



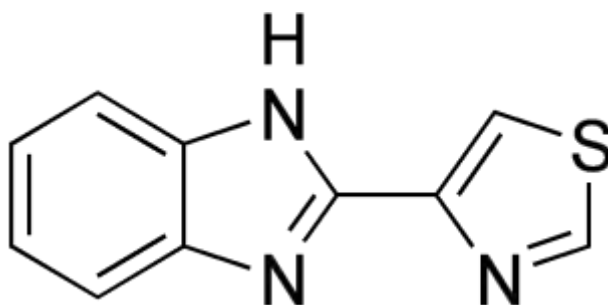
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**« Μελέτη της αποτοξικοποίησης του μυκητοκτόνου
Thiabendazole από μια κοινότητα πρωτοβακτηρίων »**



ΒΕΡΟΥΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

« Μελέτη της αποτοξικοποίησης του μυκητοκτόνου Thiabendazole από μια κοινότητα πρωτοβακτηρίων »

Υπεύθυνη καθηγήτρια

Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής επιτροπή

- Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Λιαδάκη Καλλιόπη και τον κύριο Δημήτριο Καρπούζα υπό την επίβλεψη των οποίων πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία για την πολύτιμη βοήθεια και καίρια παρέμβαση τους καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής και συγγραφικής εργασίας της διπλωματικής αυτής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Chiara Perruchon για την επίβλεψη και βοήθεια που μου παρείχε πρόθυμα στα διάφορα πειραματικά στάδια. Ακόμα ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την αρμονική συνεργασία καθ'όλη τη διάρκεια της παραμονής μου σε αυτό.

Τέλος, θα ήθελα ιδιαίτερος να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την πλήρη υποστήριξη τους κατά την διάρκεια της φοίτησης μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το Thiabendazole (TBZ) είναι μυκητοκτόνο, παρασιτοκτόνο και αντιελμινθικό φάρμακο που ανήκει στην οικογένεια των βενζιμιδαζολικών, βρίσκει εφαρμογές κυρίως στην βιομηχανία τροφίμων ως χημικό μυκητοκτόνο και παρασιτοκτόνο καθώς εφαρμόζεται στα μετασυλλεκτικά στάδια. Ο κύριος τρόπος δράσης του TBZ ως μυκητοκτόνου είναι η αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης. Η πρόσδεση του TBZ στα μόρια β-τουμπουλίνης έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του πολυμερισμού για τη δημιουργία του μικροσωληνισκού και τη διακοπή του σχηματισμού της μιτωτικής ατράκτου. Το TBZ αποτελεί περιβαλλοντικό ρύπο κατά την χρήση του ως μυκητοκτόνο μετασυλλεκτικά σε φρούτα και λαχανικά. Μη ορθές πρακτικές επεξεργασίας και χειρισμού των αποβλήτων που παράγονται από την εφαρμογή του TBZ μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα την συστηματική διάχυση υπολειμμάτων του TBZ στο περιβάλλον θέτοντας σε κίνδυνο οργανισμούς μη στόχους. Η μικροβιακή αποδόμηση θεωρείται η πιο σημαντική διαδικασία απομάκρυνσης γεωργικών φαρμάκων από ρυπασμένα εδάφη. Εμπλουτισμένες καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο του διδακτορικού τη C. Perruchon οδήγησαν στην απομόνωση μιας βακτηριακής κοινότητας που αποδομούσε ταχύτατα το TBZ. Παρόλα αυτά δεν είναι γνωστά τα προϊόντα μεταβολισμού του TBZ και έτσι δεν μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες για το αν η διαδικασία μικροβιακής αποδόμησης του TBZ από την συγκεκριμένη βακτηριακή κοινότητα οδηγεί και σε αποτοξικοποίηση. Για το λόγο αυτό κρίθηκε αναγκαίο να εκτιμηθεί αρχική η τιμή IC₅₀ του TBZ και στην συνέχεια να προσδιοριστεί η τοξικότητα των υγρών καλλιεργειών ύστερα από την πλήρη διάσπαση του TBZ. Για να προσδιοριστεί ο δείκτης τοξικότητας IC₅₀ κύτταρα HepG2 επωάστηκαν με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις TBZ και το IC₅₀ προσδιορίστηκε στο εύρος 275-280 μg/ml. Στη συνέχεια καλλιεργήθηκε η βακτηριακή κοινότητα σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο MSMN όπου το TBZ αποτελούσε την μοναδική πηγή C. Το TBZ διασπάστηκε πλήρως εντός 28 ημερών. Μετά το πέρας της διάσπασης κύτταρα HepG2 επωάστηκαν με δείγματα της υγρής καλλιέργειας των βακτηρίων ώστε να διαπιστωθεί εάν οι πιθανοί μεταβολίτες που παρήχθησαν επηρεάζουν την ανάπτυξη των κυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αποδόμηση του TBZ οδηγεί και σε απώλεια της τοξικής δράσης καταδεικνύοντας ότι η βακτηριακή κοινότητα αποτοξικοποιεί επιτυχώς το TBZ. Η ισχυρή βιοαποικοδομητική και αποτοξικοποιητική ικανότητα της συγκεκριμένης βακτηριακής κοινότητας για το TBZ καταδεικνύει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εμβόλιο σε συστήματα επεξεργασία αποβλήτων που περιέχουν το TBZ ως κύριο ρυπαντή.

ABSTRACT

Thiabendazole (TBZ) is a fungicide, pesticide and anthelmintic drug that belongs to the benzimidazole family and applies primarily in the food industry as a chemical fungicide and pesticide as well as to post-harvest stages. The principal mode of action of TBZ as fungicide is the inhibition of cell division. Binding of TBZ in the β -tubulin molecules results in the inhibition of the polymerization to create the microtubules and stop the formation of the mitotic spindle. Moreover, the TBZ is an environmental pollutant because of its use as a post-harvest fungicide in fruits and vegetables. Bad processing and handling uses of waste produced by the application of TBZ can result in systemic diffusion of TBZ residues in the environment endangering non-target organisms. Thus, the microbial degradation is considered the most important process of removing pesticides from contaminated soils. Enriched cultures were performed under the doctoral C. Perruchon and led to the isolation of a bacterial community that rapidly degrades the TBZ. However, there are unknown metabolites of TBZ and thus there is no information about whether the microbial degradation process of TBZ from specific bacterial community leads to detoxification. For this reason a necessary initial value to estimate the IC₅₀ of TBZ was considered and also in order to determine the toxicity of the liquid cultures after complete cleavage of TBZ. To determine the IC₅₀ toxicity index HepG2 cells were incubated with specific concentrations of TBZ and the IC₅₀ was calculated in the range of 275-280 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Then the bacterial community cultured on selective medium MSMN where the TBZ was the sole source of C. The TBZ was completely degraded within 28 days. After cleavage the cells HepG2 were incubated with samples of the liquid culture of bacteria to estimate whether the potential produced metabolites influence the cell growth. The results showed that the degradation of TBZ leads also to loss of the toxic action indicating that bacterial community successfully detoxifies the TBZ. The strong detoxificative and biodegradative ability of the bacterial community for TBZ demonstrates that it can be used as a vaccine in waste treatment systems which contain TBZ as the main pollutant.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Περιβαλλοντική ρύπανση από την χρήση γεωργικών φαρμάκων	7
1.2 Μετασυλλεκτική εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων σε συσκευαστήρια φρούτων ..	8
1.3 Θειαβενδαζόλη (Thiabendazole ,TBZ)	9
1.4 Μηχανισμός δράσης και χρήσεις TBZ	9
1.5 Τοξικότητα TBZ	13
1.5.1 Οξεία τοξικότητα	13
1.5.2 Χρόνια τοξικότητα	16
1.6 Το TBZ στο περιβάλλον	17
1.7 Βιολογική απορρύπανση	18
1.8 Απομόνωση μικροοργανισμών που διασπούν γεωργικά φάρμακα	19
1.9 Μικροβιακή αποδόμηση TBZ	20
1.10 Παραγόμενοι μεταβολίτες TBZ	20
1.11 Σκοπός εργασίας	23

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά	24
2.2. Παρασκευή διαλυμάτων Thiabendazole(TBZ)	25
2.3. Μέθοδος ανάλυσης TBZ σε σύστημα HPLC	25
2.4. Ανθρώπινη καρκινική σειρά ηπατοκαρκινώματος (HepG ₂)	26
2.4.1. Συντήρηση κυττάρων σε καλλιέργεια	27
2.4.2 Μακροχρόνια διατήρηση (πάγωμα) κυττάρων	28
2.4.3 Ξεπάγωμα κυττάρων	29
2.5 Μέτρηση αριθμού κυττάρων με την χρήση αιμοκυτταρομέτρου	30
2.6 Προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης με την μέθοδο ΧΤΤ	32
2.6.1. Αρχή της μεθόδου	32
2.7. Πειραματική διαδικασία υπολογισμού της επίδρασης του TBZ και των μεταβολιτών του στην ανάπτυξη κυττάρων HepG ₂	33
2.8. Επεξεργασία - ανάλυση των αποτελεσμάτων	36

2.9. Έλεγχος Μυκοπλάσματος σε κύτταρα HepG2	36
2.10. Βακτηριακή κοινότητα – διασπαση TBZ	38
2.11. Παρασκευή θρεπτικού μέσου MSMN	38
2.12. Παρασκευή εμπλουτισμένων καλλιεργειών με TBZ και αβιοτικών μαρτύρων	39
2.13. Πορεία βιοδιάσπασης Thiabendazole	40

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. Αποτελέσματα

3.1 Υπολογισμός του IC50 του TBZ σε κύτταρα HepG2	42
3.2 Αποδόμηση TBZ από βακτηριακές κοινότητες	43
3.3 Επίδραση TBZ στην ανάπτυξη κυττάρων HepG2 μετά από επώαση του παρουσία και απουσία βακτηριακών κοινοτήτων	44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4. Συζήτηση	46
-------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

5. Τελικά συμπεράσματα και μελλοντικές ερευνητικές κατευθύνσεις	48
---	----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49
---------------------------	-----------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Περιβαλλοντική ρύπανση από χρήση γεωργικών φαρμάκων

Σήμερα, οι αγρότες θεωρούν τα γεωργικά φάρμακα ως ένα σημαντικό εργαλείο για να εξασφαλίσουν την αύξηση και την ποιότητα της αγροτικής παραγωγής λαμβάνοντας υπόψη την αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού (Oerke and Dehne, 2004). Κατά τα τελευταία 30 έτη έχουν εισαχθεί στην αγορά και χρησιμοποιούνται νέες ομάδες γεωργικών φαρμάκων που χαρακτηρίζονται από υψηλή αποτελεσματικότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις και μικρή υπολειμματικότητα. Παρ' όλα αυτά τα περισσότερα γεωργικά φάρμακα ακόμη και σήμερα παρουσιάζουν τοξικότητα σε οργανισμούς μη στόχους. Για τον χρήστη τα προβλήματα προκύπτουν από την μη ορθολογική χρήση τους ενώ για τον καταναλωτή ο κίνδυνος προκύπτει από τα ανώτερα προβλεπόμενα επιτρεπτά όρια υπολειμματικότητας στα τρόφιμα. Σε επίπεδο περιβάλλοντος οι αρνητικές επιπτώσεις εντοπίζονται στο έδαφος στα υδρόβια οικοσυστήματα καθώς και σε οργανισμούς μη στόχους.

Πολλές χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως φυτοφάρμακα χαρακτηρίζονται ως υπολειμματικοί ρυπαντές του εδάφους (U.S. Environmental Protection Agency (2007)). Η ρύπανση μπορεί να οφείλεται είτε στην απευθείας έκθεση του εδάφους στις ρυπογόνες ουσίες είτε από την αποδοχή των ατμοσφαιρικών ρύπων που κατακρημνίζονται με αργούς ρυθμούς ανάλογα με τις γεωμορφολογικές συνθήκες της εκάστοτε περιοχής. Το έδαφος γίνεται αποδέκτης μια σειράς αρκετά υπολειμματικών γεωργικών φαρμάκων που ευθύνονται για την παρουσίαση τοξικών φαινομένων έναντι χερσαίων οργανισμών όπως οι γαιοσκώληκες, οι νηματώδεις καθώς και μικροοργανισμών που σχετίζονται με την μικροβιακή αποδόμηση τους με την πάροδο του χρόνου παράγοντας είτε τοξικούς είτε μη τοξικούς μεταβολίτες. Ιδιαίτερο πρόβλημα αποτελούν τα γεωργικά φάρμακα των οποίων οι μεταβολίτες είναι τοξικοί και συσσωρεύονται στα εδαφικά κolloειδή

Σημαντικό πρόβλημα αποτελεί και η ρύπανση των υδάτινων οικοσυστημάτων από τα γεωργικά φάρμακα. Τα γεωργικά φάρμακα μπορούν να καταλήγουν σε υδάτινες πηγές μέσω συγκεκριμένων διαδρομών. Αναλυτικότερα, μπορούν να μεταφερθούν εκτός της περιοχής εφαρμογής τους κατά τη διάρκεια του ψεκασμού, μπορούν να προσροφηθούν από τα εδαφικά κolloειδή και στη συνέχεια να ρυπάνουν τα υπόγεια ύδατα, καθώς και να μεταφερθούν μέσω της επιφανειακής

απορροής του νερού με κατάληξη σε υδάτινα περιβάλλοντα (Papendick RI et al., 1986).

Το τρίτο και ίσως το σημαντικότερο πρόβλημα που εντοπίζεται από την μη ορθολογική χρήση των γεωργικών φαρμάκων είναι οι επιπτώσεις που έχουν σε οργανισμούς μη στόχους. Οι συνέπειες των οργανισμών από την έκθεση τους σε γεωργικά φάρμακα ποικίλουν μεταξύ των ειδών και εξαρτώνται άμεσα από την συγκέντρωση του φαρμάκου και το χρόνο έκθεσης σε αυτό. Η τοξικότητα μπορεί να προκύψει είτε από την έκθεση του οργανισμού σε υψηλές συγκεντρώσεις φαρμάκου για μικρό χρονικό διάστημα (οξεία τοξικότητα) με άμεση εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων, είτε ύστερα από μακροχρόνια έκθεση του οργανισμού σε χαμηλές μη θανατηφόρες συγκεντρώσεις του φαρμάκου προκαλώντας μακροπρόθεσμα προβλήματα όπως η εμφάνιση καρκίνου και τερατογενέσεις (Food and Agriculture Organization, 1996)

1.2. Μετασυλλεκτική εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων στα συσκευαστήρια φρούτων

Η μετασυλλεκτική κατεργασία των φρούτων με φυτοφάρμακα εγγυάται την προστασία τους από μυκητιάσεις, την προσβολή από παράσιτα και τις φυσιολογικές διαταραχές κατά την επεξεργασία. Ωστόσο, αυτό οδηγεί στην παραγωγή μεγάλου όγκου αποβλήτων που μπορούν άμεσα να μολύνουν τα έδαφος και τα υπόγεια νερά εφόσον δεν επεξεργαστούν προς παραγωγή λιγότερο τοξικών μορφών (L.E.Castillo et al., 2006). Χαρακτηριστική είναι η τοξικότητα σε υδάτινα περιβάλλοντα από γεωργικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στο μετασυλλεκτικό στάδιο όπως τα Thiabendazole (European Commission, 2001), Imazalil (European Commission 2009), ortho- phenylphenol (EFSA, 2008) και diphenylamine (EFSA , 2012).

Η ευρωπαϊκή κοινότητα έχει τονίσει την ανάγκη της επεξεργασίας της συγκεκριμένης κατηγορίας αποβλήτων εγκρίνοντας τη χρήση συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων με προϋπόθεση την ορθή επεξεργασία των παραγόμενων υγρών αποβλήτων στα κράτη μέλη. Σε αυτο πλαίσιο παρά το ότι είναι περιορισμένες σε αριθμό οι οργανωμένες δομές επεξεργασίας υγρών αποβλήτων στα συσκευαστήρια φρούτων υπάρχουν κατοχυρωμένα με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας συστήματα (Control TecEco®, που είναι βασισμένα στην διήθηση μέσω φίλτρων ενεργού άνθρακα και έχουν την ικανότητα να απομακρύνουν σε σημαντικό βαθμό το Thiabendazole από τα υγρά απόβλητα (Portilo G. Et al., 2004).

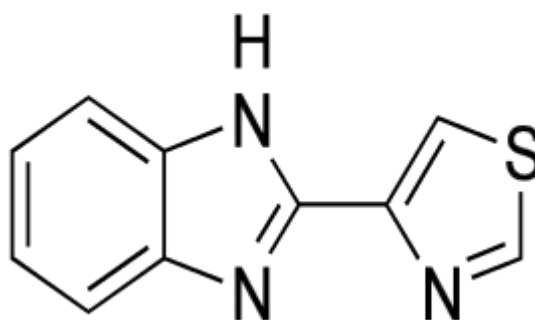
Η απόρριψη υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων έχει ως

τελικούς αποδέκτες γειτονικά υδάτινα οικοσυστήματα , βόθρους καθώς και μονάδες βιολογικού καθαρισμού. Η απόρριψη των μη επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων αποτελεί πηγή ρύπανσης ποταμών με χαρακτηριστικό παράδειγμα την ρύπανση ποταμού στην Κόστα Ρίκα, όπου στα νερά του εντοπίστηκαν τα μυκητοκτόνα Thiabendazole και Imazalil που χρησιμοποιούνται σε παρακείμενα συσκευαστήρια μπανάνας σε υψηλές συγκεντρώσεις ικανά ώστε να προκαλέσουν συμπτώματα οξείας ή και χρόνιας τοξικότητας στους υδάτινους οργανισμούς (Castillo L.E. et al 2000).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω κρίνεται πλέον αναγκαία η ανάπτυξη νέων μεθόδων επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων που προέρχονται από τη συσκευαστήρια φρούτων με κύριο πεδίο έρευνας την υποβάθμιση του ρυπαντικού φορτίου από μικροοργανισμούς με αυξημένες καταβολικές ιδιότητες έναντι των ουσιών που εμπεριέχονται στα απόβλητα.

1.3. Θειαβενδαζόλη (Thiabendazole ,TBZ)

Το Thiabendazole είναι ένα μυκητοκτόνο και παρασιτοκτόνο φάρμακο που ανήκει στην οικογένεια των Βενζιμιδαζολικών. Η ονομασία του κατά IUPAC είναι 4-(1*H*-1,3-benzodiazol-2-yl)-1,3-thiazole, ενώ τα εμπορικά σκευάσματα του ονομάζονται μεταξύ άλλων Mintezol, Tresaderm και Arbotect. Είναι μια χημική ένωση με μοριακό τύπο C₁₀H₇N₃S, μοριακό βάρος 201,3 g/mol και η δομή του φαίνεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Χημική δομή TBZ (www.drugbank.ca)

1.4. Μηχανισμός δράσης και χρήσεις TBZ

Το TBZ βρίσκει εφαρμογές κυρίως στην βιομηχανία τροφίμων ως μυκητοκτόνο και παρασιτοκτόνο καθώς εφαρμόζεται στα μετασυλλεκτικά στάδια. Συγκεκριμένα εφαρμόζεται σε φρούτα και λαχανικά που στα οποία αναπτύσσονται

μύκητες και παράσιτα ως αποτέλεσμα της μακράς μεταφοράς και αποθήκευσης τους. Για παράδειγμα εφαρμόζεται σε μεγάλο βαθμό στις μπανάνες προκειμένου να εξασφαλιστεί η υψηλή ποιότητα τους κατά το μεσο-διάστημα μεταξύ παραγωγής και τοποθέτησης στην αγορά.

Είναι αποτελεσματικό έναντι των ασκομυκήτων, δευτερομυκήτων και βασιδιομυκητων, αλλά είναι αναποτελεσματικό έναντι μυκήτων της κλάσης Οομυκήτων. Το Thiabendazole χρησιμοποιείται έναντι ενός ευρέως φάσματος μυκήτων συμπεριλαμβανομένων των *Botrytis spp.*, *Penicillium spp* και *Gleosporium spp* σε μηλοειδή φρούτα, *Botrytis spp.*, *Penicillium spp* σε εσπεριδοειδή φρούτα και *Fusarium spp.*, *Phoma exigua var. Foveata*, *Oospora pustulans* και *Helminthosporium solani* σε πατάτες.

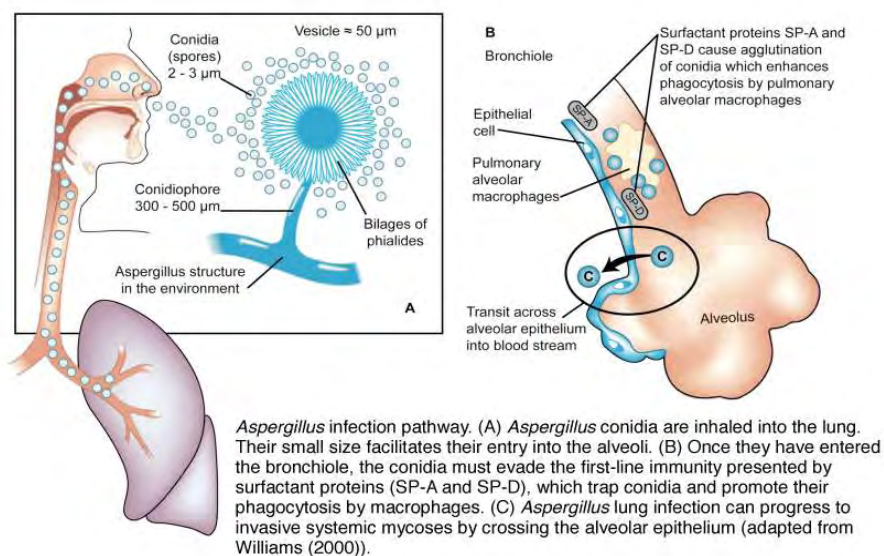
Ο κύριος τρόπος δράσης του Thiabendazole ως μηκυτοκτόνου είναι η αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης. Αρχικά ο Hastie και οι συνεργάτες του (Hastie, A. C. 1970.) παρατήρησαν ότι τα μόρια της οικογενείας των βενζιμιδαζολών προκαλούν πυρηνική αστάθεια σε μύκητες του είδους *Aspergillus nidulans*. Οι πρώτες μελέτες για τη δράση των βενζιμιδαζολων στόχευαν στους μηχανισμούς σύνθεσης των RNA και DNA. Σήμερα πλέον είναι γνωστό πως η αναστολή της σύνθεσης του DNA είναι ένα δευτερογενές γεγονός και ότι η παρεμπόδιση της ορθής κυτταρικής διαίρεσης είναι το κύριο αποτέλεσμα της δράσης τους (Davidse L.C. et al 1976, Hammerschlag et al. 1973). Σε διαιρούμενους πυρήνες μυκήτων το TBZ δείχνει μια εκπληκτική ομοιότητα με τον δευτερογενή μεταβολίτη των φυτών κολχικίνη η οποία διαταράζει την μίτωση και την μείωση σε ζωικά και φυτικά κύτταρα απενεργοποιώντας την μιτωτική άτρακτο. Η άτρακτος αποτελείται από ινίδια μικροσωληνίσκων και η κολχικίνη προσδένεται στην τουμπουλίνη το κύριο συστατικό της ατράκτου. Τη δεκαετία του 1980 αναγνωρίστηκε πως η θέση πρόσδεσης της κολχικίνης είναι ίδια με εκείνη του TBZ και εντοπίζεται στο επιμέρους συστατικό των μικροσωληνίσκων στην β-τουμπουλίνη (Lacey, 1990, Sangster et al,1985).

Οι μικροσωληνίσκοι είναι ένα δομικό συστατικό του κυτταροσκελετού και αποτελείται από μόρια τουμπουλίνης τα οποία πολυμερίζονται σχηματίζοντας ινίδια μήκος 50 μm τα οποία έχουν υψηλό δυναμικό. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα οι μικροσωληνίσκοι προκύπτουν ύστερα από τον πολυμερισμό των διμερών α/β-τουμπουλίνης (Weisenberg RC 1972). Τα μονομερή πολυμερίζονται και σχηματίζουν μικροσωληνίσκους οι οποίοι αποτελούνται από 13 πρωτοινίδια συναρμολογημένα γύρω από έναν κενό εσωτερικά πυρήνα. Τα διμερή α/β τουμπουλίνης συγκροτούν το πρωτοινίδιο, με κάθετους δεσμούς μεταξύ των διμερών. Τα πρωτοινίδια συνδέονται με πλευρικούς δεσμούς σχηματίζοντας μια δομή φύλλου. Το φύλλο κλείνει συγκροτώντας το μικροσωληνίσκο με τρόπο ώστε να δημιουργείται ένα ακραίο

περιθώριο τριών ελίκων. Ο μικροσωληνίσκος επιμηκύνεται με προσθήκη/αφαίρεση διμερών α/β τουμπουλίνης από το (+) και (-) άκρο. Η απαραίτητη ενέργεια για τον πολυμερισμό προέρχεται από την υδρόλυση του GTP προς GDP. Το GTP είναι συνδεδεμένο στην α-τουμπουλίνη ενώ το GDP στην β-τουμπουλίνη. Τα άκρα (-) των μικροσωληνίσκων αναπτύσσονται πιο αργά απ' ό,τι τα (+) άκρα. Η διαφορά αυτή στον ρυθμό αύξησης αντανακλάται στη διαφορά της κρίσιμης συγκέντρωσης που απαιτείται για την προσθήκη διμερών τουμπουλίνης από το ένα ή από το άλλο άκρο του μικροσωληνίσκου. Κίνηση με ανασχηματισμό συμβαίνει όταν οι συγκεντρώσεις των διμερών τουμπουλίνης έχουν τιμές μεταξύ της κρίσιμης συγκέντρωσης για το άκρο (+) και της κρίσιμης συγκέντρωσης για το άκρο (-). Υπό αυτές τις συνθήκες η καθαρή απώλεια διμερών GDP- τουμπουλίνης από το άκρο (-) εξισορροπείται με την προσθήκη διμερών GTP-τουμπουλίνης στο (+) άκρο (R.J. MARTIN 1997). Η πρόσδεση του TBZ στα μόρια β-τουμπουλίνης του θετικού πόλου έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του πολυμερισμού για τη δημιουργία του μικροσωληνίσκου και τη διακοπή του σχηματισμού της μιτωτικής ατράκτου η οποία είναι μια απαραίτητη δομή για την κυτταρική μίτωση.

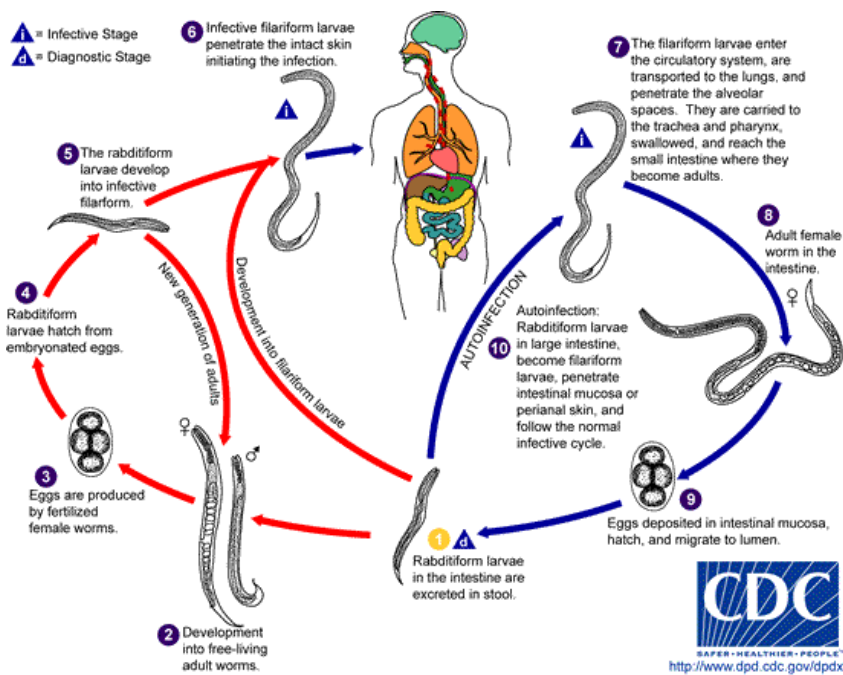
Το TBZ με την ιδιότητα του ως μυκητοκτόνο και παρασιτοκτόνο χρησιμοποιείται έναντι συγκεκριμένων παθογόνων μυκήτων και παρασίτων που προσβάλλουν τον άνθρωπο μέσω της ικανότητας του να αναστέλλει το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου είναι αποτελεσματικό έναντι της Ασπεργιλίωσης. Η Ασπεργιλίωση είναι η ονομασία μια ευρείας ομάδας ασθενειών που προκαλούνται από μόλυνση από μύκητες του γένους *Aspergillus*. Η πλειονότητα των ασθενών που πάσχουν από Ασπεργιλίωση είναι φυματικοί ασθενείς (*Denning, D. W et al,2013*) ασθενείς που υποφέρουν από χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) αλλά και άνθρωποι με υγιές ανοσοποιητικό σύστημα (*Smith, N et al, 2011*). Η ασπεργιλίωση εμφανίζεται συνηθέστερα με τη μορφή χρόνιας πνευμονικής ασπεργιλίωσης ή ως

αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργιλίωση (Goel, Ayush 2015).



Εικόνα 2. (A) Μονοπάτι μόλυνσης από τον μύκητα *Aspergillus* (Williams, 2000)

Ως παρασιτοκτόνο το TBZ είναι αποτελεσματικό έναντι των ασκαρίδων που προκαλούν στρογγυλοειδίαση. Η στρογγυλοειδίαση είναι μια ανθρώπινη ασθένεια που προκαλείται είτε από ασκαρίδες είτε από ένα τύπο έλμυνθας το *S. fülleborni*. Το παρασιτοκτόνο σκουλήκι μπορεί να προκαλέσει ένα σύνολο συμπτωμάτων στους ανθρώπους κυρίως δερματικά συμπτώματα, κοιλιακό άλγος, διάρροια και απώλεια βάρους. Σε μερικούς ανθρώπους, ιδιαίτερα εκείνους που λαμβάνουν κορτικοειδή ή άλλα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, η στρογγυλοειδίαση μπορεί να προκαλέσει ένα σύνδρομο γενικευμένης λοίμωξης (hyperinfection) που μπορεί να οδηγήσει στον θάνατο αν δεν αντιμετωπιστεί εγκαίρως. Η στρογγυλοειδίαση θεωρείται ότι επηρεάζει 30-100 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως κυρίως στις τροπικές και υποτροπικές χώρες. Το TBZ χρησιμοποιείται για την θεραπεία, λαμβάνονται ημερησίως δύο δόσεις σε συγκέντρωση 25 mg/ kg για 5 ημέρες με μέγιστη πρόσληψη 400 mg (Gompels MM et al, 1991). Ο μηχανισμός δράσης του TBZ έναντι των παρασίτων δεν είναι γνωστός αλλά είναι πιθανό να αποτελεί αναστολέα για το ειδικό ένζυμο στις έλμινθες φουμαρική-αναγωγή που μετατρέπει το φουμαρικό οξύ σε ηλεκτρικό δημιουργώντας πιθανές αλληλεπιδράσεις με τις ενδογενείς κινόνες. Για το λόγω αυτό το συγκεκριμένο ένζυμο αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα για τον μικροβιακό μεταβολισμό κατά την αναερόβια αναπνοή (Gilman, A.G. et al., 1990)



Εικόνα 3. Μονοπάτι μόλυνσης από τον νηματώδη *Strongyloides stercoralis*,

Το TBZ είναι αποτελεσματικό έναντι των αγκυλόστομων και άλλων ελμίνθων που προσβάλλουν τα άγρια ζώα, τα ζώα που χρησιμοποιούνται ευρέως στην κτηνοτροφία καθώς και τον άνθρωπο (Portugal R, et al 2002).

Τέλος, το TBZ φαίνεται να δρα και ως αναστολέας της αγγειογένεσης. Γονίδια που είναι υπεύθυνα για την διατήρηση του κυτταρικού τοιχώματος στις ζύμες φαίνετε να είναι υπεύθυνα για την αγγειογένεση στα σπονδυλωτά. Το TBZ αποδείχθηκε πως παρεμποδίζει την αγγειογένεση τόσο σε έμβρυα βατράχων όσο και σε ανθρώπινα κύττρα. Επομένως μπορεί να χρησιμεύει και ως αντι-αγγειακός παράγοντας με σκοπό την μείωση των νεοσύστατων αγγείων σε περιπτώσεις καρκίνου (Hye Ji Cha et al 2012)

1.5. Τοξικότητα TBZ

1.5.1. Οξεία τοξικότητα

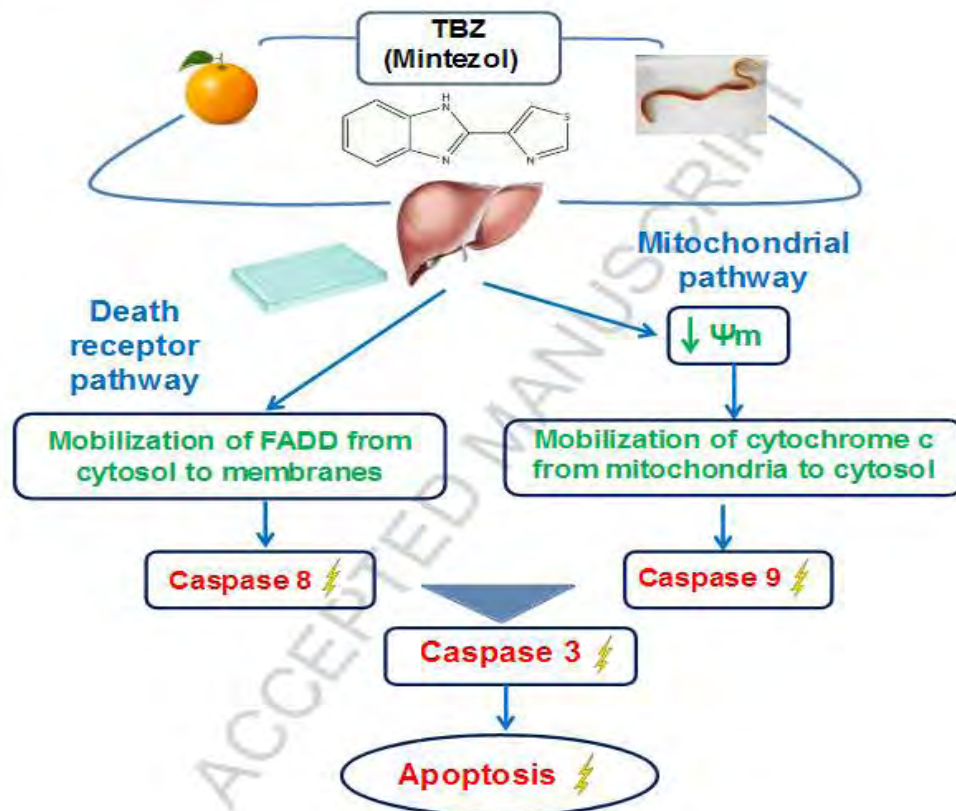
Ο όρος οξεία τοξικότητα περιγράφει τις δυσμενείς επιπτώσεις μιας ουσίας όπως αυτές προκύπτουν είτε από μία είτε από πολλαπλές εκθέσεις ενός οργανισμού σε αυτή σε σύντομο χρονικό διάστημα, συνήθως μικρότερο των 24 ωρών. Για να περιγραφεί οξεία τοξικότητα οι ανεπιθύμητες ενέργειες θα πρέπει να εκφράζονται εντός 14 ημερών. Πειράματα οξείας τοξικότητας για το TBZ διεξήχθησαν σε μια σειρά οργανισμούς μη-στόχους του φαρμάκου καθώς και σε ανθρώπους οι οποίοι ήταν

ασθενείς με ελμινθιάσεις και το TBZ δόθηκε για θεραπεία. Η οξεία τοξικότητα προσδιορίστηκε από τον δείκτη LD₅₀, που αποτελεί την μέση θανατηφόρο δόση μιας ουσίας, δηλαδή την απαιτούμενη δόση για να σκοτώσει τα μισά μέλη ενός ελεγχόμενου πληθυσμού μετά από έναν συγκεκριμένο χρόνο δοκιμής. Αναλυτικότερα μελέτες έγιναν σε ποντίκια, αρουραίους, κουνέλια και ανθρώπους. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων τοξικότητας αναγράφονται στον πίνακα 1.

Οργανισμός	Φύλο	Τρόπος χορήγησης TBZ	LD ₅₀ (mg/kg)	Βιβλιογραφία
Ποντίκια	Θηλυκά	Από στόματος	3.800	Robinson, 1964
Αρουραίοι	Θηλυκά	Από στόματος	3.300	Robinson, 1964
Αρουραίοι	Θηλυκά και αρσενικά	Από στόματος	4.700-5.100	Lankas, 1981
Αρουραίοι	Θηλυκά και αρσενικά	Εισπνοή	>400 mg/m ³	Gurman et al, 1981
Κουνέλια	-	Από στόματος	3.800	Robinson, 1964
Κουνέλια	Αρσενικά και θηλυκά	Από δέρματος	>2.000	Blaszczak & Auletta (1987)

Πίνακας 1. Αποτελέσματα πειραμάτων οξείας τοξικότητας προκαλούμενης από TBZ σε πειραματόζωα

Η Marilynne Séide και οι συνεργάτες της απέδειξαν ότι το TBZ προκαλεί σε ηπατικά κύτταρα αρουραίου, όταν αυτά επωασθούν με TBZ συγκέντρωσης που κυμαίνεται μεταξύ 200-500 μM για 24 ώρες με τα αποπτωτικά φαινόμενα στα κύτταρα να αρχίζουν να εκδηλώνονται την πρώτη ώρα μετά την επώαση ενεργοποιώντας δύο διαφορετικά αποπτωτικά μονοπάτια όπως φαίνονται στην εικόνα 4.



Εικόνα 4. Ενεργοποίηση αποπτωτικών μονοπατιών από το TBZ σε ηπατικά κύτταρα αρουραίων (Marilyne Séide et al, 2004)

Στα πειράματα οξείας τοξικότητας σε ανθρώπους οι ασθενείς με ελμινθιάσεις έλαβαν TBZ ως μέρος της θεραπείας του σε τρεις διαφορετικές δόσεις για μέρα. Στην πρώτη ομάδα (29 άνδρες) δόθηκε δόση 25 mg/ kg TBZ, στην δεύτερη ομάδα (37 άνδρες) δόθηκε δόση 50 mg/ kg TBZ ενώ στην τρίτη ομάδα (28 άνδρες) δόθηκε δόση 50 mg/ kg TBZ σε δύο υποδόσεις (Vakil et al., 1966). Οι πλειονότητα των ασθενών που έλαβαν δόση των 50 mg/ kg παρουσίασαν κοιλιακό άλγος, πονοκεφάλους, ζάλη, ναυτία και εμετό ανεξαρτήτως εάν την έλαβαν σε μια δόση ή σε δύο υποδόσεις. Από τους ασθενείς που έλαβαν δόση 25 mg/ kg οι 8 από τους 29 ανέφεραν ζάλη αλλά όχι άλλα συμπτώματα. Έτσι το συμπέρασμα που εξήχθη από την παραπάνω έρευνα ήταν η ελάχιστη συγκέντρωση TBZ που είχε την ικανότητα να προκαλέσει το ελάχιστο παρατηρούμενο αποτέλεσμα (LOWEL) για την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων ήταν 25 mg/ kg, ενώ παρατηρήθηκε και δόσοεξαρτώμενη αύξηση στην ένταση των συμπτωμάτων. Η τιμή της ελάχιστης συγκέντρωσης TBZ που δεν έχει την ικανότητα να προκαλέσει κάποιο παρατηρούμενο αποτέλεσμα (NOEL) για την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων καθιερώθηκε εν τέλει στα 10 mg/kg ανά μέρα (WHO, 2008, European Medicines Agency (EMA), 2004)

1.5.2. Χρόνια τοξικότητα

Ως χρόνια τοξικότητα ορίζεται η ανάπτυξη των δυσμενών επιπτώσεων, ως αποτέλεσμα της μακροχρόνιας έκθεσης σε ένα τοξικό ή άλλο στρεσογόνο παράγοντα. Μπορεί να εκδηλωθεί ως άμεση θνησιμότητα, αλλά πιο συχνά εκδηλώνεται μέσω συμπτωμάτων όπως μειωμένη ανάπτυξη, μειωμένη αναπαραγωγή, ή αλλαγές στη συμπεριφορά. Πειράματα που αφορούσαν την χρόνια τοξικότητα του TBZ πραγματοποιήθηκαν τη χρήση πειραματόζων. Αναλυτικότερα χρησιμοποιήθηκαν σκυλιά, αρουραίοι και ποντίκια και μετά το πέρας των πειραμάτων αποδείχθηκε ότι τα κύρια αποτελέσματα της έκθεσης των πειραματόζων σε TBZ ήταν η θυρεοειδή τοξικότητα, αναιμία και αρτηριακή θρόμβωση. Η χρόνια έκθεση αρουραίων σε TBZ περιελάμβανε την έκθεση τους σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις TBZ για περίοδο 104 εβδομάδων. Το αποτέλεσμα αυτής ήταν οι αρουραίοι να έχουν απώλεια βάρους σε σχέση με αρουραίους control. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ηπατοκυτταρική υπερτροφία ως απάντηση στο παρατεταμένο στρες λόγω του μεταβολισμού των μεγάλων ποσοτήτων TBZ (Greaves and Faccini, 1984). Αντιθέτως δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα ενζύμων όπως η αλκαλική φωσφατάση και οι αμινοτρανσφεράσες όπως και στη συγκέντρωση λιπιδίων η οποία θα μπορούσε να ήταν ενδεικτική της ηπατικής βλάβης (Zimmerman, 1982). Παρατηρήθηκε επίσης και αύξηση του βάρους του θυρεοειδούς αδένος σε θηλυκούς και αρσενικούς αρουραίους η οποία εμφάνιζε μια δόσοεξαρτώμενη σχέση και οφειλόταν στην ανάπτυξη όγκου με το πρώτο αδένωμα να εμφανίζεται την 78 εβδομάδα. Δεν υπήρξαν σαφείς αποδείξεις ότι οι όγκοι οφείλονταν στην χρόνια έκθεση στο TBZ, αλλά προτείνεται πως η κύρια αιτία της εμφάνισης θυρεοειδικού αδενώματος ήταν διαταραχή της δραστηριότητας των ηπατικών κυττάρων.

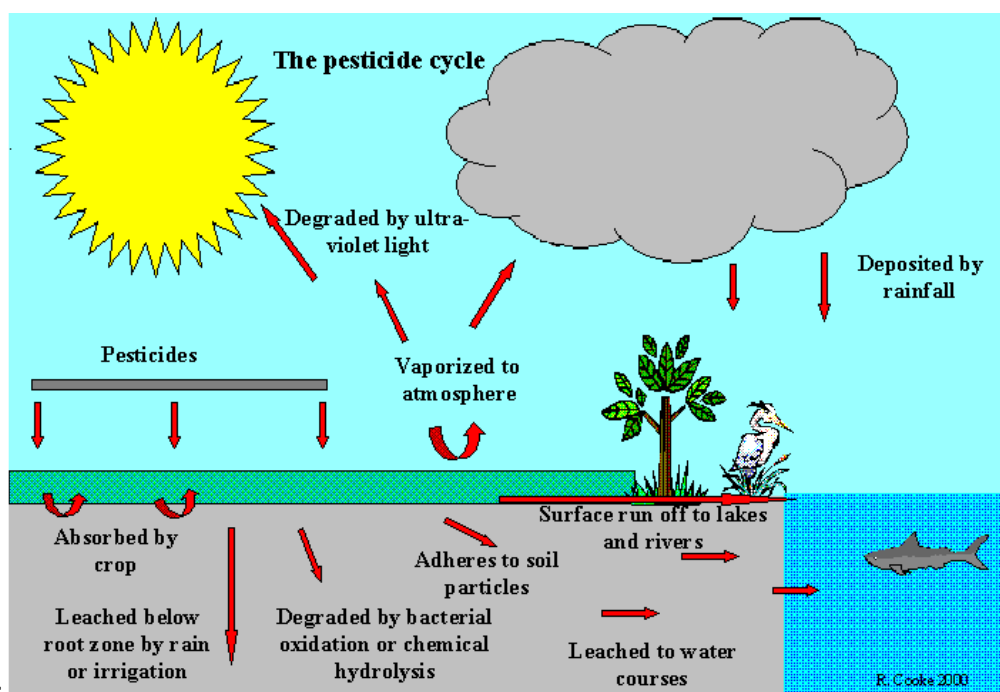
Πειράματα διεξήχθησαν και σε σκυλιά που λάμβαναν δόσεις αυξανόμενης συγκέντρωσης TBZ για ένα χρόνο μέσω καψουλών (Lankas, 1993). Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στο βάρος του σώματος όπως στην περίπτωση των αρουραίων ανεξαρτήτως συγκέντρωσης δόσης. Ωστόσο παρατηρήθηκε ήπια αναιμία τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά σκυλιά σε υψηλές δόσεις όπως υποδεικνύεται και από τον μειωμένο αριθμό αιμοσφαιρίων, αιμοπεταλίων, αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη.

Τέλος μελέτες διεξήχθησαν με τη χρήση ποντικών στους οποίους χορηγήθηκε TBZ μέσω της τροφής σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις για περίοδο 106 εβδομάδων (Bagdon et al., 1980). Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν συσχέτιση του TBZ με ογκογονικότητα. Υψηλές δόσεις σε αρσενικά είχαν ως αποτέλεσμα την μείωση

κατά 19% στο κέρδος βάρους κατά την διάρκεια της μελέτης, ενώ η ίδια παρατήρηση διαπιστώθηκε και στα θηλυκά ποντίκια για μεσαίες και υψηλές συγκεντρώσεις. Τα αρσενικά ποντίκια εμφάνισαν αρτηριακή θρόμβωση όταν έλαβαν δόση των 278 mg/kg ανά ημέρα. Αρτηριακή θρόμβωση παρατηρήθηκε και στα θηλυκά με την πρώτη να εμφανίζεται σε ένα θηλυκό ποντίκι την 31 εβδομάδα. Τα περισσότερα από τα ποντίκια που εμφάνισαν αρτηριακή θρόμβωση πέθαναν .

1.6. Το TBZ στο περιβάλλον

Η πορεία που ακολουθεί γενικά ένα γεωργικό φάρμακο ύστερα από την κατάληξη του στο περιβάλλον συνοψίζεται στην εικόνα 5..



Εικόνα 5. Διεργασίες που λαμβάνουν χώρα ύστερα από την ελευθέρωση ενός γεωργικού φαρμάκου στο περιβάλλον.

Το TBZ αποτελεί περιβαλλοντικό ρύπο κατά την χρήση του ως μυκητοκτόνο σε φρούτα λαχανικά, όταν χρησιμοποιείται σε αλόγιστες ποσότητες. Τα συσκευαστήρια φρούτων στα οποία χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον θεωρητικά περιορίζουν την έκθεση του στο περιβάλλον. Παρόλα αυτά μη ορθές πρακτικές επεξεργασίας και χειρισμού των αποβλήτων που παράγονται από την εφαρμογή του TBZ μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα την συστηματική διάχυση υπολειμμάτων του TBZ στο περιβάλλον θέτοντας σε κίνδυνο οργανισμούς μη στόχους.

Το TBZ εφαρμόστηκε σε στρώματα εδάφους τα οποία εκτέθηκαν σε τεχνητό φως σε θερμοκρασία $25^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ και το αποτέλεσμα έδειξε ότι το TBZ είναι σταθερό υπό την επίδραση του φωτός με χρόνο ημισείας ζωής περίπου 933 ημέρες. Μελέτες προσρόφησης σε τέσσερα διαφορετικής σύστασης εδάφη διεξήχθησαν προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η προσρόφηση του TBZ. (Dykes,1989). Οι τιμές του συντελεστή προσρόφησης K_{oc} κυμάνθηκαν μεταξύ 1.104 ως και 22.467 ml/g υποδεικνύοντας ότι το TBZ προσδένεται ισχυρά στα εδαφικά κolloειδή. Οι τιμές αυτές δείχνουν ότι το TBZ στο έδαφος δεν αναμένεται να είναι ιδιαίτερα κινητικό και να καταλήξει στα υπόγεια νερά. Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώθηκε και από πειράματα στηλών έκπλυσης (WARF Institute,1978). Επομένως το TBZ θεωρείται πως ακινητοποιείται στο έδαφος στο οποίο εφαρμόζεται και θεωρείται απίθανο να εκλυθεί στα υπόγεια εδάφη ή να ταξιδέψει μέσω της απορροής του νερού σε ποτάμια και ρέματα.

1.7. Βιολογική απορρύπανση

Ως βιολογική απορρύπανση ορίζεται η χρήση της μεταβολικής ικανότητας μικροοργανισμών με στόχο την απορρύπανση και αποκατάσταση ρυπασμένων εδαφών, υδροφόρων και λοιπών οικοσυστημάτων (ei.cornell.edu). Η βιοαποκατάσταση είναι μια διαδικασία που αξιοποιεί τους μικροοργανισμούς για την διάσπαση επικίνδυνων και τοξικών ουσιών προς δημιουργία λιγότερο ή μη τοξικών μορφών. Οι τεχνικές βιολογικής απορρύπανσης μπορούν να ταξινομηθούν γενικά ως *in situ* ή *ex situ*. *In situ* βιοαποκατάσταση περιλαμβάνει κατεργασία του μολυσμένου υλικού στην περιοχή του, ενώ *ex situ* περιλαμβάνει την απομάκρυνση του μολυσμένου υλικού προς επεξεργασία σε άλλο μέρος. Η βιολογική απορρύπανση εφαρμόζεται κυρίως είτε ενεργοποιώντας την ενδογενή μικροβιακή κοινότητα του ρυπασμένου περιβάλλοντος (biostimulation) είτε με τη μορφή του βιολογικού εμπλουτισμού. (Lunt D. Et al.,1970). Δευτερευόντως υπάρχουν και άλλες στρατηγικές απορρύπανσης όπως η φυτική απορρύπανση και η απευθείας προσθήκη μεταβολικών ενζύμων στο ρυπασμένο περιβάλλον. Η εφαρμογή της βιολογικής ενεργοποίησης περιλαμβάνει την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, βελτίωση του αερισμού και διατήρηση της θερμοκρασίας και υγρασίας σε βέλτιστα επίπεδα ώστε να δημιουργηθούν οι ιδανικές συνθήκες στο μικροπεριβάλλον για την αύξηση και ανάπτυξη των ενδογενών μικροοργανισμών. (Kanissery, R.G et al.,2011) Ο βιολογικός εμπλουτισμός περιλαμβάνει τον εμβολιασμό ρυπασμένων υποστρωμάτων με ικανό πληθυσμό μικροοργανισμών που παρουσιάζουν αυξημένη καταβολική ικανότητα με στόχο την επιτάχυνση της αποδόμησης των ρύπων (M. Herrero et al.,2015) . Η χρήση βιολογικών μεθόδων για περιβαλλοντική εξυγίανση

αποτελεί φιλική μέθοδο προς το περιβάλλον. Επομένως η χρήση μικροοργανισμών ή των ενζύμων που παράγουν στην αποτοξικοποίηση γεωργικών φαρμάκων θεωρείται μια φιλική περιβαλλοντικά μέθοδος απορρύπανσης.

1.8. Απομόνωση μικροοργανισμών που αποδομούν γεωργικά φάρμακα

Σημαντικός αριθμός μελετών έχει ασχοληθεί με την απομόνωση μικροοργανισμών για την βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων (Walker A, Roberts S.J., 1993). Τα αποδομητικά βακτήρια απομονώνονται συνήθως από ρυπασμένα εδάφη με ιστορικό μεταχειρίσεων για το εκάστοτε φάρμακο. . Για παράδειγμα, από έδαφος της Βορείου Ελλάδος το οποίο είχε εκτεθεί τουλάχιστον 30 χρόνια στο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο – νηματωδοκτόνο ethoprophos απομονώθηκαν βακτήρια με την ικανότητα αποδόμησης του (Karpouzas D.G et al.,2000). Στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί πολλοί μικροοργανισμοί που έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιούν τα γεωργικά φάρμακα ως πηγή ενέργειας με την ταυτόχρονη βιοδιάσπαση του γεωργικού φαρμάκου. Κύριο ρόλο στη αποικοδόμηση διαδραματίζουν τα βακτήρια, ωστόσο η διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων μπορεί να πραγματοποιηθεί δευτερευόντως και από μύκητες. Μύκητες του γένους *Mortierella* έχει αποδειχθεί πως είναι ικανοί να αποδομούν ξενοβιοτικές ουσίες, όπως πολυχλωριωμένοι αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PHAs) (Salicis et al.,1999) καθώς και γεωργικά φάρμακα (Tixier et al.,2000, Ronhede et al.,2005 , Vroumsia et al., 2005, Badawi et al., 2009). Επίσης ο μύκητας *Rizoctonia solani* (Vroumsia et al.,1996) καθώς και ο μύκητας *Bjerkandera adusta* είναι ικανοί να αποδομούν το ζιζανιοκτόνο Diuron. Αρκετά βακτηριακά στελέχη έχουν απομονωθεί με ικανότητα να χρησιμοποιούν τα γεωργικά φάρμακα ως πηγή αζώτου άνθρακα και φωσφόρου με σκοπό την αποδόμηση του και την βακτηριακή ανάπτυξη. Επί παραδείγματι, το βακτήριο *Enterobacter* sp., είναι ικανό να αποδομεί ταχύτατα το οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο chlorpyrifos και μάλιστα να χρησιμοποιεί τους παραγόμενους μεταβολίτες ως πηγή άνθρακα και αζώτου (Singh B.K. et al., 2004 , Singh B.K. et al., 2003).

Η απομόνωση μικροοργανισμών που παρουσιάζουν αποδομητικές ικανότητες έναντι γεωργικών φαρμάκων κρίνεται σημαντική καθώς, παρέχει πληροφορίες για τους μεταβολικούς μηχανισμούς των μικροοργανισμών με απώτερο σκοπό την χρήση των μικροοργανισμών αυτών για την αποτοξικοποίηση και την απορρύπανση ρυπασμένων οικοσυστημάτων.

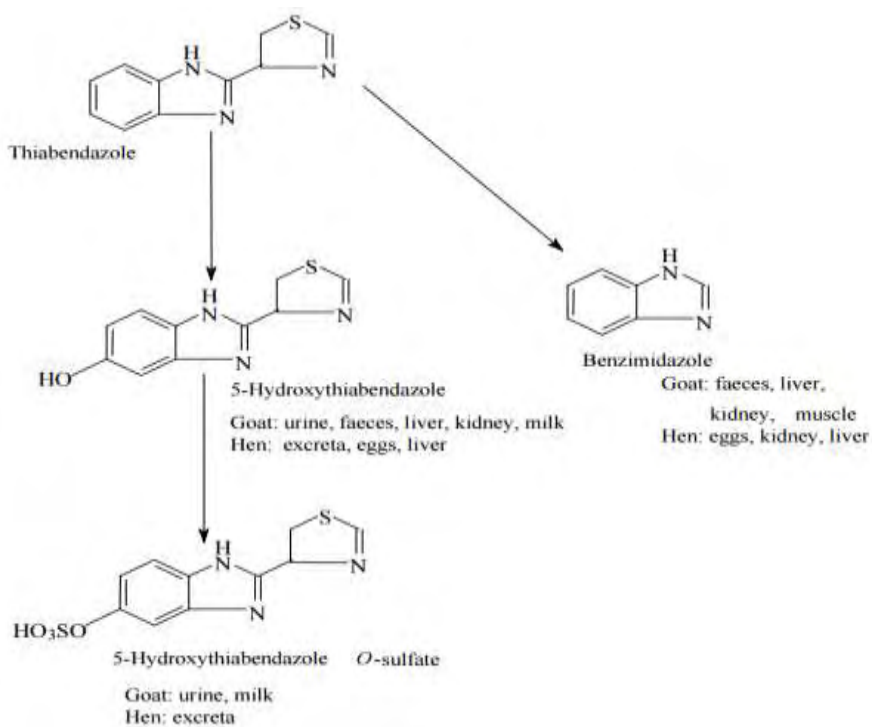
1.9. Μικροβιακή αποδόμηση TBZ

Η μικροβιακή αποικοδόμηση θεωρείται η πιο σημαντική διαδικασία απομάκρυνσης γεωργικών φαρμάκων από ρυπασμένα εδάφη (MacRae 1989). Υπο αυτό το πρίσμα έγινε προσπάθεια απομόνωσης βακτηριακών στελεχών με ικανότητα να διασπούν το TBZ με σκοπό την βιολογική απορρύπανση. Εμπλουτισμένες καλλιέργειες οδήγησαν στην απομόνωση δύο βακτηριακών κοινοτήτων που αποδομούσαν ταχύτατα και 750 mg L⁻¹ TBZ, αλλά και ως 500 mg kg⁻¹ στο έδαφος όταν εφαρμόστηκαν ως εμβόλια. Η σύνθεση των δύο βακτηριακών κοινοτήτων που απομονώθηκαν σταθεροποιήθηκε ύστερα από παρατεταμένη ανακαλλιέργειες και αποτελούνταν κυρίως από α- (*Bosea*, *Shinella*, *Oligotropha*, *Sphingomonas*), β- (*Methylobacillus*, *Methilibium*), and γ-πρωτεοβακτήρια (*Pseudomonas*). Συνεχή επιλογή και καλλιέργεια υπό την παρουσία διαφορετικών ουσιών (πχ. υποψήφια προϊόντα μεταβολισμού) και αντιβιοτικών οδήγησαν σε απλούστερες βακτηριακές κοινότητες αποτελούμενες πλέον από 3-4 βακτήρια. RNA-DGGE, q-PCR με εξειδικευμένους εκκινητές και Stable Isotope Probing-DGGE ή και TRFLP έδειξαν ένα βακτήριο του γένους *Sphingomonas* (φυλογενετικά συγγενές με *S. wittichii*) ήταν υπεύθυνο για την αποδόμηση του ιδιαίτερα υπολειμματικού (DT50 στο έδαφος > 1 χρόνο) και τοξικού μυκητοκτόνου TBZ (Perruchon C., et al, πρακτικά 6^{ου} Συνεδρίου Μικροβιόκοσμου 2015). Εκτός των παραπάνω δεν αναφέρονται στην βιβλιογραφία μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να αποδομούν το TBZ.

1.10. Παραγόμενοι μεταβολίτες TBZ

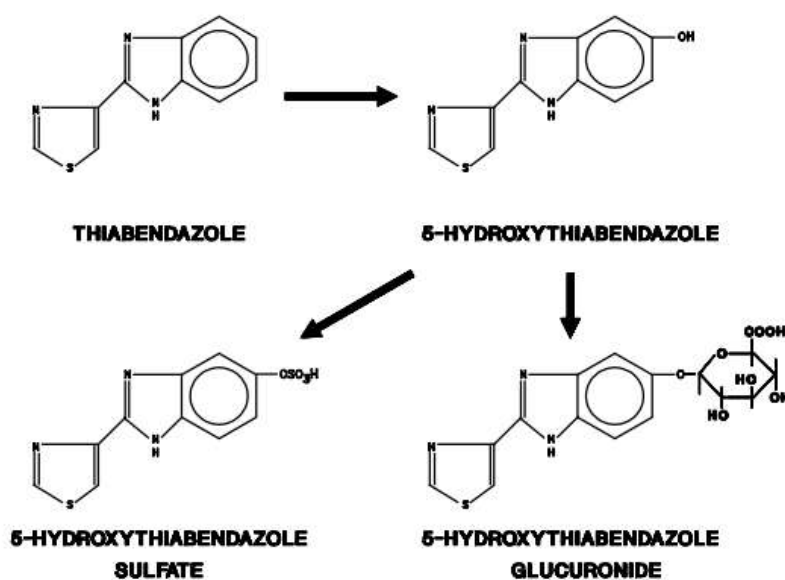
Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη του TBZ σε συγκεκριμένες συνθήκες και οργανισμούς προκειμένου να μελετηθεί το μεταβολικό μονοπάτι μεταξύ των διαφορετικών οργανισμών καθώς οι παραγόμενοι μεταβολίτες. Το TBZ απορροφάται και μεταβολίζεται ταχέως (Dalvie et al, 2006). Ο μεταβολισμός του πραγματοποιείται από τα ισοένζυμα όπως το CYP1A και CYP2B όπως έχει αναλυθεί εκτενώς σε συστήματα θηλαστικών (Rey- Grobelle et al, 1996, Coulet et al, 1998a και 2000, Lemaire et al 2004). Πειράματα με ραδιοσημασμένο TBZ με ¹⁴C διεξήχθησαν σε μια σειρά οργανισμών όπως ο άνθρωπος (Tocco et al., 1965) , κατσίκες, όρνιθες (Chukwudebe et al., 1994, Halls et al., 1991b) , αρουραίους (Tocco et al., 1965) , αγελάδες, χοίροι (Tocco et al., 1966) και πρόβατα (Tocco et al., 1964). Επίσης διεξήχθησαν πειράματα που αφορούσαν την παραγωγή μεταβολιτών κατά την διάσπαση του TBZ υπό την παρουσία φωτός σε υδάτινα οικοσυστήματα (Flynn, 1994). Αναλυτικότερα, ύστερα από τη χορήγηση 1g

thiabendazole ¹⁴C σε ανθρώπους το 40% του φαρμάκου είχε μεταβολιστεί εντός των τεσσάρων πρώτων ωρών ενώ το 80% εντός των πρώτων εικοσιτεσσάρων ωρών. Το γεωργικό φάρμακο μεταβολίστηκε σε συζευγμένο και μη 5-hydroxythiabendazole. Το 5-hydroxythiabendazole ήταν συζευγμένο είτε μια ομάδα γλυκουρονιδίου (25%) είτε με μια θειική ομάδα (Tocco et al.,1965). Στην περίπτωση των κασικίων οι παραγόμενοι μεταβολίτες προσδιορίστηκαν σε δείγματα γάλακτος, περιττωμάτων και ιστών που λαμβάνονταν πριν από την σφαγή. Παραγόμενοι μεταβολίτες εντοπίστηκαν κυρίως στα περιττώματα και δευτερευόντως στους ιστούς και το γάλα. Συγκεκριμένα τα προϊόντα του μεταβολισμού του TBZ στο ήπαρ ήταν μη-συζευγμένο 5-hydroxythiabendazole και Benzimidazole. Στο γάλα ο μοναδικός μεταβολίτης ήταν 5-hydroxythiabendazole συζευγμένο με ια θειική ομάδα, στα ούρα μη συζευγμένο 5-hydroxythiabendazole και συζευγμένο με μια θειική ομάδα, ενώ τέλος στα κόπρανα παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα ελεύθερου 5-hydroxythiabendazole και χαμηλά επίπεδα benzimidazole (Rosenblum, 1965,Rosenblum et al., 1964). Στις όρνιθες οι παραγόμενοι μεταβολίτες προσδιορίστηκαν από δείγματα που λήφθηκαν από αυγά, περιττώματα και ιστούς πριν τη σφαγή. Στα περιττώματα εντοπίστηκε μη συζευγμένο και συζευγμένο 5-hydroxythiabendazole, ενώ στα αυγά και στου ιστούς μη-συζευγμένο 5-hydroxythiabendazole. Το προτεινόμενο μεταβολικό μονοπάτι του Thiabendazole για τις κασίκες και τις όρνιθες απεικονίζεται στην εικόνα 5.



Εικόνα 6. Προτεινόμενο μεταβολικό μονοπάτι TBZ σε κασίκες και όρνιθες (<http://www.fao.org>)

Πειράματα που διεξήχθησαν σε αρουραίους με ραδιοσημασμένο TBZ απέδειξαν πως το 69-79% της χορηγηθείσας ποσότητας απεκκρίνεται στα ούρα με την μορφή 5-hydroxythiabendazole συζευγμένου είτε μια γλυκουρονική ομάδα, είτε με μια θειική ομάδα. Παρόμοια αποτελέσματα με εκείνα των πειραμάτων των αρουραίων λήφθηκαν από μελέτες που αφορούσαν τον μεταβολισμό του TBZ σε αγγελάδες, πρόβατα και χοίρους.



Εικόνα 7. Μεταβολικό μονοπάτι TBZ σε αρουραίους (Craine. 1990)

Τέλος, το TBZ φαίνεται να διασπάται όταν εφαρμόζεται σε υδάτινα οικοσυστήματα παρουσία τεχνητού ηλιακού φωτός (Flynn, 1994) σχηματίζοντας Benzimidazole-2 carboxamide, πολικά κλάσματα και benzimidazole καθώς και benzimidazolecarboxylic acid ένα δευτερεύον προϊόν που ενδέχεται να μην έχει κάποια βιολογική δράση (Stone et al., 1965, Delatour and Parish, 1986). Συνοψίζοντας, μεταξύ των διαφορετικών οργανισμών το κύριο προϊόν μεταβολισμού του TBZ είναι το 5-hydroxythiabemdzazole ελεύθερο είτε συζευγμένο με μια γλυκουρονική είτε με μια θειική ομάδα. Παρόλα αυτά ελάχιστα είναι μέχρι σήμερα γνωστά για τον μεταβολισμό του TBZ στο έδαφος και σε υδάτινα οικοσυστήματα.

1.11. Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας ήταν αρχικά να προσδιοριστεί η τοξική δράση του TBZ σε κύτταρα HepG2 μέσω του υπολογισμού του δείκτη IC50 και σε δεύτερο βαθμό να μελετηθεί η επίδραση των πιθανών μεταβολιτών του TBZ που παράγονται κατά την διάρκεια αποδόμησης του TBZ από βακτηριακή κοινότητα που έχει την συγκεκριμένη ικανότητα σε κύτταρα HepG2. Η αξιολόγηση αυτή θα μας βοηθήσει να κατανοήσουμε εάν η αποδόμηση του TBZ από τις βακτηριακές κοινότητες που έχουμε απομονώσει είναι παράλληλα και μια διαδικασία αποτοξικοποίησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Για την καλλιέργεια των κυττάρων HepG2 χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια :

- **DMEM:** (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1X): θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων (εταιρεία Gibco). Περιέχει 4500 mg/L D-γλυκόζη, 4 mM L-γλουταμίνη και 110 mg/L πυροσταφυλικό οξύ.
- **FBS:** (Fetal Bovine Serum): βόειος εμβρυϊκός ορός (εταιρεία Gibco,). Παρέχει στα κύτταρα τους αυξητικούς παράγοντες που χρειάζονται για να αναπτυχθούν. Πριν από τη χρήση ο ορός απενεργοποιείται με θέρμανση στους 55° C για 30 λεπτά (heat inactivation), ακολούθως διαχωρίζεται σε μικρότερες ποσότητες (aliquots) και αποθηκεύεται στους -20° C. Η τελική συγκέντρωση του ορού στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας είναι 10% v/v.
- **Αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη/πενικιλίνη:** Παρέχονται από την εταιρεία Gibco, σε διάλυμα 100X. Τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη προστατεύουν τις κυτταροκαλλιέργειες από την ανάπτυξη μικροβιακών παραγόντων. Η τελική συγκέντρωση των αντιβιοτικών στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας είναι 100 units/mL πενικιλίνης και 100 μg/mL στρεπτομυκίνης.
- **Διάλυμα θρυψίνης 0,5% v/v (10X) σε EDTA:** (εταιρεία Gibco,). Περιέχει 5 g/L τρυψίνη (1:250), 2 g/L EDTA 4Na, 8.5 g/L NaCl (10X). Χρησιμοποιείται σε αραιώση 1X σε διάλυμα PBS. Η τρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που διασπά πεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυτελικό άκρο της λυσίνης και της αργινίνης. Χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των κυττάρων από τις φλάσκες καλλιέργειας.
- **PBS** (Phosphate Buffered Saline, 1X): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (εταιρεία Gibco). Περιέχει 137 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, pH 7,2. Χρησιμοποιείται για τις εκπλύσεις των κυττάρων πριν από την επεξεργασία τους με τρυψίνη, με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμάτων του ορού από τη φλάσκα καλλιέργειας τα οποία δρουν ανασταλτικά στη δράση του ενζύμου τρυψίνη.
- **DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο):** (εταιρεία Sigma). Το DMSO δρα ως κρουοπροστατευτικός παράγοντας κατά το πάγωμα των κυττάρων.

Συγκεκριμένα αλλάζει τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης και εμποδίζει τον σχηματισμό πολλών κρυστάλλων νερού κατά το πάγωμα των κυττάρων. Προλαμβάνει έτσι την καταστροφή των κυττάρων από την κρυστάλλωση του νερού. Η τελική του συγκέντρωση στο μέσο παγώματος είναι 10% v/v.

- **XTT Cell Proliferation Kit II:** (εταιρεία Roche). Χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής επιβίωσης.

2.2 Παρασκευή διαλυμάτων Thiabendazole

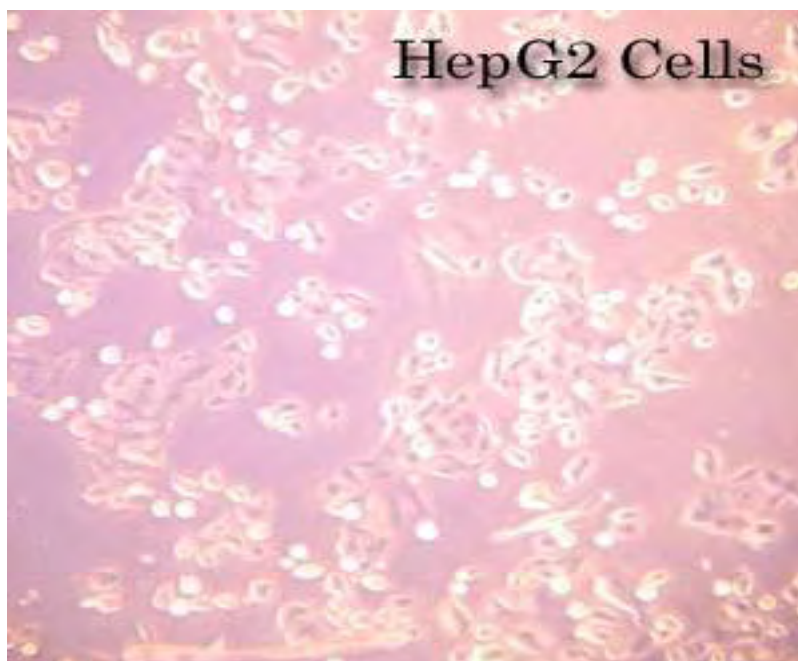
Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε εμπορικό σκεύασμα TBZ (HYKEEP®) συγκέντρωσης 300.000 µg/ml. Προκειμένου να διεξαχθούν τα πειράματα της παρούσας μελέτης ήταν απαραίτητο το αρχικό διάλυμα να αραιωθεί σε μικρότερες τιμές με την προσθήκη νερού. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις των 30.000 µg/ml, 15.000 µg/ml, 5.000 µg/ml και 2.800 µg/ml. Πριν από την κάθε χρήση το διάλυμα TBZ τοποθετούνταν για 2 ώρες σε συσκευή υπερήχων. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων TBZ που παρασκευάστηκαν επιβεβαιώθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

2.3 Μέθοδος ανάλυσης TBZ σε σύστημα HPLC

Για την ανάλυση και τον προσδιορισμό τόσο των υπολειμμάτων του TBZ στις υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις το σύστημα HPLC Marathon III, που ήταν εξοπλισμένο με σύστημα αντλιών βαθμιδωτής έκλουσης, όγκο έγχυσης 20 µL και ανιχνευτή UV, ενώ ήταν συνδεδεμένο με ανάλογο λογισμικό Clarify® για την παραλαβή και επεξεργασία των δεδομένων. Ο διαχωρισμός του TBZ έγινε σε στήλη αντίστροφης φάσης (RP) C18, Nucleosil (150 x 4,6 mm, 5 µm id) (Macherey – Nagel GmbH, Germany) με ισοκρατική έκλουση με κινητή φάση Ακετυλονιτρίλιο: 39% , H₂O:60,5 % και Αμμωνία: 0,5 N 25%. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 254 nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του TBZ βασίστηκε στην χρήση πρότυπης καμπύλης ανάφορας όπου είχε κατασκευαστεί για προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου. Για την πρότυπη καμπύλη παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα TBZ αυξανόμενων συγκεντρώσεων και στην συνέχεια δείγμα 20 µl από κάθε διάλυμα εισήχθη στο σύστημα HPLC. Το εμβαδόν που προέκυψε από την έγχυση καθενός από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με τη συγκέντρωση του TBZ ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη.

2.4. Κύτταρα HepG2

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος HepG2. Τα κύτταρα HepG2 είναι μια συνεχής καρκινική σειρά και έχουν ευρεία χρήση σε πεδία έρευνας όπου αφορούν στον ηπατικό μεταβολισμό ,την ανάπτυξη, την ογκογέννεση και την ηπατοτοξικότητα. Η κυτταρική σειρά HepG2 καθιερώθηκε το 1979 από την Barbara Knowles και τους συνεργάτες της. Το 1980 ερευνητές από το Ινστιτούτο Wistar στην Φιλαδέλφεια κατοχύρωσαν ένα δίπλωμα ευρεσιτεχνίας όπου η κυτταρική σειρά HepG2 κατοχυρώθηκε ως « απομονωμένη από ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα κυτταρική σειρά» . Από τότε, τα HepG2 έχουν συμπεριληφθεί στον κατάλογο της ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) .



Εικόνα 8. Εικόνα κυτάρων HepG2 από μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (www.altogen.com)

Η μορφολογία των κυτάρων HepG2 είναι επιθηλιακή και ο αριθμός των χρωμοσωμάτων τους ποικίλει ανάμεσα σε 48 με 54 χρωμοσώματα ανα κύτταρο (Natarajan and Darroudi, 1991). Τα κύτταρα HepG₂ έχουν υποστεί έναν μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων και πειράματα γονιδιακής έκφρασης έχουν αναδείξει ότι υπερεκφράζουν 3586 γονίδια και υποεκφράζουν 2646 γονίδια συγκριτικά με τα φυσιολογικά ηπατικά κύτταρα (S. Costantini et al, 2013)

2.4.1 Συντήρηση κυττάρων σε καλλιέργεια

Τα κύτταρα διατηρούνται και αναπτύσσονται σε καλλιέργεια μέσα σε επίπεδες αποστειρωμένες πλαστικές φλάσκες με εμβαδόν επιφανείας 25 cm² (T₂₅) ή 75 cm² (T₇₅) καθώς σχηματίζονται δεσμοί μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης και του πλαστικού υποστρώματος στην επιφάνεια της φλάσκας. Όλες οι μεταχειρίσεις των κυττάρων HerG2 πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής επιπέδου βιοασφάλειας II (laminar flow hood) της εταιρείας Tel Star AV-30/70.

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο αποτελείται από το θρεπτικό μέσο DMEM ενισχυμένο με βόειο εμβρυϊκό ορό FBS (τελικής συγκέντρωσης 10% v/v στο θρεπτικό μέσο DMEM) και παρουσία των αντιβιοτικών πενικιλίνης (P) και στρεπτομυκίνης (S) σε τελικές συγκεντρώσεις 100 units/mL και 100 µg/mL αντίστοιχα στο θρεπτικό μέσο DMEM. Ο ορός πριν από κάθε χρήση απαιτείται να θερμαίνεται στους 55° C για 30 min (heat inactivation) με σκοπό την αποφυγή της ενεργοποίησης του συστήματος του συμπληρώματος στα κύτταρα της καλλιέργειας. Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται πριν την χρήση τους προθερμαίνονται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37° C για 15-30 λεπτά. Τα κύτταρα αναπτύσσονται στις φλάσκες με την προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM. Στις φλάσκες επιφανείας 25 cm² προστίθενται 5 ml θρεπτικού μέσου ενώ στις φλάσκες επιφανείας 75 cm² προστίθενται 15 ml θρεπτικού μέσου. Το θρεπτικό υλικό των φλασκών ανανεώνεται κατά μέσο όρο κάθε 2-3 ημέρες, ενώ η κατάσταση των κυττάρων ελέγχεται καθημερινά σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων (εταιρεία Kruss). Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό σε επωαστικό κλίβανο (εταιρείας RS BIOTECH) σε θερμοκρασία 37°C σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5%. Με το πέρας των ημερών και την κατανάλωση του θρεπτικού μέσου τα κύτταρα αναπτύσσονται καλύπτοντας το 70%-80% της φλάσκας καλλιέργειας. Στη φάση αυτή παρατηρείται συσσώρευση των κυττάρων με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται ο περαιτέρω πολλαπλασιασμός τους καθώς τα κύτταρα δημιουργούν δομές που ονομάζονται πολύστιβα, όπου τα καινούργια κύτταρα αναπτύσσονται επί των προηγούμενων. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια και πέρασμα σε νέα φλάσκα και για το σκοπό αυτό πραγματοποιείται η διαδικασία της θρυψινοποίησης που αφορά στην επώαση των κυττάρων με το ένζυμο θρυψίνη. Το ένζυμο θρυψίνη είναι μια πρωτεάση σερίνης- θρεονίνης, της οποίας η ενεργότητα οδηγεί στην διάσπαση των συνδέσεων των κυττάρων τόσο μεταξύ τους όσο και με το στερεό τους υπόστρωμα. Έτσι η διαδικασία της θρυψινοποίησης επιτελείται με σκοπό την αποκόλληση τόσο των κυττάρων μεταξύ τους όσο και των κυττάρων με το πλαστικό υπόστρωμα της φλάσκας. Το πρωτόκολλο

που ακολουθείται αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια: αρχικά το πλήρες θρεπτικό υλικό της φλάσκας καλλιέργειας αφαιρείται με τη χρήση γυάλινης πιπέτας pasteur που είναι συνδεδεμένη σε αντλία κενού.. Κατόπιν προστίθενται στη φλάσκα το διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline, 1X) σε ποσότητα που ποικίλλει ανάλογα με το εμβαδόν της επιφάνειας της φλάσκας καλλιέργειας. Ενδεικτικά, σε φλάσκα καλλιέργειας T₂₅ και T₇₅ προστίθενται 5 mL και 15 mL διαλύματος PBS αντίστοιχα. Ακολουθεί η ήπια ανακίνηση της φλάσκας που στοχεύει στην έκπλυση των κυττάρων με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων του ορού τα οποία δρουν ανασταλτικά στη δράση της θρυψίνης. Μετά την αφαίρεση του διαλύματος PBS προστίθενται τρυψίνη. Η ποσότητα της οποίας εξαρτάται από το εμβαδόν επιφανείας της φλάσκας καλλιέργειας. Ενδεικτικά, χρησιμοποιείται 1 mL θρυψίνης για την φλάσκα T₂₅ και 1,5 mL θρυψίνης για την φλάσκα T₇₅. Προκειμένου να δράσει το ένζυμο, η φλάσκα καλλιέργειας τοποθετείται είτε στον επωαστικό κλίβανο (σε θερμοκρασία 37° C, σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂) για 5 λεπτά είτε διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται ήπια. Είναι πολλές φορές απαραίτητο να γίνει και επιπλέον μηχανική ανάδευση με αποστειρωμένη πιπέτα, ώστε να επιτευχθεί μέγιστη και αποτελεσματικότερη διάσπαση των κυτταρικών συσσωματωμάτων και ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στην φλάσκα καλλιέργειας. Η πλήρης αποκόλληση των κυττάρων επιβεβαιώνεται μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Ακολούθως στο κυτταρικό εναιώρημα προστίθεται πλήρες θρεπτικό μέσο, ώστε να αδρανοποιηθεί η θρυψίνη και πραγματοποιείται καλή ανάδευση των κυττάρων με χρήση αποστειρωμένης πιπέτας, ώστε να διασπαστούν τυχόν συσσωματώματα. Μια ποσότητα από το κυτταρικό εναιώρημα (ποικίλλει ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος) μπορεί να μεταφερθεί σε νέα φλάσκα καλλιέργειας που περιέχει πλήρες θρεπτικό μέσο. Οι φλάσκες καλλιέργειας διατηρούνται στον επωαστικό κλίβανο (σε θερμοκρασία 37° C, σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂).

2.4.2. Μακροχρόνια διατήρηση κυττάρων εκτός καλλιέργειας

Η διατήρηση των κυττάρων εκτός καλλιέργειας πραγματοποιείται μετά από ψύξη-πάγωμα σε ειδικά σωληνάρια (cryovials) για χρονικά διαστήματα μερικών μηνών στους -80° C ή για ακόμη μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα σε υγρό άζωτο. Η μακροχρόνια αποθήκευση των κυττάρων γίνεται σε κρυοπροστατευτικό μέσο, το οποίο αποτελείται από πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM και DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο). Για την επιτυχή διατήρησή τους, είναι απαραίτητο τα κύτταρα να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση πριν το πάγωμα. Για αυτόν τον λόγο επιλέγονται για πάγωμα κύτταρα που καλύπτουν το 60% της επιφάνειας της φλάσκα

καλλιέργειας. Για το πάγωμα των κυττάρων ακολουθείται η εξής: αρχικά αφαιρείται από τη φλάσκα καλλιέργειας το πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM και προστίθεται το διάλυμα PBS (5 mL για την φλάσκα T₂₅, 15 mL για την φλάσκα T₇₅) με στόχο την απομάκρυνση υπολειμμάτων ορού. Ακολουθεί η αφαίρεση του διαλύματος PBS και η προσθήκη θρυψίνη (1 mL και 1,5 mL για την φλάσκα T₂₅ και την T₇₅ αντίστοιχα) και τα κύτταρα είτε τοποθετούνται για λίγα λεπτά στον επωαστικό κλίβανο (σε θερμοκρασία 37° C, σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂), είτε διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να δράσει η τρυψίνη. Αφού ολοκληρωθεί η αποκόλληση των κυττάρων τόσο μεταξύ τους όσο και από την επιφάνεια της φλάσκας καλλιέργειας, συνήθως με τη βοήθεια επιπρόσθετης μηχανικής ανάδευσης, προστίθεται πλήρες θρεπτικό μέσο, το οποίο αδρανοποιεί την θρυψίνη. Στη συνέχεια τα κύτταρα αναδεύονται καλά και τοποθετούνται σε σωληνάριο τύπου falcon των 15 mL. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνται στις 900 στροφές ανά min (rpm) για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία 4° C. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (κύτταρα) επαναδιαλύεται σε μέσο παγώματος (freezing medium). Το μέσο παγώματος περιέχει 10% v/v DMSO και 90% v/v πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM. Τα παγωμένα κύτταρα (1 mL περίπου) μεταφέρονται σε κατάλληλα σωληνάρια (cryovials), τα οποία τοποθετούνται στους -20° C για 1-1,5 ώρες και εν συνεχεία στους -80° C ώστε η ψύξη να είναι σταδιακή. Για την αποθήκευση των κυττάρων για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, τα σωληνάρια τοποθετούνται σε δοχείο, που περιέχει υγρό άζωτο. Σε κάθε cryovial πρέπει να αναγράφεται ο αριθμός των περασμάτων (passage) και η ημερομηνία παγώματος.

2.4.3 Ξεπάγωμα κυττάρων

Το ξεπάγωμα των κυττάρων πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες κυτταρικού θανάτου. Τα κύτταρα μεταφέρονται από τους -80° C ή από το δοχείο υγρού αζώτου σε υδατόλουτρο στους 37° C όπου θερμαίνονται υπό συνεχή ανακίνηση του σωληναρίου με γρήγορες κινήσεις. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε σωληνάριο τύπου falcon των 15 mL που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό και αναδεύονται με χρήση πιπέτας, ώστε να αναμιχθούν πλήρως. Έπειτα τα κύτταρα μεταφέρονται σε φλάσκες T₂₅ ή T₇₅ (ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων και τις ανάγκες του πειράματος), οι οποίες τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37° C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται ανανέωση του θρεπτικού υλικού για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων DMSO που περιέχονται στο μίγμα παγώματος

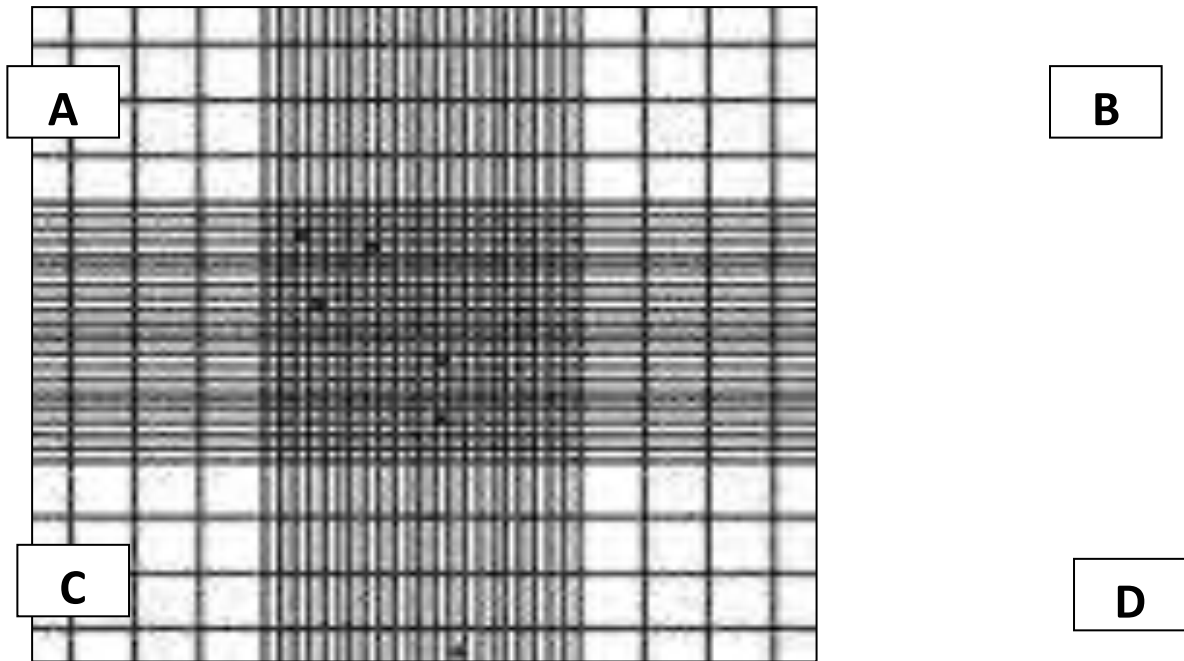
(freezing medium) και να αυξηθεί ο ρυθμός ανάπτυξης τους. Εναλλακτικά τα κύτταρα αφού αποψυχθούν και μεταφερθούν σε σωληνάριο τύπου falcon (που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό) μπορούν να φυγοκεντρηθούν σε 1000 στροφές και να επαναδιαλυθούν σε πλήρες θρεπτικό μέσο προτού μεταφερθούν σε νέα φλάσκα καλλιέργειας (T_{25} ή T_{75}).

2.5. Μέτρηση αριθμού κυττάρων με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου

Προκειμένου να γίνει η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων πριν τη διεξαγωγή ενός πειράματος τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής: Τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS, επωάζονται με διάλυμα θρυψίνης και αποκολλώνται από τη φλάσκα καλλιέργειας. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε σωληνάριο τύπου falcon των 15 mL και φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά στα 900 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (κύτταρα) επαναδιαλύεται σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Τέλος 10 μ L από το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρονται σε αιμοκυτταρόμετρο (πλακίδιο Neubauer) για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων.

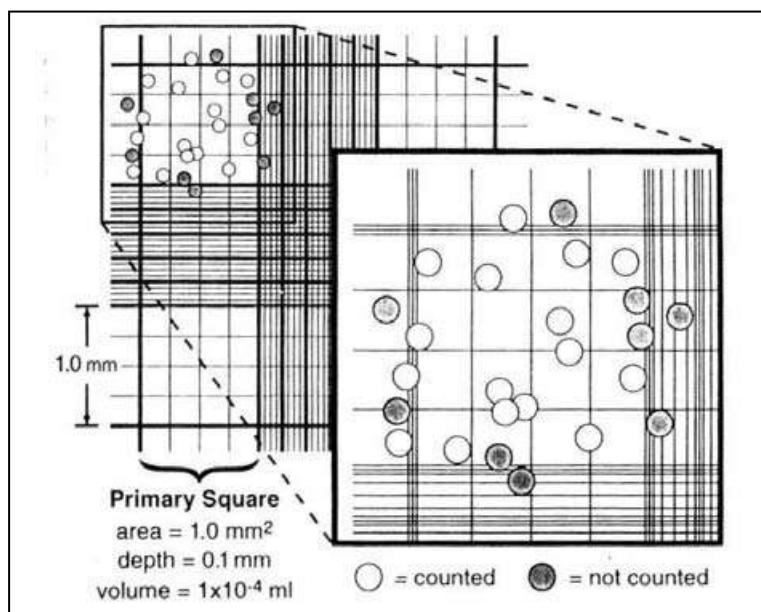
Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα, που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια.

Κάθε μια από αυτές τις λείες επιφάνειες έχει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm. Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2.5 μ m, που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του εάν τα κύτταρα θα θεωρηθούν ότι βρίσκονται μέσα ή έξω από το πλέγμα. Επίσης, κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Τα υπόλοιπα τετράγωνα σχηματίζουν ένα σταυρό και το σχήμα αυτό βοηθά στον εντοπισμό των κυττάρων κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο.



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της επιφάνειας του αιμοκυτταρόμετρου , που βοηθά στη μέτρηση των κυττάρων

Για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων ακολουθείται η εξής διαδικασία: μετράται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων και στα 4 τετράγωνα (A,B,C,D) και υπολογίζεται ο μέσος όρος τους $(A+B+C+D)/4$. Στη συνέχεια ο μέσος όρος κυττάρων ανά τετραγωνάκι πολλαπλασιαζόμενος με 10^4 δίνει τον αριθμό των κυττάρων ανά mL κυτταρικού εναιωρήματος.



Εικόνα 10. Σχηματική παρουσίαση του υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων στο πλακίδιο Neubauer

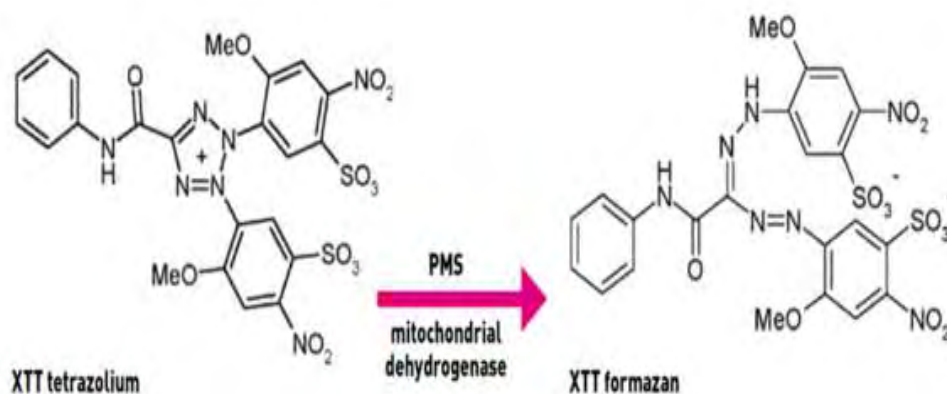
2.6. Προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης με τη μέθοδο ΧΤΤ

2.6.1. Αρχή της μεθόδου

Για την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης αξιοποιήθηκε μια μη-ραδιενεργή και φασματοφωτομετρική μέθοδος που βασίζεται στο αντιδραστήριο ΧΤΤ (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxide). Χρησιμοποιήθηκε το cell proliferation kit II της εταιρείας Roche, το οποίο περιέχει 2 αντιδραστήρια: 1) το πορτοκαλί χρώματος αντιδραστήριο Α, το οποίο καλείται ΧΤΤ labeling reagent και περιέχει 1 mg/mL (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate} σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 χωρίς την παρουσία της χρωστικής ερυθρότης φαινόλης και 2) το κίτρινου χρώματος αντιδραστήριο Β, το οποίο καλείται electron-coupling reagent και περιέχει 0,383 mg/mL PMS (N-methyldibenzopyrazine methyl sulfate) σε αποστειρωμένο PBS. Το αντιδραστήριο Β (PMS) χρησιμεύει ως ο δότης ηλεκτρονίων στην αντίδραση της Εικόνας 4. Το ΧΤΤ συντέθηκε το 1988 από τον Paull και τους συναδέλφους του (Paull et al., 1988) και η μέθοδος περιγράφηκε πρώτα από τον Scudiero και τους συνεργάτες του (Scudiero et al., 1988) ενώ βελτιώθηκε μέσα στα επόμενα χρόνια και από άλλους ερευνητές (Roehm et al., 1991, Jost et al., 1992). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα διάσπασης του κίτρινου άλατος τετραζολίου ΧΤΤ και στον σχηματισμό της φορμαζάνης, που είναι μια υδατοδιαλυτή χρωστική πορτοκαλί χρώματος σε μεταβολικά ενεργά και συνεπώς ζωντανά κύτταρα, από μιτοχονδριακά ένζυμα, τις αφυδρογονάσες (Εικόνα 4). Η αύξηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων συνεπάγεται αύξηση της δραστηριότητας των μιτοχονδριακών αφυδρογονασών στο δείγμα. Αυτή η αύξηση αντιπροσωπεύεται άμεσα από την ποσότητα της πορτοκαλί φορμαζάνης που σχηματίζεται, η οποία μπορεί άμεσα να ποσοτικοποιηθεί από ένα φασματοφωτόμετρο ELISA (multi-well ELISA reader). Αυτό διασφαλίζει υψηλό βαθμό ακρίβειας και άμεση επεξεργασία των αποτελεσμάτων από τον υπολογιστή, γεγονός που καθιστά δυνατό τον γρήγορο και εύκολο χειρισμό μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου σε σχέση με αυτές που χρησιμοποιούν άλλα άλατα τετραζολίου (π.χ ΜΤΤ) είναι το γεγονός ότι η διάσπαση του ΧΤΤ δίνει μια υδατοδιαλυτή ένωση και έτσι δεν απαιτείται το βήμα της διαλυτοποίησης. Επίσης, πρόκειται για μια μέθοδο εύκολη και ασφαλή καθώς δεν απαιτεί την χρήση ραδιενεργών ισοτόπων, επιπρόσθετων αντιδραστηρίων και σταδίων έκπλυσης, ιδιαίτερα ευαίσθητη και ακριβή καθώς αφενός ανιχνεύει ακόμη και πολύ μικρούς αριθμούς κυττάρων και αφετέρου παρατηρείται υψηλή συσχέτιση

ανάμεσα στις λαμβάνουσες τιμές απορρόφησης από την φασματοφωτομέτρηση και στον υπάρχοντα αριθμό κυττάρων. Η μέθοδος ΧΤΤ βρίσκει εφαρμογή στην εξέταση της κυτταρικής ανάπτυξης σε απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνινες ή θρεπτικές ουσίες αλλά και στη μέτρηση της κυτταροτοξικότητας.



Εικόνα 11. Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτό άλας φορμαζάνης

2.7. Πειραματική διαδικασία υπολογισμού της επίδρασης του TBZ και των μεταβολιτών του στην ανάπτυξη κυττάρων HepG₂

Η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της κυτταρικής ανάπτυξης που βασίζεται στο αντιδραστήριο ΧΤΤ διαρκεί 4 ημέρες. Την πρώτη ημέρα πραγματοποιείται η επίστρωση συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων σε τρυβλίο 96 θέσεων (96-well plate). Την επόμενη ημέρα ξεκινάει η επώαση των κυττάρων με τις εξεταζόμενες αραιώσεις του γεωργικού φαρμάκου και μετά από 48 ώρες (την τέταρτη ημέρα) γίνεται η προσθήκη του αντιδραστηρίου ΧΤΤ και ακολουθεί φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο ELISA (multi-well ELISA reader) για την εκτίμηση της κυτταρικής ανάπτυξης.



Εικόνα 12. Τρυβλίο 96 θέσεων (96 well plate)

Αναλυτικά την πρώτη ημέρα του πειράματος πραγματοποιείται η επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλίο 96 θέσεων (96-well plate). Για την επιλογή του κατάλληλου αριθμού κυττάρων, ανάλογα και με τον τύπο της κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιείται, πρέπει προηγουμένως να πραγματοποιηθεί ένα πείραμα πιλοδότησης στο οποίο μελετάται η ανάπτυξη διαφορετικού αριθμού κυττάρων, σε συνδυασμό με διαφορετικές ώρες επώασης με το αντιδραστήριο ΧΤΤ. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κατά την πειραματική διαδικασία τα κύτταρα πρέπει να διαθέτουν έναν καλό μεταβολικό ρυθμό, κάτι το οποίο παρατηρείται όταν καλύπτουν ομοιόμορφα το 40%-60% του πιάτου της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα για τα κύτταρα HepG2 χρησιμοποιήθηκαν 30.000 κύτταρα ανά πηγαδάκι. Μετά την θρυψινοποίηση και τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων ανά mL κυτταρικού εναιωρήματος υπολογίζεται ο όγκος που περιέχει τον κατάλληλο αριθμό κυττάρων, στα οποία προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με τα αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (σε τελικές συγκεντρώσεις 100 units/ mL και 100 µg/ mL αντίστοιχα) και με FBS (σε τελική συγκέντρωση 10% v/v) σε τελικό όγκο 150 µL. Τα κύτταρα τοποθετούνται στα πηγαδάκια του τρυβλίου 96 θέσεων και επωάζονται στους 37° C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ μέχρι την επόμενη ημέρα, ώστε να προσκολληθούν στον πάτο του πιάτου καλλιέργειας. Την δεύτερη ημέρα πραγματοποιείται η προσθήκη των εξεταζόμενων δειγμάτων του φαρμάκου στα κύτταρα. Για κάθε πηγαδάκι ετοιμάζεται μίγμα, το οποίο περιέχει θρεπτικό υλικό DMEM, απουσία ορού, με αντιβιοτικά και την υπό εξέταση αραίωση σε τελικό όγκο.

Στα πειράματα επίδρασης του TBZ σε κύτταρα HepG2 με απώτερο σκοπό τον υπολογισμό της τιμής IC50 χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 240, 260, 270, 275, 280, 300, 320 και 340 µg/ml του γεωργικού φαρμάκου.

Στα πειράματα προσδιορισμού της κυτταρικής ανάπτυξης μετά από επώαση των κυττάρων με δείγμα που λήφθηκε από τις φλάσκες στις οποίες συνέβη η βιοδιάσπαση του TBZ και με δείγμα που λήφθηκε από τις φλάσκες-μάρτυρες (μη εμβολιασμένες με την βακτηριακή κοινότητα που αποδομωσε το TBZ) σε διαφορετικούς χρόνους (7, 14, 23, 28, 30, 35, 39, 45 ημέρες) κάθε πηγαδάκι περιείχε 20 µl του εκάστοτε δείγματος σε θρεπτικό υλικό DMEM, με αντιβιοτικά, απουσία ορού σε τελικό όγκο 100 µL. Κάθε δείγμα δοκιμάστηκε εις διπλούν. Είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι όλα τα δείγματα πριν χρησιμοποιηθούν για την επώαση των κυττάρων τοποθετήθηκαν στην συσκευή υπερήχων (όπως έχει ήδη περιγραφεί). Η χρήση υπερήχων ειδικά στα δείγματα που ελήφθησαν από τις φλάσκες βακτηριακής καλλιέργειας προκαλεί τη διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και θάνατο των βακτηριακών στελεχών που λαμβάνονται κατά την δειγματοληψία, προτού αυτό επωαστεί με τα κύτταρα HepG₂. Αφού απομακρυνθεί προσεκτικά το θρεπτικό υλικό από το κάθε πηγαδάκι και προστίθενται στα κύτταρα 100 µl από τα διαφορετικά δείγματα που προαναφέρθηκαν. Επιπρόσθετα κάθε πείραμα περιελάμβανε και τα ακόλουθα δείγματα i) δείγματα ελέγχου, δηλαδή κύτταρα τα οποία επωάζονται παρουσία DMEM και αντιβιοτικών, απουσία ορού και δειγμάτων φαρμάκου (τουλάχιστον εις τριπλούν) και ii) δείγμα «θετικού ελέγχου», δηλαδή κύτταρα που επωάζονται παρουσία του αντικαρκινικού φαρμάκου ετοποσίδη σε τελική συγκέντρωση 10 µM, όπου αναμένεται πλήρης κυτταρικός θάνατος. Το τρυβλίο τοποθετείται σε κλίβανο θερμοκρασίας 37° C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και τα κύτταρα επωάζονται για 48 ώρες. Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρείας Roche, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η αναλογία των αντιδραστηρίων A και B, που περιέχονται στο kit πρέπει να είναι 50:1, επομένως πριν την χρήση του αντιδραστηρίου XTT τα αντιδραστήρια A και B αναμιγνύονται στη συγκεκριμένη αναλογία και προστίθενται 50 µl σε κάθε πηγαδάκι. Ακολουθώς το τρυβλίο τοποθετείται σε κλίβανο θερμοκρασίας 37° C, σε ατμόσφαιρα 5 % CO₂ και τα κύτταρα επωάζονται για 4 ώρες. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 450 και μήκος κύματος αναφοράς 630 nm σε φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) με χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek).

2.8. Επεξεργασία - ανάλυση των αποτελεσμάτων

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων επίδρασης του TBZ και των μεταβολιτών του στην ανάπτυξη κυττάρων HepG₂ πραγματοποιήθηκε η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και υπολογίστηκε το ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τις τιμές των απορροφήσεων σε μήκη κύματος 450 και 630 nm, το επι της εκατό (%) ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα control δίνεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$\frac{O.D.control - O.D.average}{O.D.control} \times 100$$

Όπου:

O.D. control average: ο μέσος όρος των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων ελέγχου. Η απορρόφηση του κάθε δείγματος ελέγχου υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 630 nm από την απορρόφηση στα 450 nm στα δείγματα που περιέχουν μόνο κύτταρα (απουσία εκχυλίσματος).

O.D. average: ο μέσος όρος της τιμής απορρόφησης κάθε δείγματος, η οποία υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 630 nm από την απορρόφηση στα 450 nm για κάθε δείγμα της ίδιας μεταχείρισης και την επακόλουθη εύρεση του μέσου όρου αυτών των διαφορών για κάθε μεταχείριση.

2.9. Έλεγχος Μυκόπλασματος σε κύτταρα HepG₂

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων πραγματοποιούνταν σε τακτά χρονικά διαστήματα έλεγχος της κυτταρικής σειράς HepG₂ για μόλυνση τόσο από εξωγενείς βακτηριακούς παράγοντες όσο και από μυκόπλασμα. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από κύτταρα HepG₂ με τη χρήση του πειραματικού kit της εταιρείας Invitrogen. Έπειτα, μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της μόλυνσης των κυττάρων από μυκόπλασμα με κατάλληλο ζεύγος εκκινητικών μορίων που υβριδοποιούνται σε συγκεκριμένη

νουκλεοτιδική αλληλουχία του μυκοπλάσματος. Παράλληλα στην αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ποιότητας και ποσότητας DNA, η αλληλουχία που κωδικοποιεί για την προθρομβίνη, με ζεύγος εκκινητών που υβριδίζονται σε καθορισμένη αλληλουχία του γονιδίου της προθρομβίνης. Το τελευταίο αποσκοπούσε στον έλεγχο της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων της PCR.

Τα βασικά υλικά της αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

- **Buffer** (ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχεται από την εταιρεία Kara Biosystems). Το ρυθμιστικό διάλυμα εξασφαλίζει ένα σταθερό εύρος pH που είναι απαραίτητο για τη δραστηριότητα του ενζύμου Taq πολυμεράση. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε δεν περιείχε $MgCl_2$
- **dNTPs** (δεοξυ-τριφωσφορικά νουκλεοτίδια συγκέντρωσης 10 mM). Τα dNTPs αποτελούν τα δομικά μονομερή που αξιοποιούνται από την Taq πολυμεράση για τη σύνθεση των νέων κλώνων DNA κατά την ενίσχυση με PCR
- **Εκκινητές** (συγκέντρωσης 50 pmoles/μl). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών. Το ένα ζεύγος εκκινητών: forward (5' CCRTGCACCACTGTCWHHHBGWWAACCTC 3') και reverse (5' GAA AGY GTG GGG AGC AAA YAG GAT TAG ATA CCCT 3') αφορούσε την ενίσχυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του μυκοπλάσματος (260 bp) και το άλλο ζεύγος: forward (5' TCT AGA AACAGTTGCCTGGC 3') και reverse (5' ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC 3') αφορούσε την ενίσχυση του γονιδίου της προθρομβίνης (340 bp)
- **Χλωριούχο Μαγνήσιο ($MgCl_2$)** (συγκέντρωσης 25 mM). Το άλας με την διάστασή του δίνει Mg^{+2} τα οποία λειτουργούν ως συμπαραγοντας απαραίτητος για τη δράση της Taq πολυμεράσης
- **Taq πολυμεράση** (συγκέντρωσης 5 U/μl). Απομονώθηκε από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες. Χρησιμοποιήθηκε για την επέκταση-πολυμερισμό των νεοσυντιθέμενων DNA κλώνων κατά την ενίσχυση με PCR.
- **Απιονισμένο νερό**
- **Εκμαγείο DNA**

Η αντίδραση PCR έγινε σε τελικό όγκο 25 μl και περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) τελικής συγκέντρωσης 1X, dNTPs τελικής συγκέντρωσης 0,4 mM, forward εκκινητή 50 pmole, reverse εκκινητή 50 pmole, χλωριούχο μαγνήσιο 2 mM και 1 Unit Taq πολυμεράσης.

Κατά την διαδικασία της PCR εντός του θερμοκυκλοποιητή πραγματοποιήθηκαν τα ακόλουθα στάδια :

- Αποδιάταξη του DNA-εκμαγείου (95 °C → 5 min)
Συνολικά 40 κύκλοι όπου σε κάθε κύκλο πραγματοποιείται:
- Αποδιάταξη του εκμαγείου στους 95 °C για 30 sec
- Υβριδοποίηση των εκκινητών στους 55 °C για 30 sec
- Πολυμερισμός-επέκταση στους 72 °C για 30 sec
- Τελική επέκταση των προϊόντων (72 °C , 10 min)

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2 % w/v. Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης ζυγίστηκαν 1,2 g αγαρόζης τα οποία διαλυτοποιήθηκαν σε 60 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X TAE (διάλυμα 50X: Tris-base (242 gr), οξικό οξύ (57.1 ml), EDTA (18.6 gr), ddH₂O μέχρι 1 L. pH: 8). Τέλος στο παραπάνω διάλυμα προστέθηκε βρωμιούχο αιθιδίο τελικής συγκέντρωσης 0,5 µg/ml που εξασφάλισε την οπτικοποίηση των ζωνών στην ηλεκτροφόρηση παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης, απαιτείται η ανάμειξη τους με ένα διάλυμα φόρτωσης ή Loading Buffer σε τελική συγκέντρωση 1X (το διάλυμα 6X περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης και 30% w/v γλυκερόλη). Επίσης, μαζί με τα δείγματα είναι απαραίτητη και η φόρτωση ενός δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (Low Molecular DNA Ladder). Τα μεγέθη των ζωνών που περιέχει είναι γνωστά και σύμφωνα με αυτά και ανάλογα με τη θέση κάθε ζώνης υπολογίζεται το μοριακό βάρος των τμημάτων DNA.

2.10. Βιοαποικοδομητική Βακτηριακή κοινότητα TBZ

Για την βιοαποικοδόμηση του TBZ χρησιμοποιήθηκε μια βακτηριακή κοινότητα, η οποία αποτελούνταν κυρίως από α- (*Bosea*, *Shinella*, *Oligotropha*, *Sphingomonas*), β- (*Methylobacillus*, *Methilibium*), και γ-πρωτεοβακτήρια (*Pseudomonas*). Όμως ένα βακτήριο του γένους *Sphingomonas* (φυλογενετικά συγγενές με *S. wittichii*) ήταν υπεύθυνο για την αποδόμηση του TBZ.

2.11. Παρασκευή θρεπτικού μέσου MSMN

Η ικανότητα βιοδιάσπασης του φαρμάκου επηρεάζεται άμεσα από το μέσο καλλιέργειας στο οποίο αναπτύσσεται η βακτηριακή κοινότητα και συγκεκριμένα από παράγοντες όπως η ποσότητα θρεπτικού υλικού, το pH, η συγκέντρωση του TBZ, η θερμοκρασία και η βακτηριακή πυκνότητα (Karpouzas DG, Walker A. 2000). Για να

επιτευχθεί η μέγιστη ικανότητα βιοδιάσπασης του φαρμάκου τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένου με άζωτο (MSM+N). Το υπόστρωμα MSM+N περιείχε, εκτός από πηγή άνθρακα, όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μικροστοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών υπο μορφή αλάτων (Mg, Mn, Fe, K, P, Ca, S, N). Αυτό έγινε με σκοπό τη μοναδική πηγή άνθρακα για τα βακτήρια να αποτελέσει το TBZ. Το θρεπτικό αυτό διάλυμα παρασκευάστηκε από τρία πυκνά διαλύματα (stock) ανόργανων αλάτων όπως αυτά αναγράφονται στον πίνακα 2.

	Συστατικά	g/l
Πυκνό διάλυμα 1	KH_2PO_4	22,7
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$	59,7
	NH_4Cl	10,0
Πυκνό διάλυμα 2	$\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	5,0
	$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	0,1
	$\text{MnSO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$	0,15
Πυκνό διάλυμα 3	$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,46

Πίνακας 2 : σύσταση διαλυμάτων ανόργανων αλάτων

Τα πυκνά διαλύματα 1 και 2 παρασκευάστηκαν με διάλυση των συστατικών τους σε 1L απεσταγμένου νερού και στη συνέχεια αποστειρώθηκαν σε κλίβανο για 25 λεπτά στους 121°C υπό πίεση 2,1 atm. Το πυκνό διάλυμα 3 αποστειρώθηκε με ειδικά φίλτρα με μέγεθος πόρων 0,2 μm καθώς ο θειικός σίδηρος (FeSO_4) είναι θερμοευαίσθητος. Για την προετοιμασία 1L MSMN, 100 ml από το πυκνό διάλυμα 1 αραιώθηκαν με 780 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και το διάλυμα αποστειρώθηκε εκ νέου. Μόλις το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκαν ασηπτικά σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής επιπέδου βιοασφάλειας II (laminar flow hood) 100 ml διαλύματος 2 και 20 ml διαλύματος 3.

2.12. Παρασκευή εμπλουτισμένων καλλιεργειών με TBZ και αβιοτικών μαρτύρων

Για την βιοδιάσπαση του Thiabendazole χρησιμοποιήθηκε μια βακτηριακή βιοκοινότητα στην οποία βασικό ρόλο για την αποικοδόμηση του φαρμάκου κατείχαν τα βακτηριακά στελέχη του γένους *Sphingomonas*. Παρασκευάστηκαν 3 κωνικές φιάλες των 250 ml (φλάσκες) όπου περιείχαν και προστέθηκαν κατά σειρά 100 ml θρεπτικού μέσου MSM+N το οποίο περιείχε όλα τα θρεπτικά στοιχεία που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των βακτηρίων εκτός από άνθρακα τον οποίο θα αντλήσουν από την διάσπαση του φαρμάκου, 7 ml TBZ συγκέντρωσης 1.208,2 mg/l και 5 ml βακτηριακής καλλιέργειας. Επίσης παρασκευάστηκαν 2 φλάσκες που αποτελούσαν του αβιοτικούς μάρτυρες του πειράματος προκειμένου να εξακριβωθεί εάν η διάσπαση του φαρμάκου είναι αποτέλεσμα της βακτηριακής δράσης ή άλλων παραγόντων όπως για παράδειγμα η παρουσία φωτός. Οι φλάσκες-μάρτυρες περιείχαν 100 ml MSMN και 7 ml TBZ συγκέντρωσης 1.208,2 mg/l χωρίς βακτήρια. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε καθώς αποτελεί ικανοποιητική προσέγγιση της συνιστώμενης δόσης του TBZ στα συσκευαστήρια φρούτων και άρα περιέχεται και στα απόβλητα. Για την παρασκευή του διαλύματος TBZ συγκέντρωσης 1208,2 mg/l αραιώθηκε διάλυμα TBZ συγκέντρωσης 30.000 μg/ml. Η προσθήκη του φαρμάκου τόσο στις φλάσκες που περιείχαν την βακτηριακή βιοκοινότητα όσο και στις φλάσκες μάρτυρες έγινε σε ασηπτικές σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής επιπέδου βιοασφάλειας II (laminar flow hood). Για την παρασκευή του διαλύματος TBZ συγκέντρωσης 1208,2 mg/l αραιώθηκε διάλυμα TBZ συγκέντρωσης 30.000 μg/ml. Η προσθήκη του φαρμάκου τόσο στις φλάσκες που περιείχαν την βακτηριακή βιοκοινότητα όσο και στις φλάσκες μάρτυρες έγινε σε ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Ύστερα από την απόψυξη του διαλύματος της υγρής καλλιέργειας των βακτηρίων το οποίο είχε συγκέντρωση 10^5 βακτήρια/ml, 5 ml από την βακτηριακή καλλιέργεια εμβολιάστηκαν σε κάθε φλάσκα

2.13. Πορεία βιοδιασπασης Thiabendazole

Το σύνολο των φλασκών που παρασκευάστηκαν τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα υπό ανάδευση (150 περιστροφές ανά λεπτό) στους 20°C. Η αποικοδόμηση του φαρμάκου από την βακτηριακή καλλιέργεια ελεγχόταν με συχνές δειγματοληψίες όπου παρατηρούταν η μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου. Δείγμα λαμβανόταν επίσης και από τις φλάσκες-μάρτυρες. Δείγματα από όλες τις φλάσκες συλλέχθηκαν στις 0, 7, 14, 23, 28, 30, 35, 39 και 45 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Κατά την διαδικασία της δειγματοληψίας λαμβάνονταν 1 ml από κάθε φλάσκα υπο ασηπτικές Πρώτα λαμβανόταν δείγμα από τις φλάσκες – μάρτυρες και κατόπιν από τις φλάσκες

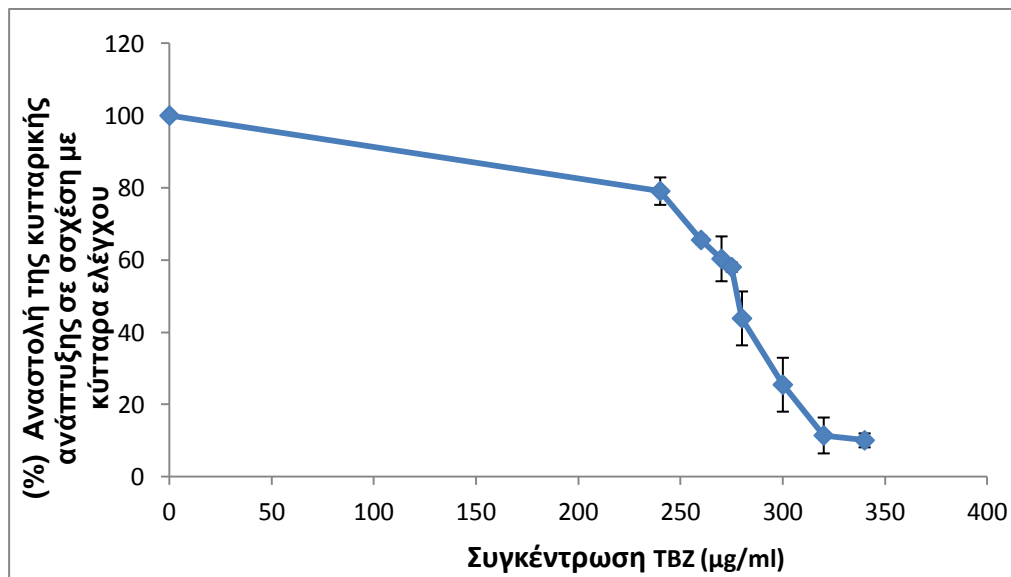
που περιείχαν την βακτηριακή καλλιέργεια με σκοπό την αποφυγή επιμολύνσεων. Κάθε φορά από το συνολικό 1 ml λαμβάνονταν 10 μl για να παρατηρηθεί η πορεία της διάσπασης και της μη διάσπασης του φαρμάκου από τις αντίστοιχες φλάσκες. Αναλυτικότερα, 10 μl από κάθε φλάσκα αραιώνονταν διαδοχικά. Πρώτα γινόταν μια αραιώση 1/100 (10μl TBZ ,990 μl H₂O) και μια δεύτερη αραιώση ½ (500 μl TBZ, 500 μl μεθανόλη). Το τελευταίο διάλυμα εισάγονταν στο σύστημα HPLC και παρατηρούταν η πορεία διάσπασης του γεωργικού φαρμάκου. Τα υπόλοιπο περιεχόμενο μετά την λήψη των 10μl αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία -20°C για μελλοντική χρήση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Υπολογισμός του IC50 του TBZ σε κύτταρα HepG2

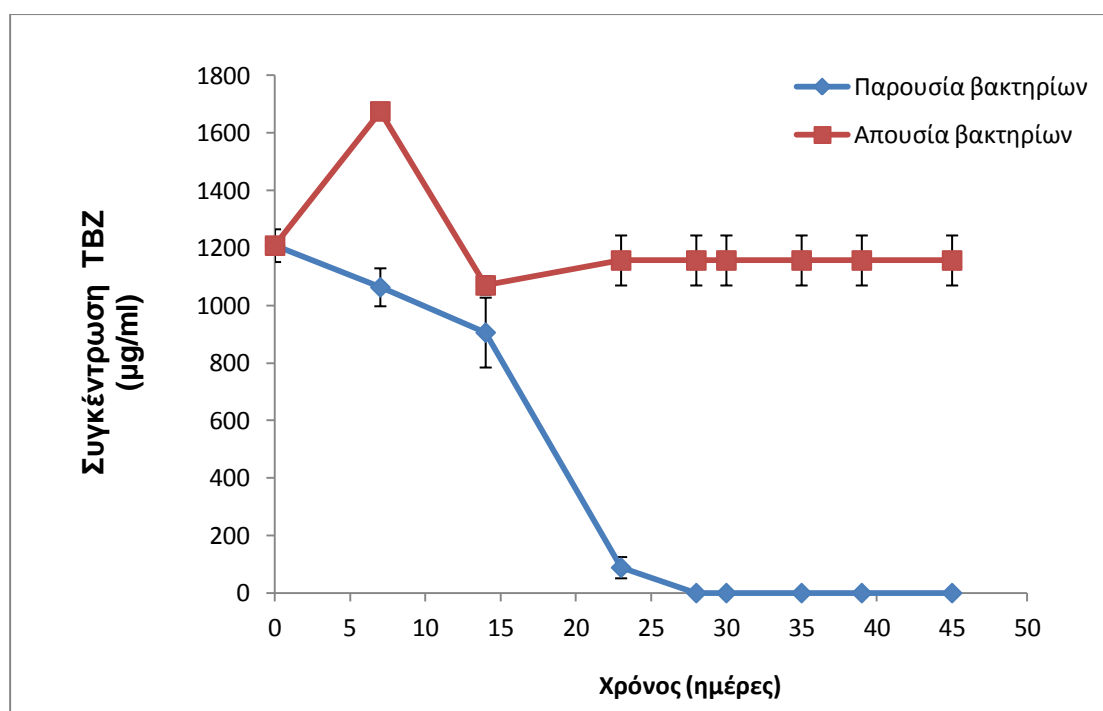
Στο πρώτο στάδιο του πειράματος ο σκοπός ήταν να υπολογιστεί η τιμή IC50 του TBZ (half maximal inhibitory concentration), ή μέση ανασταλτική συγκέντρωση, που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του φαρμάκου TBZ που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων κατά 50%. Για το λόγο αυτό ηπατοκαρκινικά κύτταρα (HepG2) επωάστηκαν για 48 ώρες με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις του TBZ: 240, 260, 270, 275, 280, 300, 320 και 340 $\mu\text{g/ml}$ και εκτιμήθηκε το επί τοις εκατό (%) ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σύγκριση με κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε ουσία (κύτταρα ελέγχου, control). Στο διάγραμμα 1 απεικονίζεται το εκατοστιαίο ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης έναντι της συγκέντρωσης του TBZ. Το TBZ προκαλεί περιορισμένη αναστολή (<10%) της κυτταρικής ανάπτυξης σε εύρος συγκεντρώσεων από 0-240 mg/L . Μόλις ξεπεραστεί το κατώφλι της συγκέντρωσης των 240 mg/L , το TBZ εμφανίζει έντονη ηπατοτοξική δράση. Είναι αξιοσημείωτο ότι η συγκεκριμένη κλίση αφορά ένα εύρος συγκεντρώσεων περίπου 100 mg/L , στο οποίο παρατηρείται αύξηση την αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης από το 20% στο 90%. Με βάση την συγκεκριμένη καμπύλη αναστολής υπολογίστηκε ότι η μέση ανασταλτική συγκέντρωση (IC50) του TBZ για τα κύτταρα HepG2 βρίσκεται μεταξύ 275-280 mg/L .



Διάγραμμα 1: Αναστολή (% σε σχέση με κύτταρα ελέγχου) της ανάπτυξης κυττάρων HepG₂ σε εύρος συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου TBZ

3.2. Αποδόμηση TBZ από βακτηριακές κοινότητες

Στο δεύτερο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας μελετήθηκε η αποδόμηση του TBZ από βακτηριακή κοινότητα. Για το λόγο καλλιέργειες της συγκεκριμένης βακτηριακής κοινότητας εμβολιάστηκαν με υψηλή συγκέντρωση TBZ (1.208 mg/L) και παρατηρήθηκε η αποδόμηση του TBZ και η μείωση της τοξικότητας δειγμάτων της καλλιέργειας κατά την πορεία αποδόμησης του TBZ. Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζεται η βιοαποδόμηση του TBZ σε σχέση με το χρόνο όπου και παρατηρήθηκε ότι η αποδόμηση του TBZ στις εμβολιασμένες με την βακτηριακή κοινότητα καλλιέργειες ολοκληρώθηκε σε 28 ημέρες ενώ αντίθετα δεν παρατηρήθηκε σημαντική διάσπαση του TBZ απουσία των βακτηρίων.



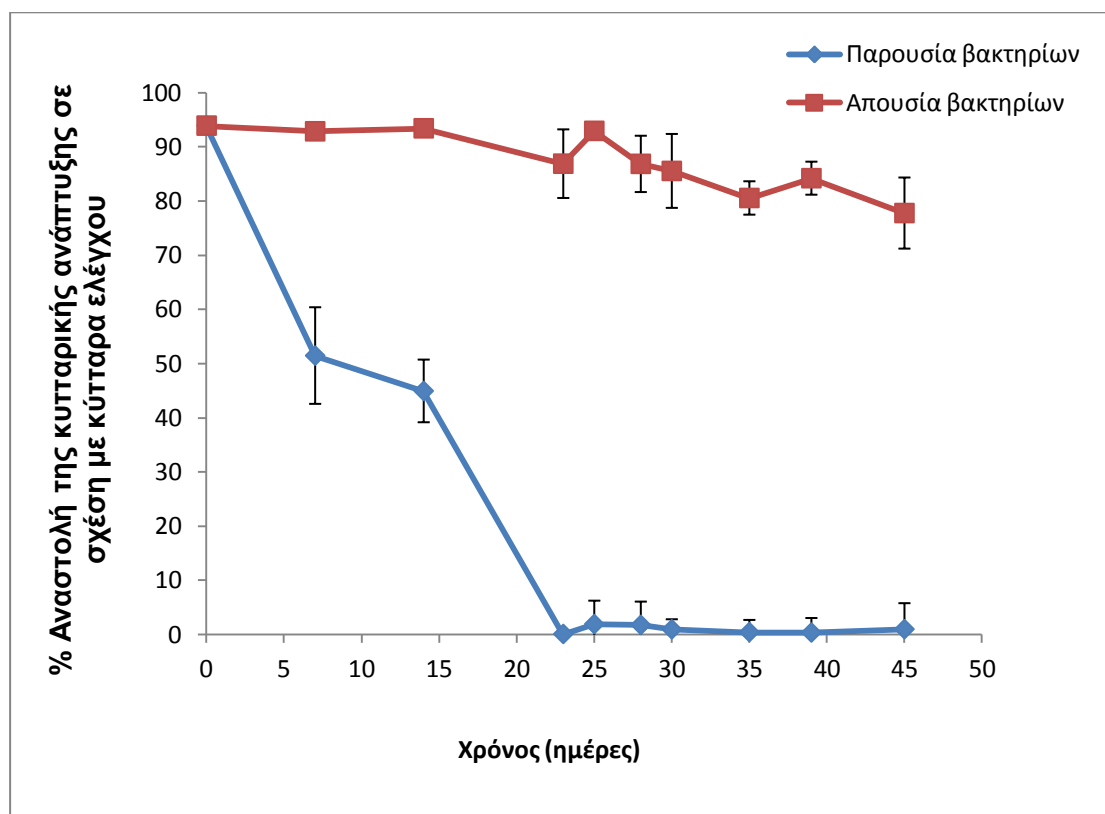
Διάγραμμα 2 : Συγκέντρωση του TBZ σε συσχέτιση με τον χρόνο παρουσία (μπλε) και απουσία (κόκκινο) βακτηριακών κοινοτήτων.

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 2 η πορεία διάσπασης μπορεί να διαχωριστεί σε 3 φάσεις. Κατά την πρώτη φάση, από τον χρόνο 0 έως την 15^η ημέρα όπου παρατηρήθηκε 25% αποδόμηση του TBZ (αργή φάση αποδόμησης). Ακολουθεί η δεύτερη ταχεία φάση αποδόμησης μεταξύ 15 και 23 ημερών όπου τα επίπεδα

αποδόμηση του TBZ φτάνουν το 90%. Τέλος ακολουθεί η τρίτη φάση από την 28η ως την 45η ημέρα όπου και ολοκληρώνεται η αποδόμηση του TBZ και πιθανότατα ακολουθεί παραγωγή διαφόρων άγνωστων μεταβολικών προϊόντων τα οποία είτε συσσωρεύονται είτε αποδομούνται περαιτέρω.

3.3. Επίδραση TBZ στην ανάπτυξη κυττάρων HepG2 μετά από επώαση του παρουσία και απουσία βακτηριακών κοινοτήτων

Η μικροβιακή αποδόμηση του TBZ από τη βακτηριακή κοινότητα οδηγεί στην παραγωγή άγνωστων μεταβολιτών του TBZ. Για το λόγο αυτό στο επόμενο στάδιο τα κύτταρα HepG2 επώασθησαν με δείγματα από τις παραπάνω καλλιέργειες τα οποία λήφθηκαν κατά την πορεία αποδόμησης του TBZ. Η υπόθεση εργασίας μας ήταν ότι η αποδόμηση του TBZ θα οδηγήσει σε μειωμένη τοξικότητα άρα και σε μείωση της τοξικότητας των δειγμάτων καλλιέργειας στα κύτταρα HepG2. Η κυτταρική σειρά HepG2 επώασθη για 48 ώρες με τα δείγματα που λήφθηκαν από τις φλάσκες όπου πραγματοποιήθηκε η διάσπαση του φαρμάκου και με τα δείγματα από τις φλάσκες-μάρτυρες (απουσία βακτηριακής κοινότητας) και η εκατοστιαία αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με το χρόνο δίνεται στο Διάγραμμα 3.



Διάγραμμα 3 : Αναστολή (% σε σχέση με κύτταρα ελέγχου) της ανάπτυξης κυττάρων HepG₂ σε συσχέτιση με τον χρόνο μετά από επώαση του TBZ παρουσία (μπλε) και απουσία (κόκκινο) βακτηριακών κοινοτήτων.

Τα δείγματα που ελήφθησαν από τις φλάσκες-μάρτυρες περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις TBZ και όπως αναμένονταν στα δείγματα αυτά δεν παρατηρήθηκε μείωση της αναστολής των κυττάρων. Αντιθέτως παρατηρήθηκε μια σταδιακή μείωση της τοξικότητας των δειγμάτων καλλιέργειας που λήφθησαν από τις εμβολιασμένες καλλιέργειες με την βακτηριακή κοινότητα που ξεκίνησε από τις 5 ημέρες ενώ τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τις βακτηρικές καλλιέργειες από τις 23 ημέρες και μετά, οπότε και είχε ολοκληρωθεί η αποδόμηση του TBZ, δεν προκάλεσαν αναστολή των κυττάρων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αναστολής συμβαδίζουν με την κινητική αποδόμησης του TBZ από την βακτηριακή κοινότητα και αποτελούν μια πρώτη απόδειξη ότι η βακτηριακή κοινότητα που έχει απομονωθεί αποδομεί και αποτοξικοποιεί το TBZ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το TBZ αποδείχθηκε πως επιδρά ανασταλτικά στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 και η μέση ανασταλτική συγκέντρωση του TBZ βρίσκεται μεταξύ 275-280 mg/L ή 1366,46 – 1.391,31 μM . Στην διεθνή βιβλιογραφία έχουν διεξαχθεί αντίστοιχα πειράματα προσδιορισμού του IC50 σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Σε ηπατικά κύτταρα ποντικού η τιμή του IC50 υπολογίζεται μεταξύ του εύρους 200-500 μM και προκαλεί αποπτωτικά φαινόμενα (Marilyne Séide et al, 2015). Σε πειράματα που διεξήχθησαν με τη χρήση της κυτταρικής σειράς B16F10 η τιμή IC50 υπολογίστηκε στα 323,9 + 28,9 μM και είχε ως αποτέλεσμα και πάλι τα κύτταρα να οδηγηθούν σε απόπτωση (Zhang J et al., 2013) . Η μέση ανασταλτική συγκέντρωση του TBZ στην κυτταρική σειρά ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος ήταν αισθητά υψηλότερη σε σχέση με εκείνη που εφαρμόστηκε σε άλλες κυτταρικές σειρές. Αυτό υποδεικνύει πως ο άνθρωπος είναι λιγότερο ευαίσθητος στην εμφάνιση τοξικών φαινομένων σε σχέση με τους ποντικούς υποδουκνείοντας πως το IC50 επηρεάζεται από την κυτταρική σειρά στην οποία εφαρμόζεται. Επίσης, ενδέχεται η παρατηρούμενη αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HepG2 να οφείλεται στην ενεργοποίηση των αποπτωτικών μονοπατιών.

Τα υγρά απόβλητα από τα συσκευαστήρια φρούτων περιέχουν γεωργικά φάρμακα υψηλού ρυπαντικού φορτίου και επιβάλλεται να επεξεργάζονται προς παραγωγή λιγότερο τοξικών μορφών πριν απορριφθούν στο περιβάλλον (Karas P. et al 2010). Η μικροβιακή αποικοδόμηση των γεωργικών φαρμάκων θεωρείται ως η πιο σημαντική διαδικασία οριστικής απομάκρυνσης τους από το περιβάλλον (Karpouzas and Singh 2006). Η μεθοδολογία αυτή έχει εφαρμοστεί για συγκεκριμένα γεωργικά φαρμάκων μεταξύ των οποίων το diphenylamine (Perruchon C. et al,2012), το Oxamyl (Rousidou K. Et al, 2016) και το ethoprophos (Karpouzas et al,2000).

Η μικροβιακή αποικοδόμηση γεωργικών φαρμάκων έχει εφαρμοστεί και στην περίπτωση του εντομοκτόνου Chlorpyrifos (R. Kumar Bhagobaty et al.,2006). Ο κύριος μεταβολίτης του Chlorpyrifos είναι το 3,5,6-trichloro pyridine-2-phenol (TCP)(Jun Wang et al., 2014) . Πειράματα τοξικότητας έχουν διεξαχθεί συγκεκριμένους οργανισμούς όπως το ψάρι ζέβρα zebrafish *Danio rerio* (Jun Wang et al., 2014) και

έχουν αποδείξει πως ο παραγόμενος μεταβολίτης εμφανίζει τοξικότητα. Επίσης το TPC παρουσιάζει μεγαλύτερη τοξικότητα για τον οργανισμό *Daphnia carinata* σε φυσικά νερά απ' ότι το *Chlorpyrifos*. Επομένως η μικροβιακή αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων δεν οδηγεί πάντα και στην αποτοξικοποίηση.

Η κοινότητα το πρωτεοβακτηρίων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη αποδόμησε το TBZ σε 28 ημέρες εκ τότε έως την 45η πιθανότατα ακολουθεί παραγωγή διαφόρων άγνωστων μεταβολικών προϊόντων τα οποία είτε συσσωρεύονται είτε αποδομούνται περαιτέρω. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τις βακτηρικές καλλιέργειες από τις 23 ημέρες και μετά, οπότε και είχε ολοκληρωθεί η αποδόμηση του TBZ, δεν προκάλεσαν αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων, αποδεικνύοντας πως τα προϊόντα του μεταβολισμού του TBZ δεν έχουν τοξική δράση.

Συνοψίζοντας, η κοινότητα των πρωτεοβακτηρίων έχει την ικανότητα να αποδομεί ταχύτατα το TBZ με την παράλληλη αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων που προέρχονται από συσκευαστήρια φρούτων και περιέχουν μεγάλες ποσότητες TBZ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

5.Τελικά συμπεράσματα και μελλοντικές ερευνητικές κατευθύνσεις

Η συγκεκριμένη μελέτη είχε ως αρχικό στόχο τον προσδιορισμό του δείκτη IC50 για το μυκητοκτόνο TBZ με απώτερο στόχο την μελέτη της μείωσης της τοξικότητας του TBZ σε σειρά κυττάρων HepG2 κατά την πορεία αποδόμηση τους TBZ από μια κοινότητα βακτηρίων που είχε την ικανότητα να αποδομεί το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο. Η τιμή IC50 εντοπίζεται εντός του εύρους 275-280 μg/ml, ενώ οι πιθανοί παραγόμενοι μεταβολίτες δεν επηρέασαν την κυτταρική ανάπτυξη καταδεικνύοντας ότι τα αποδομητικά βακτήρια αποδομούν και αποτοξικοποιούν το TBZ, χαρακτηριστικό ιδιαίτερα σημαντικό για την περαιτέρω αξιοποίηση τους σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Επομένως περαιτέρω μελέτες στο εργαστήριο θα στοχεύσουν :

1. Στην ανάλυση του μηχανισμού έκφρασης της τοξικότητας του TBZ στην κυτταρική σειρά ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος HepG2 μέσω μοριακών και αναλυτικών τεχνικών.
2. Στον χαρακτηρισμό του μεταβολικού μονοπατιού του TBZ από τα απομονωθέντα βακτήρια και στην ταυτοποίηση και μελέτη των παραγόμενων μεταβολιτών
3. Στη λειτουργική ανάλυση των γονιδίων/ενζύμων που εμπλέκονται στην αποδόμηση του TBZ με τη χρήση γονιδιωματικής και πρωτεομικής ανάλυσης
4. Στην ανάπτυξη μικροβιακών εμβολίων που θα βασίζονται στη συγκεκριμένη βακτηριακή κοινότητα που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία και τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως εμβόλια σε μονάδες βιολογικής επεξεργασίας υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Natarajan A.T., F. Darroudi 1991, Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens *Mutagenesis*, 6 (1991), pp. 399–403
2. Badawi, N., S. Ronhede, S. Olsson, B. B. Kragelund, A. H. Johnsen, O. S. Jacobsen & J. Aamand (2009). Metabolites of the phenylurea herbicides chlorotoluron, diuron, isoproturon and linuron produced by the soil fungus *Mortierella* sp. *Environ Pollut*, 15710, 2806-2812.
3. BAGDON, W.J., BOKELMAN, D.L. & ZWICKEY, R.E. (1980). Lifetime
4. Baur, L. and Robinson, R. 1993. Aqueous photolysis of 14c-ring-diphenylamine. Project XBL 92087, RPT00123. XenoBiotic Laboratories, Inc. USA. Unpublished. Issued in European Union Risk Assessment Report for diphenylamine, printed in Italy on May 2008. CAS No. 122-39-4
5. Blaszcak, D.L. & Auletta, C.S. (1987) Acute dermal toxicity study in rabbits. Unpublished report No. 4004-86 from Bio/dynamics, Inc., East Millstone, New Jersey, USA. Submitted to WHO by Syngenta, Basel, Switzerland.
6. Perruchon C., A. Pantoleon, A. Chatzinotas, S. Vasileiadis, D.G. Karpouzas, Isolation of bacterial consortia degrading the fungicide thiabendazole and identification of the role of their members via SIP-DGGE and q-PCR analysis, in: 6th Symposium of the Society of Mikrobiokosmos, Athens, Greece, 2015.
7. carcinogenic study in mice. Unpublished Report No. TT77-014-0 from Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories. Submitted to WHO by MSD Research Laboratory, Lauterbach, Germany.
8. Castillo, L.E., Reupert, C., Soils, F., 2000. Pesticide residues in the aquatic environment of banana plantation areas in the North Atlantic Zone of Costa Rica, *Enviromenta Toxicology and Chemistry* 19:1942-1950
9. *Cha, HJ; Byrom M; Mead PE; Ellington AD; Wallingford JB; et al. (August 2012). "Evolutionarily Repurposed Networks Reveal the Well-Known Antifungal Drug Thiabendazole to Be a Novel Vascular Disrupting Agent"*

10. Perruchon Chiara , Christos Batianis, Stelios Zouborlis Evangelia S. Papadopoulou, Spyridon Ntougias, Sotirios Vasileiadis Dimitrios G. Karpouzas, Isolation of a diphenylamine-degrading bacterium and characterization of its metabolic capacities, bioremediation and bioaugmentation potential, *Environmental Science and Pollution Research* December 2015, Volume 22, Issue 24, pp 19485–19496
11. Chukwudebe, A.C., Wislocki, P.G., Sanson, D. R., Halls, T.D.J. and Van den Heuvel, W.J.A. 1994. Metabolism of Thiabendazole in Laying Hen and Lactating Goats. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2964-9.
12. Costantini S., G. Di Bernardo, M. Cammarota, G. Castello and G. Colonna (2013). Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene* 518: 335-345.
13. Coulet F, Blons H, Cabelguenne A, Lecomte T, Lacourreye O, Brasnu D, Beaune P, Zucman J, Laurent-Puig P. Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis. *Cancer Res.* 2000;60:707–711.
14. Coulet, M., Eechoutte, C., Larrieu, G., et al., 1998a. Comparative metabolism of Thiabendazole in cultured hepatocytes from rats, rabbits, calves, pigs and sheep, including the formation of bound residues. *J. Agric. Food Chem.* 46, 742.
15. Craine, E.M. 1990. A Metabolism Study in Rats with [14C]Thiabendazole. Report No. 146001 and 146002, WIL Research Laboratories, USA. Unpublished
16. Davidse L.C, 1976: The antimetabolic properties of the benzimidazole fungicide carbendazim and a mechanism of resistance to this Compound in *Aspergillus nidulans*. Thesis, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
17. Delatour, P. and Parish, R. 1986. *Drug Residues in Animals*. Academic Press, Orlando, Florida, 175-204.
18. Detection of thiabendazole applied on citrus fruits and bananas using surface enhanced Raman scattering., Mueller, Csilla; David, Leontin; Chis, Vasile; et al., *Food Chemistry* Volume: 145 Pages: 814-820 , FEB 15 2014
19. Dubey, A.K., Sanyal, P.K., 2010. “Benzimidazoles in a wormy world”, *Online Vet. Journal*, Vol. 5, p.63.
20. EC, Draft Assessment Report, Initial risk assessment provided by the rapporteur member state the Netherlands for the existing substance imazalil. Volume 1 (2009)

21. European Commission (EC), Review report for the active substance thiabendazole finalized in the Standing Committee on Plant Health at its meeting on 12 December 2000 in view of the inclusion of thiabendazole in Annex I of Directive 91/414/EEC.7603/VI/97-final, 2001
22. European Commission (EC), Review report for the active substance thiabendazole finalised in the Standing Committee on Plant Health at its meeting on 12 December 2000 in view of the inclusion of thiabendazole in Annex I of Directive 91/414/EEC.7603/VI/97-final (2001).
23. European Food Safety Authority , 2008, 2012
24. Flynn, J. 1994. Determination of the Aqueous Photolysis Rate of [14 C]Thiabendazole. Report No. 41285, ABC Laboratories, USA. Unpublished.
25. Food and Agriculture Organization, 1996
26. Garcia Portillo, M., Avino, ES., Vicente, J.O., De Andres, R.L., Jimenez, MdlAS., Blanco JPL (2004) Purification system for wastewaters coming from fruit and vegetables processing plants and phytosanitary treatments in the field. United States Patent, US 6,709,585 B1 , p9
27. Gilman, A.G., T.W. Rall, A.S. Nies and P. Taylor (eds.). Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 8th ed. New York, NY. Pergamon Press, 1990., p. 970
28. Gompels MM, Todd J, Peters BS, Main J, Pinching AJ (1991). "Disseminated strongyloidiasis in AIDS: uncommon but important". *AIDS*. 5 (3): 329–32
29. Greaves, P. and J.M. Faccini, 1984. Rat Histopathology: A glossary for use in toxicity and carcinogenicity studies. p91. Elsevier, N.Y., N.Y
30. Gurman, J.L., Hardy, R.J., Voelker, R.W. & Davidson, J.L. (1981) Acute inhalation toxicity study in rats. Unpublished report No. 284-129 from Hazleton Laboratories America, Inc., Vienna, Virginia, USA. Submitted to WHO by Syngenta, Basel, Switzerland.
31. Halls, T.D.J. and Sanson, D.R. 1991b. The Metabolic Fate of Thiabendazole (TBZ) in Soybeans. Report No. 37725. ABC Laboratories, USA. Unpublished
32. Hammerschlag R.S. and H.D. Sisler, 1973: Benomyl and methyl-2-benzimidazolecarbamate (MBC): Biochemieal, cytological and chemical aspects of toxicity to *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevesiae*. *Pestic Biochem. Physiol.* 3, 42-54.
33. HAMMERSCHLAG, R. S. & SISLER, H. D. (1973). Benomyl and methyl-2-benzimidazolecarbamate (MBC): biochemical, cytological and chemical

- aspects of toxicity to *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 3, 42-54.
34. Hastie, A. C., 1970. Benlate-induced instability of *Aspergillus diploids*. *Nature*, Lond. 226: 771.
 35. <http://ei.cornell.edu>
 36. Singh S & Singh DK (2003) Utilization of monocrotophos as phosphorus source by *Pseudomonas aeruginosa*F10B and *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum* SBL 11. *Can J Microbiol* 49: 101–109.
 37. J.A. Sanchez Perez, A. Carra, C. Sirtori, A. Aguera, B. Esteban, Fate of thiabendazole through the treatment of a simulated agro-food industrial effluent by combined MBR/Fenton processes at mg/L scale, *Water Res.* 51 (2014) 55–63.
 38. Jost, L.M. et al. (1992) *J. Immunol. Meth.* 147, 153-165
 39. Kabler, K. Dykes, J, 1989, Hydrolysis as a function of pH at 25 °C of 14C-Thiabendazole, ABC Analytical Bio-Chemistry Laboratories Inc. Columbia, USA.
 40. Kannisery RG, Sims GK (2011) Biostimulation for the enhanced degradation of herbicides in soil. *Appl Environ Soil Sci* 2011: 10 pages
 41. Karpouzas D. G., Morgan J. A. W., Walker A. (2000). Isolation and characterisation of ethoprophos-degrading bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33 209–218. 10.1111/j.1574-6941.2000.tb00743.x
 42. Karpouzas, D.G., Singh, B.K., (2006). Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: Metabolic pathways and molecular basis. *Advances in microbial physiology*, 51: 119-185
 43. L.E. Castillo, E. Martínez, C. Ruepert, C. Savage, M. Gilek, M. Pinnock, *et al.* Water quality and macroinvertebrate community response following pesticide applications in a banana plantation, Limon, Costa Rica (2006)
 44. Lacey, E. 1990. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today* 6 (4) : 112-115.
 45. Lankas, G.R. (1981) Thiabendazole veterinary (lot ERM-211)—Acute oral toxicity study in rats. Unpublished report No. TT #81-2691 from Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, West Point, Pennsylvania, USA. Submitted to WHO by Syngenta, Basel, Switzerland.
 46. Lankas, G.R. (1993) Thiabendazole—Fifty-three-week oral toxicity study in dogs. Unpublished report No. TT #91-068-0 from Merck Research

Laboratories, West Point, Pennsylvania, USA. Submitted to WHO by Syngenta, Basel, Switzerland.

47. Lemaire, G., et al. 2004. *Life Sci.* 74: 2265-2278. PMID: 14987951
48. Lunt D, Evans, W.C., 1970. The microbial metabolism of biphenyl. *Biochemistry Journal* 118:54-55
49. M. Garcia Portillo, E.S. Avino, J.O. Vicente, R.L. De Andres, M.A.S. Jimenez, J.P.L. Blanco, Purification system for wastewater coming from fruit and vegetable processing plants and phytosanitary treatments in the field. United States Patent, US 6,709,585 B1 (2004) p. 9
50. M. Herrero^a, D.C. Stuckey, Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review, *Chemosphere Volume 140*, December 2015, Pages 119–128
51. MacRae IC (1989) Microbial metabolism of pesticides and structurally related compounds. *Reviews Environ Contam Toxicol* 109: 1–87.
52. Marilyne Séide, Michel Marion, Mircea Alexandru Mateescu, Diana A Averill-Bates, The fungicide thiabendazole causes apoptosis in rat hepatocytes, *Toxicol In Vitro* 2016 Apr 31;32:232-9. Epub 2015 Dec 31
53. Martin, R. J. , 1997 Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet. J.* 154, 11-34
Denning, D. W.; Pleuvry, A.; Cole, D. C. (March 2013). "Global burden of chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis". European Respiratory Journal. 41 (3): 621–6
54. Oerke EC, Dehne HW (2004) Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Prot* 23:275–285
55. Papendick, R.I., et al. 1986. Environmental Consequences of Modern Production Agriculture: How Can Alternative Agriculture Address These Concerns? *American Journal of Alternative Agriculture* 1(1);3-10
56. Paull KD, Shoemaker RH, Boyd MR, Parsons JL, Risbood PA, Barbera W, Sharma MN, Baker DC, Hand E, Scuderio DA. and others. The synthesis of XTT: a new tetrazolium reagent that is bioreducible to a water-soluble formazan. *J Heterocycl Chem.* 1988;25:911–914.
57. Perruchon C., et al, πρακτικά 6^{ου} Συνεδρίου Μικροβιόκοσμου 2015
58. Portugal R, Schaffel R, Almeida L, Spector N, Nucci M (June 2002). "Thiabendazole for the prophylaxis of strongyloidiasis in immunosuppressed patients with hematological diseases: a randomized double-blind placebo-controlled study". *Haematologica.* 87 (6): 663–4
59. Rey-Grobellet X, Ferre N, Eeckhoutte C, Larrieu G, Pineau T, and Galtier P (1996) Structural requirements for the induction of cytochromes P450 by

- benzimidazole anthelmintic derivatives in cultured rabbit hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 789–794
60. Richard C. Weisenberg 1972 Microtubule Formation in vitro in Solutions Containing Low Calcium Concentrations
61. Roberts SJ, Walker A, Parekh NR, Welsh SJ & Waddington MJ (1993) Studies on a mixed bacterial culture from soil which degrades the herbicide linuron. *Pestic Sci* 39: 71–78.
62. Robinson, H.J. (1964) Thiabendazole (preclinical evaluation). Unpublished report from Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, New Jersey, USA. Submitted to WHO by Syngenta, Basel, Switzerland. [only the part related to acute oral toxicity was provided]
63. Roehm, N.W. et al. (1991) *J. Immunol. Meth.* 142, 257-265
64. Rønhede S, Jensen B, Rosendahl S, Kragelund BB, Juhler RK & Aamand J (2005) Hydroxylation of the herbicide isoproturon by fungi isolated from agricultural soil. *Appl Environ Microbiol* 71: 7927–7932
65. Rosenblum, C. Non-metabolite Residues in Radioactive Tracer Studies. In: “Isotopes in Experimental Pharmacology”; L. J. Roth, ed., University of Chicago Press, 1965, Page 353.
66. Rousidou K, Chanika E, Georgiadou D, Soueref E, Katsarou D, Kolovos P, Ntougias S, Tourna M, Tzortzakakis EA, Karpouzas DG. Isolation of Oxamyl-degrading Bacteria and Identification of *cehA* as a Novel Oxamyl Hydrolase Gene. *Front Microbiol* 2016, 7:616
67. Salicis, F., Krivobok, S., Jack, M., Benoit-Guyod, J.L., 1999. Biodegradation of fluoranthene by soil fungi. *Chemosphere* 38, 3031–3039
68. SANGSTER NC, PRICHARD RK, LACEY E. Tubulin and benzimidazole-resistance in *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda) *J Parasitol.* 1985;71:645–651
69. Scuderio DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988;48:4827–4833.
70. Singh BK & Kuhad RC (2000) Degradation of the pesticide lindane by white-rot fungi *Cyathus bulleri* and *Phanerochaete sordida*. *Pest Manag Sci* 56: 142–146.

71. Smith, N; Denning, D.W. (1 April 2011). "Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma". *European Respiratory Journal*. 37 (4): 865–872
72. Stone, O.J., Mullins, F.J. and Willis, C.J. 1965. Comparison of Thiabendazole and 5- Hydroxythiabendazole (for Anthelmintic Effect). *J. Investigative Dermatology* 45, 132-3.
73. Tixier C, Bogaerts P, Sancelme M, Bonnemoy F, Twagilimana L, Cuer A, Bohatier J, Veschambre H. Fungal degradation of a phenylurea herbicide, diuron: structure and toxicity of metabolites. *Pest Manag Sci* 2000;56:455 – 462
74. Tocco, D.J., Egerton, J.R., Bowers, W., Christensen, V.W. and Rosenblum, C.J. (1965) Absorption, metabolism and elimination of thiabendazole in farm animals and a method for its estimation in biological materials. *J. Pharmacol. exp. Therap.*, 149:263-271
75. Tocco, D.J., Rosenblum, C., Martin, C.M. and Robinson, H.J. 1966. Absorption, Metabolism and Excretion of Thiabendazole in Man and Laboratory Animals. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 9, 31-9.
76. U.S. Environmental Protection Agency (2007)
77. Vakil, B.J., M.S. Bandisode, B.B. Gaitonde, D.S. Salunkhe, and H.J. Kulkarni, 1966. Clinical trials with a new anthelmintic, thiabendazole. *J. Trop. Med.* 68:287-295.
78. Vroumsia T, Steiman R, Seigle-Murandi F & Benoit-Guyod J-L (2005) Groupe pour l'Etude du Devenir des Xenobiotiques dans l'Environnement (GEDEXE). Fungal bioconversion of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP). *Chemosphere* 60: 1471–1480.
79. Vroumsia, T., R. Steiman, F. Seigle-Murandi, J.L. Benoit-Guyod & A. Khadrani (1996). Biodegradation of three substituted phenylurea herbicides (chlortoluron, diuron, and isoproturon) by soil fungi. A comparative study. *Chemosphere* 33: 2045-2056.
80. WARF Institute, 1978
81. World Health Organisation (WHO), 2008, European Medicines Agency (EMA), 2004)
82. Zimmerman, H.J., 1982. Chemical hepatic injury and its detection. In: *Toxicology of the Liver*. p31. G.L. Plaa and W.R. Hewit, Eds. Raven Press, N.Y., NY

