



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Επίδραση της διατροφής υψηλής περιεκτικότητας σε ζάχαρη και της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου στην κινητικότητα, τον μεταβολικό ρυθμό και στην αντοχή στο κρύο στη *Drosophila melanogaster*”

Ζωή Μαλάμη

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Σωτήριος Ζαρογιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Επιβλέπων
- Χρυσή Χατζόγλου, Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας
- Δημήτριος Μπόγδανος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής

Λάρισα, Οκτώβριος 2023



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**“Effects of high-sugar diet and cigarette smoke exposure on mobility,
metabolic rate and cold tolerance in *Drosophila melanogaster*”**

By

Zoi Malami

Tripartite thesis committee:

- Sotirios Zarogiannis, Associate Professor of Physiology, Supervisor
- Chrissi Hatzoglou, Professor of Medical Physiology
- Dimitrios Bogdanos, Professor of Internal Medicine and Autoimmune Diseases

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Clinical Applications of Molecular Medicine.

Larissa, October 2023

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	4
Περίληψη.....	5
Abstract	6
1 Εισαγωγή.....	8
1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης.....	8
1.1.1 Διαβήτης τύπου 2	9
1.1.2 Παθοφυσιολογία διαβήτη τύπου 2	10
1.1.3 Παράγοντες κινδύνου διαβήτη τύπου 2.....	13
1.1.4 Παχυσαρκία ως παράγοντας κινδύνου του διαβήτη τύπου 2	14
1.2 Καπνός τσιγάρου.....	15
1.2.1 Επιπτώσεις του καπνού τσιγάρου σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2.....	15
1.3 <i>Drosophila Melanogaster</i> ως πειραματικό μοντέλο.....	16
1.4 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας.....	19
2 Υλικό και Μέθοδοι	21
2.1 Διατήρηση καλλιέργειας <i>Drosophila Melanogaster</i>	21
2.2 Παρασκευή θρεπτικού υλικού	21
2.3 Έκθεση των <i>D. Melanogaster</i> σε καπνό τσιγάρου (CS).....	22
2.4 Πειραματικός σχεδιασμός	23
2.5 Δοκιμασία Αρνητικής Γεώταξης.....	24
2.6 Μέτρηση του μεταβολικού ρυθμού	25
2.7 Δοκιμασία αντοχής στο κρύο	27
2.8 Αξιοποίηση του μοντέλου τεχνητής νοημοσύνης DeepLabCut.....	29
2.9 Στατιστική ανάλυση	31
3 Αποτελέσματα	32
3.1 Αποτελέσματα αρνητικής γεώταξης	32
3.2 Αποτελέσματα μεταβολών του μεταβολικού ρυθμού	33
3.3 Αποτελέσματα δοκιμασίας αντοχής στο κρύο.....	35
3.4 Αποτελέσματα μοντέλου DeepLabCut.....	36
4 Συζήτηση	38
5 Βιβλιογραφία.....	44
6 Βιογραφικό Σημείωμα	47

Ευχαριστίες

Στο πλαίσιο του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας την χρονική περίοδο 2022-2023, με επιβλέπων τον κ. Σωτήριο Ζαρογιάννη, Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας αισθάνομαι την ανάγκη και την υποχρέωση να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κ. Ζαρογιάννη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή και την υποστήριξη του κατά τη διάρκεια του ΠΜΣ η οποία ήταν καθοριστική για την επιστημονική και προσωπική μου πρόοδο. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη κα. Χρυσή Χατζόγλου, Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, η οποία διατελούσε Διευθύντρια του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας την περίοδο εισαγωγής μου στο ΠΜΣ, και η οποία με δέχθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την εκπαίδευση και προθυμία να με βοηθήσουν κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Ιδιαίτερα, χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Περικλή Μαρνά, υποψήφιο Διδάκτορα του Τμήματος Ιατρικής, για την άριστη συνεργασία που είχαμε κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε στην καθοδήγηση και υλοποίηση των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και ειδικότερα τους γονείς μου οι οποίοι υπήρξαν ανεκτίμητο στήριγμα για μένα και στους οποίους οφείλω τη διαδρομή των σπουδών μου μέχρι και σήμερα.

Περίληψη

Η πρόσληψη τροφής που συμπεριλαμβάνει μεγάλη ποσότητα ζάχαρης σχετίζεται με αυξημένη εμφάνιση διαταραχών του μεταβολισμού που μπορεί να οδηγήσουν σε παχυσαρκία και Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία και ανεπάρκεια ινσουλίνης και αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες μεταβολικές διαταραχές παγκοσμίως. Ταυτόχρονα, η έκθεση σε καπνό τσιγάρου αποτελεί παράγοντα κινδύνου, καθώς μπορεί να ενισχύσει, ακόμα και να προκαλέσει την εμφάνιση του. Ομοιότητες του αναπνευστικού συστήματος και των μεταβολικών διεργασιών μεταξύ της *Drosophila Melanogaster*, ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου οργανισμού-μοντέλου, και του ανθρώπου, υποδεικνύουν την καταλληλότητα του στη διερεύνηση της επίδρασης του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 και της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, στελέχη Oregon-R *Drosophila Melanogaster* ανατράφηκαν για διάστημα δέκα ημερών σε δύο τύπους διαίτας, μια φυσιολογική (Normal Diet; ND) και μια με υψηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη (High Sugar Diet; HSD), και μισές από αυτές εκτέθηκαν σε καπνό τσιγάρου (Cigarette Smoke; CS) μέσω εισπνοής. Στόχος ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης του τύπου διαίτας και του καπνού τσιγάρου στις μύγες με παρακολούθηση της κινητικότητας, του μεταβολικού ρυθμού και της αντοχής τους στο κρύο. Η κινητικότητα εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία αρνητικής γεώταξης και με αξιοποίηση ενός καινοτόμου εργαλείου τεχνητής νοημοσύνης, του DeepLabCut. Για τον μεταβολικό ρυθμό υπολογίστηκε το παραγόμενο CO₂ ενώ για την αντοχή στο κρύο οι μύγες τοποθετήθηκαν σε πάγο και στη συνέχεια καταμετρήθηκαν όσες ξυπνούσαν.

Η κινητικότητα (σε % ποσοστό των μυγών που αναρριχήθηκαν 10cm σε 10s) μειώθηκε σημαντικά σε αρσενικές και θηλυκές μύγες που εκτέθηκαν σε ND-CS σε σχέση με τις ND και σε θηλυκές HSD-CS σε σχέση με HSD. Η παραγωγή CO₂ (σε ml/ώρα/μύγα) αυξήθηκε σημαντικά στις αρσενικές ND-CS σε σύγκριση με τις ND, ωστόσο δεν σημειώθηκε διαφορά στις θηλυκές. Μόνο οι θηλυκές παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των καμπυλών επιβίωσης, με τις θηλυκές HSD και HSD-CS να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αντοχή στο κρύο. Τέλος, η εφαρμογή του μοντέλου DeepLabCut για την υπολογιστική ανάλυση της κινητικότητας των μυγών ήταν αναποτελεσματική.

Συμπερασματικά, ο τύπος της διαίτας φαίνεται να μην συνέβαλλε στην κινητικότητα και στον μεταβολικό ρυθμό των μυγών όσο ο καπνός του τσιγάρου. Ωστόσο, η υψηλή περιεκτικότητα στη ζάχαρη ενίσχυσε την αντοχή στο κρύο ιδιαίτερα των θηλυκών μυγών.

Abstract

The intake of food that includes a large amount of sugar is associated with an increased incidence of metabolic disorders that can lead to obesity and Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). T2DM is characterised by hyperglycaemia and insulin deficiency and is one of the most prevalent metabolic disorders worldwide. At the same time, exposure to cigarette smoke constitutes a risk factor, as it can amplify and even trigger its onset. Similarities of the respiratory system and metabolic processes between *Drosophila Melanogaster*, a widely used model organism, and humans suggest its suitability in investigating the effect of T2DM and cigarette smoke exposure, either when studied separately or in combination.

In this thesis, Oregon-R *Drosophila Melanogaster* strains were reared for ten days on two types of diets, a normal diet (ND) and a high sugar diet (HSD), and half of them were exposed to cigarette smoke (CS) by inhalation. The aim was to evaluate the effect of diet type and cigarette smoke on the flies by monitoring their locomotion, metabolic rate and cold stress tolerance. Locomotion was assessed by the negative geotaxis assay and by utilizing an innovative artificial intelligence tool, DeepLabCut. For metabolic rate, the CO₂ produced was measured, while for cold tolerance, chill coma recovery was assessed.

Locomotor activity (% of flies climbing 10cm in 10s) was significantly reduced in male and female flies exposed to ND-CS compared to ND and in female HSD-CS compared to HSD. CO₂ production (in µl/hour/fly) was significantly increased in male ND-CS compared to ND, however no difference was noted in females. Only females showed a statistically significant difference between survival curves, with HSD and HSD-CS females showing the highest cold tolerance. Finally, the application of the DeepLabCut model for the computational analysis of fly locomotor activity was ineffective.

In conclusion, diet type did not appear to contribute to fly locomotion and metabolic rate as much as cigarette smoke did. However, the high sugar content enhanced the cold tolerance of female flies.

Γενικό Μέρος

1 Εισαγωγή

1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια χρόνια μεταβολική νόσος η οποία χαρακτηρίζεται από ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα που επιμένουν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, μια κατάσταση που είναι γνωστή ως υπεργλυκαιμία. Αυτή προκαλείται συνήθως είτε από ανεπαρκή παραγωγή ινσουλίνης από το πάγκρεας, μιας ορμόνης η οποία είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση της γλυκόζης στο αίμα, είτε από αδυναμία σωστής διαχείρισης της παραγόμενης ινσουλίνης από τον οργανισμό [1]. Η ασθένεια εμφανίζει πολλούς ετερογενείς τύπους, ωστόσο έχουν διακριθεί τέσσερις κύριες κατηγορίες διαβήτη:

1. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1: είναι μια αυτοάνοση διαταραχή που προκαλεί ανεπάρκεια ινσουλίνης. Οφείλεται κυρίως σε T-λεμφοκύτταρα τα οποία στοχεύουν και καταστρέφουν τα β- κύτταρα του παγκρέατος που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της ινσουλίνης [2].
2. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2: οφείλεται σε σταδιακή μείωση της εκκρινόμενης ινσουλίνης, η ποσότητα της οποίας είναι ανεπαρκής για να αντισταθμίσει την αντίσταση στην ινσουλίνη. Στο παρελθόν, το καθιερωμένο μοντέλο διάκρισης μεταξύ του διαβήτη τύπου 1 και διαβήτη τύπου 2 σχετιζόταν με την ηλικία, με τον διαβήτη τύπου 1 να συνδέεται μόνο με τα παιδιά και τον τύπο 2 μόνο με τους ενήλικους. Σύμφωνα με σύγχρονα δεδομένα, πράγματι τα ποσοστά διάγνωσης διαβήτη τύπου 1 σε παιδιά είναι υψηλότερα, όμως, και οι δύο τύποι εμφανίζονται και στις δύο ηλικιακές ομάδες [3].
3. Σακχαρώδης Διαβήτης κύησης: εμφανίζεται κυρίως σε γυναίκες οι οποίες βρίσκονται στο δεύτερο ή τρίτο τρίμηνο της κύησης και οι οποίες δεν είχαν ιστορικό διαβήτη πριν την εγκυμοσύνη.
4. Ειδικές μορφές της ασθένειας που οφείλονται σε άλλες αιτίες όπως γενετικούς παράγοντες, ασθένειες του παγκρέατος και θεραπεία με συγκεκριμένα φάρμακα ή χημικές ουσίες, όπως τα γλυκοκορτικοειδή, μια ομάδα φαρμάκων που χορηγούνται συνήθως μετά από μεταμόσχευση οργάνου ή σε άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS) [3].

Η ταξινόμηση είναι απαραίτητη για τη σωστή διάγνωση, προκειμένου να σχεδιαστεί η κατάλληλη μέθοδος θεραπείας. Ωστόσο, στην περίπτωση των δύο πρώτων τύπων διαβήτη είναι συχνά δύσκολο να γίνει ξεκάθαρη διάκριση κατά τη διάγνωση. Σαφέστερη διάγνωση είναι εφικτή μεταγενέστερα, συχνά με βάση την ανεπάρκεια των β-παγκρεατικών κυττάρων [3].

Ο διαβήτης τύπου 1 είναι λιγότερο διαδεδομένος από τον διαβήτη τύπου 2 και συνήθως η διάγνωση γίνεται όταν ο ασθενής έχει ξεπεράσει τα 50 έτη. Ήδη, πριν τα πρώτα συμπτώματα, περίπου το 90% των β-κυττάρων έχουν καταστραφεί. Στις κυριότερες αιτίες πρόκλησης της ασθένειας συγκαταλέγονται τα αυτοαντισώματα, γενετικοί παράγοντες, διατροφικές συνήθειες, το μικροβίωμα του εντέρου και επιγενετικοί παράγοντες. Περίπου το 90% των ασθενών εμφανίζει συμπτώματα και τα κυριότερα από αυτά είναι πολυδιψία, πολουρία και απώλεια βάρους, τα οποία όλα σχετίζονται και με την υπεργλυκαιμία. Μια από τις σημαντικότερες επιπλοκές είναι η κετοξέωση, η παραγωγή, δηλαδή, παραπροϊόντων κετονών μέσω αυξημένης λιπόλυσης τα οποία δρουν ως υποκατάστατα της γλυκόζης. Η κετοξέωση μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρότερες επιπλοκές όπως οργανική ανεπάρκεια, κώμα μέχρι και θάνατο. Εκτός από βραχυχρόνιες παρενέργειες, ο διαβήτης τύπου 1 μπορεί να αποτελέσει παράγοντα κινδύνου και για χρόνιες ασθένειες, οι οποίες συχνά διακρίνονται σε μικροαγγειακές, όπως νεφροπάθεια, νευροπάθεια, αμφιβληστροειδοπάθεια και μακροαγγειακές, όπως αγγειακές, καρδιαγγειακές και εγκεφαλονωτιαίες νόσους [2].

1.1.1 Διαβήτης τύπου 2

Αποτελεί τη συνηθέστερη μορφή διαβήτη, καθώς από τα 537 εκατομμύρια περιστατικά παγκοσμίως, 90-95% έχουν διαγνωστεί με διαβήτη τύπου 2 [4]. Οι ασθενείς παρουσιάζουν σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης, η οποία σταδιακά μπορεί να χειροτερεύσει, οδηγώντας σε απόλυτη ανεπάρκεια. Επίσης, χαρακτηριστικό γνώρισμα της ασθένειας είναι η περιφερειακή αντίσταση στην ινσουλίνη, η οποία προηγείται του κύριου κλινικού συμπτώματος της ασθένειας, δηλαδή της υπεργλυκαιμίας, και την οποία ο οργανισμός δεν μπορεί να αντισταθμίσει με την ποσότητα ινσουλίνης που εκκρίνει.

Σε αντίθεση με τον διαβήτη τύπου 1, δεν υπάρχουν ευρήματα που να συνδέουν την εμπλοκή αυτοαντισωμάτων στην καταστροφή των β-παγκρεατικών κυττάρων. Έχει, όμως, βρεθεί ότι ο τρόπος ζωής παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και πρόοδο της ασθένειας. Η πλειονότητα των ανθρώπων που έχουν διαβήτη τύπου 2 είναι ταυτόχρονα υπέρβαροι ή παχύσαρκοι, ενώ πολλές περιπτώσεις ασθενών που δεν κατατάσσονται στις δύο προηγούμενες κατηγορίες, μπορεί να έχουν αυξημένο ποσοστό σωματικού λίπους καταναμημένο στην περιοχή της κοιλιάς [3].

Πριν από τη διάγνωση υπάρχει συχνά μια μακρά ασυμπτωματική περίοδος, η οποία καθιστά δύσκολη την έγκαιρη αντιμετώπισή του. Ωστόσο, στο διάστημα αυτό αναπτύσσεται προοδευτικά υπεργλυκαιμία. Ο έλεγχος γίνεται με ανάλυση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο

πλάσμα (HbA_{1c}) και συνιστάται κυρίως σε άτομα που ανήκουν σε ομάδες υψηλού κινδύνου [4]. Όσο αναφορά τις μεθόδους θεραπείας, η εντατική διαίτα, η άσκηση, η χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής για τον περιορισμό της υπεργλυκαιμίας ή η χειρουργική απώλεια βάρους λειτουργούν αποτελεσματικά.

Στον διαβήτη τύπου 2 μπορεί να προκύψουν οι ίδιες μικροαγγειακές επιπλοκές που προκαλεί και ο διαβήτης τύπου 1 [5]. Μακροαγγειακά, μπορεί να αποτελέσει αιτία πρόκλησης στεφανιαίας νόσου, μυοκαρδιοπάθειας, αρρυθμιών, εγκεφαλοαγγειακής νόσου, μέχρι και αιφνίδιου θανάτου. Σύμφωνα με μελέτες, οι καρδιαγγειακές νόσοι αποτελούν μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου στους διαβητικούς. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να εξηγείται και από το γεγονός ότι η υπεργλυκαιμία, η δυσλιπιδαιμία και η αντίσταση στην ινσουλίνη μπορεί να συμβάλλουν στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης, του βασικού παθολογικού μηχανισμού εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων [6].

1.1.2 Παθοφυσιολογία διαβήτη τύπου 2

Στην ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 2 εμπλέκονται πολύπλοκοι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που επηρεάζουν πολλά όργανα του σώματος. Οι περισσότεροι από αυτούς σχετίζονται με την έκκριση και δράση της ινσουλίνης, οι οποίες πρέπει να είναι απόλυτα εναρμονισμένες με τις εκάστοτε μεταβολικές ανάγκες του οργανισμού.

Για τη σύνθεση και έκκριση της ινσουλίνης είναι υπεύθυνη η ενδοκρινής μοίρα του παγκρέατος. Πιο συγκεκριμένα, οι λειτουργικές μονάδες της ενδοκρινούς μοίρας είναι τα νησίδια του Langerhans που κατανέμονται σε όλα τα τμήματα του παγκρέατος, αντιπροσωπεύοντας το 1-1,5% της ολικής παγκρεατικής μάζας. Αποτελούνται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων, καθένας από τους οποίους είναι εξειδικευμένος στη σύνθεση συγκεκριμένης ορμόνης. Ο κυρίαρχος τύπος, που στον άνθρωπο συνιστά περίπου το 54% των νησιδίων, είναι τα β-κύτταρα, τα οποία παράγουν την ινσουλίνη, και ακολουθούν τα α-κύτταρα από τα οποία παράγεται και εκκρίνεται γλυκαγόνη. Ινσουλίνη και γλυκαγόνη συμβάλλουν ενεργά στη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης, αλλά έχουν μεταξύ τους ανταγωνιστική δράση. Η πρώτη αποσκοπεί στην μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα μέσω της απορρόφησής της από τα κύτταρα ενώ η δεύτερη στέλνει το κατάλληλο σήμα για απελευθέρωση της γλυκόζης όταν τα επίπεδα πέφτουν κάτω από το φυσιολογικό [7].

Σε πρώτο στάδιο συντίθεται στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ) ένα ανενεργό πρόδρομο μόριο της ινσουλίνης, η προπροϊνσουλίνη. Εξειδικευμένα ένζυμα μετατρέπουν την

προπροϊνσουλίνη σε προϊνσουλίνη, η οποία στη συνέχεια μεταφέρεται στο συμπλέγμα Golgi και αποθηκεύεται σε ανώριμα εκκριτικά κυστίδια. Με την ωρίμανση των κυστιδίων η προϊνσουλίνη διασπάται σε ινσουλίνη και C-πεπτίδιο. Η ινσουλίνη παραμένει μέσα στα κυστίδια έως ότου το κύτταρο αντιληφθεί αύξηση στη συγκέντρωση της γλυκόζης ($> 5\text{mM}$) στην κυκλοφορία του αίματος. Τα μόρια της γλυκόζης αναγνωρίζονται από τους διαμεμβρανικούς μεταφορείς γλυκόζης, στον άνθρωπο GLUT1 και GLUT3, μέσω των οποίων εισέρχονται στα β -κύτταρα όπου και ξεκινάει ο μεταβολισμός τους [8]. Ο μεταβολισμός της γλυκόζης πραγματοποιείται από βιοχημικές διαδικασίες, όπως τη γλυκόλυση και τον κύκλο του Krebs, οι οποίες παράγουν μεγάλα ποσά τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Η αύξηση σε ATP ενδοκυτταρικά, προκαλεί στη συνέχεια αύξηση και στον ρυθμό ATP/ADP, με αποτέλεσμα το κλείσιμο των διαύλων καλίου εξαρτώμενων από ATP και εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτή η διαφορά στο δυναμικό της μεμβράνης πυροδοτεί το άνοιγμα τασοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου από τους οποίους εισρέει τεράστιος αριθμός κατιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) [9]. Η ραγδαία αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου εξωθεί τα κυστίδια ινσουλίνης να προσδεθούν στην πλασματική μεμβράνη και στην εξωκυττάρωση των μορίων ινσουλίνης που εμπεριέχουν. Τα επίπεδα Ca^{2+} ενδοκυτταρικά είναι ζωτικής σημασίας για την έκκριση ινσουλίνης, συνεπώς σήματα, εκτός από τη γλυκόζη, που τα ενισχύουν, την ωφελούν. Τέτοια σήματα είναι τα ίδια τα Ca^{2+} τα οποία μπορούν να προκαλέσουν επαγόμενη από Ca^{2+} απελευθέρωση Ca^{2+} (CICR) μέσω των υποδοχέων ρυανοδίνης (RYR), η μονοφωσφορική κυκλική αδενοσίνη (cAMP) και η εξωκυττάρια ATP, η οποία δεσμεύεται από τους πουρινοϋποδοχείς (PYX). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι και η ίδια η ινσουλίνη μπορεί να ενισχύσει την έκκρισή της, ενεργοποιώντας την μεταγραφή του γονιδίου της [10]. Σήματα για την έκκριση ινσουλίνης μπορούν να διεγείρουν και οι ινκρετίνες, ειδικές ορμόνες που παράγονται από το γαστρεντερικό σωλήνα, οι οποίες ενεργοποιούνται κυρίως μεταγευματικά.

Μετά την απελευθέρωση της, η ινσουλίνη διαβιβάζεται στον οργανισμό μέσω της κυκλοφορίας του αίματος με σκοπό την ρύθμιση μεταβολικών διαδικασιών και την ισορροπία των θρεπτικών συστατικών. Αφού προσδεθεί στους υποδοχείς ινσουλίνης των κυττάρων-στόχων, επιφέρει τη δράση της κυρίως μέσω δύο σηματοδοτικών μονοπατιών: το μονοπάτι PI3K/Akt, που οδηγεί σε αναστολή της σύνθεσης γλυκογόνου και λιπαρών οξέων, διέγερση της πρωτεϊνικής σύνθεσης, αναστολή προαποπτωτικών μονοπατιών, ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με τη σύνθεση χοληστερόλης και λιπαρών οξέων και μετατόπιση του μεταφορέα GLUT4 στην κυτταρική μεμβράνη, ευνοώντας την ευαίσθητη σε ινσουλίνη απορρόφηση γλυκόζης, και το μονοπάτι Ras-Raf-MEK-ERK, που προάγει την κυτταρική διαίρεση, τη σύνθεση πρωτεϊνών και την κυτταρική αύξηση [8].

Οι περισσότεροι τύποι σωματικών κυττάρων εκφράζουν τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς ινσουλίνης. Σημαντικότεροι στόχοι είναι τα κύτταρα του ήπατος, των σκελετικών μυών και του λιπώδους ιστού. Στο ήπαρ, μετατρέπει την περίσσεια γλυκόζης σε γλυκογόνο (γλυκογονογένεση) και λιπαρά οξέα, αυξάνοντας την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων. Ο ρόλος της στους σκελετικούς μύες αποσκοπεί στη χρήση και αποθήκευση γλυκόζης, καθώς έχουν αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις και χρησιμοποιούν περίπου το 70% της ολικής γλυκόζης. Στο λιπώδη ιστό, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την αποθήκευση ενέργειας κυρίως σε μορφή λιπιδίων, καταστέλλει τη λιπόλυση και αυξάνει τη λιπογένεση και την μεταφορά της γλυκόζης. Η δράση της επεκτείνεται και σε άλλα όργανα, όπως το ενδοθήλιο, τον εγκέφαλο, τους νεφρούς, τα οστά και το δέρμα [8].

Όταν διαταράσσεται η ικανότητα απόκρισης των κυττάρων του σώματος στα φυσιολογικά επίπεδα συγκέντρωσης ινσουλίνης, με συνέπεια την αναστολή της αποτελεσματικής απορρόφησης της γλυκόζης από τον οργανισμό, προκαλείται αντίσταση στην ινσουλίνη. Αυτή η χαμηλή ευαισθησία σε ινσουλίνη οφείλεται σε μεταβολές πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την κυτταρική σηματοδότηση της ινσουλίνης και στη συσσώρευση λιπιδίων σε μη λιπιδικούς ιστούς, όπως στο ήπαρ και τους σκελετικούς μύες, χαρακτηριστικής των ατόμων με παχυσαρκία. Επίσης, ευρήματα δείχνουν ότι συνθήκες στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου (ΕΔ), οξειδωτικού στρες και συστηματικής χρόνιας φλεγμονώδους απόκρισης επιδεινώνουν έμμεσα την αντίσταση στην ινσουλίνη, περιορίζοντας τη σηματοδότησή της. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, τα παγκρεατικά β-κύτταρα εξαναγκάζονται να συνθέσουν και να εκκρίνουν μεγαλύτερα ποσά ινσουλίνης για να διατηρηθεί η μεταβολική ισορροπία. Παρατεταμένη υπερδιέγερση των β-κυττάρων οδηγεί στην εξάντληση και δυσλειτουργία τους με αποτέλεσμα την ελαττωματική έκκριση ινσουλίνης [11].

Στον άνθρωπο, η μάζα των β-κυττάρων είναι καθορισμένη από τις πρώτες δεκαετίες της ζωής του, και αποτελεί σπάνιο φαινόμενο η δημιουργία νέων μετά την ενηλικίωση. Σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, κατά τη διάγνωση το μεγαλύτερο ποσοστό των β-κυττάρων έχει ήδη χάσει τη λειτουργικότητά του και ο όγκος τους μπορεί να εμφανίζει έως και 40% μείωση. Σε σύγκριση με δείγματα από παγκρεατικά νησίδια Lagerhans μη διαβητικών ατόμων, σημειώνεται αυξημένη κυτταρική απόπτωση και εναπόθεση παγκρεατικής αμυλίνης, δηλαδή συσσώρευσης και δημιουργίας αμυλοειδών εναποθέσεων στα νησίδια. Αυτά τα συσσωματώματα αμυλοειδών πολυπεπτιδίων (IAPP), όπως και η λιποτοξικότητα και η υπεργλυκαιμία, προκαλούν στρες στο ΕΔ, το οποίο διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην χειροτέρευση της υγείας και στην απόπτωση των

β-κυττάρων. Επίσης, παρατηρείται συχνά κυτταρική αποδιαφοροποίηση ή και επαναπρογραμματισμός τους σε α-παγκρεατικά κύτταρα καθώς και επιταχυνόμενη γήρανση τους. Σε γενετικό επίπεδο, έχουν ταυτοποιηθεί συγκεκριμένα γονίδια και ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος που σχετίζονται με επιβλαβείς επιδράσεις στη λειτουργία των β-κυττάρων [12].

1.1.3 Παράγοντες κινδύνου διαβήτη τύπου 2

Ο κίνδυνος εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 επηρεάζεται από μεγάλο φάσμα παραγόντων, οι οποίοι θα μπορούσαν να διακριθούν σε μεταβλητούς και μη μεταβλητούς. Στην πρώτη κατηγορία συγκαταλέγονται παράγοντες όπως η ηλικία, η εθνικότητα, η γενετική προδιάθεση και το ιστορικό της οικογένειας, δηλαδή παράγοντες που δεν εμπίπτουν στην άμεση επιρροή του ατόμου και δεν μπορούν να βελτιωθούν μέσω συνειδητών επιλογών. Συγκεκριμένες φυλετικές ομάδες όπως Αφροαμερικανοί, ιθαγενείς Αμερικανοί, Λατινοαμερικάνοι και Ασιάτες παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης διαβήτη τύπου 2, σε σχέση με τους λευκούς. Επίσης άτομα με συγγενείς πρώτου βαθμού που έχουν εκδηλώσει διαβήτη τύπου 2 είναι και αυτοί επιρρεπής στην ασθένεια [10].

Όσο αναφορά τους μη μεταβλητούς παράγοντες κινδύνου εμφάνισης του διαβήτη τύπου 2, οι περισσότεροι σχετίζονται με το περιβάλλον και τη στάση ζωής των ατόμων. Μεγάλης βαρύτητας είναι ο τύπος διατροφής, καθώς η συχνή κατανάλωση κρέατος, τροφών πλούσιων σε λιπαρά και υδατάνθρακες, γαλακτοκομικών προϊόντων που δεν έχουν υποστεί ζύμωση, εξευγενισμένων υδατανθρακών και ζαχαρούχων ποτών αποτελούν παράγοντες υψηλού κινδύνου. Σε αντίθεση, η υιοθέτηση μιας διατροφής αντίστοιχης της μεσογειακής έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τον ρίσκο εμφάνισης, ανεξάρτητα από τις ευεργετικές επιπτώσεις που μπορεί να έχει επιπλέον στη μείωση του βάρους. Σημαντικό ρόλο παίζει και η έλλειψη σωματικής άσκησης, καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι οποιοδήποτε είδος φυσικής δραστηριότητας μπορεί να μειώσει μέχρι και 30% το ρίσκο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 και βελτιώνει τόσο την ικανότητα απόκρισης των κυττάρων στην ινσουλίνη όσο και τη ρύθμιση της γλυκόζης. Αντίθετα, η καθιστική ζωή και η διαρκής ακινησία που αυτή συνεπάγεται μπορεί μέχρι και να διπλασιάσει τον κίνδυνο. Το περιβάλλον διαβίωσης και η ποιότητα ζωής αποτελούν επίσης σημαντικούς παράγοντες. Ειδικότερα, ζώντας μέσα στον αστικό ιστό, το άτομο εκτίθεται σε τοξικά αιωρούμενα σωματίδια και έντονο θόρυβο, ο οποίος μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο μέχρι και 20-40%. Επιπλέον, έχει βρεθεί συσχέτιση με την εμφάνιση διαβήτη τύπου 2 και με τη διάρκεια-ποιότητα του ύπνου. Άλλοι αξιοσημείωτοι παράγοντες κινδύνου είναι το κάπνισμα, η κατάθλιψη και το χρόνιο άγχος, η κοινωνικοοικονομική κατάσταση όπου στις χαμηλές κοινωνικές τάξεις ο κίνδυνος είναι μέχρι και 40-60% μεγαλύτερος,

ορισμένες μολυσματικές ασθένειες όπως η ηπατίτιδα C η οποία προάγει αντίσταση στην ινσουλίνη και λοίμωξη από το βακτήριο *Chlamydia Pneumoniae*, που οδηγεί λόγω χρόνιας φλεγμονής σε δυσλειτουργία των β-κυττάρων. Στις γυναίκες πρέπει να ληφθεί υπόψη και η εμφάνιση διαβήτη της κύησης και το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών [13].

1.1.4 Παχυσαρκία ως παράγοντας κινδύνου του διαβήτη τύπου 2

Παχυσαρκία και διαβήτη τύπου 2 αποτελούν παθήσεις που συχνά συνυπάρχουν και έχουν τη τάση να επιδεινώνουν η μία την άλλη. Σήμερα, θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης διαβήτη τύπου 2. Κύριο χαρακτηριστικό της είναι η υπερβολική συσσώρευση πλεονάζοντος λίπους με επιβλαβείς για την υγεία συνέπειες. Εξαρτάται από την κληρονομικότητα και από παράγοντες που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής, όπως τη κακή διατροφή, καθιστική συμπεριφορά και την έλλειψη άσκησης. Ο βαθμός παχυσαρκίας ενός ατόμου καθορίζεται παραδοσιακά από τον υπολογισμό του Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ), σύμφωνα με το βάρος και το ύψος. ΔΜΣ μεγαλύτερο από 30 kg/m² αποτελεί ένδειξη παχυσαρκίας [14]. Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερα στις αναπτυγμένες χώρες, ο ρυθμός εμφάνισης νέων περιστατικών παχυσαρκίας αυξάνεται ραγδαία. Η αύξηση αυτή συσχετίζεται με την ταυτόχρονη αύξηση των ατόμων με διαβήτη τύπου 2.

Η σταδιακή αύξηση του σωματικού βάρους δημιουργεί τις κατάλληλες προϋποθέσεις για τη διαταραχή των μεταβολικών διεργασιών, ενισχύοντας τους μηχανισμούς παθογένειας του διαβήτη τύπου 2. Με την εξάπλωση του λιπώδους ιστού προκαλείται φλεγμονή, ίνωση, υποξία, απορρυθμισμένη έκκριση αντιποκινών και διαταραγμένη μιτοχονδριακή λειτουργία, επηρεάζοντας τη σηματοδότηση της ινσουλίνης και προάγοντας αντίσταση στην ινσουλίνη. Επιπλέον, η συσσώρευση θρεπτικών συστατικών και μεταβολιτών, όπως λιπίδια και αμινοξέα, διαταράσσει την ισορροπία μεταξύ της χρήσης γλυκόζης και λιπαρών οξέων, οδηγώντας σε αυξημένη λιπόλυση και συμβάλλοντας στην φλεγμονή και στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Τόσο η εξάπλωση λίπους σε ιστούς που παίζουν κεντρικό ρόλο στη σηματοδότηση και ρύθμιση της ινσουλίνης, όπως το ήπαρ, ο σκελετικός μυς, ο λιπώδης ιστός και το πάγκρεας, όσο και οι μεταβολές στη ισορροπία των θρεπτικών συστατικών στον οργανισμό, επιδρούν στη φυσιολογική λειτουργία της αυτοφαγίας, ενισχύοντας την αντίσταση στην ινσουλίνη στους συγκεκριμένους ιστούς και της δυσλειτουργίας των β-παγκρεατικών κυττάρων. Στην παχυσαρκία έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζεται και το μικροβίωμα του εντέρου, το οποίο είναι ρυθμιστής του μεταβολισμού και της σηματοδότησης της όρεξης στον άνθρωπο. Αλλαγές στην ποικιλομορφία του μικροβιώματος μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση του ΔΜΣ, συσσώρευση λίπους, φλεγμονή,

αντίσταση στην ινσουλίνη και διαταραχές σε ενδοκρινείς μονοπάτια σηματοδότησης. Επίσης η απορρύθμιση του μπορεί να επηρεάσει το εντερικό και αυτόνομο νευρικό σύστημα, επιδρώντας στη ρύθμιση της γλυκόζης και της μεταβολικής ισορροπίας [15].

1.2 Καπνός τσιγάρου

Το κάπνισμα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες απειλές για τη δημόσια υγεία, με το 20% περίπου του παγκόσμιου πληθυσμού να καπνίζει, ενώ ετησίως καταγράφονται περισσότεροι από 8 εκατομμύρια θάνατοι που σχετίζονται με έκθεση σε καπνό τσιγάρου [16]. Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει πάνω από 7000 χημικές ενώσεις και τα κύρια επιβλαβή στοιχεία του είναι η νικοτίνη, το διοξείδιο του άνθρακα, το μονοξείδιο του άνθρακα, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ), οι ελεύθερες ρίζες και οι πτητικές ενώσεις θείου. Τα συστατικά αυτά είναι τοξικά καθώς έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία του αναπνευστικού και καρδιαγγειακού συστήματος ενώ συνδέονται και με καρκινογένεση, επιδρώντας στη φυσιολογική λειτουργία των πρωτεϊνών, των λιπιδίων, του DNA και των μιτοχονδρίων [17].

1.2.1 Επιπτώσεις του καπνού τσιγάρου σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2

Επιδημιολογικά δεδομένα, από διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες, καθιστούν σαφή τη σύνδεση της συστηματικής έκθεσης σε καπνό τσιγάρου με τον διαβήτη τύπου 2. Μελέτες δείχνουν ότι η νικοτίνη μπορεί να μεταβάλλει άμεσα την ομοιόσταση της γλυκόζης στους βασικούς μεταβολικούς ιστούς μέσω του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) και περιφερικού νευρικού συστήματος (ΠΝΣ), υποδηλώνοντας το σημαντικό ρόλο που έχει το κάπνισμα στην εμφάνιση και επιβάρυνση του διαβήτη τύπου 2 [18]. Κατά μήκος του ΚΝΣ και του ΠΝΣ υπάρχουν ευρέως εξαπλωμένοι νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης (nAChR). Μεταλλάξεις στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκφρασή τους, αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης διαβήτη τύπου 2, αυξάνοντας την αντίσταση στην ινσουλίνη, τη συσσώρευση λίπους γύρω από την κοιλιακή περιοχή και την πιθανότητα εκδήλωσης παχυσαρκίας. Έχει βρεθεί επίσης ότι η νικοτίνη μπορεί να απορρυθμίσει, διεγείροντας τους nAChR συγκεκριμένου τμήματος του εγκεφάλου, μια οδό σηματοδότησης μεταξύ του εγκεφάλου και του παγκρέατος, που συμμετέχει στην ομοιόσταση της γλυκόζης. Ο μηχανισμός επίδρασης της νικοτίνης στα επίπεδα της γλυκόζης και κατ' επέκταση στην έκκριση της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα φαίνεται να εξαρτάται και από την κατάσταση πείνας του καπνιστή. Συγκεκριμένα, το κάπνισμα με άδειο στομάχι ευνοεί την αύξηση της συγκέντρωσης γλυκόζης. Μπορεί να επιδράσει και έμμεσα στη ρύθμιση της γλυκόζης, μέσω της

διέγερσης ορμονών του στρες, όπως της επινεφρίνης και της νορεπινεφρίνης αλλά και του πεπτιδίου-1 τύπου γλυκαγόνης (GLP-1) [19]. Πρόσφατα, σε μοντέλο ποντικών-παθητικών καπνιστών με πρόσβαση σε δύο διαφορετικές πηγές τροφής, μια τυπική και μια με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα, διαπιστώθηκε ότι ο καπνός του τσιγάρου επηρέασε την κατανομή των χολικών οξέων. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, ιδιαίτερα στη δεύτερη ομάδα, την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη στο ήπαρ [20].

1.3 *Drosophila Melanogaster* ως πειραματικό μοντέλο

Η *Drosophila Melanogaster* ή μύγα των φρούτων, όπως αλλιώς είναι γνωστή, είναι ένα δίπτερο έντομο που χρησιμοποιείται ευρέως ως πειραματικό μοντέλο. Παρουσιάζει πολλά πρακτικά πλεονεκτήματα, καθώς το κόστος για την προμήθεια και διατήρηση μιας καλλιέργειας *D. Melanogaster* είναι χαμηλό και η συντήρηση της εύκολη. Χαρακτηριστικό προνόμιο της, επιπλέον, είναι ο σύντομος κύκλος ζωής της, ο οποίος περιλαμβάνει 4 στάδια ανάπτυξης: αυγό, προνύμφη, νύμφη και ενήλικη μύγα και σε εργαστηριακές συνθήκες με σταθερή θερμοκρασία (25°C) και υγρασία (50-60%) φτάνει περίπου τις 10 μέρες. Επίσης, έχει υψηλή γονιμότητα, γρήγορη αναπαραγωγή και μικρή διάρκεια ζωής· οι αρσενικές μύγες ζουν κατά μέσο όρο 30-60 μέρες ενώ οι θηλυκές 40-80. Επιτρέπει έτσι την διεξαγωγή πολλών πειραμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα και την δια βίου παρατήρησή της. Κυρίως βρίσκει εφαρμογή σε μελέτες γενετικής καθώς το γονιδίωμα της είναι πλήρως αλληλουχημένο και περιέχει ορθόλογα γονίδια για το 75% σχεδόν όλων των γνωστών γονιδίων του ανθρώπου που σχετίζονται με ασθένειες. Ωστόσο είναι δημοφιλές και σε άλλα επιστημονικά πεδία, όπως της αναπτυξιακής βιολογίας, κυτταρικής βιολογίας, νευροβιολογίας και φυσιολογίας ενώ τα τελευταία χρόνια αναγνωρίστηκε και ως αξιόπιστο μοντέλο μελέτης διεργασιών του μεταβολισμού [21].

Η πρόσληψη, αποθήκευση και μεταβολισμός των θρεπτικών συστατικών ελέγχονται στον ανθρώπινο οργανισμό και στη φρουτόμυγα από όργανα και λειτουργικές δομές που μοιράζονται βασικά κοινά χαρακτηριστικά. Όπως και στον άνθρωπο, ο γαστρεντερικός σωλήνας αποτελεί την κύρια θέση απορρόφησης και πέψης των θρεπτικών στοιχείων της κυκλοφορίας του αίματος, η οποία, σε αντίθεση με το αγγειακό σύστημα των θηλαστικών, αποτελείται από ανοιχτό κυκλοφορικό δίκτυο, που ονομάζεται αιμόλεμος [22]. Στο έντερο τα λιπίδια μετατρέπονται σε λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, ενώ σε μια ειδική περιοχή, το μέσο έντερο, πραγματοποιείται πρωτεόλυση των πολυσακχαριτών. Λιποπρωτεϊνικά σωματίδια και μονοσακχαρίτες μεταφέρονται στην αιμόλεμο και από εκεί κατανέμονται κατάλληλα στο σώμα. Στη *D. Melanogaster*, το κύριο όργανο μεταβολισμού είναι το λιπόσωμα, το οποίο, όπως ο λιπώδης ιστός του ανθρώπου,



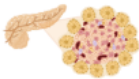




αποθηκεύει ενέργεια σε μορφή τριγλυκεριδίων και γλυκογόνου. Επίσης, προσλαμβάνει τους μονοσακχαρίτες για να τους μετατρέψει σε τρεχαλόζη, έναν μη αναγωγικό δισακχαρίτη και το πλεονάζων σάκχαρο της αιμόλεμφο. Τα οινोकύτταρα, μια ομάδα εκκριτικών κυττάρων του λιπώσματος, που παρουσιάζουν διακριτές και ανεξάρτητες λειτουργίες από το λιπόσωμα, δρουν στις ενήλικες μύγες όπως τα ηπατικά κύτταρα του ανθρώπου. Στα οινोकύτταρα, βρέθηκαν επίσης γονίδια που συμμετέχουν στη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών που εντοπίζονται και στο ήπαρ των θηλαστικών, όπως μεταβολισμός λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας, κετογένεση, μεταβολισμός δραστικών μορφών οξυγόνου και μεταβολισμός ξενοβιοτικών ουσιών. Ο σκελετικός ιστός και στα δύο είδη οργανισμών απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας για τη σωστή λειτουργία του και αποτελεί θέση γλυκόλυσης και αποθήκευσης γλυκογόνου ως ενεργειακό απόθεμα. Η ρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης, πραγματοποιείται και στην *D. Melanogaster* κατά κύριο λόγο από την ινσουλίνη, η οποία παράγεται και εκκρίνεται από μια ειδική ομάδα κυττάρων του εγκεφάλου, τα κύτταρα παραγωγής ινσουλίνης (insulin-producing cells/IPCs), αντίστοιχα των β-κυττάρων του ανθρώπινου παγκρέατος. Το ρόλο της γλυκαγόνης διαδραματίζει στη φρουτόμυγα η αντιποκινητική ορμόνη (AKH), η οποία εκκρίνεται από νευροενδοκρινικά κύτταρα (corpora cardiaca/CC) [23].

Συνολικά στην *D. Melanogaster* εκφράζονται 8 πεπτίδια εφάμιλλα της ινσουλίνης (*Drosophila* insulin-like peptides/dILPs). Όταν η συγκέντρωση των σακχάρων στην αιμόλεμφο ξεπεράσει τα φυσιολογικά επίπεδα, τα IPCs ανταποκρίνονται παράγοντας κυρίως 4 dILPs (dILP1, dILP2, dILP3 και dILP5). Ο μοριακός μηχανισμός έκκρισης της ινσουλίνης διαφέρει μεταξύ νύμφης και ενήλικης μύγας. Στις νύμφες, η έκκριση dILP γίνεται έμμεσα, με μεσολάβηση της AKH. Στις ενήλικες μύγες χρειάζεται τη συμβολή του πυρηνικού παράγοντα ηπατικών κυττάρων 4 (HNF4) και έχει μεγάλη ομοιότητα με το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης στον άνθρωπο. Η γλυκόζη εισέρχεται στα IPCs μέσω του υποδοχέα GLUT1 στη συνέχεια μεταβολίζεται προκαλώντας την παραγωγή ATP από τα μιτοχόνδρια. Η αυξημένη παραγωγή ATP οδηγεί σε κλείσιμο των εξαρτώμενων από ATP διαύλων καλίου, εκπόλωση της μεμβράνης, άνοιγμα των τασοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου και απότομη εισροή Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, εξωθώντας την εξωκυττάρωση των κυστιδίων dILP. Ανεξάρτητα από το κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι, έχει βρεθεί ότι dILP2 εκκρίνεται και με την παραγωγή του μικρού νευροπεπτιδίου F (short neuropeptide F/sNPF) από δύο νωτιαίους νευρώνες που αναγνωρίζουν τη γλυκόζη [23]. Σε αντίθεση με τον άνθρωπο, εκφράζεται μόνο ένας υποδοχέας ινσουλίνης, μέσω του οποίου εισέρχεται στα κύτταρα-στόχους. Η κύρια σηματοδοτική οδός της ινσουλίνης μέσω PI3K/Akt είναι διατηρημένη, ρυθμίζοντας τη σύνθεση γλυκογόνου, τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, τη γλυκονεογένεση και την απόπτωση, όπως και στα θηλαστικά [24].

Μοντελοποίηση του διαβήτη τύπου 2 χρησιμοποιώντας μύγες *D. Melanogaster* μπορεί να υλοποιηθεί με διαφορετικές προσεγγίσεις. Αρχικά, προκαλώντας γενετικές μεταλλάξεις σε γονίδια που είτε εμπλέκονται άμεσα στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης, είτε στη ρύθμιση του. Οι μύγες που προκύπτουν, εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη, υψηλά επίπεδα γλυκόζης στην αιμόλεμφο, αδυναμία αποθήκευσης των λιπιδίων, αυξημένη έκκριση dILPs (υπερινσουλιναιμία) και μειωμένη σωματική διάπλαση. Επίσης, προσομοίωση του φαινοτύπου της παχυσαρκίας και του διαβήτη τύπου 2 γίνεται μέσω του τύπου διαίτας. Για το σκοπό αυτό μύγες εκτρέφονται σε τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα (High Sugar Diet/HSD), συνήθως 20-30% w/v, (ένα τυπικό μέσο τροφής περιέχει 5% w/v), ή σε λιπαρά οξέα (High Fat Diet/HFD), η οποία παράγεται συνήθως με προσθήκη λαδιού καρύδας σε περιεκτικότητα 20-30% w/v. Τα δύο είδη διατροφής προκαλούν αύξηση στα επίπεδα τριγλυκεριδίων, γλυκόζης, τρεχαλόζης και γλυκογόνου, μειώνοντας ταυτόχρονα τα επίπεδα των πρωτεϊνών. Επιπλέον, προάγουν την ανάπτυξη του μηχανισμού αντίστασης στην ινσουλίνη [21,24].

Το αναπνευστικό σύστημα της *Drosophila Melanogaster* είναι αντίστοιχο με αυτό των θηλαστικών. Αποτελείται από μια χαρακτηριστική δομή, αντίστοιχη των πνευμόνων των θηλαστικών, η οποία ονομάζεται τραχεία. Η τραχεία είναι ένα ανεξάρτητο, ανοιχτό, σωληνοειδές δίκτυο επιθηλιακών αεραγωγών που εκτείνεται σε όλο το σώμα των μυγών, τροφοδοτώντας τα διάφορα όργανα με οξυγόνο. Κύρια διακλάδωσή της είναι ο ραχιαίος κορμός και οι μικρότερες διακλαδώσεις της αποκαλούνται τραχειόλια. Ο αέρας εισέρχεται στην τραχεία από μικρούς πόρους, τα στίγματα, και στις τελικές διακλαδώσεις της που επικοινωνούν με τα σωματικά κύτταρα, γίνεται ανταλλαγή αερίων με παθητική διάχυση, μέσω του επιθηλιακού υγρού [25]. Το επιθήλιο που επενδύει την τραχεία αν και απλούστερο από αυτό των αεραγωγών στον άνθρωπο, παρουσιάζει πολλές λειτουργικές ομοιότητες. Στις χρόνιες διαταραχές του ανθρώπινου αναπνευστικού συστήματος παρατηρείται σταδιακή απώλεια της ακεραιότητας του επιθηλίου, η οποία παίζει βασικό ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης και επικοινωνίας των πνευμονικών κυττάρων. Συνεπώς, αξιοποιώντας τη *Drosophila Melanogaster* η μελέτη της επίδρασης των ασθενειών όπως η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και το άσθμα μπορεί να απλουστευτεί [26]. Επιπλέον, για πολλά γονίδια που έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στη ΧΑΠ στον άνθρωπο, έχουν ταυτοποιηθεί αντίστοιχά τους στη φρουτόμυγα, υποδηλώνοντας ότι και σε γενετικό επίπεδο υπάρχουν παραλληλισμοί μεταξύ των δύο οργανισμών [27]. Εκτός από την ομοιότητα του επιθηλίου των αεραγωγών, η *Drosophila Melanogaster* αποτελεί ιδανικό μοντέλο για την διερεύνηση της επίδρασης του καπνού τσιγάρου στον οργανισμό καθώς επίσης εκφράζει τους νικοτινικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης (nAChRs). Όπως και στον άνθρωπο, οι nAChRs ενεργοποιούνται από την νικοτίνη, η οποία μπορεί να επιδράσει τη συμπεριφορά των μυγών και

ιδιαίτερα τη κινητικότητα τους [28]. Έκθεση σε καπνό τσιγάρου στις μύγες μπορεί να γίνει είτε άμεσα με εισπνοή του καπνού τσιγάρου είτε έμμεσα μέσω εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου στη τροφή. Επίσης σε πολλές μελέτες η έκθεση μπορεί να ξεκινήσει από την πατρική γενιά ή από πρώιμα στάδια ανάπτυξης για να μελετηθούν οι επιδράσεις του και σε αυτές τις φάσεις του κύκλου ζωής, το οποίο θα ήταν ηθικά αδύνατο να γίνει στον άνθρωπο.

Human Organs	Vasculature 	Lungs 	Pancreas (α-,β-cells) 	Liver 	Adipose Tissue 	Skeletal Muscle 	Gastrointestinal Tract 
Drosophila Melanogaster analogous functional structures	Hemolymph	Trachea	Corpora Cardiaca (Esophageal lining) IPCs (Brain)	Oinocytes Fat Body (FB)	Fat Body (FB)	Flight Muscles	Gut (Foregut and Midgut)
Function in Drosophila Melanogaster	Nutrient and waste product transportation	Air transport Gas exchange (O ₂ and CO ₂)	AKH secretion dILPs secretion	Energy storage Lipid mobilization	Energy storage High energy demand	Nutrient absorption	

Εικόνα 1. Κοινές χαρακτηριστικές δομές μεταξύ του ανθρώπου και της *Drosophila Melanogaster* που την καθιστούν ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη παθήσεων του αναπνευστικού και του μεταβολισμού. IPCs: Insulin-Producing Cells, AKH: Adipokinetic Hormone, dILPs: *Drosophila Insulin Peptides*.

1.4 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η αναπαραγωγή μοντέλου διαβήτη τύπου 2 σε μύγες *Drosophila Melanogaster* μέσω του τύπου διαίτας καθώς και η έκθεση των μυγών αυτών σε καπνό τσιγάρου για τη μελέτη των επιδράσεών τους σε βασικές φυσιολογικές λειτουργίες τους: τη κινητικότητα, τον μεταβολικό ρυθμό και της αντοχής τους σε ψυχρές θερμοκρασίες. Ειδικότερα, οι μύγες εκτέθηκαν σε τύπο διατροφής HSD και η έκθεση σε καπνό τσιγάρου έγινε άμεσα στα φιαλίδια με τις μύγες. Για τον προσδιορισμό της κινητικότητας εφαρμόστηκε η δοκιμασία αρνητικής γεώταξης, ο μεταβολικός ρυθμός προσδιορίστηκε με υπολογισμό του παραγόμενου CO₂ και για την αντοχή στον κρύο οι μύγες τοποθετήθηκαν σε πάγο για χρονικό διάστημα 4 ωρών.

Ειδικό Μέρος

2 Υλικό και Μέθοδοι

2.1 Διατήρηση καλλιέργειας *Drosophila Melanogaster*

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν στελέχη *D. Melanogaster* Oregon-R (OR) άγριου τύπου, προμήθεια των οποίων έγινε από το Bloomington *Drosophila* Stock Center (NIH P40OD018537). Οι μύγες διατηρήθηκαν σε ειδικό θάλαμο επώασης (incubator) προκειμένου να διασφαλιστούν σταθερές οι συνθήκες της καλλιέργειας: θερμοκρασία (25 °C), υγρασία (50-60%) και πρόγραμμα ημερήσιου κύκλου 12 ώρες ημέρα και 12 ώρες νύχτα.

Η ανάπτυξη των μυγών πραγματοποιούνταν μέσα σε φιαλίδια που περιείχαν στον πάτο θρεπτικό υλικό ενώ στο ανοιχτό πάνω άκρο τους καλύπτονταν με βαμβάκι. Προκειμένου να έχουν πρόσβαση σε φρέσκια τροφή, οι ενήλικες μύγες μεταφέρονταν ανά 10 μέρες σε νέα φιαλίδια με νέα τροφή. Αυτό εξασφάλιζε τόσο την διατήρηση της υγείας της καλλιέργειας, όσο και την εκθετική αύξηση του πληθυσμού της, καθώς στα παλαιότερα φιαλίδια γεννιόντουσαν διαρκώς νέες μύγες από τα έμβρυα, τις νύμφες και τις προνύμφες που παρέμειναν, ενώ παράλληλα στα καινούρια προκύπταν έμβρυα από την αναπαραγωγή των ενήλικων. Στο τέλος του μήνα γινόταν αντικατάσταση των φιαλιδίων και έλεγχος της καλλιέργειας για μύκητες και παράσιτα με χρήση του στερεοσκοπίου OLYMPUS.

2.2 Παρασκευή θρεπτικού υλικού

Τόσο για την καλλιέργεια όσο και για τις πειραματικές συνθήκες που αφορούσαν την τυπική διατροφή (Normal Diet; ND), χρησιμοποιήθηκε πρότυπο θρεπτικό μέσο που αποτελούνταν από ζάχαρη περιεκτικότητας 7,5% w/v, μαγιά, καλαμποκάλευρο, άγαρ και νιπαγίνη 0,2% για την παροχή αντιμυκητιασικής δράσης. Αντίστοιχα, για τις πειραματικές συνθήκες που αφορούσαν τη δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε ζάχαρη (High Sugar Diet; HSD), τα συστατικά και η δοσολογία τους παρέμειναν ίδια, με διαφορά την περιεκτικότητα σε σουκρόζη 30% w/v. Τα συστατικά των δύο διατροφών, ND και HSD παρουσιάζονται λεπτομερώς στον **Πίνακα 1**:

Θρεπτικό μέσο	Ποσότητα				
	Ζάχαρη	Κορν φλάουρ	Ξηρή μαγιά	Άγαρ	Νιπαγίνη/5ml αιθανόλης
Normal Diet	7.5g	5.5g	3.33g	1g	0.2g
High Sugar Diet	30g	5.5g	3.33g	1g	0.2g

Πίνακας 1. Συστατικά παρασκευής των θεραπευτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν για τις πειραματικές συνθήκες των πειραμάτων.

Τα βήματα παρασκευής της τροφής ήταν τα ακόλουθα:

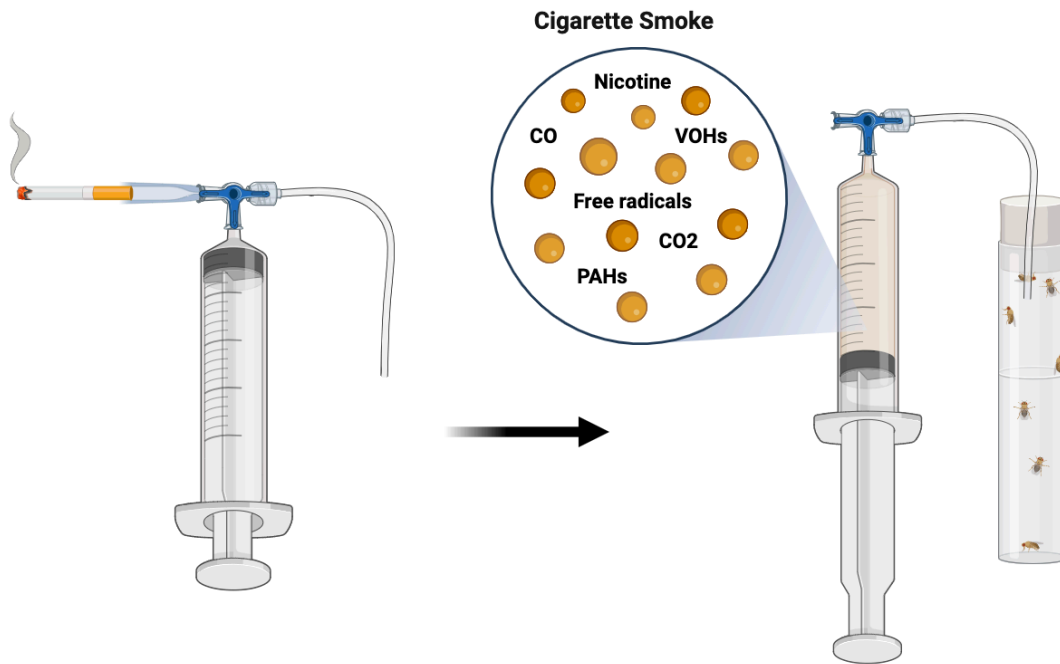
1. Τοποθετούνται 100ml νερό σε ογκομετρικό σκεύος ζέσεως το οποίο θερμαίνεται σε θερμαινόμενη πλάκα.
2. Πλησιάζοντας το σημείο βρασμού, η θερμοκρασία μειώνεται και αρχίζει η ανάδευση.
3. Προστίθεται πρώτα η ζάχαρη έως ότου διαλυθεί πλήρως.
4. Ακολουθεί σταδιακά το κορν φλάουρ με κοσκίνισμα.
5. Αφού διαλυθεί το κορν φλάουρ, προστίθεται η ξηρή μαγιά και μετά το άγαρ.
6. Με την προσθήκη όλου του άγαρ, αυξάνεται η θερμοκρασία στο μέγιστο και η ανάδευση συνεχίζεται μέχρι το μείγμα να ομοιογενοποιηθεί και να πήξει.
7. Στη συνέχεια αφαιρείται από την θερμαινόμενη πλάκα και αναδεύεται μέχρι να μειωθεί η θερμοκρασία του.
8. Όταν το μείγμα κρυώσει ελαφρώς, προστίθεται η νιπαγίνη, αναδεύεται και μεταφέρεται στα φιαλίδια διατήρησης των μυγών.

Πριν την μεταφορά των μυγών στα φιαλίδια με τη φρέσκια τροφή, τα φιαλίδια πρέπει να παραμείνουν για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Η προμήθεια της νιπαγίνης έγινε από την Sigma (cat: h3647-100G), της 100% αιθανόλης από την VWR CHEMICALS (cat: 20821.330), ενώ τα υπόλοιπα συστατικά πάρθηκαν από τοπικά καταστήματα λιανικού εμπορίου.

2.3 Έκθεση των *D. Melanogaster* σε καπνό τσιγάρου (CS)

Για την έκθεση των μυγών σε καπνό τσιγάρου χρησιμοποιήθηκε αυτοσχέδιος μηχανισμός του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ο οποίος παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1**. Ο μηχανισμός αυτός αποτελείται από μια σύριγγα 60ml, ένα σωληνάριο και μια θήκη για τσιγάρο, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με μια τρίοδη στρόφιγγα. Αρχικά, ανάβεται το τσιγάρο με ανοιχτή τη δίοδο τσιγάρου-σύριγγας για να γίνει εισροή του καπνού στην άδεια σύριγγα. Όταν έχει γεμίσει η σύριγγα, η στρόφιγγα περιστρέφεται έτσι ώστε να ανοίξει η δίοδος σύριγγας-σωληναρίου, μέσω του οποίου πραγματοποιείται η έκθεση του καπνού στα φιαλίδια με τις μύγες. Σε κάθε φιαλίδιο με *D. Melanogaster* εισάγονταν 20ml καπνού και η έκθεση διαρκούσε 15 λεπτά.



Εικόνα 1. Αυτοσχέδιος μηχανισμός παρασκευής καπνού τσιγάρου

Τα τσιγάρα που χρησιμοποιήθηκαν για την έκθεση των μυγών σε CS ήταν τσιγάρα του εμπορίου, συγκεκριμένα ήταν τσιγάρα τύπου Marlboro Red FTKS 20S Box με περιεκτικότητα σε πίσσα, νικοτίνη και μονοξείδιο του άνθρακα 10mg/cig, 0,8mg/cig και 10mg/cig αντίστοιχα.

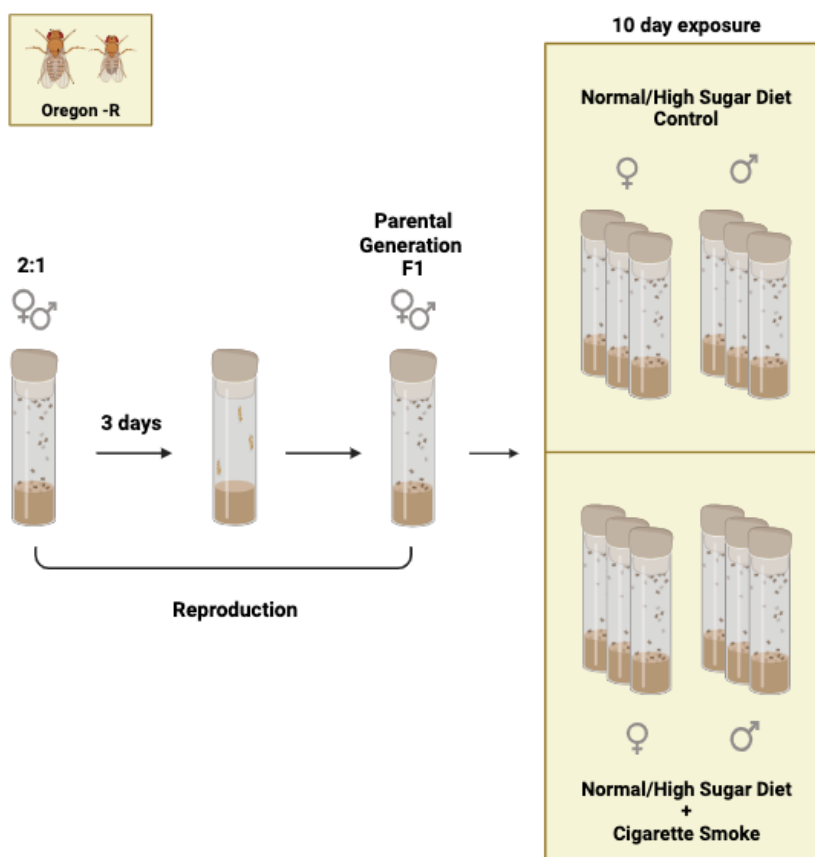
2.4 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την πειραματική διαδικασία, οι συνθήκες διαχωριστήκαν, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 2**, σε ND, ND+CS, HSD, HSD+CS. Για κάθε συνθήκη τοποθετήθηκαν συνολικά 80 αρσενικές και 80 θηλυκές μύγες στα φιαλίδια. Για τη δοκιμασία επιβίωσης έγινε ξεχωριστή διάκριση με 25 θηλυκές και 25 αρσενικές σε κάθε συνθήκη. Κάθε δοκιμασία επαναλήφθηκε 3 φορές.

Αρχικά, 10 θηλυκές και 5 αρσενικές μύγες τοποθετούνται σε φιαλίδια με τροφή για να αναπαραχθούν. Μετά από περίοδο τριών ημερών, η πατρική γενιά αφαιρείται από τα φιαλίδια, αφήνοντας πίσω τα έμβρυα από τα οποία σύντομα θα προκύψουν νέες ενήλικες μύγες. Αυτές οι νεοεμφανιζόμενες ενήλικες μύγες, ηλικίας 2-4 ημερών, χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για τα πειράματα, έπειτα από διαχωρισμό τους με βάση το φύλο. Το χρονικό διάστημα για κάθε συνθήκη είναι 10 μέρες, ενώ για τις συνθήκες με CS, οι μύγες εκτίθενται σε καπνό κάθε μέρα. Κάθε 3 μέρες παρασκευάζεται φρέσκο θρεπτικό υλικό και οι μύγες μεταφέρονται σε νέα φιαλίδια. Στη δοκιμασία επιβίωσης, πριν την απόρριψη των παλιών φιαλιδίων γίνεται καταμέτρηση των νεκρών μυγών που βρίσκονται στην τροφή και κάθε μεταφορά των μυγών μεταξύ φιαλιδίων

πραγματοποιείται με προσοχή, έτσι ώστε να μην υπάρχει καμία απώλεια. Σε περίπτωση απώλειας γίνεται καταμέτρηση και λαμβάνεται υπόψη στην ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Οι δοκιμασίες ξεκινάνε την δέκατη μέρα, κατά την οποία πρώτα καταμετρούνται οι μύγες που έζησαν από τη δοκιμασία επιβίωσης και έπειτα αναισθητοποιούνται όλες οι μύγες και χωρίζονται σε ομάδες με βάση το φύλο. Αφού πραγματοποιηθούν όλες οι δοκιμασίες, θανατώνονται και μετριέται το βάρος τους.



Εικόνα 2. Σχεδιάγραμμα περιγραφής του πειραματικού σχεδιασμού.

2.5 Δοκιμασία Αρνητικής Γεώταξης

Η αρνητική γεώταξη είναι μια φυσική συμπεριφορά, χαρακτηριστική σε μικρούς ασπόνδυλους οργανισμούς όπως η *D. Melanogaster*, κατά την οποία παρουσιάζουν κίνηση ενάντια στη δύναμη της βαρύτητας, ως αντίδραση σε κάποια απότομη αλλαγή στη ροή της κίνησής τους. Η μέθοδος εκμεταλλεύεται αυτή τη έμφυτη συμπεριφορά για τη μελέτη της αναρριχητικής ικανότητάς τους, μέχρι ένα προκαθορισμένο ύψος και σε δεδομένο χρονικό διάστημα, αξιολογώντας έτσι και την κινητική τους ικανότητα [29]. Η συνηθέστερη πρακτική περιλαμβάνει την τοποθέτηση των μυγών σε φιαλίδια και την διαταραχή της κίνησης τους χτυπώντας το φιαλίδιο ελαφρά. Οι μύγες πέφτουν στο πάτο του δοχείου και στη συνέχεια

παρατηρείται η κίνησή τους προς τα πάνω. Η παρατήρηση γίνεται μέσω βιντεοσκόπησης, επιτρέποντας την εύκολη σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάλογα με την πειραματική συνθήκη. Είναι μια διαδικασία που μπορεί να αναπαραχθεί εύκολα στο εργαστήριο με χαμηλό κόστος.

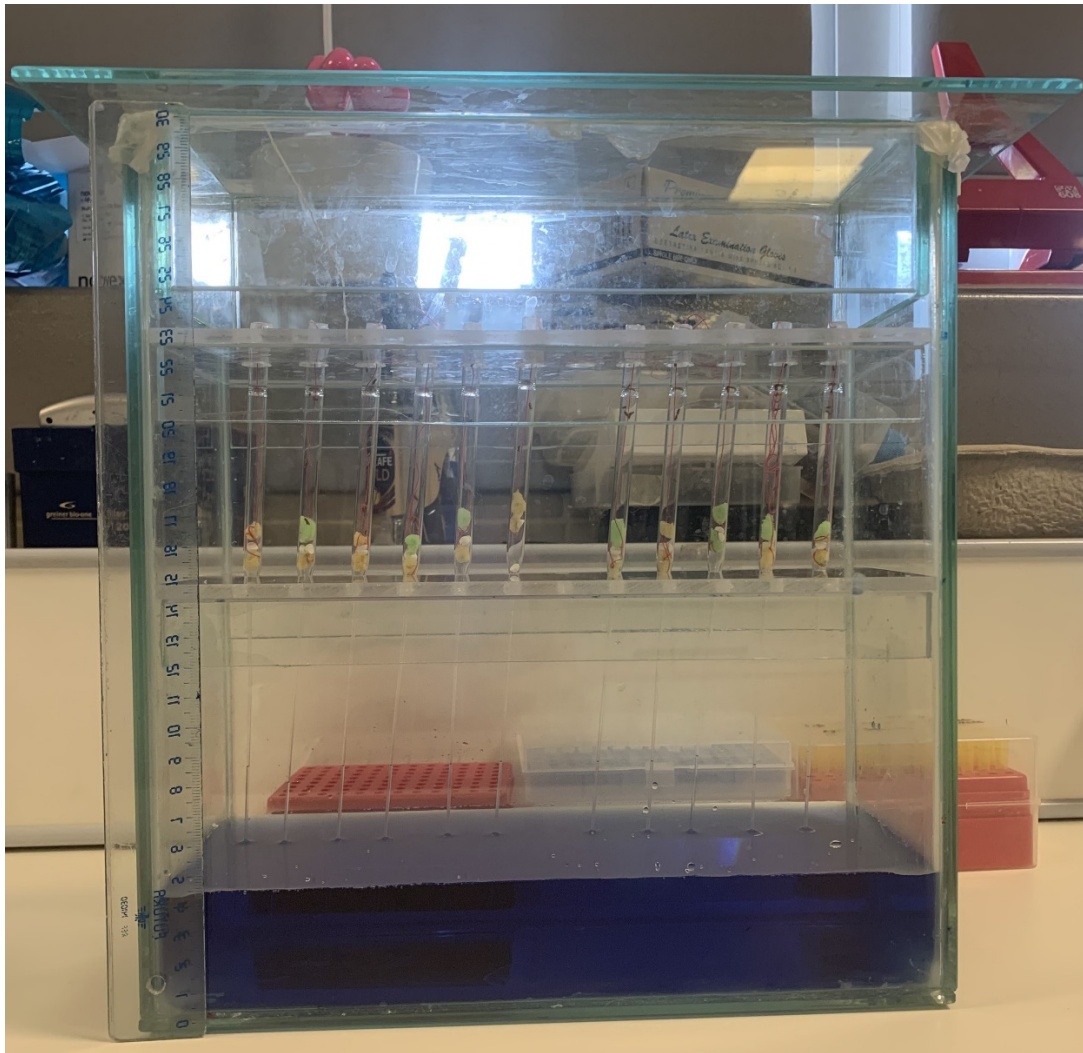
Για την δοκιμασία αρνητικής γεωτάξης συλλέχθηκαν αρσενικές και θηλυκές μύγες, οι οποίες αναπτύχθηκαν στις πειραματικές συνθήκες ND, ND+CS, HSD, HSD+CS και χωρίστηκαν σε ομάδες των 10 μυγών. Αναλυτικά, τα βήματα της δοκιμασίας είναι τα εξής:

1. Μεταφορά των *D. Melanogaster* σε άδεια φιαλίδια και τοποθέτηση σε πάγο για 30 λεπτά για να αναισθητοποιηθούν.
2. Διαχωρισμός αρσενικών από θηλυκές και τοποθέτηση σε κυλινδρικά φιαλίδια με βαθμονομημένο ύψος στα 10cm.
3. Αναμονή περίπου 15 λεπτά για να μπορέσουν να ξυπνήσουν και να σταθεροποιήσουν το κινητικό τους σύστημα.
4. Ελαφρύ χτύπημα, για να πέσουν στον πάτο των φιαλιδίων.
5. Καταγραφή της αναρριχητικής τους συμπεριφοράς σε βίντεο 10s.
6. Υπολογισμός του % ποσοστού των *D.melanogaster* που κατάφεραν να φτάσουν τα 10 cm εντός των 10s.

2.6 Μέτρηση του μεταβολικού ρυθμού

Ο προσδιορισμός του μεταβολικού ρυθμού προσδιορίστηκε εξετάζοντας την παραγωγή CO₂ από τις *D. Melanogaster*. Το παραγόμενο CO₂ είναι άμεσο αποτέλεσμα του οξειδωτικού μεταβολισμού και, ειδικά στη *D. Melanogaster*, έχει παρατηρηθεί μια σχεδόν άψογη γραμμική σχέση μεταξύ της παραγωγής του και της κατανάλωσης O₂ [30]. Ως τεχνική βρίσκει ευρεία εφαρμογή για τη μελέτη ασθενειών που σχετίζονται με ανώμαλη μεταβολική δραστηριότητα, όπως ο καρκίνος, η παχυσαρκία, ο διαβήτης και η γήρανση [31].

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε μια αυτοσχέδια διάταξη κλειστού συστήματος αναπνευστικής μέτρησης, η οποία απεικονίζεται στην **Εικόνα 3**, αποτελούμενη από έναν αεροστεγή γυάλινο θάλαμο με καθορισμένες θέσεις για την τοποθέτηση γυάλινων μικροπιπετών. Στον πάτο του θαλάμου προστίθεται νερό με χρωστική ουσία, ενώ οι μικροπιπέτες εμπεριέχουν τις μύγες μαζί με Soda lime pellets, εκτός από μια, η οποία παραμένει κενή και χρησιμεύει ως αρνητικός πείραμα αναφοράς. Το soda lime είναι μια χημική ουσία η οποία αποτελείται από Ca(OH)₂ και NaOH και έχει την ιδιότητα να απορροφά το παραγόμενο CO₂. Προμήθεια του soda lime έγινε από την εταιρεία Sigma (κωδικός: 72073-1KG).



Εικόνα 3. Αυτοσχέδιο αναπνευστόμετρο του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που αξιοποιήθηκε για την υλοποίηση των πειραμάτων μέτρησης μεταβολικού ρυθμού.

Με την τοποθέτηση των μικροπιπετών στο θάλαμο, αέρια και μικροπιπέτα ασκούν πίεση στην επιφάνεια του νερού, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του σε ένα συγκεκριμένο ύψος. Αυτή είναι η αρχική κατάσταση του συστήματος, καταγραφή της οποίας γίνεται τραβώντας φωτογραφία. Σε χρονικό διάστημα δύο ωρών, οι μύγες καταναλώνουν διαρκώς O_2 , και παράλληλα το soda lime απορροφά το CO_2 . Έτσι, ασκείται λιγότερη πίεση στην επιφάνεια του νερού και παρατηρείται αύξηση της στάθμης του εντός των μικροπιπετών. Βγάζοντας φωτογραφία και την τελική κατάσταση του συστήματος, είναι δυνατός ο υπολογισμός της διαφοράς στη στάθμη του νερού των μικροπιπετών και κατά συνέπεια του παραγόμενου CO_2 ($\mu\text{l/hr/fly}$) χρησιμοποιώντας την Εξίσωση 1.

$$CO_2 = \frac{[(\Delta d - \Delta c)(\pi \times R^2)] \times 1000}{n \times h} \quad (1)$$

όπου,

- R, η ακτίνα της μικροπιπέτας σε cm
- Δd, η διαφορά στάθμης νερού μικροπιπέτας που περιέχει *D. Melanogaster*
- Δc, η διαφορά στάθμης νερού μικροπιπέτας χωρίς *D. Melanogaster* (control)
- n, ο αριθμός *D. Melanogaster* κάθε μικροπιπέτας
- h, ο χρόνος σε ώρες

Οι μύγες που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμασία αρνητικής γεώταξης, αξιοποιήθηκαν στη συνέχεια και για την μέτρηση του μεταβολικού ρυθμού. Αναλυτικά, η διαδικασία που εκτελέστηκε είναι:

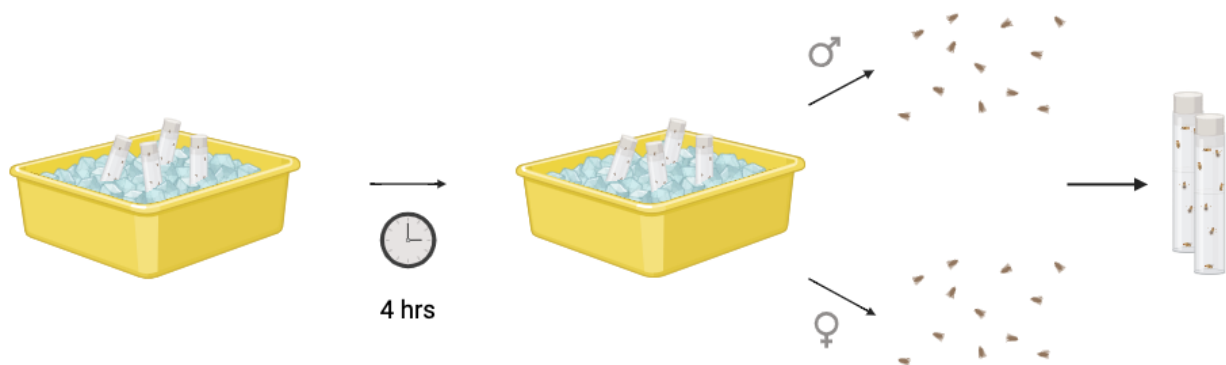
1. Οι *D. Melanogaster* μεταφέρονται σε κενά φιαλίδια και τοποθετούνται στον πάγο για 30 λεπτά για να αναισθητοποιηθούν.
2. Αναμειγνύονται 1200ml νερού με 2ml χρωστικής και τοποθετούνται στον κλειστό θάλαμο, εξασφαλίζοντας την ορατότητα της στάθμης του νερού στη μικροπιπέτα.
3. Σε μια μικροπιπέτα τοποθετείται μόνο soda lime και προορίζεται ως αρνητικός έλεγχος.
4. Στις υπόλοιπες μικροπιπέτες τοποθετούνται με την εξής σειρά: ένα κομμάτι σφουγγάρι, δύο soda lime pellets, δεύτερο κομμάτι σφουγγάρι (για να μην έρθουν οι μύγες σε άμεση επαφή με το soda lime), 6 μύγες και στο τέλος σφραγίζονται με παραφίλμ.
5. Οι μικροπιπέτες αφήνονται εκτός του θαλάμου για 15 λεπτά, έως ότου οι μύγες ανακάμψουν από την αναισθησία.
6. Στη συνέχεια, τοποθετούνται εντός του θαλάμου και αφήνονται για 15 λεπτά μέχρι να σταθεροποιηθούν.
7. Λαμβάνονται φωτογραφίες για την αποτύπωση της στάθμης του νερού σε κάθε μικροπιπέτα στην αρχική κατάσταση του συστήματος.
8. Με το πέρας 2 ωρών λαμβάνονται φωτογραφίες της τελικής κατάστασης του συστήματος.
9. Οι εικόνες αναλύονται με τη χρήση του λογισμικού ImageJ. Αρχικά από την εικόνα υπολογίζεται η διαφορά της στάθμης του νερού μεταξύ τελικής και αρχικής κατάστασης (Δd) για κάθε μικροπιπέτα. Η διαφορά αυτή αντικαθίσταται στην Εξίσωση 1 για τον υπολογισμό της παραγωγής CO₂.

2.7 Δοκιμασία αντοχής στο κρύο

Στη δοκιμασία αυτή, οι *D. Melanogaster* υποβάλλονται σε απότομη πτώση της θερμοκρασίας το οποίο προκαλεί μια κατάσταση που είναι γνωστή σε πολλά είδη ως «ψυχρό

κώμα». Κατά τη διάρκεια του ψυχρού κώματος, οι μύγες παραμένουν αδρανείς, σε μια μορφή παράλυσης, η οποία μπορεί να ανατραπεί όταν οι μύγες επιστρέφουν σε θερμότερες θερμοκρασίες [32]. Χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της αντοχής των μυγών στο κρύο και των επιπτώσεών του στους μηχανισμούς ανταπόκρισης σε αυτό. Έχει εφαρμοστεί σε μελέτες σχετικά με την κινητικότητα και το ζευγάρωμα των *D. Melanogaster* [33].

Για την έκθεση στο κρύο, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4**, οι μύγες διαχωρίστηκαν με βάση το φύλο και αφού μεταφέρθηκαν σε κενά φιαλίδια, τοποθετήθηκαν σε πάγο (θερμοκρασία 0°C). Μετά από χρονικό διάστημα 4 ωρών, αφαιρέθηκαν από τον πάγο και μεταφέρθηκαν από το φιαλίδιο, πάνω σε χαρτόνι στον εργαστηριακό πάγκο, σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μύγες παρατηρούνταν για 1 ώρα και κάθε 2 λεπτά καταγραφόταν ο αριθμός των μυγών που κατάφεραν να ξυπνήσουν. Όσες ξυπνούσαν, απομακρύνονταν με τη βοήθεια ενός σωλήνα αναρρόφησης.



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας έκθεσης σε κρύο των *Drosophila Melanogaster*, έπειτα από διαχωρισμό τους με βάση το φύλο. Οι μύγες παρέμειναν στον πάγο για 4 ώρες και έπειτα μεταφέρονταν στον εργαστηριακό πάγκο και καταμετρούνταν όσες ανέκαμπταν μέσα σε χρονικό διάστημα μίας ώρας. Οι μύγες που ξυπνούσαν επανατοποθετούνταν στα φιαλίδια για τη διενέργεια πειραμάτων ή θανατώνονταν.

Πιο συγκεκριμένα, οι μύγες που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες αρνητικής γεώταξης και μεταβολικού ρυθμού αξιοποιήθηκαν και για τη δοκιμασία ψυχρού κώματος. Αναλυτικά τα βήματα εκτέλεσης της μεθόδου συμπεριλαμβάνουν:

1. Οι *D. Melanogaster* διαχωρίζονται σε αρσενικές και θηλυκές και τοποθετούνται σε άδεια φιαλίδια.
2. Τα φιαλίδια με τις μύγες τοποθετούνται σε πάγο (0°C).
3. Οι μύγες παραμένουν στον πάγο για 4 ώρες.
4. Στη συνέχεια επανέρχονται σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Απλώνονται σε χαρτόνι στον εργαστηριακό πάγκο.

6. Κάθε 2 λεπτά καταμετρούνται οι μύγες που κατάφεραν να ξυπνήσουν σε χρονικό διάστημα 1 ώρας.

2.8 Αξιοποίηση του μοντέλου τεχνητής νοημοσύνης DeepLabCut

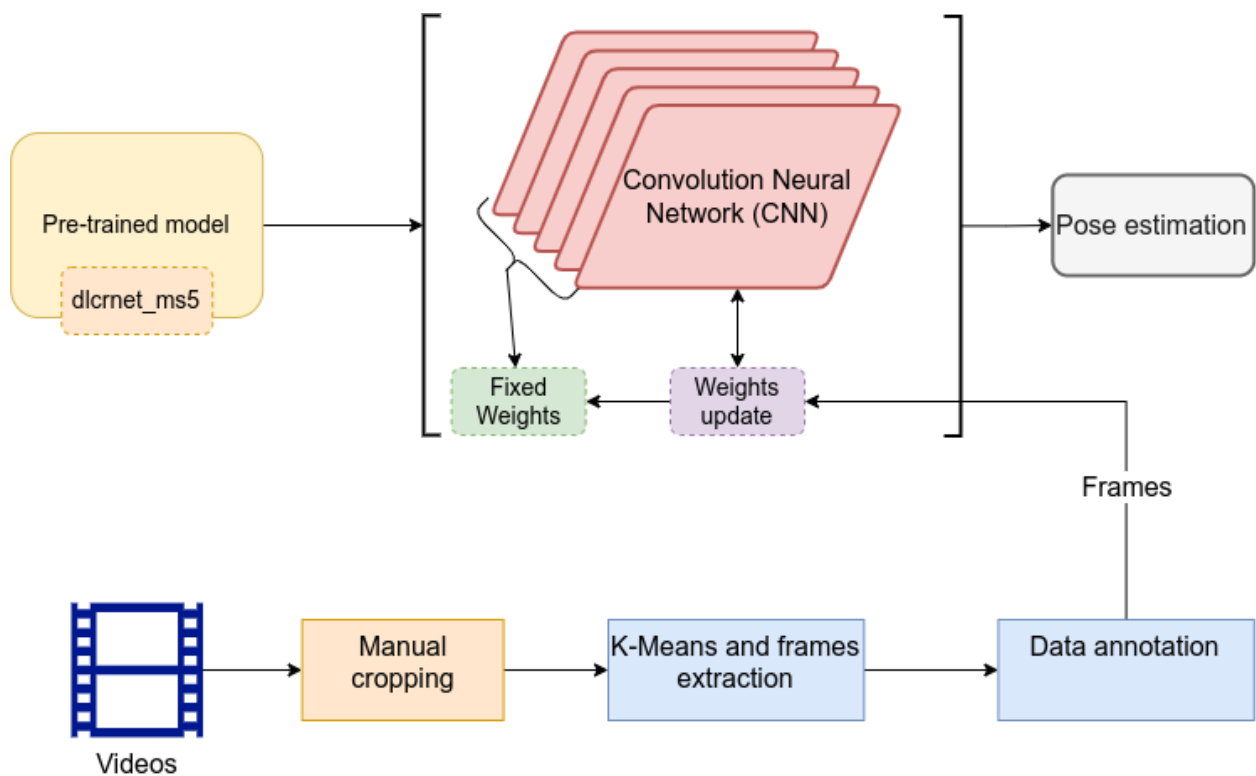
Για την καλύτερη αναγνώριση και ανάλυση της κινητικότητας των *D. Melanogaster* αξιοποιήθηκε το ελεύθερο εργαλείο βαθιάς μάθησης και υπολογιστικής όρασης DeepLabCut που αναπτύχθηκε ως πακέτο της Python και προτάθηκε από το εργαστήριο των Mathis et al. [34]. Το DeepLabCut βασίζεται σε προ-εκπαιδευμένα Συνελκτικά Νευρωνικά Δίκτυα (ΣΝΔ) και αποσκοπεί στην αποτελεσματική πρόβλεψη της στάσης του σώματος ζώων καθώς και στην εξαγωγή συμπερασμάτων για τον τρόπο συμπεριφοράς τους. Ειδικότερα, τα βάρη των ΣΝΔ του DeepLabCut έχουν προ-εκπαιδευτεί σε έναν μεγάλης κλίμακας όγκο δεδομένων, το ImageNet, το οποίο χρησιμοποιείται για την εκπαίδευση και αξιολόγηση τέτοιων μοντέλων. Συνεπώς, αξιοποιώντας την τεχνική μεταφοράς γνώσης, γενικεύουν τις δυνατότητες τους για μελλοντική ανάλυση παρόμοιων, μικρότερων συνόλων δεδομένων.

Για να προσαρμοστεί το DeepLabCut σε μια συγκεκριμένη εργασία, τα βάρη του εκπαιδεύονται σε εικόνες με ετικέτες, οι οποίες προσδιορίζουν τη θέση των σημείων ενδιαφέροντος του σώματος. Κατά την διάρκεια της εκπαίδευσης τα βάρη, μετά από πολλές επαναλήψεις, προσαρμόζονται σύμφωνα με τις ετικέτες, με στόχο την ακριβή πρόβλεψη των θέσεων του σώματος που έχουν επισημανθεί. Οι επαναλήψεις επιτρέπουν την ανάπτυξη ανιχνευτών χαρακτηριστικών εξειδικευμένων για τα σημεία ενδιαφέροντος, εξασφαλίζοντας την αποτελεσματική πρόβλεψη της θέσης τους. Η απόδοση του μοντέλου μετριέται σε pixels και καθορίζεται με βάση της τετραγωνικής ρίζας του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (Random Mean Square Error/RMSE) μεταξύ της απόστασης της ετικέτας (Ground truth) και της εκτίμησης του μοντέλου [35]. Εάν η απόδοση του μοντέλου είναι ικανοποιητική, τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση νέων βίντεο. Στη τελευταία έκδοση του DeepLabCut, περιλαμβάνεται ένα νέο δίκτυο, η αρχιτεκτονική του οποίου επεκτείνει τις δυνατότητές του, επιτρέποντας την εκτίμηση, αναγνώριση και διαρκή παρακολούθηση της θέσης πολλών ζώων (maDLC) [36]. Το δίκτυο αυτό αξιοποιήθηκε και για την ανάλυση των δεδομένων από τα πειράματα κινητικότητας των *D. Melanogaster*.

Για την προετοιμασία των δεδομένων έγινε πρώτα χειροκίνητη περικοπή των καταγεγραμμένων βίντεο, αφαιρώντας την πληροφορία εκτός από την περιοχή ενδιαφέροντος, δηλαδή τα φιαλίδια με τις μύγες. Τα επεξεργασμένα βίντεο περιορίστηκαν στην απεικόνιση ενός

φιαλιδίου με 10 μύγες ανά βίντεο, για την ευκολότερη επισήμανση των *D. Melanogaster* από τον χρήστη. Επιπλέον, η περικοπή εξασφάλισε μείωση του μεγέθους των δεδομένων και μικρότερες απαιτήσεις στον χρόνο εκπαίδευσης του μοντέλου. Στη συνέχεια, από τα επεξεργασμένα βίντεο, έγινε η εξαγωγή των εικόνων (100 εικόνες/βίντεο) αυτοματοποιημένα, με εφαρμογή του αλγόριθμου K-Means. Ο χαρακτηρισμός των δεδομένων έγινε χειροκίνητα με επισήμανση του σώματος των μυγών σε κάθε εικόνα. Σε περίπτωση κάποιας μύγας δεν ήταν αντιληπτή με ορισμένο βαθμό βεβαιότητας, επισημάνθηκαν μόνο οι μύγες που ήταν εύκολα αναγνωρίσιμες. Με την ολοκλήρωση της προ-επεξεργασίας προέκυψε το σύνολο δεδομένων που τροφοδοτήθηκε στο μοντέλο για την εκπαίδευσή του.

Ένας βασικός περιορισμός του DeepLabCut είναι ότι σε χαμηλής ισχύος υπολογιστικά μηχανήματα είναι χρονοβόρο και μη αποτελεσματικό. Για το λόγο αυτό συστήνεται η εκτέλεση των μοντέλων βαθιάς μάθησης σε κάρτες γραφικών υψηλών απαιτήσεων. Στη παρούσα εργασία το μοντέλο αναπτύχθηκε σε τοπικό μηχάνημα εξοπλισμένο με i7-13700 CPU, 16 GB RAM και Nvidia RTX 3060 12 GB GPU. Τα βήματα όλης της διαδικασίας απεικονίζονται στο **Διάγραμμα 1** και εκτελέστηκαν με την χρήση της γλώσσας προγραμματισμού Python και το εργαλείο συγγραφής κώδικα Visual Studio Code.



Διάγραμμα 1. Διάγραμμα ροής της μεθοδολογίας που εφαρμόστηκε για την ανάλυση της κινητικότητας των *Drosophila Melanogaster* με το εργαλείο Βαθιάς Μάθησης DeepLabCut.

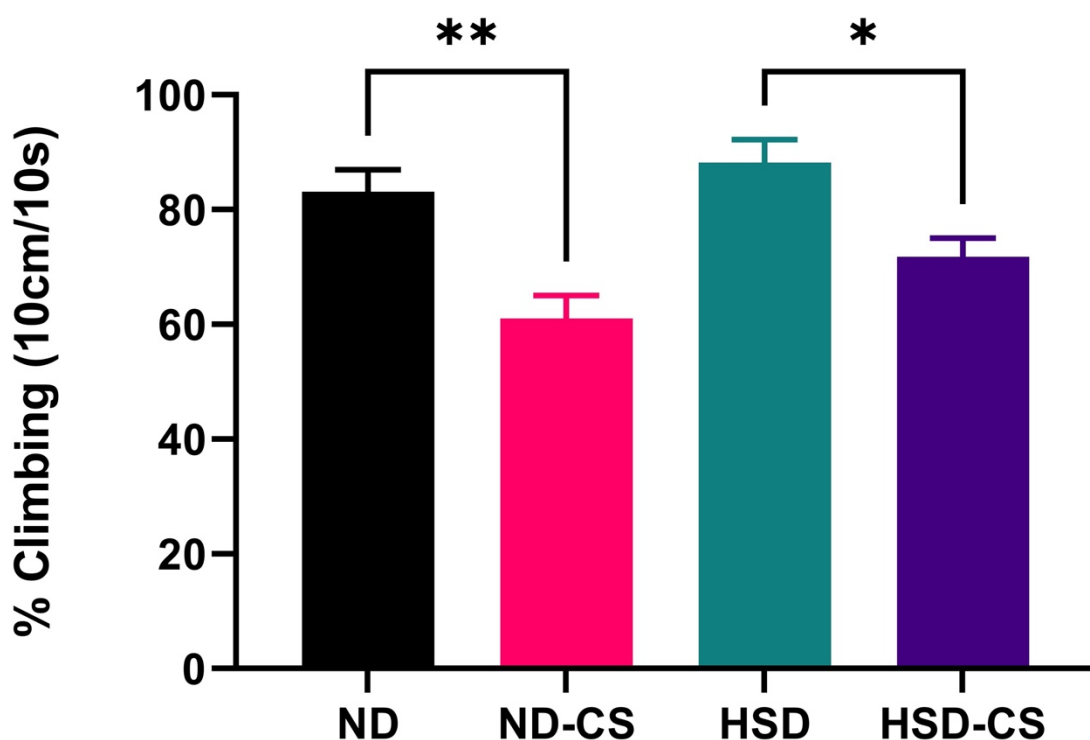
2.9 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν από την δοκιμασία αρνητικής γεώταξης, την δοκιμασία μεταβολών του μεταβολικού ρυθμού και της δοκιμασίας αντοχής στο κρύο πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό GraphPad Prism v.8.00. Πιο συγκεκριμένα τα δεδομένα της αρνητικής γεώταξης και του μεταβολικού ρυθμού, υποβλήθηκαν σε έλεγχο κανονικότητας, χρησιμοποιώντας το τεστ D'Agostino & Pearson και στη συνέχεια με βάση τα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκαν παραμετρικά τεστ One way ANOVA ή μη παραμετρικά τεστ Kruskal-Wallis test. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα μέσου όρου (mean \pm SEM) και θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά όταν το p value ήταν μικρότερο από 0.1. Τα πειραματικά δεδομένα από τη δοκιμασία αντοχής στο ψύχος υποβλήθηκαν σε ανάλυση επιβίωσης με τη μέθοδο Kaplan-Meier για τον υπολογισμό των καμπυλών επιβίωσης για κάθε πειραματική συνθήκη.

3 Αποτελέσματα

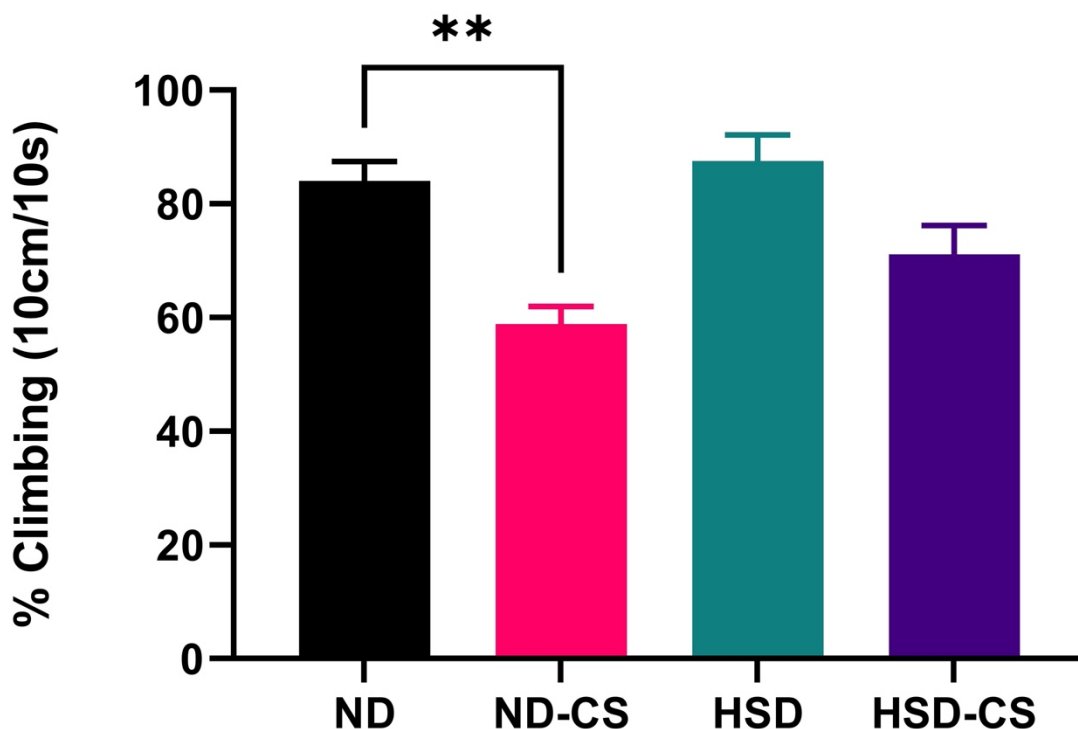
3.1 Αποτελέσματα αρνητικής γεώταξης

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της διαίτας και του καπνού τσιγάρου στην κινητικότητα των θηλυκών και αρσενικών *D. Melanogaster*. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται αναλυτικά στα **Διαγράμματα 2** και **3**. Τόσο στις αρσενικές όσο και στις θηλυκές *D. Melanogaster*, οι συνθήκες που παρουσίασαν το χαμηλότερο % ποσοστό των μυγών που κατάφεραν να αναρριχηθούν 10 cm μέσα σε 10 δευτερόλεπτα ήταν οι ND-CS (θηλυκές: 61 ± 4.069 , αρσενικές: 58.89 ± 3.093) και HSD-CS (θηλυκές: 71.82 ± 3.252 , αρσενικές: 71.11 ± 5.122).



Διάγραμμα 2. Αρνητική γεώταξη. % ποσοστό αναρρίχησης των θηλυκών *Drosophila Melanogaster* στα 10 cm μέσα σε χρονικό διάστημα 10 δευτερολέπτων (s), για κάθε πειραματική συνθήκη. $N = 90$ *Drosophila Melanogaster*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $mean \pm SEM$. * $p < 0.1$ και ** $p < 0.01$.

Όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 2**, στις θηλυκές μύγες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ικανότητα των μυγών να αναρριχηθούν 10 cm μέσα σε 10s μεταξύ των συνθηκών ND και ND-CS ($p = 0.001$) και HSD και HSD-CS ($p = 0.0321$). Αντίστοιχα στις αρσενικές μύγες, σύμφωνα με το **Διάγραμμα 3**, στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρείται μεταξύ των συνθηκών ND και ND-CS ($p = 0.0024$). Ωστόσο στις αρσενικές δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των συνθηκών HSD και HSD-CS, όπως στην περίπτωση των θηλυκών.



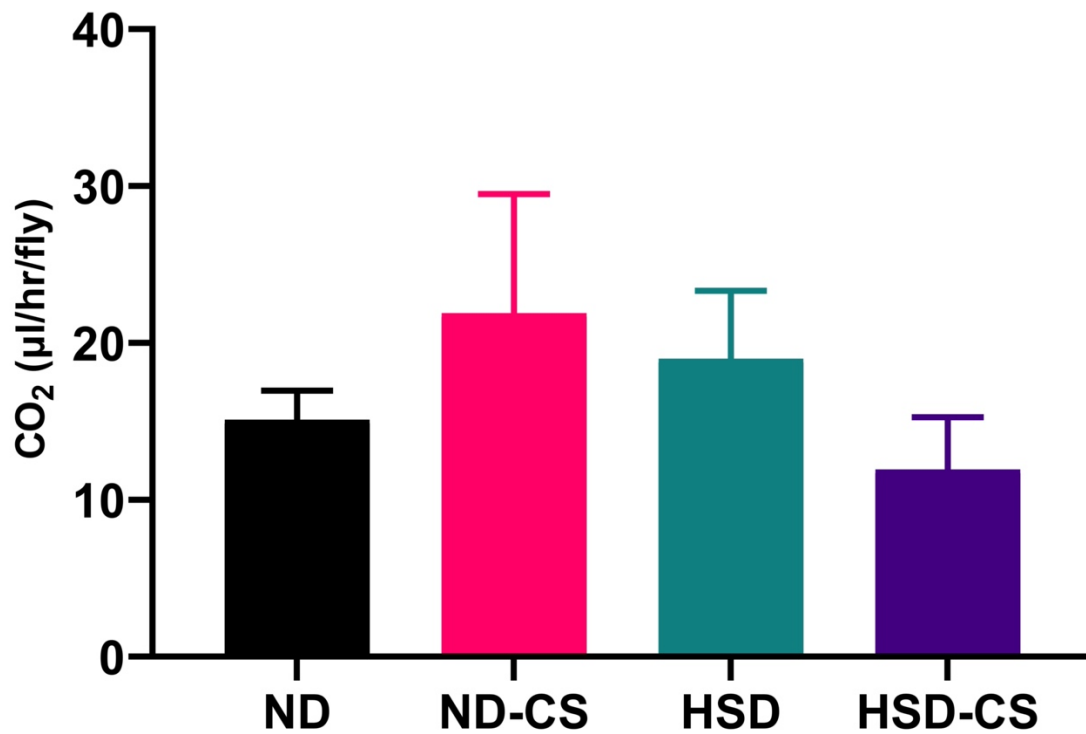
Διάγραμμα 3. Αρνητική γεώταξη. % ποσοστό αναρρίχησης των αρσενικών *Drosophila Melanogaster* στα 10 cm μέσα σε χρονικό διάστημα 10 δευτερολέπτων (s), για κάθε πειραματική συνθήκη. $N = 90$ *Drosophila Melanogaster*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $mean \pm SEM$. $** p < 0.01$.

3.2 Αποτελέσματα μεταβολών του μεταβολικού ρυθμού

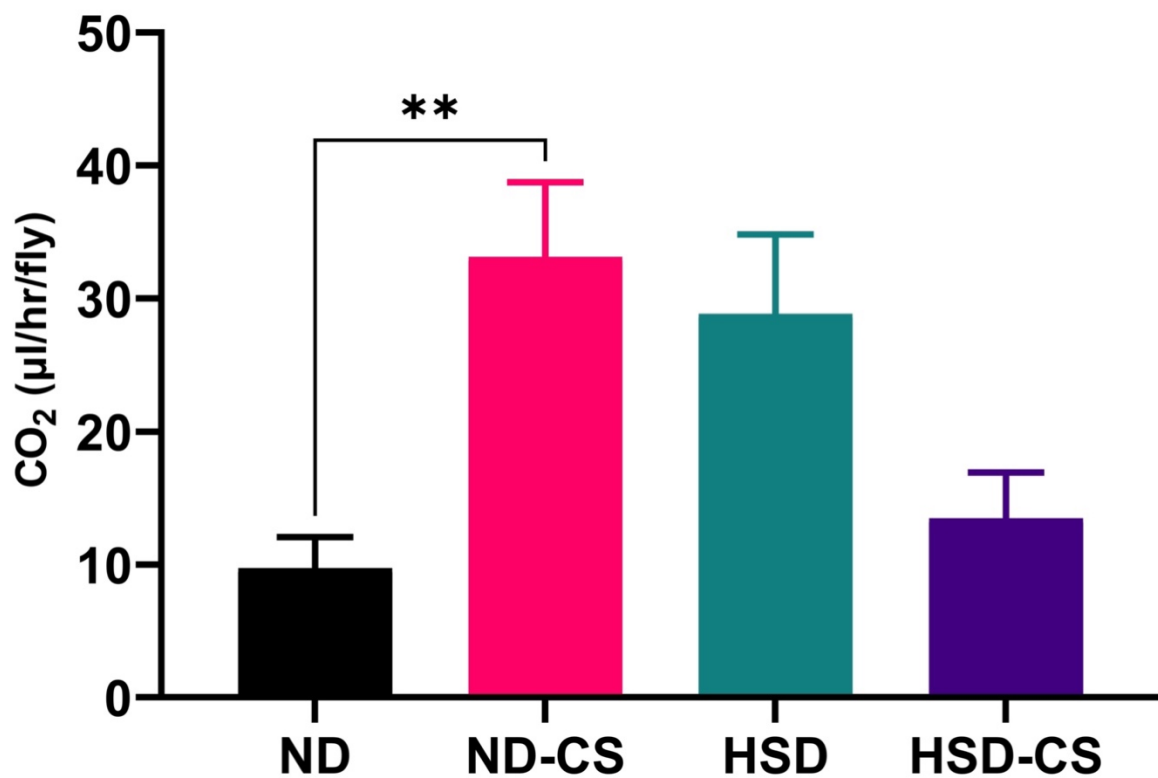
Από την μελέτη της επίδρασης της διαίτας και του καπνού τσιγάρου στον μεταβολικό ρυθμό των θηλυκών και αρσενικών *Drosophila Melanogaster*, προέκυψαν τα αποτελέσματα των **Διαγραμμάτων 4 και 5**, αντίστοιχα. Στις θηλυκές δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην παραγωγή CO_2 ($\mu\text{l/hr/fly}$) μεταξύ καμίας συνθήκης. Οι μύγες που ανατράφηκαν σε τυπικό θρεπτικό μέσο και εκτέθηκαν σε καπνό τσιγάρου και αυτές που ανατράφηκαν σε διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε ζάχαρη παράγαν το περισσότερο CO_2 , με $21,89 \pm 7.601$ και 19.00 ± 4.32 $\mu\text{l/hr/fly}$, αντίστοιχα. Η χαμηλότερη παραγωγή CO_2 καταγράφηκε στις μύγες HSD-CS (11.93 ± 3.334).

Στις αρσενικές *Drosophila Melanogaster*, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην παραγωγή CO_2 μεταξύ των μυγών που εκτέθηκαν στις πειραματικές συνθήκες ND και ND-CS ($p = 0.0078$), αλλά δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των υπόλοιπων συνθηκών. Όπως και στις θηλυκές οι *Drosophila Melanogaster* που παράγαν το περισσότερο CO_2 ήταν

όσες ανατράφηκαν στη συνθήκη ND-CS (33.12 ± 5.621) και στη συνθήκη HSD (28.84 ± 5.987). Επίσης στις αρσενικές τη χαμηλότερη παραγωγή CO παρουσίασαν οι μύγες HSD (13.46 ± 3.469).



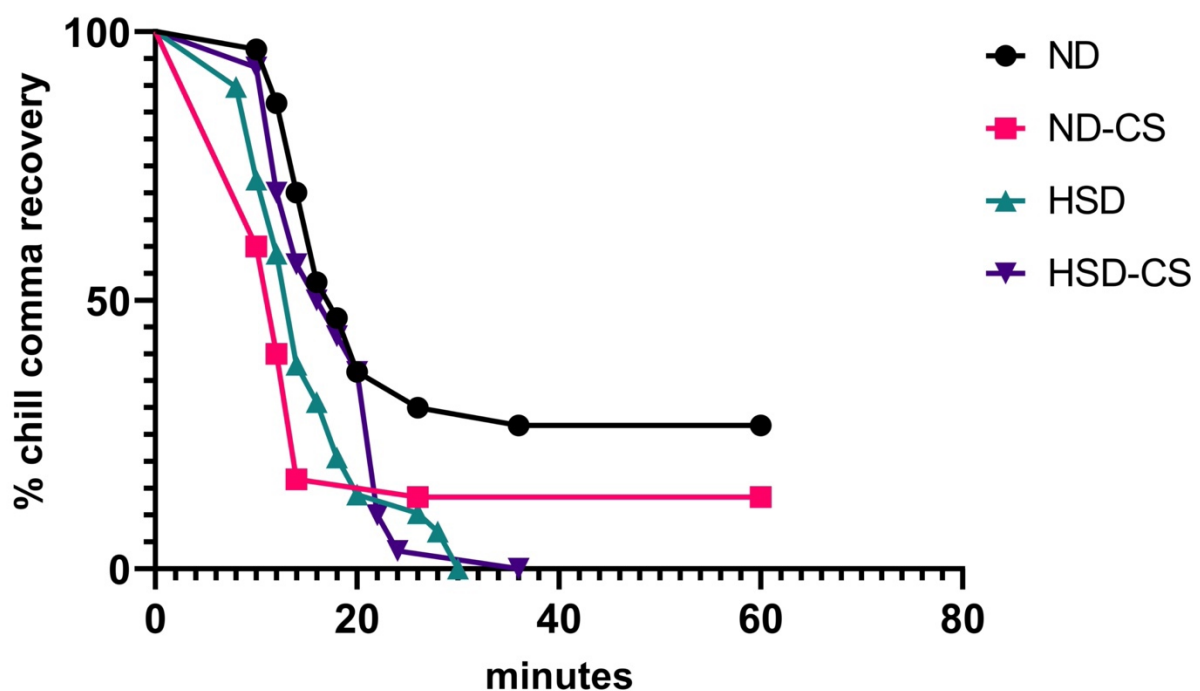
Διάγραμμα 4. Μεταβολικός ρυθμός. Παραγωγή CO₂ (μl/hr/fly) θηλυκών Drosophila Melanogaster, N = 90 Drosophila Melanogaster. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM.



Διάγραμμα 5. Μεταβολικός ρυθμός. Παραγωγή CO₂ (μl/hr/fly) αρσενικών *Drosophila Melanogaster*, N=90 *Drosophila Melanogaster*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM. ** p < 0.01

3.3 Αποτελέσματα δοκιμασίας αντοχής στο κρύο

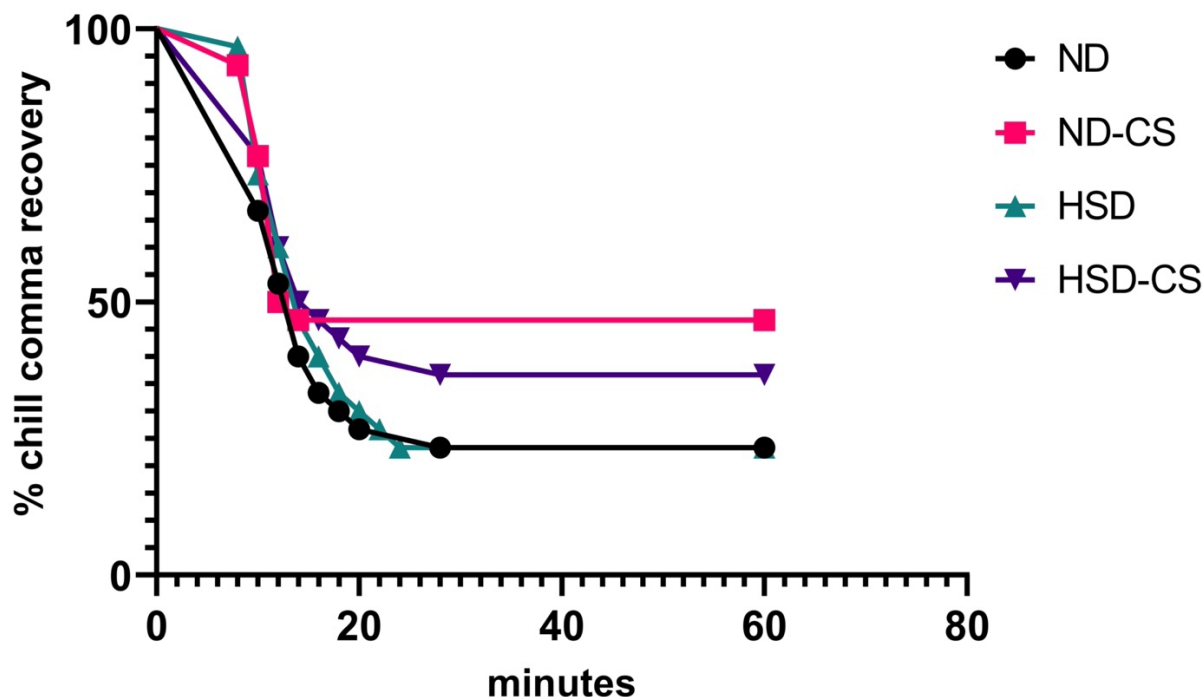
Μετά από τοποθέτηση των *Drosophila Melanogaster* στον πάγο για σύντομο χρονικό διάστημα (4 ώρες) με σκοπό τη διερεύνηση των επιπτώσεων της διαίτας και της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου στην ικανότητα των μυγών να ανακτήσουν τις αισθήσεις τους, προέκυψαν τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στα **Διαγράμματα 6 και 7**.



Διάγραμμα 6. Δοκιμασία αντοχής στο κρύο. % ποσοστό του αριθμού των θηλυκών *Drosophila Melanogaster* που κατάφεραν να ζυπνήσουν μέσα σε 60 λεπτά, μετά από την παραμονή τους σε πάγο για 4 ώρες, για κάθε πειραματική συνθήκη. N = 90 *Drosophila Melanogaster*.

Η ανάλυση επιβίωσης των θηλυκών *Drosophila Melanogaster* φαίνεται στο **Διάγραμμα 6**. Βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις καμπύλες επιβίωσης των θηλυκών μυγών ($p < 0.01$). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των καμπυλών επιβίωσης σε ζεύγη και βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των πειραματικών συνθηκών ND και ND-CS ($p = 0.0025$), ND και HSD ($p = 0.0009$).

Όσο αναφορά τις αρσενικές μύγες, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 7**. Δε βρέθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των καμπυλών επιβίωσης ND, ND-CS, HSD και HSD-CS. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι για να ανακάμψουν οι αρσενικές μύγες σε κάθε συνθήκη χρειάστηκε όλος ο διαθέσιμος χρόνος (60 λεπτά) σε σχέση με τις θηλυκές που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες HSD και HSD-CS οι οποίες ξύπνησαν σε συντομότερο χρονικό διάστημα (< 40 λεπτά).



Διάγραμμα 7. Δοκιμασία αντοχής στο κρύο. % ποσοστό του αριθμού των αρσενικών *Drosophila Melanogaster* που κατάφεραν να ξυπνήσουν μέσα σε 60 λεπτά, μετά από την παραμονή τους σε πάγο για 4 ώρες, για κάθε πειραματική συνθήκη. $N = 90$ *Drosophila Melanogaster*.

3.4 Αποτελέσματα μοντέλου DeepLabCut

Μετά από την καταγραφή των βίντεο από κάθε επανάληψη της δοκιμασίας αρνητικής γεώταξης, τα βίντεο μεταφέρονταν στον υπολογιστή και γινόταν η επεξεργασία τους. Από το σύνολο των βίντεο που καταγράφηκαν, επιλέχτηκαν τυχαία 5 (500 εικόνες συνολικά) και χρησιμοποιήθηκαν για την εκπαίδευση του μοντέλου. Η αρχιτεκτονική ΣΝΔ που επιλέχτηκε ήταν η `dlnet_ms5`, για την εκπαίδευση χρησιμοποιήθηκε το 80% των εικόνων και πλήθος επαναλήψεων 50000. Το υπόλοιπο 20% του συνόλου δεδομένων συνέβαλλε για την αξιολόγηση του μοντέλου. Το μοντέλο εκπαιδεύτηκε με τυχαία κατανομή (shuffles) των δεδομένων 3 φορές. Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του μοντέλου φαίνονται στον **Πίνακα 2**. Σύμφωνα με τον

πίνακα, παρατηρούμε ότι το μοντέλο έχει μέση τετραγωνική απόκλιση (RMSE) από 2.68 έως 3.85 pixels, από τη πραγματική τοποθεσία κάθε μύγας στο βίντεο. Να σημειωθεί ότι ένα μοντέλο θεωρείται αποδοτικό όσο το RMSE τείνει να είναι κοντά στο 0.

	Training iterations:	% Training dataset	Shuffle number	Train error(px)	Test error(px)
0	50000	80	1	3,38	3,85
1	50000	80	2	2,68	3,13
2	50000	80	3	3,27	3,13

Πίνακας 2. Μητρικές αξιολόγησης του μοντέλου ανά *shuffle*. Το σφάλμα εκπαίδευσης και αξιολόγησης μετρήθηκε σε *pixels*.

4 Συζήτηση

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, μια μεταβολική διαταραχή που επηρεάζει πάνω από μισό δισεκατομμύριο ανθρώπους παγκοσμίως, αναμένεται να έχει διπλάσιο επιπολασμό τα επόμενα χρόνια. Προκύπτει από μια σύνθετη αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, και συνδέεται ιδιαίτερα με την παχυσαρκία. Πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες έχουν επιστήσει την προσοχή στον κίνδυνο της έκθεσης στον καπνό του τσιγάρου, καθώς οι χημικές ενώσεις του μπορούν να ενισχύσουν τους υποκείμενους μηχανισμούς της νόσου. Η *Drosophila melanogaster*, ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος οργανισμός-μοντέλο, έχει αναδειχθεί σε πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη του διαβήτη τύπου 2 και της παχυσαρκίας λόγω των κοινών ρυθμιστικών μηχανισμών στις μεταβολικές διεργασίες μεταξύ ανθρώπων και μυγών. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν στελέχη Oregon-R *Drosophila Melanogaster* που εκτέθηκαν τόσο σε κανονική όσο και σε δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε ζάχαρη για 10 ημέρες, προσομοιώνοντας τον φαινότυπο του διαβήτη τύπου 2. Οι μισές από αυτές εκτέθηκαν επιπλέον, σε καθημερινή βάση, σε καπνό τσιγάρου. Στόχος ήταν να εκτιμηθεί η κινητικότητα τους, ο μεταβολικός ρυθμός και η αντοχή τους στο κρύο. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια ποσοτικοποίησης της κινητικότητας των μυγών με μεθόδους υπολογιστικής όρασης και τεχνητής νοημοσύνης.

Αρχικά μελετήθηκε η κινητικότητα των *D. Melanogaster*, καταγράφοντας το % ποσοστό αναρρίχησης τους σε 10 εκατοστά εντός 10 δευτερολέπτων, σύμφωνα με τη δοκιμασία αρνητικής γεώταξης. Με βάση τα αποτελέσματα, η κινητικότητα των μυγών φαίνεται να μην επηρεάστηκε από τον τύπο διαίτας στον οποίο ανατράφηκαν οι μύγες, καθώς μεταξύ των συνθηκών ND και HSD αλλά και των ND-CS και HSD-CS δεν σημειώθηκε σημαντική διαφορά ούτε στις θηλυκές ούτε στις αρσενικές μύγες. Ωστόσο και στα δύο φύλα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της κινητικότητας στις συνθήκες έκθεσης σε καπνό τσιγάρου. Ειδικότερα, στις θηλυκές τη χαμηλότερη κινητικότητα είχαν μύγες ND-CS με ποσοστό περίπου 61% το οποίο συγκριτικά με τις συνθήκες ND και HSD παρουσίαζε σημαντική μείωση. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μειωμένη κινητικότητα και μεταξύ των θηλυκών μυγών HSD και HSD-CS. Αντίστοιχα, στις αρσενικές τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικά μειωμένη κινητικότητα στις ND-CS, με ποσοστό μυγών που κατάφεραν να αναρριχηθούν περίπου 59%. Το ποσοστό αυτό ήταν σημαντικά μειωμένο σε σύγκριση με τα ποσοστά των ND και HSD.

Προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σχετικά με την κινητικότητα των μυγών έπειτα από έκθεση σε εκχύλισμα καπνού τσιγάρου (CSE), έδειξε ότι ο καπνός τσιγάρου επιδρά στην κινητικότητα και στα δύο φύλα *D. Melanogaster*, μειώνοντάς το % ποσοστό επιτυχημένης αναρρίχησης, κυρίως σε

χαμηλές συγκεντρώσεις CSE [25]. Ωστόσο, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι στην συγκεκριμένη περίπτωση η έκθεση είχε ξεκινήσει από την πατρική γενιά και η χορήγηση γινόταν μέσω της τροφής. Σχετικά με την επίδραση του θρεπτικού μέσου, σε μελέτη για την επίδραση δίαιτας HSD στην ικανότητα αναρρίχησης μετά από 10, 20 και 30 ημέρες ανατροφής των *Drosophila Melanogaster*, βρέθηκε ότι στο χρονικό διάστημα των 10 ημερών, θηλυκές και αρσενικές μύγες HSD παρουσίασαν μειωμένη κινητικότητα σε σχέση με την συνθήκη ND [37]. Ωστόσο, η μείωση που καταγράφηκε δεν ήταν τόσο μεγάλη. Επιπλέον, σε μελέτη για την επίδραση της υπεργλυκαιμίας στο οπτικό σύστημα της *D. Melanogaster* έπειτα από έκθεση σε HSD για 10 μέρες, οι μύγες υποβλήθηκαν σε δοκιμασία αρνητικής γεώταξης και από τα αποτελέσματα του πειράματος βρέθηκε ότι η κινητικότητα δεν παρουσίαζε μεγάλη διαφορά μεταξύ της συνθήκης HSD και ND [38]. Για να επιβεβαιώσουν περαιτέρω τα αποτελέσματα έλεγξαν δείγματα του θωρακικού μυϊκού ιστού των μυγών και από τις δύο πειραματικές συνθήκες και παρατήρησαν ότι διατηρήθηκαν σε υγιή κατάσταση ακόμα και μετά από 10 ημέρες σε συνθήκες HSD.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών επιβεβαιώνουν τις παρατηρήσεις που προέκυψαν από τα πειράματα. Από τις παρατηρήσεις της κινητικότητας των *Drosophila Melanogaster*, ο καπνός τσιγάρου φαίνεται να έχει τον κυρίαρχο ρόλο στην μείωση της κινητικότητας και στα δύο φύλα και όχι τόσο ο τύπος της δίαιτας.

Το κάπνισμα και η διατροφή επηρεάζουν σημαντικά το μεταβολισμό της ενέργειας τόσο στον ανθρώπινο οργανισμό όσο και στη *Drosophila Melanogaster*. Επιπλέον, η μεταβολική δραστηριότητα στη *D. Melanogaster* συνδέεται άμεσα με τον ρυθμό κατανάλωσης O_2 και παραγωγής CO_2 . Με τον υπολογισμό του CO_2 έγινε εκτίμηση του μεταβολικού ρυθμού των μυγών και στη συνέχεια έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων για όλες τις πειραματικές συνθήκες ND, ND-CS, HSD και HSD-CS. Οι τιμές του παραγόμενου CO_2 των θηλυκών ήταν παρόμοιες μεταξύ κάθε ομάδας, και δεν παρουσίασαν καμία στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση. Στις αρσενικές, στατιστικώς σημαντική διαφορά εντοπίστηκε μόνο μεταξύ των πειραματικών συνθηκών ND και ND-CS. Ειδικότερα, οι τιμές των ND-CS ήταν πολύ αυξημένες σε σύγκριση με τις ND και στο σύνολο των πειραματικών συνθηκών αποτελούσε την πειραματική ομάδα με την μεγαλύτερη παραγωγή CO_2 , ενώ η ND ήταν η ομάδα με τη χαμηλότερη.

Σε προηγούμενη μελέτη [25] χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος για την εκτίμηση του μεταβολικού ρυθμού σε *D. Melanogaster* που εκτέθηκαν σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις CSE για 10 ημέρες και βρέθηκε ότι μόνο οι αρσενικές μύγες παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα του παραγόμενου CO_2 και κυρίως στις υψηλές συγκεντρώσεις καπνού τσιγάρου. Οι παρατηρήσεις τους, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι μπορεί να υπάρχει διάκριση

μεταξύ των φύλων ως προς την επίδραση του καπνού τσιγάρου στον μεταβολικό ρυθμό και επιπλέον υπέθεσαν ότι η υπερκαπνία, δηλαδή η συσσώρευση μεγάλης ποσότητας CO₂ στους πνεύμονες, θα μπορούσε να ευθύνεται για την αύξηση του παραγόμενου CO₂, χωρίς όμως να υπάρχουν άλλα δημοσιευμένα τεκμήρια που να υποστηρίζουν την πρότασή τους. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται να συμφωνούν με τις παρατηρήσεις τους, καθώς σημειώθηκε διαφοροποίηση κυρίως στις αρσενικές και ο καπνός του τσιγάρου επηρέασε της μύγες σε τυπική διαίτα.

Σε άλλη μελέτη, ο τύπος της διαίτας και η επίδραση του στο μεταβολικό ρυθμό των *Drosophila Melanogaster* μελετήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο ρεσπιρομετρίας διακοπτόμενης ροής (stop-flow respirometry) [39]. Στη μελέτη αυτή διερεύνησαν πέντε διαφορετικούς τύπους διαίτας, τρεις με ισορροπημένη σύσταση (ίση πρωτεϊνική και θερμιδική σύσταση), μια με χαμηλή περιεκτικότητα σε μαγιά και υψηλή σε ζάχαρη, και μια με υψηλή περιεκτικότητα σε μαγιά και χαμηλή σε ζάχαρη. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων τους έδειξαν ότι η θερμιδική περιεκτικότητα της διαίτας έχει μικρότερη επίδραση στην κατανάλωση O₂, καθώς παρουσίασε μικρή διαφοροποίηση από τη διαίτα που είχε χαμηλή περιεκτικότητα και σε μαγιά και σε ζάχαρη. Κατέληξαν λοιπόν στο συμπέρασμα ότι διακυμάνσεις στη πρωτεϊνική σύσταση προκαλούσε ακραίες φαινοτυπικές αλλαγές, ανεξάρτητα από τη ποσότητα της ζάχαρης. Όντως και στη παρούσα μελέτη δεν φαίνεται να υπήρχε σημαντική επίδραση της διαίτας με υψηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη στον μεταβολικό ρυθμό. Φαίνεται πως η επίδραση του καπνού τσιγάρου διαδραματίζει τον κυρίαρχο ρόλο και στην παραγωγή CO₂ όπως και στην κινητικότητα.

Σε μελέτη σχετικά με την επίδραση της χρόνιας έκθεσης σε καπνό τσιγάρου στην αναπνευστική λειτουργία ποντικών που ανατράφηκαν σε διατροφή με υψηλά λιπαρά οξέα και εκδήλωσαν φαινότυπο παχυσαρκίας, δε βρέθηκαν σημαντικές επιπτώσεις που να προκαλούνται από το συνδυασμό της διαίτας και του καπνού τσιγάρου [40]. Βρήκαν ωστόσο ότι μεμονωμένα, η έκθεση σε καπνό τσιγάρου και η παχυσαρκία προκαλούν μορφολογικές αλλαγές στον ιστό των πνευμόνων. Επίσης οι αλλαγές είχαν σημαντική αύξηση σε παχύσαρκα ποντίκια που είχαν εκτεθεί σε καπνό τσιγάρου. Έλεγξαν επίσης για την έκφραση δεικτών φλεγμονής, κυρίως κυτταροκινών και βρήκαν ότι ο καπνός τσιγάρου ενισχύει τη φλεγμονή στους πνεύμονες αλλά η παχυσαρκία πιθανά να μπορεί να εξομαλύνει τις αρνητικές επιδράσεις του καπνού τσιγάρου, μέσω της χρόνιας αυξημένης παραγωγής IL-10 που παρατηρείται στην παχυσαρκία και η οποία μειώνει την έκφραση του CD86, μια πρωτεΐνη που ενεργοποιεί κυψελιδικά μακροφάγα στους πνεύμονες. Από τα δεδομένα αυτά, θα μπορούσε η δυσλειτουργία που προκαλεί ο καπνός τσιγάρου, και σε μικρότερο βαθμό ίσως η διαίτα HFD, στο αναπνευστικό σύστημα, να επηρεάζει την κατανάλωση O₂ και συνακόλουθα την παραγωγή CO₂. Αν και στην παρούσα μελέτη δε χρησιμοποιήθηκε HFD,

και οι δύο δίαιτες επάγουν αντίσταση στην ινσουλίνη και υπεργλυκαιμία. Συγκριτικά συνεπώς με την παρούσα μελέτη, μπορεί να εξηγείται η αύξηση στην συνθήκη ND και η διαφορά της με την ND-CS, καθώς και των παρατηρήσεων των μυγών που εκτέθηκαν σε HSD-CS, οι οποίες πλησιάζουν αυτές των ND που σημαίνει ότι μπορεί όντως το αυξημένο θερμιδικό φορτίο της δίαιτας να εξομαλύνει της επιδράσεις του καπνού τσιγάρου στην λειτουργία των πνευμόνων.

Τα ενεργειακά αποθέματα και η ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού παίζουν ρόλο στην ενίσχυση του μηχανισμού ανοχής στο κρύο στη *D. Melanogaster*. Επιπλέον η επιβίωση των μυγών μετά από απότομη έκθεση σε κρύο βασίζεται στην ικανότητα διατήρησης της ιοντικής ισορροπίας σε όλο τον οργανισμό. Η υψηλή σε σάκχαρα διατροφή και η έκθεση σε καπνό τσιγάρου έχουν αρνητικό αντίκτυπο στη φυσιολογική λειτουργία αυτών των μηχανισμών. Στη παρούσα μελέτη για τη διερεύνηση της ανοχής των *D. Melanogaster* στο κρύο μετά από έκθεση τους σε HSD ή/και καπνό τσιγάρου, οι μύγες τοποθετήθηκαν σε πάγο για 4 ώρες και στη συνέχεια καταγράφηκαν όσες κατάφεραν να ανακτήσουν τις αισθήσεις τους μέσα σε μία ώρα. Οι τελικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι στις θηλυκές οι συνθήκες ND-CS, HSD και HSD-CS εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική διαφορά με τη συνθήκη ND. Οι θηλυκές HSD και HSD-CS ανέκτησαν τις αισθήσεις τους γρηγορότερα από όλες τις μύγες των υπόλοιπων συνθηκών, ενώ μεταξύ ND και ND-CS η πλειονότητα των μυγών ανέκαμψε γρηγορότερα στη πρώτη.

Στη μελέτη [39] διερεύνησαν επιπλέον και την επίδραση του τύπου δίαιτας στην επιβίωση τους μετά από χρόνια έκθεση σε ακραία ψυχρές θερμοκρασίες. Παρατήρησαν ότι η αντίσταση σε στρες επαγόμενο από το κρύο είχε συσχέτιση με τον τύπο της δίαιτας. Ειδικότερα, οι μύγες που ανατράφηκαν σε ισορροπημένους τύπους διατροφής παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία στο κρύο σε σχέση με αυτές που τρεφόντουσαν με τύπο δίαιτας χαμηλής περιεκτικότητας σε μαγιά και υψηλής σε ζάχαρη και το αντίστροφο. Ωστόσο, παρατήρησαν ότι σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες, η χαμηλή σύσταση σε υδατάνθρακες είχε αρνητική επίδραση στην ανάκαμψη τους μετά από έκθεση σε κρύο. Το συμπέρασμα τους αντιτίθεται στην παρατήρηση που έγινε στην παρούσα μελέτη, όπου στις θηλυκές μύγες που ανατράφηκαν σε δίαιτα με υψηλή θερμιδική σύσταση επανήλθαν από την κωματώδη κατάσταση γρηγορότερα. Επίσης, τόσο οι αρσενικές όσο και οι θηλυκές που είχαν πρόσβαση σε τυπικό θρεπτικό μέσο καθυστέρησαν να ξυπνήσουν μετά από το «ψυχρό κώμα».

Σε άλλη έρευνα, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ζάχαρης στην τροφή των *Drosophila Melanogaster* στην ανοχή τους στο στρες [41]. Για την ανοχή στο κρύο, οι μύγες κάθε συνθήκης εκτέθηκαν για ένα λεπτό σε πάγο και στη συνέχεια μετρήθηκαν αυτές που ξύπνησαν. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι η ανοχή στο κρύο σχετίζεται κυρίως με την

περιεκτικότητα σε ζάχαρη, ενώ παράγοντες όπως το φύλο δεν φαίνεται να παίζουν ρόλο. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ζάχαρης, η αντίσταση στο κρύο ήταν πιο αυξημένη σε σχέση με τις υψηλότερες. Οι παρατηρήσεις της συγκεκριμένης μελέτης και της παρούσας δεν συμφωνούν, ωστόσο όπως αναφέρουν οι ερευνητές η αντίσταση στο στρες στη *Drosophila Melanogaster* ρυθμίζεται κυρίως από πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins/HSP), οι οποίες σύμφωνα με μελέτη της επίδρασης της διαίτας υψηλής περιεκτικότητας σε ζάχαρη σε σύγκριση με τυπική διαίτα σε αρουραίους είχαν αυξημένη έκφραση μετά από έκθεση σε στρες [42]. Η συσχέτιση αυτή θα μπορούσε να αποτελεί πιθανή εξήγηση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης σχετικά με την επίδραση της διαίτας στην αντοχή στο κρύο στη *Drosophila Melanogaster*.

Η παρακολούθηση και η αξιολόγηση των προτύπων συμπεριφοράς των πειραματόζωων αποτελεί βασικό ερευνητικό στόχο σε διάφορους επιστημονικούς κλάδους. Πρόσφατα, οι εξελίξεις στην επιστήμη των υπολογιστών, ιδίως η εξέλιξη της τεχνητής νοημοσύνης, και η ενσωμάτωση των μοντέλων βαθιάς μάθησης στην ιατρική έρευνα, έχουν σημειώσει μεγάλη πρόοδο προς αυτή την κατεύθυνση. Στην παρούσα μελέτη, παράλληλα με την αξιολόγηση της κινητικότητας των *Drosophila Melanogaster* με τις παραδοσιακές εργαστηριακές μεθόδους, έγινε προσπάθεια αξιοποίησης καινοτόμων υπολογιστικών μεθόδων για την ερμηνεία των δεδομένων από την δοκιμασία αρνητικής γεώταξης. Ο στόχος ήταν να αναπτυχθεί ένα ολοκληρωμένο μοντέλο για την ανίχνευση μυγών και την υπολογιστική ανάλυση της συμπεριφοράς τους, εύκολα αναπαραγωγίσιμο σε παρόμοιες μελλοντικές έρευνες. Δυστυχώς, η απόδοση του αρχικού μοντέλου δεν ήταν ικανοποιητική, καθώς αντιμετώπισε προκλήσεις στο να εντοπίσει και να παρακολουθήσει τις κινήσεις των μυγών. Η πρόκληση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στο μικρό μέγεθος της μύγας, που την καθιστά δυσδιάκριτη στα βίντεο, ακόμη και κατά την επισήμανση της εικόνας με γυμνό μάτι. Σύμφωνα με τους προγραμματιστές του μοντέλου, το DeepLabCut έχει σχεδιαστεί για να προβλέπει με ακρίβεια ακόμη και σε δεδομένα βίντεο με υψηλό θόρυβο, χωρίς περιορισμούς με βάση τον εξοπλισμό της κάμερας [35]. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της μελέτης υποδηλώνουν ότι, στην περίπτωση των *D. Melanogaster*, η ανάλυση μιας τυπικής συσκευής τηλεφώνου πιθανά να είναι ανεπαρκής. Ένας άλλος πιθανός παράγοντας που συμβάλλει στην αδυναμία του μοντέλου να αναλύσει νέα βίντεο θα μπορούσε να είναι ότι κατά την προ-εκπαίδευση του μοντέλου, τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλότερης ανάλυσης, όπου τα μέρη του σώματος της μύγας ήταν σαφώς ορατά, όπως βίντεο και εικόνες που έχουν ληφθεί με τη χρήση μικροσκοπίου.

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε για τον προσδιορισμό της επίδρασης του τύπου της διαίτας και της έκθεσης σε καπνό τσιγάρο στην κινητικότητα, στον μεταβολικό ρυθμό και στην αντοχή στο κρύο, χρησιμοποιώντας μύγες *Drosophila Melanogaster*. Βρέθηκε μειωμένη

κινητικότητα σε αρσενικές και θηλυκές μύγες μετά από έκθεση σε καπνό τσιγάρου, μειωμένος μεταβολικός ρυθμός στις αρσενικές τυπικής διαίτας και αυξημένος στις αρσενικές τυπικής διαίτας και έκθεσης σε καπνό τσιγάρου. Επίσης, βρέθηκε υψηλή αντοχή στο κρύο στις θηλυκές που ανατράφηκαν σε δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε ζάχαρη και σε θηλυκές που εκτέθηκαν στο συνδυασμό διαίτας με υψηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη και έκθεσης σε καπνό τσιγάρου. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, αλλά δεν υπάρχουν άλλες μελέτες σε μοντέλο *Drosophila Melanogaster* για την αλληλεπίδραση των δύο συνθηκών που να τα επιβεβαιώνουν. Συνολικά, τα ευρήματα δείχνουν ότι η *Drosophila Melanogaster* αποτελεί αξιόπιστο πειραματικό μοντέλο μελέτης των επιπτώσεων του καπνού τσιγάρου, της διαίτας αλλά και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης. Με την ευρύτερη εφαρμογή του σε μελέτες μεταβολικών διαταραχών όπως η παχυσαρκία και ο διαβήτης τύπου 2 θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέα συμπεράσματα για τους μοριακούς μηχανισμούς που τις χαρακτηρίζουν και που καθιστούν το κάπνισμα παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2.

5 Βιβλιογραφία

1. Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, Fumagalli L. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs. *Molecules*. 2020 Apr 23;25(8):1987.
2. Dariya B, Chalikonda G, Srivani G, Alam A, Nagaraju GP. Pathophysiology, Etiology, Epidemiology of Type 1 Diabetes and Computational Approaches for Immune Targets and Therapy. *Crit Rev Immunol*. 2019;39(4):239–65.
3. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: *Standards of Medical Care in Diabetes—2021*. *Diabetes Care*. 2021 Jan 1;44(Supplement_1):S15–33.
4. Ahmad E, Lim S, Lamptey R, Webb DR, Davies MJ. Type 2 diabetes. *The Lancet*. 2022 Nov;400(10365):1803–20.
5. Lyssenko V, Vaag A. Genetics of diabetes-associated microvascular complications. *Diabetologia*. 2023 Sep;66(9):1601–13.
6. Viigimaa M, Sachinidis A, Toumpourleka M, Koutsampasopoulos K, Alliksoo S, Titma T. Macrovascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Vasc Pharmacol*. 2020 Jan 27;18(2):110–6.
7. Gil-Rivera M, Medina-Gali RM, Martínez-Pinna J, Soriano S. Physiology of pancreatic β -cells: Ion channels and molecular mechanisms implicated in stimulus-secretion coupling. In: *International Review of Cell and Molecular Biology* [Internet]. Elsevier; 2021 [cited 2023 Sep 30]. p. 287–323. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1937644821000113>
8. Rahman MS, Hossain KS, Das S, Kundu S, Adegoke EO, Rahman MdA, et al. Role of Insulin in Health and Disease: An Update. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 15;22(12):6403.
9. Rachdaoui N. Insulin: The Friend and the Foe in the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 5;21(5):1770.
10. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 30;21(17):6275.
11. Lee SH, Park SY, Choi CS. Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes Metab J*. 2022 Jan 31;46(1):15–37.
12. Eizirik DL, Pasquali L, Cnop M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nat Rev Endocrinol*. 2020 Jul;16(7):349–62.
13. Kolb H, Martin S. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Med*. 2017 Dec;15(1):131.
14. Piché ME, Tchernof A, Després JP. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circ Res*. 2020 May 22;126(11):1477–500.
15. Ruze R, Liu T, Zou X, Song J, Chen Y, Xu R, et al. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. *Front Endocrinol*. 2023 Apr 21;14:1161521.

16. World Health Organization. Tobacco. [Accessed 2023]. Available from: <https://www.who.int/health-topics/tobacco>
17. Soleimani F, Dobaradaran S, De-la-Torre GE, Schmidt TC, Saeedi R. Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: A comprehensive systematic review. *Sci Total Environ.* 2022 Mar;813:152667.
18. Maddatu J, Anderson-Baucum E, Evans-Molina C. Smoking and the risk of type 2 diabetes. *Transl Res.* 2017 Jun 1;184:101–7.
19. Chen Z, Liu X an, Kenny PJ. Central and peripheral actions of nicotine that influence blood glucose homeostasis and the development of diabetes. *Pharmacol Res.* 2023 Aug 1;194:106860.
20. Yang Y, Yang C, Lei Z, Rong H, Yu S, Wu H, et al. Cigarette smoking exposure breaks the homeostasis of cholesterol and bile acid metabolism and induces gut microbiota dysbiosis in mice with different diets. *Toxicology.* 2021 Feb;450:152678.
21. Eickelberg V, Lüersen K, Staats S, Rimbach G. Phenotyping of *Drosophila Melanogaster*—A Nutritional Perspective. *Biomolecules.* 2022 Jan 27;12(2):221.
22. Rajan A, Perrimon N. Of flies and men: insights on organismal metabolism from fruit flies. *BMC Biol.* 2013 Apr 15;11(1):38.
23. Chatterjee N, Perrimon N. What fuels the fly: Energy metabolism in *Drosophila* and its application to the study of obesity and diabetes. *Sci Adv.* 2021 Jun;7(24):eabg4336.
24. Liguori F, Mascolo E, Verni F. The Genetics of Diabetes: What We Can Learn from *Drosophila*. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan;22(20):11295.
25. Μαργάς ΠΧ. Exposure of *Drosophila Melanogaster* to cigarette smoke extract and effects on its body weight, metabolic rate and locomotion. 2023 [cited 2023 Oct 10]; Available from: <http://ir.lib.uth.gr/xmlui/handle/11615/81655>
26. Ehrhardt B, El-Merhie N, Kovacevic D, Schramm J, Bossen J, Roeder T, et al. Airway remodeling: The *Drosophila* model permits a purely epithelial perspective. *Front Allergy* [Internet]. 2022 [cited 2023 Oct 16];3. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/falgy.2022.876673>
27. Rouka E, Gourgoulianni N, Lüpold S, Hatzoglou C, Gourgoulisanis KI, Zarogiannis SG. Prediction and enrichment analyses of the *Homo sapiens-Drosophila melanogaster* COPD-related orthologs: potential for modeling of human COPD genomic responses with the fruit fly. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* 2022 Jan 1;322(1):R77–82.
28. Kaun KR, Devineni AV, Heberlein U. *Drosophila melanogaster* as a model to study drug addiction. *Hum Genet.* 2012 Jun;131(6):959–75.
29. Zhong L, Yang ZZ, Tang H, Xu Y, Liu X, Shen J. Differential analysis of negative geotaxis climbing trajectories in *Drosophila* under different conditions. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2022;111(2).
30. Yatsenko AS, Marrone AK, Kucherenko MM, Shcherbata HR. Measurement of Metabolic Rate in *Drosophila* using Respirometry. *J Vis Exp.* 2014;(88).

31. Fiorino A, Thompson D, Yadlapalli S, Jiang C, Shafer Oriet, Reddy P, et al. Parallelized, real-time, metabolic-rate measurements from individual *Drosophila*. *Sci Rep*. 2018;8(1).
32. Anderson AR, Hoffmann AA, McKECHNIE SW. Response to selection for rapid chill-coma recovery in *Drosophila melanogaster*: physiology and life-history traits. *Genet Res*. 2005 Feb;85(1):15–22.
33. Garcia MJ, Teets NM. Cold stress results in sustained locomotor and behavioral deficits in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Zool Part Ecol Integr Physiol*. 2019;331(3):192–200.
34. Mathis A, Mamidanna P, Cury KM, Abe T, Murthy VN, Mathis MW, et al. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat Neurosci*. 2018 Sep;21(9):1281–9.
35. Nath T, Mathis A, Chen AC, Patel A, Bethge M, Mathis MW. Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors. *Nat Protoc*. 2019 Jul;14(7):2152–76.
36. Lauer J, Zhou M, Ye S, Menegas W, Schneider S, Nath T, et al. Multi-animal pose estimation, identification and tracking with DeepLabCut. *Nat Methods*. 2022 Apr;19(4):496–504.
37. Baenas N, Wagner AE. *Drosophila melanogaster* as a Model Organism for Obesity and Type-2 Diabetes Mellitus by Applying High-Sugar and High-Fat Diets. *Biomolecules*. 2022 Feb 14;12(2):307.
38. Catalani E, Silvestri F, Bongiorno S, Taddei AR, Fanelli G, Rinalducci S, et al. Retinal damage in a new model of hyperglycemia induced by high-sucrose diets. *Pharmacol Res*. 2021 Apr;166:105488.
39. Henry Y, Overgaard J, Colinet H. Dietary nutrient balance shapes phenotypic traits of *Drosophila melanogaster* in interaction with gut microbiota. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2020 Mar;241:110626.
40. Rémy G, Dubois-Deruy E, Alard J, Kervoaze G, Chwastyniak M, Baron M, et al. Modelling the Impact of Chronic Cigarette Smoke Exposure in Obese Mice: Metabolic, Pulmonary, Intestinal, and Cardiac Issues. *Nutrients*. 2020 Mar 20;12(3):827.
41. Strilbytska O, Strutynska T, Semaniuk U, Burdylyk N, Bubalo V, Lushchak O. Dietary Sucrose Determines Stress Resistance, Oxidative Damages, and Antioxidant Defense System in *Drosophila*. Cherniack EP, editor. *Scientifica*. 2022 May 2;2022:1–12.
42. Kanazawa M, Xue CY, Kageyama H, Suzuki E, Ito R, Namba Y, et al. Effects of a High-sucrose Diet on Body Weight, Plasma Triglycerides, and Stress Tolerance. *Nutr Rev*. 2003 May 1;61(suppl_5):S27–33.

6 Βιογραφικό Σημείωμα

Προσωπικά Στοιχεία

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Ζωή Μαλάμη

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 13/12/1997

ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Θεσσαλονίκη

ΤΟΠΟΣ ΚΑΤΑΓΩΓΗΣ: Θεσσαλονίκη

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: Λεωφόρος Φλέμινγκ 64, Άγιος Ιωάννης Ρέντης, 18233

ΤΗΛΕΦΩΝΟ: 6981581443

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ ΤΑΧΥΔΡΟΜΕΙΟΥ: zmalami@uth.gr

ΓΝΩΣΗ Η/Υ: C, Java, Python, SQL (mySQL), Perl, R, MATLAB/Octave, Linux, MS Office

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΙΣ: ΑΓΓΛΙΚΑ - Άριστη (C2 ECPE Michigan)

Εκπαίδευση

Πτυχίο του Τμήματος Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (2016 – 2022)

Βαθμός: 6,88 (Λίαν Καλώς)

Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά:

Z. Μαλάμη, Ε. Παπάζογλου, Σ. Ζαρογιάννης. Ο ρόλος της προπρανολόλης στη θεραπεία του καρκίνου. Υπό αποστολή στα *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής*.