό από κύτταρα N2a που είχαν επωαστεί με τα εντομοκτόνα για 24 και 48 h σε πλακίδια μικροτιτλοδότησης ELISA 6 βοθρίων (2×10^5 κύτταρα/ βοθρίο) και προστέθηκαν 100 μ L 0.1 % TCA όπου αφέθηκαν για επώαση για 15 min σε πάγο. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο αναμίχθηκε με 200 μ L 20 % TCA και 200 μ L 0.5 % TBA (Το TBA είχε διαλυθεί σε 20 % CH_3COOH) όπου παρέμεινε για 1 h στους 100°C. Μετά το βρασμό των δειγμάτων σε υδατόλουτρο για 1h στους 90oC προστέθηκαν 0,5mL n-βουτανόλης και ακολούθησε φυγοκέντρηση προκειμένου να γίνει διαχωρισμός των φάσεων. Τέλος, μεταφέρθηκε η ανώτερη φάση (οργανική) σε μικρόπλακα τύπου ELISA (96-well plate) και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 532 nm (απορρόφηση) και στα 600 nm (εκπομπή). Η πρότυπη καμπύλη για τον υπολογισμό του αναλόγου MDA παρασκευάστηκε με διαφορετικές συγκεντρώσεις 1, 1, 3, 3-Τετραεθοξύ προπανίου TEP (10,5, 2.5, 1.25 και 0.625 nmol/ml)

2.11.4. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός της MDA σε κύτταρα N2a.

Κύτταρα N2a που είχαν επωαστεί με τα εντομοκτόνα για 24 και 48 h σε πλακίδια μικροτιτλοδότησης ELISA 6 βοθρίων (2×10^5 κύτταρα/ βοθρίο), αποκολλήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 1000 rpm για 5 min. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων μετρήθηκε ως συγκέντρωση των αντιδρώντων ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS) που απελευθερώθηκαν μετά την επίδραση των εντομοκτόνων. Οι TBARS μετρήθηκαν μετά από προσθήκη του αντιδραστήριου TBA στα ίζημα των κυττάρων. Το αντιδραστήριο TBA περιείχε τα ακόλουθα (100 mL):

- 5.5 mL από 8.1% SDS
- 39.5 mL από διάλυμα 20% οξικού οξέος
- 39.5 mL από υδατικό διάλυμα 0.8 % θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA)
- 2.5 mL από 0.76% BHT
- 13 mL νερό.

Στη συνέχεια τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 100°C για 1 h. Στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος n-βουτανόλης (200 μL) και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 1000 rpm για 5 min. Κατόπιν, μετά το διαχωρισμό των φάσεων μετρήθηκε η n-βουτανόλη σε φωτόμετρο φθορισμού με μήκος κύματος απορρόφησης στα 515nm και εκπομπής στα 553nm (Lykkesfeldt, 2001; Badcock et al., 1997; Agarwall et al., 2002). Οι TBARS υπολογίστηκαν με το νόμο Beer-Lambert ($a=elc$) και εκφράστηκαν ως nmol αναλόγου της μαλονδιαλδεύδης (MDA) /mg πρωτεΐνης. Ο συντελεστής απόσβεσης ϵ^M είναι ίσος με $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

$$[\text{TBARS}] = \frac{R_{\text{δείγματος}} - R_{\text{τυφλού}}}{\text{Κλίση } (\mu\text{M}^{-1})} \times n \text{ (}\mu\text{M ανάλογα MDA/mg πρωτεΐνης)}$$

Τα $R_{\text{δείγματος}} - R_{\text{τυφλού}}$ είναι οι $\text{OD}_{535\text{nm}}$ ή η ένταση του φθορισμού του δείγματος και του H_2O . Το n είναι ο συντελεστής αραίωσης του δείγματος.

2.12. Εισαγωγή του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE) στη μεμβράνη κυττάρων Vero.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ολονύχτια επώαση της AChE με λαουρικό οξύ δεκαπλάσιας συγκέντρωσης (1% CH_3COOH) στους 4°C . Τα κύτταρα Vero καλλιιεργήθηκαν με τον ίδιο τρόπο που καλλιιεργήθηκαν και τα κύτταρα N2a (Βλέπε Παραγ. 2.1.). Ακολούθησαν δύο μέθοδοι εισαγωγής της AChE στη μεμβράνη των κυττάρων Vero, η ηλεκτροπόρωση και η οσμωτική ένθεση.

2.12.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.

1. Κυτταρική σειρά Vero (από την ATCC).
2. Ακετυλοχολινεστεράση (AChE) από ηλεκτρικό χέλι (10 U/mL) (SIGMA)
3. Λαουρικό οξύ
4. NaCl (Riedel-de Haën)
5. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (SIGMA)
6. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA)
7. Σουκρόζη (SIGMA)
8. PEG (SIGMA)

2.12.2. Εξοπλισμός.

1. Συσκευή ηλεκτροπόρωσης EC 100 (Thermo EC)
2. Κυβέττες ηλεκτροπόρωσης
3. Φυγόκεντρος

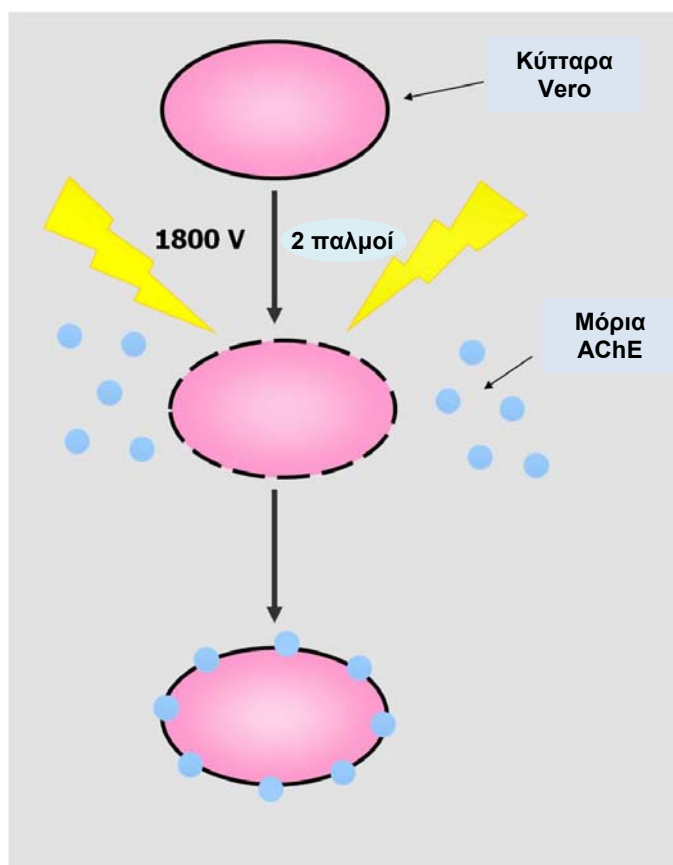
4. Μηχανικές πιπέττες.

2.12.3. Ηλεκτροπόρωση κυττάρων.

Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 1,000 rpm για 5 min, επαναδιαλύθηκαν σε συγκέντρωση 2.5×10^6 κύτ./mL με διάλυμα φωσφορικών που περιείχε AChE (36 μ M) και με διάλυμα που περιείχε AChE (36 μ M) η οποία είχε επωαστεί το προηγούμενο βράδυ με λαουρικό οξύ και αφέθηκαν για επώαση στον πάγο για 20 min. Το διάλυμα φωσφορικών περιείχε τα ακόλουθα:

- 0.14 M NaCl
- 5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- pH 7.4.

Το διάλυμα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε κυβέττες ηλεκτροπόρωσης και τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροπόρωσης. Εφαρμόστηκαν δύο παλμοί των 1,800 V διάρκειας 5 sec. Μετά την ηλεκτροπόρωση τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C για 1 h, φυγοκεντρήθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Moschoroulou & Kintzios, 2006). Η μέθοδος της ηλεκτροπόρωσης των κυττάρων Vero απεικονίζεται στην Εικόνα 2.2.

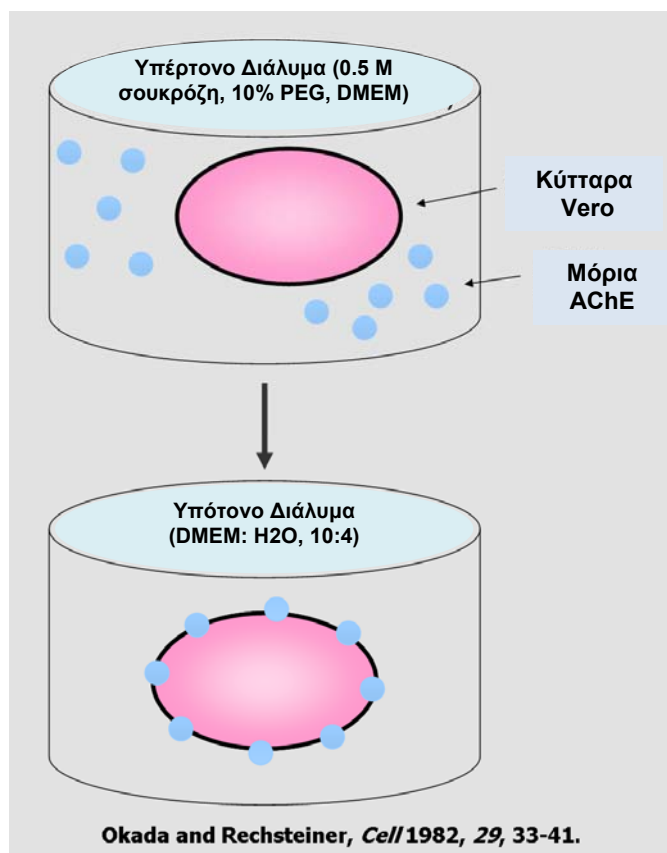


Εικόνα 2.2. Η διαδικασία εισαγωγής της AChE σε κύτταρα Vero με τη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης.

2.12.4. Οσμωτική ένθεση κυττάρων.

Κύτταρα συγκέντρωσης 5×10^6 /mL επώαστηκαν με 7 mM AChE σε υπέρτονο θρεπτικό υλικό DMEM (0,5 M σουκρόζη, 10% PEG, DMEM) για 10 min στους 37°C. Στη συνέχεια, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 1,000 rpm για 5 min, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 min στους 37°C σε υπότονο θρεπτικό DMEM (DMEM:H₂O = 6:4). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 min στις

1,000 rpm και τα κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό DMEM για 3 h στους 37°C (Okada & Rechsteiner, 1982). Η μέθοδος της οσμωτικής ένθεσης απεικονίζεται στην Εικόνα 2.3.



Εικόνα 2.3. Η διαδικασία εισαγωγής της AChE σε κύτταρα Vero με τη μέθοδο της οσμωτικής ένθεσης.

Η βιωσιμότητα των κυττάρων προσδιορίστηκε φωτομετρικά με τη χρώση MTT στα 560 nm για 0, 24 και 48 h (Βλέπε Παραγ. 2.4.3.). Η ενεργότητα της AChE προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Ellman στα 405 nm (Βλέπε Παραγ. 2.7.3.). Οι ολικές πρωτεΐνες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Bradford στα 595 nm (Βλέπε Παραγ. 2.6.3.).

2.13. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Κάθε βιοχημικό πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές. Χρησιμοποιήθηκε το Student's t test για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μέσω του προγράμματος JMP version 10.00 (www.jmp.com). Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά όταν $p < 0.05$.

2.14. Επικύρωση της μεθόδου QuEChERS για τον προσδιορισμό δύο κατηγοριών φυτοπροστατευτικών προϊόντων (νεονικοτινοειδών, αμιδίων του τετρονικού οξέος) σε αγγούρι και τομάτα με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με συζευγμένη φασματομετρία μάζας.

Η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών επιτρέπει τον γρήγορο και αποτελεσματικό προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού ουσιών, που ο προσδιορισμός τους θα ήταν πολύπλοκος με τη χρήση αέριας ή υγρής χρωματογραφίας συνδυαζόμενες με συμβατικούς ανιχνευτές (π.χ. UV). Η εκλεκτικότητα και η ευαισθησία τους βελτιώθηκαν σημαντικά, περιορίστηκε το στάδιο επεξεργασίας των δειγμάτων και πλέον μπορεί να πραγματοποιηθεί αξιόπιστος προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων (Hernandez et al., 2006). Τα τελε-

υταία χρόνια η χρήση της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (LC-MS) γίνεται όλο και περισσότερο δημοφιλής και συμπεριλαμβάνεται σε ποικίλες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό άνω των πενήντα αναλυτών σε λαχανικά.

Στόχος της παρούσας ενότητας ήταν η ανάπτυξη μιας νέας πολυ-υπολειμματικής μεθόδου, το στάδιο επεξεργασίας της οποίας βασίζεται στη μέθοδο QuEChERS και το στάδιο προσδιορισμού στην τεχνική LC-MS. Η μέθοδος αυτή επικυρώθηκε για οχτώ φυτοπροστατευτικά προϊόντα ποικίλων χημικών δομών.

2.14.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.

1. Μεθανόλη, καθαρότητας LC-MS (Fisher Chemical).
2. Νερό για LC-MS (Chem-Lab).
3. Οξικός αιθυλεστέρας (Carlo Erba Reagents).
4. Ακετονιτρίλιο (Fisher Chemical).
5. Κιτ εκχύλισης QuEChERS των 2 mL με κεραμικό ομογενοποιητή με τη μέθοδο EN (Agilent Technologies).
6. Άνυδρο θειικό νάτριο (ACS Carlo Erba Reagents)
7. Φιάλες φυγοκέντρου των 50mL από teflon και με βιδωτό πώμα.
8. Φιάλες φυγοκέντρου των 15mL από polypropylene και με βιδωτό πώμα.
9. Γυάλινα φιαλίδια των 8 mL με πώμα από teflon (PTFE).
10. Εννέα πρότυποι αναλύτες αναφοράς γνωστής καθαρότητας (PESTANAL[®], analytical standard): Acetamiprid, clothianidin, carbofuran, imidacloprid, thiacloprid, thiamethoxam, spirotetramat, spiromesifen, spirotetramat.

2.14.2. Εξοπλισμός.

1. Φυγόκεντρος τουλάχιστον 4000 στροφών / min.
2. Συσκευή υπερήχων.
3. Αναδευτήρας Vortex mixer (K-550-GE, Scientific industries inc. Bohemia).
4. Περιτροφικός Εξατμιστής.
5. Σύστημα Shimadzu LCMS-2010A, με αναλυτή μαζών, με πηγή ηλεκτροδιάχυσης (ESI) με δυνατότητα λειτουργίας θετικού ή αρνητικού ιονισμού. Για τον έλεγχο του συστήματος, την συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία τους χρησιμοποιείται το λογισμικό Varian MS Workstation software version 6.8.
6. Στήλη υγρής χρωματογραφίας Discovery C18 αντίστροφης φάσης, εσωτερικής διαμέτρου 250x4.6 mm, μέγεθος σωματιδίων 5 μM.

2.14.3. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων παρακαταθήκης.

Τα πυκνά διαλύματα παρακαταθήκης της τάξης των 1000 μg/mL παρασκευάστηκαν σε μεθανόλη ξεχωριστά για κάθε αναλύτη, τοποθετήθηκαν σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια με πώμα από Teflon και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Στις συνθήκες αυτές τα διαλύματα παραμένουν σταθερά για χρονικό διάστημα 3 ετών. Η ζύγιση της καθαρής δραστικής ουσίας για την παρασκευή των διαλυμάτων έγινε σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών, ενώ ελήφθη υπόψη και ο βαθμός καθαρότητας τους. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα σε κατάλληλες συγκεντρώσεις ώστε κατά των εμβολιασμό των υποστροφμάτων οι τελικές συγκεντρώσεις να βρίσκονται στα MRLs (δ/μα A) και στο 1/10 των MRLs (δ/μα B) των εντομοκτόνων. Οι συγκεντρώσεις εντομοκτόνων στα διαλύματα A και B απεικονίζονται παρακάτω στους Πίνακες 2.3. και 2.4. Τα Κοινοτικά MRLs με βάση τον Κανονισμό 396/2005 (EU Pesticide database) για το αγγούρι και την τομάτα παρατίθενται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2. Μέγιστα επιτρεπτά όρια (MRLs) με βάση τον κοινοτικό κανονισμό 396/2005 (EU Pesticide database) για το αγγούρι και την τομάτα.

Εντομοκτόνο	Αγγούρι (mg/kg)	Τομάτα (mg/kg)
Acetamiprid	0.3	0.2
Clothianidin	0.02	0.05
Imidacloprid	1	0.5
Thiacloprid	0.3	0.5
Thiamethoxam	0.02	0.05
Spirodiclofen	0.3	1
Spiromesifen	0.1	0.5
Spirotetramat	0.2	2

Πίνακας 2.3. Συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν για τα διαλύματα Α και Β στο υπόστρωμα αγγουριού.

Εντομοκτόνο	Διάλυμα Α (μg/mL)	Διάλυμα Β (μg/mL)
Acetamiprid	45	4.5
Clothianidin	3	3*
Imidacloprid	150	15
Thiacloprid	45	4.5
Thiamethoxam	3	3*
Spirodiclofen	15	3 [#]
Spiromesifen	45	4.5
Spirotetramat	30	3

Πίνακας 2.4. Συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν για τα διαλύματα Α και Β στο υπόστρωμα τομάτας.

Εντομοκτόνο	Διάλυμα Α (μg/mL)	Διάλυμα Β (μg/mL)
Acetamiprid	15	7.5 [#]
Clothianidin	7.5	7.5*
Imidacloprid	75	7.5
Thiacloprid	75	7.5
Thiamethoxam	30	3
Spirodiclofen	45	4.5
Spiromesifen	150	15
Spirotetramat	300	30

* Τα MRLs είναι πολύ χαμηλά και δεν είναι εφικτή η δεκαδική αραιώση.

[#] Το 1/10 του MRL είναι πολύ χαμηλό και έγινε αραιώση στο 1/5 του MRL.

2.14.4. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας (matrix matched standards).

Για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας προτύπων που περιείχαν το υπόστρωμα που αποτελείται από αγγούρι ή τομάτα. Ποσότητα 2 mL εκχυλίσματος αγγουριού ή τομάτας εξατμίστηκε μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου και προστέθηκε 1 mL από το πρότυπο διάλυμα αναφοράς στην επιθυμητή συγκέντρωση. Τα πρότυπα διαλύματα αναφοράς (Δt) παρασκευάστηκαν ώστε να αντιστοιχούν στο 60, 80, 100 και 120% της αναμενόμενης συγκέντρωσης της υπό μελέτη ουσίας στο δείγμα μετά το τέλος της εκχύλισης. Το τελικό διάλυμα τοποθετήθηκε για 30 sec σε λουτρό υπερήχων για καλύτερη διαλυτοποίηση. Ακολούθησε διήθηση από φίλτρο τύπου syringe filter 0,45μm και το διάλυμα τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο 2 mL, πωματίστηκε με PTFE και ήταν έτοιμο για έγχυση στον υγρό χρωματογράφο.

2.14.5. Εκχύλιση των οχτώ φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Η μέθοδος εκχύλισης βασίστηκε στη μέθοδο QuEChERS (Anastassiades et al., 2003), (Anastassiades et al., 2007), (CRL for Single Residue Methods). Αναλυτικότερα, σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 50 mL προστίθενται $20 \pm 0,05$ g (ms) προϊόντος, 133,3 μ L μίγματος ουσιών από τα διαλύματα Α και Β και ακολουθεί ανακίνηση Vortex mixer για 1 min. Στη συνέχεια προστίθενται 20 mL οξικού αιθυλεστέρα, ακολουθεί ανακίνηση για 1 min σε Vortex mixer, και στη συνέχεια 8 g άνυδρου θεικού νατρίου και ακολουθεί έντονη ανακίνηση με το χέρι για 1 min. Φυγοκεντρείται στις 4000 στροφές/ min για 5 min. Στη συνέχεια, 10 mL από το υπερκείμενο υγρό μεταγγίζεται σε γυάλινη φιάλη και τοποθετείται στον περιστροφικό εξατμιστή. Το εκχύλισμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού στους 40 °C, 65 στροφές/ min. Ακολουθεί παραλαβή του εκχυλίσματος με 2 mL ακετονιτριλίου, τα οποία μεταγγίζονται σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 2 mL από το κιτ για εκχύλιση QuEChERS. Μετά από έντονη ανακίνηση με το χέρι για 1 min και φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές/ min για 5 min, τα 1.5 mL από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε φιαλίδιο των 8 mL, ξηραίνονται σε υδατόλουτρο στους 40 °C και επαναδιαλυτοποιούνται με 750 μ L μεθανόλης σε υπερήχους για 30sec. Το διάλυμα που προκύπτει διηθείται από φίλτρο τύπου syringe filter (PTFE) 0,45 μ m σε φιαλίδιο των 2mL και χρησιμοποιείται απευθείας για ανάλυση στο LC-MS.

2.14.6. Προσδιορισμός με υγρή χρωματογραφία–φασματομετρία μαζών.

Χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας Shimadzu LCMS-2010A, θετικού και αρνητικού ιονισμού.

Οι βασικές παράμετροι του φασματόμετρου μάζας ρυθμίστηκαν ως παρακάτω:

- Θερμοκρασία CDL: 300 °C
- Θερμοκρασία διασυνδετή (interface temperature): 300 °C
- Τάση στα άκρα του διασυνδετή (interface voltage): 4.5 V
- Ροή αερίου εκνέφωσης (nebulizing gas): 2.5 L/min
- Θερμοκρασία heat block: 250 °C
- Τάση στα άκρα του ανιχνευτή (detector voltage): 1.5 kV
- CDL voltage: -20 V
- Πολικότητα πηγής ηλεκτροδιάχυσης: Η πηγή ηλεκτροδιάχυσης επιλέχθηκε σε ESI⁺

2.14.7. Προσδιορισμός των οχτώ φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Ο διαχωρισμός των ουσιών έγινε ισοκρατικά για 35 min σε στήλη Discovery C-18, μήκους 25cm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6mm. Η θερμοκρασία στήλης ήταν αυτή του περιβάλλοντος ($25 \pm 4^\circ\text{C}$). Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών MeOH: Νερού (0.1% CH₃COOH) 75:25 (v/v) έχοντας πραγματοποιήσει έγχυση όγκου 20 μ L. Η ροή του διαλύτη έκλουσης ήταν σταθερή 0,5 mL/min. Ο όγκος του τελικού εκχυλίσματος του δείγματος που εγχύθηκε στο LC ήταν 20 μ L. Πριν από κάθε έγχυση ο αυτόματος δειγματολήπτης εκπλύθηκε με διάλυμα μεθανόλης για να αποφευχθούν μολύνσεις.

2.14.8. Ταυτοποίηση.

Η παρουσία των εντομοκτόνων στο δείγμα ταυτοποιείται αφενός με την εμφάνιση χρωματογραφικών κορυφών σε χρόνο πλησίον ($\pm 3\%$) του χρόνου κατακράτησης της πρότυπης ουσίας και αφετέρου από το λόγο των 2 μεταπτώσεων (LC-MS) ο ο-

ποίος πρέπει να πληροί τις απαιτήσεις του Πίνακα 2.5.(http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf):

Πίνακας 2.5. Προϋποθέσεις ταυτοποίησης των εντομοκτόνων με βάση το χρόνο κατακράτησης σε σχέση με το χρόνο κατακράτησης της πρότυπης ουσίας και με βάση το χρόνο μεταπτώσεων.

Σχετική ένταση ιόντος (% της βασικής κορυφής)	LC-MS (επιτρεπόμενη απόκλιση %)
> 50 %	± 20 %
> 20 % ως 50 %	± 25 %
> 10 % ως 20 %	± 30 %
≤ 10%	± 50 %

2.14.9. Προσδιορισμός.

Η περιεκτικότητα του εντομοκτόνου στο δείγμα, σε mg/kg, υπολογίζεται, από την εξίσωση:

$$R\% = f * (\text{Ευρεθείσα Ποσότητα} / \text{Ποσότητα Εμβολιασμού}) * 100$$

όπου:

- Η Ευρεθείσα Ποσότητα του εντομοκτόνου ισούται με τη διαφορά του εμβαδού της ουσίας που εγχύθηκε από το εμβαδό της πλησιέστερης συγκέντρωσης Δt προς τη διαφορά των εμβαδών των συγκεντρώσεων Δt μεταξύ των οποίων βρίσκεται το εμβαδό της ουσίας που εγχύθηκε επί τη διαφορά των συγκεντρώσεων Δt .
- Η Ποσότητα Εμβολιασμού ισούται με την αρχική συγκέντρωση της ουσίας με την οποία εμβολιάστηκε το δείγμα.
- Ο συντελεστής f ισούται με το πηλίκο της αρχικής συγκέντρωσης εμβολιασμού διά την τελική συγκέντρωση που αναμένεται να έχει το δείγμα στο τέλος της εκχύλισης.

2.15. Βολταμετρικός προσδιορισμός νεονικοτινοειδών και αμιδίων του τετρονικού οξέος.

Για τον προσδιορισμό των νεονικοτινοειδών και των αμιδίων του τετρονικού οξέος υπάρχουν αρκετές μέθοδοι ανίχνευσης. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες είναι η αέρια και η υγρή χρωματογραφία (GC, HPLC), η φασματομετρία μαζών (MS) και η αμπερομετρία (Yáñez et al., 2013) (Zhu et al., 2013). Υπάρχουν επίσης και κάποιες ηλεκτροχημικές μέθοδοι όπως η διαφορική παλμική πολαρογραφία (Vílchez et al., 2001) και η αναδιαλυτική βολταμετρία (Guiberteau et al., 2001). Σήμερα οι μοντέρνες βολταμετρικές μέθοδοι σε συνδυασμό με τη μεγάλη ποικιλία ηλεκτροδίων/ συστημάτων ανίχνευσης, είναι απλές, φθηνές, γρήγορες καθώς και είναι αρκετά ευαίσθητες και εκλεκτικές ώστε να χρησιμοποιηθούν, για τον προσδιορισμό μιας μεγάλης κλίμακας ηλεκτροχημικά ενεργών τοξικών ουσιών (Barek et al., 2007) (Wang, 2006).

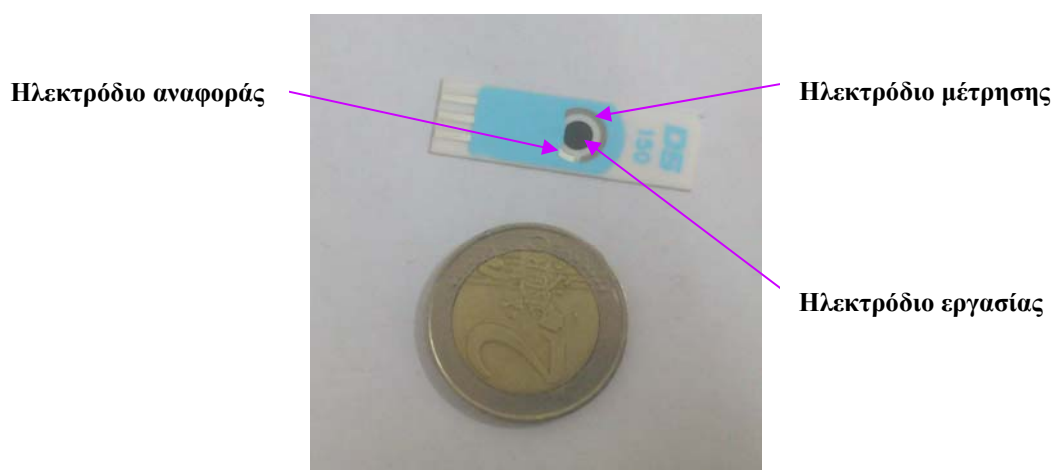
Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη ευνοούν την πόλωση του ηλεκτροδίου εργασίας και ως εκ τούτου χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό στις επιμέρους βολταμετρικές τεχνικές και είναι οι ακόλουθες (Ευσταθίου & Χατζηγιάννου, 1992):

1. Ηλεκτρόδιο εργασίας με μικρή επιφάνεια (Εικόνα 2.4.). Η χρησιμοποίηση ηλεκτροδίου εργασίας με πολύ μικρή επιφάνεια σε σχέση με την επιφάνεια του άλλου ηλεκτροδίου του ηλεκτρολυτικού στοιχείου διασφαλίζει: α) την ταχύτατη πόλωση συγκεντρώσεως στην περιοχή του διαλύματος που το περιβάλλει, β) τιμές ρεύματος, που εξαρτώνται αποκλειστικά από τις φαρανταϊκές διαδικασίες που πραγματοποιούν-

ται σε αυτό και όχι στο βοηθητικό ηλεκτρόδιο και γ) πολύ μικρά ρεύματα (μερικές δεκάδες μA ή μικρότερα), γεγονός που επιτρέπει να θεωρηθούν οι μετρήσεις μη καταστροφικές για το δείγμα, αφού μόνο ένα πολύ μικρό κλάσμα της ηλεκτρενεργού ουσίας του ηλεκτρολυτικού διαλύματος υφίσταται οξείδωση ή αναγωγή κατά τη διάρκεια κάθε μέτρησης.

2. Ακίνησια διαλύματος. Το διάλυμα στην ηλεκτρολυτική κυψελίδα διατηρείται ακίνητο (δεν αναδεύεται), γεγονός, που σε συνδυασμό με τη μικρή επιφάνεια εργασίας, επιταχύνει την πόλωση συγκεντρώσεως.

3. Υλικό ηλεκτροδίου εργασίας. Ως υλικό ηλεκτροδίου εργασίας χρησιμοποιούνται κατά το δυνατόν χημικώς αδρανή υλικά, όπως ευγενή μέταλλα, υδράργυρος και διάφορες αγωγίμες μορφές άνθρακα (υαλώδης άνθρακας ή γραφίτης).



Εικόνα 2.4. Ηλεκτρόδιο εργασίας με μικρή επιφάνεια που χρησιμοποιήθηκε στις βολταμετρικές μεθόδους της μελέτης. Το ηλεκτρόδιο αναφοράς είναι κατασκευασμένο από άργυρο ενώ τα ηλεκτρόδια μέτρησης και εργασίας (διάμετρος 4 mm) από άνθρακα.

2.15.1. Υλικά και Αντιδραστήρια.

1. Μεθανόλη, καθαρότητας LC-MS (Fisher Chemical).
2. Βορικό οξύ H_3BO_3 (Merck)
3. Φωσφορικό οξύ H_3PO_4 85% (Chem-Lab)
4. Οξικό οξύ CH_3COOH (Merck)
5. Οχτώ πρότυποι αναλύτες αναφοράς γνωστής καθαρότητας (PESTANAL[®], analytical standard): Acetamiprid, clothianidin, carbofuran, imidacloprid, thiacloprid, thiamethoxam, spiroticlofen, spiromesifen, spirotetramat.

2.15.2. Εξοπλισμός.

1. Ποτενσιοστάτης PG581 (Uniscan) (Εικόνα 2.5.)
2. Πρόγραμμα λογισμικού βολταμετρίας (UiEChemTM)
3. Εκτυπωμένα ηλεκτρόδια DS 150 (DropSens)
4. Μηχανικές πιπέττες



Εικόνα 2.5. Σύστημα ποτενσιοστάτη PG581 (Uniscan) συνδεδεμένο με μετασχηματιστή ηλεκτρικού σήματος που συνδέει τα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια άνθρακα με τον ποτενσιοστάτη.

2.15.3. Κυκλική βολταμετρία για τον προσδιορισμό των νεονικοτινοειδών και αμιδίων του τετρονικού οξέος.

Η κυκλική βολταμετρία (cyclic voltametry, CV) είναι μία ειδική βολταμετρική τεχνική ταχείας σαρώσεως, στην οποία το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας μεταβάλλεται μεταξύ δύο τιμών E1 και E2, κατά κυκλικό τρόπο. Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε βολταμετρικός προσδιορισμός των διαλυμάτων των οχτώ φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η τελική συγκέντρωση της MeOH στα διαλύματα μέτρησης ήταν 2% σε διάλυμα Britton-Robinson (Thomas, Britton & Robinson, 1931). Το διάλυμα Britton-Robinson περιείχε τα ακόλουθα:

- 0.04 M H₃BO₃
- 0.04 M H₃PO₄
- 0.04 M CH₃COOH
- pH 7.

Αρχικά έγινε καταγραφή του θορύβου ανά ηλεκτρόδιο και στη συνέχεια έγινε προσθήκη κάθε της συγκέντρωσης κάθε εντομοκτόνου και ακολούθησε επανάληψη του κύκλου. Ως εμβαδόν των κορυφών θεωρήθηκε η διαφορά των κορυφών των δύο βολταμογραφημάτων και ο προσδιορισμός γινόταν πάντα στον 1^ο κύκλο.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των εντομοκτόνων και σε διαλύματα κυττάρων N2a συγκέντρωσης 10⁶ κυτ./mL (σε PBS). Η σταγόνα στο ηλεκτρόδιο είχε όγκο 50 μL. Ο ρυθμός σάρωσης και στις δύο περιπτώσεις ήταν $v_{CV} = 25 \text{ mV s}^{-1}$ (Guzsvany et al., 2005) (Guzsvany et al., 2011).

2.15.4. Διαφορική παλμική βολταμετρία για τον προσδιορισμό των νεονικοτινοειδών και αμιδίων του τετρονικού οξέος.

Η παλμική βολταμετρία αναπτύχθηκε για να συμπίεσει το χωρητικό ρεύμα υποβάθρου στη μέτρηση του ρεύματος, με αποτέλεσμα το όριο ανίχνευσης αυτής της τεχνικής να είναι χαμηλότερο απ' αυτό της κλασσικής πολαρογραφίας. Κατά τη διάρκεια της μελέτης εφαρμόστηκαν διαφορικές παλμικές κυματομορφές. Η διάρκεια

των παλμών ήταν 50 ms. Μετά την εφαρμογή του παλμού, το χωρητικό ρεύμα φθίνει ταχέως, ενώ το φαρανταϊκό φθίνει βραδύτερα. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι μεγαλύτερη 5 έως 7 φορές συγκρινόμενη με αυτή της κλασσικής πολαρογραφίας. (Parry & Osteryoung, 1965) (Wang, 1988).

Στη διαφορική παλμική βολταμετρία (differential pulse voltametry), οι παλμοί σταθερού πλάτους (5-100 mV) που υπερτίθενται σε γραμμικώς μεταβαλλόμενο δυναμικό εφαρμόζονται στο ηλεκτρόδιο εργασίας στη χρονική στιγμή αμέσως μετά το τέλος της σταγόνας. Η δειγματοληψία του ρεύματος έγινε 2 φορές, ακριβώς πριν την εφαρμογή και πριν το τέλος του παλμού. Το μέγεθος του πρώτου ρεύματος αφαιρέθηκε αυτόματα από το μέγεθος του δεύτερου και αυτή η διαφορά καταγράφηκε σε σχέση με το εφαρμοζόμενο δυναμικό. (Parry & Osteryoung, 1965).

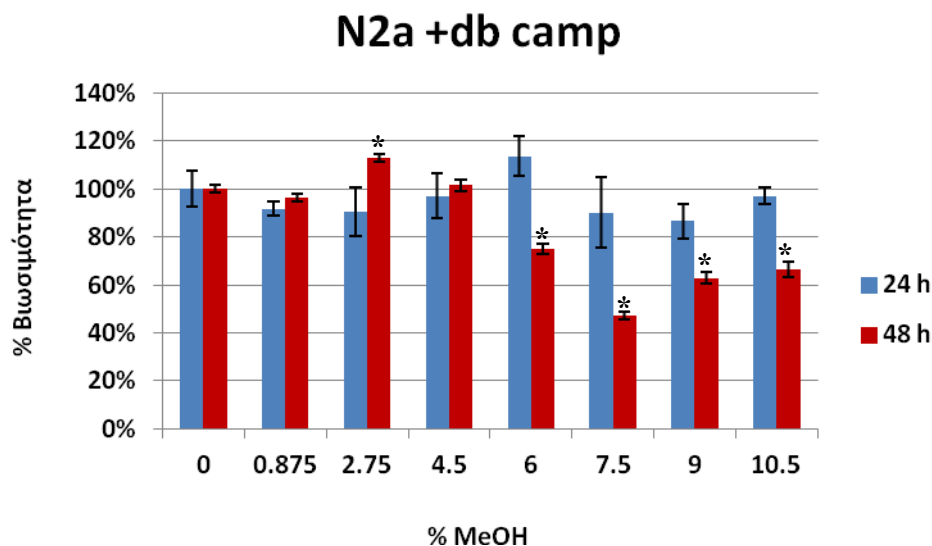
Όπως και προηγουμένως, έγινε βολταμετρικός προσδιορισμός των διαλυμάτων των οχτώ φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η τελική συγκέντρωση της MeOH στα διαλύματα μέτρησης ήταν 2% σε διάλυμα Britton Robinson. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των εντομοκτόνων και σε διαλύματα κυττάρων N2a συγκέντρωσης 10^6 κυτ./mL (σε PBS). Οι παράμετροι λειτουργίας της διαφορικής παλμικής βολταμετρίας (DPV) ήταν Ύψος παλμών, $\Delta E = 50$ mV, Διάρκεια παλμών, $w = 50$ ms, και Ρυθμός σάρωσης, $v_{DPV} = 25$ mV s⁻¹ (Guzsvany et al., 2005) (Guzsvany et al., 2011).

ΕΝΟΤΗΤΑ Γ

Αποτελέσματα

3.1. Επίδραση της MeOH στις κυτταροκαλλιέργειες N2a και N2a+db cAMP.

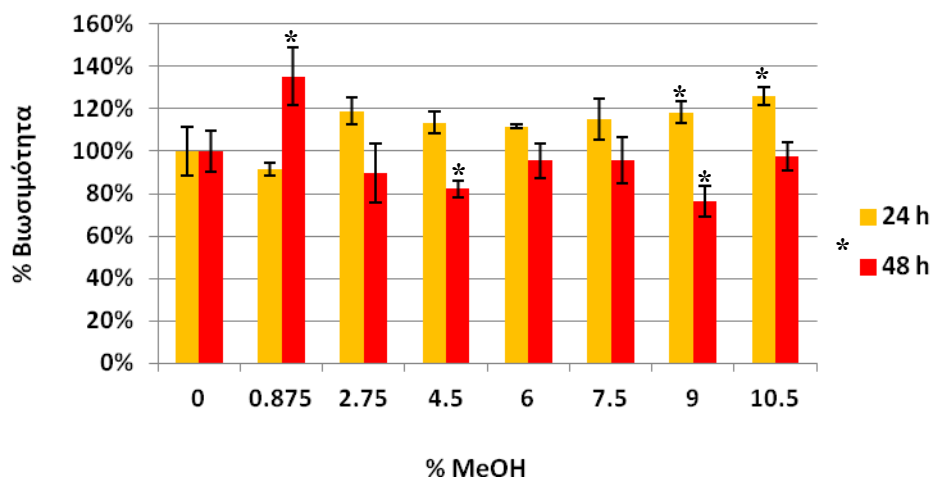
Στην δοκιμασία τοξικότητας της MeOH προσδιορίστηκε η επί τοις εκατό (%) βιωσιμότητα κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db-cAMP και μη διαφοροποιημένων μετά από εφαρμογή μεθανόλης MeOH για 24 και 48 h με τη φωτομετρική μέθοδο πρόσληψης της χρωστικής MTT.



Εικόνα 3.1. Δοκιμασία τοξικότητας διαβαθμισμένων δόσεων MeOH σε κύτταρα N2a +db cAMP στις 24 (μπλε χρώμα) και 48 ώρες (μπορντό χρώμα) μετά την εφαρμογή της ουσίας. Τα νεκρά κύτταρα και όσα έχουν υποστεί βλάβες δε χρωματίζονται, ενώ τα ζώντα εμφανίζονται με μπλε χρώμα. Παρουσιάζεται η επί τοις εκατό βιωσιμότητα των κυττάρων με \pm % σφάλμα, * $p < 0,05$.

Παρατηρήθηκε ότι η τοξικότητα της μεθανόλης ήταν χρονοεξαρτώμενη και ανάλογα την περίπτωση, δόσοεξαρτώμενη ή μη. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα βιωσιμότητας των κυττάρων N2a +db cAMP (Εικόνα 3.1.) στις 24 ώρες μετά την χορήγηση της MeOH, ήταν ανάλογα των δόσεων που εφαρμόστηκε στις καλλιέργειες μέχρι τη συγκέντρωση 0.45% ενώ στη συνέχεια άρχισε να παρατηρείται μία πτωτική τάση. Στις 48 h δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές μέχρι τη συγκέντρωση 0.6%. Στα 0.75% παρατηρήθηκε μία αύξηση του ποσοστού βιωσιμότητας, ενώ στη συνέχεια ξεκίνησε και εδώ μια ελαφρά πτώση. Η χρωστική MTT μετράει τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα μιτοχονδριακή δραστηριότητα των κυττάρων συνεπώς η αύξηση του ποσοστού βιωσιμότητας πιθανόν να οφείλεται σε αυξημένη μιτοχονδριακή λειτουργία λόγω κυτταρικού στρες στις χαμηλές συγκεντρώσεις MeOH.

N2a



Εικόνα 3.2. Δοκιμασία τοξικότητας διαβαθμισμένων δόσεων MeOH σε κύτταρα N2a στις 24 (κίτρινο χρώμα) και 48 ώρες (πορτοκαλί χρώμα) μετά την εφαρμογή της ουσίας. Τα νεκρά κύτταρα και όσα έχουν υποστεί βλάβες δε χρωματίζονται, ενώ τα ζώντα εμφανίζονται με μπλε χρώμα. Παρουσιάζεται η επί τοις εκατό βιωσιμότητα των κυττάρων με \pm % σφάλμα, * $p < 0,05$.

Τα ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων N2a (Εικόνα 3.2.) στις 24 ώρες μετά την εφαρμογή διαβαθμισμένων δόσεων MeOH, εμφανίζουν μια αύξηση μέχρι και τη συγκέντρωση του ποσοστού 10.5%. Αντίθετα, στις 48 h το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων ακολουθεί μια αντιστρόφως ανάλογη πορεία με μία πτώση που φτάνει κοντά στο 50 % στη συγκέντρωση 9%. Η διαφορά μεταξύ των δύο τύπων κυττάρων πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι τα διαφοροποιημένα κύτταρα συμπεριφέρονται ως κανονικά κύτταρα συνεπώς έχουν διαφορετικές ιδιότητες από τα καρκινικά (Prasad et al., 1974).

Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων και της διαλυτότητας των ουσιών, στο επόμενο βήμα της πειραματικής διαδικασίας που ήταν η δοκιμασία τοξικότητας στα νεοειδικά και στα αμύδια του τετρονικού οξέος, τα εντομοκτόνα που εφαρμόστηκαν στα κύτταρα N2a db-camp και N2a διαλύθηκαν σε MeOH τελικής συγκέντρωσης 0.1 έως 0.3% .

3.2. Επίδραση των εντομοκτόνων στη βιωσιμότητα διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κυττάρων N2a.

Η επίδραση των εντομοκτόνων στη βιωσιμότητα διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κυττάρων N2a προσδιορίστηκε φωτομετρικά και φθορισμομετρικά μετά από επώαση για 30 min, 24 ώρες και 48 ώρες. Ο φωτομετρικός προσδιορισμός έγινε με μέτρηση πρόσληψης των χρωστικών MTT και ουδέτερου ερυθρού (NR). Η δοκιμή MTT παρουσιάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων μέσω καταγραφής της μιτοχονδριακής δραστηριότητας ενώ το NR που έχει την ιδιότητα να προσκολλάται στα λυσοσώματα των ζωντανών κυττάρων αποτελεί επίσης ένα δείκτη κυτταρικής βιωσιμότητας. Ο φθορισμομετρικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής ιωδιούχο προπίδιο (PI). Το PI που έχει την ιδιότητα να προσδένεται στο DNA των νεκρών κυττάρων, διευκολύνει την εκτίμηση προσδιορισμού της κυτταροτοξικότητας φαρμάκων και ξеноβιοτικών.

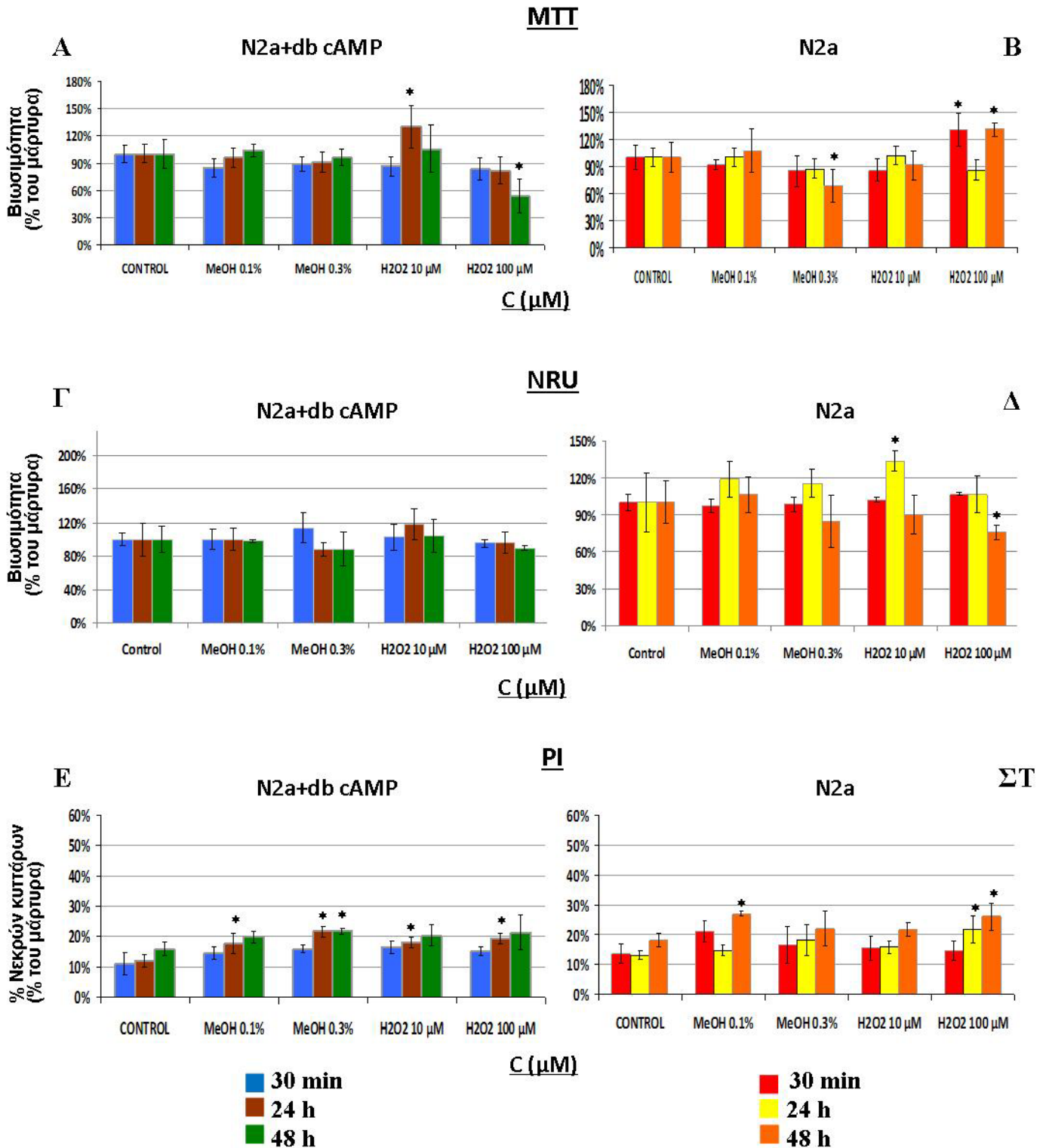
Στις Εικόνες 3.3.-3.11. που ακολουθούν απεικονίζονται διαγραμματικά τα αποτελέσματα της επίδρασης των εντομοκτόνων σε κύτταρα N2a. Σε κάθε Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τριών διαφορετικών μεθόδων προσδιορισμού της

κυτταρικής βιωσιμότητας ανά ουσία για κύτταρα διαφοροποιημένα με db cAMP και για μη διαφοροποιημένα κύτταρα.

Στην Εικόνα 3.3. απεικονίζονται τα ποσοστά της βιωσιμότητας κυττάρων N2a διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων μετά από επώασή τους με MeOH σε συγκεντρώσεις 0.1% και 0.3% καθώς και H₂O₂ σε συγκεντρώσεις 10 μM και 100 μM. Στα διαγράμματα Α και Β παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δοκιμής πρόσληψης του MTT και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό βιωσιμότητας σε σχέση με το μάρτυρα (κύτταρα που επώαστηκαν χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας). Στα διαγράμματα Γ και Δ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δοκιμής πρόσληψης του NR και τα αποτελέσματα εκφράζονται επίσης ως ποσοστό βιωσιμότητας σε σχέση με το μάρτυρα (κύτταρα που επώαστηκαν χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας). Στα διαγράμματα Ε και ΣΤ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δοκιμής πρόσληψης του PI και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστά νεκρών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα (κύτταρα όπου προστέθηκε 0.1% Triton X). Όσον αφορά τα διαφοροποιημένα κύτταρα οι μπλε στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 30 min, οι καφέ στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 24 h και οι πράσινες στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 48 h.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3. το H₂O₂ που χρησιμοποιήθηκε ως ουσία-μάρτυρας που προκαλεί κυτταρικό θάνατο δε φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα τα κύτταρα με εξαίρεση τη συγκέντρωση 100 μM στη 48ωρη επώαση (Α, Β, Γ και Δ). Κατά τη δοκιμή πρόσληψης του PI, εκτός από το H₂O₂ και η MeOH φαίνεται να έχει μια μικρή επίδραση την αύξηση του ποσοστού των νεκρών κυττάρων κυρίως στις 24 ώρες στα διαφοροποιημένα κύτταρα.

ΜΑΡΤΥΡΕΣ

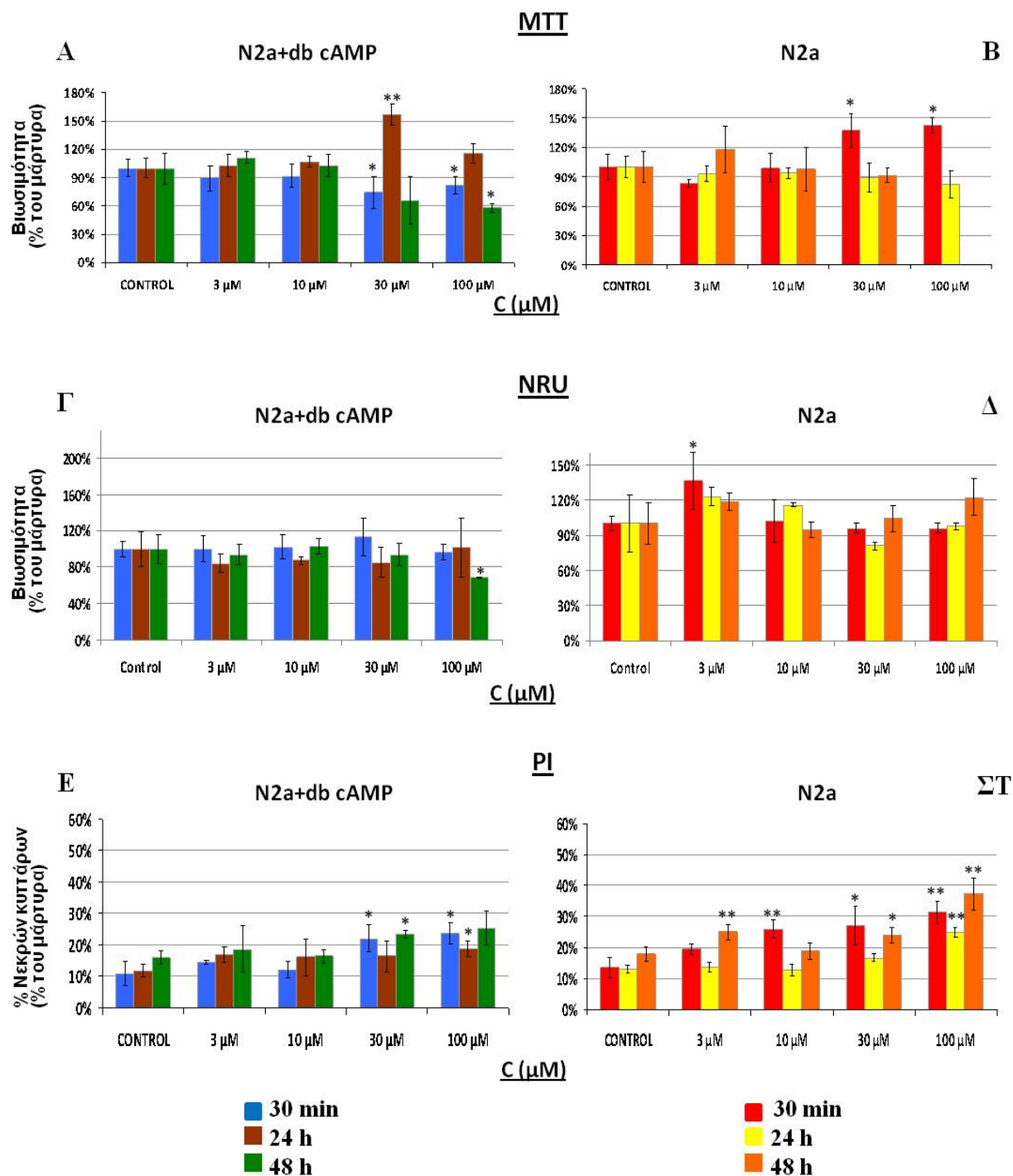


Εικόνα 3.3. Απεικονίζεται η βιωσιμότητα κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db cAMP και μη διαφοροποιημένων μετά από επώαση με MeOH και H₂O₂ για 30 min, 24h και 48 h. Στα διαγράμματα Α (N2a+db cAMP) και Β (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Στα διαγράμματα Γ (N2a+db cAMP) και Δ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής NR. Στα διαγράμματα Ε (N2a+db cAMP) και ΣΤ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των νεκρών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής PI με ± % σφάλμα, *p<0,05 **p<0,01.

Στην Εικόνα 3.4. απεικονίζονται τα ποσοστά της βιωσιμότητας κυττάρων N2a διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων μετά από επώασή τους με το εντομοκτόνο imidacloprid σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Ένα αυξημένο ποσοστό βιωσιμότητας φάνηκε κατά τη δοκιμή MTT στην περίπτωση των διαφοροποιημένων κυττάρων (A) στη συγκέντρωση 30 μM που πιθανώς να οφείλεται απλώς σε αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα αφού οι άλλες δοκιμές δεν έδειξαν ένα ανάλογο αποτέλεσμα. Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων αν και δε φαίνεται κάποια σημαντική μεταβολή από τις δοκιμές MTT και NR, η δοκιμή PI παρουσιάζει μία σχετικά γραμμική μεταβολή της αύξησης του ποσοστού των νεκρών κυττάρων στη μισάωρη και στη 48ωρη επώαση. Η μεταβολή αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τη 48ωρη επώαση στη συγκέντρωση των 100 μM όπου το ποσοστό των νεκρών κυττάρων φαίνεται να ξεπερνά το 35 %.

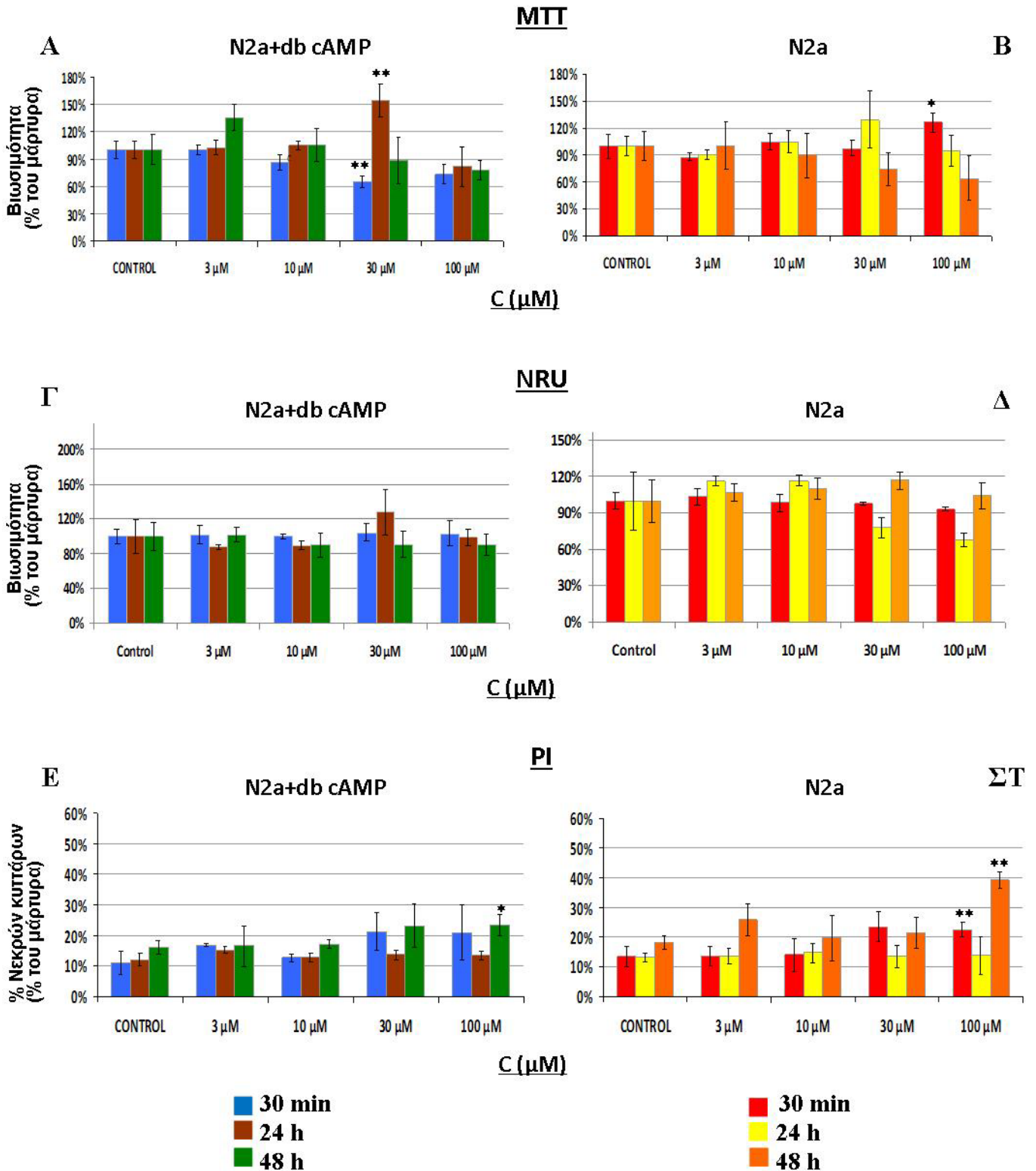
Στην Εικόνα 3.5. απεικονίζονται τα ποσοστά της βιωσιμότητας κυττάρων N2a διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων μετά από επώασή τους με το εντομοκτόνο clothianidin σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Όπως και στην Εικόνα 3.4.A. ένα αυξημένο ποσοστό βιωσιμότητας φάνηκε κατά τη δοκιμή MTT στην περίπτωση των διαφοροποιημένων κυττάρων (A) στη συγκέντρωση 30 μM που πιθανώς να οφείλεται απλώς σε αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα αφού οι άλλες δοκιμές δεν έδειξαν ένα ανάλογο αποτέλεσμα. Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων δεν παρατηρείται κάποια σημαντική μεταβολή στις τρεις μικρότερες συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου, από τις δοκιμές MTT (B) και PI (ΣΤ) παρουσιάζεται μία σημαντική μεταβολή του ποσοστού των νεκρών κυττάρων στη μισάωρη και στη 48ωρη επώαση. Η μεταβολή αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τη 48ωρη επώαση στη συγκέντρωση των 100 μM όπου το ποσοστό των νεκρών κυττάρων φαίνεται να πλησιάζει το 40 %.

IMIDACLOPRID



Εικόνα 3.4. Απεικονίζεται η βιωσιμότητα κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db cAMP και μη διαφοροποιημένων μετά από επώαση με imidacloprid σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM για 30 min, 24h και 48 h. Στα διαγράμματα A (N2a+db cAMP) και B (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Στα διαγράμματα Γ (N2a+db cAMP) και Δ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής NR. Στα διαγράμματα Ε (N2a+db cAMP) και ΣΤ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των νεκρών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής PI με \pm % σφάλμα, *, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

CLOTHIANIDIN

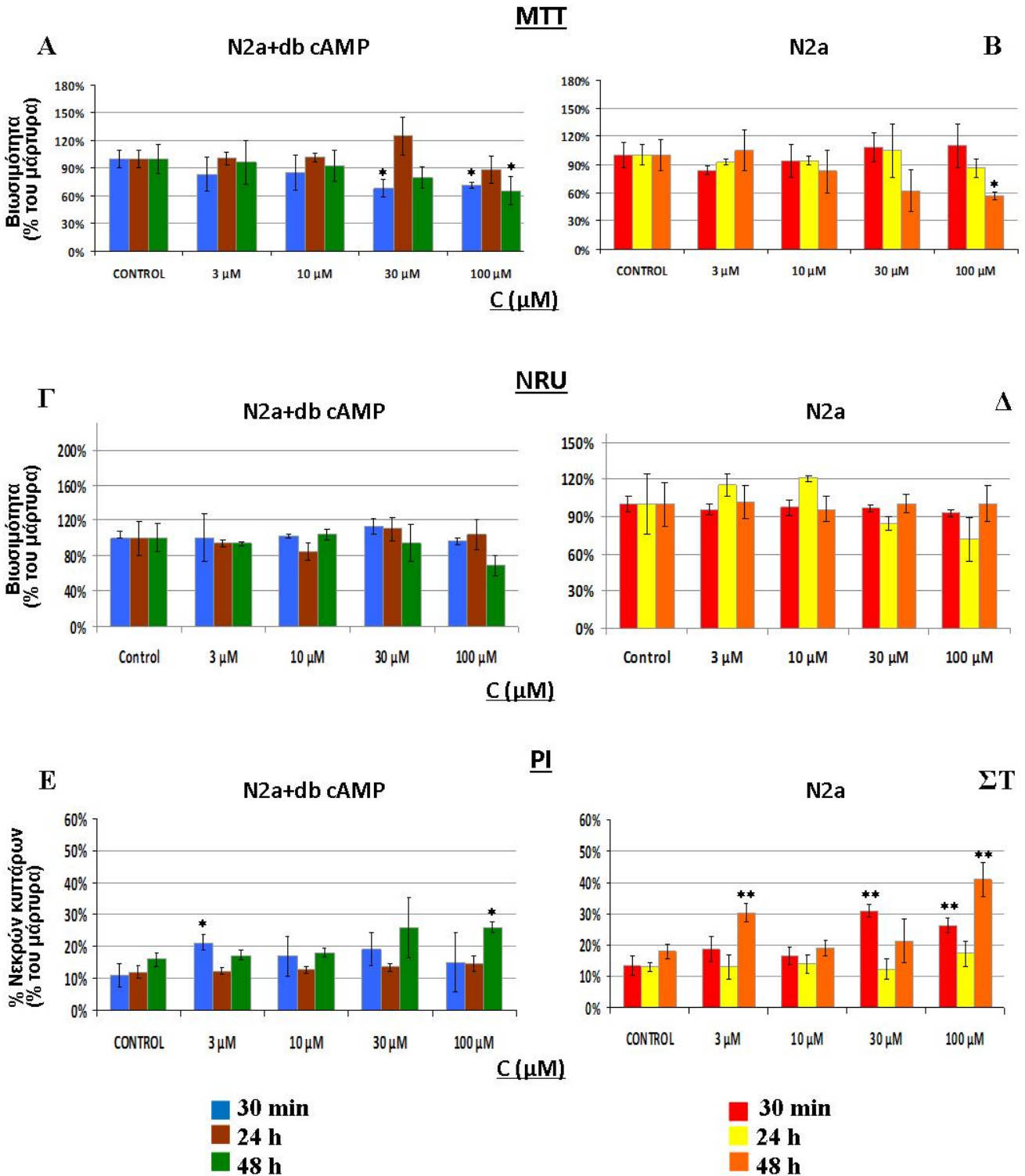


Εικόνα 3.5. Απεικονίζεται η βιωσιμότητα κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db cAMP και μη διαφοροποιημένων μετά από επώαση με clothianidin σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM για 30 min, 24h και 48 h. Στα διαγράμματα A (N2a+db cAMP) και B (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Στα διαγράμματα Γ (N2a+db cAMP) και Δ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής NR. Στα διαγράμματα E (N2a+db cAMP) και ΣΤ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των νεκρών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής PI με ± % σφάλμα, *p<0,05 **p<0,01.

Στην Εικόνα 3.6. απεικονίζονται τα ποσοστά της βιωσιμότητας κυττάρων N2a διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων μετά από επώασή τους με το εντομοκτόνο thiacloprid σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Στα διαφοροποιημένα κύτταρα το thiacloprid δεν παρουσίασε πολύ σημαντικές μεταβολές στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Εξάιρεση αποτελεί η συγκέντρωση 100 μM όπου τόσο κατά τη δοκιμή MTT (A) όσο και κατά τη δοκιμή του PI (E) υπήρξε μία μείωση της βιωσιμότητας της τάξης του 25 %. Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων αν και δε φαίνεται κάποια σημαντική μεταβολή από τις δοκιμές MTT (B) και NR (Δ), η δοκιμή PI (ΣT) παρουσιάζει μία σημαντική μεταβολή της αύξησης του ποσοστού των νεκρών κυττάρων στη μισάωρη και στη 48ωρη επώαση. Η μεταβολή αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τη 48ωρη επώαση στη συγκέντρωση των 100 μM όπου το ποσοστό των νεκρών κυττάρων φαίνεται να ξεπερνά το 42 %.

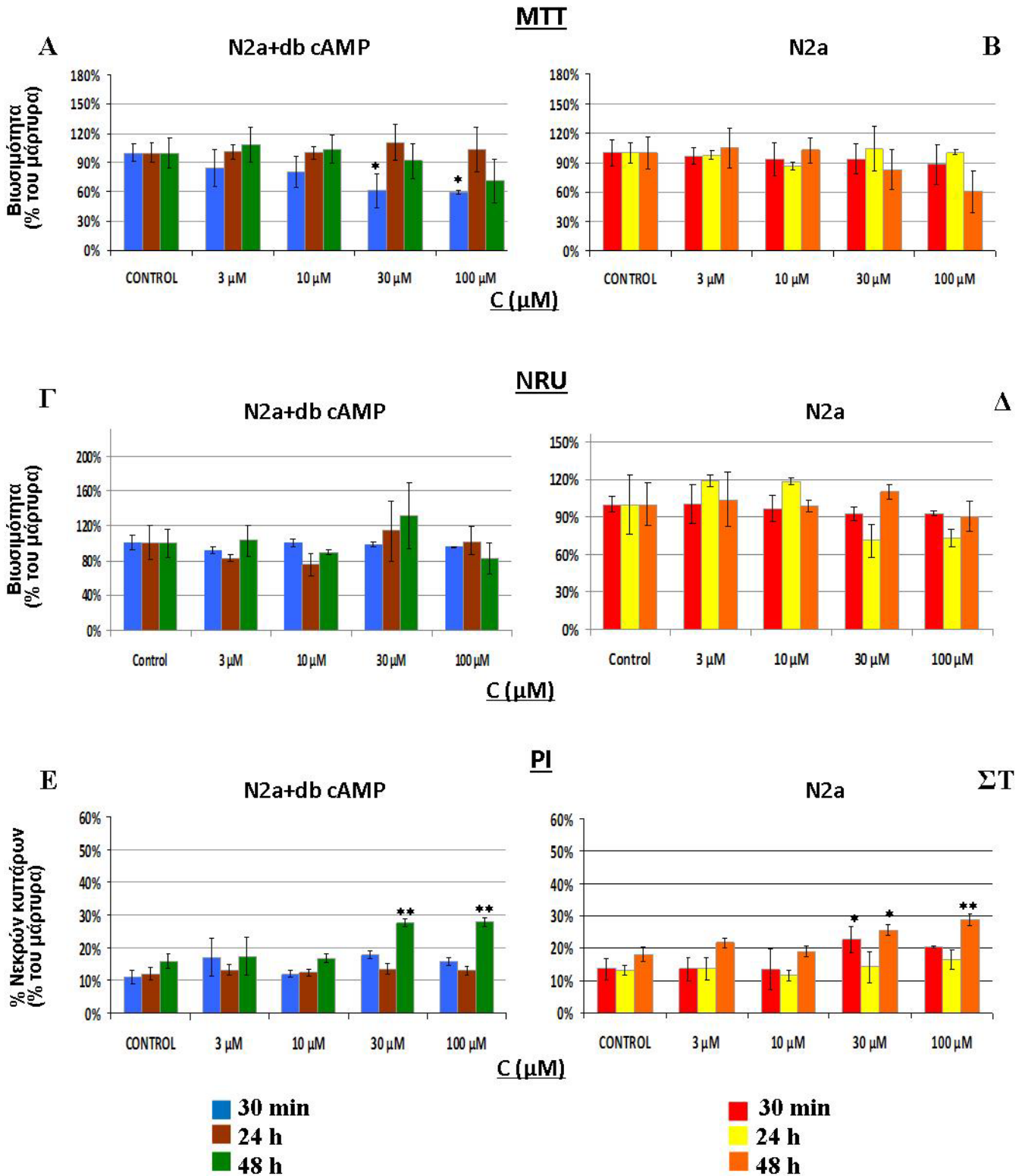
Στην Εικόνα 3.7. απεικονίζονται τα ποσοστά της βιωσιμότητας κυττάρων N2a διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων μετά από επώασή τους με το εντομοκτόνο acetamiprid σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Ένα αυξημένο ποσοστό μείωσης της βιωσιμότητας φάνηκε κατά τη δοκιμή MTT στην περίπτωση των διαφοροποιημένων κυττάρων (A) στη συγκέντρωση 30 μM και 100 μM , που υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα του PI (E). Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων αν και δεν παρατηρείται κάποια σημαντική μεταβολή στις δοκιμές MTT (B) και NR (Δ), στη δοκιμή του PI (ΣT) παρουσιάζεται μία σημαντική μεταβολή του ποσοστού των νεκρών κυττάρων στη μισάωρη και στη 48ωρη επώαση. Η μεταβολή αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική ιδίως κατά τη 48ωρη επώαση στη συγκέντρωση των 100 μM όπου το ποσοστό των νεκρών κυττάρων φαίνεται να πλησιάζει το 28 %.

THIACLOPRID



Εικόνα 3.6. Απεικονίζεται η βιωσιμότητα κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db cAMP και μη διαφοροποιημένων μετά από επώαση με thiachlorid σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM για 30 min, 24h και 48 h. Στα διαγράμματα A (N2a+db cAMP) και B (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Στα διαγράμματα Γ (N2a+db cAMP) και Δ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής NR. Στα διαγράμματα E (N2a+db cAMP) και ΣΤ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των νεκρών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής PI με \pm % σφάλμα, *, * $p < 0,05$ **, ** $p < 0,01$.

ACETAMIPRID

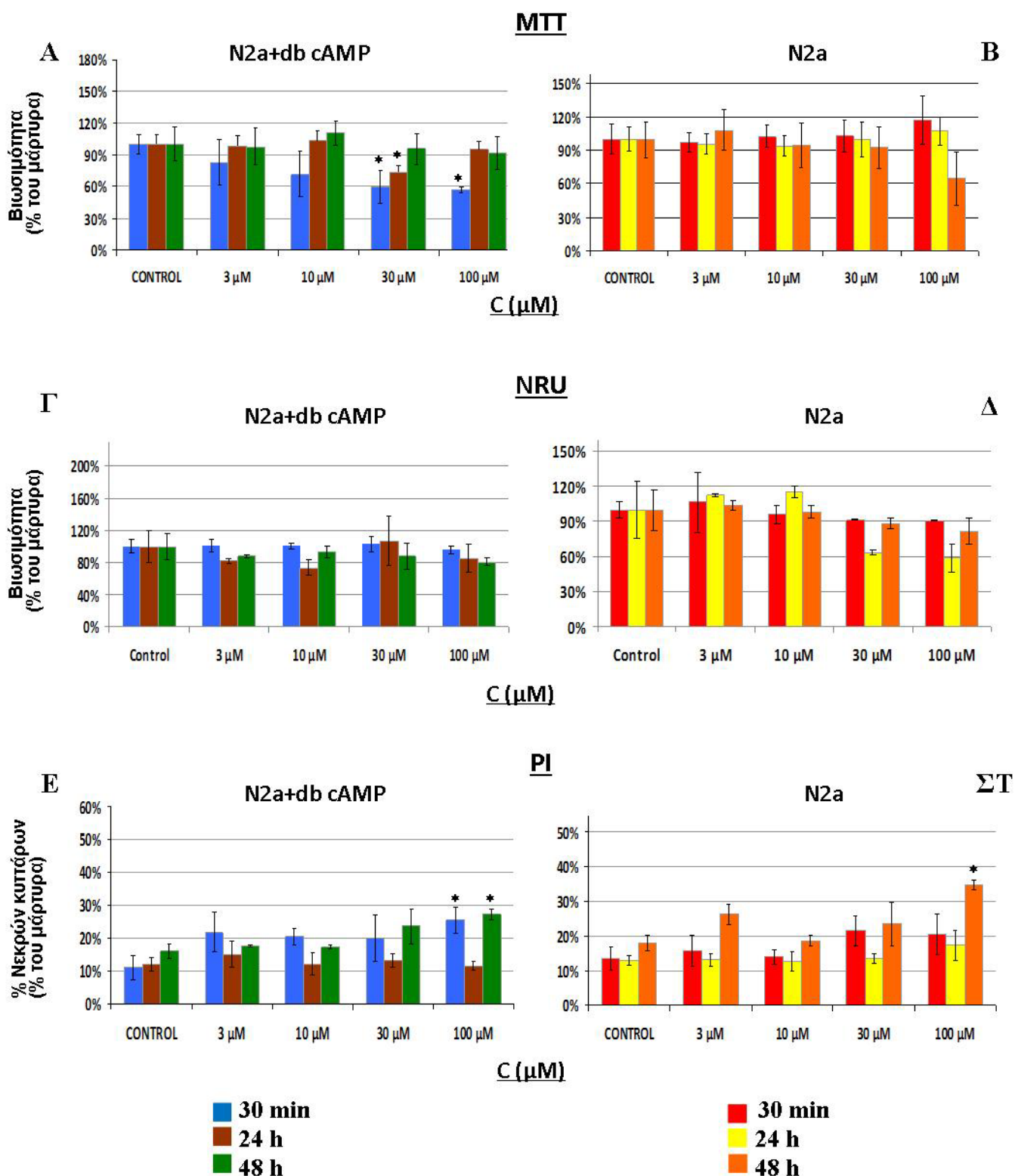


Εικόνα 3.7. Απεικονίζεται η βιωσιμότητα κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db cAMP και μη διαφοροποιημένων μετά από επώαση με acetamiprid σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM για 30 min, 24h και 48 h. Στα διαγράμματα A (N2a+db cAMP) και B (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Στα διαγράμματα Γ (N2a+db cAMP) και Δ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής NR. Στα διαγράμματα E (N2a+db cAMP) και ΣΤ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των νεκρών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής PI με ± % σφάλμα, *, *p<0,05 **p<0,01.

Στην Εικόνα 3.8. απεικονίζονται τα ποσοστά της βιωσιμότητας κυττάρων N2a διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων μετά από επώασή τους με το εντομοκτόνο thiamethoxam σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Στα διαφοροποιημένα κύτταρα το thiamethoxam παρουσίασε σημαντικές μεταβολές στη βιωσιμότητα των κυττάρων ιδίως στη συγκέντρωση 100 μM όπου τόσο κατά τη δοκιμή MTT (A) όσο και κατά τη δοκιμή του PI (E) υπήρξε μία μείωση της βιωσιμότητας της τάξης του 40 και 27 % αντίστοιχα. Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων δε φαίνεται κάποια σημαντική μεταβολή από τις δοκιμές MTT (B) και NR (Δ). Η δοκιμή PI (ΣT) παρουσιάζει μία σημαντική μεταβολή της αύξησης του ποσοστού των νεκρών κυττάρων στη 48ωρη επώαση. Η μεταβολή αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τη 48ωρη επώαση στη συγκέντρωση των 100 μM όπου το ποσοστό των νεκρών κυττάρων φαίνεται να ξεπερνά το 42 %.

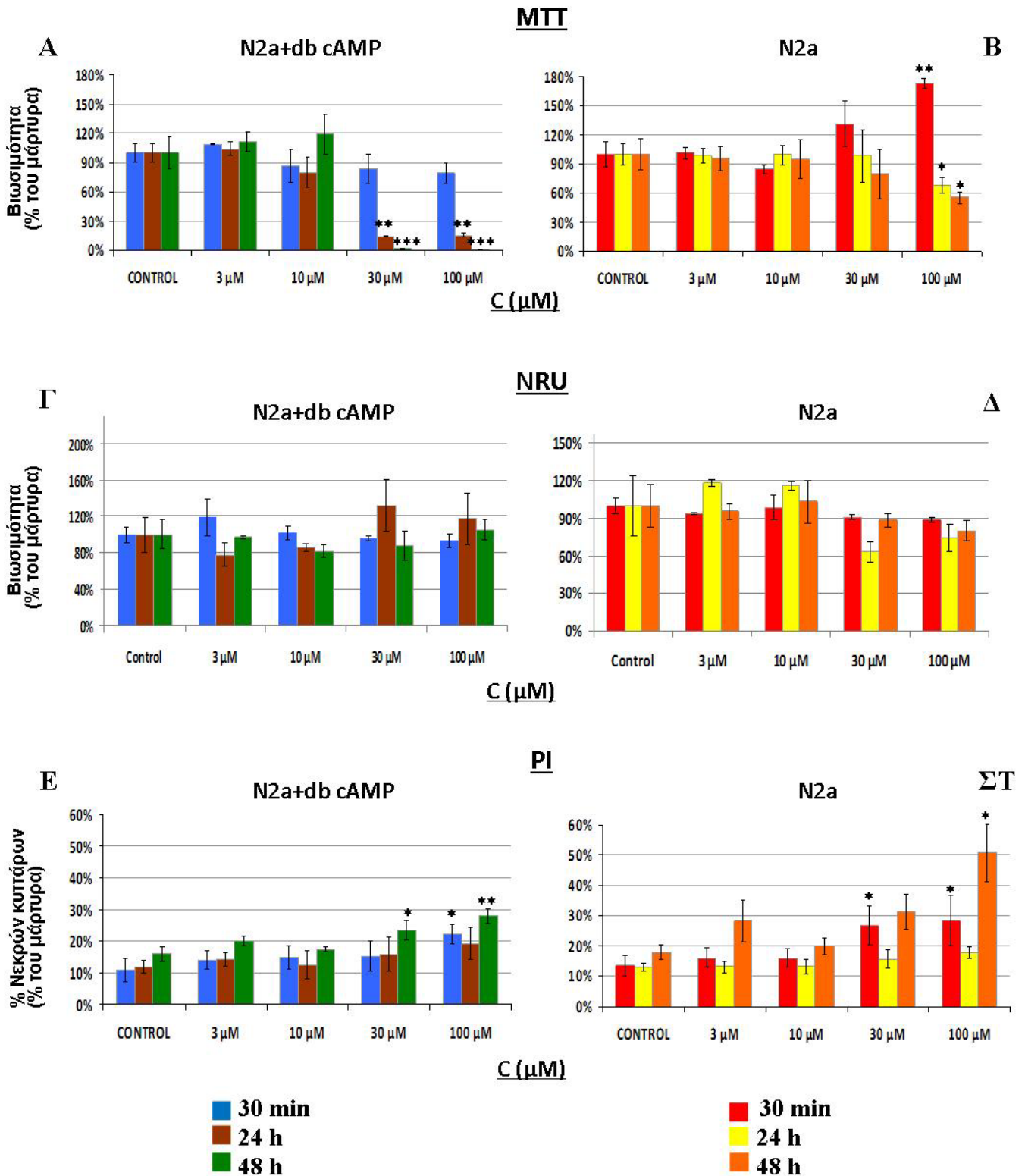
Στην Εικόνα 3.9. απεικονίζονται τα ποσοστά της βιωσιμότητας κυττάρων N2a διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων μετά από επώασή τους με το εντομοκτόνο spiromesifen σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Ένα πολύ αυξημένο ποσοστό μείωσης της βιωσιμότητας (12 και 8 %) φάνηκε κατά τη δοκιμή MTT στην περίπτωση των διαφοροποιημένων κυττάρων (A) στις συγκεντρώσεις 30 μM και 100 μM στις 48 ώρες, που υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα του PI (E). Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων αν και δεν παρατηρείται κάποια σημαντική μεταβολή στη δοκιμή NR (Δ), στη δοκιμή MTT (B) παρουσιάζεται μία σημαντική αύξηση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων στη μισάωρη και στη 48ωρη επώαση που πιθανώς οφείλεται σε αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα. Αυτό υποστηρίζεται και από τη δοκιμή PI (ΣT) όπου το ποσοστό των νεκρών κυττάρων έχει φτάσει το 50 %.

THIAMETHOXAM



Εικόνα 3.8. Απεικονίζεται η βιωσιμότητα κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db cAMP και μη διαφοροποιημένων μετά από επώαση με thiamethoxam σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM για 30 min, 24h και 48 h. Στα διαγράμματα A (N2a+db cAMP) και B (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Στα διαγράμματα Γ (N2a+db cAMP) και Δ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής NR. Στα διαγράμματα E (N2a+db cAMP) και ΣΤ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των νεκρών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής PI με ± % σφάλμα, *p<0,05 **p<0,01.

SPIROMESIFEN

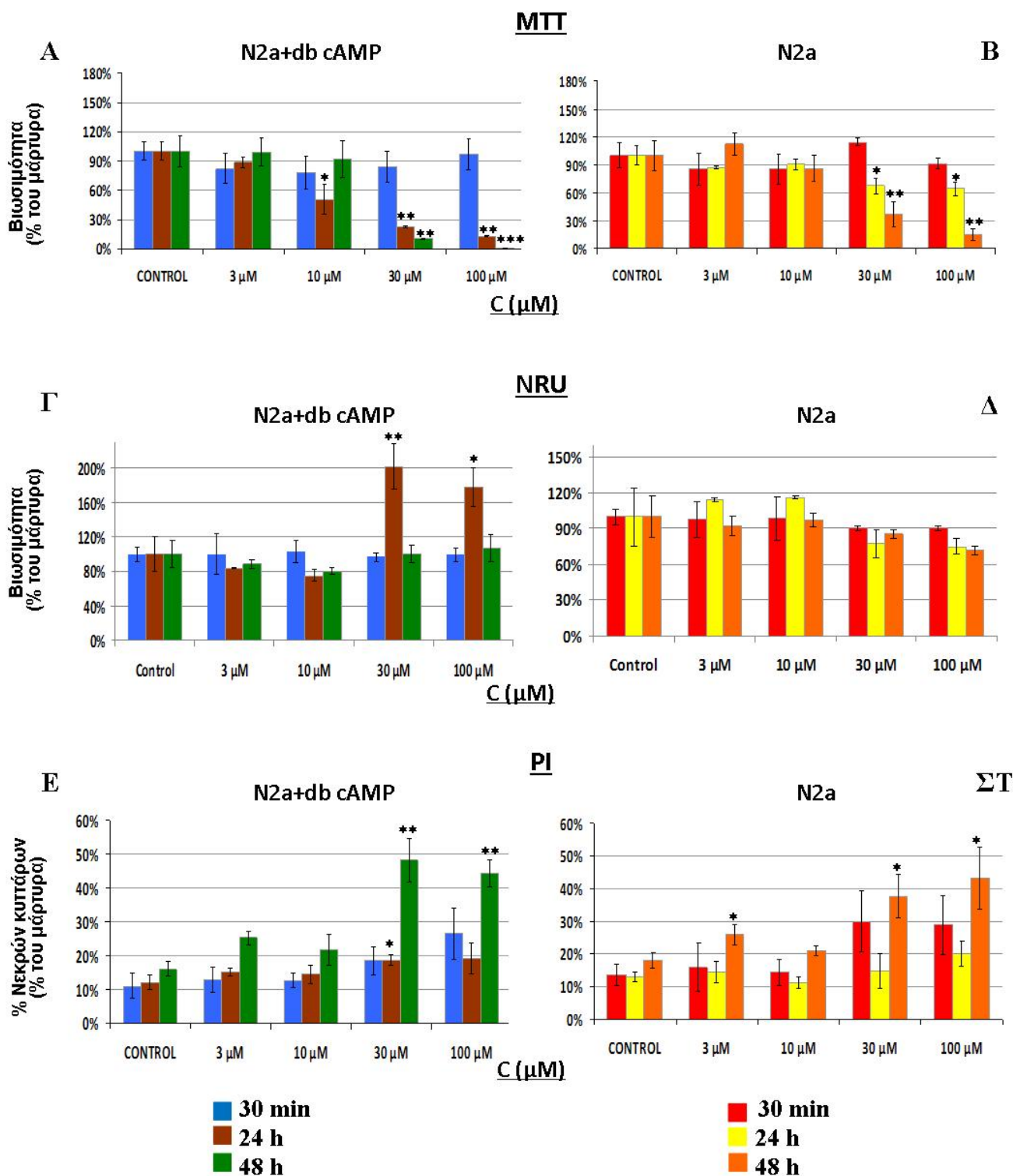


Εικόνα 3.9. Απεικονίζεται η βιωσιμότητα κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db cAMP και μη διαφοροποιημένων μετά από επώαση με spiromesifen σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM για 30 min, 24h και 48 h. Στα διαγράμματα A (N2a+db cAMP) και B (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Στα διαγράμματα Γ (N2a+db cAMP) και Δ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής NR. Στα διαγράμματα Ε (N2a+db cAMP) και ΣΤ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των νεκρών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής PI με ± % σφάλμα, *, *p<0,05 **p<0,01.

Στην Εικόνα 3.10. απεικονίζονται τα ποσοστά της βιωσιμότητας κυττάρων N2a διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων μετά από επώασή τους με το εντομοκτόνο spirodiclofen σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Στα διαφοροποιημένα κύτταρα το spirodiclofen παρουσίασε σημαντικές μεταβολές στη βιωσιμότητα των κυττάρων ιδίως στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM όπου κατά τη δοκιμή MTT (A) η βιωσιμότητα έφτασε στο 5 % κατά τη 48ωρη επώαση. Κατά τη δοκιμή NR στις ίδιες συγκεντρώσεις φαίνεται μία αύξηση της βιωσιμότητας που πιθανώς να οφείλεται στην εκτεταμένη λυσοσωμική λειτουργία στις 24 ώρες. Κατά τη δοκιμή του PI (E) υπήρξε μία μείωση της βιωσιμότητας στις συγκεντρώσεις 30 και μM στις 48 ώρες φτάνει το 48 % και 44 % αντίστοιχα. Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων παρατηρείται μια αντίστοιχη μεταβολή στις 48 ώρες στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM κατά δοκιμές MTT (B) και PI (ΣΤ). Η δοκιμή NR (Δ) παρουσιάζει μία μεταβολή του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων στη 48ωρη επώαση που δεν είναι όμως τόσο σημαντική όσο στις άλλες δύο δοκιμές.

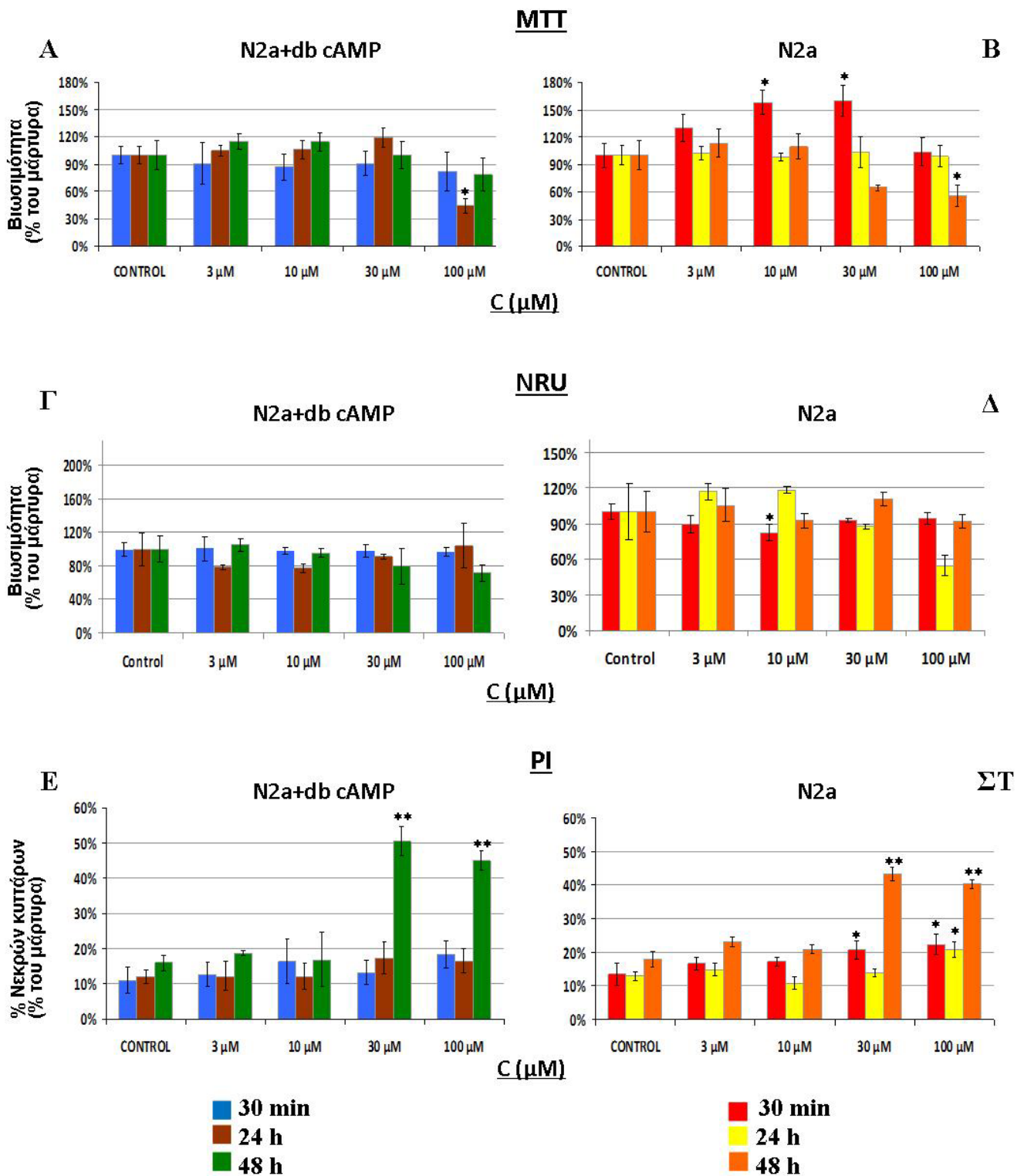
Στην Εικόνα 3.11. απεικονίζονται τα ποσοστά της βιωσιμότητας κυττάρων N2a διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων μετά από επώασή τους με το εντομοκτόνο spirotetramat σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Η βιωσιμότητα φάνηκε να μειώνεται κατά τη δοκιμή MTT στην περίπτωση των διαφοροποιημένων κυττάρων (A) στη συγκέντρωση 100 μM στις 24 ώρες. Παράλληλα, τα αποτελέσματα του PI (E) δείχνουν μία μεγάλη αύξηση του ποσοστού των νεκρών κυττάρων στις 48 ώρες στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM (50 % και 46 %). Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων παρατηρείται μια γραμμική αύξηση της βιωσιμότητας μέχρι τη συγκέντρωση 30 μM στη μισάωρη επώαση, στη δοκιμή MTT (B). Σημαντική αύξηση του ποσοστού των νεκρών κυττάρων παρουσιάζεται στη 48ωρη επώαση στη δοκιμή PI (ΣΤ) με το ποσοστό των νεκρών κυττάρων να φτάνει το 42 % στη συγκέντρωση 30 μM .

SPIRODICLOFEN



Εικόνα 3.10. Απεικονίζεται η βιωσιμότητα κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db cAMP και μη διαφοροποιημένων μετά από επώαση με spirodiclofen σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM για 30 min, 24h και 48 h. Στα διαγράμματα A (N2a+db cAMP) και B (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Στα διαγράμματα Γ (N2a+db cAMP) και Δ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής NR. Στα διαγράμματα Ε (N2a+db cAMP) και ΣΤ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των νεκρών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής PI με \pm % σφάλμα, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

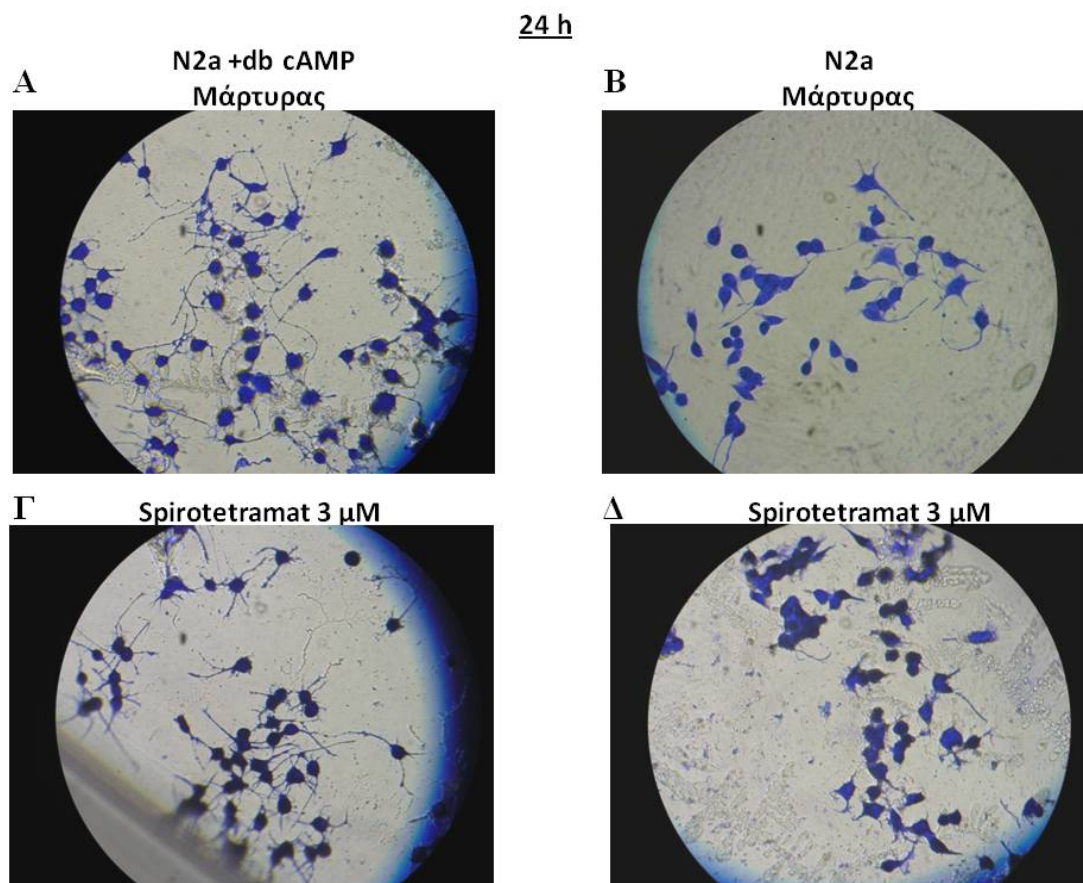
SPIROTETRAMAT



Εικόνα 3.11. Απεικονίζεται η βιωσιμότητα κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db cAMP και μη διαφοροποιημένων μετά από επώαση με spirotetramat σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM για 30 min, 24h και 48 h. Στα διαγράμματα A (N2a+db cAMP) και B (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Στα διαγράμματα Γ (N2a+db cAMP) και Δ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής NR. Στα διαγράμματα E (N2a+db cAMP) και ΣΤ (N2a) εκφράζεται το ποσοστό των νεκρών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής PI με ± % σφάλμα, *p<0,05 **p<0,01.

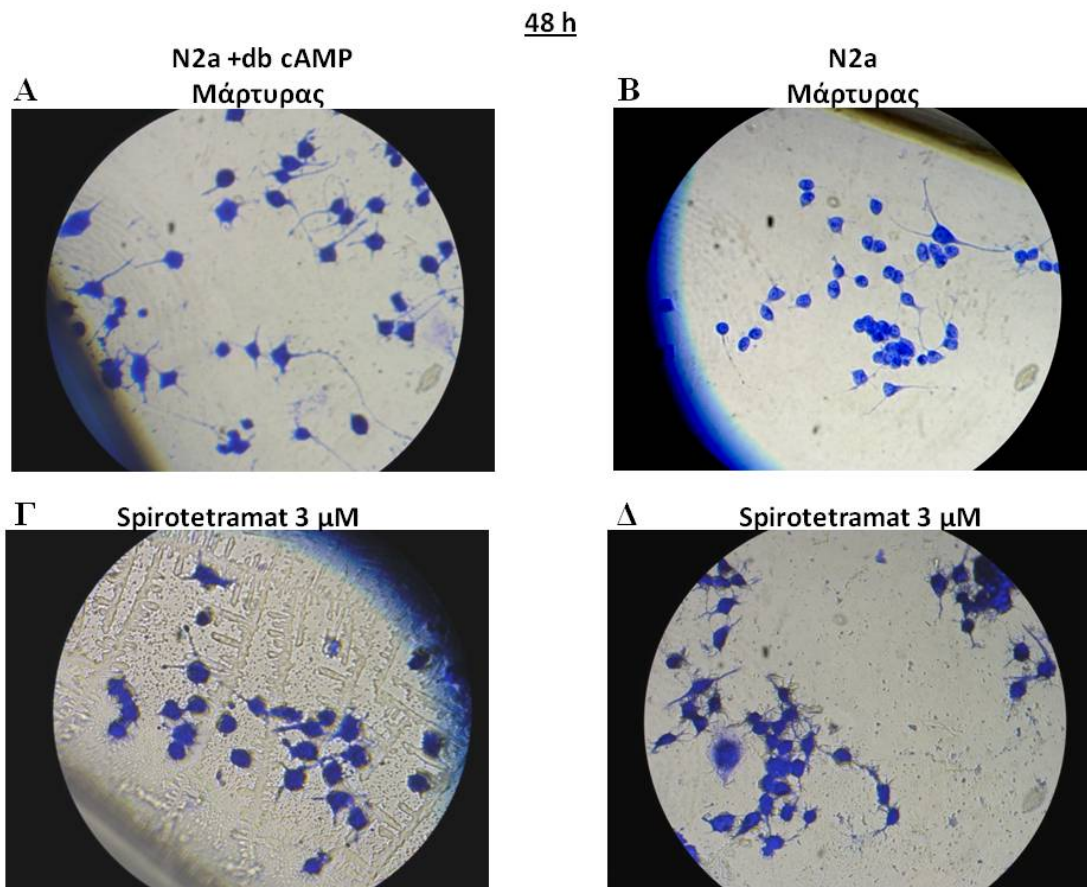
3.3. Επίδραση των εντομοκτόνων στην κυτταρική διαφοροποίηση μετά από επώαση 24 και 48 ωρών.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση των εντομοκτόνων σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με διβουτυλο-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα πραγματοποιήθηκε χρώση με τη χρωστική coomassie brilliant blue και κατόπιν οι νευρικές προεκτάσεις παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Στην Εικόνα 3.12. εμφανίζονται οι μάρτυρες (A και B) και ο χειρισμός με spirotetramat 3 μ M (Γ και Δ) μετά από 24ωρη επώαση. Παρατηρήθηκε έντονη διαφορά στην ανάπτυξη των νευρικών προεκτάσεων τόσο μεταξύ μαρτύρων και εντομοκτόνου όσο και μεταξύ των διαφοροποιημένων και των μη διαφοροποιημένων κυτάρων.



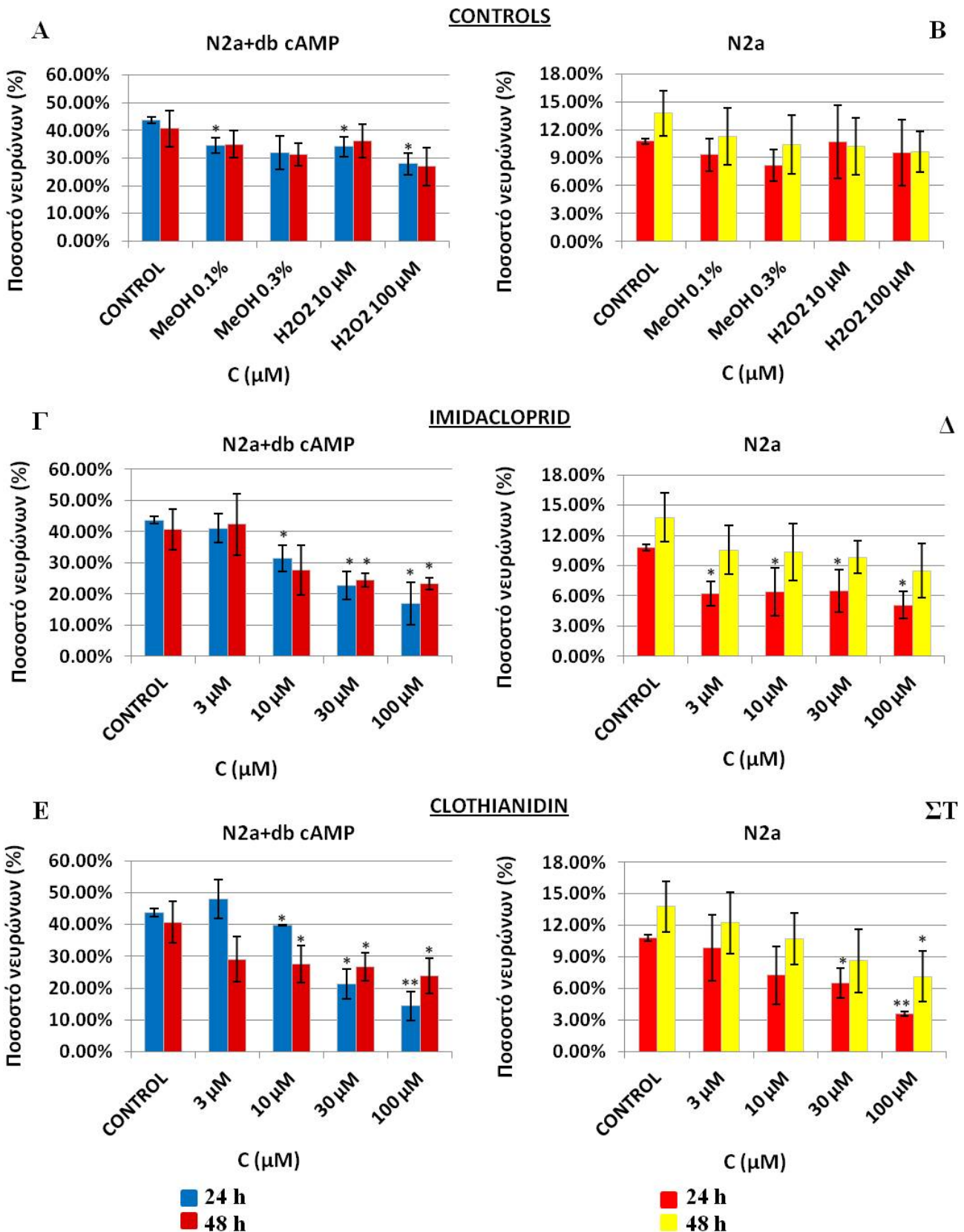
Εικόνα 3.12. Απεικονίζονται κύτταρα N2a μετά από 24ωρη επώαση με το εντομοκτόνο spirotetramat (3 μ M) και χρώση με τη χρωστική Coomassie brilliant blue. Στις φωτογραφίες A (μάρτυρας) και Γ (spirotetramat) απεικονίζονται κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, ενώ στις B και Δ κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μικροσκοπικές παρατηρήσεις των νευρικών αξόνων μετά από 48ωρη επώαση των κυττάρων με τα εντομοκτόνα. Στην Εικόνα 3.13. εμφανίζονται οι μάρτυρες (A και B) και ο χειρισμός με spirotetramat 3 μ M (Γ και Δ) μετά από 48ωρη επώαση. Όπως φαίνεται οι νευρικές προεκτάσεις εμφανίζονται εξασθενημένες από την επίδραση του εντομοκτόνου τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα, ενώ υπάρχει σημαντική μείωση των νευρώνων ακόμα και στους μάρτυρες σε σχέση με την 24ωρη επώαση.



Εικόνα 3.13. Απεικονίζονται κύτταρα N2a μετά από 48ωρη επώαση με το εντομοκτόνο spirotetramat (3 μM) και χρώση με τη χρωστική Coomassie brilliant blue. Στις φωτογραφίες A (μάρτυρας) και Γ (spirotetramat) απεικονίζονται κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, ενώ στις B και Δ κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί.

Μετά από επεξεργασία των φωτογραφιών που συλλέχθηκαν από τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις κατασκευάστηκαν συγκριτικά διαγράμματα που παρουσιάζουν την επίδραση κάθε ουσίας σε διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα κύτταρα μετά από 24ωρη και 48ωρη επώαση. Για κάθε χειρισμό καταγράφηκαν 5 διαφορετικά πεδία ανά βοθρίο. Κατά την επεξεργασία των δεδομένων ελήφθη υπόψη ο συνολικός αριθμός των κυττάρων, ενώ το μήκος κάθε νευρικής προέκτασης ήταν μεγαλύτερο από τη διπλάσια διάμετρο του σώματος ενός κυττάρου. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα II του Παραρτήματος. Στην Εικόνα 3.14. απεικονίζονται τα ποσοστά των νευρώνων σε σχέση με το συνολικό αριθμό των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε διαφοροποιημένα με db-cAMP κύτταρα N2a (A, Γ, E) και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a (B, Δ, ΣΤ) μετά από επώαση τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων imidacloprid (Γ, Δ) και clothianidin (E, ΣΤ) για 24 (μπλε και μπορντό χρώμα) και 48 ώρες (κόκκινο και κίτρινο χρώμα). Τα φάρμακα προστέθηκαν στο θρεπτικό υλικό DMEM σε τελικές συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε υπεροξείδιο του υδρογόνου H₂O₂ σε τελικές συγκεντρώσεις 10 και 100 μM καθώς και MeOH σε συγκέντρωση 0.1 και 0.3% (A, B).



Εικόνα 3.14. Απεικονίζεται το ποσοστό των νευρώνων που σχηματίστηκαν στα κύτταρα μετά από 24ωρη και 48ωρη επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων imidacloprid, clothianidin (3, 10, 30 100 μM), καθώς και με MeOH (0.1 και 0.3%) και H₂O₂ (10 μM και 100 μM), ως προς το σύνολο των κυττάρων. Στα σχήματα Α,Γ,Ε απεικονίζονται κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, ενώ στα σχήματα Β, Δ, ΣΤ, κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί. Παρουσιάζεται η επί τοις εκατό ανάπτυξη νευρώνων επί του συνόλου των κυττάρων με ± % σφάλμα, *p<0,05 **p<0,01.

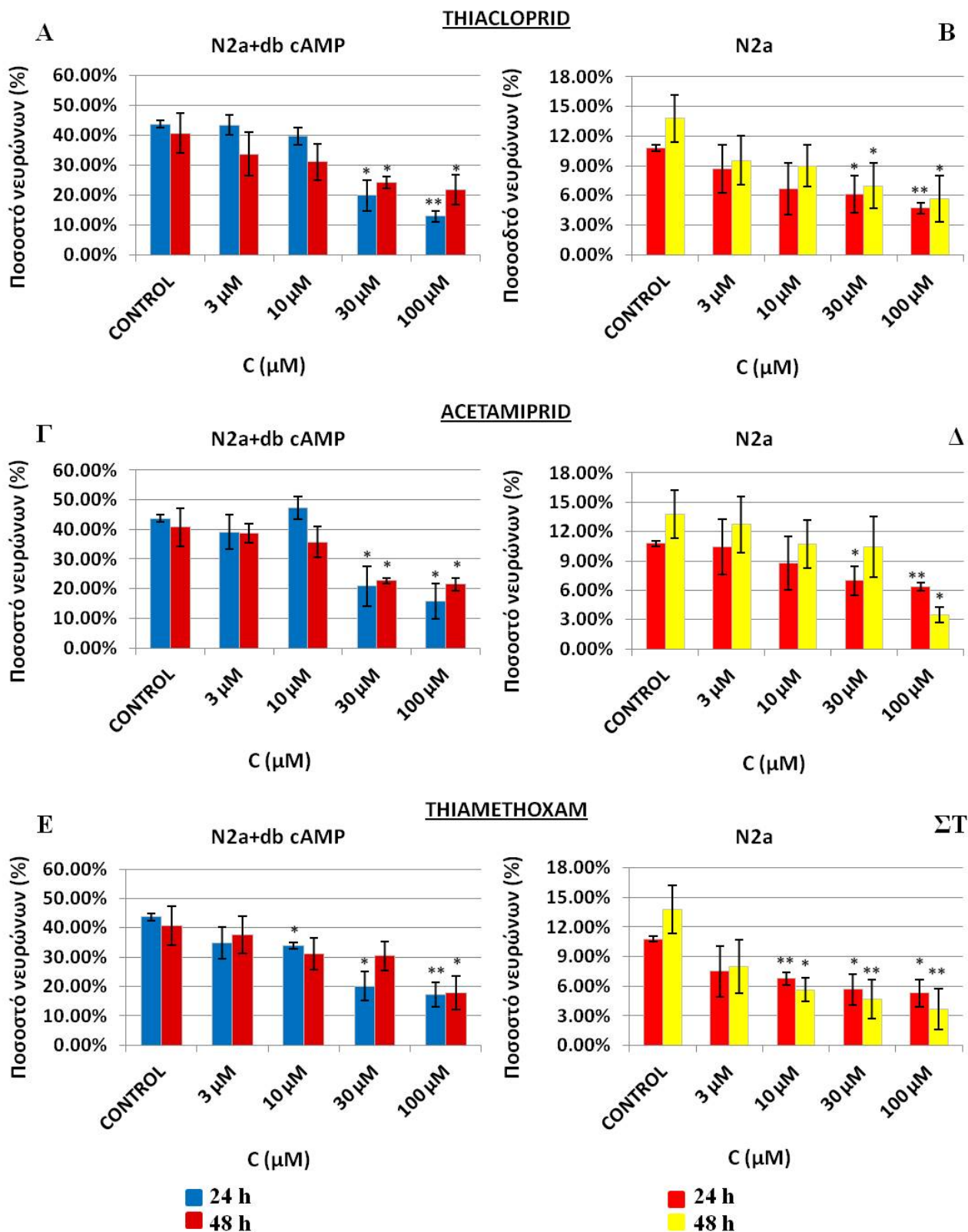
Φαίνεται ότι τόσο η MeOH όσο και το H₂O₂ δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα την ανάπτυξη των νευρικών προεκτάσεων στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα ο αριθμός των νευρώνων μειωνόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης των εντομοκτόνων. Αυτό είναι ιδιαίτερα έντονο στο εντομοκτόνο clothianidin και συγκεκριμένα στη συγκέντρωση 100 μM.

Στην Εικόνα 3.15. απεικονίζονται τα ποσοστά των νευρώνων σε σχέση με το συνολικό αριθμό των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε διαφοροποιημένα με db-cAMP κύτταρα N2a (Α, Γ, Ε) και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a (Β, Δ, ΣΤ) μετά από επώαση τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων thiacloprid (Α, Β) acetamiprid (Γ, Δ) και thiamethoxam (Ε, ΣΤ) για 24 (μπλε και μπορντό χρώμα) και 48 ώρες (κόκκινο και κίτρινο χρώμα). Τα φάρμακα προστέθηκαν στο θρεπτικό υλικό DMEM σε τελικές συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM.

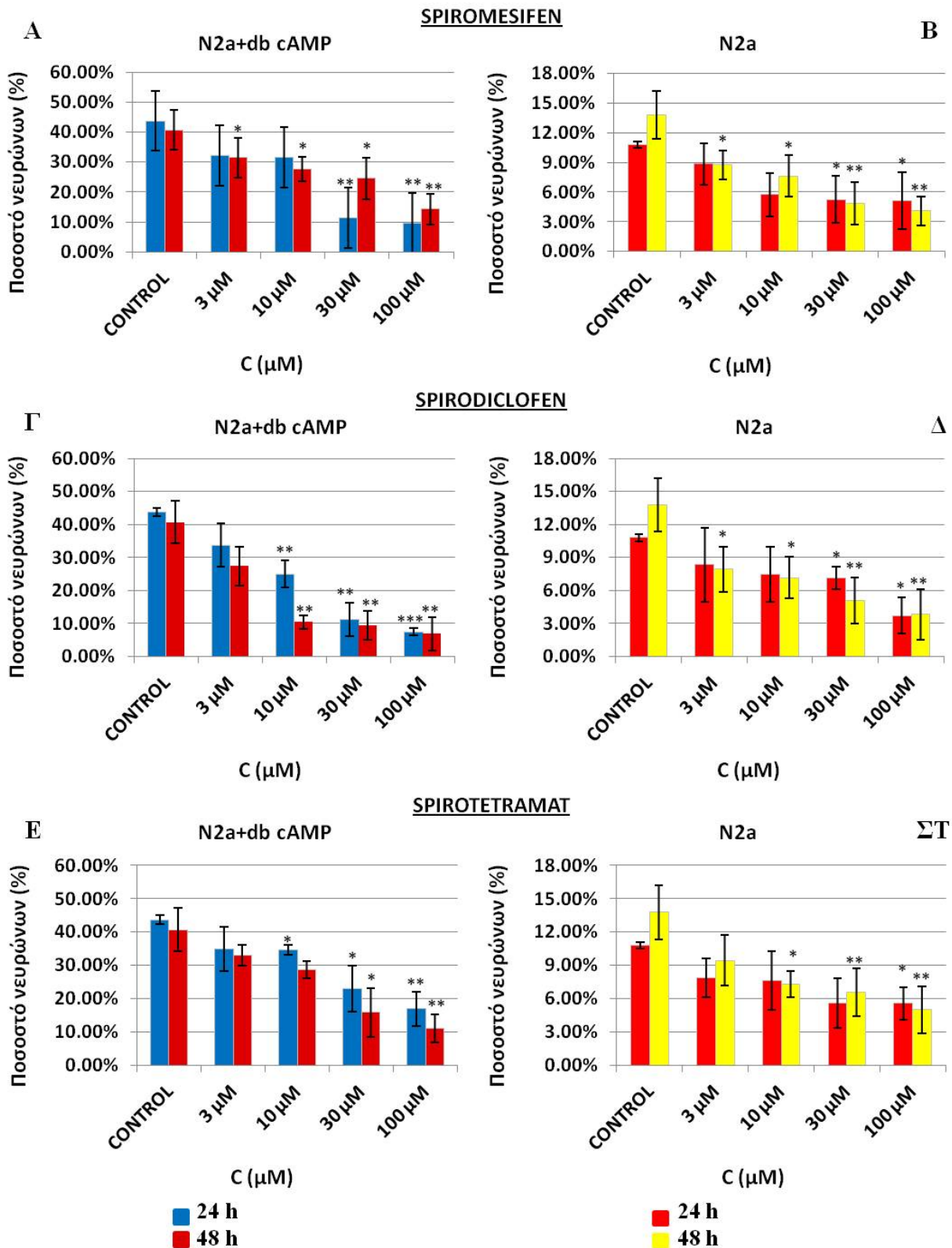
Όπως και στην Εικόνα 3.14. παρατηρήθηκε ότι τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα ο αριθμός των νευρώνων μειωνόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης των εντομοκτόνων ιδιαίτερα στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM. Ιδιαίτερα έντονη μείωση του ποσοστού των νευρώνων παρουσιάστηκε στο χειρισμό με το εντομοκτόνο thiamethoxam σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες. Παρατηρήθηκε επίσης ότι στις 48 ώρες υπήρξε μια ελαφρά αύξηση του αριθμού των νευρών στο μάρτυρα αλλά και στη συγκέντρωση 3 μM.

Στην Εικόνα 3.16. απεικονίζονται τα ποσοστά των νευρώνων σε σχέση με το συνολικό αριθμό των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε διαφοροποιημένα με db-cAMP κύτταρα N2a (Α, Γ, Ε) και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a (Β, Δ, ΣΤ) μετά από επώαση τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων spiromesifen (Α, Β) spirodiclofen (Γ, Δ) και spirotetramat (Ε, ΣΤ) για 24 (μπλε και μπορντό χρώμα) και 48 ώρες (κόκκινο και κίτρινο χρώμα). Τα φάρμακα προστέθηκαν στο θρεπτικό υλικό DMEM σε τελικές συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM.

Όπως και στις Εικόνα 3.14. και 3.15. παρατηρήθηκε ότι τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα ο αριθμός των νευρώνων μειωνόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης των εντομοκτόνων, κυρίως στις συγκεντρώσεις 10 - 100 μM. Τη μεγαλύτερη μείωση στην ανάπτυξη νευρώνων εμφάνισαν τα διαφοροποιημένα κύτταρα που είχαν επωαστεί με το εντομοκτόνο spirodiclofen στη συγκέντρωση 100 μM με ποσοστό ανάπτυξης 7,5 % στις 24 ώρες και 9,3 % στις 48 ώρες.



Εικόνα 3.15. Απεικονίζεται το ποσοστό των νευρώνων που σχηματίστηκαν στα κύτταρα μετά από 24ωρη και 48ωρη επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων thiacloprid, acetamiprid και thiamethoxam (3, 10, 30 100 μM), ως προς το σύνολο των κυττάρων. Στα σχήματα Α,Γ,Ε απεικονίζονται κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, ενώ στα σχήματα Β, Δ, ΣΤ, κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί. Παρουσιάζεται η επί τοις εκατό ανάπτυξη νευρώνων επί του συνόλου των κυττάρων με ± % σφάλμα, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.



Εικόνα 3.16. Απεικονίζεται το ποσοστό των νευρώνων που σχηματίστηκαν στα κύτταρα μετά από 24ωρη και 48ωρη επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων thiacloprid, acetamiprid και thiamethoxam (3, 10, 30 100 μM), ως προς το σύνολο των κυττάρων. Στα σχήματα Α,Γ,Ε απεικονίζονται κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, ενώ στα σχήματα Β, Δ, ΣΤ, κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί. Παρουσιάζεται η επί τοις εκατό ανάπτυξη νευρώνων επί του συνόλου των κυττάρων με ± % σφάλμα, *p<0,05 **p<0,01.

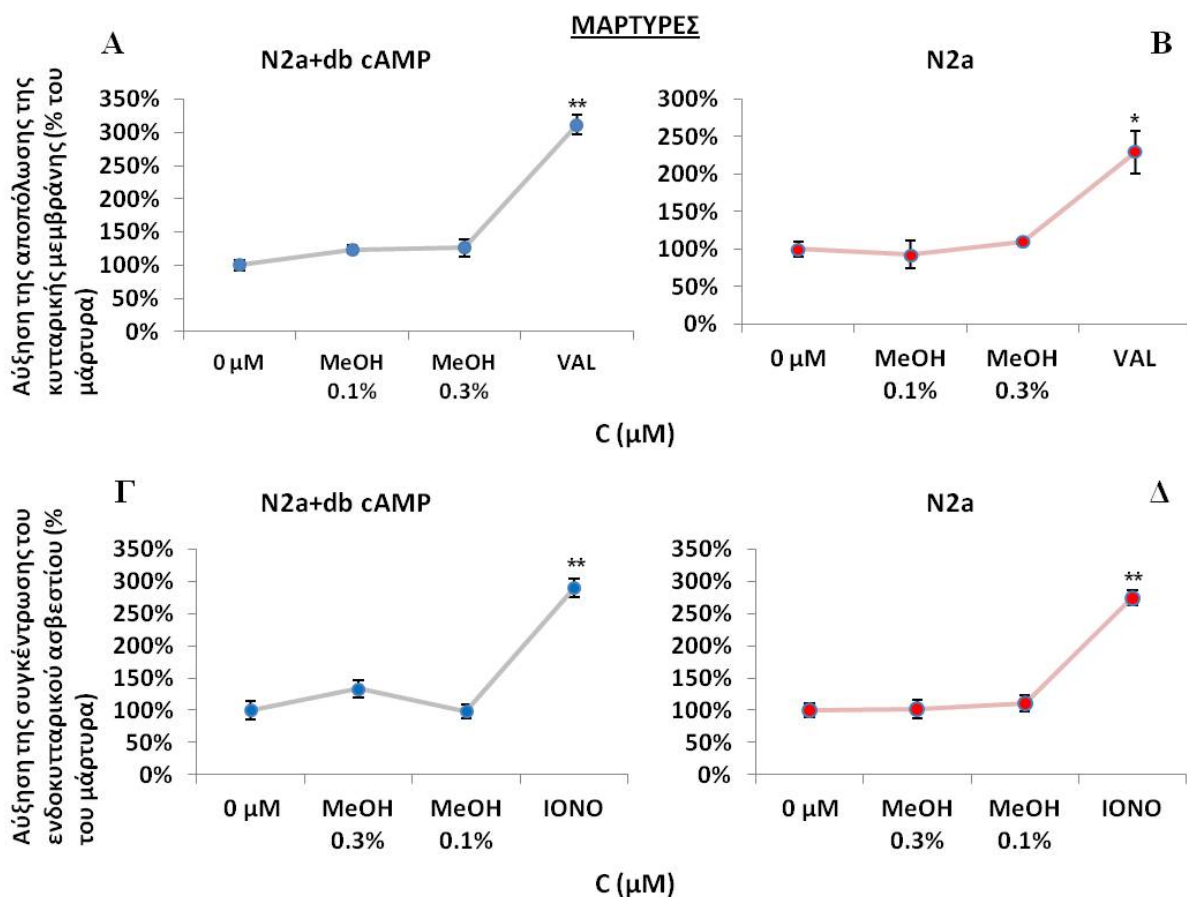
3.4. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός μεμβρανικού δυναμικού και ενδοκυτταρικού ασβεστίου των κυττάρων N2a.

Η επίδραση των εντομοκτόνων στο μεμβρανικό δυναμικό διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κύτταρων N2a προσδιορίστηκε φθορισμομετρικά για 10 min μετά από επώαση με τη χρωστική DiSC3(5) για 1 ώρα. Τα πρώτα 3 min της μέτρησης πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση των τιμών του αρχικού μείγματος με διάλυμα KCL σε συγκέντρωση 100 mM, στη συνέχεια προστέθηκαν οι διαφορετικές συγκεντρώσεις των ουσιών και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για 5 min. Τέλος προστέθηκε βαλινομυκίνη (VAL) σε συγκέντρωση 1 μ M. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό μεταβολής της αποδόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης σε σχέση με το μάρτυρα.

Επιπρόσθετα, η επίδραση των εντομοκτόνων στη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κύτταρων N2a προσδιορίστηκε φθορισμομετρικά για 10 min μετά από επώαση με τη χρωστική Fluo-3 για 45 min. Τα πρώτα 3 min της μέτρησης πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση των τιμών του αρχικού μείγματος, στη συνέχεια προστέθηκαν οι διαφορετικές συγκεντρώσεις των ουσιών και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για 5 min. Τέλος προστέθηκε ιονομυκίνη (IONO) σε συγκέντρωση 1 μ M και η μέτρηση συνεχίστηκε για άλλα 2 min. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό μεταβολής της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου σε σχέση με το μάρτυρα.

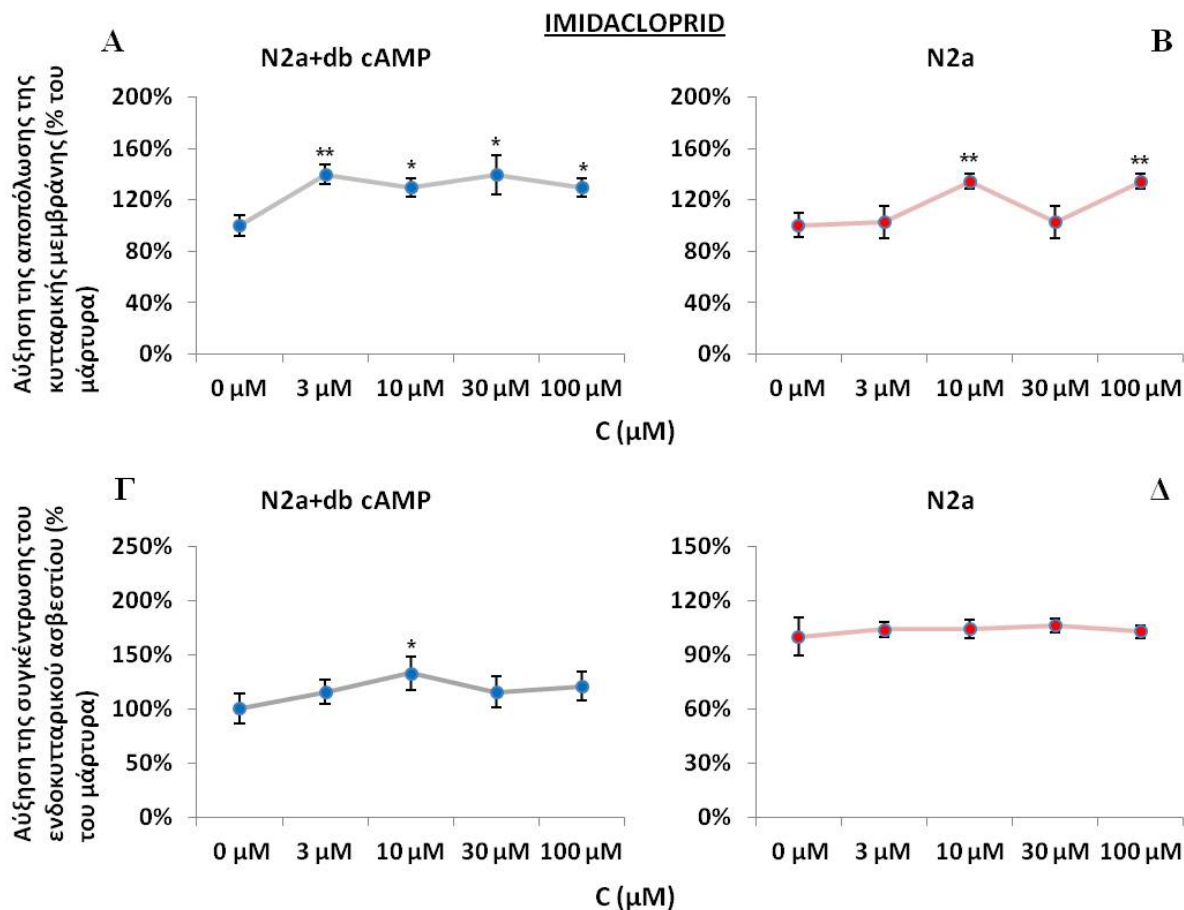
Στις Εικόνες 3.17.- 3.25. που ακολουθούν απεικονίζονται διαγραμματικά τα αποτελέσματα της επίδρασης των εντομοκτόνων στα κύτταρα N2a. Σε κάθε Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μεθόδων προσδιορισμού της μεταβολής του μεμβρανικού δυναμικού και της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου ανά ουσία για κύτταρα διαφοροποιημένα με db-cAMP και για μη διαφοροποιημένα κύτταρα.

Στην Εικόνα 3.17. (A και B) απεικονίζονται οι φθορισμομετρικές αποκρίσεις τις χρωστικής DiSC3(5) σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με db-cAMP (A) και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a (B) μετά από προσθήκη MeOH σε συγκέντρωση 0.1% και 0.3% καθώς και μετά από προσθήκη βαλινομυκίνης (VAL) σε συγκέντρωση 1 μ M. Παρατηρήθηκε ότι τόσο στα διαφοροποιημένα κύτταρα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα η MeOH δεν είχε κάποια επίδραση στο μεμβρανικό δυναμικό των κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα ενώ η βαλινομυκίνη προκάλεσε αύξηση στην αποδόλωση της μεμβράνης 2,5 και 2 φορές μεγαλύτερη από την απόκριση του μάρτυρα αντίστοιχα. Αυτό το μοτίβο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της απορρόφησης της χρωστικής Fluo-3 όπου ενώ η MeOH δεν προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, ενώ η ιονομυκίνη αύξησε το ασβέστιο σχεδόν 2 φορές σε σχέση με το μάρτυρα τόσο στα διαφοροποιημένα (Γ) όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ).



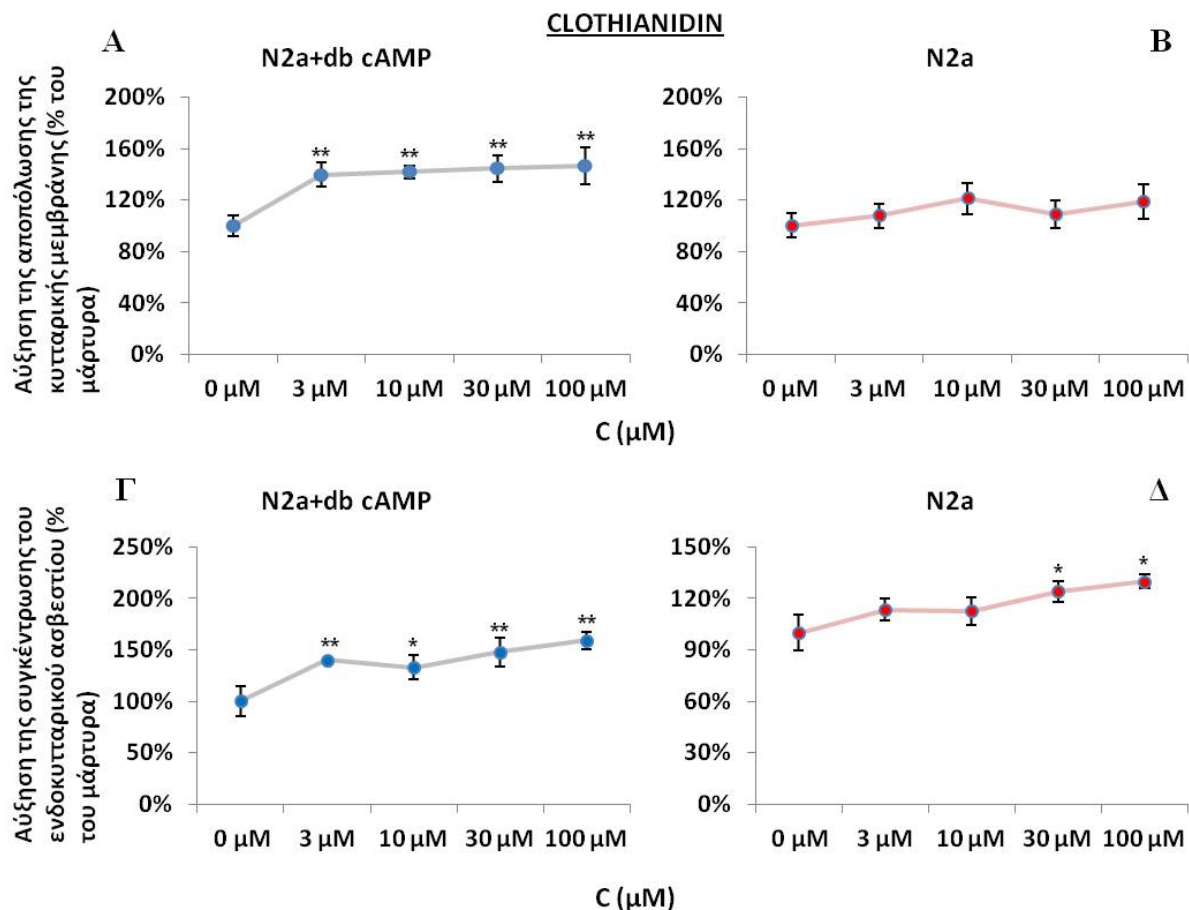
Εικόνα 3.17. Απεικονίζεται η απορρόφηση της χρωστικής DiSC3(5) του μεμβρανικού δυναμικού των κυττάρων μετά από 5λεπτη επώαση με MeOH σε συγκεντρώσεις 0.1 και 0.3 % και βαλινομυκίνη (VAL) σε συγκέντρωση 1 μM σε κύτταρα N2a που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (A) και σε κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί (B). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό αύξησης της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Τα σχήματα Γ και Δ απεικονίζουν την αύξηση της απορρόφησης της χρωστικής Fluo-3 διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κυττάρων N2a, αντίστοιχα μετά από 5λεπτη επώαση με MeOH σε συγκεντρώσεις 0.1 και 0.3 % και ιονομυκίνη (IONO) σε συγκέντρωση 1 μM. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό μεταβολής της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Στην Εικόνα 3.18. (A και B) απεικονίζονται οι φθορισμομετρικές αποκρίσεις τις χρωστικής DiSC3(5) σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με db-cAMP (A) και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a (B) μετά από επώαση τους με το εντομοκτόνο imidacloprid για 5 min. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) το imidacloprid προκάλεσε αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 55 % στη συγκέντρωση 3 μM. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της αποπόλωσης στα 10 και στα 100 μM του εντομοκτόνου. Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της συγκέντρωσης στα 10 μM στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) ενώ στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή σε σχέση με τη συγκέντρωση του μάρτυρα.



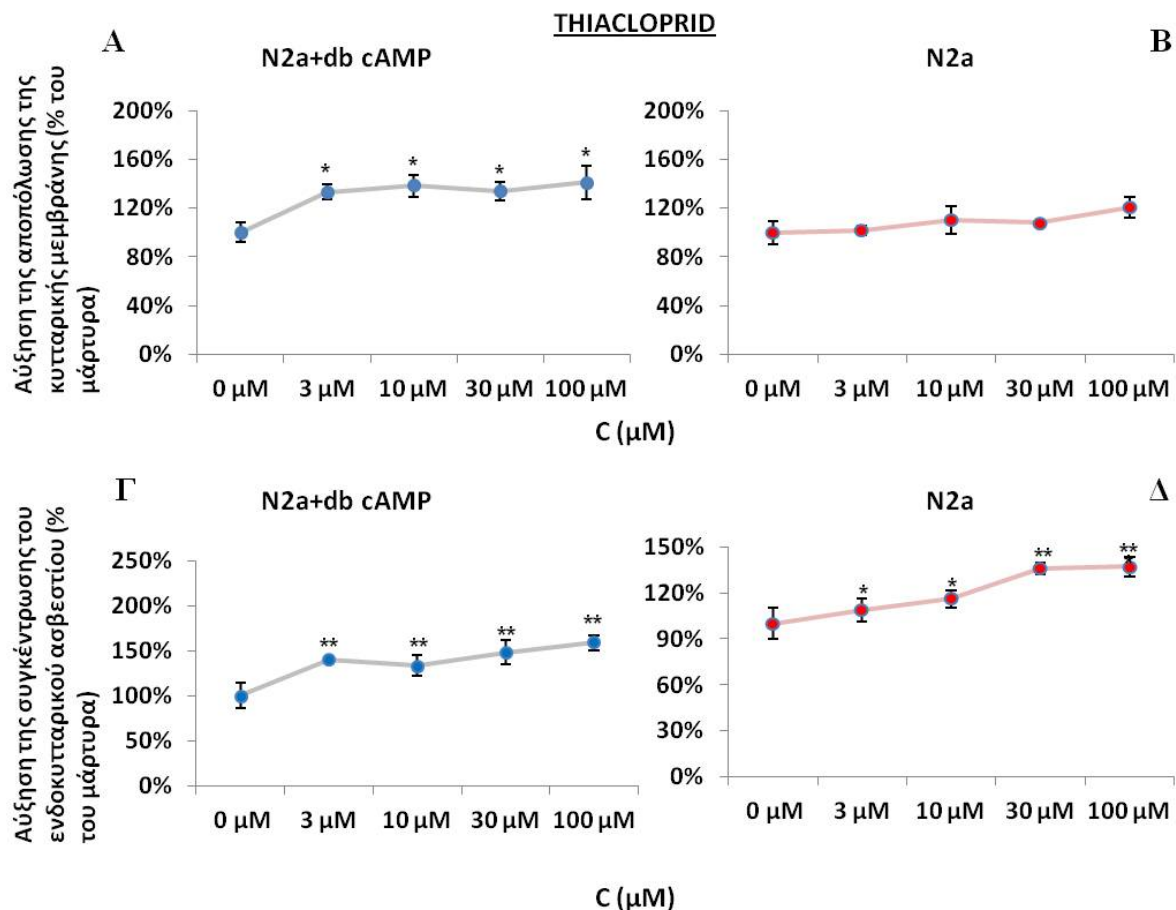
Εικόνα 3.18. Απεικονίζεται η απορρόφηση της χρωστικής DiSC3(5) του μεμβρανικού δυναμικού των κυττάρων μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο imidacloprid σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM σε κύτταρα N2a που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (A) και σε κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί (B). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό αύξησης της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, *p<0,05 **p<0,01. Τα σχήματα Γ και Δ απεικονίζουν την αύξηση της απορρόφησης της χρωστικής Fluo-3 διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κυττάρων N2a, αντίστοιχα μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο imidacloprid σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό μεταβολής της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, *p<0,05, **p<0,01.

Στην Εικόνα 3.19. (A και B) απεικονίζονται οι φθορισμομετρικές αποκρίσεις τις χρωστικής DiSC3(5) σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με db-cAMP (A) και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a (B) μετά από επώαση τους με το εντομοκτόνο clothianidin για 5 min. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) το clothianidin προκάλεσε αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 45 % στη συγκέντρωση 100 μM. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στο μεμβρανικό δυναμικό σε σχέση με το μάρτυρα. Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε μια αύξηση της συγκέντρωσης σε όλες τις συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) ενώ στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM που έφτασε έως και 25 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα.



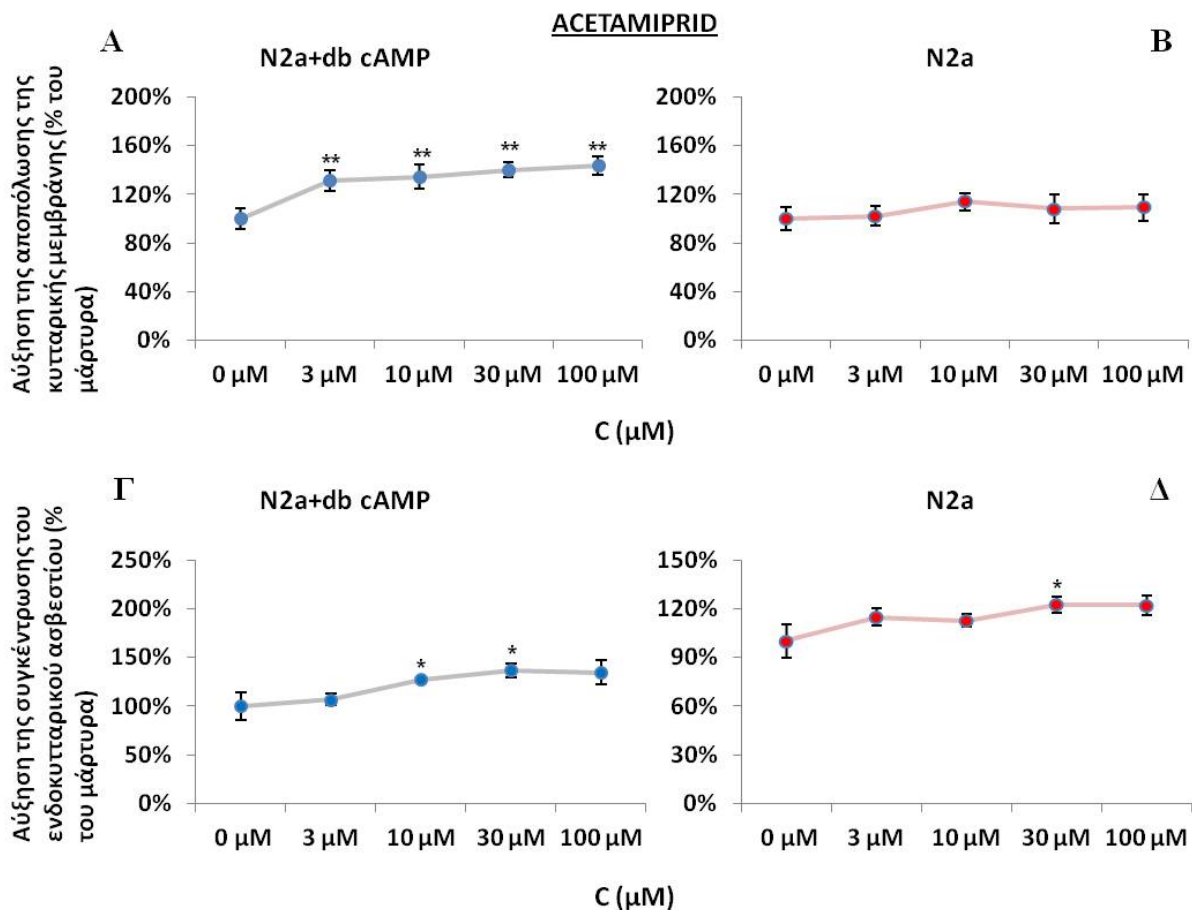
Εικόνα 3.19. Απεικονίζεται η απορρόφηση της χρωστικής DiSC3(5) του μεμβρανικού δυναμικού των κυττάρων μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο clothianidin σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM σε κύτταρα N2a που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (A) και σε κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί (B). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό αύξησης της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, *p<0,05 **p<0,01. Τα σχήματα Γ και Δ απεικονίζουν την αύξηση της απορρόφησης της χρωστικής Fluo-3 διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κυττάρων N2a, αντίστοιχα μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο clothianidin σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό μεταβολής της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, *p<0,05, **p<0,01.

Στην Εικόνα 3.20. (A και B) απεικονίζονται οι φθορισμομετρικές αποκρίσεις τις χρωστικής DiSC3(5) σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με db-cAMP (A) και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a (B) μετά από επώαση τους με το εντομοκτόνο thiacloprid για 5 min. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) το thiacloprid προκάλεσε αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 38 % στη συγκέντρωση 100 μM. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στο μεμβρανικό δυναμικό σε σχέση με το μάρτυρα. Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης σε όλες τις συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) έως 50 % σχέση με τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 100 μM. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου σε όλες τις συγκεντρώσεις που έφτασε έως και 35 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 100 μM.



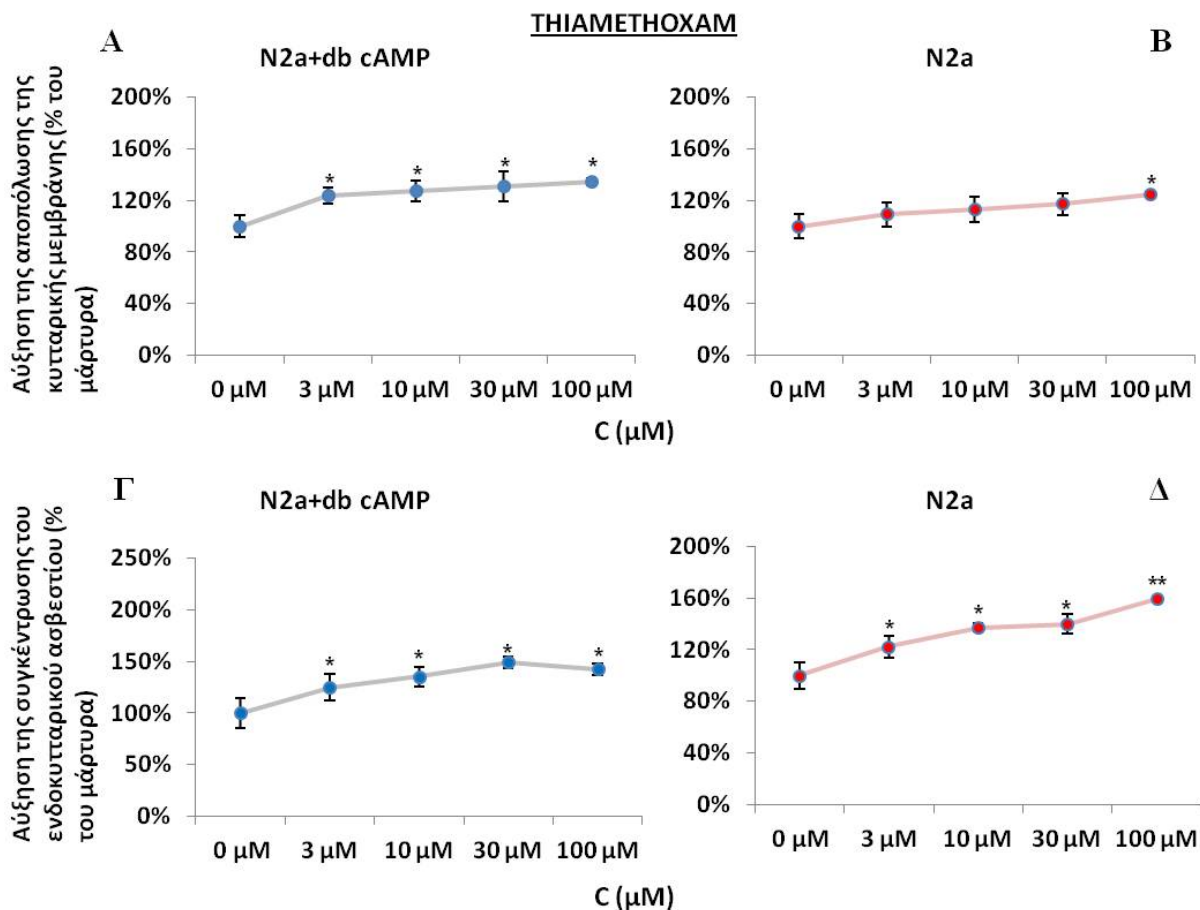
Εικόνα 3.20. Απεικονίζεται η απορρόφηση της χρωστικής DiSC3(5) του μεμβρανικού δυναμικού των κυττάρων μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο thiacloprid σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM σε κύτταρα N2a που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (A) και σε κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί (B). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό αύξησης της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Τα σχήματα Γ και Δ απεικονίζουν την αύξηση της απορρόφησης της χρωστικής Fluo-3 διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κυττάρων N2a, αντίστοιχα μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο thiacloprid σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό μεταβολής της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Στην Εικόνα 3.21. (A και B) απεικονίζονται οι φθορισμομετρικές αποκρίσεις τις χρωστικής DiSC3(5) σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με db-cAMP (A) και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a (B) μετά από επώαση τους με το εντομοκτόνο acetamiprid για 5 min. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) το acetamiprid προκάλεσε αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 41 % στη συγκέντρωση 100 μM. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στο μεμβρανικό δυναμικό σε σχέση με το μάρτυρα. Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε μια αύξηση της συγκέντρωσης στις συγκεντρώσεις 10 έως 100 μM στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) έως 44 % σχέση με τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 30 μM. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρήθηκε μια αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στη συγκέντρωση 30 μM που έφτασε στο 21 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα.



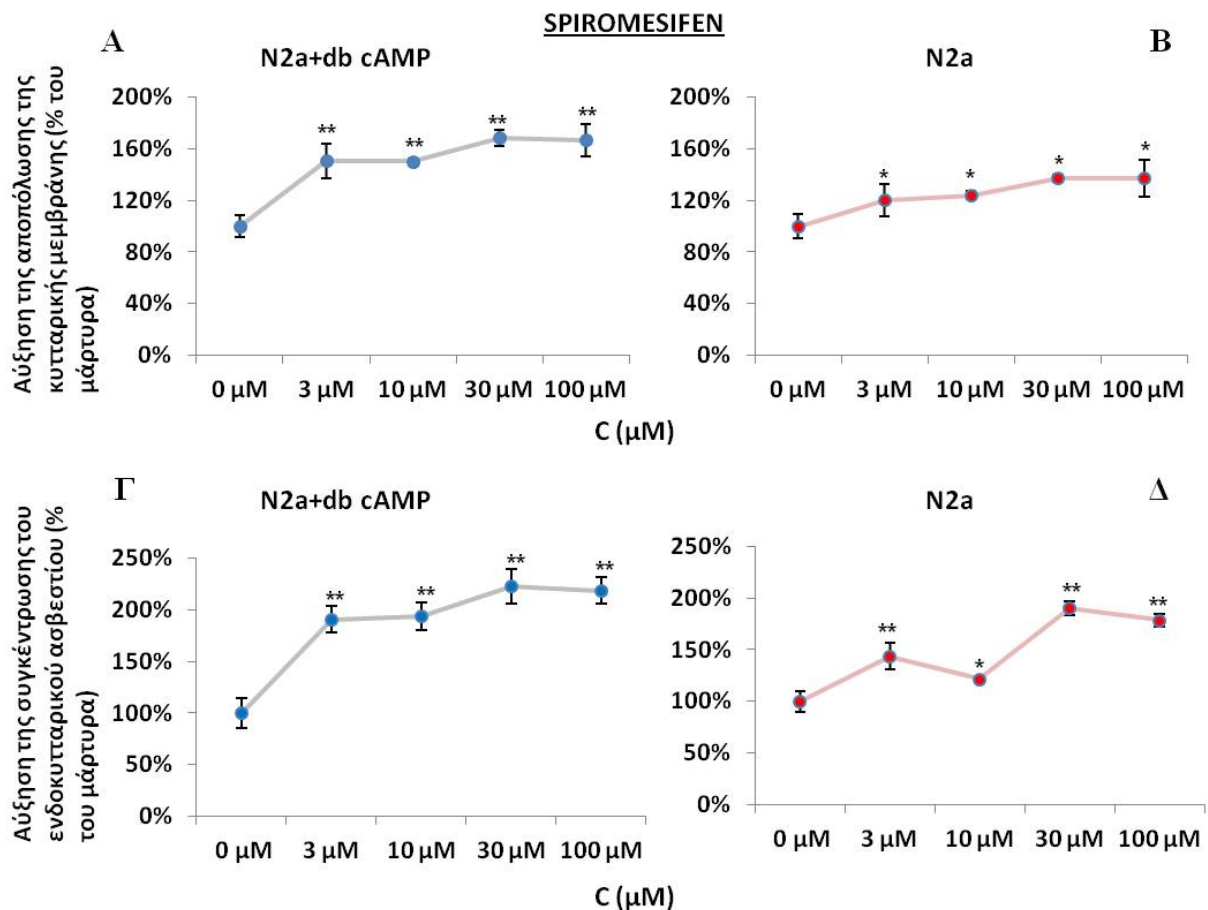
Εικόνα 3.21. Απεικονίζεται η απορρόφηση της χρωστικής DiSC3(5) του μεμβρανικού δυναμικού των κυττάρων μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο acetamiprid σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM σε κύτταρα N2a που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (A) και σε κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί (B). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό αύξησης της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης σε σχέση με το μάρτυρα με \pm % σφάλμα, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Τα σχήματα Γ και Δ απεικονίζουν την αύξηση της απορρόφησης της χρωστικής Fluo-3 διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κυττάρων N2a, αντίστοιχα μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο acetamiprid σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό μεταβολής της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου σε σχέση με το μάρτυρα με \pm % σφάλμα, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Στην Εικόνα 3.22. (A και B) απεικονίζονται οι φθορισμομετρικές αποκρίσεις τις χρωστικής DiSC3(5) σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με db-cAMP (A) και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a (B) μετά από επώαση τους με το εντομοκτόνο thiamethoxam για 5 min. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) το thiamethoxam προκάλεσε αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 28 % στη συγκέντρωση 100 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) παρατηρήθηκε μια μικρή μεταβολή στο μεμβρανικό δυναμικό που φτάνει στο 21 % σε σχέση με το μάρτυρα. Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε μια αύξηση της συγκέντρωσης στις συγκεντρώσεις 3 έως 100 μM στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) που φτάνει έως το 48 % σχέση με τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 30 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρήθηκε μια γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου σε όλες τις συγκεντρώσεις που έφτασε στο 57 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα.



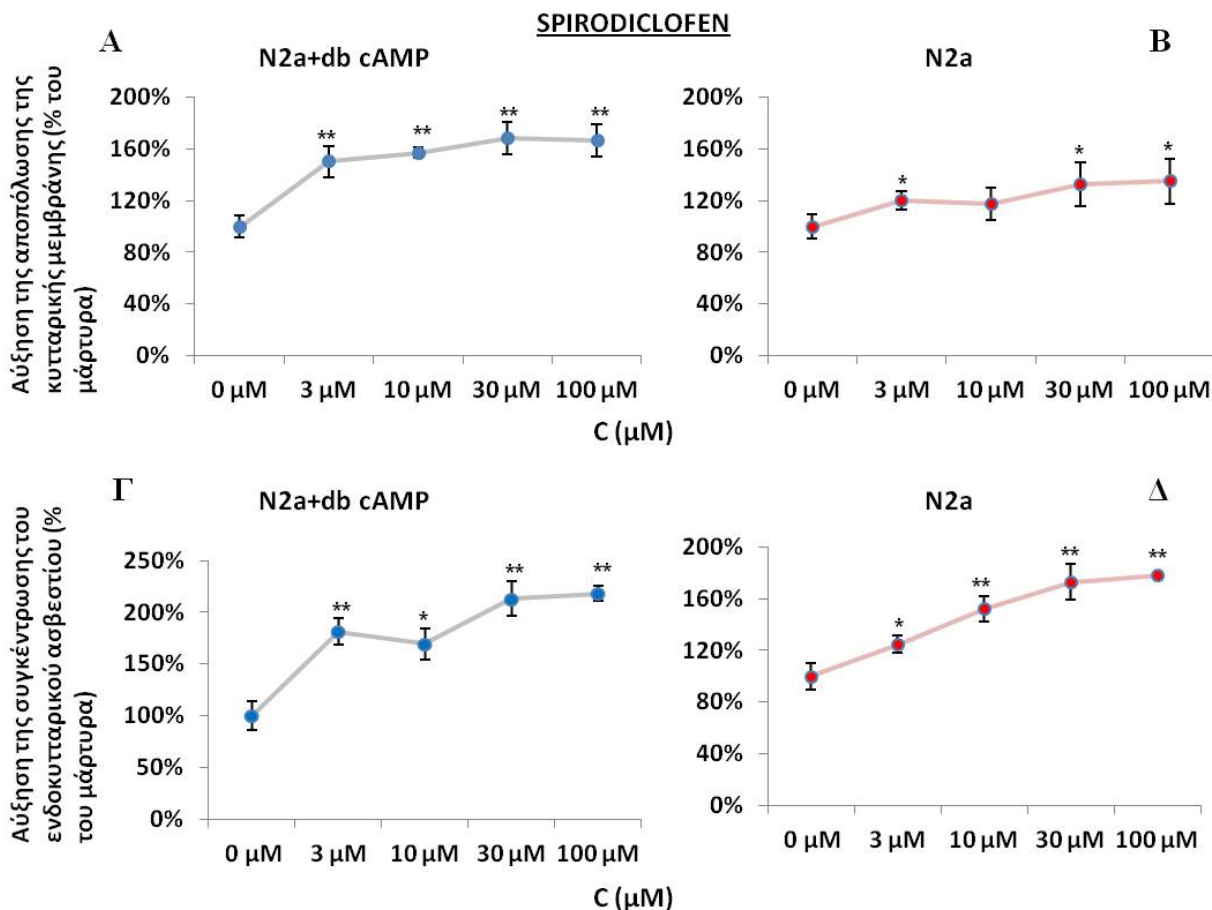
Εικόνα 3.22. Απεικονίζεται η απορρόφηση της χρωστικής DiSC3(5) του μεμβρανικού δυναμικού των κυττάρων μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο thiamethoxam σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM σε κύτταρα N2a που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (A) και σε κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί (B). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό αύξησης της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης σε σχέση με το μάρτυρα με \pm % σφάλμα, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Τα σχήματα Γ και Δ απεικονίζουν την αύξηση της απορρόφησης της χρωστικής Fluo-3 διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κυττάρων N2a, αντίστοιχα μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο thiamethoxam σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό μεταβολής της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου σε σχέση με το μάρτυρα με \pm % σφάλμα, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Στην Εικόνα 3.23. (A και B) απεικονίζονται οι φθορισμομετρικές αποκρίσεις τις χρωστικής DiSC3(5) σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με db-cAMP (A) και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a (B) μετά από επώαση τους με το εντομοκτόνο spiromesifen για 5 min. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) το spiromesifen προκάλεσε γραμμική αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 60 % στη συγκέντρωση 100 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) παρατηρήθηκε το ίδιο μοτίβο με τη μεταβολή στο μεμβρανικό δυναμικό να φτάνει στο 34 % σε σχέση με το μάρτυρα στα 100 μM . Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε πάλι γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης στις συγκεντρώσεις 3 έως 100 μM στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) έως 1,05 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 30 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρήθηκε αύξηση (μη γραμμική) της συγκέντρωσης του ασβεστίου σε όλες τις συγκεντρώσεις που έφτασε στο 97 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα.



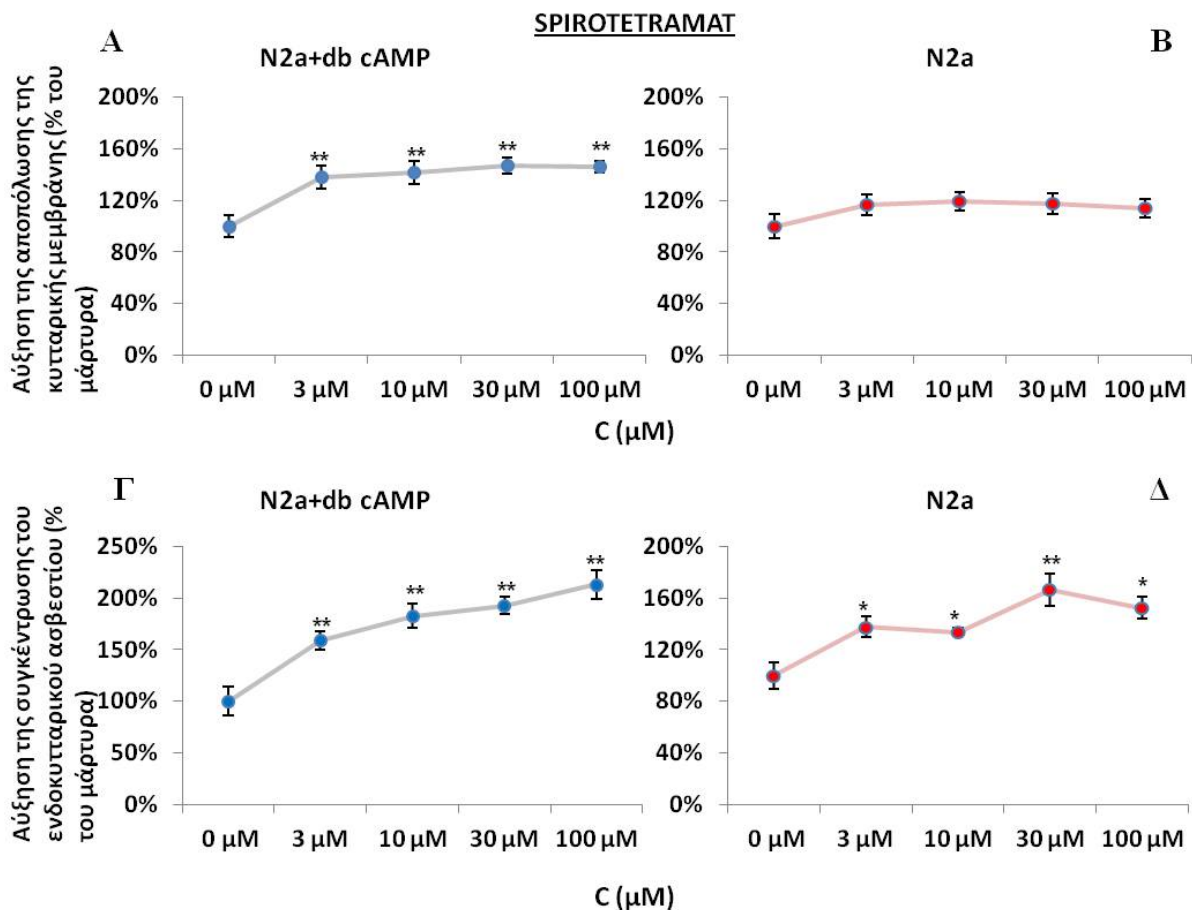
Εικόνα 3.23. Απεικονίζεται η απορρόφηση της χρωστικής DiSC3(5) του μεμβρανικού δυναμικού των κυττάρων μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο spiromesifen σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM σε κύτταρα N2a που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (A) και σε κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί (B). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό αύξησης της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης σε σχέση με το μάρτυρα με \pm % σφάλμα, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Τα σχήματα Γ και Δ απεικονίζουν την αύξηση της απορρόφησης της χρωστικής Fluo-3 διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κυττάρων N2a, αντίστοιχα μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο spiromesifen σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό μεταβολής της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου σε σχέση με το μάρτυρα με \pm % σφάλμα, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Στην Εικόνα 3.24. (A και B) απεικονίζονται οι φθορισμομετρικές αποκρίσεις τις χρωστικής DiSC3(5) σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με db-cAMP (A) και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a (B) μετά από επώαση τους με το εντομοκτόνο spiromesifen για 5 min. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) το spiromesifen προκάλεσε γραμμική αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 60 % στη συγκέντρωση 100 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) παρατηρήθηκε για μία ακόμα φορά πτώση του μεμβρανικού δυναμικού που έφτασε στο 28 % σε σχέση με το μάρτυρα στα 100 μM . Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης στις συγκεντρώσεις 3 έως 100 μM στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) έως 1,1 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 100 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου σε όλες τις συγκεντρώσεις που έφτασε στο 80 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα.



Εικόνα 3.24. Απεικονίζεται η απορρόφηση της χρωστικής DiSC3(5) του μεμβρανικού δυναμικού των κυττάρων μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο spiromesifen σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM σε κύτταρα N2a που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (A) και σε κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί (B). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό αύξησης της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης σε σχέση με το μάρτυρα με \pm % σφάλμα, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Τα σχήματα Γ και Δ απεικονίζουν την αύξηση της απορρόφησης της χρωστικής Fluo-3 διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κυττάρων N2a, αντίστοιχα μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο spiromesifen σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό μεταβολής της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου σε σχέση με το μάρτυρα με \pm % σφάλμα, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Στην Εικόνα 3.25. (A και B) απεικονίζονται οι φθορισμομετρικές αποκρίσεις τις χρωστικής DiSC3(5) σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με db-cAMP (A) και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a (B) μετά από επώαση τους με το εντομοκτόνο spirotetramat για 5 min. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) το spirotetramat προκάλεσε αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 51 % στη συγκέντρωση 30 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή του μεμβρανικού δυναμικού σε σχέση με τη μεταβολή του μάρτυρα. Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης στις συγκεντρώσεις 3 έως 100 μM στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) έως 2,1 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 100 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου σε όλες τις συγκεντρώσεις που έφτασε στο 67 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα.



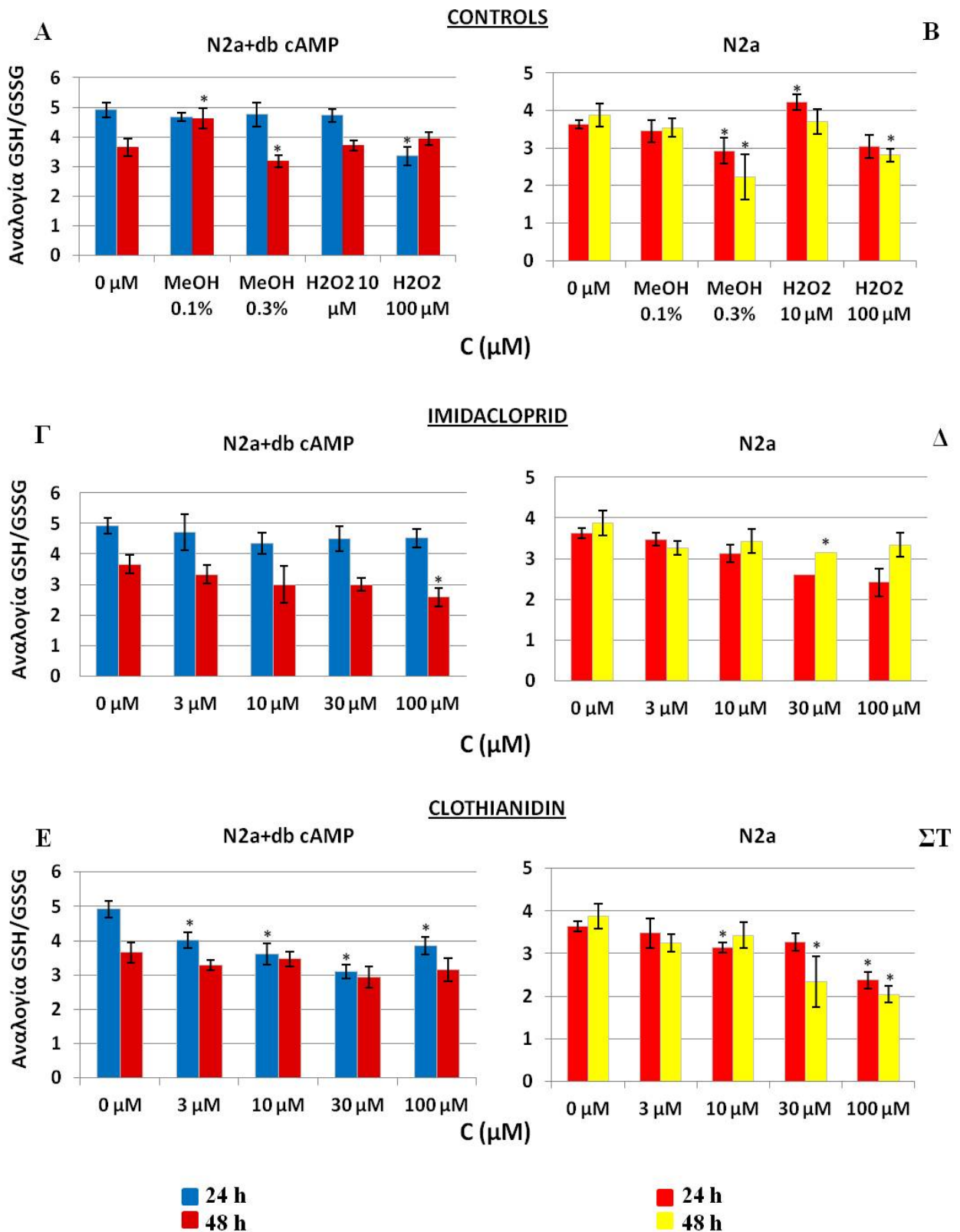
Εικόνα 3.25. Απεικονίζεται η απορρόφηση της χρωστικής DiSC3(5) του μεμβρανικού δυναμικού των κυττάρων μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο spirotetramat σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM σε κύτταρα N2a που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (Α) και σε κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί (Β). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό αύξησης της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Τα σχήματα Γ και Δ απεικονίζουν την αύξηση της απορρόφησης της χρωστικής Fluo-3 διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κυττάρων N2a, αντίστοιχα μετά από 5λεπτη επώαση με το εντομοκτόνο spirotetramat σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό μεταβολής της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.5. Προσδιορισμός της επίδρασης των εντομοκτόνων στην αναλογία GSH/GSSG σε διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση των εντομοκτόνων στην αναλογία GSH/GSSG σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με διβουτυλο-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα πραγματοποιήθηκαν φωτομετρικές μετρήσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν το ένζυμο αναγωγή του γλουταθειού (glutathione reductase, GR) και το συνένζυμο NADPH για 10 min. Στην Εικόνα 3.26. απεικονίζονται οι αναλογίες GSH/GSSG διαφοροποιημένων με db-cAMP κύτταρα N2a (Α, Γ, Ε) και μη διαφοροποιημένων κυττάρων N2a (Β, Δ, ΣΤ) μετά από επώαση τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων imidacloprid (Γ, Δ) και clothianidin (Ε, ΣΤ) για 24 (μπλε και μπορντό χρώμα) και 48 ώρες (κόκκινο και κίτρινο χρώμα). Τα φάρμακα προστέθηκαν στο θρεπτικό υλικό DMEM σε τελικές συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε υπεροξείδιο

του υδρογόνου (H_2O_2) σε τελικές συγκεντρώσεις 10 και 100 μM καθώς και MeOH σε συγκέντρωση 0.1 και 0.3% (A, B).

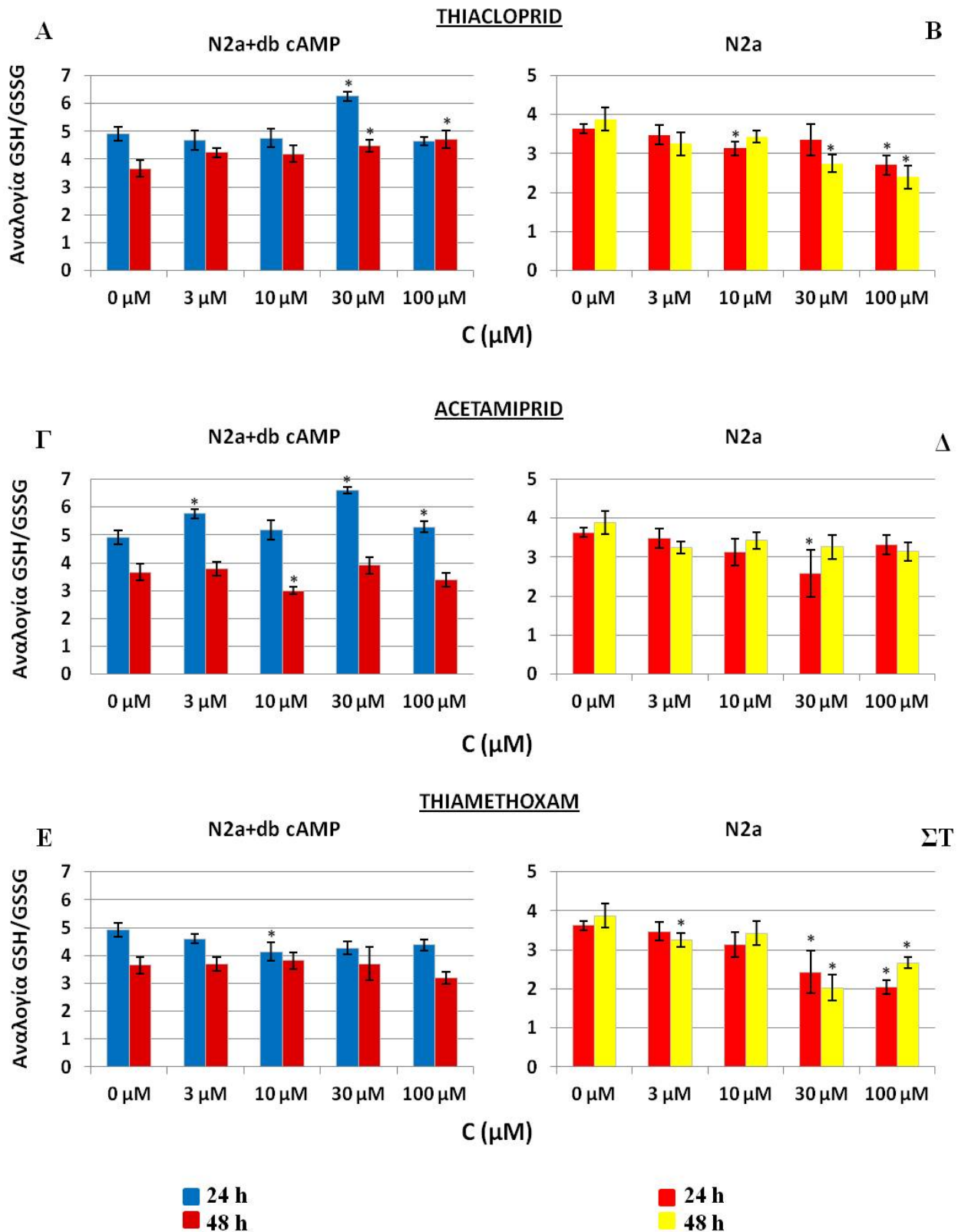
Φαίνεται ότι τόσο η MeOH όσο και το H_2O_2 δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα την αναλογία GSH/GSSG στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) κατά τις 24 ώρες ενώ στις 48 ώρες η MeOH σε συγκέντρωση 0.3% προκαλεί μια μικρή, πλην σημαντική πτώση. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) η αναλογία GSH/GSSG παρουσιάζεται πτωτική στη MeOH σε συγκέντρωση 0.3% τόσο κατά τις 24 όσο και κατά τις 48 ώρες. Το εντομοκτόνο imidacloprid δε φαίνεται να παρουσιάζει αξιοσημείωτες μεταβολές στην αναλογία GSH/GSSG στις 24 ή στις 48 ώρες σε κανέναν τύπο κυττάρων (Γ, Δ). Το clothianidin προκαλεί μια ελαφρά γραμμική μεταβολή του δείκτη με την αύξηση των συγκεντρώσεων κυρίως κατά τις 24 ώρες τόσο στα διαφοροποιημένα (E) όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (ΣΤ).



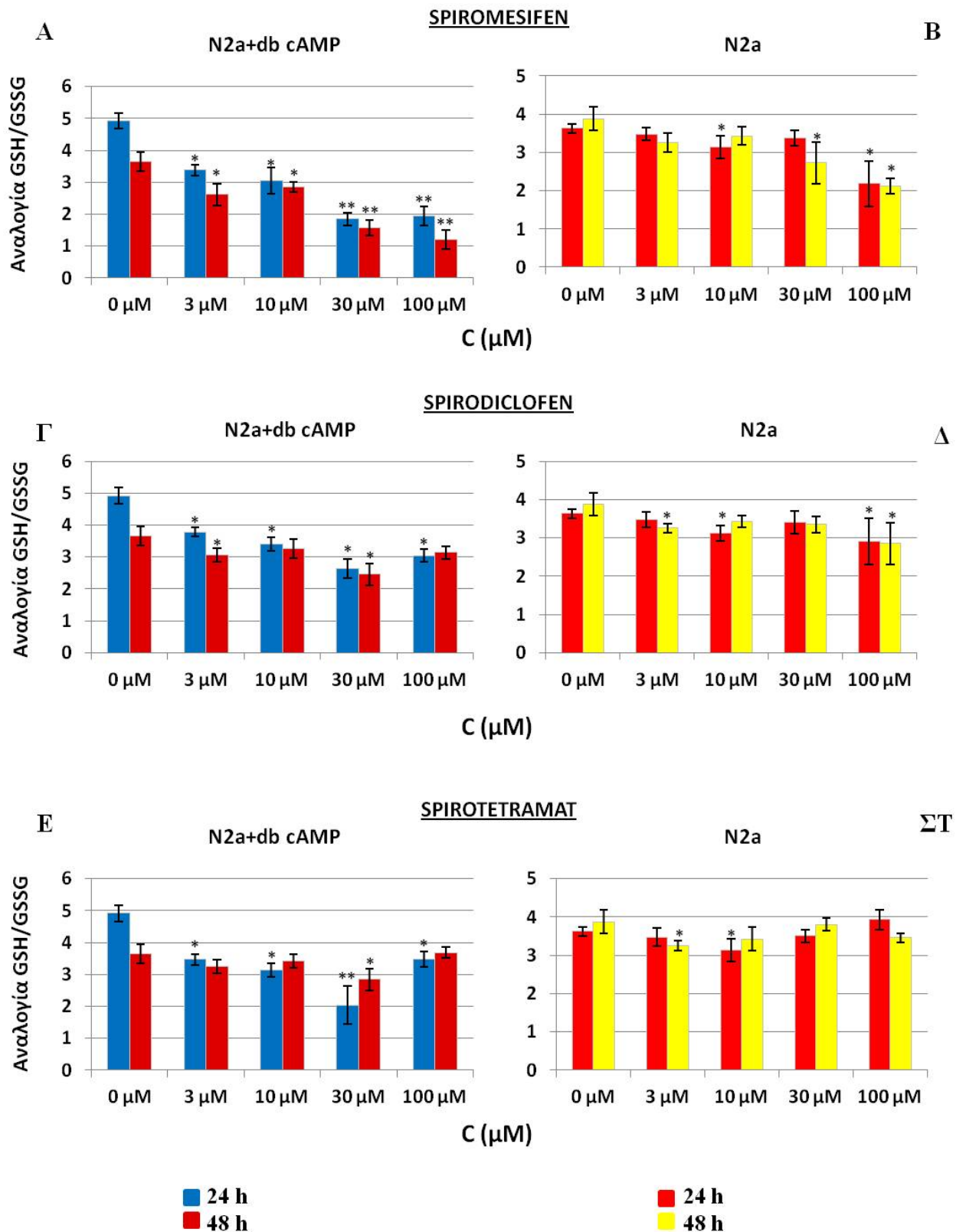
Εικόνα 3.26. Απεικονίζεται η αναλογία GSH/GSSG σε κύτταρα N2a μετά από 24ωρη και 48ωρη επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων imidacloprid, clothianidin (3, 10, 30 100 μM), καθώς και με MeOH (0.1 και 0.3%) και H₂O₂ (10 μM και 100 μM). Στα σχήματα Α,Γ,Ε απεικονίζονται κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, ενώ στα σχήματα Β, Δ, ΣΤ, κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί. Παρουσιάζεται ο λόγος GSH/GSSG ανά χειρισμό με ± % σφάλμα, *, *p<0,05.

Στην Εικόνα 3.27. απεικονίζεται η αναλογία GSH/GSSG κύτταρων N2a διαφοροποιημένων με db-cAMP (A, Γ, E) και μη διαφοροποιημένων κύτταρων N2a (B, Δ, ΣΤ) μετά από επώαση τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων thiacloprid (A, B) acetamiprid (Γ, Δ) και thiamethoxam (E, ΣΤ) για 24 (μπλε και μπορντό χρώμα) και 48 ώρες (κόκκινο και κίτρινο χρώμα). Τα φάρμακα προστέθηκαν στο θρεπτικό υλικό DMEM σε τελικές συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Παρατηρήθηκε ότι στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) το thiacloprid προκάλεσε μια ελαφρά αύξηση της αναλογίας GSH/GSSG ως προς το μάρτυρα στη συγκέντρωση 30 μM στις 24 ώρες ενώ κατά τις 48 ώρες παρατηρήθηκε επίσης μια ελαφρά αύξηση στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) το thiacloprid προκάλεσε μια ελαφρά γραμμική πτώση του δείκτη όσο αυξάνονταν οι συγκεντρώσεις τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες. Το acetamiprid παρουσίασε μια αύξηση του δείκτη με την αύξηση των συγκεντρώσεων μέχρι τα 30 μM στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ), ενώ στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή με εξαίρεση τα 30 μM στις 24 ώρες που έφεραν μια πτώση του δείκτη κοντά στο 30 % σε σχέση με το μάρτυρα. Το εντομοκτόνο thiamethoxam δεν προκάλεσε ιδιαίτερες μεταβολές στα διαφοροποιημένα κύτταρα (E) ενώ στα μη διαφοροποιημένα φαίνεται να προκάλεσε μια μείωση του δείκτη που είναι γραμμική μέχρι τα 100 μM στις 24 ώρες και μέχρι τα 30 μM στις 48 ώρες.

Στην Εικόνα 3.28. απεικονίζεται η αναλογία GSH/GSSG κύτταρων N2a διαφοροποιημένων με db-cAMP (A, Γ, E) και μη διαφοροποιημένων κύτταρων N2a (B, Δ, ΣΤ) μετά από επώαση τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων spiromesifen (A, B) spirodiclofen (Γ, Δ) και spirotetramat (E, ΣΤ) για 24 (μπλε και μπορντό χρώμα) και 48 ώρες (κόκκινο και κίτρινο χρώμα). Τα φάρμακα προστέθηκαν στο θρεπτικό υλικό DMEM σε τελικές συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Στο εντομοκτόνο spiromesifen παρατηρήθηκε ότι τόσο στα διαφοροποιημένα (A) όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) ο δείκτης μειωνόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης του εντομοκτόνου, κυρίως στις συγκεντρώσεις 10 - 100 μM . Η μείωση στα διαφοροποιημένα κύτταρα είναι ιδιαίτερα σημαντική αφού πλησιάζει στο 80 % του δείκτη του μάρτυρα στις 48 ώρες. Στα spirodiclofen και spirotetramat παρατηρείται επίσης μια πτώση του δείκτη που είναι γραμμική μέχρι τα 30 μM στα διαφοροποιημένα κύτταρα, ενώ στα μη διαφοροποιημένα δεν παρατηρούνται ιδιαίτερα σημαντικές μεταβολές.



Εικόνα 3.27. Απεικονίζεται η αναλογία GSH/GSSG σε κύτταρα N2a μετά από 24ωρη και 48ωρη επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων thiacloprid, acetamiprid και thiamethoxam (3, 10, 30 100 μM). Στα σχήματα A,Γ,Ε απεικονίζονται κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, ενώ στα σχήματα B, Δ, ΣΤ, κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί. Παρουσιάζεται ο λόγος GSH/GSSG ανά χειρισμό με ± % σφάλμα, *p<0,05.

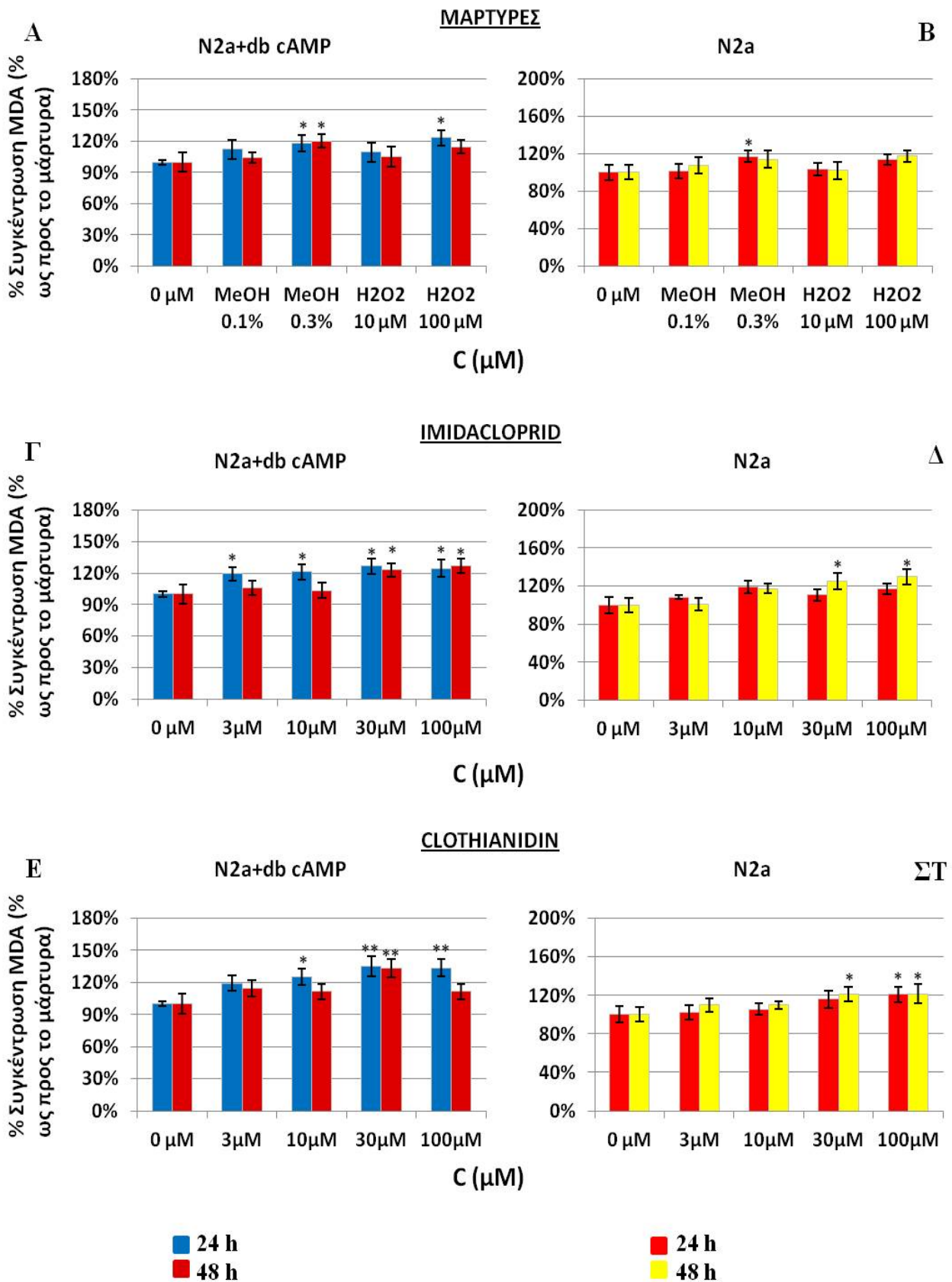


Εικόνα 3.28. Απεικονίζεται η αναλογία GSH/GSSG σε κύτταρα N2a μετά από 24ωρη και 48ωρη επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων spiromesifen, spirodiclofen και spirotetramat (3, 10, 30 100 μM). Στα σχήματα Α,Γ,Ε απεικονίζονται κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, ενώ στα σχήματα Β, Δ, ΣΤ, κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί. Παρουσιάζεται ο λόγος GSH/GSSG ανά χειρισμό με ± % σφάλμα, *p<0,05 **p<0,01.

3.6. Προσδιορισμός της επίδρασης των εντομοκτόνων στην υπεροξειδωση των λιπιδίων κυττάρων N2a με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος.

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης των εντομοκτόνων στην υπεροξειδωση των λιπιδίων κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με διβουτυλο-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη και μη διαφοροποιημένων κύτταρων πραγματοποιήθηκαν φωτομετρικές μετρήσεις της αντίδρασης της μηλονικής διαλδεύδης (MDA) με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Στην Εικόνα 3.29. απεικονίζεται η συγκέντρωση της MDA διαφοροποιημένων με db-cAMP κύτταρων N2a (A, Γ, E) και μη διαφοροποιημένων κύτταρων N2a (B, Δ, ΣΤ) μετά από επώαση τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων imidacloprid (Γ, Δ) και clothianidin (E, ΣΤ) για 24 (μπλε και μπορντό χρώμα) και 48 ώρες (κόκκινο και κίτρινο χρώμα). Τα φάρμακα προστέθηκαν στο θρεπτικό υλικό DMEM σε τελικές συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σε τελικές συγκεντρώσεις 10 και 100 μM καθώς και MeOH σε συγκέντρωση 0.1 και 0.3 % (A, B). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό MDA σε σχέση με το μάρτυρα.

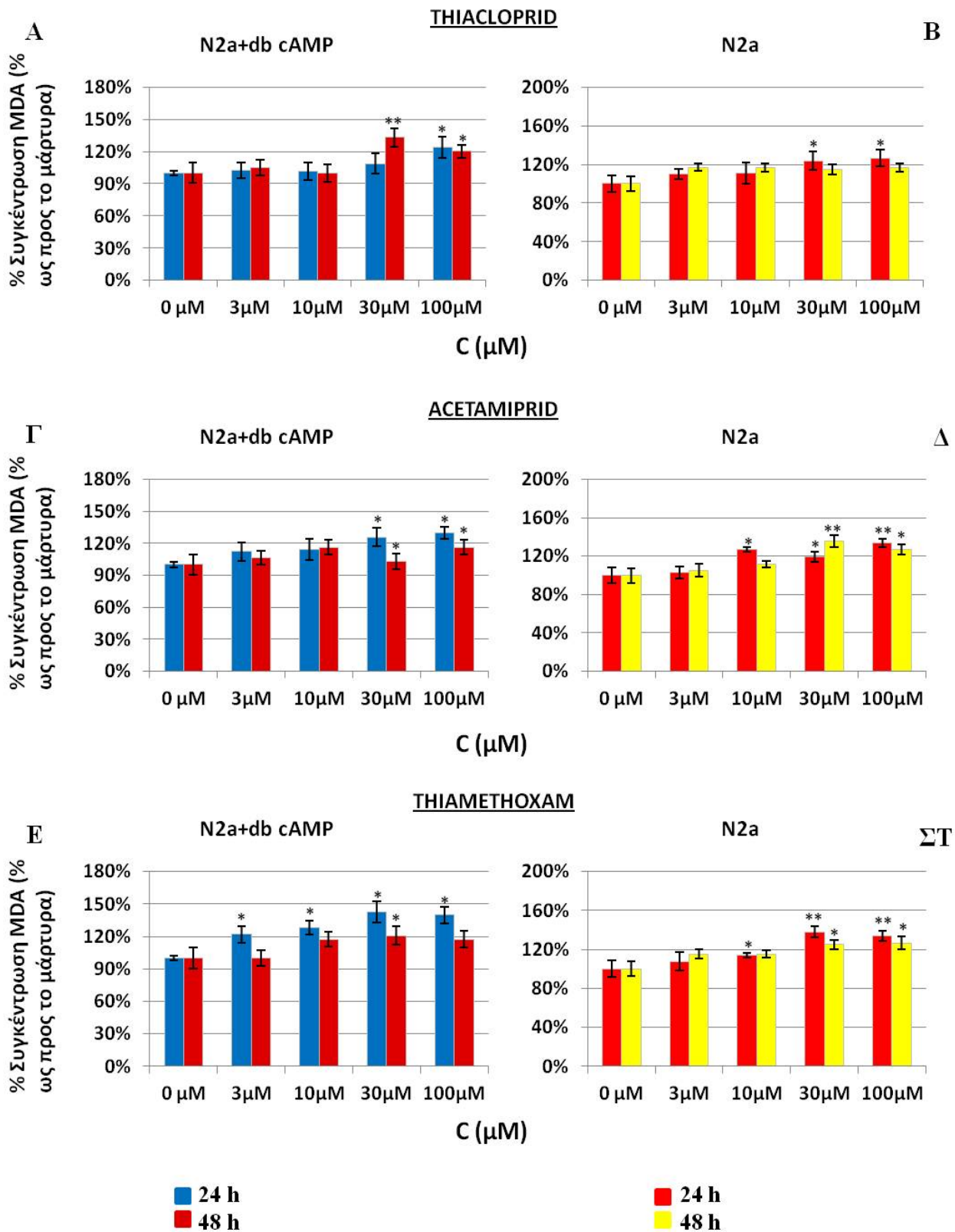
Φαίνεται ότι η MeOH αυξάνει τη συγκέντρωση της MDA στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) τόσο κατά τις 24 ώρες όσο και στις 48 ώρες σε συγκέντρωση 0.3 % ενώ παράλληλα παρατηρείται μια αύξηση της MDA και με την επίδραση του H_2O_2 κατά τις 24 ώρες. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) η συγκέντρωση της MDA αυξάνεται ελαφρώς με την επίδραση της MeOH σε συγκέντρωση 0.3 % κατά τις 24 ώρες. Το εντομοκτόνο imidacloprid φαίνεται να προκαλεί αξιοσημείωτες μεταβολές στη συγκέντρωση της MDA στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) στις 24 ώρες σε όλες τις συγκεντρώσεις και στις 48 ώρες στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρείται μια μικρή αύξηση της συγκέντρωσης στα 30 και 100 μM στις 48 ώρες. Το ίδιο μοτίβο επαναλαμβάνεται και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (ΣΤ) που είχαν υποστεί την επίδραση του clothianidin. Από την άλλη πλευρά, τα διαφοροποιημένα κύτταρα (E), εμφανίζουν μια γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης της MDA στις 24 ώρες που φτάνει μέχρι και 33 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 30 μM . Στις 48 ώρες το εντομοκτόνο αυξάνει τη συγκέντρωση κυρίως στα 30 μM (31 % πάνω από το μάρτυρα).



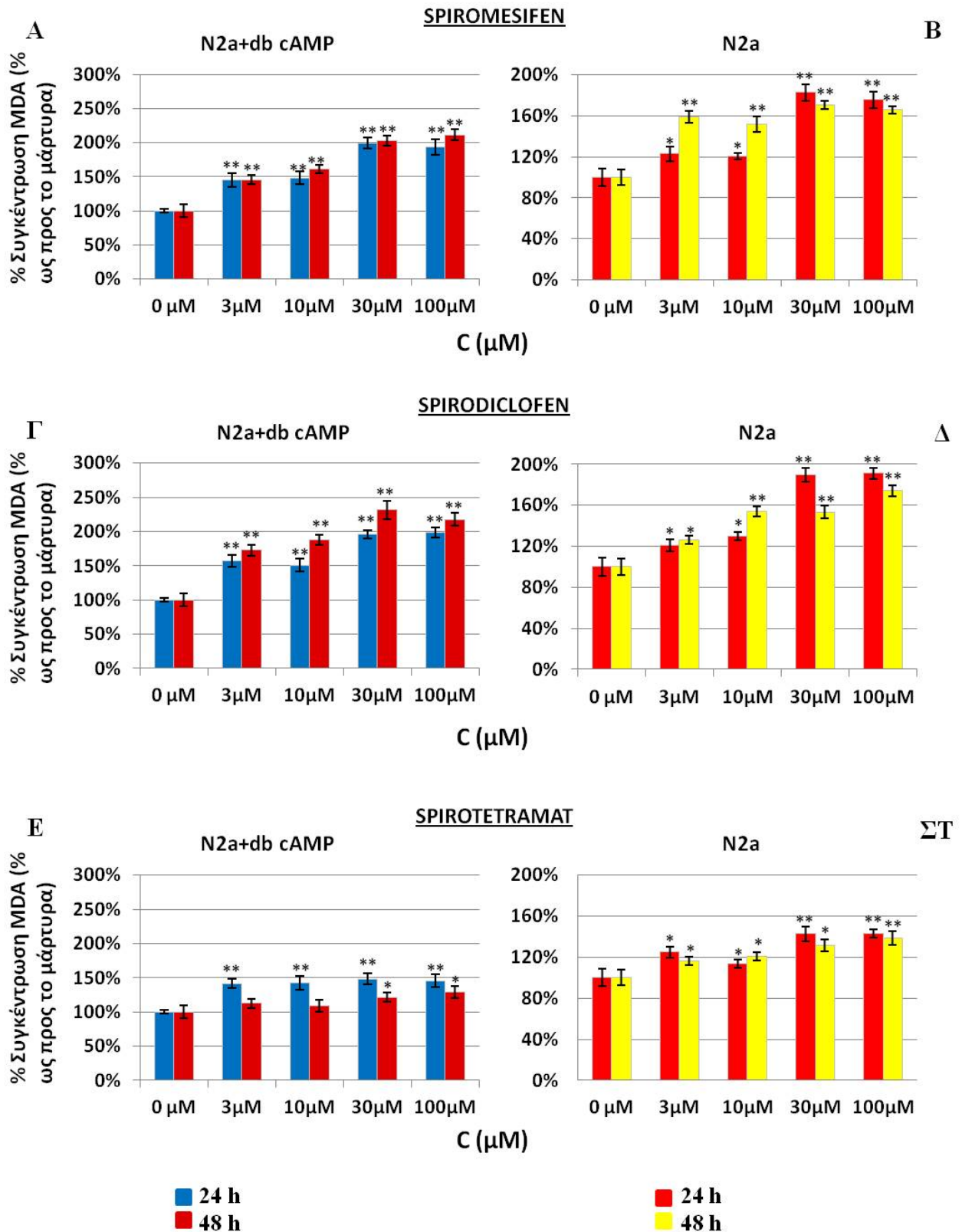
Εικόνα 3.29. Απεικονίζεται η συγκέντρωση MDA σε κύτταρα N2a μετά από 24ωρη και 48ωρη επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων imidacloprid, clothianidin (3, 10, 30 100 μM), καθώς και με MeOH (0.1 και 0.3%) και H₂O₂ (10 μM και 100 μM). Στα σχήματα Α,Γ,Ε απεικονίζονται κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, ενώ στα σχήματα Β, Δ, ΣΤ, κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό MDA σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, *p<0,05, **p<0,01.

Στην Εικόνα 3.30. απεικονίζεται η συγκέντρωση της MDA σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με db-cAMP (A, Γ, E) και μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a (B, Δ, ΣΤ) μετά από επώαση τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων thiacloprid (A, B) acetamiprid (Γ, Δ) και thiamethoxam (E, ΣΤ) για 24 (μπλε και μπορντό χρώμα) και 48 ώρες (κόκκινο και κίτρινο χρώμα). Τα φάρμακα προστέθηκαν στο θρεπτικό υλικό DMEM σε τελικές συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Παρατηρήθηκε ότι στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) το thiacloprid προκάλεσε μια σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της MDA (29 %) ως προς το μάρτυρα στη συγκέντρωση 30 μM στις 48 ώρες η οποία άρχισε να πέφτει στα 100 μM (20.2 %) ενώ κατά τις 24 ώρες παρατηρήθηκε επίσης μια ελαφρά αύξηση στη συγκέντρωση 30 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) το thiacloprid προκάλεσε μια αύξηση της MDA στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM στις 24 ώρες. Το acetamiprid παρουσίασε μια μικρή αύξηση της MDA στις συγκεντρώσεις 30 μM και 100 μM στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) που ξεπέρασε μόλις το 23 % της συγκέντρωσης του μάρτυρα στα 100 μM στις 24 ώρες, ενώ στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) σημειώθηκε μεταβολή στις ίδιες συγκεντρώσεις στις 24 ώρες που ξεπέρασε τη συγκέντρωση της MDA στο μάρτυρα κατά 37 % στα 30 μM στις 48 ώρες. Το εντομοκτόνο thiamethoxam παρουσίασε μια γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης στα διαφοροποιημένα κύτταρα (E) στις 24 ώρες μέχρι και τη συγκέντρωση 30 μM ενώ στα μη διαφοροποιημένα φαίνεται να προκάλεσε μια σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης στα 30 και στα 100 μM στις 24 ώρες που έφτασε στο 35 και στο 32 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα αντίστοιχα.

Στην Εικόνα 3.31. απεικονίζεται η συγκέντρωση της MDA σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με db-cAMP (A, Γ, E) και μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a (B, Δ, ΣΤ) μετά από επώαση τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων spiromesifen (A, B) spiroadiclofen (Γ, Δ) και spirotetramat (E, ΣΤ) για 24 (μπλε και μπορντό χρώμα) και 48 ώρες (κόκκινο και κίτρινο χρώμα). Τα φάρμακα προστέθηκαν στο θρεπτικό υλικό DMEM σε τελικές συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM . Στα εντομοκτόνα spiromesifen και spiroadiclofen παρατηρήθηκε ότι τόσο στα διαφοροποιημένα (A) όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) η συγκέντρωση της MDA αυξανόταν σημαντικά με την αύξηση της συγκέντρωσης των εντομοκτόνων σε όλες τις συγκεντρώσεις τόσο κατά τις 24 ώρες όσο και κατά τις 48 ώρες. Η αύξηση μάλιστα στο spiromesifen έφτασε στο 104 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα διαφοροποιημένα κύτταρα στα 100 μM κατά τις 48 ώρες, ενώ στο spiroadiclofen έφτασε περίπου το 135 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 30 μM . Στο spirotetramat παρατηρήθηκαν εξίσου σημαντικές αυξήσεις στη συγκέντρωση της MDA που δεν πέρασαν όμως το 52 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα.



Εικόνα 3.30. Απεικονίζεται η συγκέντρωση MDA σε κύτταρα N2a μετά από 24ωρη και 48ωρη επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων thiacloprid, acetamidiprid και thiamethoxam (3, 10, 30 100 μM). Στα σχήματα Α,Γ,Ε απεικονίζονται κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, ενώ στα σχήματα Β, Δ, ΣΤ, κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό MDA σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, *p<0,05, **p<0,01.



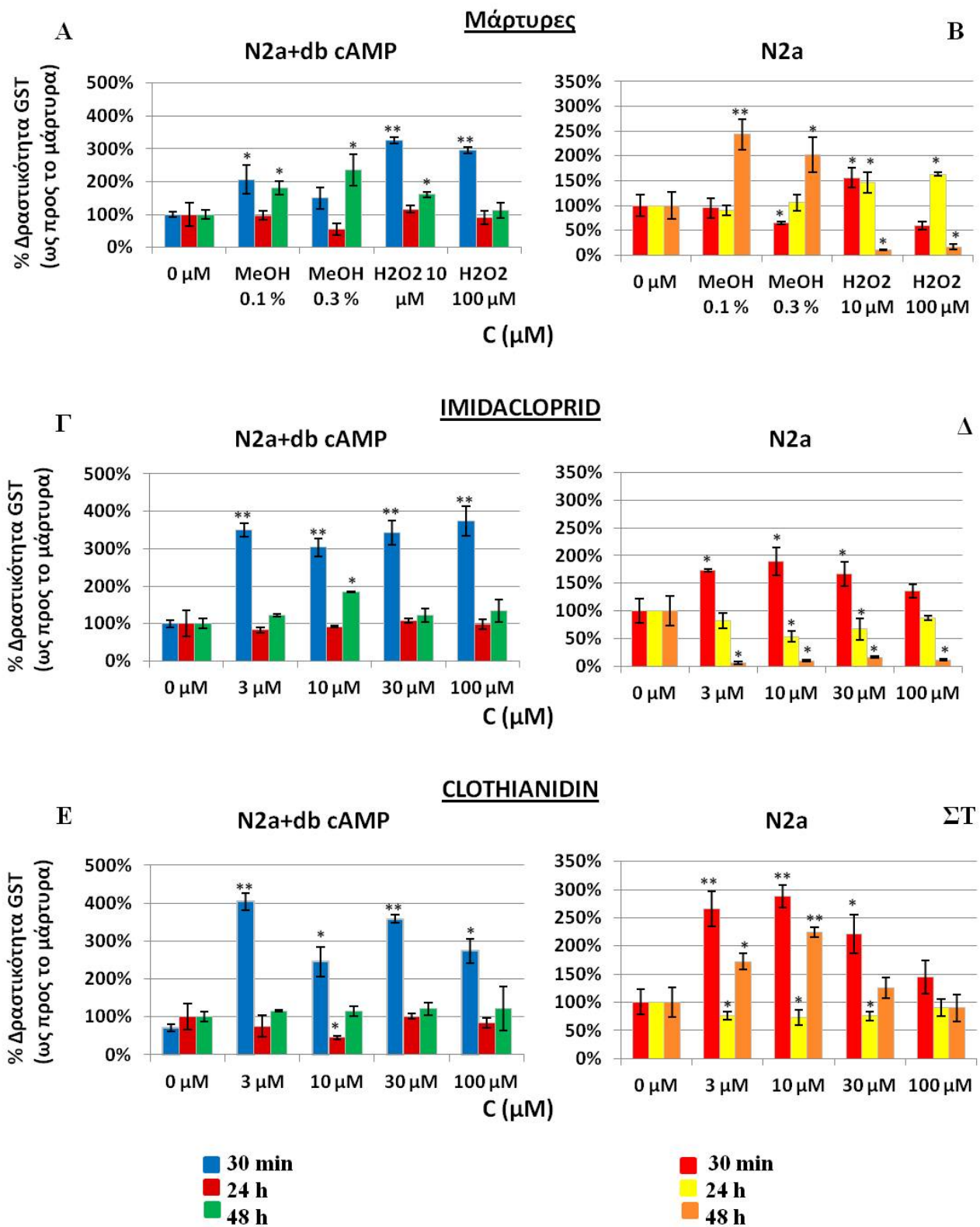
Εικόνα 3.31. Απεικονίζεται η συγκέντρωση MDA σε κύτταρα N2a μετά από 24ωρη και 48ωρη επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων spiromesifen, spirodiclofen και spirotetramat (3, 10, 30 100 μM). Στα σχήματα Α,Γ,Ε απεικονίζονται κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, ενώ στα σχήματα Β, Δ, ΣΤ, κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό MDA σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, *p<0,05, **p<0,01.

3.7. Προσδιορισμός της επίδρασης των εντομοκτόνων στη δραστηριότητα του ενζύμου S μεταφοράση του γλουταθείου (GST) σε κύτταρα N2a.

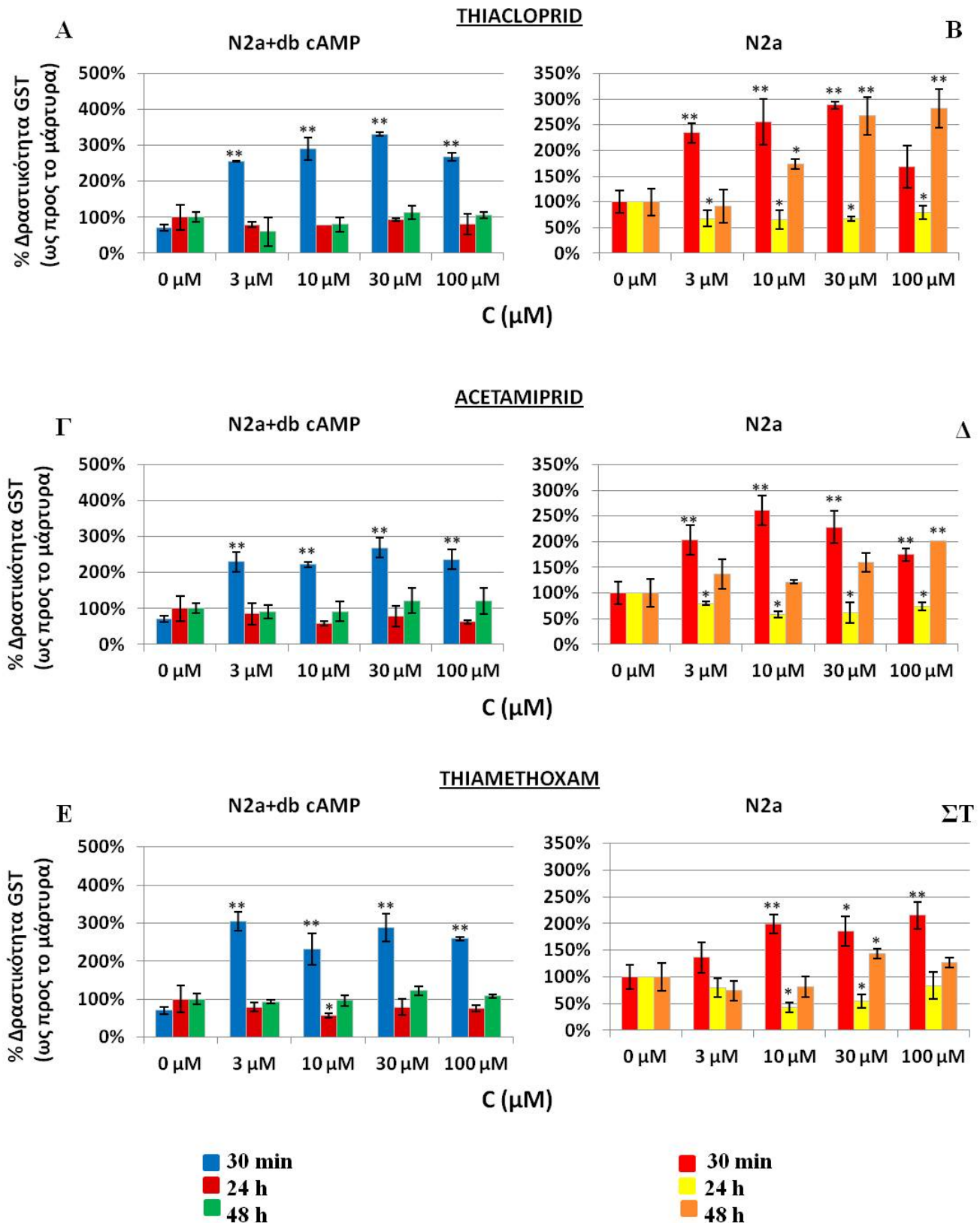
Για τον προσδιορισμό της επίδρασης των εντομοκτόνων στο ένζυμο S μεταφοράση του γλουταθείου σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με dc-cAMP και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα πραγματοποιήθηκαν φωτομετρικές μετρήσεις της αντίδρασης του ενζύμου με GSH και CDNB για 3 min. Τα κύτταρα είχαν επωαστεί με τα φάρμακα για 30 min, 24 h και 48 h. Παράλληλα, έγινε επώαση κυττάρων με MeOH σε συγκεντρώσεις 0.1 % και 0.3% και με H₂O₂ σε συγκεντρώσεις 10 και 100 μM προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα N2a που δεν είχαν επωαστεί με τις ουσίες. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών έγινε με τη φωτομετρική μέθοδο Bradford.

Στην Εικόνα 3.32. απεικονίζονται τα ποσοστά της δραστηριότητας του ενζύμου S μεταφοράση του γλουταθείου κυττάρων N2a διαφοροποιημένων (A, Γ, E) και μη διαφοροποιημένων (B, Δ, ΣΤ) μετά από επώασή τους με MeOH σε συγκεντρώσεις 0.1% και 0.3% , με H₂O₂ σε συγκεντρώσεις 10 μM και 100 μM, καθώς και με τα εντομοκτόνα imidacloprid και clothianidin σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό μεταβολής της δραστηριότητας σε σχέση με το μάρτυρα (κύτταρα που επώαστηκαν χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας). Όσον αφορά τα διαφοροποιημένα κύτταρα οι μπλε στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 30 min, οι μπλε στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 24 h και οι πράσινες στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 48 h. Αντίστοιχα, στη δεξιά πλευρά της Εικόνας 3.32. που αφορά στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα, οι κόκκινες στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 30 min, οι κίτρινες στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 24 h και οι πορτοκαλί στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 48 h.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.32. το H₂O₂ (A, B) που χρησιμοποιήθηκε ως ουσία που προκαλεί κυτταρικό θάνατο φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα του ενζύμου τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα μετά από τη μισάωρη επώαση και μετά από τη 48ωρη επώαση. Πολύ σημαντική μεταβολή στη δραστηριότητα του ενζύμου μετά από τη μισάωρη επώαση φαίνεται να προκαλούν τόσο το imidacloprid (Γ, Δ) όσο και το clothianidin (E,ΣΤ) σε όλες τις συγκεντρώσεις και στους δύο τύπους κυττάρων. Το imidacloprid προκαλεί επίσης πτώση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά τη 48ωρη επώαση στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ).



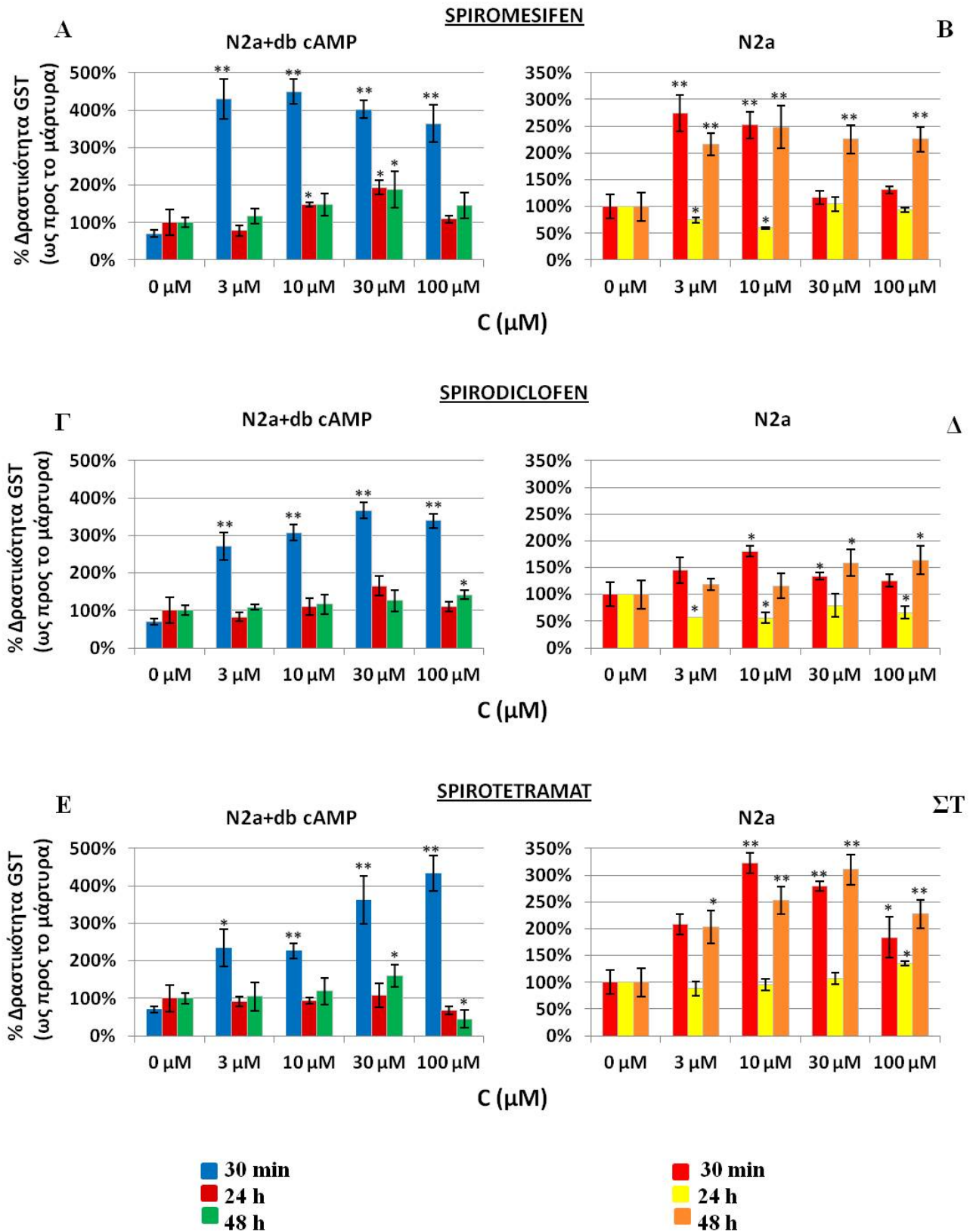
Εικόνα 3.32. Απεικονίζεται η δραστηκότητα του ενζύμου GST κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db-cAMP (A, Γ, E) και μη διαφοροποιημένων (B, Δ, ΣΤ) μετά από επίδραση τους με MeOH (συγκεντρώσεις 0.1 και 0.3%), H₂O₂ (συγκεντρώσεις 10 και 100 μM) και με τα εντομοκτόνα imidacloprid και clothianidin (συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM) για 30 min, 24 h και 48 h. Εκφράζεται το ποσοστό αύξησης της δραστηκότητας των GSTs σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, *p<0,05 **p<0,01.



Εικόνα 3.33. Απεικονίζεται η δραστηκότητα του ενζύμου GST κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db-cAMP (A, Γ, E) και μη διαφοροποιημένων (B, Δ, ΣΤ) μετά από επίδραση τους με τα εντομοκτόνα thiacloprid, acetamiprid και thiamethoxam (συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM) για 30 min, 24 h και 48 h. Εκφράζεται το ποσοστό αύξησης της δραστηκότητας των GSTs σε σχέση με το μάρτυρα με \pm σφάλμα, *, $p < 0,05$ **, $p < 0,01$.

Στην Εικόνα 3.33. απεικονίζονται τα ποσοστά της δραστηριότητας του ενζύμου S μεταφοράση του γλουταθείου κυττάρων N2a διαφοροποιημένων (A, Γ, E) και μη διαφοροποιημένων (B, Δ, ΣΤ) μετά από επώασή τους με τα εντομοκτόνα thiacloprid, acetamiprid και thiamethoxam σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μΜ. Όπως φαίνεται, και τα τρία εντομοκτόνα εμφανίζουν σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου μετά τη μισάωρη επώαση τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή μετά τις 24 και τις 48 ώρες. Αντίθετα, στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα στις 48 ώρες παρατηρείται μια γραμμική αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου σε όλα τα εντομοκτόνα.

Στην Εικόνα 3.34. απεικονίζονται τα ποσοστά της δραστηριότητας του ενζύμου S μεταφοράση του γλουταθείου κυττάρων N2a διαφοροποιημένων (A, Γ, E) και μη διαφοροποιημένων (B, Δ, ΣΤ) μετά από επώασή τους με τα εντομοκτόνα spiromesifen, spirotetramat και spirotetramat σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μΜ. Όπως και στην Εικόνα 3.33. και τα τρία εντομοκτόνα εμφανίζουν σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου μετά τη μισάωρη επώαση τόσο στα διαφοροποιημένα (η δραστηριότητα είναι 3,5 φορές μεγαλύτερη από του μάρτυρα στα 10 μΜ στο spiromesifen) όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Μόνη εξαίρεση σε αυτό το μοτίβο αποτελούν τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα στην περίπτωση του spirotetramat που δεν εμφανίζουν αξιοσημείωτη μεταβολή στην ενζυμική δραστηριότητα. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή μετά τις 24 και τις 48 ώρες. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα στις 48 ώρες η επίδραση των εντομοκτόνων spiromesifen και spirotetramat επιφέρει μια επίσης πολύ σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση του ενζύμου.



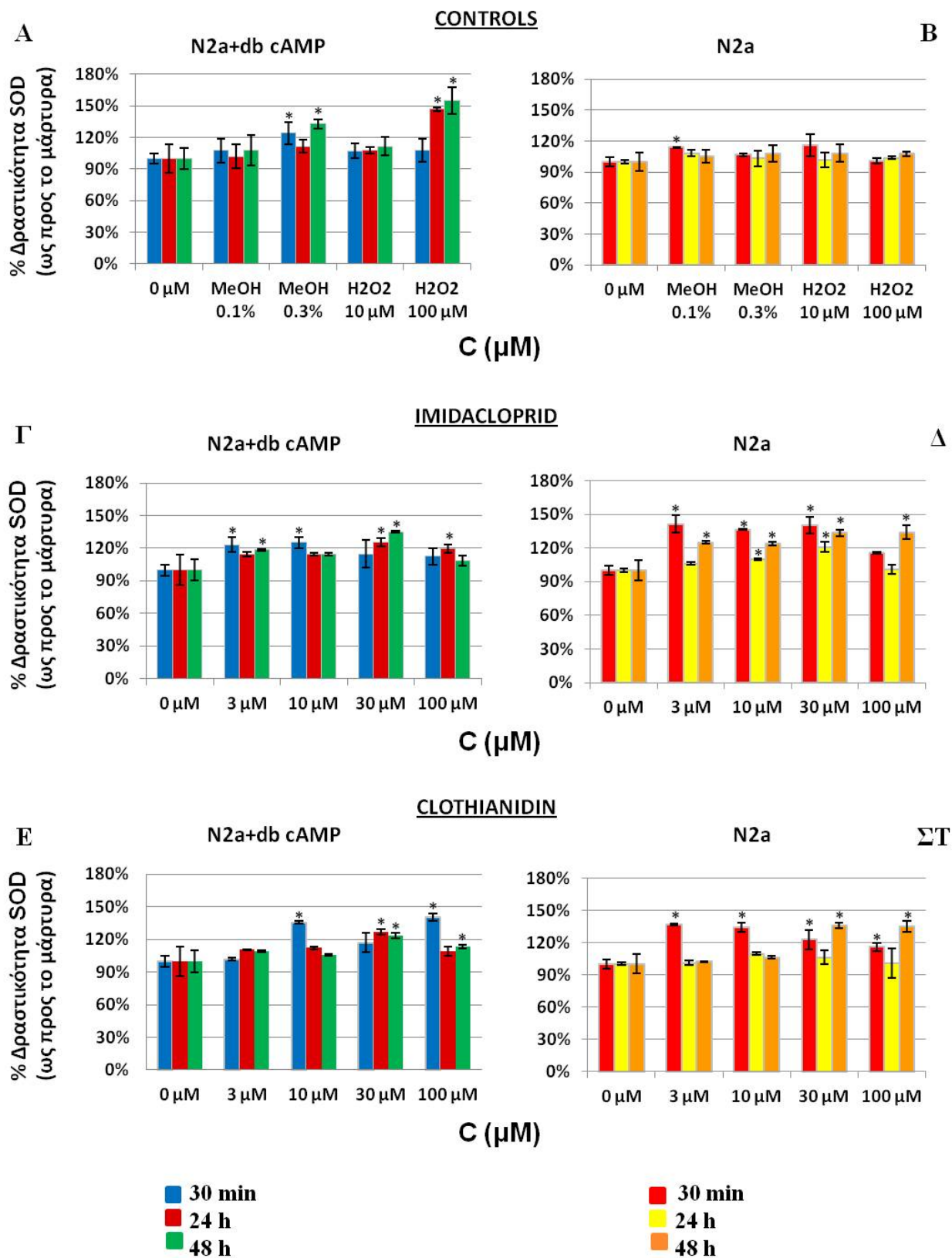
Εικόνα 3.34. Απεικονίζεται η δραστηκότητα του ενζύμου GST κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db-cAMP (A, Γ, E) και μη διαφοροποιημένων (B, Δ, ΣΤ) μετά από επίδραση τους με τα εντομοκτόνα spiromesifen, spirodiclofen και spirotetramat (συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM) για 30 min, 24 h και 48 h. Εκφράζεται το ποσοστό αύξησης της δραστηκότητας των GSTs σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

3.8. Προσδιορισμός της επίδρασης των εντομοκτόνων στη δραστηριότητα του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) σε κύτταρα N2a.

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης των εντομοκτόνων στο ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με dc-cAMP και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα πραγματοποιήθηκαν φωτομετρικές μετρήσεις της παρεμπόδισης της αντίδρασης του NBT με τη ριβοφλαβίνη από το ένζυμο. Τα κύτταρα είχαν επωαστεί με τα φάρμακα για 30 min, 24 h και 48 h. Παράλληλα, έγινε επώαση κυττάρων με MeOH σε συγκεντρώσεις 0.1 % και 0.3% και με H₂O₂ σε συγκεντρώσεις 10 και 100 μM προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα N2a που δεν είχαν επωαστεί με τις ουσίες. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών έγινε με τη φωτομετρική μέθοδο Bradford.

Στην Εικόνα 3.35. απεικονίζονται τα ποσοστά της δραστηριότητας του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) κυττάρων N2a διαφοροποιημένων (A, Γ, E) και μη διαφοροποιημένων (B, Δ, ΣΤ) μετά από επώασή τους με MeOH σε συγκεντρώσεις 0.1% και 0.3% , με H₂O₂ σε συγκεντρώσεις 10 μM και 100 μM, καθώς και με τα εντομοκτόνα imidacloprid και clothianidin σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό μεταβολής της δραστηριότητας σε σχέση με το μάρτυρα (κύτταρα που επώαστηκαν χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας). Όσον αφορά τα διαφοροποιημένα κύτταρα οι μπλε στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 30 min, οι μπορντό στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 24 h και οι πράσινες στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 48 h. Αντίστοιχα, στη δεξιά πλευρά της Εικόνας 3.35. που αφορά στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα, οι κόκκινες στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 30 min, οι κίτρινες στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 24 h και οι πορτοκαλί στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 48 h.

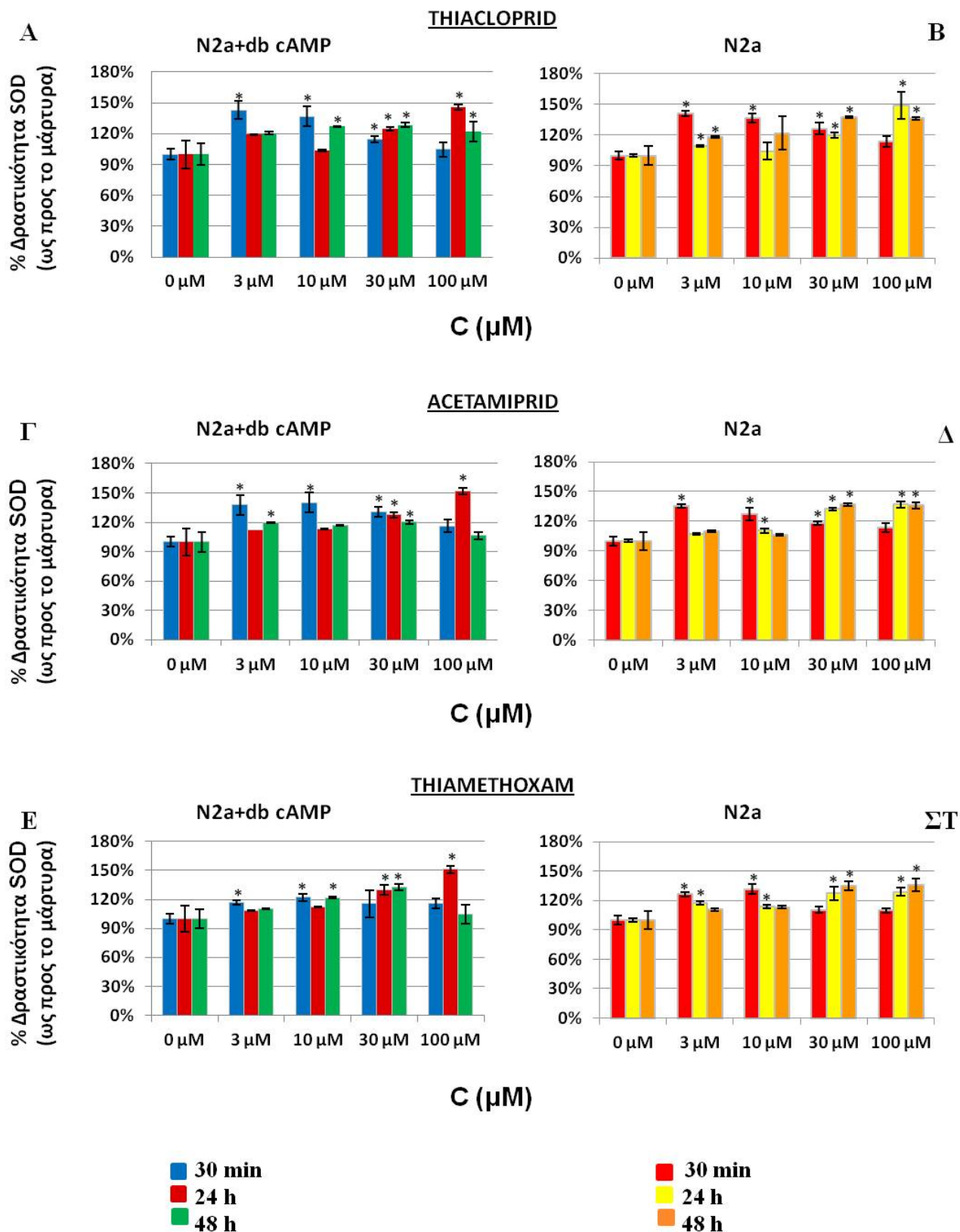
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.35. το H₂O₂ (A) που χρησιμοποιήθηκε ως ουσία που προκαλεί κυτταρικό θάνατο φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα του ενζύμου στα διαφοροποιημένα κύτταρα μετά από τη μισάωρη επώαση (μπλε στήλη) και μετά από την 24ωρη (μπορντό στήλη) και τη 48ωρη επώαση (πράσινη στήλη) στα 100 μM. Αρκετά σημαντική μεταβολή στη δραστηριότητα του ενζύμου μετά από τη μισάωρη επώαση φαίνεται να προκαλούν τόσο το imidacloprid (Γ, Δ) όσο και το clothianidin (E,ΣΤ) σχεδόν σε όλες τις συγκεντρώσεις και στους δύο τύπους κυττάρων. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα το imidacloprid προκαλεί επίσης μια ελαφρά μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου κατά τη 48ωρη επώαση στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) σε όλες τις συγκεντρώσεις ενώ το clothianidin προκαλεί μια επίσης ελαφρά μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου κατά τη 48ωρη επώαση στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM.



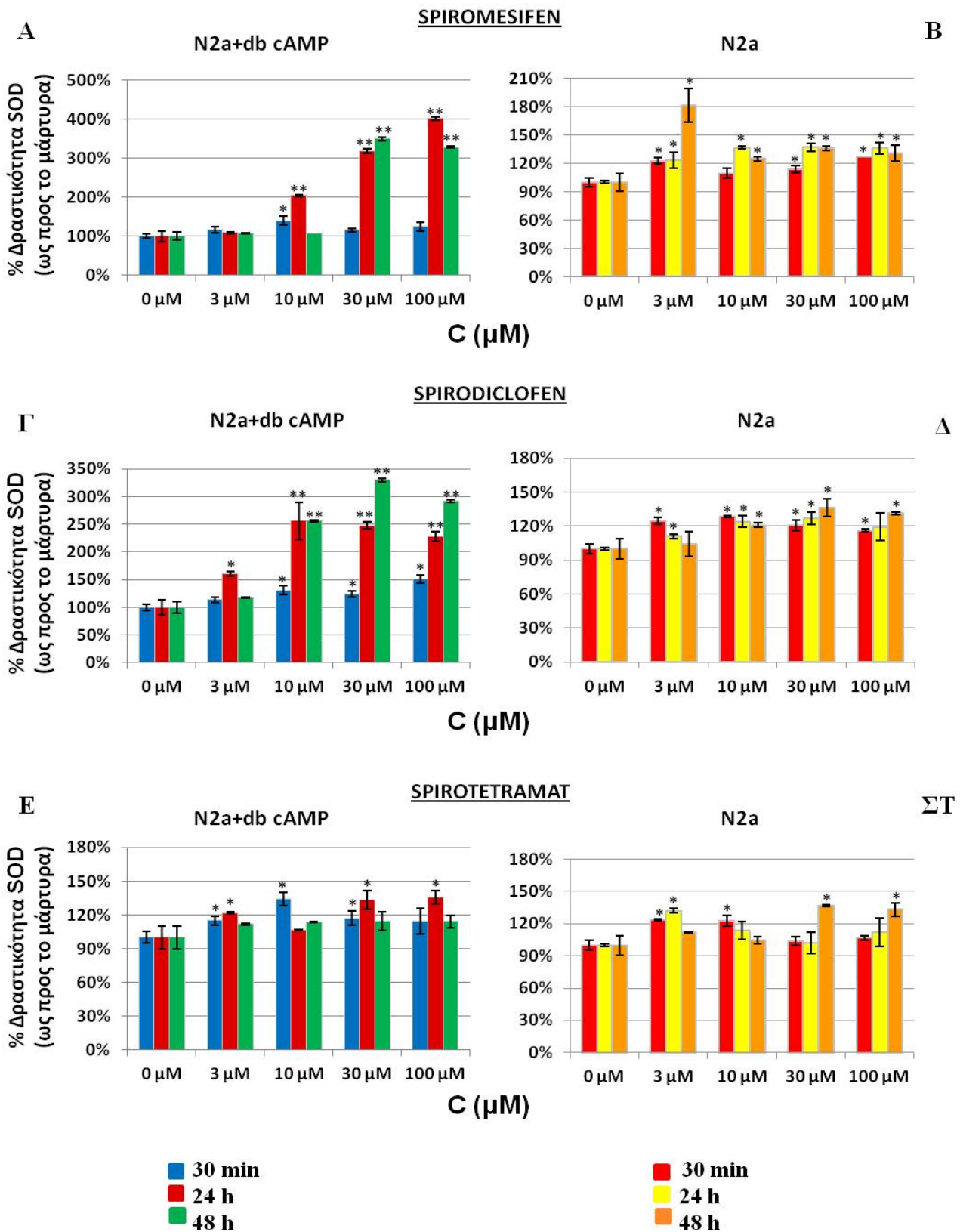
Εικόνα 3.35. Απεικονίζεται η δραστηριότητα του ενζύμου SOD κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db-cAMP (A, Γ, Ε) και μη διαφοροποιημένων (B, Δ, ΣΤ) μετά από επίδραση τους με MeOH (συγκεντρώσεις 0.1 και 0.3%), H₂O₂ (συγκεντρώσεις 10 και 100 μM) και με τα εντομοκτόνα imidacloprid και clothianidin (συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM) για 30 min, 24 h και 48 h. Εκφράζεται το ποσοστό αύξησης της δραστηριότητας της SOD σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, *p<0,05 **p<0,01

Στην Εικόνα 3.36. απεικονίζονται τα ποσοστά της δραστηριότητας του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου κυττάρων N2a διαφοροποιημένων (Α, Γ, Ε) και μη διαφοροποιημένων (Β, Δ, ΣΤ) μετά από επώασή τους με τα εντομοκτόνα thiacloprid, acetamiprid και thiamethoxam σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μΜ. Όπως φαίνεται, και τα τρία εντομοκτόνα εμφανίζουν μια αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου μετά τη μισάωρη επώαση (μπλε και κόκκινες στήλες) τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα στις συγκεντρώσεις από 3 έως 30 μΜ. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα παρατηρείται μια ελαφρά μεταβολή κατά τις 24 (μπορντό στήλη) και τις 48 ώρες (πράσινη στήλη) στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μΜ και στα τρία εντομοκτόνα. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα στις 24 (κίτρινη στήλη) και στις 48 ώρες (πορτοκαλί στήλη), στα εντομοκτόνα thiacloprid (Β) και thiamethoxam (ΣΤ) παρατηρείται μια αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου στις συγκεντρώσεις 3, 10 και 100 μΜ, ενώ στο εντομοκτόνο acetamiprid η αύξηση εντοπίζεται μεταξύ των συγκεντρώσεων 10 έως 100 μΜ.

Στην Εικόνα 3.37. απεικονίζονται τα ποσοστά της δραστηριότητας του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου κυττάρων N2a διαφοροποιημένων (Α, Γ, Ε) και μη διαφοροποιημένων (Β, Δ, ΣΤ) μετά από επώασή τους με τα εντομοκτόνα spiromesifen, spirotetramat και spirotetramat σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μΜ. Τα εντομοκτόνα spiromesifen και spirotetramat εμφανίζουν σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου μετά τη 24ωρη (μπορντό στήλη) και τη 48ωρη (πράσινη στήλη) επώαση στα διαφοροποιημένα κύτταρα (η δραστηριότητα φτάνει να είναι έως 3 φορές μεγαλύτερη από του μάρτυρα στα 100 μΜ στο spiromesifen (Α) στις 24 ώρες). Το spirotetramat (Ε) παρουσίασε μια ελαφρά αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου κυρίως στις 24 ώρες. Μόνη εξαίρεση σε αυτό το μοτίβο αποτελούν τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα στην περίπτωση του spirotetramat που δεν εμφανίζουν αξιοσημείωτη μεταβολή στην ενζυμική δραστηριότητα. Αντίστοιχα, στα διαφοροποιημένα κύτταρα τα spiromesifen και spirotetramat παρουσίασαν μια ελαφρά αύξηση στη δραστηριότητα κυρίως κατά τις 24 (κίτρινη στήλη) και τις 48 ώρες (πορτοκαλί στήλη). Ειδικά το spiromesifen εμφάνισε μία αύξηση της δραστηριότητας 0,8 φορές μεγαλύτερη του μάρτυρα στα 3 μΜ στις 48 ώρες. Η επίδραση του spirotetramat (ΣΤ) επέφερε σημαντικές μεταβολές κυρίως στις 48 ώρες (πορτοκαλί στήλη) στα 30 και 100 μΜ.



Εικόνα 3.36. Απεικονίζεται η δραστηκότητα του ενζύμου SOD κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db-cAMP (A, Γ, E) και μη διαφοροποιημένων (B, Δ, ΣΤ) μετά από επίδραση τους με τα εντομοκτόνα thiacloprid, acetamiprid και thiamethoxam (συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM) για 30 min, 24 h και 48 h. Εκφράζεται το ποσοστό αύξησης της δραστηκότητας της SOD σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, *p<0,05 **p<0,01.



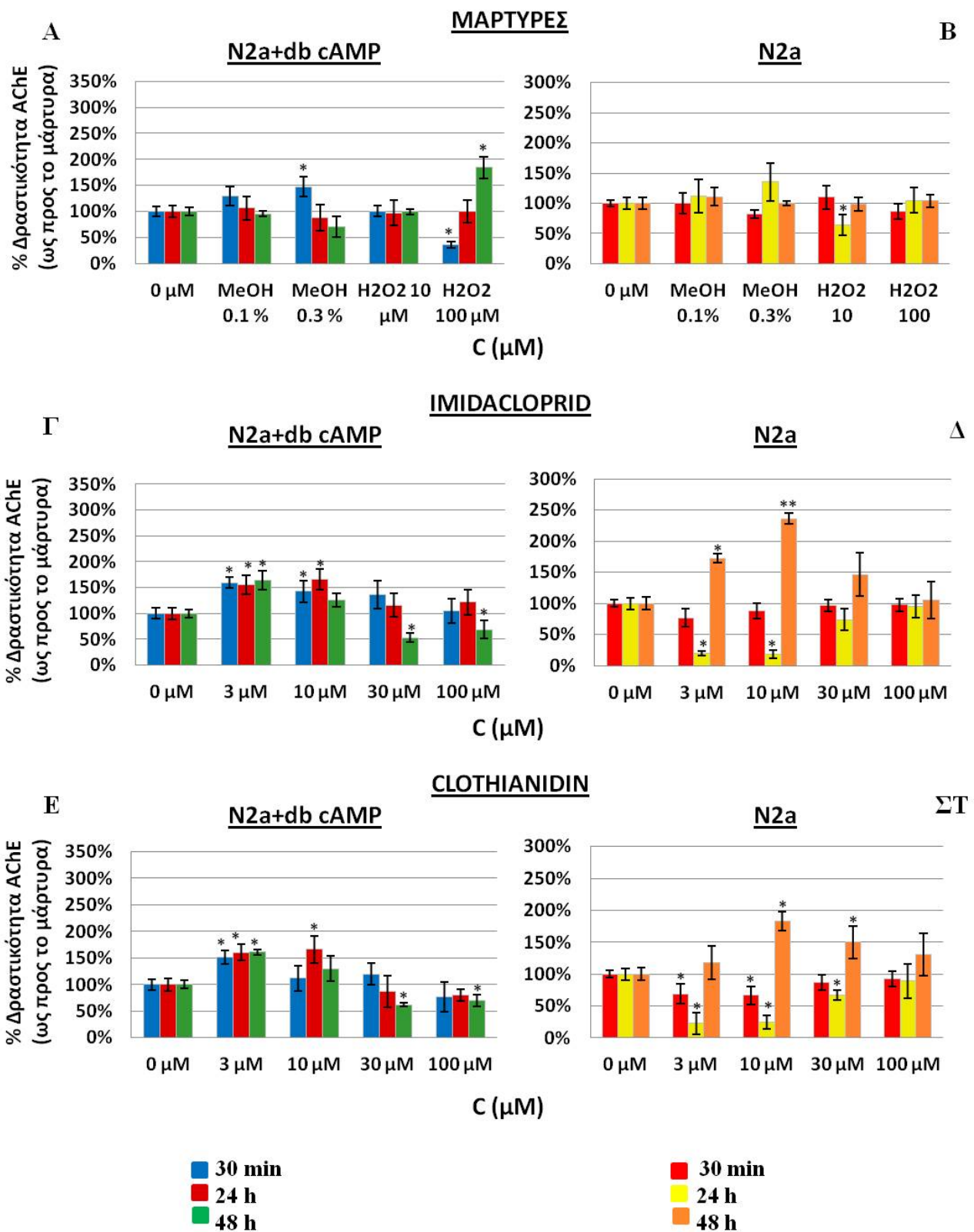
Εικόνα 3.37. Απεικονίζεται η δραστηκότητα του ενζύμου SOD κυττάρων N2a διαφοροποιημένων με db-cAMP (A, Γ, E) και μη διαφοροποιημένων (B, Δ, ΣΤ) μετά από επίδραση τους με τα εντομοκτόνα spiromesifen, spirodiclofen και spirotetramat (συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM) για 30 min, 24 h και 48 h. Εκφράζεται το ποσοστό αύξησης της δραστηκότητας της SOD σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, *p<0,05 **p<0,01.

3.9. Προσδιορισμός της επίδρασης των εντομοκτόνων στη δραστικότητα του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE) κυττάρων N2a.

Η πιθανή επίδραση των εντομοκτόνων στη δραστικότητα του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE) προσδιορίστηκε φωτομετρικά με τη μέθοδο Ellman (Ellman, 1961). Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις φωτομετρικές της ενζυμικής δραστικότητας σε κύτταρα N2a διαφοροποιημένα με dc-cAMP και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα για 3 min. Τα κύτταρα είχαν επωαστεί με τα φάρμακα για 30 min, 24 h και 48 h. Παράλληλα, έγινε επώαση κυττάρων με MeOH σε συγκεντρώσεις 0.1 % και 0.3% και με H₂O₂ σε συγκεντρώσεις 10 και 100 μM προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα N2a που δεν είχαν επωαστεί με τις ουσίες. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών έγινε με τη φωτομετρική μέθοδο Bradford.

Στην Εικόνα 3.38. απεικονίζονται τα ποσοστά της δραστικότητας της AChE σε διαφοροποιημένα με db-cAMP κύτταρα N2a (A, Γ, E) και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a (B, Δ, ΣΤ) μετά από επώασή τους με MeOH σε συγκεντρώσεις 0.1% και 0.3% , με H₂O₂ σε συγκεντρώσεις 10 μM και 100 μM, καθώς και με τα εντομοκτόνα imidacloprid και clothianidin σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μM. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό μεταβολής της δραστικότητας σε σχέση με το μάρτυρα (κύτταρα που επώαστηκαν χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας). Όσον αφορά τα διαφοροποιημένα κύτταρα οι μπλε στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 30 min, οι μπορντό στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 24 h και οι πράσινες στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 48 h. Αντίστοιχα, στη δεξιά πλευρά της Εικόνας 3.38. που αφορά στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα, οι κόκκινες στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 30 min, οι κίτρινες στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 24 h και οι πορτοκαλί στήλες απεικονίζουν κύτταρα που επώαστηκαν με τις ουσίες για 48 h.

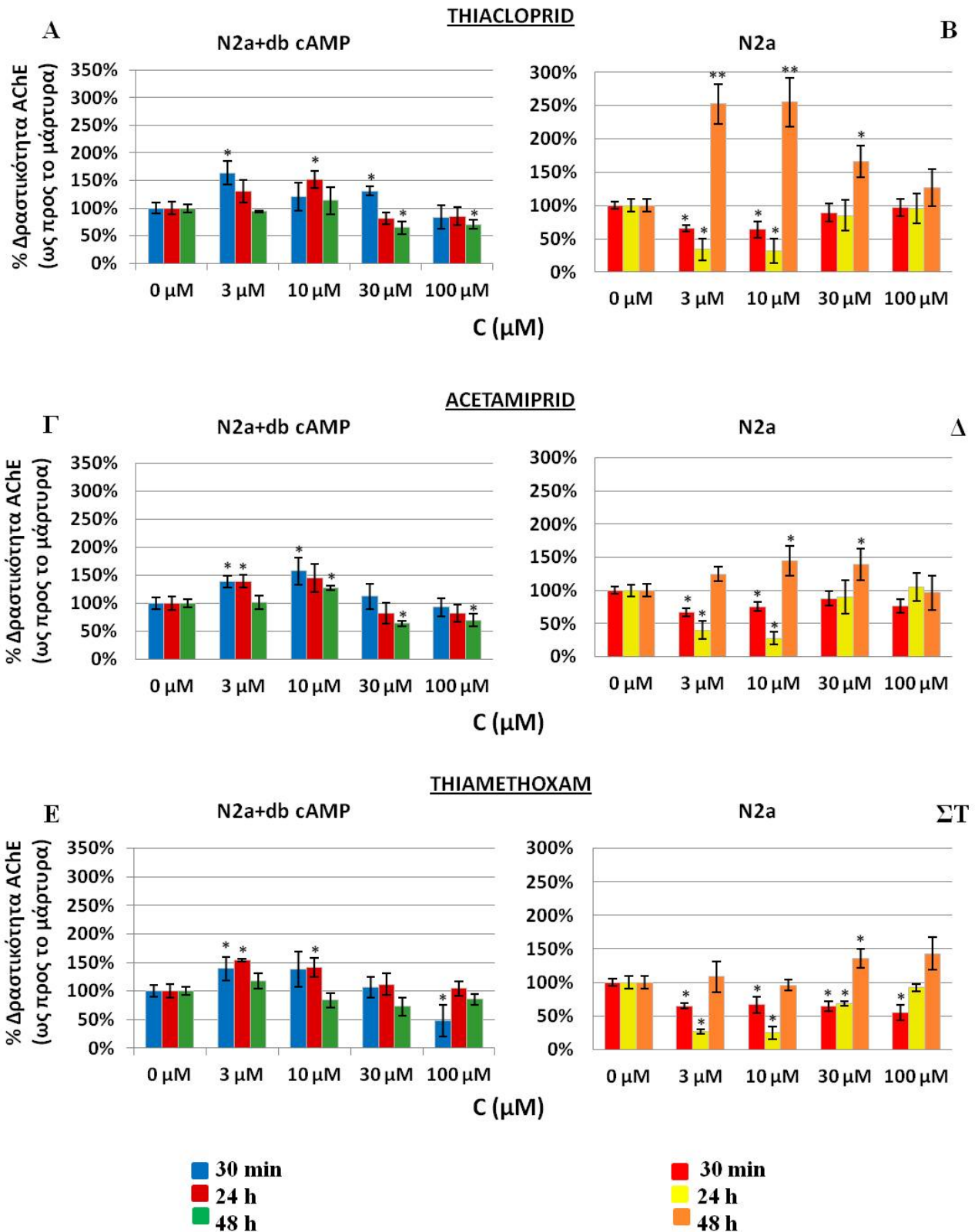
Παρατηρήθηκε ότι τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα η MeOH δε φαίνεται να επηρεάζει τη δραστικότητα του ενζύμου, ενώ το H₂O₂ στα διαφοροποιημένα κύτταρα αύξησε τη δραστικότητα του ενζύμου δύο φορές σε σχέση με το μάρτυρα στις 48 ώρες (A). Τα εντομοκτόνα imidacloprid και clothianidin στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ, E) στις συγκεντρώσεις 3 και 10 μM αυξάνουν τη δραστικότητα του ενζύμου ενώ στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM μειώνουν τη δραστικότητα κοντά στο 50 % του μάρτυρα στις 48 ώρες. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ, ΣΤ) στις 48 ώρες, όλες οι συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων αυξάνουν τη δραστικότητα του ενζύμου και ιδίως το imidacloprid στη συγκέντρωση 10 μM όπου φαίνεται η δραστικότητα να ξεπερνά το διπλάσιο του μάρτυρα.



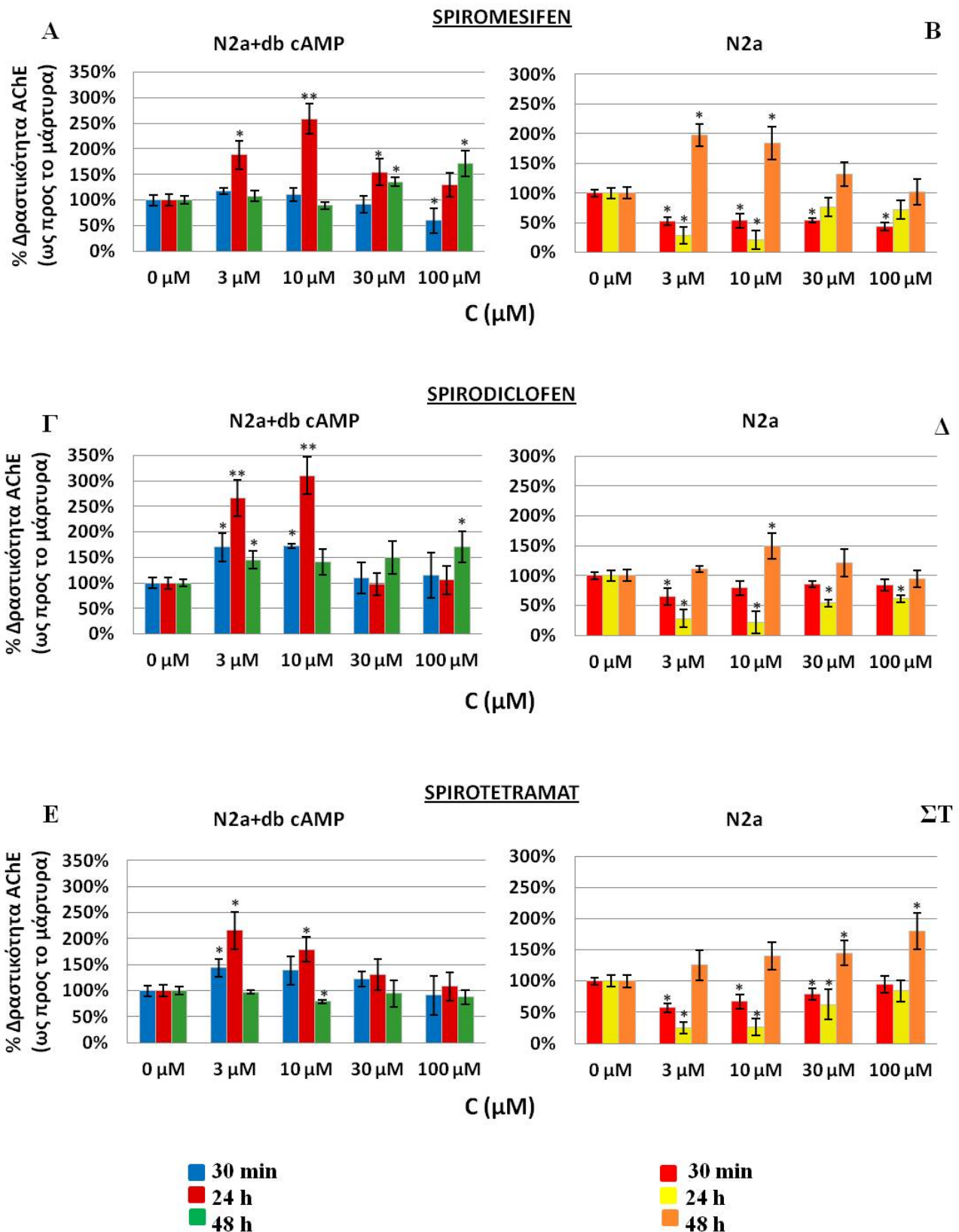
Εικόνα 3.38. Απεικονίζεται η ειδική δραστηκότητα της AChE κυττάρων N2a μετά από επώαση τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων imidacloprid, clothianidin (3, 10, 30 100 μM), καθώς και με MeOH (0.1 και 0.3%) και H₂O₂ (10 μM και 100 μM), για 30 min, 24 h και 48 h. Στα σχήματα Α,Γ,Ε απεικονίζονται κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, ενώ στα σχήματα Β, Δ, ΣΤ, κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί. Η ειδική δραστηκότητα του ενζύμου έχει εκφραστεί ως ποσοστό δραστηκότητας της AChE σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, *p<0,05 **p<0,01.

Στην Εικόνα 3.39. απεικονίζονται τα ποσοστά της δραστηριότητας του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE) κυττάρων N2a διαφοροποιημένων (Α, Γ, Ε) και μη διαφοροποιημένων (Β, Δ, ΣΤ) μετά από επώασή τους με τα εντομοκτόνα thiacloprid, acetamiprid και thiamethoxam σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μΜ. Όπως φαίνεται, και τα τρία εντομοκτόνα εμφανίζουν μια αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου μετά τη μισάωρη και την 24ωρη επώαση στα διαφοροποιημένα κύτταρα στις συγκεντρώσεις 30 και 10 μΜ (Αυξάνεται κατά περίπου 50 % πάνω από τη δραστηριότητα του μάρτυρα). Στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μΜ παρατηρείται μία πτώση της δραστηριότητας που αγγίζει το 48 % της δραστηριότητας του μάρτυρα στη 48ωρη επώαση. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα υπάρχει μία σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά τη 48ωρη επώαση, η οποία στην περίπτωση του thiacloprid αυξάνεται περίπου 1,5 φορές από τη δραστηριότητα του μάρτυρα στις συγκεντρώσεις 3 και 10 μΜ.

Στην Εικόνα 3.40. απεικονίζονται τα ποσοστά της δραστηριότητας του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE) κυττάρων N2a διαφοροποιημένων (Α, Γ, Ε) και μη διαφοροποιημένων (Β, Δ, ΣΤ) μετά από επώασή τους με τα εντομοκτόνα spiromesifen, spirotetramat και spirotetramat σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και 100 μΜ. Στην περίπτωση των διαφοροποιημένων κυττάρων, ιδίως τα εντομοκτόνα spiromesifen (Α) και spirotetramat (Γ), μεταβάλλουν σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα (αυξάνεται αντίστοιχα κατά 1,5 και 2 φορές από τη δραστηριότητα του μάρτυρα) στις συγκεντρώσεις 3 και 10 μΜ. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα στη 48ωρη επώαση παρατηρείται μια μεγάλη αύξηση της δραστηριότητας γύρω στο 100% πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα για το εντομοκτόνο spiromesifen (Β) στη συγκέντρωση 3 μΜ που στη συνέχεια πέφτει και φτάνει να είναι ίση με τη δραστηριότητα του μάρτυρα στα 100 μΜ ακολουθώντας μια γραμμική πορεία. Το εντομοκτόνο spirotetramat, φαίνεται να αυξάνει ελαφρώς τη δραστηριότητα του ενζύμου στα 10 μΜ στη 48ωρη επώαση, ενώ το εντομοκτόνο spirotetramat, δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά κατά τη 48ωρη επώαση. Στις συγκεντρώσεις 3 και 10 μΜ τόσο κατά τη μισάωρη όσο και κατά την 24ωρη επώαση μία σημαντική πτώση της δραστηριότητας του ενζύμου που φτάνει έως το 21 % της δραστηριότητας του μάρτυρα στην περίπτωση του spirotetramat στα 10 μΜ στις 24 ώρες (Δ).



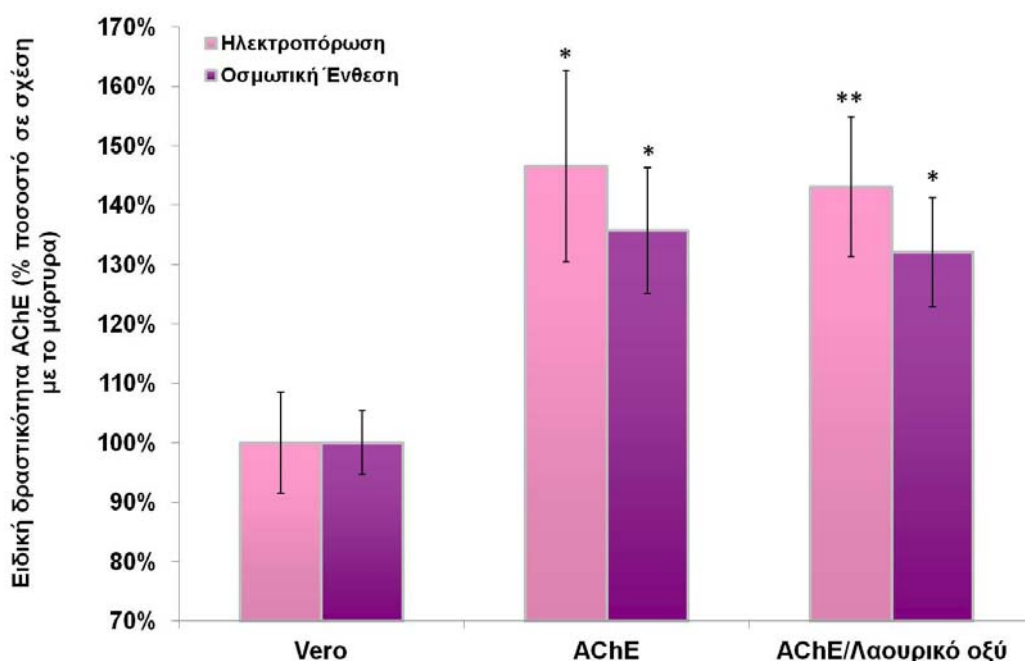
Εικόνα 3.39. Απεικονίζεται η ειδική δραστηκότητα της AChE κυττάρων N2a μετά από επώαση τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων thiacloprid, acetamiprid και thiamethoxam (3, 10, 30 100 μM), για 30 min, 24 h και 48 h. Στα σχήματα Α,Γ,Ε απεικονίζονται κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, ενώ στα σχήματα Β, Δ, ΣΤ, κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί. Η ειδική δραστηκότητα του ενζύμου έχει εκφραστεί ως ποσοστό δραστηκότητας της AChE σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.



Εικόνα 3.40. Απεικονίζεται η ειδική δραστηκότητα της AChE κυττάρων N2a μετά από επώαση τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων spiromesifen, spirodiclofen και spirotetramat (3, 10, 30 100 μM), για 30 min, 24 h και 48 h. Στα σχήματα Α,Γ,Ε απεικονίζονται κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί με διβουτυλοκυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, ενώ στα σχήματα Β, Δ, ΣΤ, κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί. Η ειδική δραστηκότητα του ενζύμου έχει εκφραστεί ως ποσοστό δραστηκότητας της AChE σε σχέση με το μάρτυρα με ± % σφάλμα, *p<0,05 **p<0,01.

3.10. Μεμβρανική τροποποίηση κυττάρων Vero μέσω των μεθόδων της ηλεκτροπόρωσης και της οσμωτικής ένθεσης για την εισαγωγή του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE).

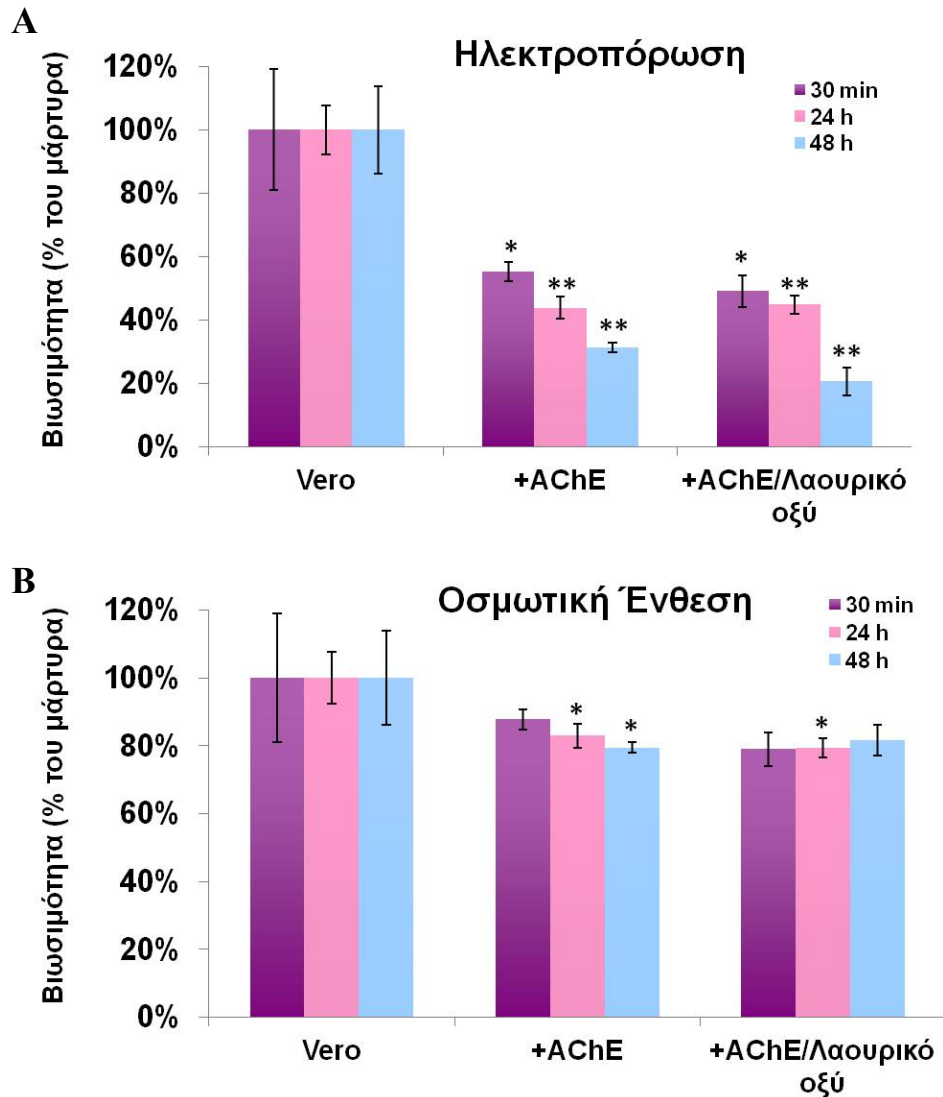
Η ηλεκτροπόρωση των κυττάρων Vero πραγματοποιήθηκε μετά από εφαρμογή δύο παλμών των 1,800 V διάρκειας 5 sec. Η οσμωτική ένθεση της AChE στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε μετά από επώασή τους σε υπέρτονο διάλυμα σουκρόζης και στη συνέχεια σε υπότονο διάλυμα DMEM. Παράλληλα, εισήχθη στα κύτταρα και AChE που είχε το προηγούμενο βράδυ επωαστεί με λαουρικό οξύ. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου με τη φωτομετρική μέθοδο Ellman. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Vero που δεν είχαν υποστεί τροποποίηση. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.41., τα κύτταρα που είχαν υποστεί ηλεκτροπόρωση (ροζ στήλη) εμφανίζουν σημαντική αύξηση στην ενζυμική δραστηριότητα και ιδίως τα κύτταρα που είχαν δεχτεί την AChE που είχε επωαστεί με το λαουρικό οξύ. Η οσμωτική ένθεση (μωβ στήλη) είχε και εκείνη θετική επίδραση στην αύξηση του επιπέδου της ενζυμικής δραστηριότητας, όμως η επώαση με το λαουρικό οξύ δε φαίνεται να επηρέασε σημαντικά τη δραστηριότητα του ενζύμου.



Εικόνα 3.41. Απεικονίζεται η ειδική δραστηριότητα της AChE που εισήχθη στη μεμβράνη κυττάρων Vero μετά από χειρισμούς ηλεκτροπόρωσης (ροζ στήλη) και οσμωτικής ένθεσης (μωβ στήλη). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Vero που δεν υπέστησαν τροποποίηση με το ένζυμο. Η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου έχει εκφραστεί σε ποσοστό σε σχέση με το μάρτυρα με \pm % σφάλμα, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση των δύο μεθόδων μεμβρανικής τροποποίησης στη βιωσιμότητα των κυττάρων μέσω της φωτομετρικής δοκιμής MTT. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν 30 min, 24 h και 48 h μετά από τους δύο χειρισμούς. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Vero που δεν είχαν τροποποιηθεί με το ένζυμο. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.42., η βιωσιμότητα εκφράστηκε ως ποσοστό σε σχέση με το μάρτυρα. Μετά από το χειρισμό της ηλεκτροπόρωσης (Α), παρουσιάστηκε σημαντική μείωση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων κυρίως κατά τις 24 (ροζ στήλη) και τις 48 ώρες (γαλάζια στήλη). Αντίθετα, μετά από το χειρισμό της οσμωτικής ένθεσης, φαίνεται ότι η βιωσιμότητα δεν επηρεάζεται σχεδόν καθόλου στα 30 min

(μωβ στήλη) ενώ φαίνεται να πέφτει ελαφρώς στις 24 (ροζ στήλη) και 48 ώρες (γαλάζια στήλη) χωρίς όμως να πέφτει κάτω από το 80 %.



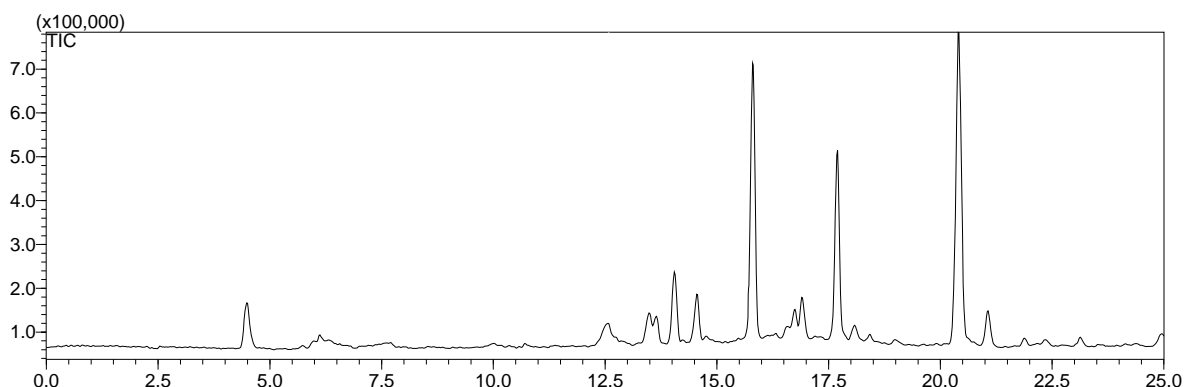
Εικόνα 3.42. Απεικονίζεται η ειδική δραστηριότητα της η βιωσιμότητα κυττάρων Vero μετά από χειρισμούς ηλεκτροπόρωσης (A) και οσμωτικής ένθεσης (B) με το ένζυμο AChE και AChE που είχε επωαστεί με λαουρικό οξύ. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν 30 min (μωβ στήλη), 24 h (ροζ στήλη) και 48 h (γαλάζια στήλη) μετά από τους χειρισμούς. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Vero που δεν υπέστησαν τροποποίηση με το ένζυμο. Η βιωσιμότητα έχει εκφραστεί ως ποσοστό σε σχέση με το μάρτυρα με \pm % σφάλμα, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

3.11. Επικύρωση της μεθόδου QuEChERS για τον προσδιορισμό δύο κατηγοριών φυτοπροστατευτικών προϊόντων (νεονικοτινοειδών, αμιδίων του τετρονικού οξέος) σε αγγούρι και τομάτα με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με συζευγμένη φασματομετρία μάζας.

3.11.1.Γραμμικότητα.

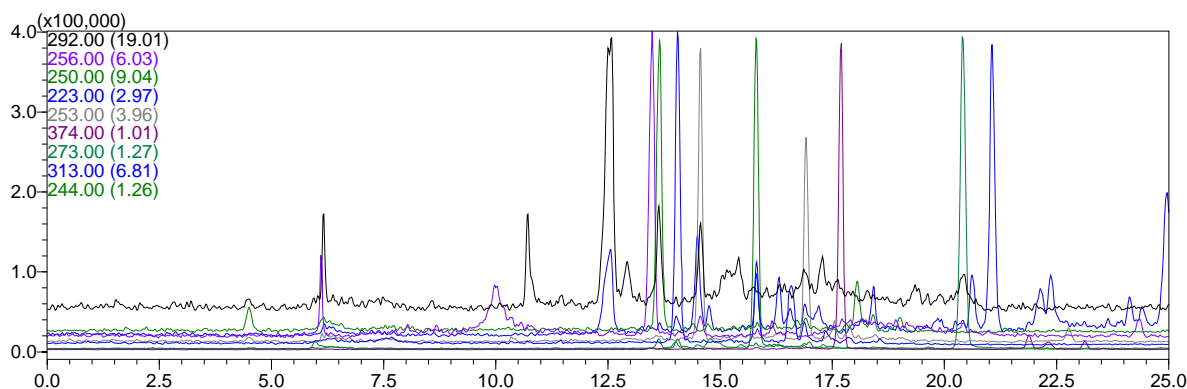
Για την κατασκευή του διαγράμματος γραμμικότητας πραγματοποιήθηκε σειρά εγχύσεων προτύπων σε υπόστρωμα για εννέα συγκεντρώσεις (0.25 -0.5 -0.75 -1-2.5-5-7.5-10-25 $\mu\text{g/L}$) των οχτώ φυτοπροστατευτικών προϊόντων και με εσωτερικό πρότυπο το carbofuran σε συγκέντρωση 0.25 $\mu\text{g/L}$. Τα πρότυπα παρασκευάστηκαν σε δύο διαφορετικά υποστρώματα (αγγούρι ή τομάτα) και δ/τη για να είναι δυνατή η α-

ξιολόγηση της επίδρασης του υποστρώματος στη μελέτη της γραμμικότητας. Στην Εικόνα 3.43. απεικονίζεται το χρωματογράφημα των εννέα εντομοκτόνων σε συγκέντρωση 5 mg/L που έχουν διαχωριστεί με το ισοκρατικό σύστημα έκλυσης.



Εικόνα 3.43. Χρωματογράφημα μίγματος των οχτώ εντομοκτόνων συγκέντρωσης 5 mg/L σε υπόστρωμα αγγουριού. Ως εσωτερικό πρότυπο έχει χρησιμοποιηθεί το εντομοκτόνο carbofuran σε συγκέντρωση 0.25 μg/L.

Από το πλήρες φάσμα μαζών της κάθε ένωσης, επιλέχθηκε για κάθε εντομοκτόνο ένα ιόν για ποσοτικό προσδιορισμό και άλλα δύο για τον προσδιορισμό της ταυτότητας του (Cairns et al., 1989) όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.44. Τα κριτήρια επιλογής ήταν η σχετική ένταση του ιόντος και ο λόγος m/z για τον οποίο ο λόγος σήμα προς θόρυβο ήταν μεγαλύτερος του δέκα. Τα ιόντα ποσοτικοποίησης, τα ιόντα επιβεβαίωσης καθώς και οι χρόνοι κατακράτησης παρουσιάζονται στον Πίνακα I του Παραρτήματος.



Εικόνα 3.44. Χρωματογράφημα ιόντων μίγματος των οχτώ εντομοκτόνων συγκέντρωσης 5 mg/L σε MeOH. Ως εσωτερικό πρότυπο έχει χρησιμοποιηθεί το εντομοκτόνο carbofuran σε συγκέντρωση 0.25 mg/L.

Ο συντελεστής συσχέτισης (r) και το τετράγωνό του (r^2), η τεταγμένη επί της αρχής (b) η τυπική απόκλιση αυτής (S_b), η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης (a) η τυπική απόκλιση αυτής (S_a) και η τυπική απόκλιση (S_u) που προκύπτει από την χρήση της γραμμής παλινδρόμησης στις μετρήσεις που εκτιμήθηκαν, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. για το αγγούρι ενώ για την τομάτα στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.1. Βασικές παράμετροι γραμμών παλινδρόμησης για τα 8 εντομοκτόνα σε υπόστρωμα αγγουριού. Ο συντελεστής συσχέτισης (r), και το τετράγωνο αυτού (r^2), τεταγμένη επί της αρχής (b) και εκτιμώμενη τυπική απόκλιση της (S_b), κλίση της γραμμής (a), και εκτιμώμενη τυπική απόκλιση της

(S_a) και η τυπική απόκλιση (S_u) που προκύπτει από την χρήση της γραμμής παλινδρόμησης στις μετρήσεις.

Εντομοκτόνα	r	r ²	b	S _b	a	S _a	S _u
Acetamiprid	0.99983	0.99966	0.03841	0.00619	0.01797	0.00015	0.01327
Clothianidin	0.99686	0.99372	0.01289	0.00261	0.00614	0.00028	0.00445
Imidacloprid	0.99827	0.99914	0.02771	0.00658	0.00853	0.00016	0.01410
Thiacloprid	0.99957	0.99914	0.02614	0.00579	0.01066	0.00014	0.01242
Thiamethoxam	0.99991	0.99981	0.00590	0.00105	0.00414	0.00003	0.00225
Spirodiclofen	0.99975	0.99951	0.16406	0.01936	0.04704	0.00047	0.04151
Spiromesifen	0.99844	0.99689	0.01684	0.00428	0.00832	0.00023	0.00810
Spirotetramat	0.99843	0.99687	0.10242	0.02428	0.04709	0.00132	0.04598

Πίνακας 3.2. Βασικές παράμετροι γραμμών παλινδρόμησης για τα 8 εντομοκτόνα σε υπόστρωμα τομάτας. Ο συντελεστής συσχέτισης (r), και το τετράγωνο αυτού (r²), τεταγμένη επί της αρχής (b) και εκτιμούμενη τυπική απόκλιση της (S_b), κλίση της γραμμής (a), και εκτιμούμενη τυπική απόκλιση της (S_a) και η τυπική απόκλιση (S_u) που προκύπτει από την χρήση της γραμμής παλινδρόμησης στις μετρήσεις.

Εντομοκτόνα	r	r ²	b	S _b	a	S _a	S _u
Acetamiprid	0.99910	0.99819	0.01544	0.00846	0.03112	0.00059	0.01600
Clothianidin	0.99897	0.99794	0.00814	0.00359	0.01234	0.00025	0.00678
Imidacloprid	0.99869	0.99738	0.01034	0.00540	0.01649	0.00038	0.01021
Thiacloprid	0.99967	0.99934	0.03687	0.00317	0.01939	0.00022	0.00600
Thiamethoxam	0.99393	0.98789	0.01023	0.00611	0.00600	0.00033	0.01157
Spirodiclofen	0.99909	0.99818	0.02593	0.00541	0.01984	0.00037	0.01022
Spiromesifen	0.98947	0.97904	0.08353	0.02963	0.01408	0.00078	0.07022
Spirotetramat	0.98829	0.97671	0.19567	0.12032	0.09807	0.00618	0.24084

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι το σύνολο των εντομοκτόνων παρουσιάζει πολύ καλή γραμμικότητα με συντελεστές συσχέτισης 0,98-0,99 για τις περισσότερες περιπτώσεις. Τα αμίδια του τετρονικού οξέος spiromesifen και spirotetramat στην περίπτωση της τομάτας παρουσιάζουν γραμμικότητα με r² = 0,97.

3.11.2. Ορθότητα – Πιστότητα.

Η εκτίμηση της ορθότητας και πιστότητας στο εργαστήριο προσδιορίστηκε με την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα υποστρώματος (αγγούρι και τομάτα) για έξι επαναλήψεις. Στο πλαίσιο αυτό, ποσότητα 20±0,05 gr υποστρώματος εμβολιάστηκε σε δυο επίπεδα με γνωστές συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων και προσθήκη μικρού όγκου διαλύματος εργασίας. Για την εκτίμηση της ορθότητας ελέγχτηκε η ανάκτηση και της πιστότητας η σχετική τυπική απόκλιση (SDR). Το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού ήταν τα 0.25 μg/kg

Η Ε.Ε (http://ec.europa.eu, 2007) δέχεται ως αποδεκτές ανακτήσεις (κατά την επικύρωση) όσες είναι στην περιοχή 70-120% και αποδεκτές τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης για ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα όσες βρίσκονται κάτω από 20%. Όταν ο στόχος αυτός δεν μπορεί να επιτευχθεί είναι δυνατόν να γίνουν αποδεκτές και μικρότερες τιμές ανάκτησης οι οποίες όμως θα πρέπει να συνοδεύονται από ικανοποιητικά στοιχεία πιστότητας.

Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν (παρατίθενται στους Πίνακες 3.3. και 3.4.), προκύπτει ότι οι μέσες ανακτήσεις στο χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης για οχτώ εντομοκτόνα κυμάνθηκαν από 60,57-94,34%, με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης μικρότερες από 14,88%. Στο μεγαλύτερο επίπεδο οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 71.86% –116.35 % με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης μικρότερες από 11,05%.

Για την πλειονότητα δηλαδή των εντομοκτόνων οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν εντός των αποδεκτών ορίων.

Πίνακας 3.3. Μέσες εκατοστιαίες ανακτήσεις (R%) για N=6 και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (SDR) των οχτώ εντομοκτόνων για τα 2 επίπεδα εμβολιασμού στο αγγούρι.

Εντομοκτόνα	R (%) 1 ^ο	SDR 1 ^ο	R (%) 2 ^ο	SDR 2 ^ο
	Επίπεδο	Επίπεδο	Επίπεδο	Επίπεδο
Acetamiprid	102,03%	5,56%	87,54%	3,10%
Clothianidin	116,35%	9,29%	92,63%	7,87%
Imidacloprid	105,32%	3,73%	89,83%	5,28%
Thiacloprid	103,63%	2,84%	94,34%	7,36%
Thiamethoxam	100,46%	11,05%	87,39%	14,88%
Spirodiclofen	73,58%	5,25%	60,57%	8,82%
Spiromesifen	75,06%	6,52%	65,51%	1,40%
Spirotetramat	103,51%	2,76%	61,81%	1,11%

Πίνακας 3.4. Μέσες εκατοστιαίες ανακτήσεις (R%) για N=6 και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (SDR) των οχτώ εντομοκτόνων για τα 2 επίπεδα εμβολιασμού στην τομάτα.

Εντομοκτόνα	R (%) 1 ^ο	SDR 1 ^ο	R (%) 2 ^ο	SDR 2 ^ο
	Επίπεδο	Επίπεδο	Επίπεδο	Επίπεδο
Acetamiprid	89,06%	3,70%	80,09%	12,00%
Clothianidin	107,48%	5,62%	90,24%	12,33%
Imidacloprid	88,68%	5,37%	87,74%	11,18%
Thiacloprid	70,53%	1,06%	89,43%	64,91%
Thiamethoxam	84,25%	5,31%	81,52%	14,97%
Spirodiclofen	71,86%	1,74%	68,26%	7,09%
Spiromesifen	72,50%	8,37%	64,91%	3,77%
Spirotetramat	100,33%	7,25%	91,75%	14,01%

Όπως εμφανίζεται στους Πίνακες 3.3. και 3.4., στο δεύτερο επίπεδο φόρτισης οι μέσες τιμές ανάκτησης κυμαίνονται από 60,57-65,51 % για τα τρία αμύδια του τετρονικού οξέος σε υπόστρωμα αγγουριού και 64,91-64,91% σε υπόστρωμα τομάτας, παρουσιάζουν όμως καλές τιμές πιστότητας (σχετικής τυπικής απόκλισης), με αποτέλεσμα τα στοιχεία τους να θεωρούνται αποδεκτά (<http://ec.europa.eu>, 2007). Για τους αναλύτες αυτούς, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίησή τους σε δείγματα ή για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό τους μετά από τη διόρθωση των αποτελεσμάτων τους ως προς την ανάκτηση.

3.11.3. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ).

Ως όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται το ελάχιστο επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο ο αναλύτης μπορεί να προσδιοριστεί αξιόπιστα, δηλαδή με αποδεκτή ορθότητα και πιστότητα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι τύποι $LOD = 3.3 * SD_b/a$ και $LOQ = 10 * SD_b/a$ όπου SD_b η τυπική απόκλιση του συντελεστή b της εξίσωσης της καμπύλης και a η κλίση της καμπύλης. (<http://ec.europa.eu>, 2007). Με βάση τα παραπάνω το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου βρέθηκε ότι είναι το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού δηλαδή τα 0.25μg/kg για όλους τους αναλύτες και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) των εντομοκτόνων στα υποστρώματα αγγουριού και τομάτας σε mg/L.

Εντομοκτόνο	Αγγούρι		Τομάτα	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Acetamiprid	0.09560	0.28969	0.08485	0.25711
Clothianidin	0.23540	0.35666	0.18185	0.27553
Imidacloprid	0.21281	0.64489	0.10207	0.61861
Thiacloprid	0.14884	0.45103	0.04499	0.13634
Thiamethoxam	0.07034	0.42632	0.31407	0.95173
Spirodiclofen	0.11326	0.34322	0.34585	1.04802
Spiromesifen	0.13064	0.39588	0.07515	0.22774
Spirotetramat	0.15899	0.48178	0.35775	1.08408

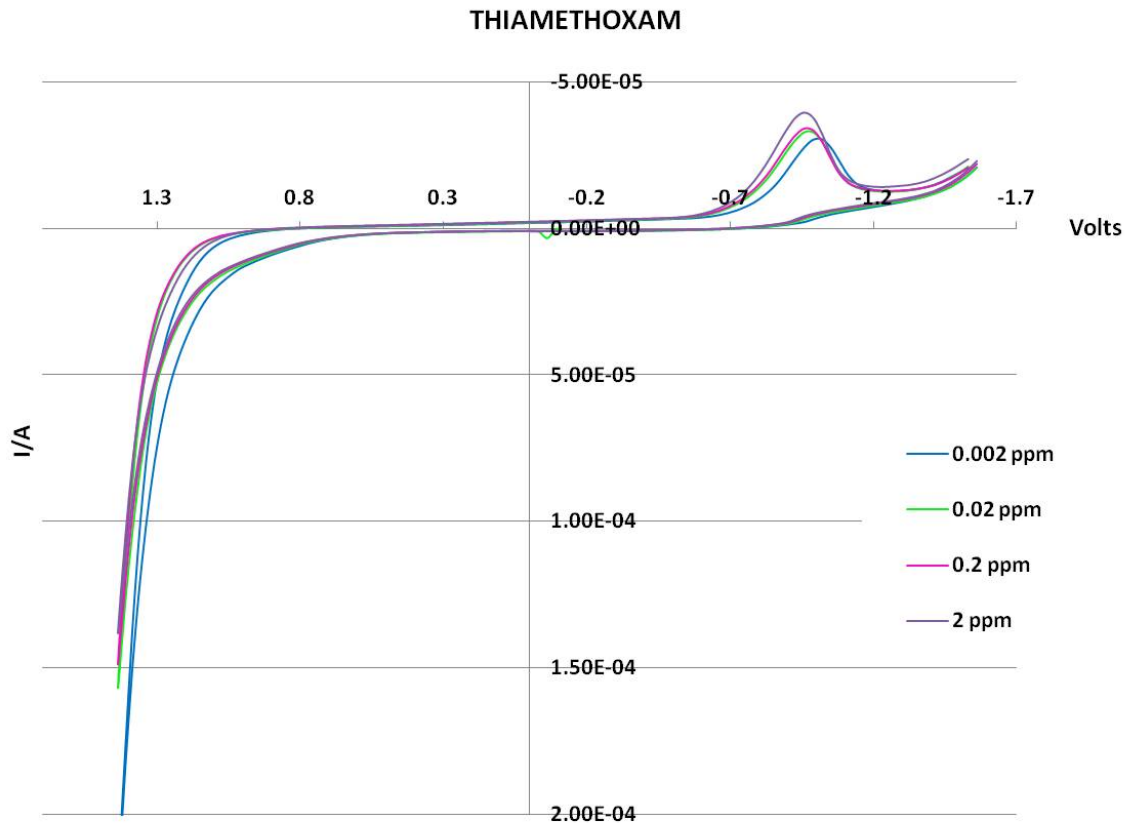
3.12. Βολταμετρικός προσδιορισμός νεονικοτινοειδών και αμιδίων του τετρονικού οξέος.

3.12.1. Προσδιορισμός των νεονικοτινοειδών και αμιδίων του τετρονικού οξέος με τη μέθοδο της κυκλικής βολταμετρίας.

Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά των οχτώ εντομοκτόνων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της κυκλικής βολταμετρίας. Ο προσδιορισμός των νεονικοτινοειδών με την χρήση βολταμετρίας, όπως αναφέρεται και σε προηγούμενες πολαρογραφικές μελέτες (Guzsvány et al., 2006), βασίζεται στην μη αναστρέψιμη αναγωγή της νιτρικής τους ομάδας. Πριν την εφαρμογή των εντομοκτόνων ήταν απαραίτητη η διεξαγωγή πειραμάτων βολταμετρικού χαρακτηρισμού των ουσιών στα ηλεκτρόδια άνθρακα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε διαλύματα διαφορετικού pH για την επιλογή των κατάλληλων συνθηκών μέτρησης. Για τα νεονικοτινοειδή επιλέχτηκε το thiamethoxam, ενώ για τα αμιδία του τετρονικού οξέος το spirodiclofen.

Στην Εικόνα 3.45. καταγράφονται χαρακτηριστικές καμπύλες τάσης – έντασης κυκλικής βολταμετρίας του εντομοκτόνου thiamethoxam σε διαδοχικές δεκαδικές συγκεντρώσεις 0.002-2 ppm για pH 7.4. Κατά την συνεχή αύξηση του δυναμικού του ηλεκτροδίου, λαμβάνουν χώρα ηλεκτροχημικές αντιδράσεις που έχουν ως συνέπεια την αύξηση της έντασης του ρεύματος. Συγκεκριμένα κάθε ανοδική ή καθοδική κορυφή στο βολταμογράφημα μπορεί να αντιστοιχηθεί σε μια ηλεκτροχημική οξειδωτική ή αναγωγική αντίδραση.

Κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων σε pH εύρους 5-8 οι κορυφές του παραγόμενου δυναμικού μετατοπίζονταν σε αρνητικότερες τιμές με την μείωση του pH. Στην περίπτωση της διαφορικής βολταμετρίας παρατηρήθηκαν εντονότερες μεταβολές με τα διαλύματα στα οποία παράγονται πιο αιχμηρές και πιο συμμετρικές κορυφές να είναι τα ουδέτερα και ελαφρώς αλκαλικά (τιμές pH 7-8). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν καταγραφεί και σε άλλες μελέτες βολταμετρίας (Guzsvány et al., 2006) (Guzsvány et al., 2011) (Gaál et al., 2007). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκε η διαφορική βολταμετρία σε διάλυμα pH 7,4 για τον βολταμετρικό προσδιορισμό των εντομοκτόνων, καθώς αποτελεί το φυσιολογικό pH για την ομοιοστάση των ζωικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.



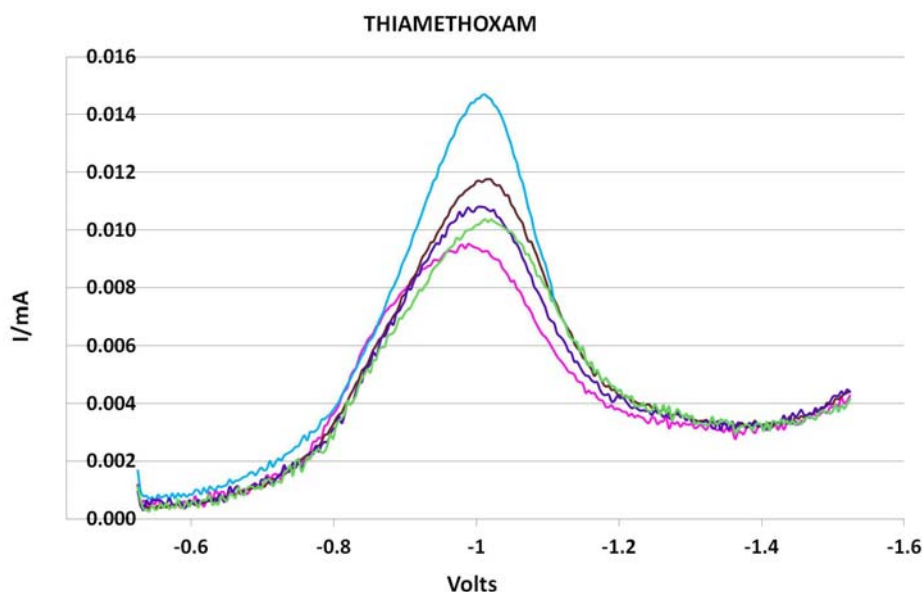
Εικόνα 3.45. Καμπύλες τάσης – έντασης κυκλικής βολταμετρίας του εντομοκτόνου thiamethoxam σε συγκεντρώσεις 0.002, 0.02, 0.2 και 2 ppm. Παράμετροι μέτρησης: $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$, $c = 31.6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.12.2. Προσδιορισμός των νεονικοτινοειδών και αμιδίων του τετρονικού οξέος με τη μέθοδο της διαφορικής παλμικής βολταμετρίας.

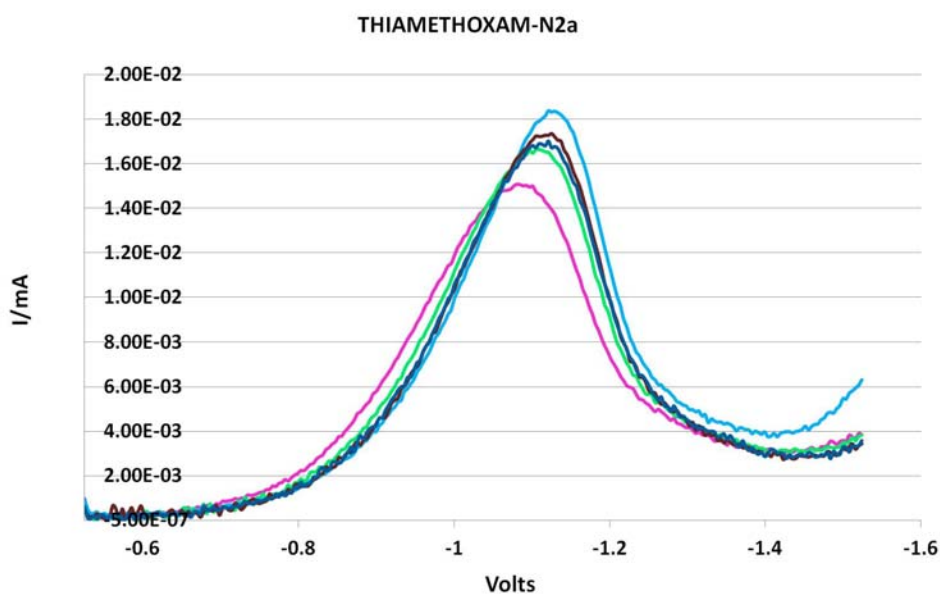
Οι λειτουργικές παράμετροι της διαφορικής παλμικής βολταμετρίας (DPV) ήταν: ύψος παλμού $E = 50 \text{ mV}$, διάρκεια παλμού $w = 50 \text{ ms}$ και ρυθμός σάρωσης $\nu\text{DPV} = 25 \text{ mV s}^{-1}$ (Guzsvany et al., 2005) (Guzsvany et al., 2011). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των εντομοκτόνων με τη μέθοδο της διαφορικής κυκλικής βολταμετρίας βασίστηκε στη γραμμική σχέση της κορυφής της έντασης του ρεύματος ($|I_p|$) και της συγκέντρωσης των εντομοκτόνων (c).

3.12.1. Γραμμικότητα.

Για την κατασκευή του διαγράμματος γραμμικότητας πραγματοποιήθηκε σειρά εγχύσεων προτύπων σε υπόστρωμα για έξι συγκεντρώσεις (0.25 -0.5 -0.75 -1-2.5-5- $\mu\text{g/L}$) για κάθε ένα από τα οχτώ φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Τα πρότυπα παρασκευάστηκαν σε υπόστρωμα αγγουριού και δ/τη για να είναι δυνατή η αξιολόγηση της επίδρασης του υποστρώματος στη μελέτη της γραμμικότητας. Στην Εικόνα 3.46. απεικονίζεται το διαφορικό παλμικό βολταμογράφημα του εντομοκτόνου thiamethoxam σε διάλυμα Britton Robinson ενώ στην Εικόνα 3.47. απεικονίζεται το διαφορικό παλμικό βολταμογράφημα του εντομοκτόνου thiamethoxam σε διάλυμα PBS με κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι οι μετρήσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα δεν έδωσαν τόσο αιχμηρές κορυφές σε σχέση με τις αντίστοιχες μετρήσεις σε διάλυμα Britton Robinson.



Εικόνα 3.46. Διαφορικό παλμικό βολταμογράφημα για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου thiamethoxam (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5 ppm) σε διάλυμα Britton–Robinson. Οι συγκεντρώσεις απεικονίζονται ως εξής: 0.25 ppm ροζ χρώμα, 0.5 ppm πράσινο χρώμα, 0.75 ppm μωβ χρώμα, 1 ppm καφέ χρώμα και 2.5 ppm γαλάζιο χρώμα.



Εικόνα 3.47. Διαφορικό παλμικό βολταμογράφημα για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου thiamethoxam (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5 ppm) σε διάλυμα PBS με κύτταρα N2a. Οι συγκεντρώσεις απεικονίζονται ως εξής: 0.25 ppm ροζ χρώμα, 0.5 ppm πράσινο χρώμα, 0.75 ppm μωβ χρώμα, 1 ppm καφέ χρώμα και 2.5 ppm γαλάζιο χρώμα.

Ο συντελεστής συσχέτισης (r) και το τετράγωνό του (r^2), η τεταγμένη επί της αρχής (b) η τυπική απόκλιση αυτής (S_b), η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης (a) η τυπική απόκλιση αυτής (S_a) και η τυπική απόκλιση (S_u) που προκύπτει από την χρήση της γραμμής παλινδρόμησης στις μετρήσεις που εκτιμήθηκαν, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6. για το διάλυμα Britton Robinson και στον Πίνακα 3.7. για το διάλυμα PBS με κύτταρα N2a.

Πίνακας 3.6. Βασικές παράμετροι γραμμών παλινδρόμησης για τα 8 εντομοκτόνα σε διάλυμα Britton Robinson. Ο συντελεστής συσχέτισης (r), και το τετράγωνο αυτού (r^2), τεταγμένη επί της αρχής (b) και εκτιμώμενη τυπική απόκλιση της (S_b), κλίση της γραμμής (a), και εκτιμώμενη τυπική απόκλιση της (S_a) και η τυπική απόκλιση (S_u) που προκύπτει από την χρήση της γραμμής παλινδρόμησης στις μετρήσεις.

Εντομοκτόνα	r	r^2	b	S_b	a	S_a	S_u
Acetamiprid	0.97881	0.98305	1.13757	0.02825	0.18314	0.012024	0.048782
Clothianidin	0.95060	0.96048	1.59900	0.04856	0.20379	0.020668	0.083848
Imidacloprid	0.97465	0.97972	1.67202	0.03372	0.19949	0.014351	0.058221
Thiacloprid	0.96927	0.97542	1.30321	0.06393	0.34284	0.027211	0.110393
Thiamethoxam	0.97896	0.98317	1.07123	0.04616	0.30038	0.019649	0.079712
Spirodiclofen	0.97104	0.97683	1.15722	0.03494	0.19317	0.014873	0.06034
Spiromesifen	0.97837	0.98269	1.46228	0.04613	0.29594	0.019634	0.079651
Spirotetramat	0.98929	0.99143	1.36261	0.03206	0.29360	0.013645	0.055357

Πίνακας 3.7. Βασικές παράμετροι γραμμών παλινδρόμησης για τα 8 εντομοκτόνα σε διάλυμα PBS με κύτταρα N2a. Ο συντελεστής συσχέτισης (r), και το τετράγωνο αυτού (r^2), τεταγμένη επί της αρχής (b) και εκτιμώμενη τυπική απόκλιση της (S_b), κλίση της γραμμής (a), και εκτιμώμενη τυπική απόκλιση της (S_a) και η τυπική απόκλιση (S_u) που προκύπτει από την χρήση της γραμμής παλινδρόμησης στις μετρήσεις.

Εντομοκτόνα	r	r^2	b	S_b	a	S_a	S_u
Acetamiprid	0.90650	0.92520	1.30474	0.06611	0.19792	0.02813	0.11415
Clothianidin	0.91456	0.93165	1.5945	0.04961	0.15590	0.02111	0.08565
Imidacloprid	0.88631	0.90905	1.75618	0.07086	0.19069	0.03015	0.12235
Thiacloprid	0.88349	0.90679	1.46230	0.06107	0.16215	0.02599	0.10545
Thiamethoxam	0.89082	0.91265	1.43968	0.07357	0.20244	0.03131	0.12703
Spirodiclofen	0.94350	0.95480	1.45424	0.03509	0.13728	0.01493	0.06058
Spiromesifen	0.95741	0.96593	1.54154	0.04393	0.19916	0.0187	0.07586
Spirotetramat	0.94343	0.95474	1.57667	0.03971	0.15527	0.01690	0.06857

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι το σύνολο των εντομοκτόνων παρουσιάζει γραμμικότητα με συντελεστές συσχέτισης 0,88-0,98 για τις περισσότερες περιπτώσεις. Οι συντελεστές συσχέτισης στις μετρήσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα N2a είναι χαμηλότεροι σε σχέση με αυτές του διαλύματος Britton Robinson και κυμαίνονται από 0.88-0.95.

3.12.2. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ).

Για τον υπολογισμό του ορίου ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκαν οι τύποι $LOD = 3.3 * SD_b/a$ και $LOQ = 10 * SD_b/a$ (Βλέπε και 3.11.3.) όπου SD_b η τυπική απόκλιση του συντελεστή b της εξίσωσης της καμπύλης και a η κλίση της καμπύλης. (<http://ec.europa.eu>, 2007). Με βάση τα παραπάνω το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου βρέθηκε ότι είναι το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού δηλαδή τα 0.25μg/kg για όλους τους αναλύτες και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.8.

Πίνακας 3.8. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) των εντομοκτόνων σε διάλυμα Britton Robinson και PBS με κύτταρα N2a (mg/L).

Εντομοκτόνο	Britton Robinson		PBS με κύτταρα N2a	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Acetamiprid	0.76093	2.30587	1.19114	3.60954
Clothianidin	0.87823	2.66132	1.14585	3.47230
Imidacloprid	0.62275	1.88713	1.00344	3.04073
Thiacloprid	0.68267	2.06870	1.14946	3.48324
Thiamethoxam	0.66114	2.00347	1.01992	3.09068
Spirodiclofen	0.85747	2.59840	0.89933	2.72526
Spiromesifen	0.57957	1.75630	0.79808	2.41154
Spirotetramat	0.41103	1.24557	0.08026	2.43235

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.8. τα LOD και LOQ των μετρήσεων με διάλυμα Britton Robinson ήταν χαμηλότερα από τα αντίστοιχα των μετρήσεων με διάλυμα PBS με κύτταρα N2a. Παρατηρήθηκε ότι τόσο τα LOD όσο και τα LOQ των εντομοκτόνων που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους της βολταμετρίας ήταν υψηλότερα από τα αντίστοιχα που προέκυψαν από τη μέθοδο της LC-MS (Πίνακας 3.5.).

ΕΝΟΤΗΤΑ Δ

Συζήτηση

Η ανακάλυψη των νεονικοτινοειδών ως μία νέα κλάση δεσμευτών των nAChRs αποτελεί ένα σημείο ορόσημο για την έρευνα πάνω στα εντομοκτόνα, και επιτρέπει την κατανόηση των λειτουργικών ιδιοτήτων των nAChRs των εντόμων. Έως σήμερα οι πιο πρόσφατες πληροφορίες σχετικά με τους nAChRs προέρχονται από έρευνα στους υποδοχείς σπονδυλωτών. Η παγκόσμια αγορά εντομοκτόνων κυριαρχείται ακόμα από ουσίες που προκαλούν μη αντιστρεπτή παρεμπόδιση της ακετυλοχολινεστεράσης, ενός ενζύμου που είναι πολύ σημαντικό για το κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων. Το μερίδιο της αγοράς αυτών των παρεμποδιστών και εκείνων των εντομοκτόνων που δρουν στους τασεοελεγχόμενους διάυλους ιόντων νατρίου φτάνει στο 70% της παγκόσμιας αγοράς (Nauen and Bretschneider, 2002) (Πίνακας 4.1.).

Πίνακας 4.1. Τρόποι δράσης των 100 πιο εμπορικών εντομοκτόνων/ακαρεοκτόνων και το διεθνές τους μερίδιο στην αγορά (εξαιρούνται τα καπνιστικά εντομοκτόνα, οι ενδοτοξίνες και εκείνα τα εντομοκτόνα που έχουν άγνωστο τρόπο δράσης)

Τρόπος/σημείο Δράσης	Μερίδιο στη Αγορά (%)		
	1987	1999	Μεταβολή (%)
Ακετυλοχολινεστεράση	71	52	-20.0
Τασεοελεγχόμενοι διάυλοι Νατρίου	17	18	+1.4
Υποδοχέας ακετυλοχολίνης	1.5	12	+10.0
Διάυλοι χλωρίου ελεγχόμενοι από το GABA	5.0	8.3	+3.3
Βιοσύνθεση χιτίνης	2.1	3.0	+0.9
Αφυδρογονάση του NADH	0	1.2	+1.2
Αποδεσμευτές	0	0.7	+0.7
Υποδοχέας οκτοπαμίνης	0.5	0.6	+0.1
Υποδοχέας εκδυσόνης	0	0.4	+0.4

Αναπαραγωγή με την άδεια των Nauen, R., Bretschneider, T., 2002. New modes of action of insecticides. *Pestic. Outlook* 12, 241–245. © The Royal Society of Chemistry.

Σήμερα τα νεονικοτινοειδή είναι η ταχύτερα αναπτυσσόμενη κατηγορία εντομοκτόνων (Μερίδιο στην αγορά περίπου 15%), με ευρεία χρήση στις περισσότερες χώρες κυρίως κατά μυζητικών αλλά και εξωπαρασιτικών εντόμων. Ο σχετικά χαμηλός κίνδυνος και η στοχευμένη εξειδίκευση των προϊόντων, σε συνδυασμό με την καταλληλότητα τους για ένα εύρος μεθόδων εφαρμογής, θα εξασφαλίσει την επιτυχία τους ως εντομοκτόνα που είναι σημαντικά για τις στρατηγικές της ολοκληρωμένης διαχείρισης παρασίτων (integrated pest management, IPM).

Οι νευροβλάστες είναι άωρα κύτταρα που υπάρχουν φυσιολογικά στην εμβρυϊκή ζωή. Μετά τη γέννηση υπάρχει φυσιολογικά ένα ποσοστό άωρων νευροβλαστών που ωριμάζουν προοδευτικά και εξαφανίζονται στο τέλος του πρώτου έτους της ζωής. Το νευροβλάστωμα προκαλείται από άθροιση άωρων νευροβλαστών και ανεξέλεγκτη αύξησή τους και αποτελεί τον πιο συχνό εξωκρανιακό όγκο της παιδικής ηλικίας (Hildebrandt and Traunecker 2005). Το νευροβλάστωμα είναι υπεύθυνο για σχεδόν 9% των παιδικών καρκίνων που προκύπτουν σε μία στις 8.000 γεννήσεις. Αυτό σε ετήσια βάση μεταφράζεται σε 1 σε 10⁵ παιδιά κάτω των 15 ετών παγκοσμίως που πάσχουν από τη νόσο (Young et al., 1986).

Αρχικά ο όρος *in vitro* καλλιέργεια όγκων νευροβλαστώματος χρησιμοποιήθηκε από τους Murray και Stout (Murray & Stout, 1947) που ανακάλυψαν ότι τα έκφυτα τριών όγκων όταν αναπτυχθούν σε καλλιέργειες θρόμβων πλάσματος έχουν την ικα-

νότητα να αναπτύσσουν άξονες. Η μακρόχρονη καλλιέργεια των όγκων του νευροβλαστώματος καθώς και οι ιδιότητες διαφοροποίησης τους, γοήτευσαν τους ερευνητές (Goldstein, 1968), οι οποίοι μελέτησαν τις καλλιέργειες προκειμένου να κατανοήσουν την τάση που έχουν τα κύτταρα νευροβλαστώματος να διαφοροποιούνται *in vivo* και *in vitro*.

Τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών αποκάλυψαν ότι οι κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος εκφράζουν νευρωνικές ή νευροενδοκρινικές ιδιότητες. Ένα χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι η αυθόρμητη ή επαγόμενη ανάπτυξη νευρωνικών διαδικασιών. Άλλες ιδιότητες που εμφανίζουν είναι η σύνθεση βιοσυνθετικών ενζύμων νευροδιαβιβαστών, έκφραση των νευροινιδίων, έκφραση των μουσκαρινικών υποδοχέων και των υποδοχέων των οπιοειδών και νευροτροφινών, υποθετικά σημεία πυρηνικών σωματίων αποθήκευσης κατεχολαμίνης, ανοσοαντίδραση στην ειδική νευρωνική ενολάση. Οι κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος τείνουν να εκφράζουν ανδρνεργικό φαινότυπο που παράγει την υδροξυλάση της τυροσίνης και την β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης σε σχετικά υψηλά επίπεδα, ενώ τα περιφερειακά νευροεπιθηλώματα των κυτταρικών σειρών Ewing τείνουν να παράγουν την ακετυλομεταφοράση της χολίνης (Thiele et al., 1987). Σε καλλιέργεια οι νευροβλάστες πολλαπλασιάζονται εξαιρετικά γρήγορα και εύκολα. Τα κύτταρα νευροβλαστώματος N2a έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές έρευνες με σκοπό τη μελέτη της νευρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης, η οποία και έχει επιτευχθεί με τη χρήση διαφόρων παραγόντων (Flaskos et al. 1998; Mackler et al. 2003; Shinjyo and Kita 2007).

Από τη βιβλιογραφία έχει βρεθεί ότι εξαιτίας της εκλεκτικότητας του σημείου στόχου, τα νεονικοτινοειδή είναι πιο τοξικά για τις αφίδες, τα τζιτζίκια και άλλα ευαίσθητα έντομα σε σχέση θηλαστικά και τα ψάρια (Matsuda 1998, Yamamoto 1998, Tomizawa 2000 and Tomizawa 2003). Συγκριτικές μελέτες πρόσδεσης σε nAChRs εντόμων δείχνουν ότι η ικανότητα τους να εκτοπίζουν το πρωτονιωμένο imidacloprid από τα σημεία πρόσδεσης του, σχετίζεται με την εντομοκτόνο αποτελεσματικότητα (Kagabu 1997a and Nauen 2001). Αυτή είναι η πρώτη φορά που διερευνώνται οι επιδράσεις και των δύο συγκεκριμένων κατηγοριών εντομοκτόνων μαζί σε κυτταρική σειρά θηλαστικών (N2a) στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Η επιλογή των κυττάρων N2a ως βιολογικό σύστημα έγινε διότι η κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος αποτελεί ένα από τα ελάχιστα κυτταρικά συστήματα που μπορεί διαφοροποιηθεί σε μη καρκινικό (Prasad et al., 1974) προσδίδοντας στα κύτταρα την ιδιότητα να συμπεριφέρονται ως κανονικά νευρικά κύτταρα με ανεπτυγμένους νευρώνες. Αυτή η ιδιότητα είναι πολύ σημαντική διότι παρατηρήθηκε ότι η κυτταρική σειρά N2a παρουσίασε διαφορετικές αντιδράσεις με την εφαρμογή των εντομοκτόνων μετά από διαφοροποίηση με τον παράγοντα διβουτυλο-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (db-cAMP) και χωρίς να έχει διαφοροποιηθεί.

Ο συντελεστής ασφαλείας του imidacloprid, δηλαδή ο δείκτης των θανατηφόρων δόσεων για τα θηλαστικά και τα έντομα, εκτιμάται στα 7300 από την τιμή LD₅₀ (0.062 mg kg⁻¹) για το *M. persicae* με τοπική εφαρμογή και σε μία τιμή LD₅₀ 450 mg kg⁻¹ για τους αρουραίους (Elbert et al., 1990). Έτσι το imidacloprid θεωρείται ένα εντομοκτόνο με υψηλή εκλεκτική τοξικότητα. Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων στην Εικόνα 3.4. αν και δε φαίνεται κάποια σημαντική μεταβολή από τις δοκιμές MTT και NR, η δοκιμή PI παρουσιάζει μία σχετικά γραμμική μεταβολή της αύξησης του ποσοστού των νεκρών κυττάρων στη μισάωρη και στη 48ωρη επώαση. Η μεταβολή αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τη 48ωρη επώαση στη συγκέντρωση των 100 μM όπου το ποσοστό των νεκρών κυττάρων φαίνεται να ξεπερνά το 35 %. Η υψηλή τοξικότητα δεν επιβεβαιώνεται στην περίπτωση των διαφοροποιημένων κυττάρων (A) κατά τη δοκιμή MTT, ενώ στη συγκέντρωση 30 μM

παρατηρήθηκε ένα αυξημένο ποσοστό βιωσιμότητας που πιθανώς να οφείλεται απλώς σε αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα. Οι δοκιμές NR και PI δεν έδειξαν κάποια ιδιαίτερη επίδραση στη βιωσιμότητα.

Το clothianidin παρουσιάζει μέτρια τοξικότητα οξείας αντίδρασης με μέση θανατηφόρα δόση (LD₅₀) μεταξύ 523 and 1216 mg/kg στους αρουραίους και 389 mg/kg στα αρσενικά ποντίκια. Η οξεία αντίδραση νευροτοξικότητας του clothianidin που μελετήθηκε σε τρεις διαφορετικές έρευνες σε αρουραίους σε δόσεις έως 400 mg/kg. Παρατηρήθηκαν επιδράσεις στη συμπεριφορά των ζώων στη μεγαλύτερη δόση την ημέρα που ξεκίνησε η αγωγή (<http://www.fao.org>). Δεν παρατηρήθηκαν όμως ιστοπαθολογικές επιδράσεις ανάλογες με τη συγκέντρωση της ουσίας. Αυτό φάνηκε και στην Εικόνα 3.5. όπου απεικονίζονται τα ποσοστά της βιωσιμότητας κυττάρων N2a κατά τη δοκιμή MTT φάνηκε ένα αυξημένο ποσοστό βιωσιμότητας στην περίπτωση των διαφοροποιημένων κυττάρων (A) στη συγκέντρωση 30 μM όπως και στην περίπτωση του imidacloprid που πιθανώς να οφείλεται σε αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα αφού οι άλλες δοκιμές δεν έδειξαν ένα ανάλογο αποτέλεσμα. Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή στις τρεις μικρότερες συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου. Αντίθετα, από τις δοκιμές MTT (B) και PI (ΣΤ) παρουσιάζεται μία σημαντική μεταβολή του ποσοστού των νεκρών κυττάρων στη μισάωρη και στη 48ωρη επώαση. Η μεταβολή αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τη 48ωρη επώαση στη συγκέντρωση των 100 μM όπου το ποσοστό των νεκρών κυττάρων φαίνεται να πλησιάζει το 40 %. Σε μια μελέτη που έγινε από τους Calderón-Segura το clothianidin προκάλεσε μια πτώση της βιωσιμότητας λεμφοκυττάρων με τη διαδοχική αύξηση των συγκεντρώσεων (Calderón-Segura et al., 2012).

Το thiacloprid έχει χαμηλή οξεία αντίδραση τοξικότητας. Τα πουλιά και τα θηλαστικά δεν παρουσιάζουν ούτε οξεία ούτε χρόνια τοξικότητα από την εφαρμογή του thiacloprid όταν χρησιμοποιείται στις δοσολογίες που συνιστανται για την ορθή γεωργική πρακτική (Klein, 2001). Στην Εικόνα 3.6. στα διαφοροποιημένα κύτταρα το thiacloprid δεν παρουσίασε πολύ σημαντικές μεταβολές στη βιωσιμότητα των κυττάρων με εξαίρεση τη συγκέντρωση 100 μM όπου τόσο κατά τη δοκιμή MTT (A) όσο και κατά τη δοκιμή του PI (E) υπήρξε μία μείωση της βιωσιμότητας της τάξης του 25 %. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων όπου αν και δεν παρουσιάστηκε κάποια σημαντική μεταβολή από τις δοκιμές MTT (B) και NR (Δ), η δοκιμή PI (ΣΤ) εμφάνισε μία σημαντική μεταβολή της αύξησης του ποσοστού των νεκρών κυττάρων στη μισάωρη και στη 48ωρη επώαση. Η μεταβολή αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τη 48ωρη επώαση στη συγκέντρωση των 100 μM όπου το ποσοστό των νεκρών κυττάρων φαίνεται να ξεπερνά το 42 %. Μια πρόσφατη μελέτη που έγινε σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα έδειξε επίσης ότι το thiacloprid έχει κυτταροτοξική επίδραση σε συγκεντρώσεις 75, 150, και 300 μg/mL αφού μειώνει το μιτωτικό δείκτη (MI) και το δείκτη πολλαπλασιασμού των κυττάρων (PI) (Yavuz Kocaman et al., 2014).

Το acetamiprid έχει σχετικά χαμηλή τοξικότητα για τα θηλαστικά και έχει κατηγοριοποιηθεί ως “απίθανο” καρκινογόνο για τον άνθρωπο. Στα θηλαστικά, το acetamiprid προκάλεσε μια γενικευμένη μη ειδική τοξικότητα και δεν φάνηκε να εμφανίζει εκλεκτικότητα για κάποιο συγκεκριμένο όργανο. Το acetamiprid έχει σχετικά χαμηλή οξεία και χρόνια τοξικότητα στα θηλαστικά και δεν υπάρχουν στοιχεία για καρκινογένεση, νευροτοξικότητα ή ενδοκρινική διατάραξη. Οι υπολογισμοί για τον αθροιστικό κίνδυνο του acetamiprid σε φαγητό και νερό δεν προκάλεσαν ανησυχία για τα επίπεδα της οξείας και χρόνιας έκθεσης. Η οξεία τοξικότητα διά του στόματος στον αρσενικό αρουραίο (LD₅₀ 217 mg kg⁻¹) και ποντίκι (LD₅₀ 198 mg kg⁻¹), καθώς

επίσης και στο θηλυκό αρουραίο (LD_{50} 146 mg kg^{-1}) και ποντίκι (LD_{50} 184 mg kg^{-1}) δεν είναι σημαντική. Η οξεία τοξικότητα διά του δέρματος στον αρσενικό και θηλυκό αρουραίο είναι χαμηλή (>2000 mg kg^{-1}). Τοξικολογικές μελέτες για το acetamiprid π.χ. η ενόχληση στο δέρμα και στα μάτια (κουνέλι), η ευαισθησία στο δέρμα (ινδικό χοιρίδιο), και η μεταλλαξογένεση που εκτιμήθηκε με τη δοκιμή Ames ήταν όλα αρνητικά (Tomlin, 2000). Παρόλα αυτά όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.7. κατά τη δοκιμή MTT φάνηκε ένα αυξημένο ποσοστό μείωσης της βιωσιμότητας στην περίπτωση των διαφοροποιημένων κυττάρων (A) στη συγκέντρωση 30 μ M και 100 μ M, που υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα του PI (E). Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων αν και δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή στις δοκιμές MTT (B) και NR (Δ), η δοκιμή του PI (Σ T) παρουσίασε μία σημαντική μεταβολή του ποσοστού των νεκρών κυττάρων στη μισάωρη και στη 48ωρη επώαση. Η μεταβολή αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική ιδίως κατά τη 48ωρη επώαση στη συγκέντρωση των 100 μ M όπου το ποσοστό των νεκρών κυττάρων φαίνεται να πλησιάζει το 28 %. Μελέτη που έγινε στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές HepG2, HEK293 και JEG3 έδειξε μια πολύ σημαντική πτώση της βιωσιμότητας από 35-80% αντίστοιχα με την επίδραση του acetamiprid σε συγκέντρωση 100 μ g/mL 24 ώρες μετά την έκθεση τους στο εντομοκτόνο (Mesnage et al., 2014).

Μετά από χορήγηση δια του στόματος σε αρουραίους, το thiamethoxam απορροφάται γρήγορα και έως και το 90% του εφαρμοσμένου υλικού αποβάλλεται μέσω των ούρων. Το thiamethoxam έχει χαμηλή οξεία τοξικότητα όταν χορηγείται σε αρουραίους δια του στόματος, δια του δέρματος ή δια εισπνοής (Maienfisch 1999a and Maienfisch 2001a). Μελέτες οξείας νευροτοξικότητας και υποχρόνιας νευροτοξικότητας σε αρουραίους έδειξαν ότι το thiamethoxam δεν έχει καμιά νευροτοξική δράση. Παρόλα αυτά, μελέτες έδειξαν ότι το thiamethoxam μία επαγωγή ενζύμων του συκωτιού ποντικών με μηχανισμό παρεμφερή με αυτόν της φαινοβαρβιτόλης. Σε επαναλαμβανόμενες μελέτες σε τρωκτικά και σκυλιά τα κύρια όργανα στόχοι ήταν το συκώτι και τα νεφρά (μόνο σε αρουραίους). Σε χρόνιες μελέτες σε τρωκτικά, τα ποντίκια παρουσίασαν αυξημένο αριθμό όγκων στο συκώτι, γεγονός που πιθανόν να είναι χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου είδους αφού έχει βρεθεί μετά από χρόνιες μελέτες σε αρουραίους ότι το thiamethoxam δεν είναι καρκινογόνο (Maienfisch et al., 2001a). Στην Εικόνα 3.8., σε διαφοροποιημένα κύτταρα το thiamethoxam παρουσίασε σημαντικές μεταβολές στη βιωσιμότητα των κυττάρων ιδίως στη συγκέντρωση 100 μ M όπου τόσο κατά τη δοκιμή MTT (A) όσο και κατά τη δοκιμή του PI (E) υπήρξε μία μείωση της βιωσιμότητας της τάξης του 40 και 27 % αντίστοιχα. Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων δε φαίνεται κάποια σημαντική μεταβολή από τις δοκιμές MTT (B) και NR (Δ). Η δοκιμή PI (Σ T) παρουσιάζει μία σημαντική μεταβολή της αύξησης του ποσοστού των νεκρών κυττάρων στη 48ωρη επώαση. Η μεταβολή αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τη 48ωρη επώαση στη συγκέντρωση των 100 μ M όπου το ποσοστό των νεκρών κυττάρων φαίνεται να ξεπερνά το 42 %. Έχει αναφερθεί ότι το thiamethoxam επήγαγε την ανάπτυξη όγκων στο συκώτι ποντικών ενώ παράλληλα προκάλεσε νέκρωση μεμονωμένων κυττάρων και αύξηση στην απόπτωση μετά από χορήγηση του για 10 εβδομάδες που ήταν ανάλογες της συγκέντρωσής του.

Το spiromesifen παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα στις μέλισσες honeybees (Nauen et al. 2002; Nicolaus et al. 2005) και στους βομβίνους (Bielza et al. 2005) ενώ προκάλεσε κάποια τοξικότητα σε πειραματόζωα μετά από μελέτες χορήγησης μακράς διάρκειας (<http://pmep.cce.cornell.edu>). Στην Εικόνα 3.9. απεικονίζονται τα ποσοστά της βιωσιμότητας κυττάρων N2a διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων μετά από επώασή τους με το εντομοκτόνο spiromesifen σε συγκεντρώσεις 3, 10, 30 και

100 μM . Ένα πολύ αυξημένο ποσοστό μείωσης της βιωσιμότητας (12 και 8 %) φάνηκε κατά τη δοκιμή MTT στην περίπτωση των διαφοροποιημένων κυττάρων (A) στις συγκεντρώσεις 30 μM και 100 μM στις 48 ώρες, που υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα του PI (E). Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων αν και δεν παρατηρείται κάποια σημαντική μεταβολή στη δοκιμή NR (Δ), στη δοκιμή MTT (B) παρουσιάζεται μία σημαντική αύξηση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων στη μισάωρη και στη 48ωρη επώαση που πιθανώς οφείλεται σε αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα. Αυτό υποστηρίζεται και από τη δοκιμή PI (ΣT) όπου το ποσοστό των νεκρών κυττάρων έχει φτάσει το 50 %.

Το spirodiclofen δεν παρουσιάζει νευροτοξική δράση, όμως δρα στην ανάπτυξη του ακάρεου. Ενεργεί σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια ακόμα και στα αυγά. Επιπλέον, το ακαρεοκτόνο επηρεάζει σημαντικά τη γονιμότητα των θηλυκών ενήλικων. (Nauen, 2005) (Wachendorff et al., 2000). Κατά τη διάρκεια μελέτης νευροτοξικότητας παρουσίασε μικρό χρόνο κατακράτησης στη φάση της μνήμης σε 60 θηλυκά ποντίκια σε όλες τις δόσεις (<http://www.epa.gov>). Στην Εικόνα 3.10. στα διαφοροποιημένα κύτταρα το spirodiclofen παρουσίασε σημαντικές μεταβολές στη βιωσιμότητα των κυττάρων ιδίως στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM όπου κατά τη δοκιμή MTT (A) η βιωσιμότητα έφτασε στο 5 % κατά τη 48ωρη επώαση. Κατά τη δοκιμή NR στις ίδιες συγκεντρώσεις φαίνεται μία αύξηση της βιωσιμότητας που πιθανώς να οφείλεται στην εκτεταμένη λυσοσωμική λειτουργία στις 24 ώρες. Κατά τη δοκιμή του PI (E) υπήρξε μία μείωση της βιωσιμότητας στις συγκεντρώσεις 30 και μM στις 48 ώρες φτάνει το 48 % και 44 % αντίστοιχα. Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων παρατηρείται μια αντίστοιχη μεταβολή στις 48 ώρες στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM κατά δοκιμές MTT (B) και PI (ΣT). Η δοκιμή NR (Δ) παρουσιάζει μία μεταβολή του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων στη 48ωρη επώαση που δεν είναι όμως τόσο σημαντική όσο στις άλλες δύο δοκιμές.

Το spirotetramat έχει χαμηλή οξεία τοξικότητα στους αρουραίους ενώ τα ποντίκια δε φάνηκε να εμφανίζουν τοξικότητα στο εντομοκτόνο (<http://www.fao.org>). Στην Εικόνα 3.11. το εντομοκτόνο spirotetramat παρατηρήθηκε ότι μείωσε τη βιωσιμότητα κατά τη δοκιμή MTT στην περίπτωση των διαφοροποιημένων κυττάρων (A) στη συγκέντρωση 100 μM στις 24 ώρες. Παράλληλα, τα αποτελέσματα του PI (E) έδειξαν μία μεγάλη αύξηση του ποσοστού των νεκρών κυττάρων στις 48 ώρες στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM (50 % και 46 %). Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων παρατηρήθηκε μια γραμμική αύξηση της βιωσιμότητας μέχρι τη συγκέντρωση 30 μM στη μισάωρη επώαση, στη δοκιμή MTT (B). Σημαντική αύξηση του ποσοστού των νεκρών κυττάρων παρουσιάζεται στη 48ωρη επώαση στη δοκιμή PI (ΣT) με το ποσοστό των νεκρών κυττάρων να φτάνει το 42 % στη συγκέντρωση 30 μM .

Τα αποτελέσματα των τριών τεστ εκτίμησης της βιωσιμότητας των κυττάρων δε φαίνεται να συσχετίζονται μεταξύ τους κυρίως στην περίπτωση των νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων. Αυτό το γεγονός πιθανώς να οφείλεται στους περιορισμούς κάθε χρωστικής. Μία συγκριτική μελέτη που έγινε σε κυτταρική LNCaP για την επίδραση της πολυφαινόλης EGCG έδειξε ότι η χρωστική MTT που είναι δείκτης των ενεργών μεταβολικά μιτοχονδρίων υπερεκτιμά τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων σε σύγκριση με τις δοκιμές που ποσοτικοποιούν το ATP, το DNA και με τη δοκιμή πρόσληψης της χρωστικής trypan blue. (Wang, Henning & Heber, 1010). Το ουδέτερο ερυθρό (NR) που έχει την ιδιότητα να προσδένεται στα λυσοσώματα των ζωντανών κυττάρων, σε μία μελέτη που έγινε σε επιθηλιακά κύτταρα κουνελιού που δέχτηκαν την επίδραση διαφορετικών ουσιών σε σύγκριση με τα αποτελέσματα *in vivo* έδωσε μια πολύ χαμηλή συσχέτιση $r=0.33$ (Sina et al., 1992). Το ιωδιούχο προπίδιο (PI) εί-

ναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική για τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA των κυττάρων καθώς δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη συνεπώς θεωρείται ένας πολύ καλός δείκτης κυτταροτοξικότητας. Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι βακτήρια *Sphingomonas* που βρισκόταν σε πρώιμη εκθετική φάση ανάπτυξης βρέθηκαν θετικά σε χρώση PI με επίπεδα κυτταροτοξικότητας 40 % ενώ αντίθετα ενώ αντίθετα η χρώση με Hoechst 33342 έδειξε ότι τα βακτήρια με την υψηλότερη πρόσληψη PI είχαν τις μικρότερες ποσότητες DNA (Shi et al., 2007).

Όσον αφορά την επίδραση των εντομοκτόνων στην κυτταρική διαφοροποίηση και την προέκταση των νευρικών αξόνων, από την Εικόνα 3.14. φαίνεται ότι τόσο η MeOH όσο και το H₂O₂ δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα την ανάπτυξη των νευρικών προεκτάσεων στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα ο αριθμός των νευρώνων μειωνόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης των εντομοκτόνων. Αυτό είναι ιδιαίτερα έντονο στο εντομοκτόνο clothianidin και συγκεκριμένα στη συγκέντρωση 100 μM. Τα αποτελέσματα αυτά δε φαίνεται να συσχετίζονται με τα αποτελέσματα των δοκιμών κυτταροτοξικότητας που αναφέρθηκαν παραπάνω. Στην Εικόνα 3.15. παρατηρήθηκε επίσης ότι τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα ο αριθμός των νευρώνων μειωνόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης των εντομοκτόνων ιδιαίτερα στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM. Ιδιαίτερα έντονη μείωση του ποσοστού των νευρώνων παρουσιάστηκε στο χειρισμό με το εντομοκτόνο thiamethoxam σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες. Παρατηρήθηκε επίσης ότι στις 48 ώρες υπήρξε μια ελαφρά αύξηση του αριθμού των νευρώνων στο μάρτυρα αλλά και στη συγκέντρωση 3 μM. Μελέτη της επαγόμενης διαφοροποίησης των κυττάρων N2a με διβουτυλο-αδενοσίνη έδειξε ότι η διαφοροποίηση καθώς και η βιογένεση των μιτοχονδρίων αποτελούν μέρη μιας αυθόρμητης αντίδρασης που πυροδοτείται από μια μικρή αύξηση της συγκέντρωσης του ανιόντος του υπεροξειδίου στα μιτοχόνδρια (Valero et al., 2012). Στην Εικόνα 3.16., όπως και στις Εικόνα 3.14. και 3.15. παρατηρήθηκε ότι τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα ο αριθμός των νευρώνων μειωνόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης των εντομοκτόνων, κυρίως στις συγκεντρώσεις 10 - 100 μM. Τη μεγαλύτερη μείωση στην ανάπτυξη νευρώνων εμφάνισαν τα διαφοροποιημένα κύτταρα που είχαν επωαστεί με το εντομοκτόνο spirodiclofen στη συγκέντρωση 100 μM με ποσοστό ανάπτυξης 7,5 % στις 24 ώρες και 9,3 % στις 48 ώρες. Όπως παρατηρείται από τον Πίνακα II του Παραρτήματος υπάρχει μια κλιμακούμενη πτώση της ανάπτυξης των νευρώνων με την αύξηση των συγκεντρώσεων των εντομοκτόνων, με τα αμύδια του τετρονικού οξέος να επηρεάζουν ιδιαίτερα την ανάπτυξη των νευρικών αξόνων. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να συσχετίζονται με τα αποτελέσματα των αντίστοιχων δοκιμών κυτταροτοξικότητας.

Στην Εικόνα 3.17. παρατηρήθηκε ότι τόσο στα διαφοροποιημένα κύτταρα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα η MeOH δεν είχε κάποια επίδραση στο μεμβρανικό δυναμικό των κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα ενώ η βαλινομυκίνη προκάλεσε μεγάλη αύξηση στην αποπόλωση της μεμβράνης 2,5 και 2 φορές μεγαλύτερη από την απόκριση του μάρτυρα αντίστοιχα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η βαλινομυκίνη είναι ένα ιονοφόρο υψηλής εκλεκτικότητας για τα ιόντα καλίου που βρίσκονται μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης (Rose & Jenkins, 2007). Λειτουργεί ως εξειδικευμένος μεταφορέας των ιόντων καλίου και διευκολύνει τη μετακίνηση των ιόντων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης (Cammann, 1985). Η βαλινομυκίνη έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τα ιόντα καλίου από τα ιόντα νατρίου (Rose & Henkens, 1974). Αυτή η εκλεκτικότητα είναι πολύ σημαντική για τη μεταφορά των ιόντων καλίου και όχι των ιόντων νατρίου στα βιολογικά συστήματα. Αυτό το μοτίβο επανα-

λήφθηκε και στην περίπτωση του ασβεστίου όπου ενώ η MeOH δεν προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, η ιονομυκίνη αύξησε το ασβέστιο σχεδόν 2 φορές σε σχέση με το μάρτυρα τόσο στα διαφοροποιημένα (Γ) όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ). Η ιονομυκίνη είναι ένα ιονοφόρο που χρησιμοποιείται για την αύξηση των επιπέδων του ασβεστίου καθώς και για την κατανόηση της μεταφοράς του ασβεστίου διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών (Cavatta et al., 2003).

Στην Εικόνα 3.18. στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Α) το imidacloprid προκάλεσε αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 55 % στη συγκέντρωση 3 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Β) παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της αποπόλωσης στα 10 και στα 100 μM του εντομοκτόνου. Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της συγκέντρωσης στα 10 μM στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) ενώ στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή σε σχέση με τη συγκέντρωση του μάρτυρα. Στην Εικόνα 3.19. στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Α) το clothianidin προκάλεσε αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 45 % στη συγκέντρωση 100 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Β) δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στο μεμβρανικό δυναμικό σε σχέση με το μάρτυρα. Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε μια αύξηση της συγκέντρωσης σε όλες τις συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) ενώ στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM που έφτασε έως και 25 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα. Στην Εικόνα 3.20. στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Α) το thiacloprid προκάλεσε αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 38 % στη συγκέντρωση 100 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Β) δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στο μεμβρανικό δυναμικό σε σχέση με το μάρτυρα. Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης σε όλες τις συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) έως 50 % σχέση με τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 100 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου σε όλες τις συγκεντρώσεις που έφτασε έως και 35 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 100 μM . Στην Εικόνα 3.21. στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Α) το acetamiprid προκάλεσε αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 41 % στη συγκέντρωση 100 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Β) δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στο μεμβρανικό δυναμικό σε σχέση με το μάρτυρα. Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε μια αύξηση της συγκέντρωσης στις συγκεντρώσεις 10 έως 100 μM στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) έως 44 % σχέση με τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 30 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρήθηκε μια αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στη συγκέντρωση 30 μM που έφτασε στο 21 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα. Στην Εικόνα 3.22. στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Α) το thiamethoxam προκάλεσε αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 28 % στη συγκέντρωση 100 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Β) παρατηρήθηκε μια μικρή μεταβολή στο μεμβρανικό δυναμικό που φτάνει στο 21 % σε σχέση με το μάρτυρα. Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε μια αύξηση της συγκέντρωσης στις συγκεντρώσεις 3 έως 100 μM στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) που φτάνει έως το 48 % σχέση με τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 30 μM . Στα

μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρήθηκε μια γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου σε όλες τις συγκεντρώσεις που έφτασε στο 57 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα. Σε γενική εικόνα φαίνεται ότι τα νεονικοτινοειδή στη συγκέντρωση 100 μΜ προκαλούν σημαντική αύξηση της αποπόλωσης του μεμβρανικού δυναμικού αλλά και της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα και με τα αποτελέσματα μελέτης που έγινε σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων εγκεφάλου από ποντίκια τα εντομοκτόνα acetamiprid και imidacloprid σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 1 μΜ μετά από διεγερτική δοκιμή εισαγωγής ασβεστίου επήγαγαν την είσοδο του ασβεστίου (Ca^{2+}) σε βαθμό σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό που έχει αναφερθεί σε μελέτες πρόσδεσης σε νικοτινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (Kimura-Kuroda et al., 2012. Παρόμοια εικόνα με τα αποτελέσματα των νεονικοτινοειδών παρατηρείται και στην περίπτωση των αμιδίων του τετρονικού οξέος. Στην Εικόνα 3.23. στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Α) το spriomesifen προκάλεσε γραμμική αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 60 % στη συγκέντρωση 100 μΜ. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Β) παρατηρήθηκε το ίδιο μοτίβο με τη μεταβολή στο μεμβρανικό δυναμικό να φτάνει στο 34 % σε σχέση με το μάρτυρα στα 100 μΜ. Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε πάλι γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης στις συγκεντρώσεις 3 έως 100 μΜ στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) έως 1,05 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 30 μΜ. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρήθηκε αύξηση (μη γραμμική) της συγκέντρωσης του ασβεστίου σε όλες τις συγκεντρώσεις που έφτασε στο 97 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα. Στην Εικόνα 3.24. στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Α) το spirodiclofen προκάλεσε γραμμική αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 60 % στη συγκέντρωση 100 μΜ. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Β) παρατηρήθηκε για μία ακόμα φορά πτώση του μεμβρανικού δυναμικού που έφτασε στο 28 % σε σχέση με το μάρτυρα στα 100 μΜ. Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης στις συγκεντρώσεις 3 έως 100 μΜ στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) έως 1,1 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 100 μΜ. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου σε όλες τις συγκεντρώσεις που έφτασε στο 80 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα. Στην Εικόνα 3.25. στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Α) το spirotetramat προκάλεσε αύξηση της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα που φτάνει έως το 51 % στη συγκέντρωση 30 μΜ. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Β) δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή του μεμβρανικού δυναμικού σε σχέση με τη μεταβολή του μάρτυρα. Στην περίπτωση του ασβεστίου παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης στις συγκεντρώσεις 3 έως 100 μΜ στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) έως 2,1 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 100 μΜ. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου σε όλες τις συγκεντρώσεις που έφτασε στο 67 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα.

Αν και ο μεταβολισμός του γλουταθείου στα εγκεφαλικά κύτταρα έχει μελετηθεί σε πρωτογενής κυτταρικές καλλιέργειες κυρίως αστρόγλια, λίγα πράγματα είναι γνωστά για το μεταβολισμό του στους νευρώνες. Στην πρώτη αναφορά που έγινε, για τα επίπεδα του γλουταθείου σε καλλιεργούμενους νευρώνες, υποστηρίχθηκε ότι οι νευρώνες έχουν ελάχιστη ποσότητα γλουταθείου (Raps et al., 1989). Παρόλα αυτά, πρόσφατες αναφορές αποδεικνύουν ότι οι καλλιεργούμενοι νευρώνες περιέχουν γλουταθείο σε ποσότητα μέχρι και 40 nmol/mg πρωτεΐνης (Pileblad et al., 1991). Πολύ

σημαντική για τη σωστή μέτρηση του δισουλφιδίου του γλουταθείου, καθώς και του δείκτη GSH/GSSG είναι η χαμηλή συγκέντρωση του δισουλφιδίου του γλουταθείου (υψηλός δείκτης) και η ανάγκη να αποτραπεί η οξειδωση του γλουταθείου GSH κατά την προετοιμασία των δειγμάτων. Ο Griffith (Griffith, 1980) χρησιμοποίησε τη 2-βινυλοπυριδίνη (2-VP) που παραγωγοποιεί το GSH. Το γλουταθείο προστατεύει τα κύτταρα από τις ελεύθερες ρίζες δρώντας ως αντιοξειδωτικό. Μέσα στα κύτταρα το γλουταθείο υπάρχει σε ανηγμένη (GSH) και οξειδωμένη (GSSG) κατάσταση. Σε υγιή κύτταρα, περισσότερο από το 90% του ολικού γλουταθείου βρίσκεται σε ανηγμένη μορφή (GSH) ενώ λιγότερο από το 10% υπάρχει στη μορφή του δισουλφιδίου (GSSG). Η υψηλή συγκέντρωση του γλουταθείου οφείλεται στο γεγονός ότι η ρεδο-υκτάση του γλουταθείου, το ένζυμο που ευθύνεται για τη μετάβαση του από την οξειδωμένη (GSSG) στην ανηγμένη κατάσταση είναι συνεχώς ενεργό και λειτουργεί κατά του οξειδωτικού στρες. Ένας αυξημένος δείκτης GSSG/GSH είναι χαρακτηριστικός του οξειδωτικού στρες. Η θειολική ομάδα του ανηγμένου γλουταθείου, προσφέρει τα ανάλογα άλλων ασταθών ROS, με αποτέλεσμα να γίνεται ασταθής και η ίδια. Το ασταθές μόριο GSH αντιδρά αμέσως με ένα άλλο ασταθές μόριο GSH σχηματίζοντας το σταθερό μόριο GSSG. Αυτή η αντίδραση επικρατεί καθώς το γλουταθείο είναι διαθέσιμο σε μεγάλες συγκεντρώσεις, επομένως το GSSG μετατρέπεται ξανά σε GSH μέσω του ενζύμου ρεδουκτάση του γλουταθείου (Anderson, 1996) (Halliwell & Gutteridge, 1999). Στην Εικόνα 3.26. φαίνεται ότι τόσο η MeOH όσο και το H₂O₂ δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα την αναλογία GSH/GSSG στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) κατά τις 24 ώρες ενώ στις 48 ώρες η MeOH σε συγκέντρωση 0.3% προκαλεί μια μικρή, πλην σημαντική πτώση. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) η αναλογία GSH/GSSG παρουσιάζεται πτωτική στη MeOH σε συγκέντρωση 0.3% τόσο κατά τις 24 όσο και κατά τις 48 ώρες. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου έχει αναφερθεί ότι είναι ιδιαίτερα τοξικό για τους νευρώνες του εγκεφάλου (Mischel et al., 1997) (Abe & Saito, 1998). Το υπεροξείδιο προκαλεί απόπτωση στους καλλιεργούμενους νευρώνες (Whittemore et al., 1995) (Hoyt et al., 1997) στην προκειμένη περίπτωση όμως δεν παρατηρήθηκε τοξικότητα λόγω χαμηλής συγκέντρωσης στα κυτταρικά διαλύματα. Η εφαρμογή του H₂O₂ σε νευρώνες προκαλεί μια ταχύτατη οξειδωση του GSH. Η αποδόμηση του ακολουθείται από μια σχεδόν ολοκληρωτική αναγέννηση του αρχικού δείκτη GSH/GSSG μέσα σε μερικά λεπτά (Dringen et al., 1999). Το εντομοκτόνο imidacloprid δε φαίνεται να παρουσιάζει αξιοσημείωτες μεταβολές στην αναλογία GSH/GSSG στις 24 ή στις 48 ώρες σε κανέναν τύπο κυττάρων (Γ, Δ). Το clothianidin προκαλεί μια ελαφρά γραμμική μεταβολή του δείκτη με την αύξηση των συγκεντρώσεων κυρίως κατά τις 24 ώρες τόσο στα διαφοροποιημένα (E) όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (ΣΤ). Στην Εικόνα 3.27. παρατηρήθηκε ότι στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) το thiacloprid προκάλεσε μια ελαφρά αύξηση της αναλογίας GSH/GSSG ως προς το μάρτυρα στη συγκέντρωση 30 μM στις 24 ώρες ενώ κατά τις 48 ώρες παρατηρήθηκε επίσης μια ελαφρά αύξηση στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) το thiacloprid προκάλεσε μια ελαφρά γραμμική πτώση του δείκτη όσο αυξάνονταν οι συγκεντρώσεις τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες. Το acetamiprid παρουσίασε μια αύξηση του δείκτη με την αύξηση των συγκεντρώσεων μέχρι τα 30 μM στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ), ενώ στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή με εξαίρεση τα 30 μM στις 24 ώρες που έφεραν μια πτώση του δείκτη κοντά στο 30 % σε σχέση με το μάρτυρα. Το εντομοκτόνο thiamethoxam δεν προκάλεσε ιδιαίτερες μεταβολές στα διαφοροποιημένα κύτταρα (E) ενώ στα μη διαφοροποιημένα φαίνεται να προκάλεσε μια μείωση του δείκτη που είναι γραμμική μέχρι τα 100 μM στις 24 ώρες και μέχρι τα 30 μM στις 48 ώρες. Στην Εικόνα 3.28. στο εντομοκτόνο spiromesifen

παρατηρήθηκε ότι τόσο στα διαφοροποιημένα (A) όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) ο δείκτης μειωνόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης του εντομοκτόνου, κυρίως στις συγκεντρώσεις 10 - 100 μM . Η μείωση στα διαφοροποιημένα κύτταρα είναι ιδιαίτερα σημαντική αφού πλησιάζει στο 80 % του δείκτη του μάρτυρα στις 48 ώρες. Στα spirodiclofen και spirotetramat παρατηρείται επίσης μια πτώση του δείκτη που είναι γραμμική μέχρι τα 30 μM στα διαφοροποιημένα κύτταρα, ενώ στα μη διαφοροποιημένα δεν παρατηρούνται ιδιαίτερα σημαντικές μεταβολές. Παρόλο που στη βιβλιογραφία τα αμίδια του τετρονικού οξέος αναφέρονται ως μη τοξικά για τα θηλαστικά παρατηρήθηκε ότι επέφεραν μια σημαντική μεταβολή στο δείκτη GSH/GSSG (<http://www.cdpr.ca.gov>).

Από τη βιβλιογραφία, τα νεονικοτινοειδή δε φαίνεται να προκαλούν κάποια οξειδωτική επίδραση στα λιπίδια των κυττάρων θηλαστικών. Παρόλα αυτά μετά από μελέτη που έγινε σε κύτταρα 3T3-L1, έχει βρεθεί ότι το imidacloprid υπάρχει πιθανότητα να επάγει την αδιπογένεση (Park et al., 2013). Στην Εικόνα 3.29. φαίνεται ότι η MeOH αυξάνει τη συγκέντρωση της MDA στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) τόσο κατά τις 24 ώρες όσο και στις 48 ώρες σε συγκέντρωση 0.3 % ενώ παράλληλα παρατηρείται μια αύξηση της MDA και με την επίδραση του H_2O_2 κατά τις 24 ώρες. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) η συγκέντρωση της MDA αυξάνεται ελαφρώς με την επίδραση της MeOH σε συγκέντρωση 0.3 % κατά τις 24 ώρες. Το εντομοκτόνο imidacloprid φαίνεται να προκαλεί αξιοσημείωτες μεταβολές στη συγκέντρωση της MDA στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) στις 24 ώρες σε όλες τις συγκεντρώσεις και στις 48 ώρες στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) παρατηρείται μια μικρή αύξηση της συγκέντρωσης στα 30 και 100 μM στις 48 ώρες. Το ίδιο μοτίβο επαναλαμβάνεται και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (ΣΤ) που είχαν υποστεί την επίδραση του clothianidin. Από την άλλη πλευρά, τα διαφοροποιημένα κύτταρα (E), εμφανίζουν μια γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης της MDA στις 24 ώρες που φτάνει μέχρι και 33 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 30 μM . Στις 48 ώρες το εντομοκτόνο αυξάνει τη συγκέντρωση κυρίως στα 30 μM (31 % πάνω από το μάρτυρα). Στην Εικόνα 3.30. παρατηρήθηκε ότι στα διαφοροποιημένα κύτταρα (A) το thiacloprid προκάλεσε μια σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της MDA (29 %) ως προς το μάρτυρα στη συγκέντρωση 30 μM στις 48 ώρες η οποία άρχισε να πέφτει στα 100 μM (20.2 %) ενώ κατά τις 24 ώρες παρατηρήθηκε επίσης μια ελαφρά αύξηση στη συγκέντρωση 30 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) το thiacloprid προκάλεσε μια αύξηση της MDA στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM στις 24 ώρες. Το acetamiprid παρουσίασε μια μικρή αύξηση της MDA στις συγκεντρώσεις 30 μM και 100 μM στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ) που ξεπέρασε μόλις το 23 % της συγκέντρωσης του μάρτυρα στα 100 μM στις 24 ώρες, ενώ στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) σημειώθηκε μεταβολή στις ίδιες συγκεντρώσεις στις 24 ώρες που ξεπέρασε τη συγκέντρωση της MDA στο μάρτυρα κατά 37 % στα 30 μM στις 48 ώρες. Το εντομοκτόνο thiamethoxam παρουσίασε μια γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης στα διαφοροποιημένα κύτταρα (E) στις 24 ώρες μέχρι και τη συγκέντρωση 30 μM ενώ στα μη διαφοροποιημένα φαίνεται να προκάλεσε μια σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης στα 30 και στα 100 μM στις 24 ώρες που έφτασε στο 35 και στο 32 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα αντίστοιχα. Όσον αφορά τα αμίδια του τετρονικού οξέος η επίδραση τους στα κύτταρα είναι αρκετά σημαντική κάτι που εξηγείται από τον τρόπο δράσης τους που σχετίζεται με την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των λιπιδίων στα έντομα (<http://www.cdpr.ca.gov>). Στην Εικόνα 3.31. στα εντομοκτόνα spiromesifen και spirodiclofen παρατηρήθηκε ότι τόσο στα διαφοροποιημένα (A) όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (B) η συγκέντρωση της MDA αυξανόταν σημαντικά με την αύξηση της συγκέντρωσης των εντο-

μοκτόνων σε όλες τις συγκεντρώσεις τόσο κατά τις 24 ώρες όσο και κατά τις 48 ώρες. Η αύξηση μάλιστα στο spiriomesifen έφτασε στο 104 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα διαφοροποιημένα κύτταρα στα 100 μM κατά τις 48 ώρες, ενώ στο spiridiclofen έφτασε περίπου το 135 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα στα 30 μM. Στο spiriotetramat παρατηρήθηκαν εξίσου σημαντικές αυξήσεις στη συγκέντρωση της MDA που δεν πέρασαν όμως το 52 % πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα. Πολλές από τις διαδικασίες που προστατεύουν τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες εξαρτώνται από το γλουταθείο. Συνεπώς τα μειωμένα επίπεδα γλουταθείου αυξάνουν την πιθανότητα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και της κυτταρικής αποδόμησης (Comporti, 1987). Αν και υπήρξε μια πτώση στα επίπεδα του γλουταθείου, δεν ανιχνεύθηκε πολύ σημαντική αύξηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την υπόθεση ότι το γλουταθείο αναπτύσσεται μόνο όταν τα επίπεδα του γλουταθείου φτάσουν σε ένα κρίσιμο σημείο (Comporti, 1987). Μία πιθανή υπόθεση που μπορεί να γίνει είναι ότι η αναγέννηση των νευρώνων δεν σχετίζεται με τη γενική και περιορισμένη πτώση των επιπέδων του γλουταθείου. Επίσης δε μπορεί να αποκλεισθεί η πιθανότητα ότι σε περιφερειακά τμήματα των νευρώνων τα επίπεδα του γλουταθείου μπορεί να μειώνονται σε κρίσιμα επίπεδα οδηγώντας σε μια τοπική υπεροξειδωση των λιπιδίων. Αυτό το τμήμα όμως των νευρώνων αποτελεί μόνο ένα μικρό μέρος όλης της κυτταροκαλλιέργειας όπου γίνεται η μέτρηση της συγκέντρωσης του MDA με αποτέλεσμα μια να μην είναι εφικτή η ανίχνευση μιας τοπικής ανίχνευσης της υπεροξειδωσης

Η ετερογένεια των κυττάρων και η πολυπλοκότητα της δομής του νευρικού συστήματος, σε συνδυασμό με τις διαφορές στη μεταβολική ικανότητα των νευρώνων, των νευρογλοιακών κυττάρων και άλλων στοιχείων υποδηλώνει μια εξειδικευμένη εμπλοκή των κυττάρων στις διαδικασίες μετά από την εφαρμογή νευροτοξικών ουσιών. Ο προσδιορισμός του ρόλου του βιομετασχηματισμού των ξеноβιοτικών στη νευρική προδιάθεση προϋποθέτει την κατανόηση της κατανομής των ενζυμικών συστημάτων των φάσεων I και II στα κύτταρα του εγκεφάλου. Ενώ κατά μήκος του νευρικού συστήματος, το επένδυμα, το χοριοειδές πλέγμα και τα ενδοθηλιακά επιχρίσματα των αιμοφόρων αγγείων φαίνεται να περιέχουν σεβαστές ποσότητες διαφόρων ισοτύπων του κυτοχρώματος P450 (CYP450), τα νευρογλοιακά κύτταρα και οι νευρώνες τείνουν να εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση στη μορφή του P450 που εκφράζουν. Η τοπική και κυτταρική ετερογένεια χαρακτηρίζει με παρόμοιο τρόπο την κατανομή του γλουταθείου και του συζευκτικού του ενζύμου μεταφοράση του S γλουταθείου (GST) στον εγκέφαλο. Ενώ όλα τα κύτταρα του εμβρυονικού νευρικού συστήματος εκφράζουν υψηλά επίπεδα γλουταθείου και της π-GST (και μικρότερες ποσότητες των α- και μ-), κατά την ενηλικίωση οι νευρώνες και τα μη-νευρικά κύτταρα εμφανίζουν διαφορά στην κατανομή του γλουταθείου και ως προς το ποιους ισότυπους GST εκφράζουν. Οι νευρώνες (με εξαίρεση τα γάγγλια της ραχιαίας ρίζας και τα κύτταρα της κοκκιώδους στοιβάδας της παρεγκεφαλίδας) γίνονται GSH-αρνητικά αλλά περιέχουν α-, μ- και π-GST. Τα νευρογλοιακά κύτταρα, το επένδυμα, το χοριοειδές πλέγμα και τα νευραγγειακά κύτταρα είναι πλούσια σε GSH και εκφράζουν διάφορους ισότυπους GST. Οι GSTs στα κύτταρα νευροβλαστώματος υπάρχουν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις από τις GSTs που έχουν ανιχνευθεί σε άλλους ιστούς όπως το σπύκωτι και ο εγκέφαλος (146 μmol και 40 μmol*min⁻¹*mg⁻¹ πρωτεΐνης αντίστοιχα) (Theodore et al., 1985). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.32. το H₂O₂ (A, B) που χρησιμοποιήθηκε ως ουσία που προκαλεί κυτταρικό θάνατο φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα του ενζύμου τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα μετά από τη μισάωρη επώαση και μετά από τη 48ωρη επώαση. Πολύ σημαντική μεταβολή στη δραστηριότητα του ενζύμου μετά από τη μι-

σάωρη επώαση φαίνεται να προκαλούν τόσο το imidacloprid (Γ, Δ) όσο και το clothianidin (E,ΣΤ) σε όλες τις συγκεντρώσεις και στους δύο τύπους κυττάρων. Το imidacloprid προκαλεί επίσης πτώση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά τη 48ωρη επώαση στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ). Στην Εικόνα 3.33. τα εντομοκτόνα thiacloprid, acetamiprid και thiamethoxam φαίνεται να εμφανίζουν σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου μετά τη μισάωρη επώαση τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή μετά τις 24 και τις 48 ώρες. Αντίθετα, στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα στις 48 ώρες παρατηρείται μια γραμμική αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου σε όλα τα εντομοκτόνα. Στην Εικόνα 3.34. όπως και στην Εικόνα 3.33. τα εντομοκτόνα spiromesifen, spirodiclofen και spirotetramat εμφανίζουν σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου μετά τη μισάωρη επώαση τόσο στα διαφοροποιημένα (η δραστηριότητα είναι 3,5 φορές μεγαλύτερη από του μάρτυρα στα 10 μM στο spiromesifen) όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Μόνη εξαίρεση σε αυτό το μοτίβο αποτελούν τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα στην περίπτωση του spirodiclofen που δεν εμφανίζουν αξιοσημείωτη μεταβολή στην ενζυμική δραστηριότητα. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή μετά τις 24 και τις 48 ώρες. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα στις 48 ώρες η επίδραση των εντομοκτόνων spiromesifen και spirotetramat επιφέρει μια επίσης πολύ σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση του ενζύμου.

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή δύο υπεροξειδίων σε H_2O_2 και οξυγόνο. Το πλεονέκτημα στην προκειμένη περίπτωση είναι ότι το H_2O_2 είναι πολύ λιγότερο τοξικό από το υπεροξείδιο. Η SOD επιταχύνει αυτήν την αποτοξινωτική αντίδραση σχεδόν 10.000 φορές σε σχέση με τη μη-καταλυόμενη αντίδραση. Έρευνες σε όγκους από ιστό νευρικής ακρολοφίας έδειξαν ότι το εκχύλισμα από μελάνωμα ποντικού είχε 67 U/mg πρωτεΐνης SOD σε αντίθεση με ιστό από τον εγκέφαλο κανονικού ποντικού που περιείχε SOD με ειδική δραστηριότητα 9.0 U/mg πρωτεΐνης. Εκχυλίσματα νευροβλαστώματος περιείχαν 3.8 U/mg πρωτεΐνης SOD εκ των οποίων τα 1.3 U/mg πρωτεΐνης ήταν Mn SOD (Oberley et al., 1978). Συνεπώς τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα του ενζύμου. Παράλληλα, σε μελέτες που έγιναν σε κύτταρα νευροβλαστώματος SK-N-SH που διαφοροποιήθηκαν με ρετινοϊκό οξύ παρουσίασαν επαγωγή της έκφρασης της Mn SOD (Kinningham et al., 2008). Στην Εικόνα 3.35. το H_2O_2 (Α) που χρησιμοποιήθηκε ως ουσία που προκαλεί κυτταρικό θάνατο φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα του ενζύμου στα διαφοροποιημένα κύτταρα μετά από τη μισάωρη επώαση (μπλε στήλη) και μετά από την 24ωρη (μπορντό στήλη) και τη 48ωρη επώαση (πράσινη στήλη) στα 100 μM. Η επαγόμενη διαφοροποίηση των κυττάρων N2a με διβουτυλο-αδενοσίνη πυροδοτεί μια μικρή αύξηση της συγκέντρωσης του ανιόντος του υπεροξειδίου στα μιτοχόνδρια (Valero et al., 2012). Αρκετά σημαντική μεταβολή στη δραστηριότητα του ενζύμου μετά από τη μισάωρη επώαση φαίνεται να προκαλούν τόσο το imidacloprid (Γ, Δ) όσο και το clothianidin (E,ΣΤ) σχεδόν σε όλες τις συγκεντρώσεις και στους δύο τύπους κυττάρων. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα το imidacloprid προκαλεί επίσης μια ελαφρά μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου κατά τη 48ωρη επώαση στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ) σε όλες τις συγκεντρώσεις ενώ το clothianidin προκαλεί μια επίσης ελαφρά μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου κατά τη 48ωρη επώαση στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM. Στην Εικόνα 3.36. φαίνεται ότι τα εντομοκτόνα thiacloprid, acetamiprid και thiamethoxam εμφανίζουν μια αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου μετά τη μισάωρη επώαση (μπλε και κόκκινες στήλες) τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα στις συγκεντρώσεις από 3 έως 30 μM. Στα διαφοροποιη-

μένα κύτταρα παρατηρείται μια ελαφρά μεταβολή κατά τις 24 (μπορντό στήλη) και τις 48 ώρες (πράσινη στήλη) στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM και στα τρία εντομοκτόνα. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα στις 24 (κίτρινη στήλη) και στις 48 ώρες (πορτοκαλί στήλη), στα εντομοκτόνα thiacloprid (B) και thiamethoxam (ΣΤ) παρατηρείται μια αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου στις συγκεντρώσεις 3, 10 και 100 μM , ενώ στο εντομοκτόνο acetamiprid η αύξηση εντοπίζεται μεταξύ των συγκεντρώσεων 10 έως 100 μM . Στην Εικόνα 3.37. τα εντομοκτόνα spiromesifen και spiroadiclofen εμφανίζουν σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου μετά τη 24ωρη (μπορντό στήλη) και τη 48ωρη (πράσινη στήλη) επώαση στα διαφοροποιημένα κύτταρα (η δραστηριότητα φτάνει να είναι έως 3 φορές μεγαλύτερη από του μάρτυρα στα 100 μM στο spiromesifen (A) στις 24 ώρες). Το spirotetramat (E) παρουσίασε μια ελαφρά αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου κυρίως στις 24 ώρες. Μόνη εξαίρεση σε αυτό το μοτίβο αποτελούν τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα στην περίπτωση του spiroadiclofen που δεν εμφανίζουν αξιοσημείωτη μεταβολή στην ενζυμική δραστηριότητα. Αντίστοιχα, στα διαφοροποιημένα κύτταρα τα spiromesifen και spiroadiclofen παρουσίασαν μια ελαφρά αύξηση στη δραστηριότητα κυρίως κατά τις 24 (κίτρινη στήλη) και τις 48 ώρες (πορτοκαλί στήλη). Ειδικά το spiromesifen εμφάνισε μία αύξηση της δραστηριότητας 0,8 φορές μεγαλύτερη του μάρτυρα στα 3 μM στις 48 ώρες. Η επίδραση του spirotetramat (ΣΤ) επέφερε σημαντικές μεταβολές κυρίως στις 48 ώρες (πορτοκαλί στήλη) στα 30 και 100 μM . Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα των μετρήσεων του ενζύμου S-μεταφοράση του γλουταθείου φαίνεται ότι σχετίζονται θετικά αφού και τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν παρόμοια μεταβολή της δραστηριότητας τους στις 24 και τις 48 ώρες.

Παρόλο που ο τρόπος δράσης των νεονικοτινοειδών αφορά τους νικοτινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης και αποτελούν πολύ εκλεκτικό σύστημα (Tomizawa 2003), έχει αναφερθεί ότι μέλισσες που είχαν εκτεθεί σε υποθανάτιες δόσεις των imidacloprid και clothianidin παρουσίασαν αύξηση της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης υποδηλώνοντας ότι το ένζυμο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της παρουσίας νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων (Boily et al., 2013). Στην Εικόνα 3.38. παρατηρήθηκε ότι τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα η MeOH δε φαίνεται να επηρεάζει τη δραστηριότητα του ενζύμου, ενώ το H₂O₂ στα διαφοροποιημένα κύτταρα αύξησε τη δραστηριότητα του ενζύμου δύο φορές σε σχέση με το μάρτυρα στις 48 ώρες (A). Τα εντομοκτόνα imidacloprid και clothianidin στα διαφοροποιημένα κύτταρα (Γ, E) στις συγκεντρώσεις 3 και 10 μM αυξάνουν τη δραστηριότητα του ενζύμου ενώ στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM μειώνουν τη δραστηριότητα κοντά στο 50 % του μάρτυρα στις 48 ώρες. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Δ, ΣΤ) στις 48 ώρες, όλες οι συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων αυξάνουν τη δραστηριότητα του ενζύμου και ιδίως το imidacloprid στη συγκέντρωση 10 μM όπου φαίνεται η δραστηριότητα να ξεπερνά το διπλάσιο του μάρτυρα. Στην Εικόνα 3.39. φαίνεται ότι τα εντομοκτόνα thiacloprid, acetamiprid και thiamethoxam εμφανίζουν μια αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου μετά τη μισάωρη και την 24ωρη επώαση στα διαφοροποιημένα κύτταρα στις συγκεντρώσεις 30 και 10 μM (Αυξάνεται κατά περίπου 50 % πάνω από τη δραστηριότητα του μάρτυρα). Στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM παρατηρείται μία πτώση της δραστηριότητας που αγγίζει το 48 % της δραστηριότητας του μάρτυρα στη 48ωρη επώαση. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα υπάρχει μία σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά τη 48ωρη επώαση, η οποία στην περίπτωση του thiacloprid αυξάνεται περίπου 1,5 φορές από τη δραστηριότητα του μάρτυρα στις συγκεντρώσεις 3 και 10 μM . Σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε όμως και στην περίπτωση των αμιδίων του τετρονικού οξέος παρόλο που ο τρόπος δράσης τους δεν σχετίζεται με το σύστη-

μα ακετυλοχολίνης-ακετυλοχολινεστεράσης. Στην Εικόνα 3.40. στην περίπτωση των διαφοροποιημένων κυττάρων, ιδίως τα εντομοκτόνα spiromesifen (Α) και spirodiclofen (Γ), μεταβάλλουν σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα (αυξάνεται αντίστοιχα κατά 1,5 και 2 φορές από τη δραστηριότητα του μάρτυρα) στις συγκεντρώσεις 3 και 10 μM . Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα στη 48ωρη επώαση παρατηρείται μια μεγάλη αύξηση της δραστηριότητας γύρω στο 100% πάνω από τη συγκέντρωση του μάρτυρα για το εντομοκτόνο spiromesifen (Β) στη συγκέντρωση 3 μM που στη συνέχεια πέφτει και φτάνει να είναι ίση με τη δραστηριότητα του μάρτυρα στα 100 μM ακολουθώντας μια γραμμική πορεία. Το εντομοκτόνο spirodiclofen, φαίνεται να αυξάνει ελαφρώς τη δραστηριότητα του ενζύμου στα 10 μM στη 48ωρη επώαση, ενώ το εντομοκτόνο spirotetramat, δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά κατά τη 48ωρη επώαση. Στις συγκεντρώσεις 3 και 10 μM τόσο κατά τη μισάωρη όσο και κατά την 24ωρη επώαση μία σημαντική πτώση της δραστηριότητας του ενζύμου που φτάνει έως το 21 % της δραστηριότητας του μάρτυρα στην περίπτωση του spirodiclofen στα 10 μM στις 24 ώρες (Δ). Τα αποτελέσματα αυτά πιθανώς να οφείλονται στη γενικότερη οξειδωτική κατάσταση που προκαλούν τα αμιδία στα κύτταρα που στρεσάρει γενικώς τα μελετώμενα συστήματα στις συγκεντρώσεις 30 και 100 μM .

Στη συνέχεια της μελέτης κύτταρα Vero τροποποιήθηκαν μεμβρανικά με το ένζυμο AChE προκειμένου να μελετηθεί κατά πόσο είναι εφικτό να επιτευχθεί η εξειδίκευσή τους για μελλοντική χρήση τους σε κυτταρικούς βιοαισθητήρες. Προκειμένου να γίνει εισαγωγή του ενζύμου AChE στην κυτταρική μεμβράνη κυττάρων Vero χρησιμοποιήθηκαν δύο στρατηγικές. Η ηλεκτροπόρωση των κυττάρων Vero μετά από εφαρμογή δύο παλμών των 1,800 V διάρκειας 5 sec και η οσμωτική ένθεση της AChE στα κύτταρα μετά από επώασή τους σε υπέρτονο διάλυμα σουκρόζης και στη συνέχεια σε υπότονο διάλυμα DMEM. Για να βελτιωθεί η πρόσδεση του ενζύμου στην κυτταρική μεμβράνη εισήχθη στα κύτταρα και AChE που είχε το προηγούμενο βράδυ επωαστεί με λαουρικό οξύ. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.41., τα κύτταρα που είχαν υποστεί ηλεκτροπόρωση (ροζ στήλη) εμφανίζουν σημαντική αύξηση στην ενζυμική δραστηριότητα και ιδίως τα κύτταρα που είχαν δεχτεί την AChE που είχε επωαστεί με το λαουρικό οξύ. Η οσμωτική ένθεση (μωβ στήλη) είχε και εκείνη θετική επίδραση στην αύξηση του επιπέδου της ενζυμικής δραστηριότητας, όμως η επώαση με το λαουρικό οξύ δε φαίνεται να επηρέασε σημαντικά τη δραστηριότητα του ενζύμου. Κατά τη μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.42., μετά από το χειρισμό της ηλεκτροπόρωσης (Α), παρουσιάστηκε σημαντική μείωση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων κυρίως κατά τις 24 (ροζ στήλη) και τις 48 ώρες (γαλάζια στήλη). Αντίθετα, μετά από το χειρισμό της οσμωτικής ένθεσης, φαίνεται ότι η βιωσιμότητα δεν επηρεάζεται σχεδόν καθόλου στα 30 min (μωβ στήλη) ενώ φαίνεται να πέφτει ελαφρώς στις 24 (ροζ στήλη) και 48 ώρες (γαλάζια στήλη) χωρίς όμως να πέφτει κάτω από το 80 %. Αυτή η πτώση της βιωσιμότητας πιθανώς να οφείλεται στην ένταση των παλμών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία της ηλεκτροπόρωσης.

Με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με τη χρωματογραφία μαζών αναπτύχθηκε μια εύχρηστη, οικονομική και αξιόπιστη μέθοδος προσδιορισμού 8 φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τις κατηγορίες των νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων και των αμιδίων του τετρονικού οξέος σε υποστρώματα αγγουριού και τομάτας, η οποία και επικυρώθηκε εργαστηριακά. Η μέθοδος παρουσιάζει καλή ορθότητα και πιστότητα με ανακτήσεις που κυμαίνονται από 60,57-116,35% και τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης μικρότερες του 14,88% για το αγγούρι και με ανακτήσεις 64,91%-107,48% και τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης μικρότερες του 64,91% για την τομάτα. Για την πλειονότητα των αναλυτών παρατηρείται εξαιρετική γραμμικότητα με

συντελεστές συσχέτισης μεγαλύτερους του 0,99. Ο στόχος αυτός επιτεύχθηκε με την τεχνική επεξεργασίας δείγματος QuEChERS και την ανάπτυξη μιας εντελώς νέας υπολειμματικής μεθόδου ανίχνευσης σε σύστημα LC-MS. Με το τρόπο αυτό έγινε δυνατή η ταυτόχρονη ανίχνευση αναλυτών από δύο τελείως διαφορετικές κατηγορίες εντομοκτόνων (τα νεονικοτινοειδή δρουν στους νικοτινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης ενώ τα αμίδια του τετρονικού οξέος παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση λιπιδίων). Το ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου (LOQ) για το υπόστρωμα αγγουριού ήταν τα 0.64489 mg/kg για το εντομοκτόνο imidacloprid ενώ για το υπόστρωμα τομάτας ήταν 1.08408 mg/kg για το εντομοκτόνο spirotetramat.

Όσον αφορά τη μέθοδο της διαφορικής παλμικής βολταμετρίας, η μέθοδος προσδιορισμού για κάθε ένα από τα 8 φυτοπροστατευτικά προϊόντα αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα αγγουριού. Η τεχνική επεξεργασίας δείγματος που χρησιμοποιήθηκε και στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν η μέθοδος QuEChERS. Η πλειονότητα των αναλυτών παρουσίασε καλή γραμμικότητα με συντελεστές συσχέτισης που κυμαίνονταν από 0.95-0.98 για τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν με το διάλυμα Britton Robinson και από 0.88-0.95 για τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν με το διάλυμα PBS που περιείχε τα κύτταρα N2a. Το ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου (LOQ) για τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν με το διάλυμα Britton Robinson ήταν τα 2.66132 mg/kg για το εντομοκτόνο clothianidin ενώ για το διάλυμα που περιείχε τα κύτταρα N2a ήταν 3.60954 mg/kg για το εντομοκτόνο imidacloprid. Συμπερασματικά, η ευαισθησία της βολταμετρικής μεθόδου μπορεί να βελτιωθεί με τη χρήση διαφορετικών υλικών ηλεκτροδίων καθώς και διαφορετικών τύπων κυττάρων που χρησιμοποιούνται ως αισθητήριο υλικό.

Οι αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμους νευρώνες με την προσθήκη συγκεκριμένων ουσιών ή παραγόντων διαφοροποίησης στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξής τους. Αυτή η ιδιότητα κάνει τις κυτταρικές σειρές ιδιαίτερα ελκυστικές ως *in vitro* μοντέλα μελέτης των νευρικών λειτουργιών και τις νευροτοξικότητας (Gartlon et al., 2006). Η κυτταρική σειρά N2a μέσω διαφοροποίησης της με τον παράγοντα διβουτυλο-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη μετατρέπεται σε ένα εξαιρετικό νευρικό κυτταρικό τύπο που προσομοιάζει κανονικούς νευρώνες. Μέσω της επαγωγής της διαφοροποίησης πυροδοτούνται αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί (Valero et al., 2012) που αυξάνουν τα επίπεδα δραστηριότητας αποτοξινωτικών/αντιοξειδωτικών ενζύμων (π.χ. GSTs, SOD). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συγκεντρωτικά, έδειξαν σημαντικές διαφορές στην επίδραση των νεονικοτινοειδών και των αμιδίων του τετρονικού οξέος σε κύτταρα που είχαν διαφοροποιηθεί με db-cAMP σε σχέση με κύτταρα που δεν είχαν διαφοροποιηθεί τόσο σε επίπεδο κυτταροτοξικότητας όσο και σε επίπεδο αντιοξειδωτικής ικανότητας. Όπως αποδείχτηκε από τα αποτελέσματα της εργασίας τα διαφοροποιημένα κύτταρα αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη προοπτική για τον τομέα των κυτταρικών βιοαισθητήρων διότι παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία για τις εφαρμοζόμενες σε αυτά ουσίες.

Μελλοντικά, οι βιοαισθητήρες θα κατασκευάζονται με τη χρήση, οργάνων, κυττάρων και μορίων ως αισθητήρια υλικά που θα συνδυάζονται με τεχνολογία μικροκατασκευών για τη δημιουργία αληθινών βιομμητικών chip αισθητήρων. Αυτού του είδους οι αισθητήρες θα παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ευαισθησία και εκλεκτικότητα στα εξωτερικά ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούν ζωντανά κύτταρα θα μπορούν να ανιχνεύσουν τη μετρούμενη πληροφορία ποιοτικά και ποσοτικά και να προσδιορίσουν την παρουσία ουσιών, τη συγκέντρωσή τους κλπ. Επιπλέον, οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες θα έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν λειτουργικές πληροφορίες ενός εξωτερικού φυσικού ή χημικού ερεθίσματος. Εκτός αυτού, οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες ως πραγματικά βιομμητικοί αισθητή-

ρες θα μπορούν να έχουν πρακτική εφαρμογή στον τομέα της ιατρικής επιδιορθώνοντας ή υποκαθιστώντας ανθρώπινα όργανα κ.ο.κ. Η ανάπτυξη των κυτταρικών βιοαισθητήρων στο μέλλον θα συνδυάζει και άλλες προηγμένες τεχνολογίες της φυσικής και της μηχανικής (πχ. Μικροηλεκτρονική, νανοτεχνολογία και μοριακή βιολογία) ώστε να μπορέσουν να κατασκευαστούν ολοκληρωμένα, πολυλειτουργικά και <έξυπνα> συστήματα αισθητήρων.

ΕΝΟΤΗΤΑ Ε

Βιβλιογραφία

Agarwal R., Chase S.D., (2002). Rapid fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *Journal of chromatography B*, pp. 775 121-126.

Akayama, A., Minamida, I., 1999. Discovery of a new systemic insecticide, nitenpyram and its insecticidal properties. In: Yamamoto, I., Casida, J.E. (Eds.), *Neonicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*. Springer, New York, pp. 127–148.

Amar M., Thomas P., Wonnacott S., Lunt G.G. (1995) A nicotinic acetylcholine receptor subunit from insect brain forms a non-desensitizing homo-oligomeric nicotine acetylcholine receptor when expressed in *Xenopus* oocytes *Neurosci. Lett.*, 199, pp. 107–110.

Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction for the Determination of Pesticide Residues in Produce, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 86, pp. 412-431.

Anastassiades M, Tasdelen B, Scherbaum E, Stajnbaher D (2007). Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis, In: Ohkawa H, Miyagawa H, Lee PW (eds), *Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety*. Wiley-VCH, Weinheim.

Anderson, M. (1996). *Glutathione in Free radicals, A Practical Approach*. Oxford University Press, New York, p. 213.

Anderson R. L. (1987). *Practical Statistics for Analytical Chemistry*. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 316.

Anderson R. L. (1987). *Practical Statistics for Analytical Chemistry*. New York: Van Nostrand Reinhold, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. (1989). Fluorescence labeling and microscopy of DNA. *Methods Cell Biol.* 30:417–448.

Apostolou T., Pascual N., Marco M.P., Moschos A., Petropoulos A., Kaltsas G., Kintzios S. (2014) Extraction-less, rapid assay for the direct detection of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) in cork samples. *Talanta* 125, pp. 336-340.

Arndt-Jovin D. J., Jovin T.M. (1989). Chapter 16 Fluorescence Labeling and Microscopy of DNA, *Methods Cell Biol* 30, p. 417.

Badcock N.R., Zoanetti G.D., Martin E.S. (1997). Nonchromatographic assay for malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct with HPLC equivalence. *Clinical Chemistry* 43, pp. 1655-1657.

Bader, M. A (1980). Systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. *J. Chem. Educ.*, 57, pp. 703 – 706.

Bai D., Lummis S.C.R., Leicht W., Breer H., Satelle D.B. (1991). Actions of imidacloprid and related nitromethylen on cholinergic receptors of an identified insect motor neuron *Pestic. Sci.*, 33, pp. 197–204.

Bard A.J. and Faulkner L.R. (1980). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* (New York: Wiley), pp. 261-303.

Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J. (2007). Nontraditional Electrode Materials in Environmental Analysis of Biologically Active Organic Compounds, *Electroanalysis*, 19,p. 2003.

Bayer Crop Science (2012) Spirotetramat (Movento, Ultor, Tihan). <http://www.bayercropscience.com/bcsweb/cropprotection.nsf/id/spirotetramat.htm>. Πρόσβαση 10 Μαρτίου 2013.

Becker B., Lob V., Grundl D., Ilchmann F., Wolf B. (2008). Automated Multi-Parametric Label Free 24 Channel Real-Time Screening System, *IFMBE Proc.*, Vol. 20, pp. 186–189.

Benson J.A., (1989). Insect nicotine acetylcholine receptors as targets for insecticides, in: N.R. McFarlane, A.W. Farnham (Eds.), *Progress and Prospects in Insect Control*, BCPC Monograph, vol. 43 British Crop Protection Council (1989), pp. 59–70.

Bertrand D., Ballivet M., Gomez M., Bertrand S., Phannavong B. (1994). Physiological properties of neuronal nicotinic receptors reconstituted from the vertebrate $\beta 2$ subunit and *Drosophila* α subunits *Eur. J. Neurosci.*, 6, pp. 869–875.

Beyer W.F., Fridovich I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity:some large consequences of minor changes in condition. *Anal. Biochem.*, 161, pp. 559-566.

Bielza P., Contreras J., Quinto V., Izquierdo J., Mansanet V., Elbert A. (2005) Effects of Oberon_ 240 SC on bumblebees pollinating greenhouse tomatoes. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 58, pp. 469–484.

Boily M., Sarrasin B., Deblois C., Aras P., Chagnon M. (2013) Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 20(8), pp. 5603-14.

Borman S. A. (1983). Improving the analytical chemistry/regulatory interface, *Anal. Chem.*, 55, 836A.

Borman S., (1987). Hyphenated MS at Piticon *Anal. Chem.*, 59, p. 769A.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, pp. 248-54.

Breer H. (1988). Receptors for acetylcholine in the nervous system of insects G.G. Lund (Ed.), *Neurotox 88: Molecular Basis of Drug and Pesticide Action*, Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 301–309.

Bretschneider T., Fischer R.; Benet-Buchholz J. (2005). Spiromesifen (Oberon) discovery, synthesis and X-ray structure. *Pflanzenschutz Nachr. Bayer*, 58 (3), pp. 307–318.

Bretschneider T., Fisher R., Nauen R. (2007) Inhibitors of lipid synthesis (acetyl-CoA-carboxylase inhibitors). In: Krämer W, Schirmer U (eds) *Modern crop protection compounds*, vol 3. Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 909–925.

Brischwein, M., Motrescu ER, Cabala E, Otto AM, Grothe H, Wolf B. (2003). Functional Cellular Assays with Multiparametric Silicon Sensor Chips, *Lab Chip*, Vol. 3, pp. 234–240.

Brown M.A., Kim I.S., Sasinos F.I., and Stephens R.D. (1990). *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Application in Agricultural, Pharmaceutical, and Environmental Chemistry*. M. A. Brown, Ed. Washington, DC: American Chemical Society.

Brown P. R. and R. H. Hartwick R. H., (1989). *High Performance Liquid Chromatography*, New York: Wiley.

Brück E, Elbert A, Fischer R, Krueger S, Kühnhold J, Klueken AM, Nauen R, Niebes JF, Reckman U, Schnorbach JJ, Steffens R, van Waetermeulen X (2009). Movento, an innovative ambimobile insecticide for sucking insect pest control in agriculture: biological profile and field performance. *Crop Prot* 28, pp. 838–844.

Buchholz A., Nauen R. (2001). Organophosphate and carbamate resistance in *Myzus persicae* Sulzer and *Phorodon humuli* Schrank (Homoptera: Aphididae): biological and biochemical considerations *Mitteil. Deutschen Gesell. Allg. Angew. Entomol.*, 13, pp. 227–232.

Buchholz A., Nauen R. (2002). Translocation and translaminar bioavailability of two neonicotinoid insecticides after foliar application to cabbage and cotton *Pest. Mgt. Sci.*, 58, pp. 10–16.

Buckingham S.D., Lapied B., Le Corrionc H., Grolleau F., Sattelle D.B. (1997). Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors *J. Exp. Biol.*, 200, pp. 2685–2692.

Γατίδου Γεωργία (2005), *Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων, μελέτη της τοξικότητας τους και ανίχνευση τους στο περιβάλλον*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Περιβάλλοντος, Παν. Αιγαίου, Μυτιλήνη.

Cairns, T., Siegmund, E., Stamp, J. (1989). Evolving criteria for confirmation of trace level residues in food and drugs by mass spectrometry. Part I, *Mass Spectrom. Rev.*, 8 (2), pp. 93-117.

Calcutt R. and Boddy R. (1983). *Statistics for Analytical Chemistry*. New York: Chapman and Hall, London, UK, p. 19.

California Department of Pesticide Regulation (2005)

Διαθέσιμο: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/registration/ais/publicreports/5858.pdf>

Πρόσβαση στις: 12/04/2014.

Cammann K. (1985). Ion-selective bulk membranes as models, *Top. Curr. Chem.*, 128, pp. 219–258.

Carbonneau M.A., Peuchant E, Sess D, Canioni P, Clerc M (1991) Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clin.Chem.* 37/8, 1423-1429 (1991).

Cavarra M.S., Assef Y.A., Kotsias B.A. (2003), Effects of ionomycin and thapsigargin on ion currents in oocytes of *Bufo arenarum*, *J. Exp. Zoolog. A Comp. Exp. Biol.*, 297(2), pp.130-7.

Cheung H., Clarke B.S., Beadle D.J. (1992). A patch-clamp study of the action of a nitromethylene heterocycle insecticide on cockroach neurons growing *in vitro* *Pestic. Sci.*, 34, pp. 187–193.

Chen, J., Miao Y., He N., Wu X., Li S. (2004). *Nanotechnology and Biosensors*, *Bio-technol. Adv.*, Vol. 22, pp. 505–518.

Chiesa R., Fioriti L., Tagliavini F., Salmona M., and Forloni G. (2004). *Techniques in Prion Research* (Lehmann, S., and Grassi, J., eds), Birkhäuser Verlag, Basel pp. 176–19.

Comporti M. (1987) Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 45, pp. 143-169.

Cornell University, Cooperative Extension, Pesticide Management Education Program (2006)

Διαθέσιμο: http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/insect-mite/propetamphos-zetacyperm/spiromesifen/spiromesifen_1206.pdf

Πρόσβαση στις: 12/04/2014.

Covey T. R., Lee E. D., Bruins A. P. and Henion J. D. (1986) Liquid chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 58, p. 1451A.

Dorschel, C. A., Ekmanis, J. L., Oberholtzer, J. E., Warren, Jr., F. V., and Bidlingmeyer, B. A., LC detectors: evaluations and practical implications of linearity, *Anal. Chem.*, 61, 951A, 1989.

Dringen R., Kussmaul L., Gutterer J.M., Hirrlinger J., Hamprecht B. (1999) The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells, *J. Neurochem.*, 72, pp. 2523-2530.

Ευσταθίου, Κ.Η, Χατζηιωάννου, Θ. Π. (1992). Ενόργανες Τεχνικές Αναλύσεως, Τόμος Α, Εκδ. Μαυρομμάτη, Αθήνα, κεφ.7, σελ.166-226.

Elbert A., Becker B., Hartwig J., Erdelen C. (1991). Imidacloprid: a new systemic insecticide Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 44, pp. 113–136.

Elbert A., Brück E., Melgarejo J., Schnorbach H.J., Sone S (2005). Field development of Oberon for whitefly and mite control in vegetables, cotton, corn, strawberries, ornamentals and tea. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 58, pp. 441–468.

Elbert A., Nauen R., Leicht W. (1998). Imidacloprid, a novel chloronicotinyl insecticide, biological activity and agricultural importance I. Ishaaya, D. Degheele (Eds.), Insecticides with Novel Modes of Action, Mechanism, and Application, Springer, New York, pp. 50–73.

Elbert A., Overbeck H., Iwaya K., Tsuboi S. (1990). Imidacloprid, a novel systemic nitromethylene analog insecticide for crop protection Proc. Brighton Crop Protection Conference: Pests and Disease, 1, pp. 21–28.

Ellman GL. Callaway E. (1961). Erythrocyte cholinesterase-levels in mental patients. Nature. (192), p. 1216.

European Commission (2007), Document No. SANCO/2007/3131, Method Validation And Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis In Food And Feed,

Διαθέσιμο: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf.
Πρόσβαση στις: 11/1/2008.

European Commission (2009), Document No. SANCO/10684/2009, "Method Validation And Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis In Food And Feed",

Διαθέσιμο: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf.
Πρόσβαση στις: 11/7/2010.

Food and Agriculture Organisation of the United Nations (2014)

Διαθέσιμο:

http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_/Pesticides/JMPR/Report08/Spirotetramat.pdf

Πρόσβαση στις: 12/04/2014.

Foods of plant origin (2007). Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE – QuEChERS-method. CEN/TC 275, Date: 2007-01, TC 275 WI 00275154, Secretariat: DIN (Document type: European Standard, Document Stage: CEN Enquire).

Gaál F., Guzsány V., Bjelica L., (2007) Determination of various insecticides and pharmaceuticals using differently modified glassy carbon electrodes, J. Serb. Chem. Soc. 72, p. 1465.

- Geisler T., Ressler J., Hartmann H., Wolf B. Uhl R. (2006). Automated Multiparametric Platform for High-Content and High-Throughput Analytical Screening on Living Cells, *IEEE Transactions on Automation Science and Engineering*, Vol. 3, pp. 169–176.
- Gilbert M.T., (1987). *High Performance Liquid Chromatography*, Bristol, UK: Wright.
- Goldstein, M. N. (1968). Neuroblastoma Cells In Tissue Culture, *J. Pediatric Surg.* 3, pp. 166-169.
- Goodman C.S., Spitzer N.C. (1980). Embryonic development of neurotransmitter receptors in grasshoppers D.B. Sattelle, L.M. Hall, J.G. Hidebrand (Eds.), *Receptors for Neurotransmitters, Hormones and Pheromones in Insects*, Elsevier, Amsterdam, pp. 195–307.
- Grafton-Cardwell E.E., Scott S.J. (2008). Efficacy of acaricides for control of citrus red mite. *Arthropod Manage Tests*, vol 33, (D5). Entomological Society of America, Lanham.
- Grafton-Cardwell E.E., Reagan C.A., Haviland D.R. (2007). Efficacy of Movento to control California red scale, 2006. *Arthropod Manage Tests*, vol 32 (D6). Entomological Society of America, Lanham.
- Green R. B. (1983). Laser: practical detectors for chromatography, *Anal. Chem.*, 55, 20A.
- Greenwood R., Ford M.G., Scarr A. (2002). Neonicotinoid pharmacokinetics *Proc. Brighton Crop Protection Conference: Pest and Diseases*, 1, pp. 153–160.
- Griffith, O.W., (1980) *Analytical Biochemistry* 106, 207-212.
- Griffith O.W. (1980). Determination of glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinyl pyridine, *Anal. Biochem.*, 106 (1980), pp. 207–212.
- Grotto D., Santa Maria L.D., Boeira S., Valentini J., Charão M.F., Moro A.M., Nascimento P.C., Pomblum V.J., Garcia S.C. (2007). Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43(2), pp. 619-24.
- Guiberteau A., Galeano T., Mora N., Parrilla P., Salinas F. (2001). Study and determination of the pesticide Imidacloprid by square wave adsorptive stripping voltammetry, *Talanta*, Volume 53, Issue 5, pp. 943-949.
- Guthrie F., Devine G., Denholm I., Nauen R. (2003). Biological evaluation of spiromesifen against *Bemisia tabaci* and an assessment of resistance risks. In: *Proceedings of the BCPC Conference*, vol 2, pp 795–800
- Gundelfinger E.D. (1992). How complex is the nicotinic receptor system of insects? *Trends Neurosci.*, 15, pp. 206–211.

Gupta S.K., Srivastava S., Trivedi D., Joshi S., Halder N. (2005). Ocimum sanctum Modulates Selenite-Induced Cataractogenic Changes and Prevents Rat Lens Opacification. *Current Eye Research*, 30, pp. 583-591.

Guzsvany V.J., Gaal F. F, Bjelica. L.J., Ökresz S. N. (2005). Voltammetric determination of imidacloprid and thiamethoxam, *J. Serb. Chem. Soc.*, 70 (5). pp. 735–743.

Guzsvány, V.; Kádár, M.; Gaál, F.; Tóth, K.; Bjelica, L. (2006) Rapid differential pulse polarographic determination of thiamethoxam in commercial formulations and some real samples. *Microchim.Acta*, 154, pp. 321-328.

Guzsvany V., Papp Z., Švancara I., Vytras K. (2011). Bismuth Powder-Bulk-Modified Carbon Paste Electrode for the Voltammetric Determination of Nitenpyram Insecticide, *Sensing in Electroanalysis*, 6, pp. 231-246.

Haisa M., Kashino S. and Maeda H. (1974). The orthorhombic form of p-hydroxyacetanilide., *Acta Cryst.*, B30, pp. 2510-2512 .

Halliwell, B, Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York, pp. 114-120.

Harrow I.D., Sattelle D.B. (1983). Acetylcholine receptors on the cell body membrane of giant interneurone 2 in the cockroach *Periplaneta americana* *J. Exp. Biol.*, 105, pp. 339–350.

Helmke, B. P., and Minerick A. R., (2006). Designing a Nano-Interface in a Microfluidic Chip to Probe Living Cells: Challenges and Perspectives, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 103, pp. 6419–6424.

Hermesen B., Stetzer E., Thees R., Heiermann R., Schratzenholz A. (1998). Neuronal nicotinic receptors in the locust *Locusta migratoria* *J. Biol. Chem.*, 273, pp. 18394–18404.

Hernandez F., Pozo O.J., Sancho J.V., Bijlsma L., Barreda M., Pitarch E. (2006). Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities, *Journal of Chromatography A*, 1109(2) pp. 242-52.

Hoyt K.R., Gallagher A.J., Hastings T.G., Reynolds I.J. (1997) Characterization of hydrogen peroxide toxicity in cultured rat forebrain neurons, *Neurochem. Res.*, 22, pp. 333-340.

Huang Y., Williamson M.S., Devonshire A.L., Windass J.D., Lansdell S.J. (1999). Molecular characterization and imidacloprid selectivity of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the peach potato aphid *Myzus persicae* *J. Neurochem.*, 73, pp. 380–389.

Huber L. and George S.A. (1993). *Diode Array Detection in HPLC*, Eds. New York: Marcel Dekker.

ICH Harmonised Tripartite guideline, Validation of Analytical Procedures:Text and Methodology Q2(R1).

Ingle J. D. (1970). Sensitivity and limit of detection in quantitative spectrometric methods, *J. Chem. Educ.*, 42, 100.

IRAC (2012) Resistance management for sustainable agriculture and improved public health. <http://www.irc-online.org>. Πρόσβαση 10 Μαρτίου 2012.

Ishii Y., Kobori I., Araki Y., Kurogochi S., Iwaya K. (1994). HPLC determination of the new insecticide imidacloprid and its behavior in rice and cucumber *J. Agric. Food Chem.*, 42, pp. 2917–2921.

Jacobsen E., Jacobsen T. V. and Rojahn T. (1973). *Anal. Chim. Acta*, 64, 293-473.

Jentsch A.M., Bachmann H., Fürst P., Biesalski H.K. (1996). Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, pp. 251-256.

Jeschke P., Moriya K., Lantsch R., Seifert H., Lindner W. (2001). Thiacloprid (Bay YRC2894): a new member of the chloronicotiny insecticide (CNI) *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 54, pp. 147–160.

Κατσάνος Ν. (1981). *Φυσικοχημεία, Βασική Θεώρηση, 2η Έκδοση, Πάτρα.*

Κοκκινίδης Γ.Ι., (1992). *Αρχές και Μέθοδοι Ηλεκτροδιακών Δράσεων, Εκδόσεις Γιαχούλη, Θεσ/κη.*

Κοτρίκλα Α. (2002). “Βελτιστοποίηση μεθόδου ανάλυσης ζιζανιοκτόνων σε υδατικά υποστρώματα με HPLC”, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Περιβάλλοντος, Παν. Αιγαίου, Μυτιλήνη.

Kagabu S., Akagi T. (1997). Quantum chemical consideration of photostability of imidacloprid and related compounds *J. Pest. Sci.*, 22, pp. 84–89.

Kagabu S. (1997). Chloronicotiny insecticides: discovery, application, and future perspective *Rev. Toxicol.*, 1, pp. 75–129.

Kaiser H. (1987). Quantitation in Elemental Analysis, *Anal. Chem.*, 42, p. 53A.

Kawahara K., Saitoh M., Nakajima T., Sato H., Tanaka M., Tojima T. and Ito E. (2002) Increased Resistance to Nitric Oxide Cytotoxicity Associated with Differentiation of Neuroblastoma-Glioma Hybrid (NG108-15) Cells, *Informa Healthcare*, 36(5), pp. 545-554.

Keefer E.W., Gramowski A., Stenger D.A., Pancrazio J.J., Gross G.W. (2001). Characterization of acute neurotoxic effects of trimethylolpropane phosphate via neuronal network biosensors. *Biosens Bioelectron.*, 16(7-8), pp. 513-25.

- Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Kuroda Y, Hayashi M, Kawano H (2012) Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats, PLoS ONE, 7(2), e32432.
- Kiningham KK, Cardozo ZA, Cook C, Cole MP, Stewart JC, et al. (2008) All-trans-retinoic acid induces manganese superoxide dismutase in human neuroblastoma cells through NF-kappaB. Free Radical Biol Med., 44, pp. 1610–1616.
- Kolthoff I. M., and Lingane J.J. (1952). 1. Polarography, Band: Theoretical Principles – Instrumentation and Technique. Interscience Publishers, New York, London.
- Koppert Biological Systems Side effects database, <http://www.koppert.nl>.
- Kramer T., Nauen R. (2011). Monitoring of spiroticlofen susceptibility in field populations of European red mites, *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae), and the cross-resistance pattern of a laboratory-selected strain. Pest Manag Sci, 67, pp. 1285–1293.
- Krohn J., Hellpointer E. (2002). Environmental fate of imidacloprid Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 55, pp. 3–26 (special edn.).
- Kucera P. (1984). Microcolumn High Performance Liquid Chromatography, Ed. New York: Elsevier.
- Leech C.A., Jewess P., Marshall J., Sattelle D.B. (1991). Nitromethylene actions on *in situ* and expressed insect nicotinic acetylcholine receptors FEBS Lett., 290, pp. 90–94.
- Lind R.J., Clough M.S., Reynolds S.E., Earley F.G.P. (1998). [³H]Imidacloprid labels high- and low-affinity nicotinic acetylcholine receptor-like binding sites in the aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) Pestic. Biochem. Physiol., 62, pp. 3–14.
- Liu M.Y., Casida J.E. (1993). High affinity binding of [³H]imidacloprid in the insect acetylcholine receptor Pestic. Biochem. Physiol., pp. 40–46.
- Liu M.Y., Lanford J., Casida J.E. (1993). Relevance of [³H]imidacloprid binding site in housefly head acetylcholine receptor to insecticidal activity of 2-nitromethylen- and 2-nitroimino-imidazolidines Pestic. Biochem. Physiol., 46, pp. 200–206.
- Liu T.X. (2004) Toxicity and efficacy of spiromesifen, a tetronic acid insecticide, against sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) on melons and collards. Crop Protection 23, pp. 505–513.
- Long G.L., Winefordner J.D. (1983). Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. Anal Chem., 55, pp. 712A–724A.
- Lowndes, Herbert E.; Beiswanger, Christine M.; Philbert, Martin A.; Reuhl, Kenneth R., 1994: Substrates for neural metabolism of xenobiotics in adult and developing brain. Neurotoxicology (Little Rock), 15(1), pp. 61-73.

Lykkesfeldt J. (2001). Determination of malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. *Clinical Chemistry* 47, No 9.

Μουμτζής Ι. Α. και Σαζού Δ. Π. (1997). Ηλεκτροχημεία, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσ/κη.

Maienfisch P., Angst M., Brandl F., Fischer W., Hofer D. (2001). Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid *Pest Mgt Sci.*, 57, pp. 906–913.

Maienfisch P., Brandl F., Kobel W., Rindlisbacher A., Senn R. (1999). CGA 293,343: a novel, broad-spectrum neonicotinoid insecticide I. Yamamoto, J.E. Casida (Eds.), *Neonicotinoid insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*, Springer, New York, pp. 177–209.

Maienfisch P., Gsell L., Rindlisbacher A. (1999). Synthesis and insecticidal activity of CGA 293343: a novel broad-spectrum insecticide *Pestic. Sci.*, 55, pp. 351–355.

Majors R. E. (1995). New chromatography columns and accessories at the 1995 Pittsburgh conference, USA, *LC-GC*, 13(8), pp. 202-219.

Mandel J. (1978). in. *Treatise on Analytical Chemistry*, 2nd ed, 1.. M. Kolthoff and P. J. Elving, Eds., Part I, Vol. i, Chapter 5. New York: Wiley, pp. 282 – 289.

Mandel J. and Stiehler R. D. (1964). Sensitivity: a criterion for the comparison of methods of test, *J. Res. Natl. Bur. Std.*, A53, p. 155.

Mannervik, B. and Guthenberg, C. (1981). Glutathione transferase (Human placenta). *Methods in enzymology*. Colowick, P. S. and Kaplan, O. N. Academic Press, New York, 77, pp. 231-235.

Marshall J., Buckingham S.D., Shingai R., Lunt G.G., Goosey M.W. (1990). Sequence and functional expression of a single α subunit of an insect nicotinic acetylcholine receptor *EMBO J.*, 9, pp. 4391–4398.

Marcic D. (2007) Sublethal effects of spiroadiclofen on life history and life-table parameters of two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*). *Exp Appl Acarol*, 42, pp. 121–129

Marcic D., Ogurlic I., Mutavdzic S., Peric P. (2010) The effects of spiromesifen on life history traits and population growth of twospotted spider mite (*Acari: Tetranychidae*). *Exp Appl Acarol*, 50, pp. 255–267.

Marcic D., Mutavdzic S., Medjo I., Prijovic M., Peric P. (2011a) Field and greenhouse evaluation of spiroadiclofen against *Panonychus ulmi* and *Tetranychus urticae* (*Acari: Tetranychidae*) in Serbia. In: Moraes GJ de, Proctor H (eds) *Acarology XIII, Proceedings of the International Congress, Zoosymposia*, 6, pp. 93–98

- Marcic D., Petronijevic S., Drobnjakovic T., Prijovic M., Peric P., Milenkovic S. (2012) The effects of spirotetramat on life history traits and population growth of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Exp Appl Acarol*, 56, pp. 113–122
- Matsuda K., Buckingham S.D., Kleier D., Rauh J.J., Grauso M. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors *Trends Pharmacol. Sci.*, 22, pp. 573–578.
- Matsuda K., Buckingham S.D., Freeman J.C., Squire M.D., Baylis H.A. (1998). Effects of the α subunit on imidacloprid sensitivity of recombinant nicotinic acetylcholine receptors *Br. J. Pharmacol.*, 123, pp. 518–524.
- McKenzie J.A and Batterham P. (1998). Predicting insecticide resistance: mutagenesis, selection and response. *Phil Trans R Soc B*, **353**, pp. 1729–1734.
- McCord J.M., Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein), *J Biol Chem.*, 244(22), pp. 6049-55.
- Mesnager R., Defarge N., Spiroux de Vendômois J. and Séralini G.-E. (2014) Major Pesticides Are More Toxic to Human Cells Than Their Declared Active Principles. *BioMed Research International*, 2014, ID 179691. pp.1-8.
- Meyer V. R. (1988). *Practical High Performance Liquid Chromatography*, New York:Wiley.
- Miller J. C., George S. O., and Willis B. G., (1982) Multichannel detection in high-performance liquid chromatography, *Science*, 218, p. 241.
- Mischel R.E., Kim Y.S., Sheldon R.A., Ferriero D.M. (1997) Hydrogen peroxide is selectively toxic to immature murine neurons in vitro, *Neurosc. Lett.*, 231, pp. 17-20.
- Mokrasch L.C., Teschke E.J. (1984). Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a specific fluorometric assay. *Anal. Biochem.* 140(2), pp. 506-9.
- Moschopoulou G., Kintzios S. (2006). Application of “membrane-engineering” to bioelectric recognition cell sensors for the ultra-sensitive detection of superoxide radical: A novel biosensor principle, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 573–574, pp. 90-96.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), pp. 55-63.
- Munkres, D.K., Rana, S. R. and Goldstein, E. (1984). Genetically determined conidial longevity is positively correlated with superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, cytochrome c, peroxidase, and ascorbate free radical reductase activities in *Neurospora crassa*. *Mechanisms of Ageing and Development*. 24: 83-100.
- Murray M., and Stout A. (1947). Distinctive characteristics of the sympathetic blastoma cultivated in vitro; method for prompt diagnosis, *Amer. J. Path.* 23, pp. 429-441.

Nauen R., Ebbinghaus U., Tietjen K. (1999). Ligands of the nicotinic acetylcholine receptor as insecticides *Pestic. Sci.*, 55, pp. 608–610.

Nauen R., Ebbinghaus-Kintscher A., Elbert A., Jeschke P., Tietjen K. (2001). Acetylcholine receptors as sites for developing neonicotinoid insecticides I. Ishaaya (Ed.), *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*, Springer, New York, pp. 77–105.

Nauen R., Bretschneider T. (2002). New modes of action of insecticides *Pestic. Outlook*, 12, pp. 241–245.

Nauen R., Bretschneider T., Brück E., Elbert A., Reckmann U., Wachendorff U., Tiemann R. (2002). BSN 2060: a novel compound for whitefly and spider mite control. In: *The BCPC conference: pests and diseases*, vols 1 and 2. Proceedings of the international conference, Brighton, UK, 18–21 November, 2002. British Crop Protection Council, Farnham, UK, pp. 39–44.

Nauen R., Ebbinghaus-Kintscher U., Salgado V.L., Kausmann M. (2003). Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants *Pest. Biochem. Physiol.*, 76, pp. 55–69.

Nauen R. (2005). Spirodiclofen—mode of action and resistance risk assessment in tetranychid mite species. *J Pestic Sci*, 30, pp. 272–274.

Nauen R., Konanz S. (2005). Spiromesifen as a new chemical option for resistance management in whiteflies and spider mites. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 58, pp. 485–502.

Nauen R., Schnorbach H.J., Elbert A. (2005). The biological profile of spiromesifen (Oberon) A new tetronic acid insecticide/acaricide. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 58, pp. 417–440.

Nauen R., Reckmann U., Thomzik J., Thielert W. (2008). Biological profile of spirotetramat (Movento) a new two-way systemic (ambimobile) insecticide against sucking pest species. *Bayer CropScience Journal*, 61, pp. 245–278.

Nicolaus B., Romijn C., Bowers L. (2005). Ecotoxicological profile of the insecticide Oberon. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 58, pp. 353–370.

Novotny M. (1988). Recent Advances in Microcolumn Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, 60, p. 500A

Oberley, L. W., Sahu, S. K., and Cheng, F. H. F. (1978) Superoxide dismutase activity in normal mouse brain, prenatal brain, and neuroblastoma cells. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 19, p. 147.

Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. (1979). Assay of lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*, 82, pp. 67-78.

Okada, C.Y. and Rechsteiner, M. (1982) Introduction of macromolecules into cultured mammalian cells by osmotic lysis of pinocytotic vesicles, *Cell*, 29(1), pp. 33-41.

Otto, A. M., Brischwein M, Niendorf A, Henning T, Motrescu E, Wolf B. (2003). Microphysiological Testing for Chemosensitivity of Living Tumor Cells with Multiparametric Microsensor Chips, *Cancer Detect. Prev.*, Vol. 27, pp. 291–296.

Otto, A. M., Brischwein M, Motrescu E, Wolf B. (2004). Analysis of Drug Action on Tumor Cell Metabolism Using Electronic Sensor Chips, *Arch. Pharm. Med. Chem.*, Vol. 337, pp. 682–686.

Papp Zs., Švancara I., Guzsány V., Vytras K., Gaal F. (2009) Voltammetric Determination of Imidacloprid Insecticide in Selected Samples Using a Carbon Paste Electrode, *Microchim. Acta*, 166, p. 169.

Park Y., Kim Y., Kim J., Yoon K.S., Clark J., Lee J. (2013) Imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, potentiates adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *J Agric. Food Chem.*, 61(1), pp. 255-259.

Parris N. A. (1984). *Instrumental Liquid Chromatography*, 2nd ed. New York: Elsevier.

Parry E.P., Osteryoung R.A. (1965). Evaluation of analytical pulse polarography, *Anal. Chem.*, 37, p. 1634.

Pileblad E., Eriksson P.S., Hansson E., (1991) The presence of glutathione in primary neuronal and astroglial cultures from rat cerebral cortex and brain system, *J. Neural Transm.*, 86, pp. 43-49.

Prasad, K. N., Sahu, S. K., and Kumar, S. Relationship between cyclic AMP level of differentiation of neuroblastoma cells in culture. (1974) In: W. Nakahara, T. Ono, T. Sugimura, and H. Sugano (eds.), *Differentiation and Control of Malignancy of Tumor Cells*, Tokyo: University of Tokyo Press, pp. 287-309.

QuEChERS Method (including optional alkaline hydrolysis to release covalently bound compounds) - CRL for Single Residue Methods, (Πρόσβαση στις 10/11/2010).

Raps S.P., Lai J.C.K., Hertz L., Cooper A.J.L. (1989) Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons, *Brain Res.*, 493, pp. 398-401.

Rauch N. and Nauen R., (2002). Spirodiclofen resistance risk assessment in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): a biochemical approach. *Pest Biochem Physiol*, 74, pp. 91–101.

Raymond P.W. Scott. (1994). *Liquid chromatography for the analyst* Publisher, New York : Marcel Dekker, Description, p. 328.

Restifo L.L., White K. (1990). Molecular and genetic approaches to neurotransmitter and neuromodulator systems in *Drosophila* *Adv. Insect. Physiol.*, 22, pp. 115–219.

- Rieger F., Faivre-Bauman A., Benda P., Vigny M. (1976) Molecular forms of acetylcholinesterase: their de novo synthesis in mouse neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 5, pp. 1059-63.
- Roberts T.R., Hutson D.H. (1999). (Eds.), *Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 2, Insecticides and Fungicides* Cambridge University Press, Cambridge.
- Rose M.C., Henkens, R.W. (1974). Stability of sodium and potassium complexes of valinomycin, *BBA*, 372 (2), pp. 426–435.
- Rose L., Jenkins A.T.A. (2007). The effect of the ionophore valinomycin on biomimetic solid supported lipid DPPTE/EPC membranes, *Bioelectroche.*, 70 (2), pp. 387–393.
- Sattelle D.B., Harrow I.D., Hue B., Pelhate M., Gepner J.I. (1983). α -Bungarotoxin blocks excitatory synaptic transmission between cercal sensory neurons and giant interneurons *J. Exp. Biol.*, 107, pp. 473–489.
- Sattelle D.B., Buckingham S.D., Wafford K.A., Sherby S.M., Barkry N.M. (1989). Actions of the insecticide 2(nitromethylene)tetrahydro-1,3-thiazine on insect and vertebrate nicotinic acetylcholine receptors *Proc. Roy. Soc. B*, 237, pp. 501–514.
- Scott R. P. W. (1984). *Small Bore Liquid Chromatography Columns: Their Properties and Uses*, Ed. New York: Wiley.
- Scott P. (1986). *Liquid Chromatographic Detectors*, 2nd ed. Amsterdam: Elsevier.
- Schmidt M., Betti G., Hensel A. (2007). Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses. *Wien Med Wochenschr*, 157/13-14, pp. 315-319.
- Schröder M.E., Flattum R.F. (1984). The mode of action and neurotoxic properties of the nitromethylene heterocycle insecticides *Pestic. Biochem. Physiol.*, 22, pp. 148–160.
- Schulz R., Sawruk E., Mülhardt C., Bertrand S., Baumann A. (1998). $\text{D}\alpha 3$, a new functional α subunit of nicotinic acetylcholine receptors from *Drosophila* *J. Neurochem.*, 71, pp. 853–862.
- Senn R., Hofer D., Hoppe T., Angst M., Wyss P. (1998). CGA 293343: a novel broad-spectrum insecticide supporting sustainable agriculture worldwide *Proc. Brighton Crop Protection Conference: Pests and Diseases*, vol. 1, pp. 27–36.
- Sgard F., Fraser S.P., Katkowska M.J., (1998). M.B.A. Djamgoz, S.J. Dunbar *et al.* Cloning and functional characterization of two novel nicotinic acetylcholine receptor α subunits from the insect pest *Myzus persicae* *J. Neurochem.*, 71, pp. 903–912.

Shi L., Günther S., Hübschmann T., Wick L. Y., Harms H. and Müller S. (2007) Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria, *Cytometry Part A*, 71A (8), pp. 592–598.

Sina J.F., Ward G.J., Laszek M.A., Gautheron P.D., Assessment of Cytotoxicity assays as predictors of ocular irritation of pharmaceuticals, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, pp. 515-521.

Speranza G., Dadà G., Manitto P., Monti D., Gramatica P. (1984). 13-cis-crocine: a New Crocinoid of Saffron. *Gazz.Chim. Ital.*, 114, pp. 189-192.

Stein-Dönecke U., Führ F., Wieneke J., Hartwig J., Leicht W. (1992). Influence of soil moisture on the formulation of dressing zones and uptake of imidacloprid after seed treatment of winter wheat *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 45, pp. 327–368.

Stupp H.P., Fahl U. (2003). Environmental fate of clothianidin (TI-435; Poncho) *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 56, pp. 59–74.

Tang, S.S., Lin, C.C. and Chang, G.G. (1996). Metal-catalysed oxidation and cleavage of octopus glutathione transferase by the Cu(II)-ascorbate system. *Free Radic. Biol. Med.* 21, pp. 955-964.

Theodore C., Singh S. V., Hong T. D. Awasthi Y. C., (1985), Glutathione S- transferases of human brain. *Biochem. J.*, 225, pp.375-382.

Thiele C., McKeon C., Triche T., Ross R., Reynolds C., and Israel M. (1987). Differential proto-oncogene expression characterizes histopathologically indistinguishable tumors of the peripheral nervous system., *J Clin Invest.* 80, pp. 804-811.

Thomas H., Britton S. and Robinson R.A. (1931) CXCVIII.—Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *J. Chem. Soc.*, pp. 1456-1462.

Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27, pp. 502-522.

Tomizawa M., Casida J.E. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors *Annu. Rev. Entomol.*, 48, pp. 339–364.

Tomizawa M., Lee D.L., Casida J.E. (2000). Neonicotinoid insecticides: molecular feature conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors *J. Agric. Food Chem.*, 48, pp. 6016–6024.

Tomizawa M., Latli B., Casida J.E. (1996). Novel neonicotinoid–agarose affinity column for *Drosophila* and *Musca* nicotinic acetylcholine receptors *J. Neurochem.*, 67, pp. 1669–1676.

Tomizawa M., Yamamoto I. (1993). Structure activity relationships of neonicotinoids and imidacloprid analogs *J. Pestic. Sci.*, 18, pp. 91–98.

Tomizawa M., Yamamoto I. (1992). Binding of nicotinoids and the related compounds to the insect nicotinic acetylcholine receptor *J. Pestic. Sci.*, 17, pp. 231–236.

Tomlin, C.D.S. (2000). *The pesticide Manual*, 12th edn. British Crop Protection Council.

Tröltzsch C.M., Führ F., Wieneke J., Elbert A. (1994). Einfluss unterschiedlicher Bewässerungsverfahren auf die Aufnahme von Imidacloprid durch Baumwolle nach Saatgutbeizung *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 47, pp. 249–303.

United States Environmental Protection Agency (2005)

Διαθέσιμο:

http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-124871_11-Aug-05.pdf

Πρόσβαση στις: 12/04/2014.

Valero T., Moschopoulou G., Mayor-Lopez L., Kintzios S. (2012) Moderate superoxide production is an early promoter of mitochondrial biogenesis in differentiating N2a neuroblastoma cells, *Neurochemistry International*, 61(8), pp. 1333–1343.

van Pottelberge S, Khajehali J, van Leeuwen T, Tirry L (2009a) Effects of spiroticlofen on reproduction in a susceptible and resistant strain of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), *Exp. App. Acarol.* 47, pp. 301–309

Vestal M. L. (1984). High-performance liquid chromatography-mass spectrometry *Science*, 226, p. 275.

Vilchez J.L., Valencia M.C., Navalón A., Molinero-Morales B., Capitán-Vallvey L.F. (2001). Flow injection analysis of the insecticide imidacloprid in water samples with photochemically induced fluorescence detection, *Analytica Chimica Acta*, 439, pp. 299–305.

Wachendorff U., Brück E., Elbert A., Fischer R., Nauen R., Stumpf N. (2000). BAJ 2740: a novel broad spectrum acaricide. *Proc Brighton Crop Prot Conf – Pests and Diseases*, Vol. 2. British Crop Protection Council, Alton, Hants, UK, pp. 53–58.

Wachendorff-Neumann U. (2002). Use of 3-(2,4,6-trimethylphenyl)-4-neopentylcarbonyloxy-5,5-tetramethylene- Δ^3 -dihydrofuran-2-one for controlling the white fly. U.S. Patent 6436988.

Wang J. (1988). *Electroanalytical techniques in clinical chemistry and laboratory medicine*, VCH Publishing Inc., USA.

Wang J. (2006). *Analytical Electrochemistry*, 3rd ed.; Wiley-VCH: Hoboken, New Jersey, USA.

Wang P, Henning SM, Heber D (2010) Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. *PLoS ONE*, 5(4), e10202.

Waring M.J. (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids, *J Mol Biol* 13, p. 269.

Wendel, A. (1980). *Enzymatic Basis of Detoxication*, Academic Press NY, 1, p. 333.

Whittemore E.R., Loo D.T., Watt J.A., Cotman C.W. (1995) A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal cultures, *Neuroscience*, 67, pp. 921-932.

Willoughby R. C. and Browner R. F. (1984). Monodisperse aerosol generation interface for combining liquid chromatography with mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 56, p. 2626.

Widmer H., Steinemann A., Maienfisch P. (1999). Chemical and physical properties of thiamethoxam (CGA 293343) Abstracts 218th Am. Chem. Sci. Natl Mtg, p. 134.

Wu Y. C., Wang P., Ye X., Zhang Q., Li R., Yan W., Zheng X. (2001). A Novel Microphysiometer Based MLAPS for Drug Screening, *Biosen.Bioelectron.*, Vol. 16, pp. 277–286.

http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report10/Chlothianidin.pdf.

Yamada T., Takahashi H., Hatano R. (1999). A novel insecticide, acetamiprid I. Yamamoto, J.E. Casida (Eds.), *Neonicotinoid Insecticides and Nicotinic Acetylcholine Receptor*, Springer, New York, pp. 149–175.

Yamamoto I., Tomizawa M., Saito T., Miyamoto T., Walcott E.C. (1998). Structural factors contributing to insecticidal and selective actions of neonicotinoids *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 37, pp. 24–32.

Yáñez K. P., Bernal J.L., Nozal M.J., Martín M.T., Bernal J. (2013). Determination of seven neonicotinoid insecticides in beeswax by liquid chromatography coupled to electrospray-mass spectrometry using a fused-core column, *Journal of Chromatography A*, 1285, pp. 110-117.

Yavuz Kocaman A., Rencüzoğulları E., Topaktaş M. (2014) In Vitro Investigation of the Genotoxic and Cytotoxic Effects of Thiacloprid in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes, *Environ. Toxicol.*, 29 (6), pp.1522-7278.

Yergey A. L., Edmonds C. G., Lewis I. A. S., and Vestal M. L. (1990) *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Techniques and Applications*. New York: Plenum Press.

Yeung E. S. and Sepaniak M. J. (1980). Laser Fluorometric Detection in Liquid Chromatography", *Anal. Chem.*, 52, 1465A.

Yeung E. S. and Synovec R. E. (1986). Detectors for Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, 58, 1237A.

Young, J., Ries, L., and Silverberg, E. Cancer incidence, survival and mortality for children younger than 15 years, *Cancer*. 58: 598, 1986.

Yu, H., Cai H., Zhang W., Xiao L., Liu Q., Wang P. (2009). A Novel Design of Multifunctional Integrated Cell-Based Biosensors for Simultaneously Detecting Cell Acidification and Extracellular Potential, *Biosen. Bioelectron.*, Vol. 24, pp. 1462–1468.

Zhang, Q. T., Wang P., Wolfgang J.P., Michael G., Gaoyan Z. (2001). A Novel Design of Multi-Light LAPS Based on Digital Compensation of Frequency Domain, *Sens. Actuators B: Chem.*, Vol. 73, pp. 152–156.

Zhu Y., Liu X., Xu J., Dong F., Liang X., Li M., Duan L., Zheng Y. (2013) Simultaneous determination of spirotrienolol and its four metabolites in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. of Chromatogr. A*, 1299, pp. 71-77.

Zwart R., Oortgiesen M., Vijverberg H.P. (1992). The nitromethylene heterocycle 1-(pyridin-3-yl-methyl)-2-nitromethylene-imidazolidine distinguishes mammalian from insect nicotinic receptor subtypes *Eur. J. Pharmacol.*, 228, pp. 165–169.

Παράρτημα

Πίνακας Ι. Χημικές ομάδες, ιόντα ποσοτικοποίησης, ιόντα επιβεβαίωσης και χρόνοι κατακράτησης των υπό μελέτη εντομοκτόνων σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών.

Εντομοκτόνο	Χημική Ομάδα	Συγκέντρωση Δραστικής Ουσίας (%)	Ιόν Ποσοτικοποίησης	Ιόν Επιβεβαίωσης	Χρόνος Κατακράτησης (RT)
Acetamiprid	Νεονικοτινοειδές	99.9	223	126	16
Clothianidin	Νεονικοτινοειδές	99.4	250	169	15.1
Carbofuran	Καρβαμιδικό	99.9	222.1	123	15.8
Imidacloprid	Νεονικοτινοειδές	98.7	256	209	14.9
Thiacloprid	Νεονικοτινοειδές	99	253	126	17.1
Thiamethoxam	Νεονικοτινοειδές	99.7	292	211	13.1
Spirodiclofen	Αμίδιο του Τετρονικού Οξέος	99.2	313	313	21.7
Spiromesifen	Αμίδιο του Τετρονικού Οξέος	99.9	273	255	32.5
Spirotetramat	Αμίδιο του Τετραμικού Οξέος	99.2	374	244	23.3

Πίνακας ΙΙ. Συγκεντρωτικά ποσοστά μεταβολής νευρώνων κυττάρων N2a+/- db-cAMP ως προς το μάρτυρα 24 και 48 ώρες μετά την επίδραση των εντομοκτόνων στις 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (3, 10, 30 και 100 μM).

% μεταβολή νευρώνων σε N2a +db cAMP				
T(h)	3 μM	10 μM	30 μM	100 μM
24	73.5-109.6	57.2-108	25.5- 52.5	17-39.3
48	67.1-103.8	25.5-76.4	23-74.7	16.8-58.5

% μεταβολή νευρώνων σε N2a				
T(h)	3 μM	10 μM	30 μM	100 μM
24	57.9-97	53.1-81	48.8-66.2	33.1-59
48	57.4-92.2	40.8-77.6	34.1-75.5	25.4-61.6