



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Επιδράσεις της έκθεσης *Drosophila Melanogaster* σε
εκχύλισμα καπνού τσιγάρου»**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΖΑΡΟΓΙΑΝΝΗΣ ΖΩΤΗΡΙΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΛΙΒΑΝΟΥ ΕΛΕΝΗ του ΧΡΗΣΤΟΥ

ΛΑΡΙΣΑ, 2021



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

BACHELOR'S THESIS

**“Effects of cigarette smoke extract exposure on *Drosophila*
Melanogaster”**

SUPERVISING PROFESSOR: ZAROGIANNIS SOTIRIOS, ASSOCIATE PROFESSOR OF PHYSIOLOGY
CO-SUPERVISING PROFESSOR: BALATSOS NIKOLAOS, ASSISTANT PROFESSOR OF BIOCHEMISTRY

LIVANOU ELENI

LARISA, 2021

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Σωτήριος Ζαρογιάννης

Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
(επιβλέπων)

Νικόλαος Μπαλατσός

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας (συνεπιβλέπων)

Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης

Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της συνεργασίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας, κ. Ζαρογιάννη Σωτήρη, το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2020 – Μάιος 2021.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα θερμά τον επιβλέποντα μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας Κ. Ζαρογιάννη Σωτήριο που δέχτηκε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία και φυσικά για την επιστημονική καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφερε.

Θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Μπαλασό Νικόλαο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και τον κ. Γουργουλιάνη Κωνσταντίνο, Καθηγητή Πνευμονολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Διευθύντρια του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κα. Χατζόγλου Χρυσή, που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια, Ρούκα Ερασμία και στην υποψήφια διδάκτορα Πιταράκη Ελεάννα για τον χρόνο τους και την πολύτιμη και

συνεχή βοήθεια που αφιέρωσαν καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας για το φιλικότατο και θερμό κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο από την αρχή.

Περίληψη

Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει περισσότερα από 4000 μεταλλαξιγόνα και καρκινογόνα συστατικά. Το κάπνισμα είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση διαφόρων αγγειακών, αναπνευστικών, πεπτικών και άλλων ασθενειών παγκοσμίως, οι οποίες οδηγούν σε θάνατο. Το προγεννητικό κάπνισμα προκαλεί αναπτυξιακές ανεπάρκειες και συγκεκριμένα επηρεάζει το μέγεθος και το βάρος των εμβρύων. Ταυτόχρονα, επηρεάζει αρνητικά την αναπαραγωγική ικανότητα των αντρών και των γυναικών, καθώς μειώνει την γονιμότητα και την σεξουαλική λειτουργία.

Στη μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε τη *Drosophila melanogaster* ως οργανισμό-μοντέλο για την αξιολόγηση των επιδράσεων του καπνού του τσιγάρου. Συγκεκριμένα, μελετήσαμε τις επιδράσεις σε δύο μορφολογικά χαρακτηριστικά, το βάρος και το μήκος της κνήμης καθώς και στη σεξουαλική συμπεριφορά της μύγας, ύστερα από έκθεση των μυγών σε διαφορετικά ποσοστά εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν πως στις υψηλότερες συγκεντρώσεις καπνού τσιγάρου (50%), υπήρχαν εντονότερες επιπτώσεις. Συγκεκριμένα, οι μύγες που εκτέθηκαν σε 50% συγκέντρωση εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου, είχαν μειωμένο βάρος και μειωμένο μήκος κνήμης σε σύγκριση με τις μύγες των πειραματικών ομάδων αναφοράς. Συγχρόνως, η υψηλή συγκέντρωση καπνού τσιγάρου, επηρέασε τη σεξουαλική συμπεριφορά των μυγών, καθώς παρατηρήθηκαν αυξημένες απόπειρες σεξουαλικής επαφής.

Συμπερασματικά, η έκθεση σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις καπνού τσιγάρου προκαλεί μορφολογικές αλλαγές στις μύγες οι οποίες πιθανά ευθύνονται και στις αλλαγές της

σεξουαλικής συμπεριφοράς ενώ η έκθεση σε μικρότερες συγκεντρώσεις έχει πιο ήπιες επιδράσεις.

Abstract

Cigarette smoke contains more than 4000 mutagens and carcinogens. Smoking is responsible for various vascular, respiratory, digestive and other diseases worldwide, which lead to death. Prenatal smoking causes developmental deficiencies and in particular affects the size and weight of embryos. At the same time, it negatively affects the reproductive capacity of men and women, as it reduces fertility and sexual function.

In our study we used *Drosophila melanogaster* as a model organism to evaluate the effects of different concentrations of cigarette smoke extract (CSE) on specific morphological (weight and tibia length) and sexual behavior traits. Our results showed that exposure to high CSE concentration reduces adult fly weight and tibia and length and leads to more attempts for copulation.

In conclusion, exposure to higher concentrations of cigarette smoke causes morphological changes in flies that are probably responsible for changes in sexual behaviour, while exposure to lower concentrations has milder effects.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Η μύγα των φρούτων (<i>Drosophila Melanogaster</i>) ως βιολογικό μοντέλο.....	12
1.2 Κύκλος ζωής της <i>Drosophila Melanogaster</i>	13
1.2.1 Μορφολογικές διαφορές αρσενικού-θηλυκού.....	15
1.2.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά παρθένων μυγών.....	16
1.3 Η <i>Drosophila melanogaster</i> ως οργανισμός-μοντέλο για τη μελέτη ασθενειών του ανθρώπου.....	18
1.3.1 Η <i>Drosophila melanogaster</i> ως οργανισμός-μοντέλο για τη μελέτη ασθενειών του πνεύμονα στον άνθρωπο.....	19
1.4 Οι επιδράσεις του καπνίσματος στον άνθρωπο.....	21
1.5 Επιδράσεις καπνού τσιγάρου στη <i>Drosophila Melanogaster</i>	25
1.5.1 Μελέτες επιδράσεων καπνού τσιγάρου στη <i>Drosophila Melanogaster</i>	26
1.6 Εκτίμηση μορφομετρικών χαρακτηριστικών <i>Drosophila melanogaster</i> σε σχέση με τον καπνό τσιγάρου.....	28
1.7 Σεξουαλική συμπεριφορά της <i>Drosophila Melanogaster</i>	30

1.7.1 Επίδραση ουσιών που περιέχονται στον καπνό του τσιγάρου στη σεξουαλική συμπεριφορά της <i>Drosophila melanogaster</i>	31
1.8 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας.....	33
2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	35
2.1 Στελέχη <i>D. melanogaster</i> και διατήρηση αποικιών.....	35
2.2 Παρασκευή θρεπτικού υλικού για τη διατήρηση των μυγών.....	35
2.3 Παρασκευή εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου.....	37
2.3.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών με αυξανόμενες συγκεντρώσεις CSE και πειραματικές ομάδες.....	38
2.4 Καλλιέργεια και διατήρηση αποικιών <i>Drosophila melanogaster</i>	38
2.5 Μετρήσεις βάρους και μήκους ποδιού.....	39
2.6 Εγκατάσταση μεθόδων φαινοτυπικής ανάλυσης.....	40
2.7 Ανάλυση δεδομένων.....	41
2.8 Στατιστική ανάλυση.....	42
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
3.1 Αποτελέσματα μέτρησης του βάρους.....	43
3.2 Αποτελέσματα μέτρησης του μήκους της κνήμης των ποδιών.....	46
3.3 Αποτελέσματα ανάλυσης παραμέτρων σεξουαλικής προσέγγισης.....	49
3.4 Αποτελέσματα ανάλυσης παραμέτρων σεξουαλικής επαφής.....	52
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	56
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	60

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Το κάπνισμα αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες απειλές της δημόσιας υγείας που έχει αντιμετωπίσει η ανθρωπότητα μέχρι σήμερα. Αποτελεί τη δεύτερη κυριότερη αιτία θανάτου και εκτιμάται ότι ο αριθμός των καπνιστών παγκοσμίως ανέρχεται στο ένα δισεκατομμύριο (Sadiq & Altaany, 2014). Περίπου το 12%-20% των εγκύων γυναικών καπνίζουν κάποια στιγμή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, και το 10% των εγκύων γυναικών αναφέρεται ότι έχουν καπνίσει κατά τη διάρκεια των τελευταίων 3 μηνών της εγκυμοσύνης. Το κάπνισμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης οδηγεί σε αναπτυξιακούς κινδύνους για την υγεία του εμβρύου και του παιδιού, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης θνησιμότητας, του χαμηλού βάρους γέννησης και των αναπτυξιακών καθυστερήσεων (Al-Odat et al., 2014). Επίσης επηρεάζει την αναπαραγωγική ικανότητα καθώς μειώνει την γονιμότητα των γυναικών και την σεξουαλική λειτουργία των ανδρών (Harte & Meston, n.d.).

Η *Drosophila melanogaster* αποτελεί ένα σημαντικό πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη ασθενειών στον άνθρωπο. Στη μελέτη μας, χρησιμοποιήσαμε μύγες *D. Melanogaster* οι οποίες εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου (10%, 25% και 50%) για να ερευνήσουμε τις πιθανές επιδράσεις του στη μορφολογία και στη σεξουαλική συμπεριφορά της μύγας. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως η έκθεση σε υψηλά ποσοστά εκχυλίσματος καπνού μειώνει το βάρος και το μήκος της κνήμης των ενήλικων μυγών και οδηγεί σε περισσότερες απόπειρες για σεξουαλική επαφή.

1.1 Η μύγα των φρούτων (*Drosophila Melanogaster*) ως βιολογικό μοντέλο

Το έντομο *Drosophila Melanogaster* ανήκει στην τάξη των δίπτερων και η συστηματική του κατάταξη είναι η εξής:

- Βασίλειο: Ζώα
- Φύλο: Αρθρόποδα
- Κλάση: Έντομα
- Τάξη: Δίπτερα
- Οικογένεια: Drosophilidae
- Γένος: *Drosophila*
- Υπογένος: *Sophophora*
- Είδος: *Drosophila melanogaster*

Η *Drosophila Melanogaster*, γνωστή και ως μύγα των φρούτων (**Εικόνα 1**), είναι ο πλησιέστερος ασπόνδυλος οργανισμός μοντέλο στον άνθρωπο, λόγω της μεγάλης ομοιότητας και συντήρησης των γονιδιωματικών τους αλληλουχιών. Αποτελεί έναν από τους πιο διαδεδομένους οργανισμούς μοντέλα στην έρευνα, ιδιαίτερα σε μελέτες γενετικής, καθώς παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων μοντέλων, όπως : σύντομο κύκλο ζωής, μικρό μέγεθος, υψηλή γονιμότητα και γρήγορη αναπαραγωγή, χαμηλό κόστος και εύκολη συντήρηση της καλλιέργειας καθώς και ευκολία πειραματικού χειρισμού (Tiwari et al., 2011).



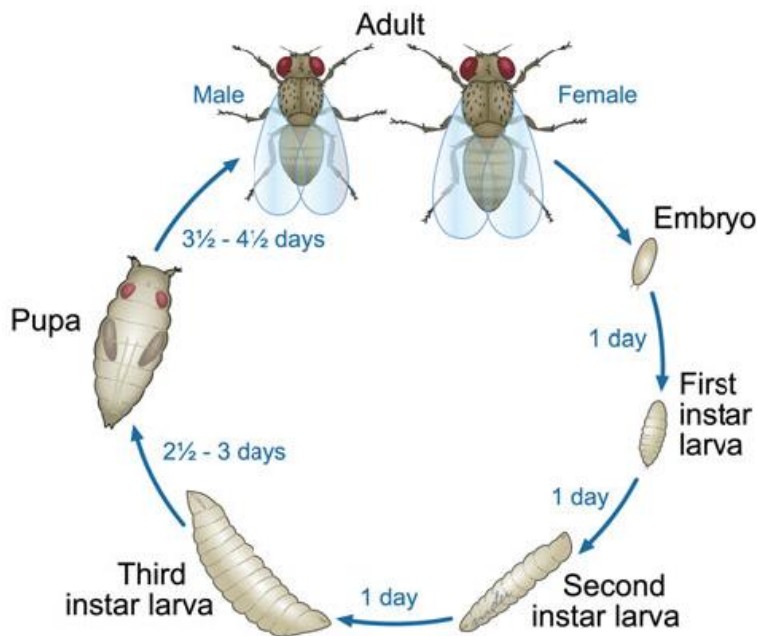
Εικόνα 1. Το έντομο *Drosophila Melanogaster* (<https://www.shutterstock.com/>).

Έχει μόνο τέσσερα χρωμοσώματα, τα φυλετικά X και Y και 3 αυτοσωμικά τα 2,3 και 4 (Kaufman, 2017). Το γενετικό της υλικό αποτελείται από 14.000 περίπου γονίδια, εκ των οποίων το 95% βρίσκεται στα 3 από τα 4 χρωμοσώματα (Ong et al., 2015).

1.2 Κύκλος ζωής της *Drosophila Melanogaster*

Ο κύκλος ζωής της *D. melanogaster* είναι ιδιαίτερα μικρός (περίπου 10 ημέρες) που συνδυαστικά με την υψηλή γονιμότητα που διακρίνει το έντομο, καθιστά δυνατή τη συλλογή ενός μεγάλου αριθμού απογόνων σε σύντομο χρονικό διάστημα (Hales et al., 2015). Η ανάπτυξη της *D. melanogaster* διακρίνεται σε 4 στάδια: έμβρυο, προνύμφη,

νύμφη και ενήλικη μύγα (Ong et al., 2015). Ως εργαστηριακό μοντέλο, οι μύγες διατηρούνται σε φιαλίδια (vials) με ειδικά μαγειρεμένο φαγητό (media) στους 25°C. Η διαδικασία κατά την οποία το γονιμοποιημένο αυγό γίνεται ενήλικη μύγα ολοκληρώνεται σε 9-10 ημέρες, στους 25°C (Hales et al., 2015). Η διαδικασία της εμβρυογένεσης γίνεται μέσα στο αυγό, το οποίο είναι τοποθετημένο στην τροφή. Το έμβρυο μεταμορφώνεται σε προνύμφη (larva) σε λιγότερο από 24 ώρες και αρχίζει να τρέφεται. Τις επόμενες 4 ημέρες η προνύμφη περνάει από 3 φάσεις ανάπτυξης (first instar larva, second instar larva, third instar larva). Όταν η προνύμφη φτάσει στην 'third instar' φάση, απομακρύνεται από την τροφή και αναζητάει χώρο για να πραγματοποιηθεί η μεταμόρφωση της σε νύμφη. Η μεταμόρφωσή της θα κρατήσει 4 ημέρες με το έντομο να αναπτύσσεται μέσα σε ένα κουκούλι από χιτίνη. Μετά το πέρας των 4 ημερών το έντομο εξέρχεται από το κουκούλι, ως τέλειο έντομο πλέον (Ong et al., 2015). Οι μύγες θα είναι σεξουαλικά ώριμες 8-12 ώρες μετά την έκδυση τους, οπότε και ξεκινάει ένας νέος κύκλος ζωής του εντόμου (Hales et al., 2015). Τα θηλυκά είναι έτοιμα να ζευγαρώσουν σε λιγότερο από 24 ώρες μετά την έκδυση και μπορούν να γεννήσουν έως και 100 αυγά την ημέρα. Οι ενήλικες μύγες ζουν περίπου δύο μήνες μετά την έκδυση (Ong et al., 2015) **(Εικόνα 2)**.



Εικόνα 2. Ο κύκλος ζωής της *D. melanogaster* είναι γρήγορος και ολοκληρώνεται σε 10-12 ημέρες στους 25°C. Η ανάπτυξη της *D. melanogaster* διακρίνεται σε 4 στάδια: έμβρυο, προνύμφη (first instar larva, second instar larva, third instar larva), νύμφη και ενήλικη μύγα (Ong et al., 2014). Na sbhsv oto 14 na valw του 15

1.2.1 Μορφολογικές διαφορές αρσενικού-θηλυκού

Οι ενήλικες αρσενικές μύγες διαφέρουν από τις ενήλικες θηλυκές καθώς είναι μικρότερες σε μέγεθος και σε βάρος. Τα θηλυκά ζυγίζουν περίπου 1,4 mg ενώ τα αρσενικά 0,8 mg (Ong et al., 2015). Επιπλέον, οι αρσενικές μύγες έχουν μια μαύρη κηλίδα στο κάτω μέρος της κοιλιάς τους ενώ στις θηλυκές παρατηρούνται μαύρες ρίγες. Τα αρσενικά διαθέτουν επίσης ένα φυλετικό χτένι στον ταρσό του πρώτου ζεύγους ποδιών το οποίο δεν υπάρχει στα θηλυκά (<https://depts.washington.edu/cberglab/wordpress/outreach/an-introduction-to-fruit-flies/>) (**Εικόνα 3**).



Εικόνα 3. Αριστερά: Κοιλιακή όψη ενός αρσενικού (πάνω) και ενός θηλυκού (κάτω). Δεξιά: Πλευρική όψη ενός αρσενικού (πάνω) και ενός θηλυκού (κάτω) (Peter Geiger, *Drosophila Melanogaster* and Mendelian Genetics, <https://depts.washington.edu/cberglab/wordpress/outreach/an-introduction-to-fruit-flies/>)

1.2.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά παρθένων μυγών

Οι παρθένες μύγες είναι εύκολο να διακριθούν λόγω του λευκού χρώματος του σώματος τους και των κολλημένων στο σώμα φτερών (**Εικόνα 4**). Οι παρθένες μύγες είναι μεγαλύτερες σε μέγεθος από τις ενήλικες και έχουν μια χαρακτηριστική μαύρη κουκίδα στην κάτω πλευρά της κοιλιάς που ονομάζεται μηκόνιο, το οποίο είναι υπόλειμμα του τελευταίου τους γέυματος πριν την μεταμόρφωση σε νύμφη (**Εικόνα 5**). Οι θηλυκές μύγες παραμένουν παρθένες για 8-10 ώρες μετά την έκδυση τους (<https://depts.washington.edu/cberglab/wordpress/outreach/an-introduction-to-fruit-flies/>).



Εικόνα 4. Χαρακτηριστική μορφή μια παρθένας θηλυκής μύγας. Στα αριστερά φαίνονται τα διπλωμένα και κολλημένα φτερά στο σώμα και δεξιά το μηκόνιο (Peter Geiger, *Drosophila Melanogaster* and Mendelian Genetics, <https://depts.washington.edu/cberglab/wordpress/outreach/an-introduction-to-fruit-flies/>).



Εικόνα 5. Αριστερά: διαφορά μεταξύ μίας ωριμής (πάνω) και μιας παρθένας (κάτω) θηλυκής μύγας. Δεξιά: διαφορά μεταξύ μίας ώριμης (πάνω) και μιας παρθένας (κάτω) αρσενικής μύγας [5].

1.3 Η *Drosophila melanogaster* ως οργανισμός-μοντέλο για τη μελέτη ασθενειών του ανθρώπου

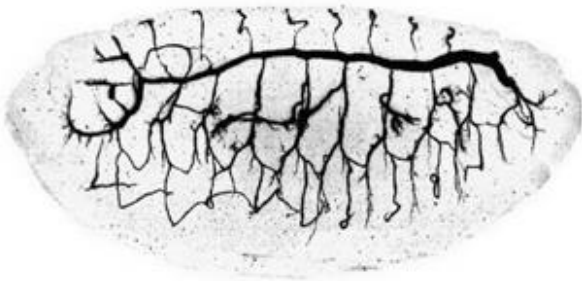
Η *Drosophila melanogaster* αποτελεί τον πιο γνωστό ασπόνδυλο οργανισμό-μοντέλο στον τομέα της βιοϊατρικής. Έγινε διάσημη λόγω των μελετών της κληρονομικότητας που πραγματοποίησε ο T.H. Morgan το 1900. Το 75% των γονιδίων που σχετίζονται με ανθρώπινες νόσους έχουν τουλάχιστον ένα λειτουργικό ομόλογο στη μύγα. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με αναπτυξιακές και νευρολογικές διαταραχές, καρκίνο, καρδιαγγειακές παθήσεις, μεταβολικές ασθένειες, καθώς και με τη λειτουργία του οπτικού, ακουστικού και ανοσοποιητικού συστήματος (Vecchio, 2015). Όλες αυτές οι ομοιότητες της μύγας με τον άνθρωπο, κατέστησαν τη *Drosophila* τον κύριο μη θηλαστικό οργανισμό μοντέλο ακόμα και σε μελέτες που τα θηλαστικά θεωρούνται αναντικατάστατα μοντέλα. Η μεγάλη επιτυχία της *D. melanogaster* ως οργανισμού-μοντέλου οφείλεται στα πλεονεκτήματα που προσφέρει σε σχέση με τα μοντέλα των σπονδυλωτών: (α) η φροντίδα και η καλλιέργεια της είναι απλή και φθηνή, (β) ο χρόνος αναπαραγωγής της είναι ιδιαίτερα ταχύς με ένα μόνο ζευγάρι μύγες να μπορεί να παράγει εκατοντάδες απογόνους σε λίγες μόλις εβδομάδες και (γ) τα όργανα και οι ιστοί της είναι εύκολο να αναγνωριστούν, να συλλεχθούν και να μελετηθούν. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι από πλευρά βιοηθικής είναι το καταλληλότερο μοντέλο καθώς επιτρέπει στους επιστήμονες να αποφύγουν ορισμένα από τα ηθικά ζητήματα που αφορούν τη βιοϊατρική έρευνα για τους σπονδυλωτούς οργανισμούς, σύμφωνα με

τις αρχές της «αντικατάστασης, βελτίωσης και μείωσης των ζώων στην έρευνα (NC3Rs)» (Vecchio, 2015).

1.3.1 Η *Drosophila melanogaster* ως οργανισμός-μοντέλο για τη μελέτη ασθενειών του πνεύμονα στον άνθρωπο

Η *D. melanogaster* διαθέτει ένα σύστημα αεραγωγών που μπορεί να θεωρηθεί ως ισοδύναμο του πνεύμονα. Τα αναπνευστικά όργανα των μυγών και των ανθρώπων μπορεί να φαίνονται διαφορετικά, ωστόσο στην πραγματικότητα υπάρχουν αρκετά κοινά στοιχεία στην ανάπτυξη, τη φυσιολογία, τη λειτουργία και τις αντιδράσεις στα μικρόβια μεταξύ της τραχείας των εντόμων και των πνευμόνων των θηλαστικών. Αν και δεν είναι ομόλογα όργανα, τα δύο συστήματα αεραγωγών αποτελούνται από επιθηλιακά σωληνοειδή όργανα που τροφοδοτούν ολόκληρο τον οργανισμό με οξυγόνο. Η τραχεία των εντόμων είναι, όπως και οι πνεύμονες του ανθρώπου, ένα διακλαδισμένο σωληνοειδές όργανο γεμάτο με αέρα, το οποίο αποτελείται από πρωτεύοντες, δευτερεύοντες και τελικούς κλάδους (**Εικόνα 6**). Η επιφάνεια ανταλλαγής αυξάνεται κατά τη διακλάδωση. Επομένως, το μεγαλύτερο μέρος της ανταλλαγής των αερίων πραγματοποιείται στα άπω τμήματα. Η οργανογένεση αυτών των διακλαδισμένων σωληναριακών δικτύων έχει βρεθεί ότι μοιράζεται πολλές θεμελιώδεις αρχές μεταξύ των συστημάτων των αεραγωγών της μύγας και των θηλαστικών, ιδίως όσον αφορά τα γενετικά συστατικά και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τη διακλάδωση (Bergman et al., 2017). Ωστόσο, σε αντίθεση με τα θηλαστικά, οι μύγες δεν αναπνέουν

ενεργά. Ο αέρας εισέρχεται στο αναπνευστικό σύστημα μέσω αναπνευστικών ανοιγμάτων (των λεγόμενων σπιράλ) από όπου διανέμεται σε όλους τους αεραγωγούς με παθητική διάχυση (Hammer et al., 2018) (**Εικόνα 7**). Λόγω των παραπάνω χαρακτηριστικών, η μύγα έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο στην έρευνα πολλών παθήσεων του πνεύμονα όπως του άσθματος, των χρόνιων αποφρακτικών παθήσεων του πνεύμονα, της υπερκαπνίας, της κυστικής ίνωσης, της φυματίωσης καθώς και για διάφορες μυκητιασικές λοιμώξεις του πνεύμονα (Bergman et al., 2017).



Εικόνα 6. Ανοσοαποτύπωση του αναπτυσσόμενου τραχειακού συστήματος ενός 15 ωρών εμβρύου *D. Melanogaster* (Doust et al., 2017).

1.4 Οι επιδράσεις του καπνίσματος στον άνθρωπο

Ο καπνός του τσιγάρου αποτελείται από ένα σύνθετο μείγμα περισσότερων από 4000 άμεσων και έμμεσων μεταλλαξιογόνων και καρκινογόνων, όπως πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, N-νιτροζαμίνες, αρωματικές αμίνες, ιχνοστοιχεία και ελεύθερες ρίζες, τα οποία προσβάλλουν διαφορετικά κυτταρικά συστατικά και μεταβάλλουν τις λειτουργίες τους (Sadiq & Altaany, 2014). Στους ανθρώπους, ο καπνός του τσιγάρου είναι γνωστό ότι βλάπτει διάφορους ιστούς και αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων τύπων καρκίνου, καρδιαγγειακών διαταραχών, διαβήτη και τραυματισμό του αμφιβληστροειδούς. Έρευνες έχουν δείξει ότι, ο καπνός του τσιγάρου προκαλεί οξειδωτικό στρες σε καλλιεργημένα ανθρώπινα κύτταρα καπνιστών αλλά και μη καπνιστών, ύστερα από τη μέτρηση της παραγωγής ελεύθερων ριζών (ROS), των επιπέδων αντιοξειδωτικών στο πλάσμα και της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (**Εικόνα 8**) (Fujiwara et al., 2011).

Επιπλέον, το κάπνισμα αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης διάφορων χρόνιων πνευμονοπαθειών, όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Η μακροχρόνια έκθεση στον καπνό τσιγάρου είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου, ενώ και οι ατμοσφαιρικοί ρύποι συμβάλλουν στην ανάπτυξη ασθενειών (Prange et al., 2018). Όπως δήλωσε ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ), ο καπνός του τσιγάρου είναι μια από τις μεγαλύτερες απειλές για τη δημόσια υγεία που έχει αντιμετωπίσει ποτέ ο κόσμος (ΠΟΥ, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>). Η θνησιμότητα από σοβαρές καρδιαγγειακές και αναπνευστικές παθήσεις που σχετίζονται με το κάπνισμα,

έχει αυξηθεί σημαντικά (περισσότερο από οκτώ εκατομμύρια θάνατοι ετησίως σε όλο τον κόσμο). Είναι ενδιαφέρον ότι πάνω από επτά εκατομμύρια από αυτούς τους θανάτους σχετίζονται με την άμεση κατανάλωση καπνού, ενώ περίπου 1,2 εκατομμύρια σχετίζονται με την παθητική έκθεση σε καπνό. Όλες οι μορφές καπνού θεωρούνται επιβλαβείς και δεν αναφέρεται ασφαλές επίπεδο έκθεσης (ΠΟΥ, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>). Μεταξύ των πολλών συνεπειών του καπνού στην υγεία, είναι και η αύξηση του κινδύνου κολπικών και κοιλιακών αρρυθμιών, ξαφνικού θανάτου και οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου καθώς και η πρόκληση αιμοδυναμικών αλλαγών που επιδεινώνουν την καρδιακή ανεπάρκεια (Santalla et al., 2021).

Επιπρόσθετα, η προγεννητική έκθεση στον καπνό του τσιγάρου έχει ως συνέπεια τη μειωμένη ανάπτυξη του εμβρύου καθώς και την έκπτωση της αναπνευστικής λειτουργίας. Έμβρυα που εκτίθενται προγεννητικά διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν άσθμα, τόσο κατά την παιδική όσο και κατά την εφηβική και ενήλικη ζωή, και ενδεχομένως και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) με την πάροδο της ηλικίας. Παρά τη μείωση των ποσοστών καπνίσματος σε αρκετές χώρες, ο αριθμός των γυναικών που καπνίζουν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης παραμένει υψηλός. Επιπλέον, οι έγκυες γυναίκες αρχίζουν να χρησιμοποιούν ηλεκτρονικά τσιγάρα σε ραγδαία αυξανόμενα ποσοστά σχεδόν ίσα με τα συμβατικά τσιγάρα, τα οποία επηρεάζουν την υγεία του εμβρύου παρόμοια με τα συμβατικά τσιγάρα (Hammer et al., 2018). Παρατηρήθηκε ήδη από τα τέλη του 1950 πως οι μητέρες που καπνίζουν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης γεννάνε παιδιά με μειωμένο βάρος. Το ίδιο παρατηρήθηκε

και σε προγεννητικά ποντίκια που εκτέθηκαν σε καπνό τσιγάρου κατά τη διάρκεια διαφορετικών περιόδων κύησης. Συγκεκριμένα, το κάπνισμα μείωσε σημαντικά το βάρος του εμβρύου, ενώ το μήκος του εμβρύου μειώθηκε μόνο όταν υπήρξε έκθεση στην αρχή της εγκυμοσύνης. Μια άλλη μελέτη έδειξε διαφορές μεταξύ των φύλων, καθώς παρατηρήθηκε μειωμένο σωματικό βάρος σε θηλυκούς αλλά όχι σε αρσενικούς απογόνους ποντικών μετά την έκθεση της μήτρας σε καπνό τσιγάρου. Αυτές οι μελέτες αποκαλύψαν πως ο καπνός του τσιγάρου επηρεάζει την ανάπτυξη του εμβρύου με παρόμοιο τρόπο στον άνθρωπο και το ποντίκι (Hammer et al., 2018).



Εικόνα 7. Τα βλαβερή συστατικά του τσιγάρου (<https://www.hse.ie/eng/about/who/tobaccocontrol/kf/>).

Επιπλέον, το κάπνισμα επηρεάζει την αναπαραγωγική ικανότητα τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες καθώς σχετίζεται με σεξουαλική δυσλειτουργία διότι επιδρά στο εσωτερικό τμήμα των αιμοφόρων αγγείων. Μελέτες έδειξαν ότι, οι καπνιστές που

καπνίζουν περισσότερα από 20 τσιγάρα ημερησίως, διατρέχουν 50% υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης στυτικής δυσλειτουργίας, σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (Millett et al., 2006). Ταυτόχρονα, μια παρόμοια μελέτη σε γυναίκες έδειξε ότι, το κάπνισμα μειώνει τη γονιμότητα και η νικοτίνη συγκεκριμένα, μειώνει σημαντικά τη φυσιολογική σεξουαλική διέγερση σε υγιείς, νεαρές, μη καπνίστριες γυναίκες (Harte & Meston, n.d.).

1.5 Επιδράσεις καπνού τσιγάρου στη *Drosophila Melanogaster*

Πειραματικά η έκθεση της *Drosophila melanogaster* σε τσιγάρο πραγματοποιείται με δύο κύριους τρόπους, μέσω της εισπνοής ή της τροφής. Σε ότι αφορά την έκθεση μέσω της εισπνοής μπορεί να γίνει μέσω:

- 1) θαλάμου καπνίσματος συνδεδεμένου με αντλία ώστε ο καπνός του τσιγάρου να διαχέεται στα φιαλίδια των μυγών (Prange et al., 2018),
- 2) αναμένων τσιγάρων σε θερμοκοιτίδα που βρίσκονται οι μύγες (Fujiwara et al., 2011),
- 3) έκθεσης σε ατμό νικοτίνης (El-Merhie et al., 2021a).

Η έκθεση μέσω τροφής μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω διατροφής των μυγών με φαγητό που περιέχει νικοτίνη (Morris et al., 2018).

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται και ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση με ένεση φιλτραρισμένου καπνού (Sadiq & Altaany, 2014).

1.5.1 Μελέτες επιδράσεων καπνού τσιγάρου στη *Drosophila Melanogaster*

Η *Drosophila melanogaster* έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως μοντέλο για ανθρώπινες ασθένειες, καθώς και για τη μελέτη των αντιδράσεων ύστερα από κατανάλωση διάφορων ουσιών. (Santalla et al., 2021). Έρευνες που έγιναν για τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια εκθέτοντας μύγες *D. melanogaster* σε καπνό τσιγάρου, έδειξαν πως οι μύγες παρουσίασαν τα πιο σημαντικά παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου, όπως μειωμένη σωματική δραστηριότητα, αυξημένους ρυθμούς μεταβολισμού, σημαντική μείωση των αναπνευστικών επιφανειών και πρόωρο θάνατο. Συγκεκριμένα, η χρόνια έκθεση για περίπου 30 λεπτά ανά ημέρα είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής σε άγριες θηλυκές μύγες *Drosophila melanogaster*. Η μέση διάρκεια ζωής μειώθηκε στατιστικά σημαντικά κατά περίπου 70% σε σύγκριση με τους αντίστοιχους μάρτυρες. Επιπλέον, μετά από 7 ημέρες έκθεσης σε καπνό τσιγάρου, οι θηλυκές μύγες είχαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα σωματικού λίπους σε σύγκριση με τους μάρτυρες που δεν είχαν εκτεθεί σε καπνό. Επιπλέον, οι μύγες που είχαν εκτεθεί ημερησίως σε καπνό τσιγάρου έδειξαν σημαντικά μειωμένη συνολική σωματική δραστηριότητα (Prange et al., 2018).

Στη συνέχεια, έρευνες που έγιναν σε προνύμφες *D. melanogaster*, έδειξαν πως η παρατεταμένη έκθεση σε καπνό τσιγάρου είχε σημαντικό αντίκτυπο στις τερματικές δομές του συστήματος των αεραγωγών. Οι τερματικές δομές είναι εκείνες οι περιοχές

του συστήματος των αεραγωγών που αφορούν την ανταλλαγή αερίων. Οι προνύμφες που εκτέθηκαν εμφάνισαν μειωμένη αναπνευστική επιφάνεια (Prange et al., 2018).

Μελέτες που έγιναν σε ενήλικες μύγες ανέδειξαν φυλετικές διαφορές στην αντίδραση έναντι της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου. Η έκθεση σε καπνό τσιγάρου για μια εβδομάδα μείωσε την καθημερινή σωματική δραστηριότητα των αρσενικών μυγών κατά περίπου 60-70%. Η μείωση έγινε πιο έντονη ύστερα από 14 ημέρες έκθεσης σε καπνό τσιγάρου. Στις ενήλικες θηλυκές μύγες, η έκθεση σε καπνό τσιγάρου για 7 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα την οριακή μείωση της δραστηριότητας, η οποία ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, η έκθεση για 14 ημέρες προκάλεσε έντονη μείωση της σωματικής δραστηριότητας όπως και στις αρσενικές μύγες (Prange et al., 2018).

Συνοψίζοντας, οι μύγες που εκτίθενται χρονίως σε καπνό τσιγάρου έχουν πολύ μειωμένη διάρκεια ζωής, παρουσιάζουν μειωμένη σωματική δραστηριότητα, αυξημένους μεταβολικούς ρυθμούς και μειωμένη περιεκτικότητα σε σωματικό λίπος. (Prange et al., 2018).

Η νικοτίνη, το κύριο εθιστικό συστατικό του καπνού, επηρεάζει τη συμπεριφορά των θηλαστικών ενεργοποιώντας τους νικοτινικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης. Μύγες που εκτέθηκαν σε νικοτίνη, παρουσίασαν υπερκινητικότητα και σπασμωδικές κινήσεις σε χαμηλές δόσεις και υποκινητικότητα και ακινησία σε υψηλότερες δόσεις. Ταυτόχρονα, η έκθεση στη νικοτίνη επηρέασε δόσοεξαρτώμενα την αρνητική γεωταξία στις μύγες (Kaun et al., 2012).

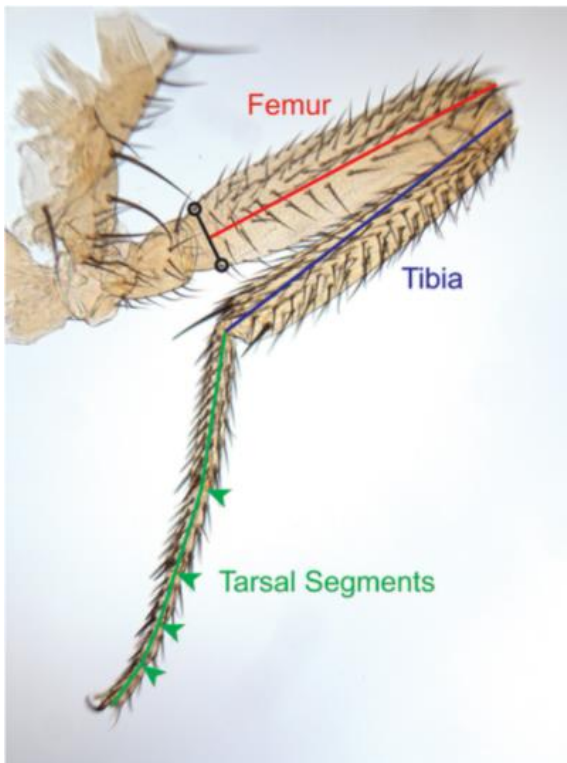
1.6 Εκτίμηση μορφομετρικών χαρακτηριστικών *Drosophila melanogaster* υπό την επίδραση καπνού τσιγάρου

Η διατροφή επηρεάζει το μέγεθος του σώματος των περισσότερων ζώων, το οποίο διαμορφώνεται από την ποιότητα και την ποσότητα των θρεπτικών συστατικών που είναι διαθέσιμα στην τροφή τους. Μια ανθυγιεινή διατροφή, μπορεί να έχει δια βίου επιπτώσεις στην αναπαραγωγική ικανότητα και τη φυσική κατάσταση ενός ζώου. Στα έντομα, η διατροφή (κυρίως κατά τη διάρκεια των νυμφικών ή προνυμφικών σταδίων) επηρεάζει το μέγεθος των ενηλίκων. Ωστόσο, το σωματικό βάρος είναι πιθανό να μεταβάλλεται επίσης με τη διατροφή των ενηλίκων. Όταν η προνύμφη εκτίθεται σε μεταβλητά περιβάλλοντα, μπορεί να μεταβάλει τον ρυθμό ανάπτυξής της και τη διάρκεια της περιόδου ανάπτυξής της (που καθορίζεται από το χρόνο της μεταμόρφωσης) για να φτάσει σε ένα τελικό μέγεθος ενηλίκου. Σε συνθήκες διατροφής πλούσιες σε θρεπτικά συστατικά, τα δίπτερα αναπτύσσονται γρήγορα και εξελίσσονται σύντομα σε ενήλικα άτομα. Αντιθέτως, όταν τα θρεπτικά συστατικά είναι περιορισμένα, η περίοδος ανάπτυξης της προνύμφης παρατείνεται για να επιτραπεί επιπλέον ανάπτυξη και να εξασφαλιστεί το κατάλληλο τελικό μέγεθος ενηλίκου. (Koyama et al., 2021)

Πειράματα που έγιναν σε προνύμφες *D. melanogaster* οι οποίες υποβλήθηκαν σε δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, έδειξαν πως απέκτησαν μεγαλύτερα φτερά και μηρούς (femur) από προνύμφες οι οποίες τράφηκαν με χαμηλότερα ποσοστά πρωτεϊνών (Εικόνα 8). Όσον αφορά το μήκος των μηρών, η ηλικία του ενήλικα και η αναλογία πρωτεΐνης/υδατάνθρακα της διαίτας των ενηλίκων επηρέασαν επίσης το μέγεθος. Το

μέγεθος των μηρών μικραίνει καθώς οι ενήλικοι μεγαλώνουν. Ο βαθμός στον οποίο μειώθηκε το μέγεθός τους εξαρτιόταν τόσο από τη διατροφή με την οποία είχαν εκτραφεί ως προνύμφες, όσο και από τη διατροφή τους ως ενήλικες (Ροζας et al., 2020).

Μύγες *D. melanogaster* που εκτράφηκαν σε τροφή που περιείχε νικοτίνη είχαν καθυστερημένη ανάπτυξη, μειωμένο βάρος ενήλικων μυγών και μειωμένη επιβίωση. Το μέγεθος αυτών των επιδράσεων ήταν δοσο-εξαρτώμενο, με υψηλότερες συγκεντρώσεις νικοτίνης να σχετίζονται με ισχυρότερες επιδράσεις (Morris et al., 2018).



Εικόνα 8. Πόδι μύγας *Drosophila melanogaster* (Grubbs et al., 2013).

1.7 Σεξουαλική συμπεριφορά της *Drosophila Melanogaster*

Τα ζώα γεννιούνται με ένα σύνολο έμφυτων συμπεριφορών, ή ενστίκτων, που εκδηλώνονται ως στερεοτυπικές αντιδράσεις σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Τα αρσενικά και τα θηλυκά έχουν ευδιάκριτες και έμφυτες σεξουαλικές συμπεριφορές οι οποίες είναι απαραίτητες για την αναπαραγωγική τους επιτυχία. Η σεξουαλική προσέγγιση των αρσενικών μυγών *D. melanogaster* χαρακτηρίζεται από ένα περίπλοκο τελετουργικό σύστημα. Περιλαμβάνει ένα μοτίβο σταθερών ενεργειών, κατά το οποίο το αρσενικό προσανατολίζεται προς το θηλυκό και το ακολουθεί, το αγγίζει με τα μπροστινά του πόδια, τραγουδά ένα ειδικό για το είδος τους τραγούδι τεντώνοντας τα φτερά του, γλείφει τα γεννητικά όργανα του θηλυκού και κάμπει τη κοιλιά του προς το θηλυκό ως απόπειρα ζευγαρώματος. Εάν το θηλυκό είναι επαρκώς διεγερμένο και δεν έχει ζευγαρώσει πρόσφατα, δέχεται την προσέγγισή του αρσενικού επιβραδύνοντας και ανοίγοντας τις κολπικές πλάκες του για να επιτρέψει το ζευγάρωμα (Demir & Dickson, 2005). Το τραγούδι ζευγαρώματος που παράγεται από τη δόνηση των φτερών των αρσενικών κατά τη διάρκεια του τελετουργικού ζευγαρώματος έχει μελετηθεί περισσότερο μεταξύ των ήχων επικοινωνίας στις μύγες και θεωρείται ότι, είναι το κυριότερο ερέθισμα που επηρεάζει την επιλογή του θηλυκού (Li et al., 2018). Επιπρόσθετα, το μέγεθος του σώματος είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό που σχετίζεται με τη φυσική κατάσταση και συμβάλλει στην επιτυχή επιλογή συντρόφου (Carreira et al., 2009). Έχει αναφερθεί ότι τα μεγαλύτερα αρσενικά ανταγωνίζονται τα μικρότερα αρσενικά σε επιθετικότητα, φλερτάρουν πιο έντονα και ξοδεύουν λιγότερο χρόνο για να επιτύχουν το ζευγάρωμα. Πιθανόν τα θηλυκά ανταποκρίνονται καλύτερα

στα μεγαλύτερα αρσενικά που είναι «καλύτεροι» τραγουδιστές, επειδή έχουν μεγαλύτερα φτερά (Jagadeeshan et al., 2015). Όλοι αυτοί οι παράγοντες που θα επηρεάσουν το ζευγάρι, εξαρτώνται από την τελική επίδοση των αρσενικών σε όλα αυτά τα χαρακτηριστικά.

1.7.1 Επίδραση ουσιών που περιέχονται στον καπνό του τσιγάρου στη σεξουαλική συμπεριφορά της *Drosophila melanogaster*

Ο καπνός του τσιγάρου εκτός από τα πολλά βλαβερή συστατικά που περιλαμβάνει, περιέχει και νικοτίνη. Η νικοτίνη είναι η χημική ουσία του καπνού που συνδέεται με τις εθιστικές του επιδράσεις. Η νικοτίνη ενεργοποιεί τους νικοτινικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης (nAChRs) στον εγκέφαλο. Αυτοί οι υποδοχείς ενεργοποιούνται κανονικά από τον ενδογενή συνδέτη, την ακετυλοχολίνη, και έχουν ρόλο στη μάθηση και τη μνήμη καθώς και στις ψυχοκινητικές συμπεριφορές. Η σηματοδότηση των νικοτινικών υποδοχέων είναι επίσης σημαντική για τη φυσιολογική ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Επομένως, η έκθεση στη νικοτίνη κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης δύναται να επηρεάσει διάφορες πτυχές της φυσιολογικής ανάπτυξης του εγκεφάλου (Velazquez-Ulloa, 2017). Έρευνες που έγιναν σε μύγες *D. melanogaster* οι οποίες εκτέθηκαν σε φιλτραρισμένο καπνό (smoke filtrate; SF), έδειξαν πως ο καπνός όχι μόνο ήταν τοξικός και προκαλούσε θνησιμότητα, αλλά είχε σημαντικές επιδράσεις στειρότητας στις αρσενικές μύγες. Οι παρατηρούμενες επιδράσεις τοξικότητας και στειρότητας του φιλτραρισμένου καπνού στη *D. melanogaster* οφείλονται στη νικοτίνη και στα υπόλοιπα

τοξικά συστατικά του καπνού, όπως τα σπερματοκτόνα προϊόντα, τα οποία μεταβάλουν τη μορφολογία και τη λειτουργία της μεμβράνης του σπέρματος καθώς και τη κινητικότητα του σπέρματος (Sadiq & Altaany, 2014). Όσον αφορά τις θηλυκές μύγες, μια διαφορετική έρευνα στην οποία οι μύγες εκτέθηκαν πάλι σε νικοτίνη, έδειξε δραστική μείωση του ποσοστού γονιμότητας κατά σχεδόν 50% σε σύγκριση με τις μύγες που δεν είχαν εκτεθεί σε νικοτίνη (El-Merhie et al., 2021b).

Ανάμεσα στα πολλά συστατικά του τσιγάρου, βρίσκεται και η αμμωνία. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε αρσενικές μύγες *D. melanogaster* οι οποίες εκτέθηκαν σε αμμωνία μέσω ολφακτόμετρου, έδειξαν πως η αμμωνία έλκυε πεινασμένες και ζευγαρωμένες αρσενικές μύγες ενώ απωθούσε παρθένες αρσενικές μύγες οι οποίες είχαν στερηθεί το φαγητό. Συγκεκριμένα, οι χορτασμένες μύγες παρουσίασαν αυξημένη προτίμηση για την αμμωνία σε συγκεντρώσεις 0,25% με μέγιστη ανταπόκριση σε συγκέντρωση 0,5%. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αμμωνίας (16%), οι μύγες απωθούνταν. Σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις οι παρθένες μύγες παρουσίασαν υψηλότερες προτιμήσεις από τις ζευγαρωμένες. Ωστόσο, με τη στέρηση της τροφής άλλαξε το μοτίβο αντίδρασης στην αμμωνία. Για τα ζευγαρωμένα αρσενικά, οι δείκτες προτίμησης αυξήθηκαν σχεδόν γραμμικά με τη συγκέντρωση από τη χαμηλότερη στην υψηλότερη, με μέγιστες αντιδράσεις στο 16%. Για τα παρθένα αρσενικά, οι δείκτες προτίμησης μειώθηκαν όταν αυξήθηκε η συγκέντρωση.

1.8 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Στόχος της μελέτης ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης του καπνού σε μορφολογικά χαρακτηριστικά και στη σεξουαλική συμπεριφορά της *Drosophila* μετά από έκθεση σε εκχύλισμα καπνού τσιγάρου. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά αφορούσαν την επίδραση στο βάρος και στο μήκος κνήμης των ενήλικων μυγών. Για την επίδραση στη σεξουαλική συμπεριφορά, μελετήθηκαν τέσσερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (τα αγγίγματα προς το θηλυκό, οι εκτάσεις των φτερών των αρσενικών, οι κάμψεις των κοιλιών των αρσενικών και οι απόπειρες για σεξουαλική επαφή) καθώς και η έναρξη της σεξουαλικής προσέγγισης, ο απαιτούμενος χρόνος για την έναρξη της σεξουαλικής επαφής και η επιτυχία της. Η μελέτη έγινε σε ισοτονικό διάλυμα για την καλλιέργεια κυττάρων (Phosphate Buffered Saline, PBS) το οποίο ήταν το δείγμα αναφοράς (control) και σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος καπνού (Cigarette Smoke Extract, CSE): 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. Υλικό και Μέθοδος

2.1 Στελέχη *D. melanogaster* και διατήρηση αποικιών

Στα πειράματα που έγιναν χρησιμοποιήθηκαν *D. melanogaster* μύγες άγριου τύπου απομονωμένες στη Ζυρίχη της Ελβετίας, οι οποίες είχαν μεγαλώσει σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25 °C) και υγρασίας (50-60%) με 12 ώρες ημέρα-νύχτα μέσα σε μια θερμοκοιτίδα.

2.2 Παρασκευή θρεπτικού υλικού για τη διατήρηση των μυγών

Η σύσταση της τροφής (media) στα 100ml νερό είναι η εξής:

-7,5 gr ζάχαρη

-5,5 gr καλαμποκάλευρο

-3,33 gr ξηρή μαγιά

-1 gr άγαρ

-0,2 gr νιπαγίνη (SIGMA) διαλυμένη σε 5 ml αιθανόλης 70%

Η διαδικασία παρασκευής τροφής περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

-Σε ένα ποτήρι ζέσεως τοποθετούνται 100 ml νερό. Το ποτήρι μεταφέρεται σε θερμαινόμενη πλάκα σε μέγιστη θερμοκρασία (100°C) και παραμένει σε αυτή μέχρι το νερό να φτάσει σε σημείο βρασμού.

-Όταν θερμανθεί το νερό στο επιθυμητό σημείο, η θερμοκρασία ελαττώνεται και ξεκινάει η παράλληλη ανάδευσή του.

-Πρώτα προστίθεται η ζάχαρη έως ότου να διαλυθεί πλήρως.

-Υστερα κοσκινίζεται το καλαμποκάλευρο και μόλις διαλυθεί προστίθεται η ξηρή μαγιά και τελευταίο το άγαρ.

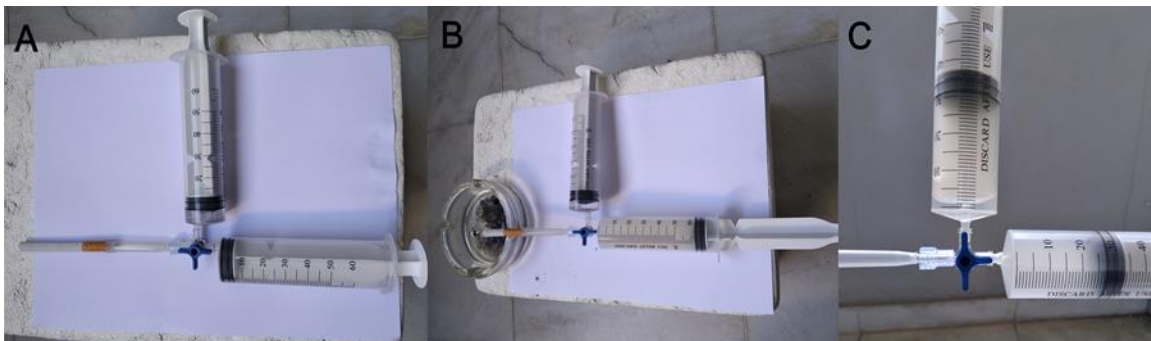
-Το μείγμα παραμένει υπό ανάδευση έως ότου διαλυθούν πλήρως όλα τα συστατικά του και λίγο πριν πήξει τελείως, απομακρύνεται από τη θέρμανση και τοποθετείται σε απλό αναδευτήρα ώστε να πέσει η θερμοκρασία.

-Μόλις μειωθεί η θερμοκρασία του επαρκώς προστίθεται η διαλυμένη νιπαγίνη και το μείγμα αναδεύεται για 1 λεπτό ακόμη.

-Τέλος, το μείγμα τοποθετείται σε αποστειρωμένα φιαλίδια και αφήνεται να στερεοποιηθεί πλήρως για περίπου 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, προτού εισαχθούν μύγες προς καλλιέργεια.

2.3 Παρασκευή εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου

Η διαδικασία με την οποία λαμβάνεται το εκχύλισμα καπνού απεικονίζεται στην **Εικόνα 9**. Ο μηχανισμός αποτελείται από μια θήκη για ένα τσιγάρο του εμπορίου και δυο σύριγγες που συνδέονται με ένα σωλήνα τριών οδών. Η κάθετη σύριγγα περιέχει PBS, ενώ η οριζόντια είναι άδεια. Αρχικά, μέσω της αντλίας διατηρείται ανοιχτή η οδός μεταξύ του τσιγάρου και της άδειας σύριγγας, ώστε ανάβοντας το τσιγάρο, να αναρροφηθεί καπνός προς την άδεια σύριγγα. Ύστερα, μετακινείται η αντλία μεταξύ της κάθετης και οριζόντιας σύριγγας με σκοπό τη μεταφορά του καπνού στο PBS. Αμέσως μετά, αφαιρείται ο καπνός από τη σύριγγα που περιέχει PBS και η διαδικασία συνεχίζεται έως ότου σβήσει το τσιγάρο.



Εικόνα 9. Μηχανισμός λήψης εκχυλίσματος καπνού (CSE).

2.3.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών με αυξανόμενες συγκεντρώσεις CSE και πειραματικές ομάδες

Για τη δημιουργία της πειραματικής συνθήκης '10% CSE' χρησιμοποιούνται 1 τσιγάρο στα 5 ml PBS, τα οποία αναμειγνύονται με 45ml media. Για τη συνθήκη '25% CSE' χρησιμοποιούνται 2 τσιγάρα στα 10ml PBS τα οποία αναμειγνύονται με 30 ml media. Τέλος, στη συνθήκη '50% CSE' χρησιμοποιούνται 2 τσιγάρα στα 10 ml PBS τα οποία αναμειγνύονται με 10 ml media. Συνολικά μελετήθηκαν 100 ζευγάρια μυγών για κάθε συνθήκη: control (10% PBS), 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE.

2.4 Καλλιέργεια και διατήρηση αποικιών *Drosophila melanogaster*

Οι μύγες διατηρούνται σε σταθερές συνθήκες, με θερμοκρασία 25°C, υγρασία 50-60% και 12 ώρες εναλλαγής φωτισμού του κλιβάνου ώστε να ανταποκρίνονται στο πρότυπο 12 ωρών ημέρας – 12 ωρών νύχτας. Στα φιαλίδια τοποθετούνται περίπου 30-40 μύγες για αποφυγή συνωστισμού. Κάθε 10-12 ημέρες οι μύγες μετακινούνται σε φιαλίδια με φρέσκο θρεπτικό υλικό. Τα φιαλίδια απορρίπτονται μετά το πέρας ενός μήνα ή σε περίπτωση που εμφανιστεί κάποια εστία μόλυνσης ή παρατηρηθεί έντονη θνησιμότητα.

2.5 Μετρήσεις βάρους και μήκους κνήμης του ποδιού

Μετρήθηκε το βάρος και το μήκος της κνήμης (tibia) του δεύτερου ποδιού στις θηλυκές και αρσενικές μύγες σε κάθε πειραματική συνθήκη (**Εικόνα 11**). Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν μύγες 2-4 ημερών που είχαν εκτραφεί στις πειραματικές συνθήκες 10% PBS (control), 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και σεξουαλικά ώριμες μύγες καθώς δεν επηρέαζαν τις μετρήσεις. Όταν εκκολάφθηκαν τα αυγά, 100 μύγες (50 θηλυκές-50 αρσενικές) από κάθε πειραματική συνθήκη συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε άδεια φιαλίδια για να απομονωθούν από την τροφή. Μετά το πέρας μίας ώρας, μεταφέρθηκαν στους -80°C για περίπου 20 λεπτά ώστε να θανατωθούν. Οι μύγες χωρίστηκαν σε δεκάδες και μετρήθηκαν σε ζυγό ακριβείας. Έπειτα, από κάθε μύγα αφαιρέθηκε η κνήμη (tibia) του δεύτερου ποδιού και τοποθετήθηκε σε πλάκα μικροσκοπίου. Για τη λήψη των ψηφιακών εικόνων χρησιμοποιήθηκε ένα στερεοσκόπιο OLYMPUS και μια ψηφιακή κάμερα OptixCam. Μετά από βαθμονόμηση που πραγματοποιήθηκε τα 390 pixels αντιστοιχήθηκαν σε ένα χιλιοστό. Όλες οι εικόνες υποβλήθηκαν σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ. Το μήκος της κνήμης (tibia) μετρήθηκε χρησιμοποιώντας πρόσθια και οπίσθια όρια (**Εικόνα 10**).



Εικόνα 10. Πόδι θηλυκής μύγας *Drosophila melanogaster*. Με κόκκινο απεικονίζεται η κνήμη (tibia).

2.6 Εγκατάσταση μεθόδων φαινοτυπικής ανάλυσης

Κατά την πρώτη ημέρα πειραματικών χειρισμών χρησιμοποιήθηκαν μύγες 10-12 ημερών, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε άδεια φιαλίδια και μεταφέρθηκαν στον πάγο για 15-20 λεπτά ώστε να αναισθητοποιηθούν. Ύστερα από τη παρέλευση του χρόνου, οι μύγες τοποθετήθηκαν σε μια παγωμένη επιφάνεια και συλλέχθηκαν 15 μύγες (10 θηλυκές και 5 αρσενικές) για κάθε φιαλίδιο πειραματικής συνθήκης (control, 10% CSE, 25% CSE, 50% CSE). Οι μύγες παρέμειναν στα εκάστοτε φιαλίδια για τρεις ημέρες και έπειτα αφαιρέθηκαν ώστε να παραμείνουν μόνο τα αυγά ώστε να συλλεχθούν απόγονοι F1 γενιάς. Ο χρόνος μέχρι να εκκολαφθούν τα αυγά ήταν περίπου επτά ημέρες από την απομάκρυνση των ενήλικων μυγών. Μια μέρα πριν την συλλογή των παρθένων μυγών

έγινε η Παρασκευή του φρέσκου θρεπτικού υλικού με CSE ή PBS. Κατά την έβδομη ημέρα περίπου ξεκίνησε η συλλογή των σεξουαλικά ανώριμων (παρθένων) μυγών, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά φιαλίδια βάσει φύλου. Η συλλογή κράτησε 3 ημέρες και στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν μύγες 2-4 ημερών.

Την τελευταία ημέρα του πειράματος (τέταρτη ημέρα από την αρχή της συλλογής), οι μύγες μεταφέρθηκαν σε άδεια φιαλίδια τα οποία μπήκαν στον πάγο για περίπου 17 λεπτά, ώστε να αναισθητοποιηθούν οι μύγες. Ύστερα, μπήκαν ανά ζευγάρι σε πλάκες με 6 βοθρίων (#657 160, Griener Bio-one). Μετά από 8 λεπτά είχαν επανέλθει από την αναισθητοποίηση και ξεκίνησε η βιντεοσκόπηση της σεξουαλικής συμπεριφοράς τους για 30 λεπτά.

2.7 Ανάλυση δεδομένων

Κάθε ζευγάρι αναλύθηκε ξεχωριστά με οπτική παρατήρηση των χαρακτηριστικών. Μελετήθηκαν τέσσερις φαινότυποι σεξουαλικής συμπεριφοράς (έκταση φτερού, άγγιγμα, κάμψη κοιλιάς, προσπάθεια σεξουαλικής επαφής), ο χρόνος εκκίνησης της συμπεριφοράς προσέγγισης, ο χρόνος μέχρι το ζευγάρωμα, οι προσπάθειες που χρειάστηκαν μέχρι τη σεξουαλική επαφή και η επιτυχία της σεξουαλικής επαφής (σεξουαλική επαφή/όχι σεξουαλική επαφή). Ο χρόνος εκκίνησης της συμπεριφοράς προσέγγισης ορίζεται ως η χρονική στιγμή που το αρσενικό ξεκινά να προσανατολίζεται προς το θηλυκό, εκδηλώνοντας τα χαρακτηριστικά σεξουαλικής προσέγγισης. Ο χρόνος μέχρι τη σεξουαλική επαφή είναι η χρονική περίοδος κατά την οποία το αρσενικό

προσεγγίζει το θηλυκό και εντέλει ζευγαρώνει μαζί του. Η σεξουαλική επαφή που διήρκησε λιγότερο από 10 λεπτά θεωρήθηκε μη επιτυχής. Αντιθέτως, η σεξουαλική επαφή που είχε διάρκεια 10 λεπτά και περισσότερο, θεωρήθηκε επιτυχής. Τα δεδομένα καταγράφηκαν σε excel. Επίσης τα δεδομένα από τις μετρήσεις του βάρους και του μήκους ποδιών καταγράφηκαν σε excel.

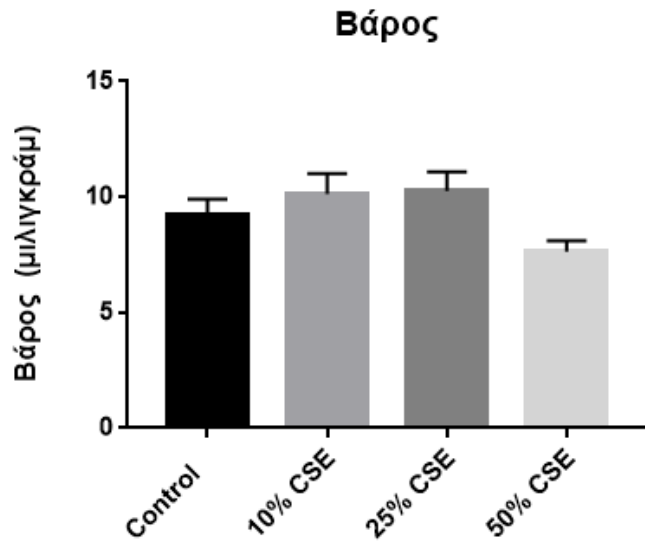
2.8 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πακέτο GraphPad Prism v.7.00. Όλα τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (mean \pm SEM). Τα δεδομένα κάθε πειράματος υποβλήθηκαν σε έλεγχο κανονικότητας με το τεστ D'Agostino & Pearson ή Shapiro Wilk προκειμένου να επιλεγούν παραμετρικά (One way Anova) ή μη-παραμετρικά (Kruskal-Wallis test) τεστ στην περαιτέρω ανάλυση. Για την ανάλυση κατηγορικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος χ^2 . Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά όταν το p value ήταν $<0,05$.

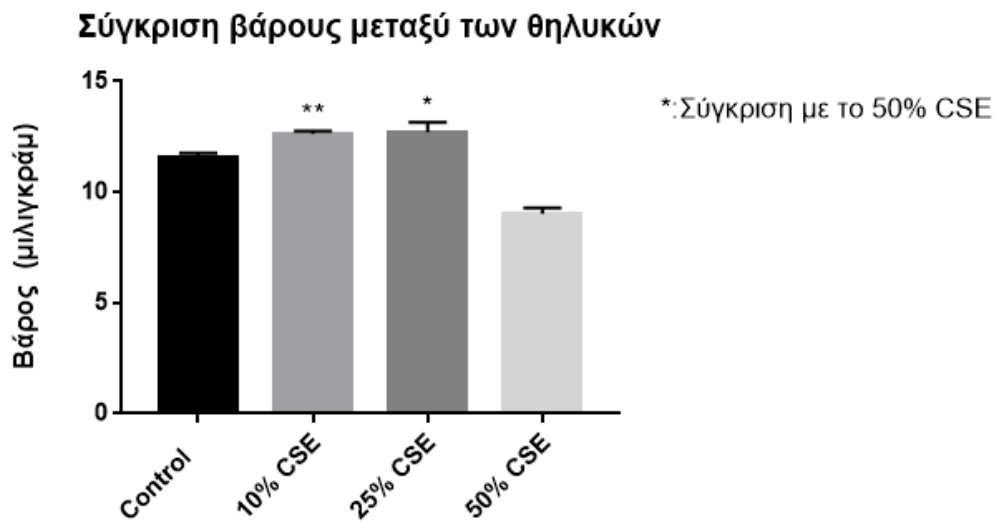
3. Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα μέτρησης του βάρους

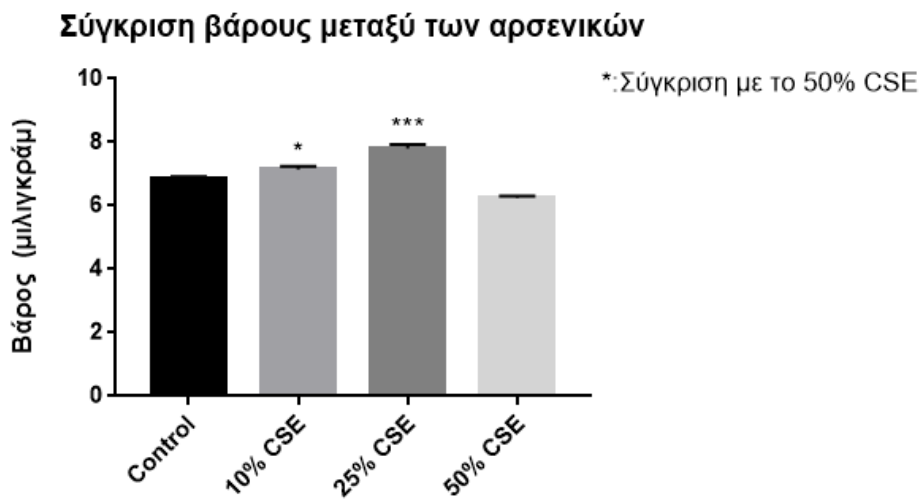
Μελετήθηκε η επίδραση του καπνού του τσιγάρου στο βάρος των μυγών στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. Συλλέχθηκαν 100 μύγες (50 θηλυκές-50 αρσενικές) και μετρήθηκε το βάρος τους. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε ότι αφορά το βάρος όλων των μυγών μεταξύ του control ($9,192 \pm 0,7195$ mg) και των πειραματικών συνθηκών 10% CSE ($10,14 \pm 0,8684$ mg), 25% CSE ($10,25 \pm 0,8459$ mg) και 50% CSE ($7,63 \pm 0,4801$ mg) (**Διάγραμμα 1**). Ωστόσο, η ανάλυση πολλαπλών συγκρίσεων του βάρους των θηλυκών μυγών έδειξε πως το βάρος των θηλυκών μυγών της πειραματικής συνθήκης 50% CSE ($9,02 \pm 0,2577$ mg) είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένο σε σύγκριση με τις πειραματικές συνθήκες 10% CSE ($12,63 \pm 0,1229$ mg) και 25% CSE ($12,7 \pm 0,4494$ mg) (**Διάγραμμα 2**). Ομοίως, το βάρος των αρσενικών μυγών στην πειραματική συνθήκη 50% CSE ($6,24 \pm 0,067$ mg) εμφανίστηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένο σε σύγκριση με το βάρος των αρσενικών μυγών στις πειραματικές συνθήκες 10% CSE ($7,14 \pm 0,097$ mg) και 25% CSE ($7,8 \pm 0,13$ mg) (**Διάγραμμα 3**).



Διάγραμμα 1. Μετρούμενο βάρος των μυών στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. N=100 μύγες ανά πειραματική συνθήκη (50 θηλυκές-50 αρσενικές).



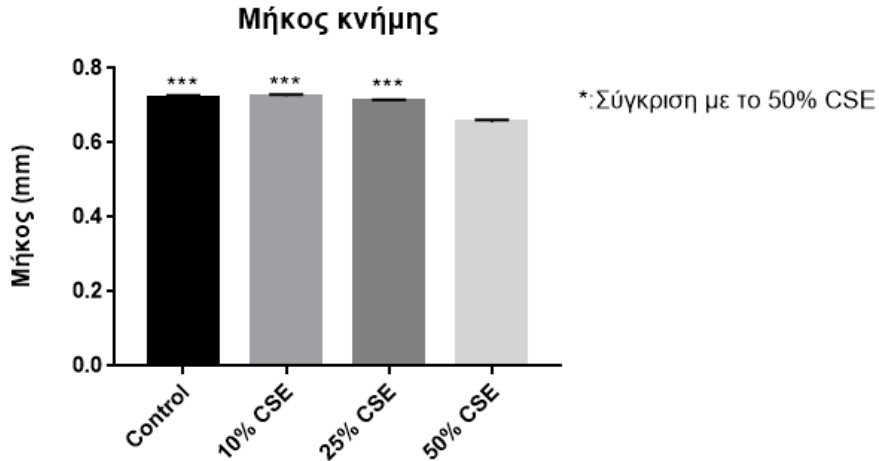
Διάγραμμα 2. Μετρούμενο βάρος των θηλυκών μυγών στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. Το βάρος των θηλυκών μυγών της πειραματικής συνθήκης 50% CSE βρέθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένο σε σύγκριση με τις πειραματικές συνθήκες 10% CSE ($p=0,0013$) και 25% CSE ($p=0,0106$). $N=50$ μύγες ανά πειραματική συνθήκη.



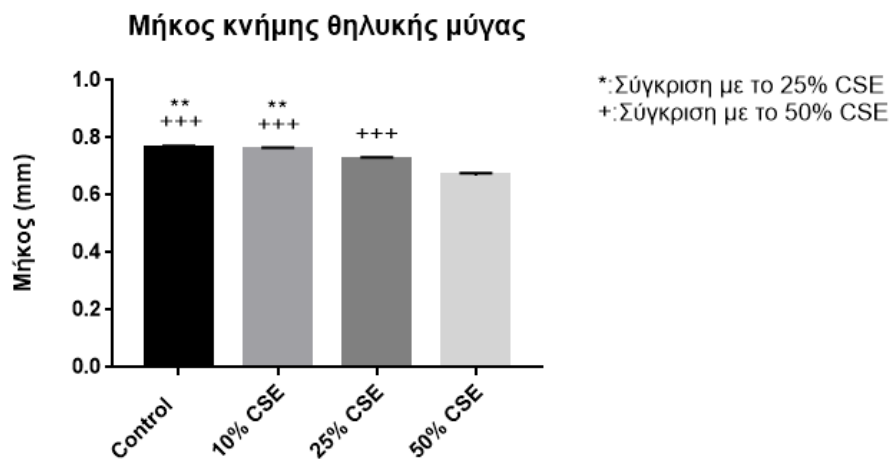
Διάγραμμα 3. Μετρούμενο βάρος των αρσενικών μυγών στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. Το βάρος των αρσενικών μυγών στην πειραματική συνθήκη 50% CSE βρέθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένο σε σύγκριση με το βάρος των αρσενικών μυγών στις πειραματικές συνθήκες 10% CSE ($p=0,0472$) και 25% CSE ($p=0,0003$). $N=50$ μύγες ανά πειραματική συνθήκη.

3.2 Αποτελέσματα μέτρησης του μήκους της κνήμης των ποδιών

Όσον αφορά τη μέτρηση των ποδιών συλλέχθηκαν 100 μύγες (50 θηλυκές-50 αρσενικές) και μετρήθηκε η κνήμη (tibia) των δεύτερων ποδιών. Το μήκος της κνήμης των μυγών στην πειραματική συνθήκη 50% CSE ($0,655 \pm 0,005$ mm) παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένο σε σύγκριση με το μήκος της κνήμης των μυγών στις πειραματικές συνθήκες control ($0,719 \pm 0,007$ mm), 10% CSE ($0,724 \pm 0,005$ mm) και 25% CSE ($0,711 \pm 0,003$ mm) (**Διάγραμμα 4**). Η ανάλυση πολλαπλών συγκρίσεων, έδειξε πως το μήκος κνήμης των θηλυκών μυγών της πειραματικής συνθήκης 25% CSE ($0,726 \pm 0,005$ mm) είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένο σε σύγκριση με το μήκος της κνήμης των μυγών στις πειραματικές συνθήκες control ($0,763 \pm 0,007$ mm) και 10% CSE ($0,760 \pm 0,004$ mm) (**Διάγραμμα 5**). Επιπρόσθετα, το μήκος κνήμης των θηλυκών μυγών της πειραματικής συνθήκης 50% CSE ($0,668 \pm 0,007$ mm) είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένο σε σύγκριση με το μήκος της κνήμης των μυγών στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE και 25% CSE. Το μήκος της κνήμης των αρσενικών μυγών της πειραματικής συνθήκης 25% CSE ($0,697 \pm 0,004$ mm) είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένο σε σύγκριση με το μήκος της κνήμης των μυγών στην πειραματική συνθήκη control ($0,675 \pm 0,010$ mm) (**Διάγραμμα 6**). Επιπρόσθετα, το μήκος της κνήμης των αρσενικών μυγών της πειραματικής συνθήκης 50% CSE ($0,642 \pm 0,007$ mm) είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένο σε σύγκριση με το μήκος της κνήμης των μυγών στις πειραματικές συνθήκες 10% CSE ($0,688 \pm 0,007$ mm) και 25% CSE.

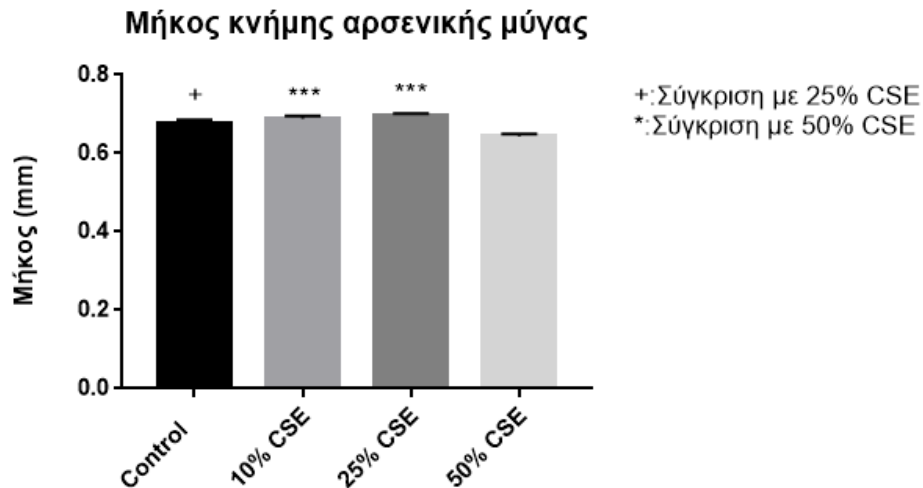


Διάγραμμα 4. Μετρούμενο μήκος της κνήμης των μυγών στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. Το μήκος της κνήμης των μυγών στην πειραματική συνθήκη 50% CSE ($p < 0,0001$) βρέθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένο σε σύγκριση με το μήκος της κνήμης των μυγών στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE και 25% CSE. $N=100$ μύγες ανά πειραματική συνθήκη (50 θηλυκές-50 αρσενικές).



Διάγραμμα 5. Μετρούμενο μήκος της κνήμης των θηλυκών μυγών στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πειραματικών

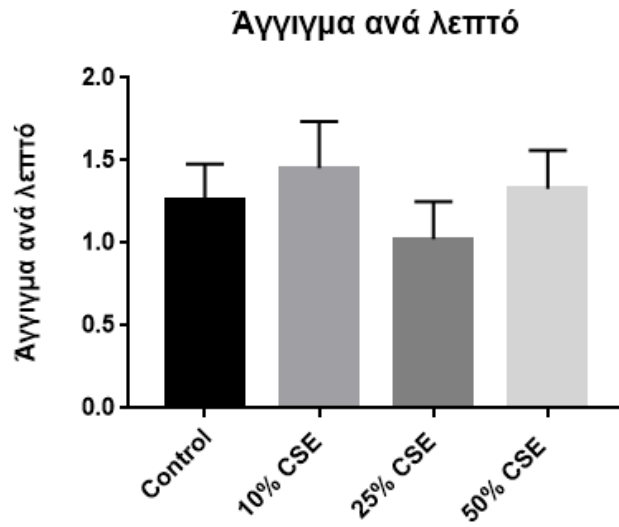
ομάδων 25% CSE και control ($p=0.0019$), 25% CSE και 10% CSE ($p=0.0011$) καθώς και του 50% CSE και των control ($p<0,0001$), 10% CSE ($p<0,0001$) και 25% CSE ($p=0,0003$). $N=50$ μύγες ανά πειραματική συνθήκη.



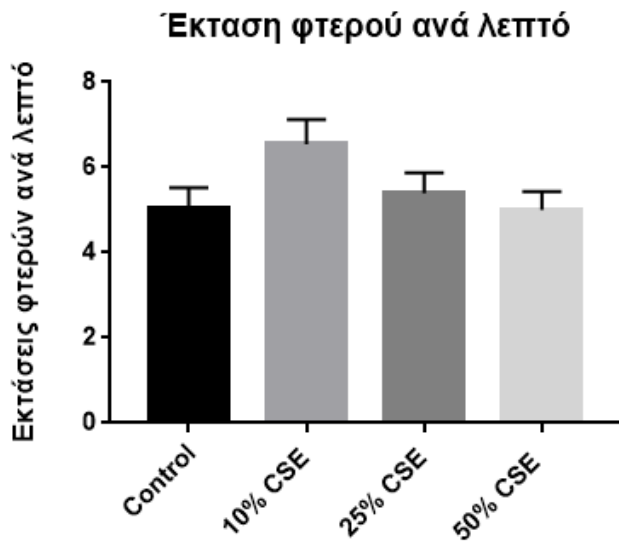
Διάγραμμα 6. Μετρούμενο μήκος της κνήμης των αρσενικών μυγών στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πειραματικών ομάδων control και 25% CSE ($p=0,0202$), 10% CSE και 50% CSE ($p<0,0001$) καθώς και μεταξύ των 25% CSE και 50% CSE ($p<0,0001$). $N=50$ μύγες ανά πειραματική συνθήκη.

3.3 Αποτελέσματα ανάλυσης παραμέτρων σεξουαλικής προσέγγισης

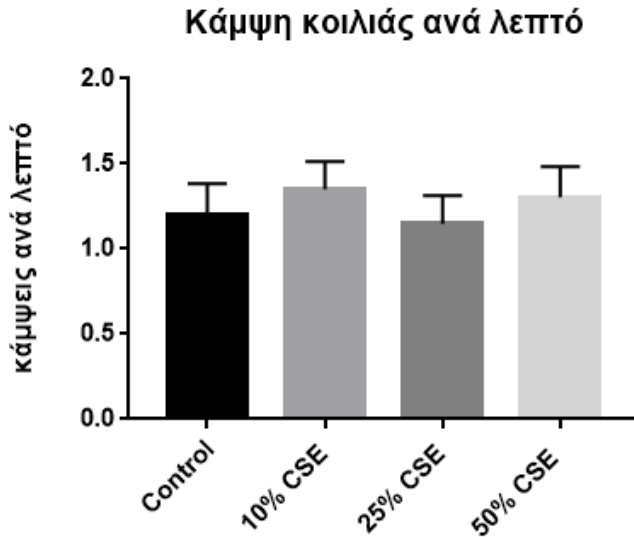
Μελετήθηκε το πλήθος των αγγιγμάτων ανά λεπτό σε όλες τις πειραματικές συνθήκες (**Διάγραμμα 7**). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε ότι αφορά το συγκεκριμένο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό μεταξύ του control ($1,259 \pm 0,218$) και των πειραματικών συνθηκών 10% CSE ($1,453 \pm 0,282$), 25% CSE ($1,022 \pm 0,228$) και 50% CSE ($1,328 \pm 0,232$). Επίσης, μελετήθηκε το πλήθος των εκτάσεων των φτερών των αρσενικών ανά λεπτό στις πειραματικές συνθήκες control ($5,025 \pm 0,497$), 10% CSE ($6,542 \pm 0,583$), 25% CSE ($5,391 \pm 0,480$) και 50% CSE ($5,005 \pm 0,430$) (**Διάγραμμα 8**). Δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Ομοίως δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μελέτη του πλήθους των κάμψεων της κοιλιάς των αρσενικών ανά λεπτό στις πειραματικές συνθήκες control ($1,202 \pm 0,182$), 10% CSE ($1,351 \pm 0,163$), 25% CSE ($1,147 \pm 0,161$) και 50 % CSE ($1,303 \pm 0,180$) (**Διάγραμμα 9**). Τέλος, μελετήθηκε το πλήθος των αποπειρών για σεξουαλική επαφή ανά λεπτό στις πειραματικές συνθήκες control ($0,699 \pm 0,180$), 10% CSE ($0,786 \pm 0,182$), 25% CSE ($1,082 \pm 0,166$) και 50% CSE ($0,882 \pm 0,152$) και τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά (**Διάγραμμα 10**).



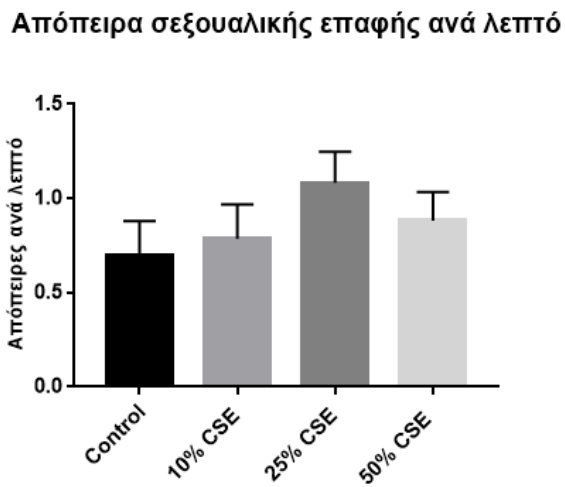
Διάγραμμα 7. Πλήθος των αγγιγμάτων ανά λεπτό στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. N=100 ζευγάρια ανά πειραματική συνθήκη.



Διάγραμμα 8. Πλήθος των εκτάσεων φτερών των αρσενικών ανά λεπτό στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. N=100 ζευγάρια ανά πειραματική συνθήκη.



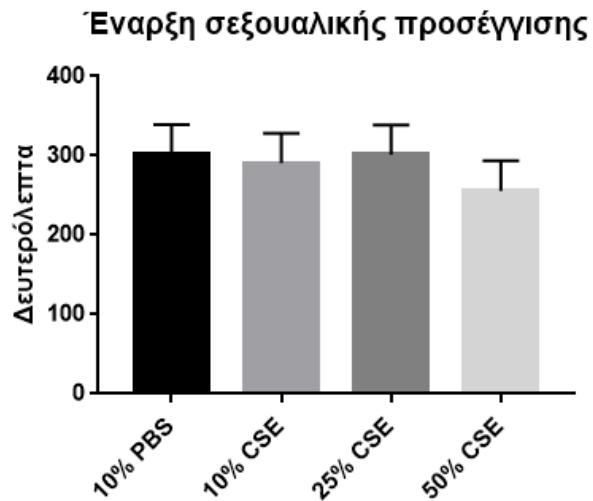
Διάγραμμα 9. Πλήθος των κάμψεων του κάτω μέρους της κοιλιάς των αρσενικών ανά λεπτό στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50 % CSE. N=100 ζευγάρια ανά πειραματική συνθήκη.



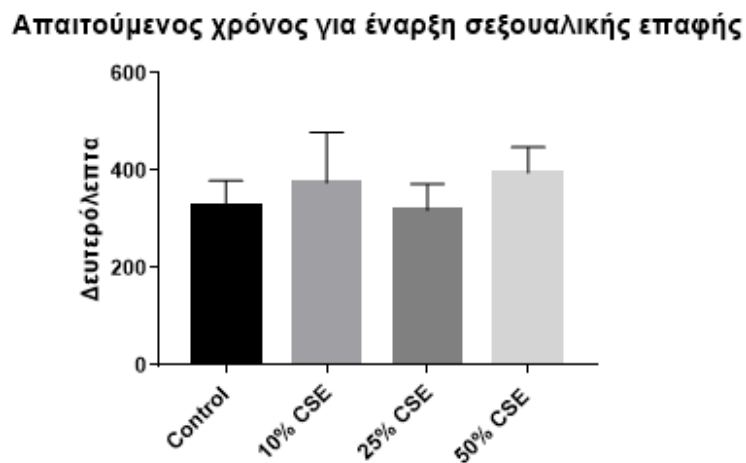
Διάγραμμα 10. Πλήθος των αποπειρών για σεξουαλική επαφή ανά λεπτό στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. N=100 ζευγάρια ανά πειραματική συνθήκη.

3.4 Αποτελέσματα ανάλυσης παραμέτρων σεξουαλικής επαφής

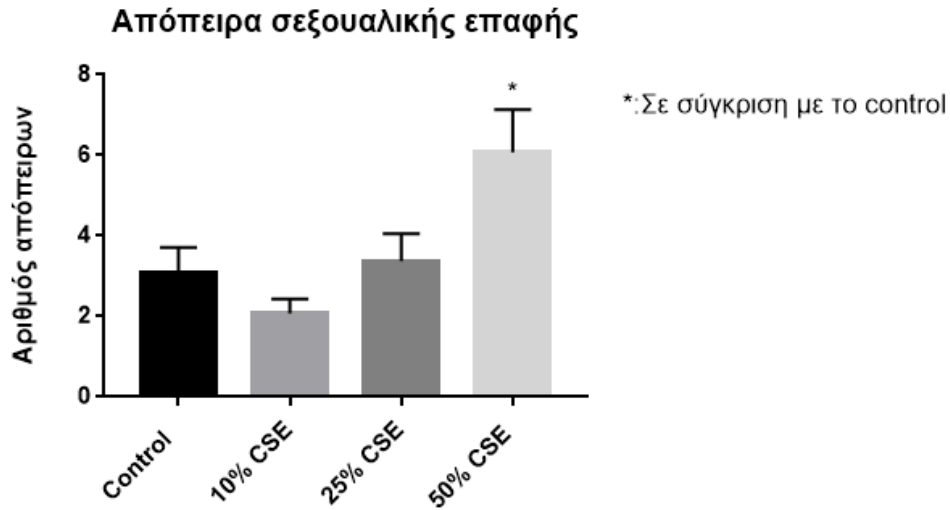
Μελετήθηκε η επίδραση του καπνού του τσιγάρου στη σεξουαλική επαφή των μυγών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι χρονικές στιγμές που ξεκίνησε η σεξουαλική προσέγγιση στις πειραματικές συνθήκες control (302,4±36,9), 10% CSE (290,6±37,53), 25% CSE (301,2±47,51) και 50% CSE (255,9±37,92), χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (**Διάγραμμα 11**). Επίσης, μελετήθηκε ο απαιτούμενος χρόνος για την έναρξη της σεξουαλικής επαφής από την αρχή της σεξουαλικής προσέγγισης στις πειραματικές συνθήκες control (328,3±51), 10% CSE (375,1±103,4), 25% CSE (318,9±53,81) και 50% CSE (395,9±52,44) (**Διάγραμμα 12**). Τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά. Επιπλέον, μελετήθηκε το πλήθος των αποπειρών για σεξουαλική επαφή στις πειραματικές συνθήκες control (3,096±0,6136), 10% CSE (2,076±0,353), 25% CSE (3,375±0,679) και 50% CSE (6,074±1,063) (**Διάγραμμα 13**). Οι απόπειρες για σεξουαλική επαφή στην πειραματική συνθήκη 50% CSE βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένες σε σύγκριση με το control ($p=0,0174$). Στη συνέχεια, αναλύθηκαν τα ζευγάρια που είχαν σεξουαλική επαφή και αυτά που δεν είχαν στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE (**Διάγραμμα 14**). Τέλος, αναλύθηκαν τα ζευγάρια που είχαν επιτυχή σεξουαλική επαφή (διάρκεια ≥ 10 λεπτά) στις πειραματικές συνθήκες control 10% PBS, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE (**Διάγραμμα 15**).



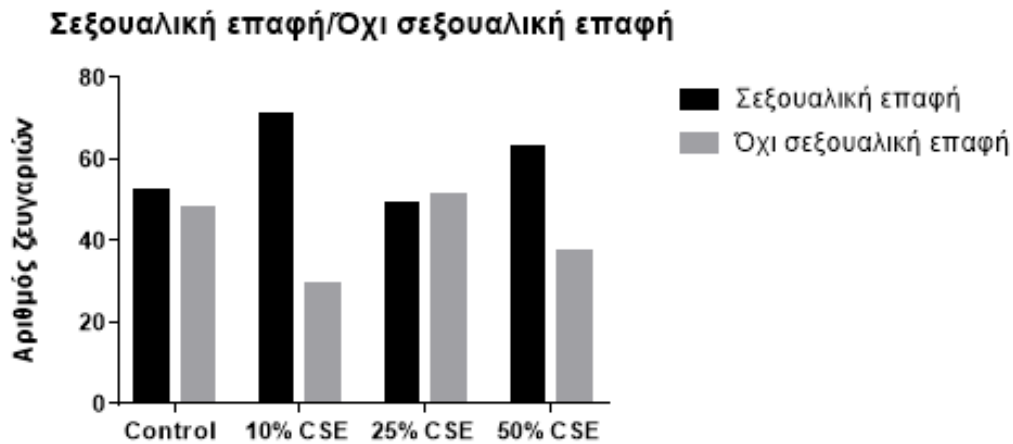
Διάγραμμα 11. Έναρξη σεξουαλικής προσέγγισης στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. N=100 ζευγάρια ανά πειραματική συνθήκη.



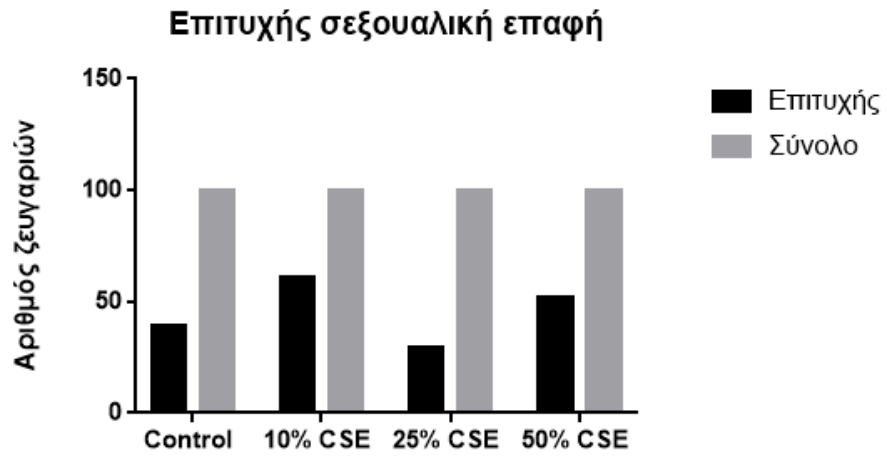
Διάγραμμα 12. Απαιτούμενος χρόνος για την έναρξη της σεξουαλικής επαφής από την αρχή της σεξουαλικής προσέγγισης στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. N=100 ζευγάρια ανά πειραματική συνθήκη.



Διάγραμμα 13. Απόπειρες για σεξουαλική επαφή στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. N=100 ζευγάρια ανά πειραματική συνθήκη.



Διάγραμμα 14. Σεξουαλική επαφή στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. N=100 ζευγάρια ανά πειραματική συνθήκη.



Διάγραμμα 15. Επιτυχία της σεξουαλικής επαφής στις πειραματικές συνθήκες control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. Ως επιτυχής ορίστηκε η σεξουαλική επαφή με διάρκεια ίση ή μεγαλύτερη των 10 λεπτών. N=100 ζευγάρια ανά πειραματική συνθήκη.

4. Συζήτηση

Η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου προκαλεί ένα ευρύ φάσμα αρνητικών αποτελεσμάτων στην υγεία και στη συμπεριφορά των μυγών, συμπεριλαμβανομένων την ανεπάρκεια ανάπτυξης και την αλλαγή στους ρυθμούς της σεξουαλικής προσέγγισης. Στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου στα μορφολογικά χαρακτηριστικά (βάρος, μήκος κνήμης) και σε συγκεκριμένους φαινότυπους σεξουαλικής συμπεριφοράς της *D. melanogaster*. Παρατηρήθηκε ότι, στην πειραματική συνθήκη με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση εκχυλίσματος καπνού (50% CSE), οι μύγες είχαν μειωμένο βάρος και μήκος κνήμης σε σχέση με το control. Μείωση του μήκους της κνήμης παρατηρήθηκε και κατά την έκθεση των μυγών σε 25% CSE. Επιπλέον, τα αρσενικά της πειραματικής συνθήκης 50% CSE έκαναν περισσότερες προσπάθειες για σεξουαλική επαφή.

Οι μύγες που εκτέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος καπνού (50% CSE), είχαν σημαντικά μειωμένο βάρος σε σχέση με τις μύγες του control. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι μύγες που εκτίθενται χρονίως σε καπνό τσιγάρου παρουσιάζουν μειωμένες σωματικές δραστηριότητες, αυξημένο μεταβολικό ρυθμό και μειωμένη περιεκτικότητα σε σωματικό λίπος (Prange et al., 2018). Ταυτοχρόνως, έχει φανεί πως η αναπτυξιακή έκθεση των μυγών σε νικοτίνη μειώνει το βάρος των ενηλίκων, με τις υψηλότερες δόσεις νικοτίνης να επιτυγχάνουν ισχυρότερα αποτελέσματα (Velazquez-Ulloa, 2017).

Επιπλέον, η μελέτη μας δείχνει ότι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου (25% και 50% CSE) η έκθεση σε καπνό τσιγάρου μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του μήκους της κνήμης των μυγών. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι, το προγεννητικό άτμισμα νικοτίνης προκαλεί μείωση του βάρους και του μέσου μήκους του σώματος των μυγών σε σύγκριση με τις μύγες της ομάδας ελέγχου (El-Merhie et al., 2021b). Η μείωση αυτή συσχετίστηκε με την αραίωση των θρεπτικών συστατικών στο media που περιείχε μεγαλύτερο ποσοστό εκχυλίσματος καπνού σε σχέση με το απλό media. Σε φτωχά διατροφικά περιβάλλοντα, οι προνύμφες *D. melanogaster* αναπτύσσονται αργά και επιτυγχάνουν μικρότερο μέγεθος σώματος ενηλίκων (Koyama et al., 2021). Επίσης, έχει βρεθεί ότι, η αναλογία πρωτεΐνης/υδατάνθρακα στη δίαιτα των μυγών επηρεάζει το μέγεθος των μηρών. Οι μύγες που είχαν τραφεί με φτωχό σε θρεπτικά συστατικά φαγητό είχαν μικρότερους μηρούς (Rozas et al., 2020).

Οι μύγες προσελκύονται από ορισμένες χημικές ουσίες στην τροφή, ενώ απωθούνται από άλλες οι οποίες έχουν ενδείξεις που αντιπροσωπεύουν πιθανό κίνδυνο. Οι μύγες *D. melanogaster* μπορούν να αντιληφθούν τα συστατικά της τροφής μέσω της γεύσης και της όσφρησης και αποφεύγουν τις τροφές που δεν είναι αρκετά θρεπτικές. Όταν η τροφή τους είναι χαμηλή σε θρεπτικά συστατικά, οι μύγες παρουσιάζουν διάφορες στερεοτυπικές αλλαγές συμπεριφοράς οι οποίες αυξάνουν την ικανότητά τους να βρίσκουν νέες πηγές τροφής και τις καθιστούν πιο δεκτικές στην κατανάλωση επικίνδυνων για την υγεία τους τροφών. Γίνονται πιο δραστήριες, κοιμούνται λιγότερο και προσαρμόζουν τις αισθήσεις της όσφρησης και της γεύσης. Η αύξηση της κινητικότητας θεωρείται πως γίνεται για να αυξηθούν οι πιθανότητες να βρουν μια πιο

πλούσια σε θρεπτικά πηγή τροφής και η προσαρμογή της όσφρησης και της γεύσης καθιστά πιο πιθανό να προσελκυσθούνε από τροφές με ασθενείς οσμές (Koyama et al., 2021). Ταυτόχρονα, στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως η έκθεση των μυγών σε χαμηλές συγκεντρώσεις νικοτίνης συνδέεται με υπερκινητικότητα. (El-Merhie et al., 2021b). Τα ευρήματα των παραπάνω μελετών βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μας αναφορικά με τη σεξουαλική συμπεριφορά, καθώς οι μύγες που εκτέθηκαν σε 50% CSE φαίνεται να είχαν μια πιο έντονη δραστηριότητα και έκαναν περισσότερες απόπειρες για σεξουαλική επαφή από τις μύγες του control. Συγχρόνως, το μέγεθος του σώματος των αρσενικών στη *D. melanogaster* επηρεάζει την επιτυχία του ζευγαρώματος. Έχει αναφερθεί ότι τα μεγαλύτερα αρσενικά φλερτάρουν πιο έντονα και χρειάζονται λιγότερο χρόνο για να επιτύχουν το ζευγάρι. Επιπλέον, τα θηλυκά ανταποκρίνονται καλύτερα στα μεγαλύτερα αρσενικά καθώς είναι "καλύτεροι" τραγουδιστές, πιθανόν ως αποτέλεσμα του ότι έχουν μεγαλύτερα φτερά (Jagadeeshan et al., 2015). Στην παρούσα μελέτη, οι αρσενικές μύγες που εκτέθηκαν σε 50% CSE, είχαν όπως προαναφέρθηκε, μειωμένο βάρος και μέγεθος και ως εκ τούτου χρειάστηκαν περισσότερες προσπάθειες για να προσεγγίσουν το θηλυκό και να πραγματοποιήσουν σεξουαλική επαφή. Ωστόσο, είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι είχαν μεγαλύτερη επιτυχία στη διατήρηση της σεξουαλικής επαφής για περισσότερο από 10 λεπτά, καθώς και ότι περισσότερες μύγες είχαν σεξουαλική επαφή σε σύγκριση με τις μύγες του control.

Η επίδραση της έκθεσης του καπνού του τσιγάρου στη σεξουαλική συμπεριφορά της *Drosophila melanogaster* έχει μελετηθεί ελάχιστα. Η *D. melanogaster* αποτελεί ήδη ένα ισχυρό οργανισμό-μοντέλο για τη μελέτη των επιδράσεων των τοξικών ουσιών. Σε

συνδυασμό με τη μεγάλη γονιδιωματική της ομοιότητας με τον άνθρωπο, αξίζει να χρησιμοποιηθεί για μελλοντικές μελέτες της σεξουαλικής συμπεριφοράς καθώς θα μπορέσει να συμβάλει στη διερεύνηση των γονιδίων και των σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν στις επιπτώσεις του τσιγάρου που έχουν περιγραφεί.

5. Βιβλιογραφία

Peter Geiger, *Drosophila Melanogaster* and Mendelian Genetics,

<https://depts.washington.edu/cberglab/wordpress/outreach/an-introduction-to-fruit-flies/>, ημερομηνία πρόσβασης: 1/7/2021

<https://www.hse.ie/eng/about/who/tobaccocontrol/kf/>

Al-Odat, I., Chen, H., Chan, Y. L., Amgad, S., Wong, M. G., Gill, A., Pollock, C., & Saad, S. (2014). The impact of maternal cigarette smoke exposure in a rodent model on renal development in the offspring. *PLoS ONE*, *9*(7), 1–10.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103443>

Bergman, P., Seyedoleslami Esfahani, S., & Engström, Y. (2017). *Drosophila* as a Model for Human Diseases—Focus on Innate Immunity in Barrier Epithelia. *Current Topics in Developmental Biology*, *121*, 29–81.

<https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.07.002>

Carreira, V. P., Mensch, J., & Fanara, J. J. (2009). *Body size in Drosophila : genetic architecture , allometries and sexual dimorphism*. 246–256.

<https://doi.org/10.1038/hdy.2008.117>

Demir, E., & Dickson, B. J. (2005). fruitless splicing specifies male courtship behavior in *Drosophila*. *Cell*, *121*(5), 785–794. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.027>

Doust, A. N., Devos, K. M., Gadberry, M. D., Gale, M. D., Kellogg, E. A., Raven, P. H.,
Doust, A. N., Devos, K. M., Gadberry, M. D., Galet, M. D., & Kellogg, E. A. (2017). *Linked references are available on JSTOR for this article : Genetic control of branching in foxtail millet*. *101*(24), 9045–9050.

El-Merhie, N., Krüger, A., Uliczka, K., Papenmeier, S., Roeder, T., Rabe, K. F., Wagner, C., Angstmann, H., & Krauss-Etschmann, S. (2021a). Sex dependent effect of maternal e-nicotine on F1 *Drosophila* development and airways. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–

14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81607-8>

El-Merhie, N., Krüger, A., Uliczka, K., Papenmeier, S., Roeder, T., Rabe, K. F., Wagner, C., Angstmann, H., & Krauss-Etschmann, S. (2021b). Sex dependent effect of maternal e-nicotine on F1 *Drosophila* development and airways. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81607-8>

Fujiwara, M., Hamatake, Y., Arimoto, S., Okamoto, K., Suzuki, T., & Negishi, T. (2011). Exposure to cigarette smoke increases urate level and decreases glutathione level in larval *Drosophila melanogaster*. *Genes and Environment*, *33*(3), 89–95. <https://doi.org/10.3123/jemsge.33.89>

Grubbs, N., Leach, M., Su, X., Petrisko, T., Rosario, J. B., & Mahaffey, J. W. (2013). *New Components of Drosophila Leg Development Identified through Genome Wide Association Studies*. *8*(4), 21–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060261>

Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuenta, A. M., & Roberts, D. M. (2015). Genetics on the fly: A primer on the *drosophila* model system. *Genetics*, *201*(3), 815–842. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.183392>

Hammer, B., Wagner, C., Divac Rankov, A., Reuter, S., Bartel, S., Hylkema, M. N., Krüger, A., Svanes, C., & Krauss-Etschmann, S. (2018). In utero exposure to cigarette smoke and effects across generations: A conference of animals on asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, *48*(11), 1378–1390. <https://doi.org/10.1111/cea.13283>

Harte, C. B., & Meston, C. M. (n.d.). *The Inhibitory Effects of Nicotine on Physiological Sexual Arousal in Nonsmoking Women: Results from a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Cross-Over Trial*. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.00778.x>

Jagadeeshan, S., Shah, U., Chakrabarti, D., & Singh, R. S. (2015). Female choice or male sex drive? the advantages of male body size during mating in *drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, *10*(12), 1–12.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144672>

Kaufman, T. C. (2017). A Short History and Description of *Drosophila melanogaster* Classical Genetics. *Genetics*, 206(June), 665–689.

<http://www.genetics.org/content/genetics/206/2/665.full.pdf>

Kaun, K. R., Devineni, A. V., & Heberlein, U. (2012). *Drosophila melanogaster* as a model to study drug addiction. *Human Genetics*, 131(6), 959–975.

<https://doi.org/10.1007/s00439-012-1146-6>

Koyama, T., Texada, M. J., Halberg, K. A., & Rewitz, K. (2021). Metabolism and growth adaptation to environmental conditions in *Drosophila*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03547-2>

Li, X., Ishimoto, H., & Kamikouchi, A. (2018). Auditory experience controls the maturation of song discrimination and sexual response in *Drosophila*. *eLife*, 7, 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.34348>

Millett, C., Wen, L. M., Rissel, C., Smith, A., Richters, J., Grulich, A., de Visser, R., & Ming Wen, L. (2006). Smoking and erectile dysfunction: findings from a representative sample of Australian men. *Tobacco Control*, 15, 136–139.

<https://doi.org/10.1136/tc.2005.015545>

Morris, M., Shaw, A., Lambert, M., Perry, H. H., Lowenstein, E., Valenzuela, D., & Velazquez-Ulloa, N. A. (2018). Developmental nicotine exposure affects larval brain size and the adult dopaminergic system of *Drosophila melanogaster*. *BMC Developmental Biology*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12861-018-0172-6>

Ong, C., Yung, L. L., Cai, Y., Bay, B., & Baeg, G. (2014). *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. 5390, 1–8.

<https://doi.org/10.3109/17435390.2014.940405>

Ong, C., Yung, L. Y. L., Cai, Y., Bay, B. H., & Baeg, G. H. (2015). *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*, 9(3), 396–403.

<https://doi.org/10.3109/17435390.2014.940405>

Poças, G. M., Crosbie, A. E., & Mirth, C. K. (2020). When does diet matter ? The roles of larval and adult nutrition in regulating adult size traits in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, December 2019, 104051.

<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104051>

Prange, R., Thiedmann, M., Bhandari, A., Mishra, N., Sinha, A., Häsler, R., Rosenstiel, P., Uliczka, K., Wagner, C., Yildirim, A. önder, Fink, C., & Roeder, T. (2018). A *Drosophila* model of cigarette smoke induced COPD identifies Nrf2 signaling as an expedient target for intervention. *Aging*, 10(8), 2122–2135.

<https://doi.org/10.18632/aging.101536>

Sadiq, M. F. G., & Altaany, Z. N. (2014). Induction of complete and mosaic sex-linked recessive lethal mutations by cigarette smoke filtrate in *Drosophila melanogaster*. *Drug and Chemical Toxicology*, 37(2), 163–168.

<https://doi.org/10.3109/01480545.2013.834355>

Santalla, M., Pagola, L., Gómez, I., Balcazar, D., Valverde, C. A., & Ferrero, P. (2021). Smoking flies: Testing the effect of tobacco cigarettes on heart function of *Drosophila melanogaster*. *Biology Open*, 10(2), 1–12.

<https://doi.org/10.1242/bio.055004>

Tiwari, A. K., Pragya, P., Ravi Ram, K., & Chowdhuri, D. K. (2011). Environmental chemical mediated male reproductive toxicity: *Drosophila melanogaster* as an alternate animal model. *Theriogenology*, 76(2), 197–216.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.027>

Vecchio, G. (2015). A fruit fly in the nanoworld: Once again *Drosophila* contributes to environment and human health. *Nanotoxicology*, 9(2), 135–137.

<https://doi.org/10.3109/17435390.2014.911985>

Velazquez-Ulloa, N. A. (2017). A *Drosophila* model for developmental nicotine exposure.

