



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
“ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ”**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΩΜΑΤΟΣ ΖΕΒΡΑΦΙΣΗ ΜΕΤΑ ΤΗΝ
ΕΚΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΤΑ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΗ ΠΟΛΥ(3-
ΥΔΡΟΞΥΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ) ΚΑΙ ΠΟΛΥ(ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ
ΒΟΥΤΥΛΕΣΤΕΡΑ)**

**ΓΑΒΡΙΛΑ ΑΝΔΡΟΜΑΧΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ
2024**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΓΑΒΡΙΛΑ ΑΝΔΡΟΜΑΧΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

A.M.:1392

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Σταλίκας Κωνσταντίνος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σταλίκας Κωνσταντίνος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Λεονάρδος Ιωάννης

**Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών Και Τεχνολογιών, Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων**

Τάκης Παντελεήμων

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

2024

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο - ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.2 ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΗ	11
1.3 ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΑ	16
1.3.1 Ορισμός-Προέλευση	16
1.3.2 Τρόποι μεταφοράς – Παρουσία στο περιβάλλον	18
1.3.3 Επίδραση στο υδάτινο περιβάλλον	19
1.3.4 Επιπτώσεις μικροπλαστικών σε υδρόβιους οργανισμούς	20
1.3.4.1 Επιπτώσεις συμβατικών μικροπλαστικών	21
1.3.4.2 Επιπτώσεις βιομικροπλαστικών	23
1.3.5 Τοξικότητα μικροπλαστικών	25
1.4 ΠΟΛΥ(ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΣ ΒΟΥΤΥΛΕΣΤΕΡΑΣ) (PBS)	26
1.4.1 Σύνθεση	26
1.4.2 Ιδιότητες	27
1.4.3 Τρόποι αποδόμησης	28
1.4.4 Εφαρμογές	29
1.5 ΠΟΛΥ(3-ΥΔΡΟΞΥΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ) (PHB).....	31
1.5.1 Σύνθεση	31
1.5.2 Ιδιότητες	32
1.5.3 Τρόποι αποδόμησης	32
1.5.4 Εφαρμογές	33
1.6 ZEBRAFISH (Danio rerio)	34
1.6.1 Zebrafish ως πειραματικό μοντέλο	35
1.7 -ΟΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ (omics)	38
1.7.1 Μεταβολομική	39
1.7.2 Λήψη και Επεξεργασία δεδομένων σε μια μεταβολομική ανάλυση	42
1.7.2.1 Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση	46
1.7.2.2 Μονοπαραμετρική στατιστική ανάλυση	48
1.7.2.3 Ανάλυση μεταβολικών μονοπατιών	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	53
2.1 Ηθική.....	53
2.2 Αντιδραστήρια – Διαλύτες – Υλικά.....	53

2.3 Όργανα – Συσκευές	53
2.4 Πειραματικές Πορείες.....	54
2.4.1 Διατήρηση zebrafish	54
2.4.2 Έκθεση των zebrafish σε PBS	55
2.4.3 Έκθεση των zebrafish σε PHB	56
2.4.4 Εκχύλιση μεταβολιτών	56
2.4.5 Λήψη φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (1D)	57
2.4.6 Επεξεργασία δεδομένων.....	58
2.4.7 Στατιστική ανάλυση.....	58
2.4.8 Ανάλυση μεταβολικών μονοπατιών	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	61
3.1 Οπτική παρατήρηση κατά την έκθεση των zebrafish σε PBS, PHB και κατά τη συλλογή των οργάνων.....	61
3.2 Μελέτη του μεταβολώματος των εκτεθειμένων σε PBS zebrafish.....	63
3.3 Μελέτη του μεταβολώματος των εκτεθειμένων σε PHB zebrafish.	78
3.4 Ανάλυση μεταβολικών μονοπατιών.....	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	94
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	96
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	107
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	122

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

PET: τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο

PE: πολυαιθυλένιο

PP: πολυπροπυλένιο

PS: πολυστυρένιο

PCL: πολυκαπρολακτόνη

PBS: πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας)

PLA: πολυγαλακτικό οξύ

PHAs: πολυδροξυαλκανοϊκά οξέα

PHB: πολυ(3-υδροξυβουτυρικό οξύ)

ROS: δραστικές μορφές οξυγόνου

DNA: δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
NMR: φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
MS: φασματομετρία μάζας
LC: υγρή χρωματογραφία
GC: αέρια χρωματογραφία
BMRB: Biological Magnetic Resonance data Bank
PCA: Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών
PC1: πρώτη κύρια συνιστώσα
PC2: δεύτερη κύρια συνιστώσα
MeOH: μεθανόλη
CHCl₃: χλωροφόρμιο

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ – ΠΙΝΑΚΩΝ – ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1 : Διαχωρισμός βιοπολυμερών ανάλογα με την προέλευση τους.	12
ΕΙΚΟΝΑ 2 : Ταξινόμηση πολυμερών με βάση την προέλευση και τη βιοαποδομησιμότητα τους. Πηγή: Institute for Bioplastics and Biocomposites (IBB) and European Bioplastics (EUBP).....	13
ΕΙΚΟΝΑ 3: Παγκόσμια παραγωγική ικανότητα βιοπλαστικών για το 2022 και πρόβλεψη αυτής έως και το 2028. Πηγή : European Bioplastics, nova-Institute (2023)	13
ΕΙΚΟΝΑ 4: Απεικόνιση των ποσοστών παγκόσμιας παραγωγικής ικανότητας διάφορων βιοπλαστικών το 2023. Πηγή : European Bioplastics, nova-Institute (2023)	14
ΕΙΚΟΝΑ 5: Κύκλος ζωής κομποστοποιησίμων προϊόντων. (Πηγή: European Bioplastics)	15
ΕΙΚΟΝΑ 6: Πρωτογενή μικροπλαστικά με την μορφή μικροσφαιριδίων σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας. (Πηγή : https://www.beatthemicrobead.org/)	17
ΕΙΚΟΝΑ 7: Δευτερογενή μικροπλαστικά διαφόρων σχημάτων. (Πηγή: https://www.oceancare.org/)	17
ΕΙΚΟΝΑ 8: Τρόποι υποβάθμισης πολυμερών στο υδάτινο περιβάλλον [26].	18
ΕΙΚΟΝΑ 9: Παρουσία μικροπλαστικών στο περιβάλλον. (Πηγή: https://www.eea.europa.eu/)	19
ΕΙΚΟΝΑ 10: Ο συντακτικός τύπος του πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα) (PBS).	26
ΕΙΚΟΝΑ 11: Οι συντακτικοί τύποι των δομικών μονάδων (μονομερή) του PBS i. Ηλεκτρικό οξύ, ii. 1,4-βουτανοδιόλη	26
ΕΙΚΟΝΑ 12: Κάποιες από τις εφαρμογές του BioPBS™. (Πηγή: https://www.pttmcc.com/).....	30
ΕΙΚΟΝΑ 13: Ο συντακτικός τύπος του πολυ(3-υδροξυβουτυρικού οξέος) (PHB).	31
ΕΙΚΟΝΑ 14: Θηλυκό (πάνω) και αρσενικό (κάτω) zebrafish [115].	34
ΕΙΚΟΝΑ 15: Διάγραμμα του κεντρικού δόγματος της βιολογίας.	38
ΕΙΚΟΝΑ 16: Οι τέσσερις κύριες -ομικές τεχνικές.	39
ΕΙΚΟΝΑ 17: Βασικά βήματα κατά τη διεξαγωγή μη-στοχευμένης μεταβολικής ανάλυσης για μελέτη τοξικολογίας.	46
ΕΙΚΟΝΑ 18: Δεξαμενές με zebrafish που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.	55
ΕΙΚΟΝΑ 19: Έκθεση των zebrafish σε PBS και PHB, αντίστοιχα.	61
ΕΙΚΟΝΑ 20: Φωτογραφία i. των εσωτερικών οργάνων αρσενικού zebrafish, μετά από τομή ατόμου από την ομάδα ελέγχου, ii. του γαστρεντερικού σωλήνα, όπου δεξιά διακρίνεται η χοληδόχος κύστη, iii. σχηματικής αναπαράστασης των εσωτερικών οργάνων ενήλικου zebrafish [128].	62

ΕΙΚΟΝΑ 21: Φωτογραφίες των εσωτερικών οργάνων αρσενικών zebrafish, μετά από τομή ατόμων από την ομάδα έκθεσης σε PHB.	63
ΕΙΚΟΝΑ 22: Φάσματα ¹ H-NMR (1D) των δειγμάτων από την ομάδα ελέγχου (μπλε) και από την ομάδα έκθεσης (κόκκινα) σε PBS. Σύγκριση i) του δείγματος των βραγχίων από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης ii) του δείγματος των εγκεφάλων από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης iii) του δείγματος των γαστρεντερικών σωλήνων από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης iv) του δείγματος των ηπάτων από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης v) του δείγματος των σαρκών από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης vi) του δείγματος των γονάδων από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης.	65
ΕΙΚΟΝΑ 23: Φάσματα ¹ H-NMR (1D) των δειγμάτων από την ομάδα ελέγχου (μπλε) και από την ομάδα έκθεσης (κόκκινα) σε PHB. Σύγκριση i) του δείγματος των βραγχίων από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης ii) του δείγματος των εγκεφάλων από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης iii) του δείγματος των γαστρεντερικών σωλήνων από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης iv) του δείγματος των ηπάτων από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης v) του δείγματος των σαρκών από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης.	80
 ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Ιδιότητες PBS σε σύγκριση με αυτές του βιοπολυμερούς PLA και του συμβατικού πλαστικού PP [91].	28
ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Ιδιότητες PHB σε σύγκριση με PLA, PBS, PP [9], [105].	32
ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Βασικές διαφορές των δύο προσεγγίσεων της μεταβολικής ανάλυσης [133].	42
ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Σύγκριση NMR-MS [133], [134], [143].	44
ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Λίστα των μεταβολιτών που προσδιορίστηκαν σε κάθε φάσμα.	66
ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Μεταβολίτες που μελετήθηκαν με μονοπαραμετρική ανάλυση και οι αντίστοιχες τιμές p.	77
ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Λίστα των μεταβολιτών που προσδιορίστηκαν σε κάθε φάσμα.	81
ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Μεταβολίτες που μελετήθηκαν με μονοπαραμετρική ανάλυση και οι αντίστοιχες τιμές p.	91
ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Τα μεταβολικά μονοπάτια που προέκυψαν από την ανάλυση με τιμές p <0.05, καθώς και οι ευρεθέντες μεταβολίτες στο καθένα.	93
 ΠΙΝΑΚΑΣ Π1: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα βραγχίων από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PBS, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).	107
ΠΙΝΑΚΑΣ Π2: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα εγκεφάλων από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PBS, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).	108
ΠΙΝΑΚΑΣ Π3: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα γαστρεντερικών σωλήνων από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PBS, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη)	110
ΠΙΝΑΚΑΣ Π4: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα ηπάτων από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PBS, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).	112

ΠΙΝΑΚΑΣ Π5: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα σαρκών από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PBS, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).....	113
ΠΙΝΑΚΑΣ Π6: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα γονάδων από τα θηλυκά άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PBS, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).	114
ΠΙΝΑΚΑΣ Π7: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα βραγχίων από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PHB, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).....	116
ΠΙΝΑΚΑΣ Π8: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα γαστρεντερικών σωλήνων από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PHB, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).	117
ΠΙΝΑΚΑΣ Π9: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα ηπατών από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PHB, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).....	119
ΠΙΝΑΚΑΣ Π10: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα εγκεφάλων από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PHB, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).....	120

ΣΧΗΜΑ 1: Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνιστωσών δύο διαστάσεων που απεικονίζει την κατανομή των δεδομένων για κάθε ιστό από τις ομάδες ελέγχου και έκθεσης σε PBS. Τα κόκκινα σημεία παριστάνουν τα διαφορετικά δείγματα ιστών από την ομάδα ελέγχου, ενώ τα πράσινα σημεία τα διαφορετικά δείγματα ιστών από την ομάδα έκθεσης σε PBS.	68
ΣΧΗΜΑ 2: Θηκογράμματα των 24 μεταβολιτών, που μελετήθηκαν, για την ομάδα ελέγχου και την ομάδα έκθεσης σε PBS και οι αντίστοιχες τιμές p , όπως προέκυψαν από τη μονοπαραμετρική ανάλυση. Αριστερά σε κάθε σχήμα φαίνεται η διασπορά των ατόμων ελέγχου και δεξιά των ατόμων έκθεσης σε PBS.	76
ΣΧΗΜΑ 3: Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνιστωσών δύο διαστάσεων που απεικονίζει την κατανομή των δεδομένων για κάθε ιστό από τις ομάδες ελέγχου και έκθεσης σε PHB. Τα κόκκινα σημεία παριστάνουν τα διαφορετικά δείγματα ιστών από την ομάδα ελέγχου, ενώ τα πράσινα σημεία τα διαφορετικά δείγματα ιστών από την ομάδα έκθεσης σε PHB.....	83
ΣΧΗΜΑ 4: Θηκογράμματα των 24 μεταβολιτών, που μελετήθηκαν, για την ομάδα ελέγχου και την ομάδα έκθεσης σε PHB και οι αντίστοιχες τιμές p , όπως προέκυψαν από τη μονοπαραμετρική ανάλυση. Αριστερά σε κάθε σχήμα φαίνεται η διασπορά των ατόμων ελέγχου και δεξιά των ατόμων έκθεσης σε PHB.....	90

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών του Τμήματος Χημείας με ειδίκευση <<Αναλυτική Χημεία, Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος και Τροφίμων>>, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κωνσταντίνου Σταλικά κατά την περίοδο 2021-2023.

Σε αυτό το σημείο αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους που συνέβαλαν καταλυτικά στην υλοποίηση της. Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Κωνσταντίνο Σταλικά, για την ευκαιρία συμμετοχής στην ερευνητική του ομάδα και την ανάθεση αυτού του θέματος. Οι πολύτιμες συμβουλές του, η συνεχής καθοδήγηση και υποστήριξη του συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας έρευνας και αποτέλεσαν για εμένα κινητήριο δύναμη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον κ. Ιωάννη Λεονάρδο για την πρόσβαση στους χώρους των εργαστηρίων του, όπου διεξήχθη μέρος του πειράματος, αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια του ίδιου στη διεξαγωγή των πειραμάτων. Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στον κ. Παντελεήμων Τάκη για την ουσιαστική και καθοριστική καθοδήγηση και βοήθεια του στην ολοκλήρωση της έρευνας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω, τόσο τον κ. Ιωάννη Λεονάρδο, όσο και κ. Παντελεήμων Τάκη, για την αποδοχή συμμετοχής στην εξεταστική επιτροπή και το χρόνο που αφιέρωσαν.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Θεόδωρο Χατζημητάκο για τη βοήθεια που μου προσέφερε, καθώς και τις υποψήφιες διδάκτορες Φωτεινή Μπάρκα και Κατερίνα Θεμελή για την καθοδήγηση και φιλική συνεργασία. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Τσιαφούλη, υπεύθυνο του κέντρου πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και τον κ. Αναστάσιο Τρογκάνη για τη βοήθεια τους.

Ξεχωριστά ευχαριστώ τον κ. Μάμαντο Προδρομίδα και την ερευνητική του ομάδα για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τον Άλκη, τον Γιάννη, την Ελευθερία, την Καλλιρρόη και την Ιωάννα, για την όμορφη συνεργασία και τις στιγμές που μοιραστήκαμε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για τη διαρκή στήριξη και κατανόηση που μου προσέφεραν όλο αυτό το διάστημα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο - ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα πολυμερή είναι μακρομόρια υψηλού μοριακού βάρους τα οποία δημιουργούνται από τη σύνδεση, μέσω ομοιοπολικών δεσμών, δομικών μονάδων που ονομάζονται μονομερή. Έχουν καταστεί αναγκαία ως υλικά για την παραγωγή πληθώρας προϊόντων καθημερινής χρήσης και έχουν καθοριστικό ρόλο στην άνεση και διευκόλυνση της ανθρώπινης ζωής (επικοινωνία, μεταφορά, ένδυση, κτίρια, αυτοκινητόδρομοι, φάρμακα, ιατρική) [1]. Τα πολυμερή, που προέρχονται κυρίως από ορυκτούς πόρους, χρησιμοποιούνται σήμερα για την παραγωγή ενός ευρέος φάσματος προϊόντων, εξαιτίας των μηχανικών και θερμικών ιδιοτήτων τους, κυρίως της ανθεκτικότητας και της αντίστασης τους στα διάφορα είδη διάβρωσης, αλλά και λόγω της χαμηλής τους τιμής [2]. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πλαστικά είναι το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), η πολυουρεθάνη (PU), το πολυστυρένιο (PS), το πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC), το πολυπροπυλένιο (PP), το πολυαιθυλένιο (PE) και το πολυαμίδιο (PA) [3]. Η εξάπλωση της παραγωγής πλαστικών αποτελεί σοβαρή πηγή ρύπανσης του περιβάλλοντος, με την παγκόσμια παραγωγή να αγγίζει εκατομμύρια τόνους ετησίως και σε σύντομο χρονικό διάστημα απορρίπτονται στο περιβάλλον περίπου τα μισά εξ' αυτών [4]. Λόγω του ευρέος φάσματος ιδιοτήτων τους, είναι πανταχού παρόντα στην καθημερινή ζωή, με αποτέλεσμα μεγάλος όγκος απορριμμάτων να οφείλεται σε αυτά [1]. Επιπλέον, η χρήση για εφαρμογές μικρής διάρκειας, όπως συσκευασίες προϊόντων και τροφίμων, έχει συμβάλλει τα τελευταία χρόνια στο σημαντικό πρόβλημα της ρύπανσης του περιβάλλοντος και της έλλειψης χώρου απόρριψής τους. Η απόρριψη πλαστικών συμβάλλει στην εκπομπή μεγάλων ποσοτήτων επιβλαβών αερίων για το περιβάλλον, όπως του διοξειδίου του άνθρακα, γεγονός που συμβάλλει στην υπερθέρμανση του πλανήτη. Ακόμη, τα πλαστικά είναι πολύ ανθεκτικά και επομένως παραμένουν στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την απόρριψή τους, ιδιαίτερα εάν προστατεύονται από το άμεσο ηλιακό φως σε χώρους υγειονομικής ταφής [5].

Η επιτακτική προσπάθεια για προστασία του περιβάλλοντος, αλλά και η εξάντληση των ορυκτών πόρων έχει οδηγήσει στην αξιοποίηση βιοπολυμερών, δηλαδή πολυμερών από ανανεώσιμους πόρους και πολυμερών που μπορούν να αποδομηθούν φυσικά. Έτσι, τα

τελευταία χρόνια αυξάνεται το ενδιαφέρον για την αξιοποίηση βιομάζας ως πρώτη ύλη για την παραγωγή των μονομερών τους, λόγω της αφθονίας της και της δυνατότητας ανανέωσης της. Επιπρόσθετα, τα βιοαποδομήσιμα πολυμερή μπορούν να αποτελέσουν μια εναλλακτική λύση έναντι των συμβατικών μη βιοαποδομήσιμων, συμβάλλοντας μερικώς στη βελτίωση του προβλήματος. Η βιοαποδόμηση αποτελεί ικανοποιητική λύση ιδιαίτερα για εύκολα υδρολυόμενα πολυμερή, όπως οι αλειφατικοί εστέρες, χρήζει όμως προσοχής το γεγονός ότι πρέπει να πραγματοποιείται σε ελεγχόμενες συνθήκες για να διασφαλιστεί η πλήρης απομάκρυνση χωρίς ανεξέλεγκτες παρενέργειες, όπως διαρροή ρύπων ή σχηματισμός μικροπλαστικών [6].

Τα πλαστικά, ως πανταχού παρόντες ανθρωπογενείς ρύποι, κατακερματίζονται σε μικρότερα κομμάτια (μικροπλαστικά) με την πάροδο του χρόνου, τα οποία διασκορπίζονται γρήγορα στο έδαφος και στο υδάτινο περιβάλλον [7]. Το 2015, περίπου 79% των πλαστικών απορριμμάτων παγκοσμίως κατέληξαν σε χωματερές ή ως απόβλητα στο περιβάλλον, με το υδάτινο περιβάλλον να δέχεται ~11 % του πλαστικού που απορρίπτεται παγκοσμίως [8]. Εκτιμάται ότι περίπου 12 δισεκατομμύρια τόνοι πλαστικών απορριμμάτων θα βρίσκονται σε χώρους υγειονομικής ταφής μέχρι το 2050, ενώ μεγάλη ποσότητα αυτών θα καταλήξει στους ωκεανούς παράγοντας υψηλά επίπεδα μικροπλαστικών [9]. Την τελευταία δεκαετία, οι μελέτες επίδρασης των μικροπλαστικών στους θαλάσσιους οργανισμούς έχουν αυξηθεί ραγδαία, επιβεβαιώνοντας ότι η περιβαλλοντική απειλή των πλαστικών είναι σημαντική για τα θαλάσσια ζώα και έχει τραβήξει ιδιαίτερα την προσοχή [10], ενώ λιγότερες είναι αυτές που εστιάζουν σε οργανισμούς του γλυκού νερού [11]. Οι περιβαλλοντικές μεταβολομικές μελέτες τυγχάνουν αυξανόμενης προσοχής, με πολλούς ερευνητές να έχουν δείξει ενδιαφέρον για την αξιολόγηση του κινδύνου, μελετώντας την τοξικότητα αυτών των ρύπων σε διάφορους τύπους οργανισμών [12].

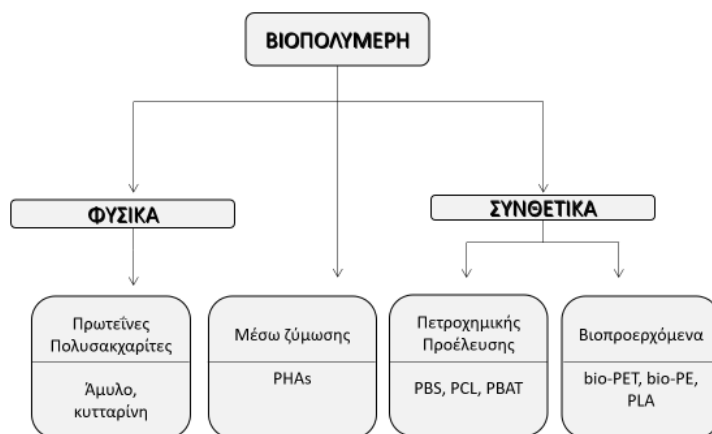
1.2 ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΗ

Τα πολυμερή μπορούν να καταταχθούν ανάλογα με την προέλευση και τη δυνατότητα βιοαποδόμησης τους. Με βάση αυτά τα κριτήρια προκύπτουν οι παρακάτω κατηγορίες :

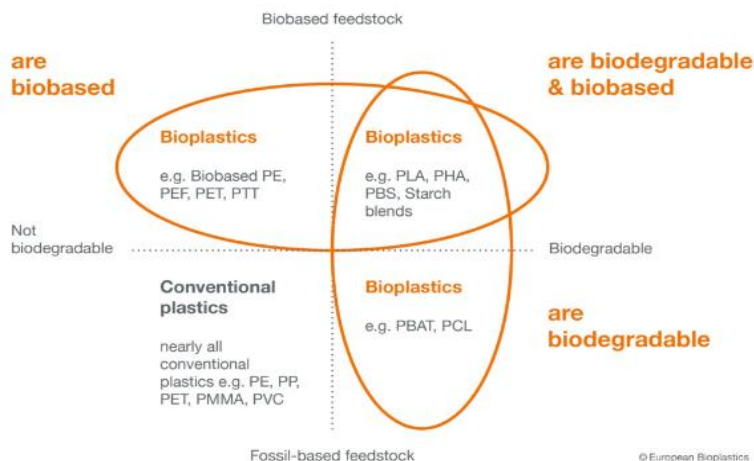
- ο τα φυσικά πολυμερή, όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες,

- ο τα λεγόμενα συμβατικά πολυμερή που προέρχονται από ορυκτούς πόρους και δεν είναι βιοαποδομήσιμα, όπως το PP και το PET,
- ο πολυμερή που προέρχονται από ορυκτούς πόρους και είναι βιοποδομήσιμα, όπως ο πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (PBS), η πολυκαπρολακτόνη (PCL), η πολυβινυλική αλκοόλη (PVA) και το τερεφθαλικό αδιπικό πολυβουτυλένιο (PBAT),
- ο πολυμερή που προέρχονται από βιομάζα, αλλά δε βιοαποδομούνται, όπως το βιοπροερχόμενο πολυαιθυλένιο (bio-PE) και το βιοπροερχόμενο τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (bio-PET). Τα πολυμερή αυτά είναι χημικά πανομοιότυπα με τα αντίστοιχα συμβατικά, αλλά προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες και ονομάζονται drop-ins.
- ο πολυμερή που είναι βιοπροερχόμενα και βιοαποδομήσιμα, όπως το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) και τα πολυυδροξυαλκανοϊκά οξέα (PHAs) [13],[14]

Βιοπολυμερή χαρακτηρίζονται τα πολυμερή που παράγονται πλήρως ή εν μέρει από φυσικές ανανεώσιμες πρώτες ύλες και μπορεί να είναι ή όχι βιοαποδομήσιμα και τα πολυμερή από ορυκτούς πόρους που είναι όμως βιοαποδομήσιμα (ΕΙΚΟΝΑ 1, 2). Έτσι, κριτήριο για το χαρακτηρισμό ενός πολυμερούς ως βιοπολυμερές είναι, είτε να είναι βιοπροερχόμενο, είτε βιοαποδομήσιμο [13].

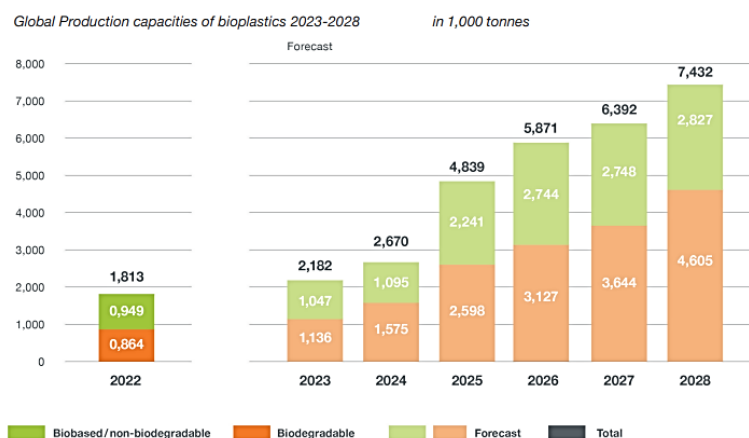


ΕΙΚΟΝΑ 1 : Διαχωρισμός βιοπολυμερών ανάλογα με την προέλευση τους.



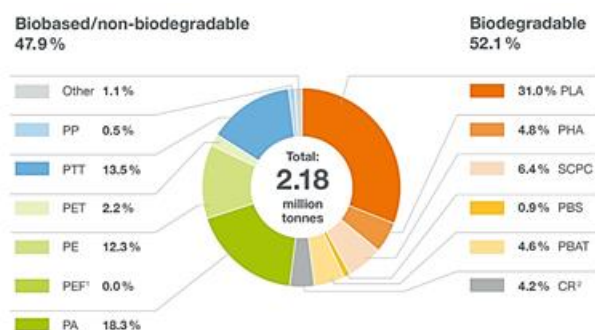
ΕΙΚΟΝΑ 2 : Ταξινόμηση πολυμερών με βάση την προέλευση και τη βιοαποδομησιμότητά τους. Πηγή: Institute for Bioplastics and Biocomposites (IBB) and European Bioplastics (EUBP)

Η παραγωγή βιοπλαστικών είναι μικρή σε σύγκριση με αυτή στην κοινή βιομηχανία πλαστικών. Η παγκόσμια παραγωγή πλαστικών για το 2022 ήταν περίπου 400 εκατομμύρια τόνοι, ενώ σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα της αγοράς, που συγκεντρώθηκαν από την European Bioplastics σε συνεργασία με το nova-Institute, η παγκόσμια παραγωγική ικανότητα βιοπλαστικών ήταν περίπου 1,8 εκατομμύρια τόνους το 2022 και αναμένεται να αυξηθεί σε περίπου 6,4 εκατομμύρια τόνους το 2027 (ΕΙΚΟΝΑ 3, 4) [15].



ΕΙΚΟΝΑ 3: Παγκόσμια παραγωγική ικανότητα βιοπλαστικών για το 2022 και πρόβλεψη αυτής έως και το 2028. Πηγή : European Bioplastics, nova-Institute (2023)

Στην Ευρώπη για το 2022 η παραγωγή πλαστικών άγγιξε τους 59 εκατομμύρια τόνους, με μόνο 400.000 τόνους να αντιστοιχούν σε βιοπλαστικά και εξ' αυτών το 50% παράγεται στην Γερμανία [16]. Σήμερα, τα βιοπλαστικά μπορούν να βρεθούν σε συσκευασίες, σε είδη μιας χρήσης, σε ηλεκτρονικά είδη, ως ίνες σε μη υφασμένα υφάσματα, σε εφαρμογές στην αυτοκινητοβιομηχανία και στη γεωργία. Η αξιοποίηση τους για εφαρμογή σε συσκευασίες κατέχει το μεγαλύτερο τμήμα της αγοράς, περίπου 43% επί του συνόλου, σύμφωνα με δεδομένα του 2023 [15].



ΕΙΚΟΝΑ 4: Απεικόνιση των ποσοστών παγκόσμιας παραγωγικής ικανότητας διάφορων βιοπλαστικών το 2023.
Πηγή : European Bioplastics, nova-Institute (2023)

Τα βιοπολυμερή συμβάλλουν στην υιοθέτηση εμπορικά βιώσιμων κύκλων ζωής των πλαστικών ως μέρος μιας κυκλικής οικονομίας. Η επαναχρησιμοποίηση, η ανακύκλωση και η βιοαποδόμηση κυριαρχούν στους κύκλους ζωής των υλικών [13]. Βιοαποδομήσιμα χαρακτηρίζονται τα πολυμερή των οποίων είναι δυνατή η διάσπαση της πολυμερικής αλυσίδας σε φυσικές ουσίες, λόγω της δράσης μικροοργανισμών. Τελικά προϊόντα της αποδόμησης των πολυμερών είναι διοξείδιο του άνθρακα, νερό, ανόργανα συστατικά και βιομάζα, υπό αερόβιες συνθήκες ή διοξείδιο του άνθρακα, μεθάνιο, νερό, ανόργανα συστατικά και βιομάζα, υπό αναερόβιες συνθήκες. Σημαντικό ρόλο στο ρυθμό αποδόμησης διαδραματίζουν η σύσταση και οι ιδιότητες του πολυμερούς (πάχος, υδροφοβικότητα, μοριακό βάρος, κρυσταλλικότητα), το περιβάλλον, καθώς και η ύπαρξη κατάλληλων συνθηκών σε αυτό, όπως θερμοκρασία, υγρασία, διαθεσιμότητα οξυγόνου, μικροοργανισμοί, παρουσία ηλιακής ακτινοβολίας [17], [18].

Ο όρος ‘βιοαποδόμηση’ δεν προσδιορίζει το περιβάλλον στο οποίο θα συμβεί, με αποτέλεσμα να δημιουργεί λανθασμένες υποθέσεις για την ασφαλή διάθεση και επαρκή απομάκρυνση πολυμερών, τα οποία δεν αποδομούνται εύκολα στο περιβάλλον [19]. Η βιοαποδόμηση σε

φυσικό περιβάλλον, όπως το θαλάσσιο, απαιτεί περισσότερη έρευνα και είναι δύσκολη η θέσπιση προτύπων και πιστοποιήσεων, λόγω των δυναμικών συνθηκών που επικρατούν στη φύση [13], [20]. Ο ρυθμός βιοαποδόμησης εξαρτάται άρρηκτα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται διαφορετικές συμπεριφορές και ρυθμοί υποβάθμισης [21]. Σύμφωνα με τα Ευρωπαϊκά πρότυπα για να χαρακτηριστεί ένα υλικό ως βιοαποδομήσιμο απαιτείται το 90% αυτού να βιοαποδομείται πλήρως εντός σύντομου χρονικού διαστήματος (3 μήνες έως 2 χρόνια). Ωστόσο, τέτοιοι υψηλοί βαθμοί αποδόμησης φαίνεται να επιτυγχάνονται μόνο υπό βέλτιστες βιομηχανικές/εργαστηριακές συνθήκες (pH, θερμοκρασία, υγρασία) και ειδικά σε θαλάσσιες συνθήκες, πολλά βιοπλαστικά έχουν δείξει χαμηλή βιοαποδομησιμότητα [22]. Επιπλέον, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι τα μείγματα πολυμερών, που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη επιθυμητών ιδιοτήτων, πιθανά θα παρουσιάζουν διαφορετική συμπεριφορά αποδόμησης από τα αντίστοιχα ομοπολυμερή [23]. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει αναγνωρισμένη μέθοδος πιστοποίησης του χρόνου ή των συνθηκών που απαιτούνται για τη διάσπαση ενός βιοπλαστικού στη φύση, ενώ έχουν εκδοθεί πρότυπα ελέγχου για την τεκμηρίωση της δυνατότητας βιοαποδόμησης [24]. Όταν ένα πολυμερές υφίσταται βιοαποδόμηση υπό συγκεκριμένες, ελεγχόμενες συνθήκες, σε αερόβιο περιβάλλον, σε βιομηχανικές εγκαταστάσεις κομποστοποίησης, χωρίς να αφήνει τοξικά κατάλοιπα και συμμορφώνεται με συγκεκριμένα διεθνή πρότυπα ονομάζεται κομποστοποιήσιμο [13]. Τα κομποστοποιήσιμα υλικά μπορούν να βιοαποδομηθούν γρήγορα (3-6 μήνες), αλλά δεν είναι όλα τα βιοαποδομήσιμα υλικά και κομποστοποιήσιμα. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή βιοαερίου, υπό αναερόβιες συνθήκες (ΕΙΚΟΝΑ 5).



ΕΙΚΟΝΑ 5: Κύκλος ζωής κομποστοποιήσιμων προϊόντων. (Πηγή: European Bioplastics)

Τα βιοπλαστικά γενικά συνδέονται με την έννοια της βιωσιμότητας, όμως η παρανόηση ότι είναι όλα βιοαποδομήσιμα ή ότι δεν έχουν καμία βλαβερή επίδραση στο περιβάλλον δημιουργεί την εντύπωση ότι οποιαδήποτε χρήση τους είναι φιλική για το περιβάλλον. Θα πρέπει να διευκρινιστεί ο ορισμός των βιοπλαστικών, να τονιστεί η διαφορά του κομποστοποιήσιμου προϊόντος και η αβεβαιότητα σχετικά με τη βιοαποδόμηση σε διαφορετικά περιβάλλοντα και να γνωστοποιηθούν οι τρόποι απόρριψής τους, ώστε να μην επιμολύνουν τις ροές ανακύκλωσης και τους χώρους υγειονομικής ταφής συμβάλλοντας στην επιδείνωση του προβλήματος [13].

1.3 ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΑ

Η ρύπανση από μικροπλαστικά αποτελεί ένα παγκόσμιο περιβαλλοντικό πρόβλημα, με την παρουσία τους σε υδάτινους βιότοπους να είναι έντονη και τις πιο απαισιόδοξες προβλέψεις να αναφέρουν ότι εάν δε ληφθούν άμεσα μέτρα η ποσότητα τους (κατά βάρος) θα ξεπεράσει αυτή των ψαριών μέχρι το 2050 [25]. Η παρουσία τους έχει αναφερθεί από τη δεκαετία του 1970, ωστόσο από το 2000 και έπειτα απασχόλησαν περισσότερο την επιστημονική κοινότητα και ο όρος ‘μικροπλαστικό’ εισήχθη το 2004 [26], [27]. Έχουν αποκτήσει αυξανόμενο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, λόγω της μεγάλης τους ποσότητας, αλλά και εξαιτίας της δυνατότητας τους να εισέρχονται στους ζωντανούς οργανισμούς. Παρά την ευρεία διασπορά στο υδάτινο περιβάλλον η επίδρασή τους σε αυτό δεν έχει εκτιμηθεί επαρκώς, καθώς δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως η συμπεριφορά τους και δεν υπάρχουν τυποποιημένες μέθοδοι δειγματοληψίας, ταυτοποίησης ή ποσοτικού προσδιορισμού μικροπλαστικών [28]–[31].

1.3.1 Ορισμός-Προέλευση

Ως μικροπλαστικά ορίζονται τα κομμάτια πλαστικού, μεγέθους μικρότερου από 5 mm και έχουν αναγνωριστεί ως αναδυόμενοι ρύποι στο υδάτινο και στο χερσαίο περιβάλλον [11], [30]. Διακρίνονται, ανάλογα με την προέλευσή τους, σε δύο κατηγορίες: στα πρωτογενή και στα δευτερογενή μικροπλαστικά. Στα πρωτογενή συγκαταλέγονται αυτά που απελευθερώνονται άμεσα στο περιβάλλον και εκτιμάται ότι αποτελούν περίπου το 15-30% των μικροπλαστικών στους ωκεανούς. Χρησιμοποιούνται, είτε ως πρώτη ύλη στις βιομηχανίες παραγωγής πλαστικών ειδών, είτε ως συστατικά σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας (EIKONA 6). Στα

δευτερογενή ανήκουν αυτά που προέρχονται από την υποβάθμιση και τη διάβρωση μεγαλύτερων πλαστικών και εκτιμάται ότι αποτελούν το 70-85% των μικροπλαστικών που υπάρχουν στους ωκεανούς (ΕΙΚΟΝΑ 7) [25]. Στο περιβάλλον εντοπίζονται σε διάφορα σχήματα και μεγέθη με συνηθέστερα, τα σφαιρίδια, τα ακανόνιστα θραύσματα και τις ίνες [32]. Κάθε χρόνο περίπου 145.000 τόνοι πρωτογενών μικροπλαστικών εκτιμάται ότι χρησιμοποιούνται, εκ των οποίων περίπου 42.000 τόνοι καταλήγουν στο περιβάλλον, ενώ η εκτιμώμενη ποσότητα δευτερογενών μικροπλαστικών που καταλήγει στα ευρωπαϊκά επιφανειακά ύδατα ετησίως είναι περίπου 176.000 τόνοι. (<https://www.echa.europa.eu/>) Θεωρητικά, από μία μόνο πλαστική σακούλα μπορεί να προκύψουν εκατομμύρια μικροπλαστικά [33].



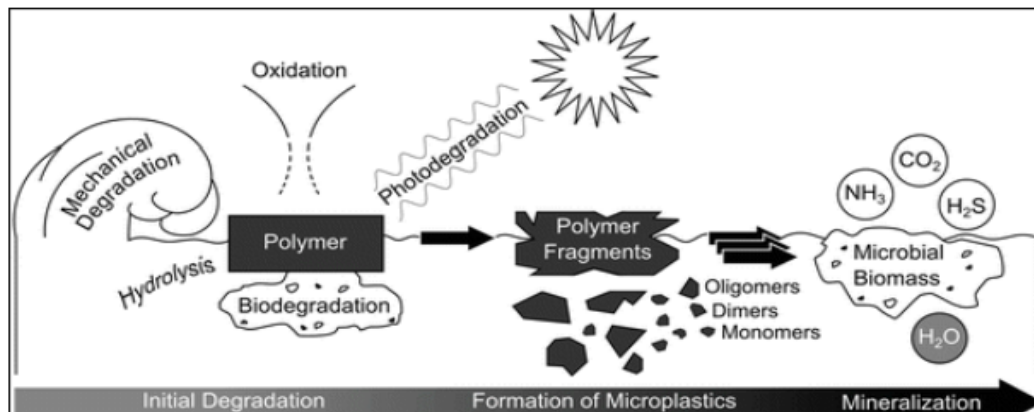
ΕΙΚΟΝΑ 6: Πρωτογενή μικροπλαστικά με την μορφή μικροσφαιριδίων σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας. (Πηγή : <https://www.beatthemicrobead.org/>)



ΕΙΚΟΝΑ 7: Δευτερογενή μικροπλαστικά διαφόρων σχημάτων. (Πηγή: <https://www.oceancare.org/>)

Οι μηχανισμοί αποδόμησης των βιοπλαστικών χωρίζονται σε βιοτικούς, λόγω δράσης μικροοργανισμών και αβιοτικούς, όπως φυσική τριβή, υδρόλυση, οξείδωση και φωτο-αποδόμηση [14]. Οι σημαντικότερες διεργασίες αποδόμησης των πλαστικών, που οδηγούν στη δημιουργία μικροπλαστικών στο περιβάλλον, είναι η φωτο-οξείδωση που οφείλεται στη δράση

του ακτινοβολίας UV παρουσία οξυγόνου, η θερμική αποδόμηση (θερμο-οξειδωση) που προκαλείται από αυξημένη θερμοκρασία παρουσία οξυγόνου, η υδρολυτική αποδόμηση, ο μηχανικός κατακερματισμός, λόγω της επίδρασης αναταράξεων που προκαλούνται από κύματα, ρεύματα, αέρα και τριβής με το έδαφος και η βιο-αποδόμηση που αποδίδεται στη δράση μικροοργανισμών (ΕΙΚΟΝΑ 8). Όλες αυτές οι διεργασίες υποβαθμίζουν τις μηχανικές ιδιότητες, καθιστούν τα πλαστικά εύθραυστα, ελαττώνοντας την ανθεκτικότητα τους και συμβάλλοντας σε κατακερματισμό σε όλο και πιο μικρά κομμάτια. Η φωτο-αποδόμηση θεωρείται η αρχική αιτία αποδόμησης σε συνθήκες περιβάλλοντος, με το ρυθμό φωτο-οξειδωσης να είναι γρηγορότερος σε σχέση με των άλλων διαδικασιών [34]. Στο υδάτινο περιβάλλον, η αποδόμηση είναι πιο αργή σε σχέση με τη ξηρά, λόγω χαμηλότερης συγκέντρωσης οξυγόνου, θερμοκρασίας και έκθεσης σε ηλιακή ακτινοβολία, ενώ και η μικροβιακή δραστηριότητα είναι συνήθως χαμηλότερη σε σχέση με το έδαφος [26], [8]. Για την παρακολούθηση και εξαγωγή συμπερασμάτων της αποδόμησης των πλαστικών κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση των υποθαλάσσιων συνθηκών σε αυτά [34].

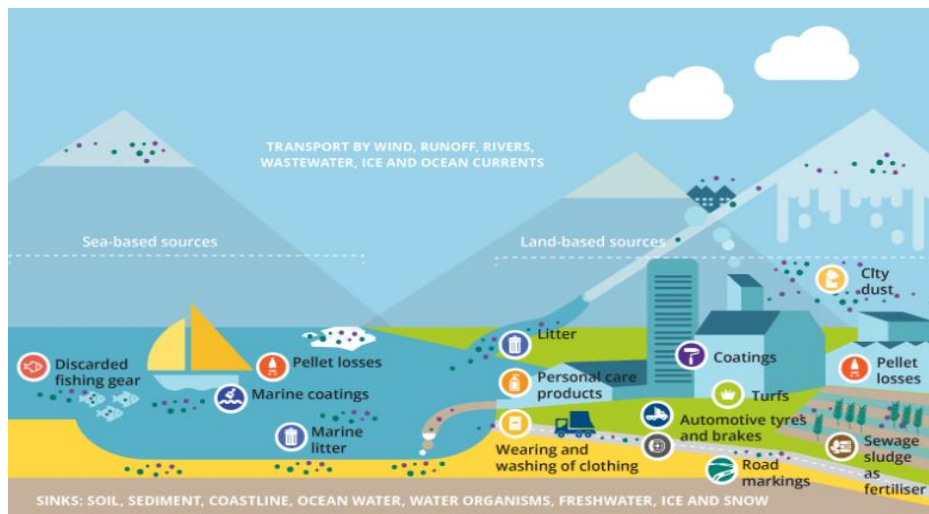


ΕΙΚΟΝΑ 8: Τρόποι υποβάθμισης πολυμερών στο υδάτινο περιβάλλον [26].

1.3.2 Τρόποι μεταφοράς – Παρουσία στο περιβάλλον

Η απορροή από αστικές, γεωργικές και καθημερινές δραστηριότητες που καταλήγει σε υδάτινους αποδέκτες, η άμεση απόρριψη πλαστικών και η διάσπαση αυτών *in situ*, η άμεση διασπορά από βιομηχανικές δραστηριότητες και οι μονάδες επεξεργασίας λυμάτων αποτελούν πηγές μικροπλαστικών στο περιβάλλον (ΕΙΚΟΝΑ 9) [27]. Η πλειοψηφία των μικροπλαστικών

απομακρύνονται από το νερό κατά την επεξεργασία των λυμάτων, ωστόσο μεγάλο μέρος αυτών μπορεί να διατηρηθεί στη λάσπη λυμάτων και έτσι η επαναχρησιμοποίηση της ιλύος ως λίπασμα αποτελεί σημαντικό σημείο εισόδου τους στο περιβάλλον [3].



ΕΙΚΟΝΑ 9: Παρουσία μικροπλαστικών στο περιβάλλον. (Πηγή: <https://www.eea.europa.eu/>)

Τα μικροπλαστικά στο περιβάλλον μπορούν να κινηθούν με τρεις κυρίως τρόπους, μέσω του αέρα, μέσω της απορροής από τη στεριά και μέσω του γλυκού νερού και της θάλασσας. Τα περισσότερα μικροπλαστικά καταλήγουν στους ωκεανούς προερχόμενα από τη στεριά, μέσω των ποταμών και του αέρα [10]. Η παρουσία τους έχει τεκμηριωθεί σε όλο τον κόσμο, ακόμη και σε πάγους στην Αρκτική και στα ανώτερα στρώματα της αβύσσου [2], [26], [35]–[37].

1.3.3 Επίδραση στο υδάτινο περιβάλλον

Η πρόσληψη των μικροπλαστικών από τους υδρόβιους οργανισμούς γίνεται μέσω των βραγχίων και μέσω της κατάποσης. Το μικρό μέγεθος επιτρέπει την κατάποση από μια πληθώρα υδρόβιων οργανισμών, από διαφορετικά τροφικά επίπεδα και με διαφορετικές στρατηγικές διατροφής [38]. Ακούσια πρόσληψη πραγματοποιείται μέσω των βραγχίων, μέσω παθητικής κατάποσης κατά τη λήψη τροφής και μέσω δευτερογενούς κατανάλωσης και τροφικής μεταφοράς από θηράματα που περιέχουν μικροπλαστικά [10], [35], [39]. Ακόμη, η κατάποση πραγματοποιείται εκούσια από τη στήλη νερού ή το ίζημα, λόγω ομοιότητας με την πραγματική τροφή [40]. Η επιλογή εκούσιας κατάποσης επηρεάζεται από το μέγεθος, το σχήμα, την πυκνότητα, αλλά και το χρώμα των μικροπλαστικών, καθώς και από τις

διατροφικές συνήθειες, το μηχανισμό κατάποσης και το μέγεθος των οργανισμών. Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των μικροπλαστικών [10], [39], [41], [42]. Έτσι, η παρουσία τους έχει εντοπιστεί σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς, από χελώνες, ψάρια, μύδια μέχρι ζωοπλαγκτόν [30], [32], [36], [43]–[51]. Τα ψάρια εκτιμώνται ως ένας από τους πιο ευαίσθητους υδρόβιους οργανισμούς στην κατάποση μικροπλαστικού και έχουν αναγνωριστεί ως βιοδείκτες για την ποιότητα και τη ρύπανση από μικροπλαστικά σε γλυκά νερά και θάλασσα. Καθώς αποτελούν και τα ίδια τροφή για τον άνθρωπο η δυνατότητα αυτή μπορεί να οδηγήσει σε κινδύνους για την ασφάλεια των τροφίμων και την ανθρώπινη υγεία [39]. Υφίσταται κίνδυνος μετάδοσης πλαστικών σωματιδίων στον άνθρωπο, αν και δεν έχει μελετηθεί πλήρως η μεταφορά από θαλάσσιους οργανισμούς. Έχουν βρεθεί σε ανθρώπινα περιττώματα, στον πλακούντα, στο έντερο μετά από κατανάλωση μυδιών που φέρανε τα ίδια, καθώς και σε τρόφιμα, όπως μπύρα, μέλι, γάλα και νερό βρύσης [51].

1.3.4 Επιπτώσεις μικροπλαστικών σε υδρόβιους οργανισμούς

Τα μικροπλαστικά αποτελούν απειλή για τους οργανισμούς, τα οικοσυστήματα και την ανθρώπινη υγεία, λόγω της παρουσίας τους στο έδαφος, στο γλυκό και θαλάσσιο περιβάλλον, ακόμη και στον αέρα. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η αλληλεπίδραση με τους υδρόβιους οργανισμούς είναι έντονη. Η κατανόηση των οδών πρόσληψης, συσσώρευσης και των πιθανών επιπτώσεων τους είναι ζωτικής σημασίας για την αξιολόγηση του κινδύνου που ενέχουν για τους οργανισμούς και τα οικοσυστήματα [31].

Μελέτες εντοπίζουν μικροπλαστικά κυρίως στο γαστρεντερικό σύστημα, αλλά και στα βράγχια των υδρόβιων οργανισμών. Στο γαστρεντερικό σύστημα μπορεί να προκαλέσουν παρεμπόδιση της πέψης και ψευδοκορεσμό που μπορεί να οδηγήσει σε υποσιτισμό, με συνέπεια δυσμενείς επιπτώσεις στον οργανισμό, ενώ η συσσώρευση στα βράγχια μπορεί να προκαλέσει καταστροφή των νημάτων, με αποτέλεσμα ελάττωση της αναπνευστικής ικανότητας και αύξηση της πιθανότητας μόλυνσης [10], [39], [52]–[54]. Ορισμένα σχήματα μικροπλαστικών, όπως ίνες ή θραύσματα με αιχμηρές άκρες, μπορεί να προκαλέσουν τραυματισμούς στους οργανισμούς κατά την κατάποση ή την επαφή με αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονών. Τα μικρότερου μεγέθους μικροπλαστικά (<150 μm, συνήθως <20 μm) έχουν την ικανότητα να διαπερνούν το εντερικό επιθήλιο μέσω δύο πιθανών διαδρομών, είτε

παρακυττάρια (persorption, μεγέθη $\sim 5\text{-}150\ \mu\text{m}$), είτε διακυττάρια (transcytosis, μεγέθη $< 5\ \mu\text{m}$), να εισέρχονται στο κυκλοφορικό σύστημα και στους ιστούς, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση τους στα όργανα [55]–[58]. Καθοριστικός παράγοντας της μετατόπισης είναι το μέγεθος, αν και άλλες παράμετροι, όπως το σχήμα, η συγκέντρωση και ο οργανισμός παίζουν, επίσης, ρόλο [31]. Τα βράγχια και το επιθήλιο του εντέρου θεωρούνται οδοί μετατόπισης και συσσώρευσης αυτών των εξωγενών σωματιδίων σε ιστούς μέσα στον οργανισμό [32], [52]. Οι Browne et al. αναφέρουν μετατόπιση μικροπλαστικών μεγέθους $3\text{-}10\ \mu\text{m}$ από το γαστρεντερικό σωλήνα στο κυκλοφορικό σύστημα μυδίων, ενώ άλλες μελέτες αναφέρουν μετατόπιση μικροπλαστικών στο ήπαρ, στη σάρκα και στον εγκέφαλο ψαριών, αν και δεν αποδεικνύεται πάντα [56], [59]–[65].

Οι οργανισμοί αναπτύσσουν διάφορους μηχανισμούς για την αντιμετώπιση των επιδράσεων των ξενοβιοτικών, όπως είναι η απέκκριση, η απομόνωση τους από τα κυτταρικά συστατικά και η εξουδετέρωση της οξειδωτικής ανισορροπίας με τη βοήθεια των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Στην περίπτωση όμως, που δεν καταστούν επαρκείς οι μηχανισμοί, τότε οι οργανισμοί δύνανται να υποστούν δυσμενείς επιδράσεις και διαταραχές στις φυσιολογικές τους λειτουργίες [66].

1.3.4.1 Επιπτώσεις συμβατικών μικροπλαστικών

Ποικίλες έρευνες έχουν ασχοληθεί με τη μελέτη των πιθανών επιπτώσεων σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς. Τα κυριότερα συμπτώματα που έχουν αναφερθεί είναι εντερικές βλάβες και φλεγμονές, οξειδωτικό στρες, μεταβολικές διαταραχές, γονοτοξικότητα και κατ' επέκταση επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα, στην αναπαραγωγή, συμπεριφορικές αλλαγές και πιθανή νευροτοξικότητα [42], [58], [67], [68].

Η έκθεση zebrafish σε μικροπλαστικά μεγέθους $70\ \mu\text{m}$ προκάλεσε εντερική βλάβη η οποία πιθανά οδηγεί σε μειωμένη απορρόφηση θρεπτικών συστατικών [69], ενώ φλεγμονή και οξειδωτικό στρες προκλήθηκαν στο έντερο ψαριών, που εκτέθηκαν σε μικροπλαστικά $5\ \mu\text{m}$, οδηγώντας σε διαταραχή του εντερικού μικροβιώματος, του μεταβολισμού των αμινοξέων και των λιπιδίων [70]. Μια άλλη μελέτη απέδειξε οξειδωτικό στρες στο ήπαρ, διαταραχές στον μεταβολισμό λιπιδίων και ενέργειας στα ηπατοκύτταρα, ύστερα από έκθεση zebrafish σε μικροπλαστικά πολυστυρενίου μεγέθους $5\ \mu\text{m}$ [61]. Για τη διερεύνηση της τοξικότητας

μικροπλαστικών ινών πολυπροπυλενίου, μικρότερα και ενήλικα ψάρια εκτέθηκαν σε διαφορετικού μήκους ίνες. Η έκθεση προκάλεσε εντερική βλάβη, εξαρτώμενη από το μήκος. Η εντερική βλάβη επηρεάζεται κυρίως από το μέγεθος των σωματιδίων, παρά από τη χημική τους σύνθεση, με τις μακριές μικροπλαστικές ίνες να προκαλούν πιο σοβαρές επιπτώσεις από τις πιο μικρές, κάτι που μπορεί να αποδοθεί στο μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης, καθώς κολλάνε περισσότερο στους ιστούς και είναι πιο δύσκολο να απεκκριθούν. Οι ίνες προκάλεσαν οξειδωτικό στρες, φλεγμονή και αλλαγές στη διαπερατότητα και δομή του εντέρου, που αποδείχθηκαν από την αύξηση D-γαλακτικού οξέος και το μειωμένο πάχος του βλεννογόνου. Οι μεταβολίτες που σχετίζονται με την υπεροξειδωση λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένης της φωσφατιδυλοχολίνης (PE), της φωσφοαιθανολαμίνης, της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (lysoPC) και της λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης (lysoPE), αυξήθηκαν. Η συσσώρευση lysoPC σχετίζεται με οξειδωτικό στρες και φλεγμονή, αυξημένη PE και lysoPE σχετίζονται με εντερική βλάβη. Με βάση αυτούς τους μεταβολίτες, ο μεταβολισμός των σφιγγολιπιδίων, ο μεταβολισμός των γλυκεροφωσfolιπιδίων και η οδός σηματοδότησης της αδιποκυτταροκίνης αναδείχθηκαν ως οι πιο σημαντικά διαταραγμένες οδοί, οι οποίες παίζουν ζωτικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων και διεγείρονται κατά τη φλεγμονή και ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η εντερική βλάβη μπορεί να αποδοθεί στην υπεροξειδωση των λιπιδίων (επαγόμενη από οξειδωτικό στρες), λόγω της έκθεσης σε μικροπλαστικά. Ακόμη, παρατηρήθηκε μείωση του μεταβολισμού των λιπαρών ακυλίων, η οποία συνδέεται με διατροφική ανεπάρκεια [71]. Μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε για την ανακάλυψη μεταβολικών διαταραχών στο ήπαρ μέδακας (*Oryzias melastigmas*), μετά από έκθεση σε μικροπλαστικά πολυστυρενίου για 60 μέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκθεση πυροδότησε μείωση μονοσακχαριτών και οργανικών οξέων, που συνεπάγεται αναστολή της γλυκόλυσης και του κύκλου του κιτρικού οξέος. Το επίπεδο φλοριδοσίδης αυξήθηκε σημαντικά, γεγονός που υποδηλώνει διαταραχές αποθήκευσης, μεταφοράς και αφομοίωσης υδατανθράκων. Μειωμένα επίπεδα 6-φωσφογλυκονικού και ριβόζης στο ήπαρ έδειξαν την αναστολή της οδού της φωσφορικής πεντόζης, αποκαλύπτοντας διαταραγμένη σύνθεση νουκλεοτιδίων. Παρατηρείται μείωση αμινοξέων και σημαντικά αυξημένα επίπεδα υποταυρίνης και μιμοσίνης που υποδηλώνουν αυξημένο οξειδωτικό στρες και αναστολή της αντιγραφής και/ή επιμήκυνσης του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA), αντίστοιχα. Τέλος, παρατηρούνται αλλαγές στον

μεταβολισμό των γλυκερολιπιδίων, λόγω αυξημένης σύνθεσης τριγλυκεριδίων και μειωμένης αποδόμησης τους στο ήπαρ, με αποτέλεσμα συσσώρευση λιπιδίων σε αυτό [72].

Η έκθεση σε μικροπλαστικά μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη συμπεριφορά των ψαριών, συμπεριλαμβανομένων αλλαγών στην κολύμβηση, μειωμένης δραστηριότητας και αλληλεπίδρασης αρπακτικού-θηράματος [31],[73]. Σε zebrafish εκτεθειμένα σε μικροπλαστικά πολυστυρενίου μεγέθους 5 μm παρατηρήθηκε υπερκινητικότητα, η οποία πιθανά αποδίδεται στην παρατηρούμενη αύξηση των οιστρογόνων και προκαλεί διαταραχή της γλυκόλυσης και αύξηση του καταβολισμού πρωτεϊνών στο μυϊκό ιστό [74]. Μελέτες σε λαβράκι έχουν δείξει επιπτώσεις μικροπλαστικών στις συμπεριφορικές αντιδράσεις, όπως ληθαργική και ακανόνιστη συμπεριφορά κολύμβησης, καθώς και υπεροξειδωση λιπιδίων στον εγκέφαλο και στους μυς [28]. Επιπλέον, η έκθεση σε μικροπλαστικά μπορεί να προκαλέσει νευροτοξικότητα, λόγω υπεροξειδωσης των λιπιδίων στα ψάρια και διαταραχής ένζυμων που σχετίζονται με τα νεύρα [58]. Έχει αναφερθεί πιθανή νευροτοξικότητα, λόγω αναστολής της δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης στον εγκέφαλο ψαριών και οξειδωτικό στρες στο ήπαρ το οποίο, όμως, φαίνεται να μπορούν να αντιμετωπίσουν με αμυντικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς [60]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί μείωση της καρδιακής λειτουργίας και της ικανότητας κολύμβησης σε εκτεθειμένα zebrafish, ενώ και σε *Daphnia magna* επηρεάστηκε ο καρδιακός ρυθμός, καθώς και ο μεταβολισμός των φωσfolιπιδίων και ενέργειας. Σε δεκάποδα φαίνεται ότι μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες, επίδραση στην αναπαραγωγή, στην ανάπτυξη και σε συμπεριφορές, όπως αναζήτηση τροφής και κολύμπι [75]. Φλεγμονώδεις αντιδράσεις και λυσοσωμικές διαταραχές έχουν παρατηρηθεί σε μύδια που εκτέθηκαν σε μικροπλαστικά PE και PS. Σε κωπήποδα που εκτέθηκαν σε PS μεγέθους 0,5 και 6 μm παρατηρήθηκε μείωση της γονιμότητας, που ενδεχομένως οφείλεται σε έλλειψη ενέργειας [54], [76].

1.3.4.2 Επιπτώσεις βιομικροπλαστικών

Τα βιοπλαστικά παρουσιάζονται στο ευρύ κοινό ως μια βιώσιμη, φιλική προς το περιβάλλον λύση στο πρόβλημα της πλαστικής ρύπανσης. Ωστόσο, η έρευνα των επιπτώσεων τους σε ζωντανούς οργανισμούς είναι περιορισμένη, ενώ ήδη υπάρχουν ενδείξεις ότι και αυτά είναι υπεύθυνα για δυσμενείς επιπτώσεις [21], [22], [77]–[79].

Το ενδιαφέρον τέτοιων μελετών έχει εστιαστεί κυρίως στο PLA, ένα βιοπροερχόμενο και βιοαποδομήσιμο πολυμερές, στο βιοπολυμερές πολυ(3-υδροξυβουτυρικό οξύ) (PHB), αλλά και σε άλλα, όπως PCL, PBS. Οι επιπτώσεις στο έντερο zebrafish, έπειτα από έκθεση σε PLA συγκέντρωσης 17,5 mg/L διερευνήθηκαν, με τα αποτελέσματα να υποδεικνύουν εντερική βλάβη και αλλαγές στην ποικιλομορφία της εντερικής μικροχλωρίδας που σχετίστηκαν με διαταραχές του μεταβολισμού ενέργειας και των κυτταρικών διεργασιών στα ψάρια [80]. Σύμφωνα με τους Malafaia et al., μικροπλαστικά PLA σε συγκεντρώσεις 2,5 και 5 mg/L συσσωρεύτηκαν στο ήπαρ, στον εγκέφαλο και στα βράγχια ενήλικων zebrafish. Παρατηρήθηκε αυξημένη δραστικότητα ακετυλοχολινεστεράσης και οξειδωτικό στρες στον εγκέφαλο των ψαριών, στα οποία πιθανά οφείλονται οι παρατηρούμενες αλλαγές στη κοινωνική συμπεριφορά τους. Ακόμη, παρατηρήθηκαν αλλαγές στο χρωματισμό της επιδερμίδας τους [81]. Έκθεση προνυμφών zebrafish σε μικροπλαστικά PLA συγκεντρώσεων 3 και 9 mg/L φανέρωσε αλλαγές στην κινητικότητα τους, ενδεικτικές συμπεριφορές άγχους και μείωση της δραστικότητας ακετυλοχολινεστεράσης, υποδεικνύοντας ότι αποτελούν στρεσογόνους παράγοντες για τα ψάρια και ενδεχομένως είναι υπεύθυνα για εμφάνιση νευροτοξικότητας [82].

Ύστερα από έκθεση 48 ωρών σε συγκεντρώσεις 0,5 μg και 1 μg/ml PHB, ιστοπαθολογική μελέτη σε λαβράκι έδειξε αλλοίωση στους ιστούς των μυών, των βραγχίων και νέκρωση του μυοκαρδιακού ιστού, ενώ παρατηρήθηκε κυτταροτοξικότητα με σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων των κυτταρικών γραμμών σπλήνας, με μέθοδο MTT [83]. Σε άλλη μελέτη, πραγματοποιήθηκε δοκιμή οξείας τοξικότητας εμβρύων zebrafish, για να ελεγχθεί η πιθανή κυτταροτοξικότητα του PHB, με τα αποτελέσματα να εμφανίζουν θνησιμότητα σε συγκεντρώσεις μεταξύ 6,25 - 100 μg/mL, μετά από 96 ώρες έκθεσης [84]. Οι Magara et al. αναφέρουν ότι μικροπλαστικά PHB σε συγκέντρωση 1000 σωματίδια/ml επηρεάζουν επίπεδα βιοδεικτών που σχετίζονται με οξειδωτικό στρες στα βράγχια και στους πεπτικούς αδένες μυδιών (*Mytilus edulis*) [85]. Μια ακόμη μελέτη εξέτασε τις επιπτώσεις νανοπλαστικών PHB, ύστερα από αβιοτική αποδόμηση μικροπλαστικών PHB, υπό περιβαλλοντικά ρεαλιστικές συνθήκες για 3 ημέρες, σε διαφορετικών τροφικών επιπέδων οργανισμούς του γλυκού νερού (κυανοβακτήρια, φύκια και καρκινοειδή). Παρατηρήθηκε μείωση της ανάπτυξης των κυανοβακτηρίων και των φυκιών και ακινητοποίηση των καρκινοειδών *Daphnia magna*, που πιθανά οφείλονται στην υπερπαραγωγή δραστικών

μορφών οξυγόνου (ROS), επηρεάζοντας την ακεραιότητα, διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης [86]. Ακόμη, φαίνεται να επιδρά σε γονίδια που σχετίζονται με οξειδωτικό στρες, καθώς και σε γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τη σκελετογένεση, με αποτέλεσμα καθυστέρηση ανάπτυξης και δυσμορφίες εμβρύων αχινού [78]. Το PBS φαίνεται να προκαλεί καταστροφή των λυσοσωμικών μεμβρανών και αύξηση της παραγωγής ROS που οδηγεί σε υπεροξείδωση λιπιδίων, αύξηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και βλάβη DNA σε αιμοκύτταρα σαλιγκαριών [55]. Ακόμη, προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης μικροφύκων κατά 34 % [87], ενώ δεν φαίνεται να επιδρά σε έμβρυα αχινού σε συγκεντρώσεις 1, 5, 10 mg/L [78].

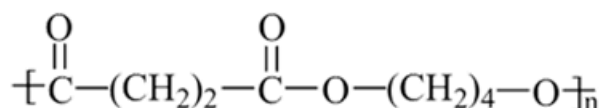
1.3.5 Τοξικότητα μικροπλαστικών

Η επιφάνεια των μικροπλαστικών είναι κατάλληλη για τη δημιουργία στρωμάτων βιοφίλμ, δηλαδή αποικιών μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα αύξηση της πυκνότητας, βύθιση του μικροπλαστικού και πιθανή μείωση του ρυθμού αποδόμησης του [2]. Επιπλέον, λειτουργούν ως φορείς μεταφοράς για αυτά τα είδη, όπως και παθογόνων μικροοργανισμών, διευκολύνοντας την εξάπλωσή σε νέους οικοτόπους και την εισαγωγή μη ιθαγενών ειδών, διαταράσσοντας τα αυτοφυή οικοσυστήματα. Οι επιφανειακές ιδιότητες των μικροπλαστικών, όπως η υδροφοβικότητα και η τραχύτητα μπορούν να επηρεάσουν την προσρόφηση χημικών ουσιών, την προσκόλληση μικροοργανισμών και το σχηματισμό βιοφίλμ [11], [31]. Επιπλέον, η τοξική δράση των μικροπλαστικών οφείλεται στη σύνθεσή τους, συγκεκριμένα στα πρόσθετα υλικά που χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους και στη μεγάλη ειδική επιφάνεια που διαθέτουν, η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους. Τα πλαστικά περιέχουν χημικά πρόσθετα, όπως πλαστικοποιητές, σταθεροποιητές υπεριώδους ακτινοβολίας, βαφές, λιπαντικά, αντιμικροβιακούς παράγοντες, επιβραδυντικά φλόγας και άλλες χημικές ουσίες, οι οποίες είναι επιβλαβείς για τους ζωντανούς οργανισμούς, όπως δισφαινόλες και φθαλικές ενώσεις. Κατά την αποδόμηση τους απελευθερώνουν όχι μόνο τα μονομερή, αλλά και τα τοξικά πρόσθετα που περιέχονται σχεδόν σε όλα τα πλαστικά υλικά. Επίσης, η μεγάλη ειδική επιφάνεια τους δίνει τη δυνατότητα να προσροφούν και να συσσωρεύουν ρύπους, όπως βαρέα μέταλλα, έμμονους οργανικούς ρύπους από το περιβάλλον και έτσι λειτουργούν ως φορείς για τη μεταφορά αυτών στους οργανισμούς και μάλιστα σε συγκέντρωση αρκετών τάξεων μεγέθους υψηλότερη συγκριτικά με αυτή στο περιβάλλον. Όσο

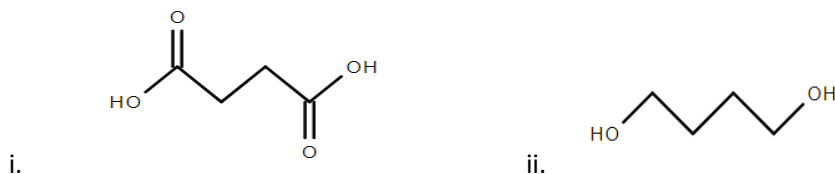
μικρότερο είναι το μέγεθος τους, τόσο μεγαλύτερες μπορεί να είναι οι συγκεντρώσεις συναπορροφημένων ρύπων και πιθανότερη η δημιουργία υψηλού τοξικολογικού κίνδυνου [28], [49], [88], [89].

1.4 ΠΟΛΥ(ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΣ ΒΟΥΤΥΛΕΣΤΕΡΑΣ) (PBS)

Ο πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (PBS) είναι ένας αλειφατικός πολυεστέρας (ΕΙΚΟΝΑ 10) που έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον, εξαιτίας της βιοαποδομησιμότητας του και της ικανότητας παραγωγής του από ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Συντίθεται μέσω αντίδρασης μεταξύ διοξέος - διόλης, στην προκείμενη περίπτωση του ηλεκτρικού οξέος (ή παράγωγων του) με 1,4-βουτανοδιόλη (ΕΙΚΟΝΑ 11). Το ηλεκτρικό οξύ, εμπορικά, παράγεται κυρίως από μη ανανεώσιμες πρώτες ύλες, όμως στο άμεσο μέλλον για την παραγωγή του θα αξιοποιηθεί εκτενέστερα η ζύμωση σακχάρων, όπως άμυλο, γλυκόζη, ξυλόζη, που αποτελούν εξαιρετικές ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα παραγωγής ανανεώσιμης 1,4-βουτανοδιόλης, του δίνει την προοπτική να αποτελέσει ένα εξ' ολοκλήρου βιοπροερχόμενο πολυμερές [19].



ΕΙΚΟΝΑ 10: Ο συντακτικός τύπος του πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα) (PBS).



ΕΙΚΟΝΑ 11: Οι συντακτικοί τύποι των δομικών μονάδων (μονομερή) του PBS i. Ηλεκτρικό οξύ, ii. 1,4-βουτανοδιόλη

1.4.1 Σύνθεση

Η πρώτη προσπάθεια σύνθεσης του χρονολογείται τη δεκαετία του 1930, όμως τη δεκαετία του 1990 επιτεύχθηκε η παραγωγή του με υψηλό μοριακό βάρος και ικανοποιητικές μηχανικές

ιδιότητες, που έδωσε τη δυνατότητα πρακτικής εφαρμογής του. Συντέθηκε από την Showa HighPolymer με το εμπορικό σήμα Bionolle, μέσω πολυμερισμού συμπύκνωσης ακολουθούμενου από αντίδραση επέκτασης πολυμερικής αλυσίδας, χρησιμοποιώντας δισοκυανικό εστέρα ως παράγοντα σύζευξης για την αύξηση του μοριακού βάρους. Ωστόσο, το στάδιο επιμήκυνσης της αλυσίδας το καθιστά ακατάλληλο για εφαρμογές στους τομείς της ιατρικής, των καλλυντικών και της συσκευασίας τροφίμων, όπου η βιοασφάλεια είναι θεμελιώδης απαίτηση. Οι βασικοί μέθοδοι παραγωγής του είναι ο πολυμερισμός μετεστεροποίησης, ο άμεσος πολυμερισμός τήγματος ηλεκτρικού οξέος και βουτανοδιόλης, ο πολυμερισμός συμπύκνωσης ακολουθούμενος από επέκταση αλυσίδας και ο ενζυμικός πολυμερισμός. Έτσι, αργότερα διάφοροι ερευνητές και εταιρίες στόχευσαν στη σύνθεση του, μέσω άμεσου πολυμερισμού τήγματος πετυχαίνοντας ίδιες ιδιότητες, αλλά καλύτερη βιοαποδόμηση και ενισχυμένη ασφάλεια [90], [91].

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τόσο το ηλεκτρικό οξύ, όσο και η 1,4-βουτανοδιόλη είναι μονομερή, τα οποία προέρχονται από ορυκτές, αλλά και ανανεώσιμες πηγές. Κυρίως προέρχονται, είτε από υδρογόνωση μαλεϊκού ανυδρίτη, είτε βιολογικά μέσω διεργασιών ζύμωσης σακχάρων [19], [92]. Η BioAmber Inc. το 2010 ξεκίνησε την εμπορευματοποίηση ηλεκτρικού οξέος από ανανεώσιμες πρώτες ύλες, ενώ η παραγωγή της 1,4-βουτανοδιόλης ξεκίνησε από την Novamont S.p.A. το 2016 [17].

1.4.2 Ιδιότητες

Το PBS είναι ένας θερμοπλαστικός, ημικρυσταλλικός πολυεστέρας με καλές θερμικές και μηχανικές ιδιότητες. Παρουσιάζει ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του PE και του PP [13]. Οι μηχανικές του ιδιότητες, όπως η επιμήκυνση κατά τη θραύση, η αντοχή σε εφελκυσμό και η αντοχή σε κρούση είναι ικανοποιητικές. Το μοριακό βάρος του πολυμερούς επηρεάζει κάποιες ιδιότητες, όπως την αντοχή εφελκυσμού και την ικανότητα επιμήκυνσης μέχρι τη θραύση, οι οποίες αυξάνονται με την αύξηση του, ενώ και η κρυσταλλικότητα παίζει καθοριστικό ρόλο στις ιδιότητες των πολυμερών. Οι θερμικές ιδιότητες του PBS παρουσιάζονται καλύτερες σε σύγκριση με εκείνες άλλων βιοαποδομήσιμων πολυμερών. Έχει υψηλή θερμοκρασία θερμικής παραμόρφωσης που καταδεικνύει τη θερμική αντοχή του υλικού, ενώ απαιτεί χαμηλές θερμοκρασίες επεξεργασίας [91], [93].

Έχει χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο μαζί με άλλα βιοπολυμερή, όπως το PLA [17], [94], αλλά και με τη μορφή συμπολυμερών του, όπως με αδιπικό και τερεφθαλικό οξύ. Με αυτό τον τρόπο, μπορούν να προκύψουν υλικά με ένα εύρος ιδιοτήτων που ποικίλουν ανάλογα με το είδος και τη σύσταση του τελικού προϊόντος. Συνήθως, χωρίς να αποτελεί κανόνα, καθώς εξαρτάται από το ποσοστό του συμμονομερούς, ο συμπολυμερισμός οδηγεί σε μείωση του σημείου τήξης, του βαθμού κρυσταλλικότητας, της θερμοκρασίας θερμικής παραμόρφωσης και της αντοχής σε εφελκυσμό, ενώ οδηγεί σε αύξηση της επιμήκυνσης μέχρι τη θραύση και της αντοχής σε κρούση. Επιπρόσθετα, ο ρυθμός αποδόμησης του επηρεάζεται σημαντικά με συμπολυμερισμό ή ανάμειξη με άλλα πολυμερή. Συνήθως, ο συμπολυμερισμός με αλειφατικά συμμονομερή έχει ως αποτέλεσμα ταχύτερο ρυθμό βιοαποδόμησης, ενώ με αρωματικά συμμονομερή οδηγεί σε βραδύτερο ρυθμό. Παρακάτω παρουσιάζονται κάποιες ιδιότητες του PBS σε σύγκριση με αυτές του βιοπολυμερούς PLA και του συμβατικού πλαστικού PP (ΠΙΝΑΚΑΣ 1) [4], [13], [19], [90], [91].

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Ιδιότητες PBS σε σύγκριση με αυτές του βιοπολυμερούς PLA και του συμβατικού πλαστικού PP [91].

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ	PBS	PLA	PP
Σημείο τήξης T_m (°C)	112-116	170	176
Επιμήκυνση μέχρι θραύση (%)	560	4	400
Αντοχή εφελκυσμού (MPa)	34	66	38
Θερμοκρασία ναλώδους μετάπτωσης T_g (°C)	-32	55	-10

1.4.3 Τρόποι αποδόμησης

Η αποδόμηση του PBS μπορεί να χωριστεί σε υδρολυτική, ενζυμική και βιοαποδόμηση υπό περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως σε υδάτινο περιβάλλον, έδαφος και λίπασμα [91]. Επιπλέον, το πολυμερές χαρακτηρίζεται βιομηχανικά κομποστοποιήσιμο [23]. Τα βιοπλαστικά προορίζονται για να διασπώνται πιο εύκολα από το συμβατικό πλαστικό και να είναι ασφαλέστερα για το περιβάλλον, ωστόσο για να επιτευχθεί αυτό πρέπει να υπάρχουν κατάλληλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες. Το PBS παρουσιάζει αποδομησιμότητα σε διάφορες

συνθήκες και περιβάλλοντα. Ο ρυθμός αποδόμησης του, καθώς και των συμπολυμερών του επηρεάζεται, τόσο από τα χαρακτηριστικά του πολυεστέρα (κρυσταλλικότητα, σύσταση του συμπολυμερούς), όσο και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος, όπως είναι η ύπαρξη μικροοργανισμών, η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH, η ηλιακή ακτινοβολία [91].

Η ύπαρξη εστερικού δεσμού στο σκελετό του πολυμερούς τον καθιστά ευαίσθητο σε αποδόμηση. Υφίσταται υδρολυτική αποδόμηση με διάσπαση του εστερικού δεσμού και μείωση του μοριακού βάρους σε όξινες ή αλκαλικές συνθήκες, με αποτέλεσμα να γίνεται ψαθυρό και εύθραυστο. Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την υδρολυτική αποδόμηση, όπως η κρυσταλλικότητα, η υδροφιλικότητα, η ευκαμψία, το pH και η θερμοκρασία. Η ενζυμική αποδόμηση είναι μια διεργασία, κατά την οποία τα ένζυμα προσδένονται πάνω στο αδιάλυτο υπόστρωμα και η υδρόλυση προχωρά καταστρέφοντας την επιφάνεια, σε αντίθεση με τη χημική υδρόλυση, όπου συμβαίνει διαμέσου της μάζας του πολυμερούς, με εξαίρεση κάποια πολύ υδρόφοβα πολυμερή. Στα υπεύθυνα για την αποδόμηση ένζυμα συγκαταλέγονται οι εστεράσες, οι λιπάσες, οι πρωτεάσες, ενώ έχουν αναφερθεί αρκετοί μικροοργανισμοί για αποδόμηση του PBS. Ο ρυθμός βιοαποδόμησης στο έδαφος σχετίζεται με τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν σε αυτό [90].

Πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι η βιοαποδόμηση, τόσο σε υδάτινο περιβάλλον, όσο και στο έδαφος είναι περιορισμένη. Σύμφωνα με πρότυπα ελέγχου βιοαποδομησιμότητας στο έδαφος, στο θαλάσσιο και υδάτινο περιβάλλον, το PBS παρουσιάζει χαμηλή βιοαποδομησιμότητα [23], [92], [95]. Η υδρολυτική αποδόμηση ακολουθεί αργό ρυθμό (10% μετά το πέρας 9 εβδομάδων, 65% μετά το πέρας 15 εβδομάδων), όπως διαπιστώθηκε σε φυσιολογικό ορό ρυθμισμένο με φωσφορικά, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος [19]. Ακόμη, υπολογίζεται ότι η αποδόμηση στον ωκεανό είναι πολύ αργή (<1% μετά από 28 ημέρες), ενώ και σε έδαφος, υπό σταθερές συνθήκες, παρατηρήθηκε μόνο 1% μείωση του βάρους του πολυμερούς με τη μορφή φιλμ και ~17% με τη μορφή σκόνης, ύστερα από 28 ημέρες [96].

1.4.4 Εφαρμογές

Το PBS μπορεί να αξιοποιηθεί σε διάφορους τομείς, χάρη στη βιοαποδομησιμότητα του, τις καλές μηχανικές ιδιότητες, καθώς και τη δυνατότητα υποβολής σε διάφορες τεχνικές επεξεργασίας, όπως εξώθηση, χύτευση με έγχυση, εκβολή φουσητού φιλμ, πλαστικοποίηση

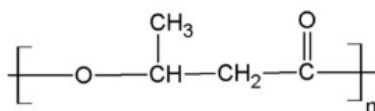
εξώθησης, ινοποίηση και θερμοδιαμόρφωση. Είναι κατάλληλο για κατασκευή μεμβρανών, φύλλων, νημάτων, προϊόντων έγχυσης, μη υφασμένων υφασμάτων και μπορεί να εφαρμοστεί στη γεωργία, στη δασοκομία, στον κατασκευαστικό τομέα, στη βιομηχανία συσκευασίας κ.α. [91]. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στην αυτοκινητοβιομηχανία για εσωτερικά εξαρτήματα, όπως ταμπλό κυρίως, λόγω της ικανότητας χύτευσης του, της αντοχής στη θερμότητα και της μηχανικής αντοχής, που συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα του [97]. Η αξιοποίηση του εστιάζεται, κυρίως, στο γεωργικό τομέα για μεμβράνες γεωργικής χρήσης και στη βιομηχανία συσκευασίας για βιοδιασπώμενες σακούλες [98]. Το βιοπροερχόμενο (εν μέρει) PBS διατίθεται στο εμπόριο από το 2017 από τη Mitsubishi Chemical Corporation με την εμπορική ονομασία BioPBS™ και έως τώρα έχει λάβει πιστοποιήσεις για εφαρμογές σε επαφή με τρόφιμα και δυνατότητας βιομηχανικής κομποστοποίησης (σύμφωνα με το πρότυπο EN13432). Οι κύριες εφαρμογές του είναι ως επικάλυψη χαρτιού σε κύπελα, καθώς παρουσιάζει καλή στεγανότητα, καλή πρόσφυση στο χαρτί και θερμική σταθερότητα, ως στεγανοποιητικό στρώμα σε εύκαμπτες συσκευασίες, εξαιτίας των ιδιοτήτων φραγμού, ως μη υφασμένο ύφασμα και σε μεμβράνες γεωργικής χρήσης (ΕΙΚΟΝΑ 12). Σε αυτές τις εφαρμογές είναι βιομηχανικά κομποστοποιήσιμο, ενώ τα κύπελα μπορούν και να ανακυκλωθούν [19], [99].



ΕΙΚΟΝΑ 12: Κάποιες από τις εφαρμογές του BioPBS™. (Πηγή: <https://www.pttmcc.com/>)

1.5 ΠΟΛΥ(3-ΥΔΡΟΞΥΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ) (PHB)

Το πολυ (3-υδροξυβουτυρικό οξύ) (PHB) ανήκει στα πολυυδροξυαλκανοϊκά οξέα (PHAs), μια οικογένεια γραμμικών πολυεστέρων που αποτελούνται από μονομερή 3-υδροξυοξέων, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με έναν εστερικό δεσμό και παράγονται, μέσω μικροβιακής ζύμωσης σακχάρων και λιπιδίων (ΕΙΚΟΝΑ 13). Συσσωρεύονται σε μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών ως ενδοκυτταρικές αποθήκες ενέργειας στο κυτταρόπλασμα, παρουσία περίσσειας άνθρακα, συνήθως όταν υπάρχει έλλειψη θρεπτικών συστατικών (συνθήκες στρες). Τα πολυμερή που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία παράγονται από διαφορετικά υποστρώματα άνθρακα, μικροοργανισμούς και συνθήκες, με το PHB να είναι το πιο απλό και πιο μελετημένο αυτής της κατηγορίας [100].



ΕΙΚΟΝΑ 13: Ο συντακτικός τύπος του πολυ(3-υδροξυβουτυρικού οξέος) (PHB).

1.5.1 Σύνθεση

Η παραγωγή του πραγματοποιείται κυρίως από βακτήρια, τα οποία μπορούν να αποθηκεύσουν έως και 80% του ξηρού βάρους τους σε κόκκους πολυμερούς. Τα σημεία που χρήζουν προσοχής είναι η διατήρηση γρήγορης ανάπτυξης κατά τη ζύμωση, η αποφυγή φαινομένων αποπολυμερισμού από τα ίδια τα βακτήρια και η δυνατότητα εύκολης εξαγωγής του πολυμερούς από τα κύτταρα. Έχουν γίνει προσπάθειες για αξιοποίηση και παραλλαγών της μεθόδου με χρήση ανασυνδυασμένων βακτηρίων, ζυμομυκήτων και φυτών. Η σύνθεση του χαρακτηρίζεται κοστοβόρα κυρίως, λόγω του κόστους του υποστρώματος-πηγής άνθρακα και των διαδικασιών ανάκτησης και καθαρισμού του ενδοκυτταρικά σχηματιζόμενου πολυμερούς. Η σύνθεση από διαγονιδιακά φυτά έχει αναφερθεί ότι μπορεί να αποτελέσει μια ελπιδοφόρα λύση στο πρόβλημα του κόστους [101]–[103].

1.5.2 Ιδιότητες

Ανήκει στα μικρού μήκους αλυσίδας PHAs (3-5 άτομα άνθρακα), είναι θερμοπλαστικό, υδρόφοβο και παρουσιάζει ιδιότητες παρόμοιες με συμβατικών πλαστικών, όπως του PP. Έχει καλή μηχανική αντοχή και καλές ιδιότητες φραγμού ωστόσο, είναι ένα εύθραυστο, άκαμπτο πολυμερές με πολύ υψηλό σημείο τήξης και χαμηλή θερμική αντοχή. Δεδομένου ότι η θερμική αποδόμηση του μπορεί να ξεκινήσει αμέσως μετά την τήξη, καθιστά δύσκολη την επεξεργασία του και κατ' επέκταση τη βιομηχανική εφαρμογή του [9], [101], [104].

Βελτίωση της ευθραυστότητας και της ακαμψίας μπορεί να επιτευχθεί, μέσω συμπολυμερισμού με τα μεσαίας μήκους αλυσίδας PHAs, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των ελαστομερών. Επιπλέον, μελέτες χρήσης αυτού μαζί με άλλα πολυμερή, όπως PCL, PLA, PBS ή προσθετά έχουν αναφερθεί με σκοπό την επίτευξη επιθυμητών ιδιοτήτων, αλλά και ελάττωση του κόστους [9], [100], [101], [103]. Παρακάτω παρουσιάζονται κάποιες ιδιότητες του PHB σε σύγκριση με αυτές των βιοπολυμερών PLA, PBS και του συμβατικού PP (ΠΙΝΑΚΑΣ 2).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Ιδιότητες PHB σε σύγκριση με PLA, PBS, PP [9], [105].

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ	PHB	PP	PLA	PBS
Σημείο τήξης T_m ($^{\circ}\text{C}$)	173-180	176	170	112-116
Επιμήκυνση μέχρι θραύση (%)	5	400	4	560
Αντοχή εφελκυσμού (MPa)	40	38	66	34
Θερμοκρασία ναλώδους μετάπτωσης T_g ($^{\circ}\text{C}$)	5	-10	55	-32

1.5.3 Τρόποι αποδόμησης

Το PHB είναι βιοαποδομήσιμο σε βιομηχανικές εγκαταστάσεις κομποστοποίησης, σε συνθήκες οικιακής κομποστοποίησης, αλλά και σε φυσικό περιβάλλον με αργό ρυθμό και υπό ορισμένες συνθήκες (κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας). Οι εστερικοί δεσμοί υδρολύονται και στη συνέχεια μπορούν να βιοαποδομηθούν από μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών, οι οποίοι βρίσκονται σε διάφορα περιβάλλοντα και εκκρίνουν κατάλληλα για την αποδόμηση ένζυμα, όπως αποπολυμεράσες και υδρολάσες PHA [9], [106]. Μελέτες

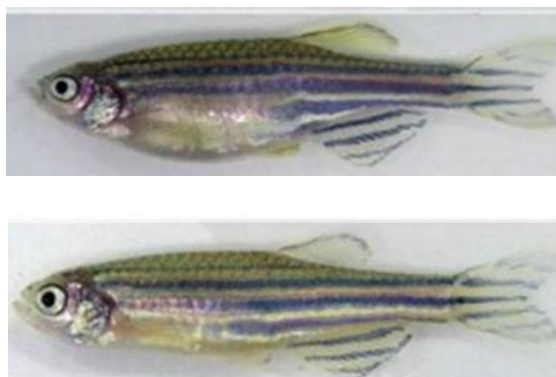
δείχνουν ότι το PHB, σύμφωνα με πρότυπα ελέγχου βιοαποδομησιμότητας στο έδαφος, στο θαλάσσιο και υδάτινο περιβάλλον, παρουσιάζει υψηλή βιοαποδομησιμότητα [23], [95]. Άλλη μελέτη αναφέρει ότι το ποσοστό αποδόμησης του σε φυσικό θαλασσίνο νερό από την Ταϊλάνδη βρέθηκε περίπου 13%, ύστερα από 28 ημέρες, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό σε συνθετικό θαλασσίνο νερό ήταν 86% [107], [108]. Όταν εξετάστηκε η βιοαποδόμηση σε θαλασσίνο νερό υπό στατικές και υπό δυναμικές συνθήκες, αναφέρθηκε διαφορετικό ποσοστό αποδόμησης (90% μετά από 18 ημέρες, 30% μετά από 90 ημέρες) με αυτό υπό δυναμικές συνθήκες να είναι μικρότερο, όπως αναμενόταν [109]. Μια μετα-ανάλυση για τον προσδιορισμό του συνολικού ρυθμού αποδόμησης βιοπλαστικών PHAs αναφέρει ότι για την πλήρη βιοαποδόμηση μιας φιάλης νερού PHA σε θαλάσσιο περιβάλλον η εκτιμώμενη περίοδος είναι 1,5–3,5 έτη [110].

1.5.4 Εφαρμογές

Τα PHAs αρχικά χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή δοχείων καλλυντικών, όπως μπουκάλια σαμπουάν, ως φράγματα υγρασίας σε προϊόντα υγιεινής, ως πρώτες ύλες για την παραγωγή πλαστικών χρωμάτων. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς για μακροχρόνια απελευθέρωση ζιζανιοκτόνων ή εντομοκτόνων, αλλά και να αξιοποιηθούν για την παραγωγή ισχυρών ινών στην αλιευτική βιομηχανία [103]. Όμως, η εφαρμογή τους είναι περιορισμένη, εξαιτίας του υψηλού κόστους. Λόγω της βιοαποδόμησης τους το ενδιαφέρον έχει στραφεί σε γεωργικές, ιατρικές εφαρμογές, καθώς και σε εφαρμογές συσκευασίας [17]. Το PHB παρουσιάζει ικανοποιητική δυνατότητα φραγμού οξυγόνου και υδρατμών, γεγονός που το καθιστά ικανό για χρήση σε συσκευασίες τροφίμων, αλλά και για κατασκευή ειδών καθημερινής χρήσης, όπως είδη μιας χρήσης [111]. Το PHB και το συμπολυμερές του με 3-υδροξυβαλερικό οξύ είναι τα πιο μελετημένα PHAs για ιατρικές εφαρμογές. Τα τελευταία χρόνια θεωρούνται υλικά που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την κατασκευή καρδιαγγειακών προϊόντων (βαλβίδες καρδιάς, αγγειακά μοσχεύματα), συστημάτων χορήγησης φαρμάκων (δισκία), προϊόντων για διαχείριση τραυμάτων (ράμματα, επιδέσμους) [103]. Ωστόσο, το κόστος και τα μειονεκτήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω εμποδίζουν την ευρεία εφαρμογή του. Η Metabolix (ΗΠΑ) παράγει το Metabolix PHA [(μείγμα PHB και πολυ(3-υδροξυοκτανοϊκού)] για αξιοποίηση στη συσκευασία τροφίμων και στην 3D-εκτύπωση [100].

1.6 ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Το Zebrafish (*Danio rerio*) είναι ένα μικρόσωμο, σπονδυλωτό, τροπικό είδος ψαριού του γλυκού νερού που προέρχεται από τη Νότια Ασία και ανήκει στην ομοταξία Ακτινοπτερυγίων (Actinopterygii), στην οικογένεια των ψαριών του γλυκού νερού των Κυπρινοειδών (Cyprinidae), της τάξης των Κυπρινομόρφων (Cypriniformes), στο είδος *Danio rerio*, του γένους *Danio*. Βρίσκεται σε ποταμούς (κυρίως του Γάγγη) της περιοχής των Ιμαλαΐων της Νότιας Ασίας, ιδίως της Ινδίας, του Νεπάλ, του Μπουτάν, του Πακιστάν, του Μπαγκλαντές και της Μιανμάρ [112]–[114].



ΕΙΚΟΝΑ 14: Θηλυκό (πάνω) και αρσενικό (κάτω) zebrafish [115].

Χαρακτηριστικό στοιχείο της εμφάνισης του είναι οι εναλλασσόμενες σκουρόχρωμες και ανοιχτόχρωμες οριζόντιες λωρίδες κατά μήκος του σώματος του, οι οποίες μπορούν να παρομοιαστούν με ρίγες ζέβρας απ' όπου προέκυψε και το χαρακτηριστικό του όνομα. Το σχήμα του είναι ατρακτοειδές και πλευρικά συμπιεσμένο, ενώ το στόμα του είναι στραμμένο προς τα επάνω (ΕΙΚΟΝΑ 14). Η αναγνώριση του είδους μπορεί να γίνει, πέρα από τις οριζόντιες λωρίδες, και από την ατελή πλευρική γραμμή που εκτείνεται στη βάση του πτερύγιου της λεκάνης και τα δυο ζεύγη «μουστάκια» (barbels). Τα ψάρια αυτά, συνήθως, εντοπίζονται σε ρηχά, χαμηλής ροής ή στάσιμα υδάτινα περιβάλλοντα, όπως άκρες ρεμάτων, τάφρων, ρυάκια, λίμνες, ποτάμια, ιδιαίτερα δίπλα από ορυζώνες. Συνήθως, προτιμούν ανοιχτές τοποθεσίες με καθαρά νερά και άφθονη βλάστηση στα περιθώρια, ενώ προτιμούν να βρίσκονται, τόσο στην επιφάνεια, όσο και στο βάθος της στήλης νερού [114], [116], [117].

Είναι ευκαιριακοί παμφάγοι καταναλωτές, αλλά η διατροφή τους αποτελείται κυρίως από ζωοπλαγκτόν και έντομα υδρόβιας, αλλά και χερσαίας προέλευσης. Καταναλώνουν σκουλήκια και μια μεγάλη ποικιλία βενθικών και πλαγκτονικών καρκινοειδών. Στη φύση ο χρόνος ζωής τους κυμαίνεται από 3,5 έως 5,5 χρόνια, ενώ σε περιβάλλον εργαστηρίου από περίπου 18 μήνες έως 2 χρόνια. Η εμπορική σημασία αυτού του ψαριού δεν είναι σημαντική, λόγω του μικρού μεγέθους που το καθιστά μη αξιοποιήσιμο για βρώση. Έχει βρεθεί ως αλλόχθονο είδος σε διάφορα μέρη του κόσμου και είναι δημοφιλές ως ψάρι ενυδρείου, καθώς η διατήρηση του δεν είναι ιδιαίτερα απαιτητική [116], [118]–[120].

1.6.1 Zebrafish ως πειραματικό μοντέλο

Η χρήση πειραματόζωων είναι καθοριστικής σημασίας στην εξέλιξη των βιοεπιστημών, καθώς μας επιτρέπει να αποκτήσουμε γνώσεις πάνω σε έναν οργανισμό-μοντέλο και να τις αξιοποιήσουμε στην έρευνα και στην επίλυση ερωτημάτων. Στα συνήθη χρησιμοποιούμενα πειραματικά μοντέλα συγκαταλέγονται, κυρίως, τα ποντίκια, οι αρουραίοι, τα κουνέλια, καθώς και άλλα θηλαστικά και κάποια είδη ψαριών. Το καθένα παρουσιάζει πλεονεκτήματα, αλλά και μειονεκτήματα, όπως για παράδειγμα τα ποντίκια, ενώ αποτελούν ένα κατάλληλο μοντέλο, η πολυπλοκότητα του οργανισμού τους και το κόστος δυσχεραίνουν την αξιοποίησή τους. Η χρήση του zebrafish ενδείκνυται σύμφωνα με τις αρχές 3Rs (**R**eplacement, **R**eduction and **R**efinement-Αντικατάσταση, Μείωση και Βελτίωση), ενώ παρουσιάζει πληθώρα πλεονεκτημάτων, που θα παρουσιαστούν παρακάτω [121], [122].

Από τη δεκαετία του 1950, είχαν αρχίσει να κάνουν την εμφάνισή τους δημοσιεύσεις αναφερόμενες στον οργανισμό zebrafish. Η συμβολή, όμως, της πρωτοποριακής έρευνας του George Streisinger και των συνεργατών του, στις αρχές της δεκαετίας του 1980, ήταν καθοριστική για την εδραίωση του ως πειραματικό μοντέλο. Αποκαλύφθηκε ότι μπορεί να επιβληθεί σε γενετική ανάλυση και χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο εξερεύνησης για τη γενετική μελέτη λειτουργίας και ανάπτυξης του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών. Ραγδαία αύξηση παρατηρήθηκε από τις αρχές του 1990, όταν και χρησιμοποιήθηκε για γενετική εξέταση προς αναζήτηση μεταλλάξεων από τους Christiane Nusslein-Volhard στη Γερμανία και Wolfgang Driever στη Βοστώνη [113], [123]. Στη συνέχεια, το Φεβρουάριο του 2001,

ξεκίνησε ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδιώματος του zebrafish, ο οποίος ολοκληρώθηκε το 2013 από επιστήμονες του Sanger Institute [112].

Τα τελευταία 40 χρόνια, έχει τραβήξει το ενδιαφέρον ως ζωικό μοντέλο και έχει καταστεί δημοφιλές για την αξιοποίηση του στην έρευνα [112]. Ευρεία είναι η χρήση του για τον έλεγχο τοξικότητας, όπως σε μελέτες βιοσυσσώρευσης και επίδρασης περιβαλλοντικών ρύπων, αλλά και στον έλεγχο τοξικότητας φαρμάκων (π.χ καρδιοτοξικότητας, γονοτοξικότητας) και αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας τους [121], [122]. Είναι εξαιρετικό μοντέλο για γενετικές και συμπεριφορικές μελέτες και επιτρέπει ζωντανή απεικόνιση κυττάρων με εφαρμογές στην αναπτυξιακή βιολογία, όπως αγγειογένεση και νευροανάπτυξη. Έχει χρησιμοποιηθεί για τη μοντελοποίηση ασθενειών συμβάλλοντας στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών δημιουργίας τους και στην ανάπτυξη θεραπευτικών φαρμάκων [116], [124]. Η χρήση του μοντέλου zebrafish έχει αξιοποιηθεί στη μελέτη νευροαναπτυξιακών, νευροεκφυλιστικών και ψυχιατρικών διαταραχών, νεφρικών και καρδιαγγειακών παθήσεων και στη μελέτη του καρκίνου [113], [116], [123]–[125].

Τα πλεονεκτήματα του, έναντι άλλων πειραματικών μοντέλων, έχουν συμβάλει καθοριστικά στη συχνή αξιοποίηση του στην έρευνα. Επιγραμματικά, στην ένταξη του ως πειραματικό μοντέλο βοήθησαν το μικρό του μέγεθος, η ταχεία ανάπτυξη, τα καλά χαρακτηρισμένα στάδια ανάπτυξης, η οπτική διαφάνεια των εμβρύων, ο σύντομος κύκλος ζωής, η υψηλή γονιμότητα και εύκολη αναπαραγωγή τους και η φθηνή, εύκολη συντήρηση [122].

Σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί το μικρό τους μέγεθος (3-5 cm), καθώς επιτρέπει την ταυτόχρονη χρήση μεγάλου αριθμού πειραματόζωων, υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες και με χαμηλότερο κόστος σε σύγκριση με άλλα μοντέλα θηλαστικών. Δοκιμές με τη χρήση άλλων πειραματικών μοντέλων χαρακτηρίζονται από υψηλό κόστος, αλλά και χρονοβόρες διαδικασίες διατήρησης αυτών [121].

Ελκυστικό μοντέλο το καθιστά και η υψηλή γονιμότητα των ψαριών αυτών, αφού φαίνεται ότι μπορούν να παράγουν, υπό ιδανικές συνθήκες, περίπου 200 αυγά κάθε περίπου 3-5 ημέρες [121]. Η αναπαραγωγή τους δεν επηρεάζεται σημαντικά από τις εποχές κατά τη διάρκεια του χρόνου, ιδίως σε περιβάλλον εργαστηρίου φαίνεται πως η αναπαραγωγή πραγματοποιείται όλο το χρόνο με μικρά διαλλείματα κάποιων ημερών. Στη φύση η περίοδος αναπαραγωγής έχει

συνδεθεί με την αρχή των μουσώνων, είναι όμως πιθανό αυτό να οφείλεται στη μεγαλύτερη διαθεσιμότητα τροφής που υπάρχει αυτήν την περίοδο [112], [113].

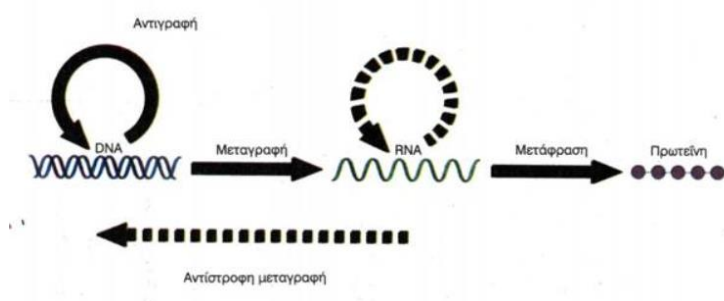
Ο μεγάλος αριθμός ψαριών που μπορεί να προκύψει με μια ωοτοκία δίνει τη δυνατότητα στατιστικά σημαντικού αριθμού στενά συγγενών εμβρύων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ακόμη και σε ένα μόνο πείραμα, όπως για παράδειγμα στην πραγματοποίηση μεταλλαξογένεσης σε μεγάλη κλίμακα και έλεγχο των απογόνων για διαφορετικούς τύπους μεταλλάξεων. Επιπλέον, η γονιμοποίηση και η διαδικασία ανάπτυξης λαμβάνουν χώρα, εκτός της μητέρας, στη στήλη νερού διευκολύνοντας την παρατήρηση και την όποια παρέμβαση και καθιστώντας το κατάλληλο μοντέλο για αναπτυξιακές διαταραχές. Σε αυτό συμβάλει σημαντικά και η οπτική διαφάνεια των εμβρύων, που επιτρέπει τη ζωντανή απεικόνιση του οργανισμού και τη μικροσκοπική παρατήρηση της διαδικασίας της ανάπτυξης, των μορφογενετικών και κυτταρικών διεργασιών [116], [123]. Μετά τη γονιμοποίηση η ανάπτυξη τους είναι εξαιρετικά γρήγορη. Το έμβρυο μέσα σε μόλις 4 μέρες μετατρέπεται σε προνύμφη (λάρβα-larvae), μια μικρή εκδοχή του ενήλικα [113]. Ο σχηματισμός των κύριων οργάνων ολοκληρώνεται εντός περίπου έξι ημερών, ενώ σε περίπου 10 εβδομάδες τα θηλυκά είναι έτοιμα να αναπαραχθούν [126], [127]. Ακόμη, ο σύντομος χρόνος ζωής τους δίνει τη δυνατότητα γενεαλογικής μελέτης που διαρκεί μόνο το 1/3 του χρόνου που απαιτείται για του ποντικιού, αντίστοιχα [116].

Επιπρόσθετα, σημαντικό πλεονέκτημα του οργανισμού είναι η δυνατότητα επιβολής του σε γενετικούς χειρισμούς, που του δίνει και τη δυνατότητα να χρησιμοποιείται έντονα στη βιοϊατρική έρευνα [121]. Μπορεί να πραγματοποιηθεί γενετική ανάλυση μιας συγκεκριμένης γονιδιακής λειτουργίας με διαγονιδιακής τεχνολογίας και knockdown πειράματα [126]. Παράλληλα, το γονιδίωμα του zebrafish έχει πολλές ομοιότητες με αυτό του ανθρώπου. Η γονιδιακή ομολογία φτάνει περίπου το 70%, δηλαδή το 70% των ανθρώπινων γονιδίων έχει τουλάχιστον ένα ομόλογο γονίδιο στο zebrafish, όπως επίσης και το 84% των γονιδίων που σχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες έχουν ομόλογα γονίδια σε αυτό [124], [128]. Τα συστήματα οργάνων του ψαριού, όπως το καρδιαγγειακό, το νευρικό, το πεπτικό, το έμφυτο ανοσοποιητικό, ο εγκέφαλος παρουσιάζουν ομοιότητες με αυτά του ανθρώπου. Εξαιρετικά σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι καλοήθεις και κακοήθεις όγκοι επιδεικνύουν παρόμοια

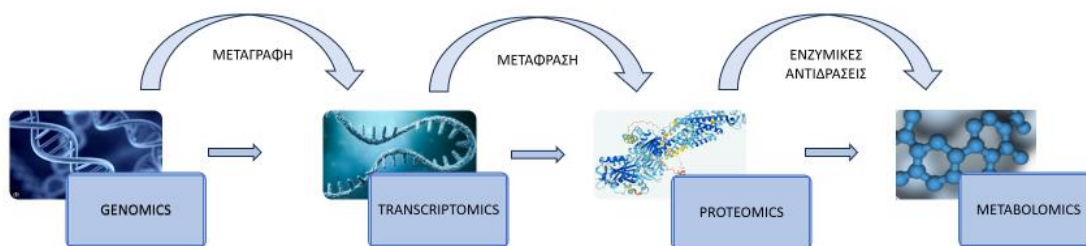
ιστολογία και στα δύο είδη, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η μελέτη του καρκίνου με τη χρήση του μοντέλου αυτού [113], [121], [125].

1.7 -ΟΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ (omics)

Στους ζωντανούς οργανισμούς, η γενετική πληροφορία στα κύτταρα ρέει από το DNA, στο RNA (ριβονουκλεϊκό οξύ) και στις πρωτεΐνες, όπως υπαγορεύεται από το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας (ΕΙΚΟΝΑ 15) [129]. Οι -ομικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για την ολιστική ανάλυση αυτών των μορίων, συμβάλλοντας στη διερεύνηση και ανάλυση μεγάλου όγκου δεδομένων που εκφράζουν τη δομή και τη λειτουργία ενός βιολογικού συστήματος σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο [130]. Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούν υψηλής απόδοσης (high-throughput) τεχνολογίες και αξιοποιούν το σύνολο μοριακών δεδομένων από έναν οργανισμό, όπως υποδηλώνεται και στην ονομασία τους με το επίθημα "omics" που σημαίνει "ως σύνολο" [66], [129]. Η γονιδιωματική (genomics), η μεταγραφωματική/τρανσκριπτομική (transcriptomics), η πρωτεομική (proteomics) και η μεταβολομική (metabolomics) αποτελούν τις «τέσσερις κύριες -ομικές τεχνικές», οι οποίες μελετούν το γονιδίωμα, το μεταγράφημα, το πρωτέωμα και το μεταβόλωμα, αντίστοιχα (ΕΙΚΟΝΑ 16) [130]. Χρησιμοποιούνται στη βιολογία συστημάτων δίνοντας τη δυνατότητα μελέτης της ως ένα ολοκληρωμένο και αλληλεξαρτώμενο σύστημα γενετικών, πρωτεϊνικών, μεταβολικών και βιοσυνθετικών δράσεων [131].



ΕΙΚΟΝΑ 15: Διάγραμμα του κεντρικού δόγματος της βιολογίας.



ΕΙΚΟΝΑ 16: Οι τέσσερις κύριες -ομικές τεχνικές.

Ο συνδυασμός δεδομένων -omics είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την κατασκευή μιας ολοκληρωμένης αιτιώδους σχέσης μεταξύ μοριακών «υπογραφών» και φαινοτυπικών εκδηλώσεων και την ολοκληρωμένη κατανόηση της πολυπλοκότητας των βιολογικών διεργασιών [130]. Με αυτές τις τεχνικές είναι δυνατό να εντοπιστούν αποκρίσεις σε χαμηλά επίπεδα επιβλαβών ουσιών που δεν προκαλούν ακόμη τοξικότητα, αλλά θέτουν κύτταρα ή οργανισμούς υπό στρες. Ο εντοπισμός του κυτταρικού στρες είναι σημαντικός, επειδή η έκδηλη τοξικότητα εμφανίζεται όταν το σύστημα αντιστάθμισης έχει εξαντληθεί [66].

Πλέον, η προσπάθεια απόκτησης γνώσης σε έναν συγκεκριμένο τομέα με την ενσωμάτωση πολλαπλών -ομικών δεδομένων και η πολυπλοκότητα της κυτταρικής συμπεριφοράς οδηγούν στην καθιέρωση νέων τεχνικών [130]. Εκτός των βασικών τεσσάρων -ομικών τεχνικών, εισήχθησαν καινούργιοι όροι αναφερόμενοι, είτε σε νέους τομείς, όπως foodomics που μελετά την επίδραση της διατροφής στην υγεία, immunomics που μελετά την απόκριση και ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος στα παθογόνα, fluxomics που μελετά τους ρυθμούς μεταβολικών αντιδράσεων, είτε σε συγκεκριμένη κατηγορία μορίων, όπως η λιπιδιομική που μελετά τα λιπίδια και η γλυκομική που μελετά τα σάκχαρα [132].

1.7.1 Μεταβολομική

Η έννοια της μεταβολομικής εισήχθη το 1998, όταν ο Steven Oliver και οι συνεργάτες του εισήγαγαν τον όρο ανάλυση μεταβολώματος στη μελέτη τους, όπου συσχέτισαν αποτελέσματα υπερέκφρασης γονιδίων με αλλαγή στη σχετική συγκέντρωση μεταβολιτών. Ο όρος "μεταβολομική" διευκρινίστηκε το 2001 και πλέον θεωρείται ακρογωνιαίος λίθος σε όλη τη βιολογία συστημάτων [132], [133]. Η Μεταβολομική ανήκει στις -omics τεχνικές και στοχεύει στο χαρακτηρισμό του μεταβολώματος, δηλαδή του συνόλου των μεταβολιτών ενός

ορισμένου βιολογικού συστήματος, όπως ένα κύτταρο, ένας ιστός, ένα όργανο ή ένας ολόκληρος οργανισμός [134]. Στους μεταβολίτες περιλαμβάνονται τα οργανικά μόρια χαμηλού μοριακού βάρους (<1500 Da) που λειτουργούν ως υποστρώματα ή προϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων σε ένα κύτταρο ή έναν οργανισμό. Σε αυτά συγκαταλέγονται σάκχαρα, νουκλεοτίδια, οργανικά οξέα, βιταμίνες, αντιοξειδωτικά, αμινοξέα, αλκοόλες, λιπίδια [128]. Πιο συγκεκριμένα, με τη μεταβολομική επιτυγχάνεται ανάλυση των ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων του μεταβολισμού, όπως ενδογενών μεταβολιτών που συνδέονται άμεσα με ενδογενείς ενζυμικές δραστηριότητες που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα, εξωγενών μεταβολιτών που προέρχονται από το περιβάλλον, τρόφιμα, φάρμακα και μεταβολιτών που προέρχονται από τη μικροχλωρίδα του εντέρου [134], [135].

Οι μεταβολίτες παρουσιάζουν διαφορές στη μοριακή τους δομή, διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, δεν είναι ειδικοί για κάθε οργανισμό, ενώ μεγάλος είναι ο αριθμός τους και το εύρος των συγκεντρώσεών τους σε ένα δείγμα (τουλάχιστον έξι τάξεις μεγέθους) [66], [133]. Ο μεταβολισμός είναι δυναμικός και μπορεί να ποικίλλει, τόσο στον ίδιο, όσο και μεταξύ οργανισμών του ίδιου είδους, καθώς επηρεάζεται ποικίλα από περιβαλλοντικούς παράγοντες, διατροφή, τρόπο ζωής, στρες, φαρμακολογικές επιδράσεις, μεταλλάξεις, εμφάνιση παθολογιών. Έτσι, οι πληροφορίες που μας δίνει είναι πιο δύσκολο να ερμηνευθούν, μπορούν όμως να φανερώσουν μια εικόνα της συνολικής κατάστασης της υγείας ενός ατόμου [134].

Οι μεταβολίτες συμμετέχουν σε αντιδράσεις, που απαιτούνται για την ανάπτυξη, τη διατήρηση και τη φυσιολογική λειτουργία ενός κυττάρου και έτσι αποτυπώνουν πιο στενά τις δραστηριότητες του σε λειτουργικό επίπεδο, σε σχέση με την αποτύπωση τους στα γονίδια ή στις πρωτεΐνες και θεωρούνται εξαιρετικοί δείκτες της δραστηριότητας και της κατάστασης του [129], [136]. Οι μεταβολίτες και οι συγκεντρώσεις τους επηρεάζονται, τόσο από γενετικούς, όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, καθώς λειτουργούν ως σημαντικοί βιολογικοί ρυθμιστές για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, με τα επίπεδα τους να μπορούν να θεωρηθούν ως τελική απόκριση των βιολογικών συστημάτων στις γενετικές ή περιβαλλοντικές αλλαγές [135], [137]. Η μεταβολομική μπορεί να καταδείξει την πολύπλοκη σύνδεση της φυσιολογίας με εξωτερικά γεγονότα και συνθήκες, καθώς και την απόκριση σε διαταραχές σχετιζόμενες με ασθένειες. Οι μεταβολίτες μπορούν να αποτελέσουν δηλωτές

νόσου, καθώς συχνά σχετίζονται άμεσα με παθογενετικούς μηχανισμούς [135]. Σε αντίθεση με τα γονίδια και τις πρωτεΐνες, συσχετίζονται ευκολότερα με το φαινότυπο και δρουν ως άμεσες υπογραφές της βιοχημικής δραστηριότητας, καθώς παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου και οι διαταραχές εκτός του φυσιολογικού εύρους είναι συχνά ενδεικτικές αυτής [134]. Για την πλήρη και καλύτερη κατανόηση της πολυπλοκότητας ενός βιολογικού συστήματος μπορεί να αξιοποιηθεί ο συνδυασμός των δεδομένων της μεταβολομικής ανάλυσης μαζί με δεδομένα άλλων -ομικών τεχνικών. Η γονιδιωματική και η μεταγραφωματική συχνά αδυνατούν να ερμηνεύσουν αυτή την πολυπλοκότητα και έτσι παραμένει ένα κενό στον χάρτη από το γονότυπο στο φαινότυπο, στη γεφύρωση του οποίου μπορεί να συμβάλει η μεταβολομική [133].

Κάποιες από τις εφαρμογές της μεταβολομικής αφορούν την υγεία. Στοχεύουν στην εύρεση αξιόπιστων βιοδεικτών για παθολογικές καταστάσεις, με σκοπό την κλινική διάγνωση και την έγκαιρη πρόγνωση ασθενειών, με τον αριθμό των μεταβολιτών που μπορούν να ελεγχθούν με τη μεταβολομική να είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν που καλύπτουν οι υπάρχουσες κλινικές αναλύσεις. Ακόμη, στοχεύουν στην έρευνα για την εφαρμογή και καθιέρωση εξατομικευμένης ιατρικής με κατάλληλη διάγνωση, θεραπεία για το κάθε άτομο και εξατομικευμένο έλεγχο της επίδρασης χορήγησης φαρμάκων, της διατροφής, του τρόπου ζωής και άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων [131]. Οι εφαρμογές της επεκτείνονται, πέρα από την ιατρική, και στην τοξικολογία και περιβαλλοντική παρακολούθηση, με μελέτες σε ζώα και φυτά [134]. Εκεί, η μεταβολομική ανάλυση παρέχει μια εικόνα για τις επιδράσεις των επιβλαβών ουσιών σε οργανισμούς, βοηθώντας στην κατανόηση των μεταβολικών αποκρίσεων στην έκθεση και των μοριακών μηχανισμών αποτοξίνωσης [138]. Η μεταβολομική μπορεί να αποσαφηνίσει τις σχέσεις μεταξύ των διαφορετικών μεταβολιτών και των αντίστοιχων φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων των οργανισμών, μέσω ποσοτικής ανάλυσης μεταβολιτών στον οργανισμό και να ανακαλύψει τις αλλαγές τους σε διαφορετικές καταστάσεις [139]. Επιπλέον, εφαρμογή μπορεί να βρει στη γεωργία, στη μικροβιολογία, στις επιστήμες διατροφής, όπως για παρακολούθηση και αξιολόγηση παραγωγικών διαδικασιών και βιοτεχνολογικών μελετών και στην ανάπτυξη φαρμάκων για αξιολόγηση της ασφάλειας και αποτελεσματικότητας τους.

1.7.2 Λήψη και Επεξεργασία δεδομένων σε μια μεταβολομική ανάλυση

Στην μεταβολομική υπάρχουν δύο προσεγγίσεις, η στοχευμένη (targeted) ανάλυση και η μη στοχευμένη (untargeted) ανάλυση (ΠΙΝΑΚΑΣ 3). Στην περίπτωση της στοχευμένης ανάλυσης πραγματοποιείται εύρεση και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένου αριθμού γνωστών μεταβολιτών για τους οποίους υπάρχει ήδη γνώριμη σχέση ή πιστεύεται ότι σχετίζονται με την κατάσταση ή την ασθένεια που μελετάται. Από την άλλη, η μη στοχευμένη ανάλυση στοχεύει στον προσδιορισμό όσον το δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών, δίνοντας μια συνολική εικόνα. Η αναγνώριση μεταβολιτών, ο χαρακτηρισμός άγνωστων μικρών μορίων και ο χρόνος που απαιτείται για την επεξεργασία των δεδομένων είναι κάποιες από τις προκλήσεις της μη στοχευμένης μεταβολομικής [132].

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Βασικές διαφορές των δύο προσεγγίσεων της μεταβολικής ανάλυσης [133].

Μη στοχευμένη ανάλυση	Στοχευμένη ανάλυση
Ανακάλυψη βιοδεικτών	Επικύρωση βιοδεικτών
Ανάλυση μεγάλου αριθμού μεταβολιτών	Ανάλυση μικρού αριθμού μεταβολιτών
Σχετική ποσοτικοποίηση	Απόλυτη/Σχετική ποσοτικοποίηση
Δυσκολότερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων	Ευκολότερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Οι κοινές αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την απόκτηση δεδομένων στις μεταβολομικές μελέτες είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και η φασματομετρία μάζας (MS), συνήθως σε συνδυασμό με τεχνικές διαχωρισμού, όπως αέρια χρωματογραφία, υγρή χρωματογραφία υψηλής ή υπεραπόδοσης και τριχοειδική ηλεκτροφόρηση. Και οι δύο χαρακτηρίζονται από πλεονεκτήματα, αλλά και μειονεκτήματα γεγονός που τις καθιστά συμπληρωματικές τεχνικές (ΠΙΝΑΚΑΣ 4) [132].

Η NMR είναι μια φασματοσκοπική τεχνική που βασίζεται στην αρχή της απορρόφησης ενέργειας και επανεκπομπής από πυρήνες ατόμων με ιδιοστροφορμή (spin), λόγω διακυμάνσεων σε ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, εκμεταλλευόμενη την ενεργειακή μετάβαση των πυρηνικών spin, παρουσία ομογενούς ισχυρού μαγνητικού πεδίου [140]. Τα προκύπτοντα φασματικά δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το χαρακτηρισμό της χημικής δομής των μεταβολιτών, αλλά και την ποσοτικοποίησή τους [141]. Είναι μία μη επεμβατική, μη

καταστροφική για το δείγμα μέθοδος, ενώ δεν απαιτείται ιδιαίτερη προεργασία αυτού. Επίσης, το γεγονός ότι είναι μια εξαιρετικά αναπαραγώγιμη τεχνική αποτελεί κύριο πλεονέκτημα αυτής, δίνει αναπαραγώγιμα αποτελέσματα με δυνατότητα ποσοτικοποίησης. Μειονεκτήματα της τεχνικής αποτελούν η σχετικά χαμηλή ευαισθησία, συγκρινόμενη με την MS και η χαμηλή φασματική ανάλυση που δυσχεραίνει την ταυτοποίηση σε σύνθετα δείγματα [132]. Χαμηλές κορυφές που αντιστοιχούν σε δυνητικά σημαντικές ενώσεις μπορεί να καλυφθούν από μεγαλύτερες κορυφές άλλων ενώσεων [141]. Ως εκ τούτου, απαιτεί δείγματα με συγκεντρώσεις στο μικρομοριακό εύρος για να είναι σημαντικά τα δεδομένα που συλλέγονται. Έχουν αναφερθεί κάποιες αναλυτικές προσεγγίσεις για την εφαρμογή της NMR, όπως η δισδιάστατη προσέγγιση που προσφέρει τη δυνατότητα βελτίωσης της ευαισθησίας και είναι συμφέρουσα, καθώς παρέχει πρόσθετες πληροφορίες για τα δείγματα. Επιπλέον, NMR υψηλής διαχωριστικότητας με περιστροφή δείγματος υπό μαγική γωνία (HRMAS) έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες, επιτρέποντας την ανάλυση και ημιστερεών δειγμάτων, όπως άθικτων ιστών [12].

Η MS βασίζεται στον ιοντισμό των μορίων και στη συνέχεια στο διαχωρισμό τους με βάση την αναλογία μάζα προς φορτίο (m/z). Έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί στις μεταβολομικές μελέτες με κύριο πλεονέκτημα της τη μεγάλη ευαισθησία (συνήθως πικογραμμομοριακό εύρος). Λόγω της εκλεκτικότητας της έχει χρησιμοποιηθεί σε στοχευμένες μελέτες μεταβολομικής ή για επιβεβαίωση των μεταβολιτών που παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά με NMR [142]. Ωστόσο, πρόκειται για μια καταστροφική ως προς το δείγμα μέθοδο και απαιτείται διαχωρισμός ή καθαρισμός πριν από την τοποθέτηση του, ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα, όπως η καταστολή ιόντων ή η υπερφόρτωση του συστήματος MS. Έτσι, συνήθως, χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τεχνικές χρωματογραφικού διαχωρισμού, όπως με υγρή (LC) ή αέρια (GC) χρωματογραφία. Αυτό το επιπλέον βήμα διαχωρισμού αποσκοπεί σε μείωση της πολυπλοκότητας του βιολογικού δείγματος και ανάλυση διαφορετικών συνόλων μορίων σε διαφορετικό χρόνο [141]. Με την LC επιτυγχάνεται ανάλυση πολικών ενώσεων με υψηλή σχετική μοριακή μάζα, θερμικά ασταθών ή μη πτητικών. Η προετοιμασία του δείγματος είναι εύκολη, ωστόσο απαιτείται μεγάλος χρόνος ανάλυσης και υπάρχει έλλειψη βάσεων δεδομένων. Με την GC επιτυγχάνεται ανάλυση πτητικών, θερμικά σταθερών, πολικών και μη πολικών ενώσεων [12], [139].

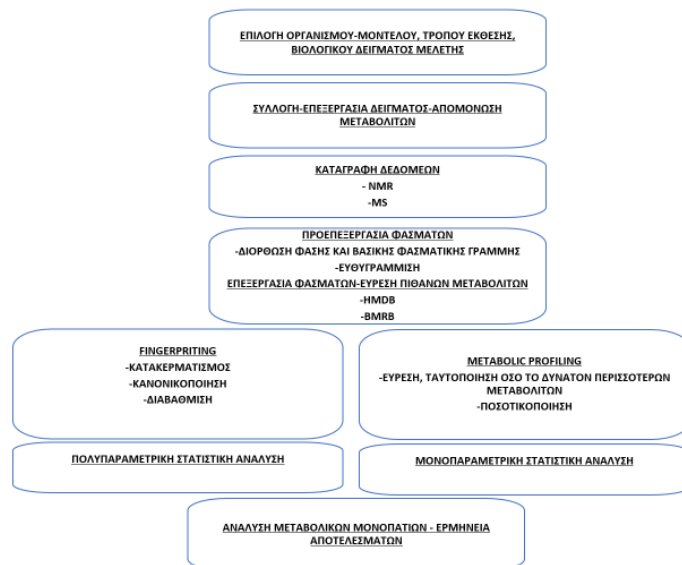
ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Σύγκριση NMR-MS [133], [134], [143].

	NMR	MS
Ευαισθησία	Χαμηλή	Υψηλή
Αναπαραγωγικότητα	Εξαιρετική	Καλή
Όριο ανίχνευσης	Micromolar range	Picomolar range
Ποσοτικοποίηση	Εγγενής	Απαιτεί βαθμονόμηση
Προετοιμασία δείγματος	Ελάχιστη	Αρκετή
Προτεινόμενη χρήση	Μη στοχευμένη ανάλυση	Στοχευμένη ανάλυση

Τα προκύπτοντα αποτελέσματα από αυτές τις αναλύσεις θα πρέπει να επεξεργαστούν, ώστε να μας δώσουν τη χρήσιμη πληροφορία που θα αξιοποιηθεί στη συνέχεια προς όφελος της εκάστοτε μελέτης. Εργαλεία βιοπληροφορικής και στατιστικής μπορούν να βοηθήσουν στην επίτευξη αυτού. Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών είναι απαραίτητη στη μη στοχευμένη ανάλυση, καθώς αυτοί είναι άγνωστοι όταν ορίζεται το βιολογικό πρόβλημα. Ο κατάλογος των «πιθανών μεταβολιτών» μπορεί να δημιουργηθεί χρησιμοποιώντας ελεύθερες βάσεις δεδομένων που αξιοποιούν, είτε το λόγο m/z και τους χρόνους κατακράτησης για δεδομένα MS, είτε τις χημικές μετατοπίσεις για δεδομένα NMR [132]. Η μεταβολομική εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα και την ποιότητα των δημόσιων βάσεων δεδομένων. Η βάση δεδομένων ανθρώπινου μεταβολώματος (Human Metabolome DataBase) είναι ελεύθερα προσβάσιμη και έχει σχεδιαστεί με τη δυνατότητα σύνδεσης με άλλες βάσεις δεδομένων (KEGG, PubChem, MetaCyc, UniProt και GenBank). Άλλες ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων είναι η Biological Magnetic Resonance data Bank (BMRB) και η Metabolite and Tandem MS [141], [144], [145].

Για να βρεθούν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, οι στατιστικές μέθοδοι αποτελούν μέρος της ανάλυσης δεδομένων μεταβολομικής [132]. Η βασική προεπεξεργασία των φασμάτων NMR περιλαμβάνει τη διόρθωση φάσης και βασικής φασματικής γραμμής και την ευθυγράμμιση τους, είτε ως προς την κορυφή του προτύπου αναφοράς, είτε ως προς κάποια άλλη κορυφή αναφοράς. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται μείωση του θορύβου και τα φάσματα γίνονται ευθέως συγκρίσιμα [134]. Πέρα από τη βασική προεπεξεργασία, τα φάσματα θα πρέπει να επεξεργαστούν περαιτέρω, ώστε τα δεδομένα να μετασχηματιστούν σε μορφή κατάλληλη για χρήση στις μετέπειτα στατιστικές αναλύσεις. Στη μη στοχευμένη

μεταβολομική ανάλυση ακολουθούνται δύο προσεγγίσεις, του δακτυλικού αποτυπώματος (fingerprinting) και του μεταβολικού προφίλ (metabolic profiling). Στην πρώτη περίπτωση το φάσμα υφίσταται κατακερματισμό (binning ή bucketing) σε τμήματα μικρού εύρους, συνήθως 0.02-0.04 ppm για βιορευστά και υπολογίζεται η ένταση του καθενός. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται μείωση του αριθμού των μεταβλητών επιτρέποντας ταχύτερη ανάλυση των δεδομένων και αντιστάθμιση των μικροαποκλίσεων στις χημικές μετατοπίσεις. Προκύπτει ένας πίνακας, όπου οι στήλες αντιστοιχούν στις μεταβλητές (ένταση των κορυφών), ενώ οι γραμμές στα διαφορετικά δείγματα. Τα δεδομένα αυτής της μορφής μπορούν να αξιοποιηθούν για πολυπαραμετρική ανάλυση. Για την καλύτερη κατανομή των δεδομένων εφαρμόζεται κανονικοποίηση (normalization) στις γραμμές του πίνακα, ώστε να εξομαλυνθούν διαφορές συγκεντρώσεων, που αποδίδονται στη διαφορετική ποσότητα του προς ανάλυση υλικού ή στην αραίωση και όχι σε αλλαγές στις μεταβολικές αποκρίσεις. Στις στήλες του πίνακα εφαρμόζεται διαβάθμιση (scaling) για την εξισορρόπηση των διακυμάνσεων της έντασης του σήματος που προέρχονται από τη διαφορά στη μέση αφθονία μεταβολιτών. Η διαφορά ενός μεταβολίτη μεγάλης αφθονίας, μεταξύ δειγμάτων παρουσιάζεται συνήθως πιο έντονη, σε σχέση με την αντίστοιχη ενός μεταβολίτη σε χαμηλότερη αφθονία [146]. Η δεύτερη προσέγγιση, αυτή του μεταβολικού προφίλ, έχει ως στόχο την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση όσο το δυνατόν περισσότερων κορυφών, που στη συνέχεια αναλύονται, κυρίως, με μονοπαραμετρική ανάλυση, ώστε να βρεθούν οι διαφορές στις συγκεντρώσεις μεταξύ των δειγμάτων. Μπορούν να αναλυθούν και με πολυπαραμετρική ανάλυση, όμως ολόκληρο το φάσμα περιέχει περισσότερες πληροφορίες από το άθροισμα όλων των μετρήσιμων μεταβολιτών [134], [147]. Έτσι, η στατιστική ανάλυση, συμπεριλαμβανομένης της μονοπαραμετρικής και πολυπαραμετρικής, χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό μεταβολιτών που εκφράζονται σημαντικά και στη συνέχεια συνδέονται με μια βιολογική διαδικασία, μέσω εξειδικευμένων εργαλείων που χαρτογραφούν μεταβολίτες σε γνωστές βιοχημικές οδούς, σύμφωνα με πληροφορίες που συλλέγονται σε βάσεις δεδομένων, όπως η KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [133].



ΕΙΚΟΝΑ 17: Βασικά βήματα κατά τη διεξαγωγή μη-στοχευμένης μεταβολικής ανάλυσης για μελέτη τοξικολογίας.

1.7.2.1 Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση

Τα προκύπτοντα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης χαρακτηρίζονται πολυμεταβλητά, καθώς κάθε δείγμα περιέχει έναν σημαντικό αριθμό μεταβλητών-μεταβολιτών και για καθένα παρακολουθούνται περισσότερες από δύο μεταβλητές. Ο όγκος των δεδομένων είναι πολύ μεγάλος, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η μελέτη για την εύρεση και τη σύγκριση των μεταβλητών στα βιολογικά δείγματα. Για τη μελέτη και ταυτόχρονη παρατήρηση περισσότερων των δύο μεταβλητών χρησιμοποιούνται μέθοδοι πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης που στοχεύουν σε μείωση του όγκου δεδομένων, με τη μικρότερη δυνατή απώλεια πληροφορίας και δίνουν τη δυνατότητα γραφικής αναπαράστασης και έγκαιρης εξαγωγής συμπερασμάτων για τη σχέση μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων [148].

Στη μεταβολομική χρησιμοποιούνται δύο κατηγορίες: οι επιβλεπόμενες (supervised) και οι μη επιβλεπόμενες (unsupervised) μέθοδοι. Στην πρώτη περίπτωση αξιοποιούνται ήδη υπάρχουσες πληροφορίες που κατηγοριοποιούν τα δεδομένα εκ των προτέρων, όπως στην παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) και στην ανάλυση ορθογώνιων προβολών σε λανθάνουσες δομές. Στόχος αυτής της ανάλυσης είναι να προκύψει ένας κανόνας βασισμένος στις υπάρχουσες πληροφορίες που να αντικατοπτρίζει τη διάκριση των δειγμάτων και να

μπορεί να εφαρμοστεί ως δείκτης πρόβλεψης, καταδεικνύοντας τη διαφοροποίηση και σε άγνωστα δείγματα. Στην δεύτερη περίπτωση δεν αξιοποιείται καμία διαθέσιμη πληροφορία. Σε αυτή την κατηγορία συγκαταλέγονται μέθοδοι προβολής, όπως η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis - PCA), η ανάλυση κατά συστάδες και μέθοδοι νευρωνικών δικτύων, όπως οι αυτό-οργανούμενοι χάρτες (Self-Organizing Maps-SOM). Οι μη επιβλεπόμενες μέθοδοι αποτελούν, συνήθως, το πρώτο βήμα στην ανάλυση δεδομένων, βοηθώντας στην οπτικοποίηση αυτών και στην ανακάλυψη πιθανών ακραίων σημείων [134].

Για τη διευκόλυνση της ανάλυσης του συνόλου των μεταβολομικών δεδομένων και του ελέγχου της μεταβλητότητας των δειγμάτων χρησιμοποιείται, συνήθως, PCA [142]. Η PCA αξιοποιείται, κυρίως, ως πρώτο στάδιο ανάλυσης και ελέγχου για δεδομένα μεταβολομικής, προκειμένου να παρατηρηθεί στην κατανομή των δεδομένων στο δειγματικό χώρο, εάν υπάρχουν τάσεις διαχωρισμού μεταξύ των διαφορετικών ομάδων και ακραία σημεία δεδομένων [141]. Στόχος της είναι να αντικατοπτρίσει τη διακύμανση στο αρχικό σύνολο δεδομένων μειώνοντας τον όγκο αυτών, με την προϋπόθεση οι μεταβλητές να συσχετίζονται μεταξύ τους. Η μεταβλητότητα των δεδομένων παρουσιάζεται με τη βοήθεια ενός νέου συνόλου ασυσχέτιστων μεταβλητών, οι οποίες προκύπτουν από γραμμικό συνδυασμό των αρχικών μεταβλητών και ονομάζονται κύριες συνιστώσες (PCs). Προκύπτει ίσος αριθμός καινούργιων μεταβλητών, αλλά όταν υπάρχει σημαντική συσχέτιση μόνο μικρός αριθμός αυτών (2 ή 3) απαιτείται για την εξήγηση του μεγαλύτερου ποσοστού της διακύμανσης του αρχικού συνόλου δεδομένων. Η πρώτη κύρια συνιστώσα-PC1 αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των δεδομένων, ενώ η δεύτερη κύρια συνιστώσα-PC2 τη δεύτερη μεγαλύτερη διακύμανση και ούτω καθεξής. Έτσι, η μεταβλητότητα στο σύνολο των δεδομένων εξηγείται αντικαθιστώντας τις μεταβλητές με έναν πολύ μικρότερο αριθμό ασυσχέτιστων μεταβλητών που αθροιστικά διατηρούν την περισσότερη πληροφορία των αρχικών δεδομένων και μπορεί να οπτικοποιηθεί σε δισδιάστατα ή τρισδιάστατα διαγράμματα (score plots) [149]. Κάθε μεταβλητή συνεισφέρει σε διαφορετικό βαθμό στη διαφοροποίηση. Οι προβολές των μεταβλητών πάνω στις κύριες συνιστώσες ονομάζονται επιβαρύνσεις (loadings) και δείχνουν πόσο συνεισφέρει καθεμιά στη διακύμανση που περιγράφει κάθε κύρια συνιστώσα [142].

1.7.2.2 Μονοπαραμετρική στατιστική ανάλυση

Με τη μονοπαραμετρική στατιστική ανάλυση δίνεται η δυνατότητα εξέτασης κάθε μεταβλητής - μεταβολίτη ξεχωριστά, εύρεσης της συνεισφοράς του στη διαφοροποίηση των δειγμάτων και ανακάλυψης βιοδεικτών. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι οι στατιστικές δοκιμές, η ανάλυση συσχέτισης και οι καμπύλες Λειτουργικών Χαρακτηριστικών Δέκτη (ROC) [134], [141].

Κάθε μεταβολίτης αναλύεται ανεξάρτητα από τους υπόλοιπους, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Διαμορφώνεται η μηδενική υπόθεση (H_0) η οποία υποστηρίζει ότι δύο τυχαία επιλεγμένα δείγματα από δύο πληθυσμούς ανήκουν στην πραγματικότητα στον ίδιο πληθυσμό, με άλλα λόγια ότι ο υπό μελέτη μεταβολίτης συνεισφέρει το ίδιο και στις δύο ομάδες. Η αποδοχή ή απόρριψη αυτής της υπόθεσης βασίζεται στην τιμή σημαντικότητας p . Η τιμή p ορίζεται ως η πιθανότητα, κάτω από την παραδοχή της μηδενικής υπόθεσης, λήψης ενός αποτελέσματος ίσου ή και περισσότερο ακραίου από ότι ήταν στην πραγματικότητα παρατηρήσιμο. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό στατιστικά σημαντικά εκφραζόμενων μεταβολιτών και καθορίζει την τελική βιολογική ερμηνεία. Αν η τιμή της είναι μεγαλύτερη από το επίπεδο σημαντικότητας, συνήθως 0,05 ή 0,01, η μηδενική υπόθεση ισχύει, ενώ αν είναι μικρότερη απορρίπτεται και ο μεταβολίτης θεωρείται στατιστικά διαφορετικός στις ομάδες μελέτης. Όσο μικρότερη είναι η τιμή της, τόσο μικρότερη είναι η αβεβαιότητα ότι η μηδενική υπόθεση δεν απορρίφθηκε λανθασμένα και ότι η μεταβλητή δε βρέθηκε σημαντική, λόγω τυχειότητας. Λόγω του μεγάλου αριθμού μεταβολιτών, συνήθως, πραγματοποιούνται πολλαπλές δοκιμές που αυξάνουν την πιθανότητα ύπαρξης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Έτσι, υιοθετούνται μέθοδοι διόρθωσης, όπως η διόρθωση Bonferroni και η Benjamini-Hochberg, γνωστή ως FDR (False Discovery Rate-ποσοστό ψευδούς ανακάλυψης) [134], [141], [147].

1.7.2.3 Ανάλυση μεταβολικών μονοπατιών

Τελευταίο βήμα αποτελεί η βιολογική ερμηνεία των δεδομένων για να γίνει μια σύνδεση μεταξύ του παράγοντα διαφοροποίησης και της μεταβολικής απόκρισης του οργανισμού [142]. Οι μεταβολίτες που ανιχνεύονται είναι αντιδρώντα, προϊόντα ή ενδιάμεσα παράγωγα μιας ενζυμικής αντίδρασης. Ως μεταβολικό μονοπάτι ορίζεται μία ομάδα μεταβολιτών οι οποίοι σχετίζονται με μία συγκεκριμένη βιολογική διεργασία και συνδέονται με μια αλληλουχία πολλαπλών ενζυμικών αντιδράσεων. Με την ανάλυση μονοπατιών μπορούμε να αποκτήσουμε μια βαθύτερη εξήγηση των αλλαγών που παρατηρούνται, για παράδειγμα μπορούμε να συσχετίσουμε τους μεταβολίτες με βιολογικές διαδικασίες που εμπλέκονται στην παθογένεση μιας νόσου και να ενισχύσουμε την εκλαμβάνουσα πληροφορία από τις παραπάνω μεθόδους [134]. Αξιοποιούνται κατάλληλα εργαλεία και λογισμικά, όπως η MetaboAnalyst που αποτελεί μια συλλογή εργαλείων για την ανάλυση μεταβολικών δεδομένων. Η πλατφόρμα παρέχει τέσσερις κύριες λειτουργικές ενότητες, τη στατιστική ανάλυση (στατιστικές μεθόδους, ανάλυση βιοδεικτών, ανάλυση πολλαπλών παραγόντων/χρονικής σειράς, ανάλυση ισχύος), τη λειτουργική ανάλυση (ανάλυση εμπλουτισμού, ανάλυση μεταβολικής οδού, πρόβλεψη δραστηριότητας μονοπατιού (MS)), την ολοκλήρωση δεδομένων και βιολογία συστημάτων (μετα-ανάλυση βιοδεικτών, ανάλυση κοινής οδού και εξερεύνηση δικτύου) και την επεξεργασία δεδομένων και λειτουργίες χρησιμότητας (μετατροπή σύνθετου αναγνωριστικού, διόρθωση παρτίδων, λιπιδομική και συνδέσεις με διάφορα εργαλεία ανάλυσης φασμάτων) [141]. Έτσι, χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό και την απεικόνιση των μεταβολιτών σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, σύμφωνα με πληροφορίες που συλλέγονται σε βάσεις δεδομένων, όπως η KEGG [133].

Μια συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η Ανάλυση Εμπλουτισμού (Enrichment Analysis - Over-Representation Analysis (ORA)), όπου μέσω στατιστικών μεθόδων βρίσκονται τα στατιστικά σημαντικά μονοπάτια. Η λίστα με τους στατιστικά σημαντικούς μεταβολίτες, των οποίων οι συγκεντρώσεις διαφέρουν μεταξύ των υπό εξέταση ομάδων, αποτελεί τη βάση προκειμένου να βρεθούν τα επηρεασμένα μονοπάτια. Λαμβάνονται όλα τα σχετικά μεταβολικά μονοπάτια, η λίστα των σημαντικά διαφορετικών, αλλά και όλων των μεταβολιτών. Προκύπτει ένας πίνακας ενδεχομένων (contingency table) για το κάθε μονοπάτι,

στον οποίο καταγράφεται ο αριθμός των μεταβολιτών που εντοπίζονται, αλλά και αυτών που δεν εντοπίζονται, και από τις δύο λίστες. Στη συνέχεια, εφαρμόζονται στατιστικά τεστ για τον έλεγχο σημαντικότητας του κάθε μονοπατιού (δοκιμασία χ^2 , Fishers Exact Test-υπεργεωμετρική δοκιμασία) [149]. Στους περιορισμούς αυτής της μεθόδου συγκαταλέγονται το ότι λαμβάνονται υπόψη μόνο οι στατιστικά σημαντικοί μεταβολίτες και αγνοούνται εντελώς οι αλληλεπιδράσεις, θεωρώντας ότι είναι ανεξάρτητοι, τόσο οι μεταβολίτες, όσο και τα μονοπάτια. Μια άλλη μέθοδος είναι η Ανάλυση Σκορ Λειτουργικής Τάξης (Functional Class Scoring), η οποία λαμβάνει υπόψη και μη στατιστικά σημαντικούς μεταβολίτες θεωρώντας πως ένας στατιστικά σημαντικός μεταβολίτης μπορεί να επηρεάσει το μονοπάτι, αλλά και μικρότερες συντονισμένες αλλαγές μη στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών, που σχετίζονται σε μεταβολικό επίπεδο, επηρεάζουν επίσης το μονοπάτι. Τέλος, η Ανάλυση Τοπολογίας Μονοπατιών (Pathway Topology) αξιοποιεί περισσότερες πληροφορίες για τα μονοπάτια λαμβάνοντας υπόψη τις αλληλεπιδράσεις και την εξάρτηση μεταξύ των μεταβολιτών [150].

ΣΚΟΠΟΣ

Η αξιοποίηση βιοπλαστικών εμφανίζεται ως ένας τρόπος για την αποσύνδεση από τη χρήση ορυκτών πόρων και το μετριασμό περιβαλλοντικών κινδύνων που σχετίζονται με τα πλαστικά απόβλητα. Τα βιοπολυμερή έχουν τη δυνατότητα να είναι πιο φιλικά προς το περιβάλλον και λόγω του αυξανόμενου ενδιαφέροντος για την προστασία αυτού, η παραγωγή βιοπλαστικών αυξάνεται με την πάροδο των χρόνων. Ωστόσο, δε γνωρίζουμε με βεβαιότητα, ούτε τη συμπεριφορά τους στο περιβάλλον, ούτε τις επιπτώσεις τους στους οργανισμούς και αν πράγματι μπορούν να συμβάλουν επιτυχώς στην προστασία του υδάτινου οικοσυστήματος από την πλαστική ρύπανση.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης βιοπολυμερών στον οργανισμό-μοντέλο zebrafish μέσω της μεταβολομικής μελέτης του οργανισμού. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα όπου μελετήθηκαν οι αλλαγές στο μεταβόλωμα ενήλικων zebrafish, έπειτα από έκθεση τους σε δύο διαφορετικά βιοπολυμερή: τον πολυ(ηλεκτρικό βουτυλεστέρα) (PBS) και το πολυ(3-υδροξυβουτυρικό οξύ) (PHB). Αναλυτικότερα, διεξήχθη μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση, με την οποία εξετάστηκαν ξεχωριστά οι μεταβολές στα βράγχια, στον εγκέφαλο, στο γαστρεντερικό σωλήνα, στο ήπαρ και στη σάρκα των ψαριών, με στόχο να δοθεί μια συνολική εικόνα της μετακίνησης και επίδρασης τους στον οργανισμό. Για τη μεταβολομική μελέτη χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίων $^1\text{H-NMR}$, λήφθηκαν τα μονοδιάστατα φάσματα και με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) εντοπίστηκαν οι «πιθανοί μεταβολίτες» σε κάθε δείγμα, οι οποίοι δεν ταυτοποιήθηκαν με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας. Επιπλέον, προσδιορίστηκε ο μέγιστος δυνατός αριθμός μεταβολιτών σε κάθε φάσμα. Πραγματοποιήθηκε πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση και πιο συγκεκριμένα Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA), με στόχο την εύρεση και οπτικοποίηση της σχέσης μεταξύ των ατόμων ελέγχου και των ατόμων έκθεσης, καθώς και μεταξύ των αντίστοιχων ιστών από κάθε ομάδα. Επίσης, με μονοπαραμετρική στατιστική ανάλυση ελέγχθηκε η σημαντικότητα της συνεισφοράς των μεταβολιτών, που προσδιορίστηκαν, στη συνολική διαφοροποίηση μεταξύ των ατόμων ελέγχου και έκθεσης, για κάθε βιοπολυμερές. Τέλος, έγινε αντιστοίχιση των

μεταβολιτών με τα εμπλεκόμενα μεταβολικά μονοπάτια, μέσω ανάλυσης εμπλουτισμού και τοπολογίας μονοπατιών και σύγκριση των δειγμάτων ελέγχου και έκθεσης από κάθε υλικό, ώστε να προκύψουν συμπεράσματα για την επίδραση κάθε βιοπολυμερούς στο μεταβόλωμα του zebrafish.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Ηθική

Όλες οι πειραματικές διεργασίες στα ψάρια διεξήχθησαν σύμφωνα με τους εθνικούς κανονισμούς (Οδηγία 2010/63/EE) και εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Ερευνών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η εγκατάσταση zebrafish είναι αδειοδοτημένη και πιστοποιημένη με τον αριθμό άδειας EL33-BIOexp03.

2.2 Αντιδραστήρια – Διαλύτες – Υλικά

Ακολουθεί κατάλογος των αντιδραστηρίων, διαλυτών και υλικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Όλοι οι διαλύτες ήταν αναλυτικής καθαρότητας, τουλάχιστον και σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό.

- ο Πολυ(3-υδροξυβουτυρικό οξύ) [Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] (PHB)], (Fluka Analytical, Sigma Aldrich, Steinheim)
- ο Πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) [Poly (butylene succinate) (PBS)], (Sigma-Aldrich, Taufkirchen Germany)
- ο Μεθανόλη (HPLC grade), (Fisher Scientific, Loughborough, UK)
- ο Χλωροφόρμιο, (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain)
- ο Υπερκάθαρο νερό
- ο Υγρό άζωτο
- ο Δευτεριωμένο νερό (D₂O)
- ο 3-τριμεθυλο-σιλυλο-(2,2,3,3-d₄)-1-προπιονικό νάτριο (TSP-d₄) (Deutero GmbH, Kastellaun, Germany)

2.3 Όργανα – Συσκευές

Ακολουθεί κατάλογος των οργάνων και συσκευών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

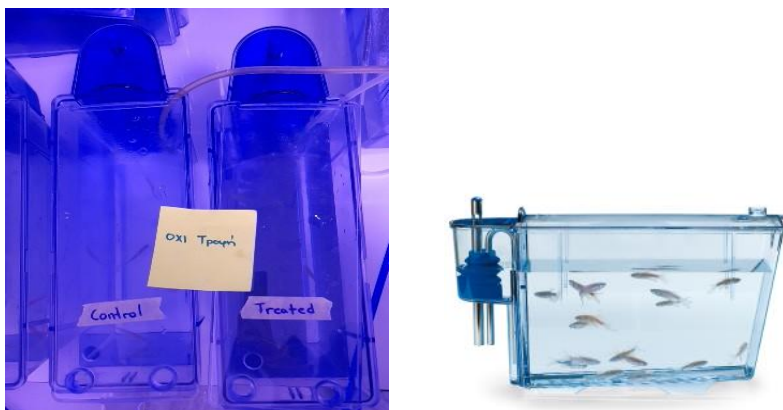
- Συσκευή περιδίνησης, Vortex TK3S (Technokartell, Italy)
- Λουτρό υπερήχων Emmi-D30 (Emag, Germany)
- Φυγόκεντρος PrO-Research (Centurion, Sci., West Sussex, UK)
- Γεννήτρια αζώτου, Micro Nitrogen Generator (Claind S.r.l., Lenno, Italy)
- Απαγωγός με ομαλή, αδιάκοπη, βελτιωμένη ροή, αποστειρωμένου αέρα που έχει φιλτραριστεί (Hood) (distributor of EUROCLONE Fume Hood) (EUROCLONE, Italy)
- Αναλυτικός ζυγός (Shimadzu, Tokyo, Japan)
- Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού, Simplicity® UV ultra pure water purification system
- Φασματόμετρο NMR Bruker AV-500 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) εξοπλισμένο με κρυοκαθετήρα TXI
- Αυτοματοποιημένο σύστημα εκτροφής zebrafish ZebTEC Active Blue, Tecniplast
- Στερεομικροσκόπιο Olympus SZ61, με ψυχρό φωτισμό LED KL 300 L

2.4 Πειραματικές Πορείες

2.4.1 Διατήρηση zebrafish

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ζωολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα zebrafish άγριου τύπου, περίπου 18 μηνών, τα οποία διατηρούνται σε αυτοματοποιημένο σύστημα εκτροφής με αυτόματη ανανέωση νερού στους $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, σε φωτοπερίοδο 14 ώρες φως / 10 ώρες σκοτάδι και ταΐζονται δύο φορές την ημέρα με εμπορική ξηρά τροφή. Το νερό, που περνά στο σύστημα, διέρχεται αρχικά μέσω φίλτρου αντίστροφης ώσμωσης και στη συνέχεια υφίσταται επιπλέον διαδικασία καθαρισμού, διερχόμενο διαδοχικά μέσω διαφορετικών ειδών φίλτρων. Το pH διατηρείται σε τιμές μεταξύ 7-8 και η αγωγιμότητα σε τιμές $500 \pm 50 \mu\text{S/cm}$, με τη βοήθεια ρυθμιστικών διαλυμάτων αλάτων. Για τις ανάγκες του

πειράματος, τα ψάρια διατηρηθήκαν εκτός του συστήματος εκτροφής, σε δεξαμενές χωρητικότητας 3,5 L, με αντλία οξυγόνου, όπου ταΐζονταν μία φορά την ημέρα και εγκλιματίστηκαν στις συνθήκες του πειράματος για μία εβδομάδα, πριν την έναρξη αυτού (ΕΙΚΟΝΑ 18).



ΕΙΚΟΝΑ 18: Δεξαμενές με zebrafish που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

2.4.2 Έκθεση των zebrafish σε PBS

Σε δύο δεξαμενές έγινε προσθήκη τριών λίτρων νερού στην καθεμία και τοποθετήθηκαν από 7 ψάρια μικτού φύλου (4 αρσενικά και 3 θηλυκά). Η πρώτη ομάδα ψαριών αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου (control), η οποία δεν εκτέθηκε στο βιοπολυμερές, ενώ η δεύτερη αποτέλεσε την ομάδα έκθεσης, η οποία εκτέθηκε σε συγκέντρωση 5 mg/L PBS. Κάθε δεύτερη μέρα, τα ψάρια της ομάδας ελέγχου έμεναν σε νηστεία, ενώ στην ομάδα έκθεσης δινόταν το βιοπολυμερές, αντί τροφής. Τις υπόλοιπες ημέρες, τα ψάρια και των δύο ομάδων ταΐζονταν με την απαιτούμενη ποσότητα κανονικής τροφής, ενώ στην ομάδα έκθεσης γινόταν και προσθήκη του βιοπολυμερούς στο νερό κατά την αλλαγή του. Το νερό, και στις δύο περιπτώσεις, ανανεωνόταν καθημερινά με νερό από το σύστημα εκτροφής, με τη διαφορά ότι στην ομάδα έκθεσης γινόταν προσθήκη 15 mg βιοπολυμερούς PBS, είτε ως τροφή, είτε με απλή προσθήκη κατά την αλλαγή του νερού. Συνολικά, η έκθεση τους διήρκεσε 15 ημέρες. Στη συνέχεια, έπειτα από αναισθητοποίηση, ακολούθησε η συλλογή των διαφορετικών οργάνων (εγκέφαλος, ήπαρ, βράγχια, γαστρεντερικός σωλήνας, σάρκα, γονάδες θηλυκών) και τοποθέτηση στην κατάψυξη στους -20°C για αποθήκευση μέχρι την επεξεργασία τους. Για κάθε διαφορετικό ιστό, το σύνολο τους από όλα τα άτομα της ομάδας ελέγχου αποτέλεσε ένα δείγμα, όπως αντίστοιχα και το σύνολο τους από όλα τα άτομα της ομάδας έκθεσης.

2.4.3 Έκθεση των zebrafish σε PHB

Σε δύο δεξαμενές έγινε προσθήκη τριών λίτρων νερού στην καθεμία και τοποθετήθηκαν από 6 αρσενικά ψάρια. Η πρώτη ομάδα ψαριών αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου (control), η οποία δεν εκτέθηκε στο βιοπολυμερές, ενώ η δεύτερη αποτέλεσε την ομάδα έκθεσης, η οποία εκτέθηκε σε συγκέντρωση 5 mg/L PHB. Κάθε δεύτερη μέρα, στα ψάρια της ομάδας έκθεσης δινόταν το βιοπολυμερές με την μορφή σκόνης, αντί τροφής, ενώ τις υπόλοιπες ημέρες ταΐζονταν με την απαιτούμενη ποσότητα κανονικής τροφής και η έκθεση γινόταν μέσω του νερού, με απλή προσθήκη του βιοπολυμερούς κατά την αλλαγή του. Αντίστοιχα, κάθε δεύτερη μέρα τα ψάρια της ομάδας ελέγχου έμεναν σε νηστεία, ενώ τις υπόλοιπες ημέρες, ταΐζονταν με την απαιτούμενη ποσότητα κανονικής τροφής. Το νερό, και στις δύο περιπτώσεις, ανανεωνόταν καθημερινά με νερό από το σύστημα εκτροφής, με τη διαφορά ότι στην ομάδα έκθεσης γινόταν προσθήκη 15 mg βιοπολυμερούς PHB, είτε ως τροφή, είτε με απλή προσθήκη κατά την αλλαγή του νερού. Συνολικά, η έκθεση τους διήρκεσε 15 ημέρες. Στη συνέχεια, έπειτα από αναισθητοποίηση, ακολούθησε η συλλογή των διαφορετικών οργάνων (εγκέφαλος, ήπαρ, βράγχια, γαστρεντερικός σωλήνας, σάρκα) και τοποθέτηση στην κατάψυξη στους -20°C για αποθήκευση μέχρι την επεξεργασία τους. Για κάθε διαφορετικό ιστό, το σύνολο τους από όλα τα άτομα της ομάδας ελέγχου αποτέλεσε ένα δείγμα, όπως αντίστοιχα και το σύνολο τους από όλα τα άτομα της ομάδας έκθεσης.

2.4.4 Εκχύλιση μεταβολιτών

Για την εκχύλιση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή της μεθόδου εκχύλισης Bligh-Dyer, με χρήση των διαλυτών μεθανόλης (MeOH), χλωροφορμίου (CHCl_3) και υπερκάθαρου νερού, σε αναλογία 2:1:1 [151]. Αρχικά, πραγματοποιείται μεταφορά κάθε δείγματος ιστών από την κατάψυξη σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Falcon, προσθήκη 1 ml MeOH και πολτοποίηση αυτού. Στη συνέχεια, το δείγμα υποβάλλεται σε τρεις κύκλους κατάψυξης – απόψυξης, με εμβάπτιση σε υγρό άζωτο και απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου (flash freeze-thaw cycles), ώστε να επιτευχθεί η εξαγωγή των ενδοκυτταρικών μεταβολιτών. Ακολουθούν προσθήκη 1 ml MeOH και 1 ml CHCl_3 , ανάδευση σε συσκευή Vortex και τοποθέτηση σε λουτρό υπερήχων για 5 min. Έπειτα, πραγματοποιείται προσθήκη 1 ml υπερκάθαρου νερού, ανάδευση σε συσκευή Vortex για 30 sec και τοποθέτηση σε λουτρό

υπερήχων για 1 min. Το δείγμα φυγοκεντρείται στα 8000 rpm για 10 min, από όπου προκύπτει ένα διφασικό σύστημα, αποτελούμενο από μια στοιβάδα μεθανόλης - νερού (άνω φάση), που περιέχει τους πολικούς μεταβολίτες και τη χλωροφορμική στοιβάδα (κάτω φάση), που περιέχει τα λιπίδια. Οι δυο φάσεις διαχωρίζονται και φυλάσσονται σε φιαλίδια Eppendorf. Το υπερκείμενο, που περιέχει τους πολικούς μεταβολίτες, είναι αυτό που θα αξιοποιηθεί αργότερα προς μελέτη. Η πορεία μετά το στάδιο της απόψυξης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές, όμως με προσθήκη 0,25 ml διαλυτών αυτή τη φορά, δηλαδή πραγματοποιούνται συνολικά τρεις διαδοχικές εκχυλίσσεις και ακολουθεί εξάτμιση μέχρι ξηρού του συνολικού υπερκείμενου, υπό ομαλή ροή ρεύματος αέριου αζώτου. Τέλος, το υπόλειμμα, μετά την εξάτμιση, τοποθετείται στην κατάψυξη στους -20°C για αποθήκευση μέχρι τη χρήση.

2.4.5 Λήψη φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (1D)

Για τη λήψη των φασμάτων απαιτείται κατεργασία των δειγμάτων από την κατάψυξη. Αρχικά, κάθε υπόλειμμα ξεχωριστά επαναιωρήθηκε σε 600 μL D_2O , αναδεύτηκε σε συσκευή Vortex, τοποθετήθηκε για 10 sec σε λουτρό υπερήχων και έπειτα προστέθηκαν 3 μL TSP-d4 ($0,02 \text{ mmol L}^{-1}$) ως ένωση αναφοράς. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε στα 8000 rpm για 8 min, τοποθετήθηκε σε υάλινο σωληνάκι NMR 5 mm και ακολούθησε η λήψη μονοδιάστατου φάσματος σε φασματογράφο πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού συχνότητας 500 MHz. Το σύστημα ελεγχόταν από το λογισμικό Topspin 4.0.7 της εταιρίας Bruker. Οι συνθήκες λήψης φασμάτων για τα δείγματα των ατόμων ελέγχου και των ατόμων έκθεσης σε PBS ήταν οι εξής:

- ο Παλμικό πρόγραμμα zg30
- ο Καταγραφή φασμάτων στους 298 K
- ο Χρόνος λήψης φάσματος: 2,3396351 sec
- ο Χρόνος πυρηνικής αποκατάστασης: 1 sec
- ο Σημεία δεδομένων: 32 K
- ο Αριθμός σαρώσεων: 256

Ενώ για τα δείγματα των ατόμων ελέγχου και των ατόμων έκθεσης σε PHB οι συνθήκες ήταν οι εξής:

- ο Παλμικό πρόγραμμα zg
- ο Καταγραφή φασμάτων στους 298 K

- Χρόνος λήψης φάσματος: 2,7852800 sec
- Χρόνος πυρηνικής αποκατάστασης: 3 sec
- Σημεία δεδομένων: 32 K
- Αριθμός σαρώσεων: 192

2.4.6 Επεξεργασία δεδομένων

Ο έλεγχος και η επεξεργασία των φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό TopSpin 3.6.5. Η διόρθωση της φάσης και της βασικής φασματικής γραμμής πραγματοποιήθηκε αυτόματα, μετά από μετασχηματισμό Fourier των αποτελεσμάτων και ακολούθησε ευθυγράμμιση των φασμάτων ως προς την κορυφή της ένωσης αναφοράς TSP στα 0 ppm. Πραγματοποιήθηκε καταγραφή των χημικών μετατοπίσεων των κορυφών κάθε φάσματος και στη συνέχεια, με τη χρήση του εργαλείου “chemical shift search” της βάσης δεδομένων BMRB, με την επιλογή αναζήτησης Metabolomics, οι κορυφές αποδόθηκαν στους αντίστοιχους μεταβολίτες. Αναλυτικότερα, στη βάση δεδομένων τοποθετήθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις (ppm) των κορυφών που προέκυψαν από την επεξεργασία των φασμάτων NMR, με το εύρος ανοχής (peak tolerance) να είναι $\pm 0,01$ ppm και για κάθε δείγμα προέκυψε μία λίστα «πιθανών μεταβολιτών» που περιέχονται σε αυτό.

2.4.7 Στατιστική ανάλυση

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε διόρθωση της φάσης και της βασικής φασματικής γραμμής όλων των φασμάτων, καθώς και ευθυγράμμιση των φασματικών κορυφών ως προς τη σταθερή διπλή κορυφή του πρωτονίου του ανωμερούς άνθρακα της α -D-γλυκόζης στα 5.24 ppm, ώστε να είναι ευθέως συγκρίσιμα, μέσω του λογισμικού TopSpin.

Πραγματοποιήθηκε επιλογή και προσδιορισμός του μέγιστου δυνατού αριθμού κορυφών σε κάθε φάσμα, με τη βοήθεια στατιστικών μεθοδολογιών STOCSY (Statistical Total Correlation Spectroscopy) και του λογισμικού Chenomx NMR suite [152]. Ακολούθησε σχετική ποσοτικοποίηση, μέσω της χημειοπληροφορικής εργαλειοθήκης SMolESY_platform (https://github.com/pantakis/SMolESY_platform).

- Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε κατακερματισμός (binning) της περιοχής 0,5–10 ppm κάθε φάσματος, εκτός της περιοχής του νερού (4,6–4,9 ppm) η οποία αφαιρέθηκε, σε σημεία εύρους 0,01 ppm, μέσω της SMolESY_platform και ολοκλήρωση αυτών. Η κανονικοποίηση κρίθηκε μη απαραίτητη, ενώ επιλέχθηκε unit-variance scaling. Τα δεδομένα εξάχθηκαν με τη μορφή πίνακα και εφαρμόστηκε σε αυτά πολυπαραμετρική μη επιβλεπόμενη PCA. Ακόμη, εφαρμόστηκε στοχευμένη PCA λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα δεδομένα από τους μεταβολίτες που προσδιορίστηκαν σε κάθε φάσμα. Όλη η πολυπαραμετρική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού PLS-toolbox της πλατφόρμας MATLAB (<http://www.eigenvector.com>).

- Μονοπαραμετρική στατιστική ανάλυση

Για κάθε μεταβολίτη που προσδιορίστηκε, εφαρμόστηκε μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (one way Analysis of Variance, one way ANOVA), μέσω της πλατφόρμας MATLAB. Έτσι, μπορέσαμε να ελέγξουμε τη διακύμανση κάθε μεταβολίτη συνολικά, μεταξύ των ομάδων ελέγχου και έκθεσης και για τα δύο βιοπολυμερή, καθώς και τη σημαντικότητα της συνεισφοράς του σε διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων ελέγχου και έκθεσης, που αντικατοπτρίζεται από την τιμή p .

2.4.8 Ανάλυση μεταβολικών μονοπατιών

Οι «πιθανοί μεταβολίτες» για κάθε δείγμα εισήχθησαν στο εργαλείο “pathway analysis” της MetaboAnalyst 5.0 και με τη βοήθεια της βιβλιοθήκης: *Danio rerio* (zebrafish) (KEGG) λήφθηκαν τα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία ενέχονται και έγινε σύγκριση αυτών για κάθε ιστό μεταξύ των ομάδων ελέγχου και έκθεσης και για τα δύο βιοπολυμερή.

Για την εύρεση των ενεργών μεταβολικών μονοπατιών χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα Metaboanalyst 6.0, όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση εμπλουτισμού και τοπολογίας μονοπατιών, αξιοποιώντας ως βάση τη λίστα των μεταβολιτών που προσδιορίστηκαν. Οι μεταβολίτες εισήχθησαν στο εργαλείο “pathway analysis” της MetaboAnalyst 6.0 όπου λήφθηκαν, με τη βοήθεια της βιβλιοθήκης: *Danio rerio* (zebrafish) (KEGG), τα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία ενέχονται και οι τιμές p , που δείχνουν την πιθανότητα του κάθε μονοπατιού να είναι ενεργό. Για την ανάλυση εμπλουτισμού επιλέχθηκε το υπεργεωμετρικό

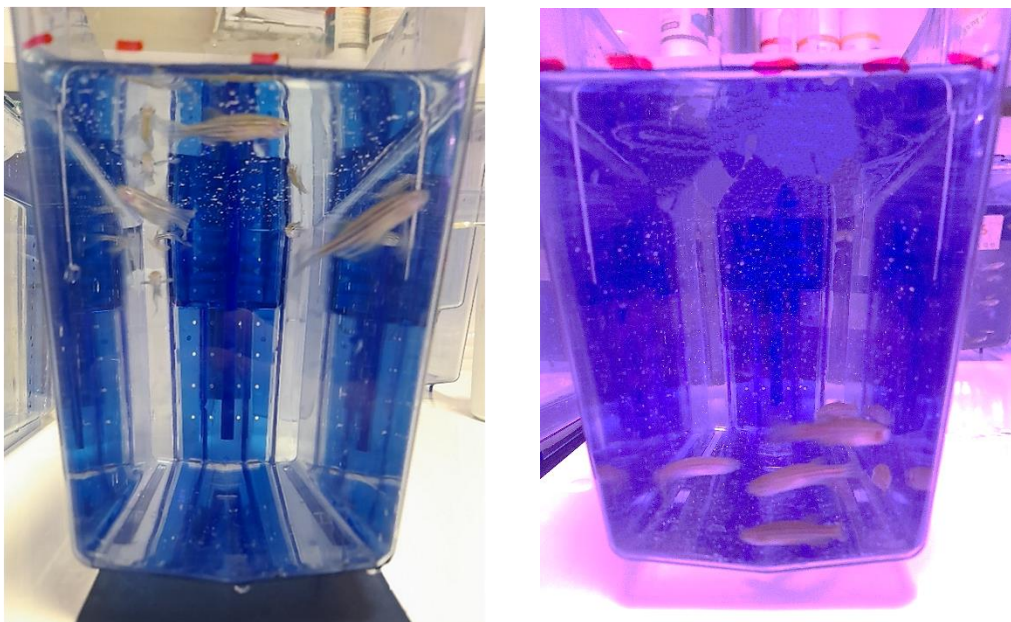
τεστ (Hypergeometric test), ενώ στην ανάλυση τοπολογίας η σημασία κάθε μεταβολίτη υπολογίστηκε σύμφωνα με τον αριθμό των συντομότερων διαδρομών, μεταξύ κάθε ζεύγους μεταβολιτών μέσα στο μονοπάτι, που διέρχονται από αυτόν (betweenness centrality).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

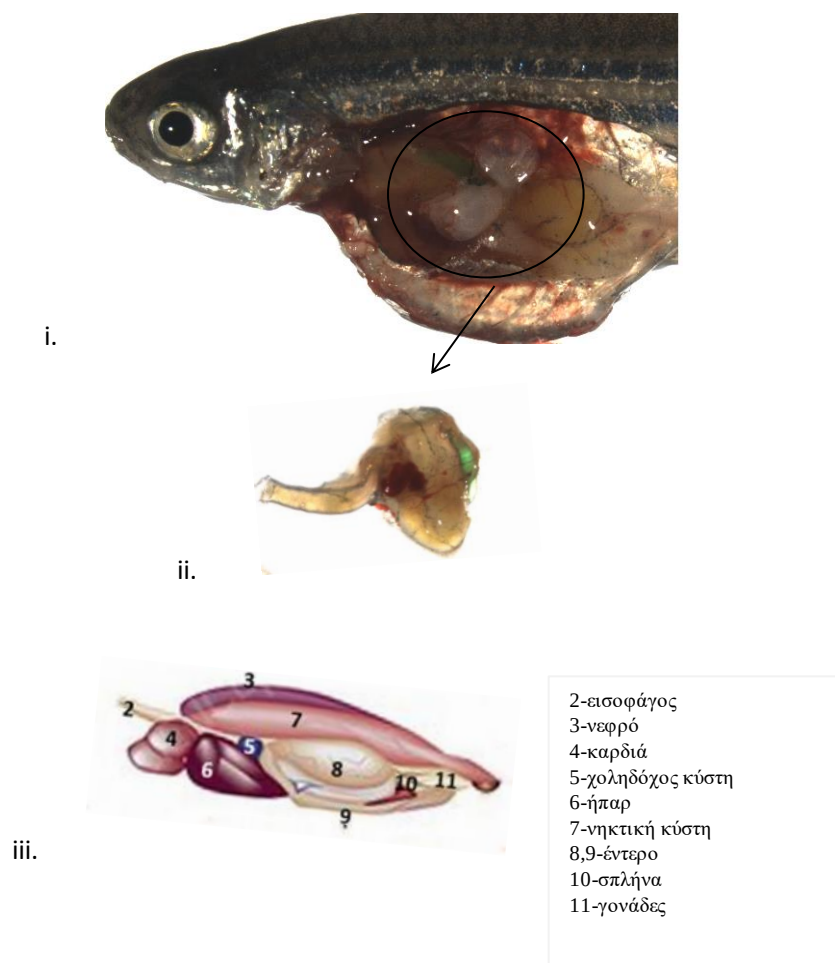
3.1 Οπτική παρατήρηση κατά την έκθεση των zebrafish σε PBS, PHB και κατά τη συλλογή των οργάνων

Κατά τη διάρκεια της έκθεσης, τόσο στο βιοπολυμερές PBS, όσο και στο PHB δεν παρατηρήθηκαν, οπτικά, διαφορές μεταξύ των ατόμων ελέγχου και των ατόμων έκθεσης, καθώς ούτε αλλαγές ή διαφορές στην κινητικότητα, στην όρεξη και στη συμπεριφορά τους στο νερό (ΕΙΚΟΝΑ 19). Τα ψάρια των ομάδων έκθεσης διαπιστώθηκε ότι λάμβαναν το υλικό από το στόμα, λόγω λανθασμένης εκτίμησης του ως τροφή, αλλά και παθητικά κατά τη λήψη της κανονικής τροφής. Κατά την έκθεση σε PHB παρατηρήθηκαν ανοιχτόχρωμα περιττώματα τα οποία, όμως, δεν αξιολογήθηκαν περαιτέρω.

Μετά το πέρας της έκθεσης, ακολούθησε η συλλογή των διαφορετικών οργάνων των ψαριών, έπειτα από αναισθητοποίηση τους. Κατά τη συλλογή, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ή αλλοιώσεις στους ιστούς των ατόμων της ομάδας έκθεσης σε PBS. Σε κάποια από τα άτομα που εκτέθηκαν σε PHB παρατηρήθηκε διάχυτο ήπαρ και διογκωμένη χοληδόχος κύστη (ΕΙΚΟΝΑ 20- 21).



ΕΙΚΟΝΑ 19: Έκθεση των zebrafish σε PBS και PHB, αντίστοιχα.



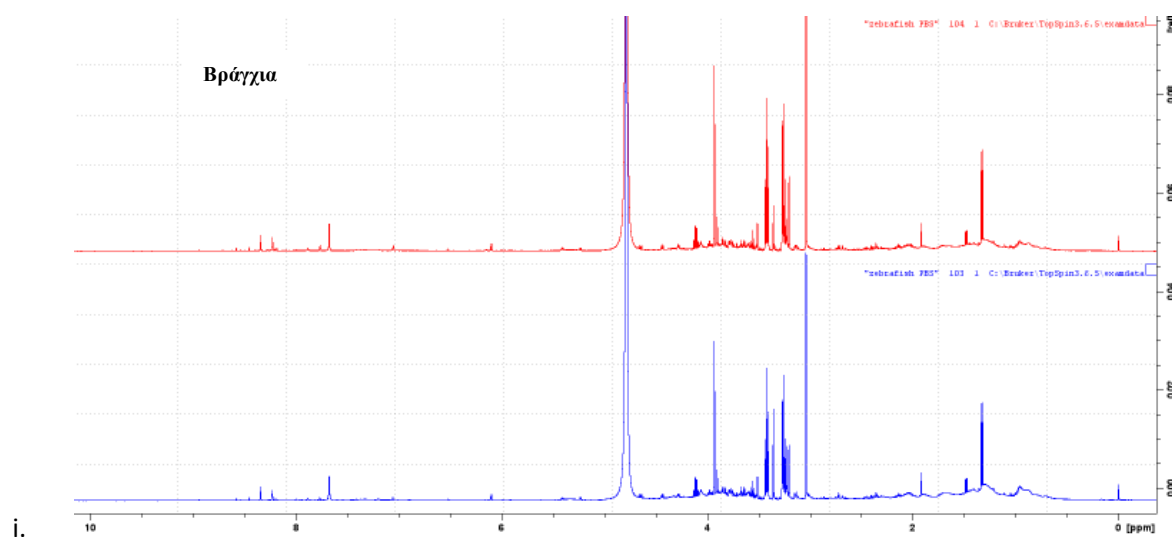
ΕΙΚΟΝΑ 20: Φωτογραφία i. των εσωτερικών οργάνων αρσενικού zebrafish, μετά από τομή ατόμου από την ομάδα ελέγχου, ii. του γαστρεντερικού σωλήνα, όπου δεξιά διακρίνεται η χοληδόχος κύστη, iii. σχηματικής αναπαράστασης των εσωτερικών οργάνων ενήλικου zebrafish [128].



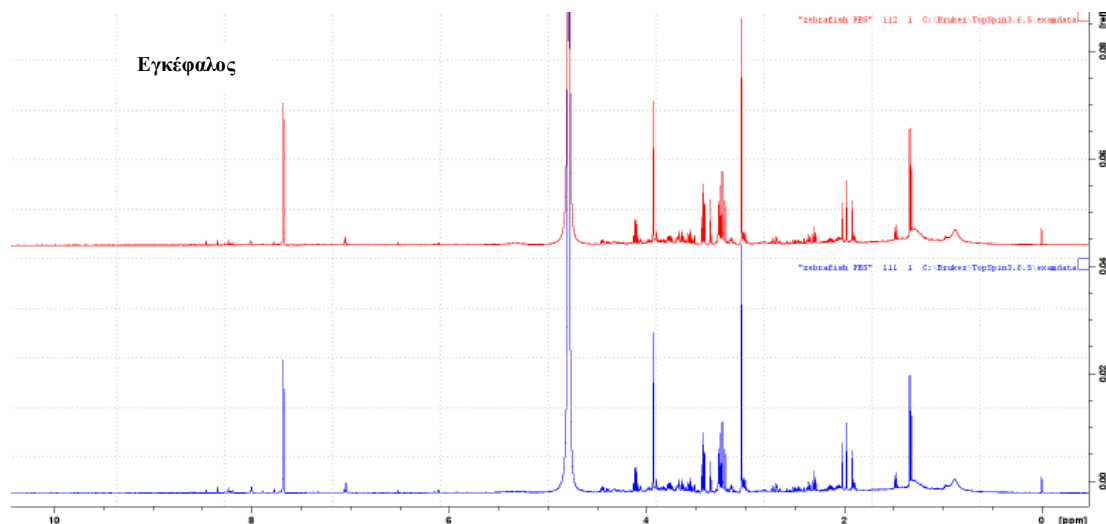
ΕΙΚΟΝΑ 21: Φωτογραφίες των εσωτερικών οργάνων αρσενικών zebrafish, μετά από τομή ατόμων από την ομάδα έκθεσης σε PHB.

3.2 Μελέτη του μεταβολώματος των εκτεθειμένων σε PBS zebrafish

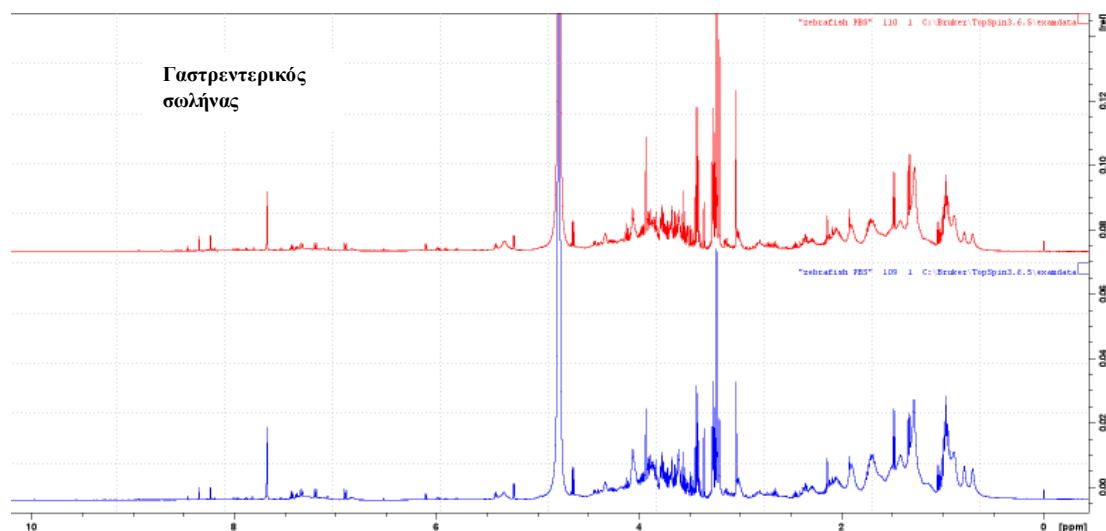
Αρχικά, λήφθηκαν τα μονοδιάστατα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (1D) για το σύνολο των δειγμάτων (ΕΙΚΟΝΑ 22). Εκ πρώτης όψεως, διαπιστώνεται η πολυπλοκότητα αυτών, που οφείλεται στο μεγάλο αριθμό μεταβολιτών, με τις περισσότερες κορυφές να εντοπίζονται περίπου στην περιοχή 4,5-1 ppm. Ωστόσο, με μία πρώτη ματιά δεν εντοπίζονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των φασμάτων, που αντιπροσωπεύουν τα μεταβολώματα των ατόμων ελέγχου και των εκτεθειμένων στο βιοπολυμερές PBS ατόμων.



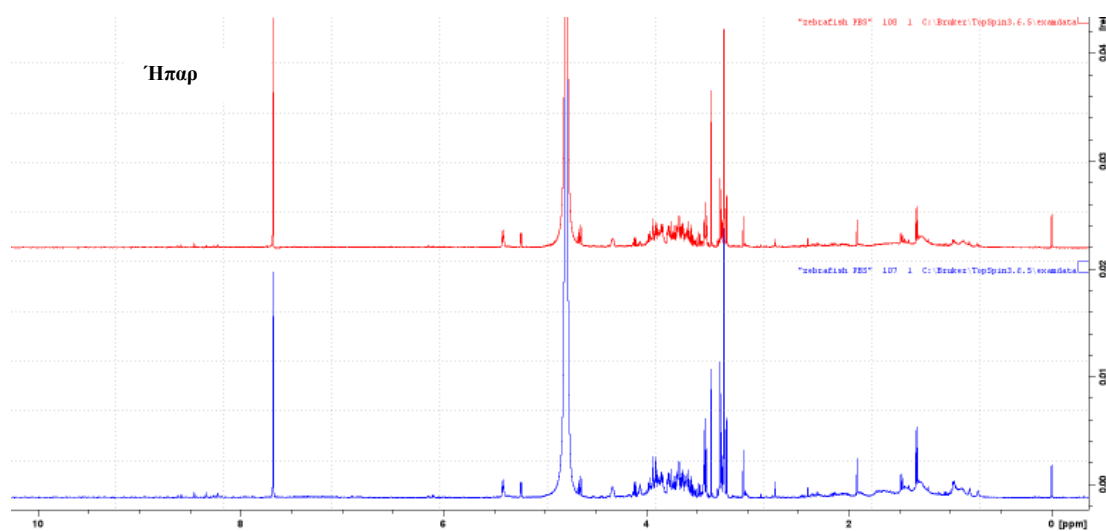
ii.

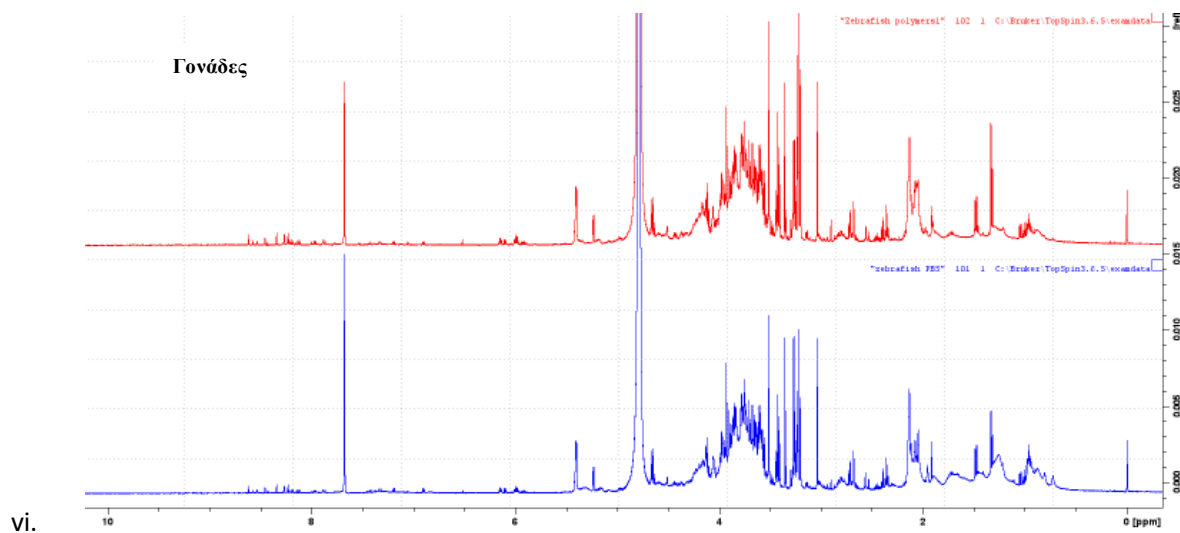
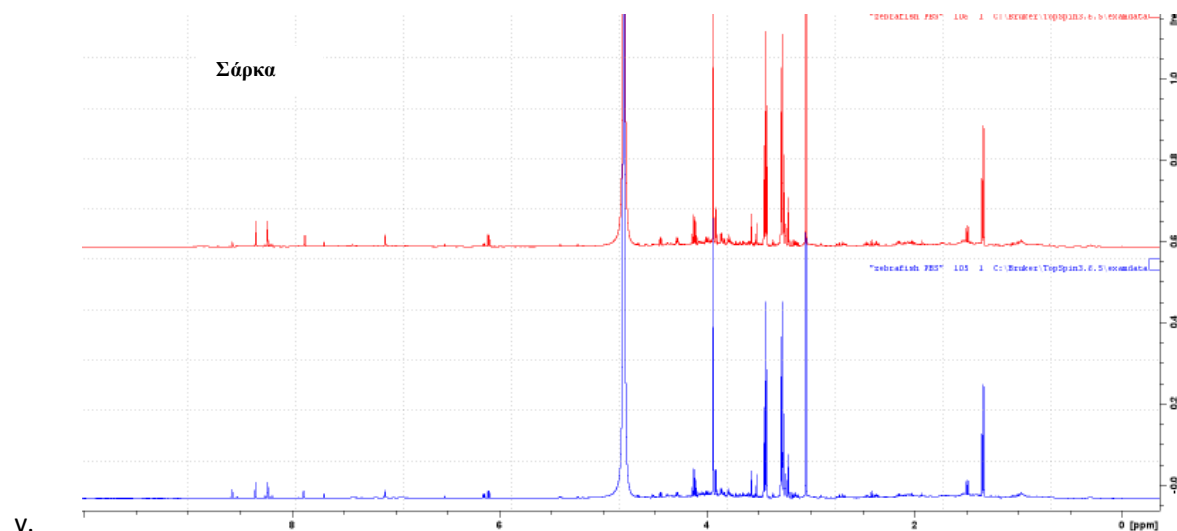


iii.



iv.





ΕΙΚΟΝΑ 22: Φάσματα ^1H -NMR (1D) των δειγμάτων από την ομάδα ελέγχου (μπλε) και από την ομάδα έκθεσης (κόκκινα) σε PBS. Σύγκριση **i)** του δείγματος των **βραγχίων** από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης **ii)** του δείγματος των **εγκεφάλων** από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης **iii)** του δείγματος των **γαστρεντερικών σωλήνων** από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης **iv)** του δείγματος των **ηπάτων** από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης **v)** του δείγματος των **σαρκών** από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης **vi)** του δείγματος των **γονάδων** από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης.

Στη συνέχεια, ακολούθησε επεξεργασία των φασμάτων, από όπου προέκυψε για κάθε δείγμα μία λίστα με τις χημικές μετατοπίσεις (ppm) των φασματικών κορυφών. Από τα δεδομένα αυτά, με τη χρήση της βάσης δεδομένων BMRB, προέκυψαν οι «πιθανοί μεταβολίτες» που περιέχονται σε κάθε δείγμα ξεχωριστά. Αναφέρονται ως «πιθανοί», διότι δεν έχουν

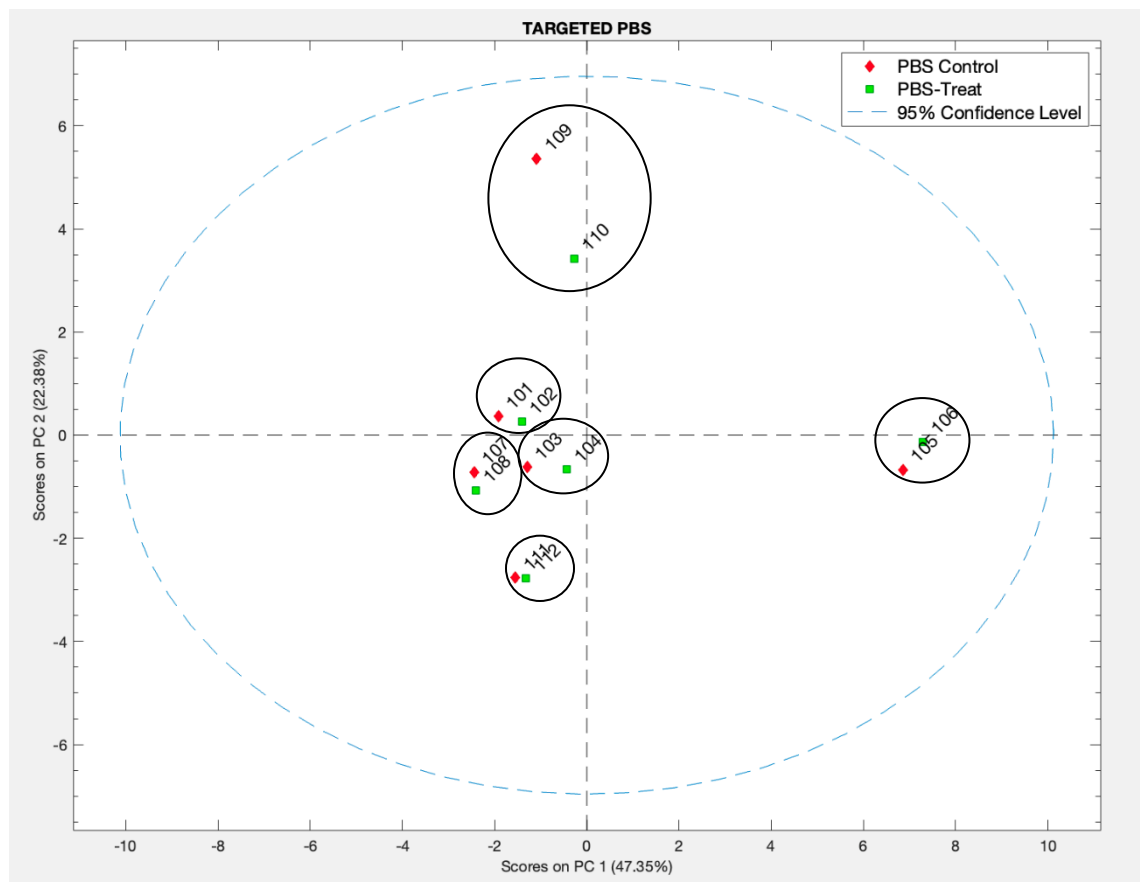
ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και αποτελούν υποψήφιες ενώσεις που θα μπορούσαν να υπάρχουν στα δείγματα, όμως είναι αδύνατον να εντοπιστούν όλες σε κάθε δείγμα. Αναλυτικά οι λίστες με αυτούς τους μεταβολίτες παρατίθενται στο Παράρτημα (ΠΙΝΑΚΕΣ Π1-Π6). Σύγκριση των «πιθανών μεταβολιτών» κάθε δείγματος ιστών από τα άτομα ελέγχου με αυτούς των αντίστοιχων δειγμάτων από τα άτομα έκθεσης φανέρωσε πως οι περισσότεροι εντοπίζονται και στα δύο συγκρινόμενα κάθε φορά δείγματα, ωστόσο, παρατηρούνται κάποιες διαφορές οι οποίες μπορούν να αποδοθούν σε μικροαποκλίσεις των κορυφών και σε θόρυβο.

Ο μέγιστος αριθμός μεταβολιτών που μπόρεσαν να προσδιοριστούν σε κάθε φάσμα ήταν 24 και αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (ΠΙΝΑΚΑΣ 5).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Λίστα των μεταβολιτών που προσδιορίστηκαν σε κάθε φάσμα.

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ
3-υδροξυβουτυρικό οξύ
4-αμινοβουτυρικό οξύ
Οξικό οξύ
Αλανίνη
Κρεατίνη
Κρεατινίνη
Αιθανόλη
Μυρμηκικό οξύ
Φουμαρικό οξύ
Γλουταμινικό οξύ
Γλυκίνη
Ισταμίνη
Ινοσίνη
Μονοφωσφορική Ινοσίνη (IMP)
Ισολευκίνη
Γαλακτικό οξύ
Λευκίνη
Λυσίνη
Μαλτόζη
Μεθανόλη
Ηλεκτρικό οξύ
Ταυρίνη
Τυροσίνη
Βαλίνη

Η PCA εφαρμόστηκε στα δεδομένα, με σκοπό την οπτικοποίηση της κατανομής και μεταβλητότητας τους και την εύρεση της τάσης διαχωρισμού, μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας έκθεσης, καθώς και μεταξύ των αντίστοιχων ιστών από κάθε ομάδα. Αρχικά, εφαρμόστηκε PCA στο σύνολο των δεδομένων, με στόχο να αντικατοπτριστεί η διακύμανση στο αρχικό σύνολο αυτών. Ωστόσο, η ύπαρξη μακρομορίων στα δείγματα αποφέρει ευρεία σήματα στο φάσμα που επηρεάζουν τη βασική φασματική γραμμή, με αποτέλεσμα, ανάλογα με την ποσότητα τους, να επηρεάζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στους μεταβολίτες. Έτσι, δε γνωρίζουμε εάν οι διαφορές που παρατηρούνται οφείλονται σε αλλαγή των μεταβολιτών του δείγματος ή σε διαφορά των μακρομορίων. Οπότε, θεωρούμε ότι η μη στοχευμένη PCA δεν αντικατοπτρίζει αξιόπιστους διαχωρισμούς. Στη συνέχεια, αν και ολόκληρο το φάσμα περιέχει περισσότερες πληροφορίες από το άθροισμα όλων των μετρήσιμων μεταβολιτών, ακολούθησε στοχευμένη PCA, με βάση τα δεδομένα των μεταβολιτών που προσδιορίστηκαν σε κάθε φάσμα, δηλαδή των 24 μεταβολιτών του ΠΙΝΑΚΑ 5 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω (ΣΧΗΜΑ 1).

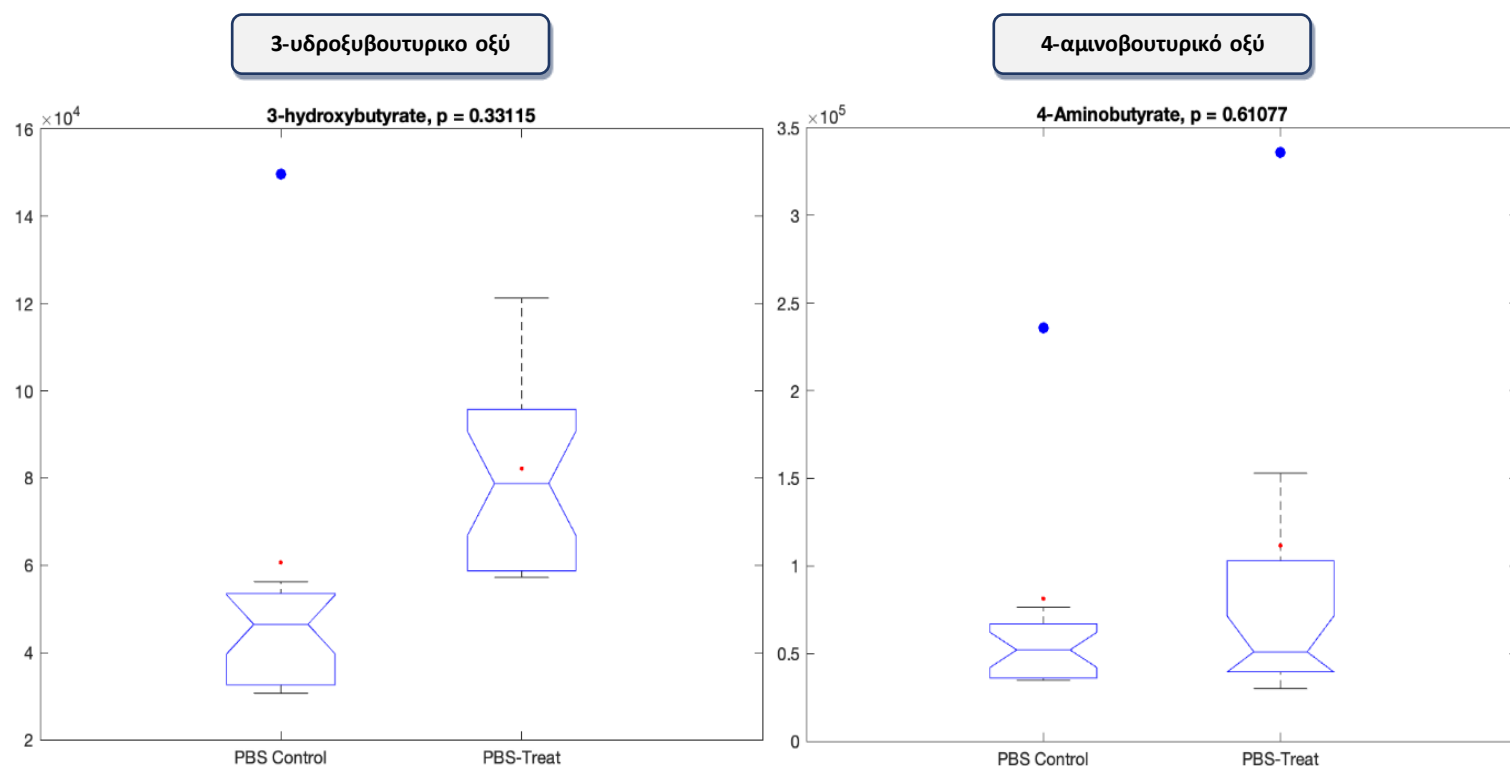


ΥΠΟΜΝΗΜΑ ΣΧΗΜΑΤΟΣ 1	
Συμβολισμός	Ομάδα, Όργανο μελέτης
101	Control Γονάδες
102	Treated Γονάδες
103	Control Βράγχια
104	Treated Βράγχια
105	Control Σάρκα
106	Treated Σάρκα
107	Control Ήπαρ
108	Treated Ήπαρ
109	Control Γαστρεντερικός σωλήνας
110	Treated Γαστρεντερικός σωλήνας
111	Control Εγκέφαλος
112	Treated Εγκέφαλος
†treated: εκτεθειμένα στο βιοπολυμερές	

ΣΧΗΜΑ 1: Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνιστωσών δύο διαστάσεων που απεικονίζει την κατανομή των δεδομένων για κάθε ιστό από τις ομάδες ελέγχου και έκθεσης σε PBS. Τα κόκκινα σημεία παριστάνουν τα διαφορετικά δείγματα ιστών από την ομάδα ελέγχου, ενώ τα πράσινα σημεία τα διαφορετικά δείγματα ιστών από την ομάδα έκθεσης σε PBS.

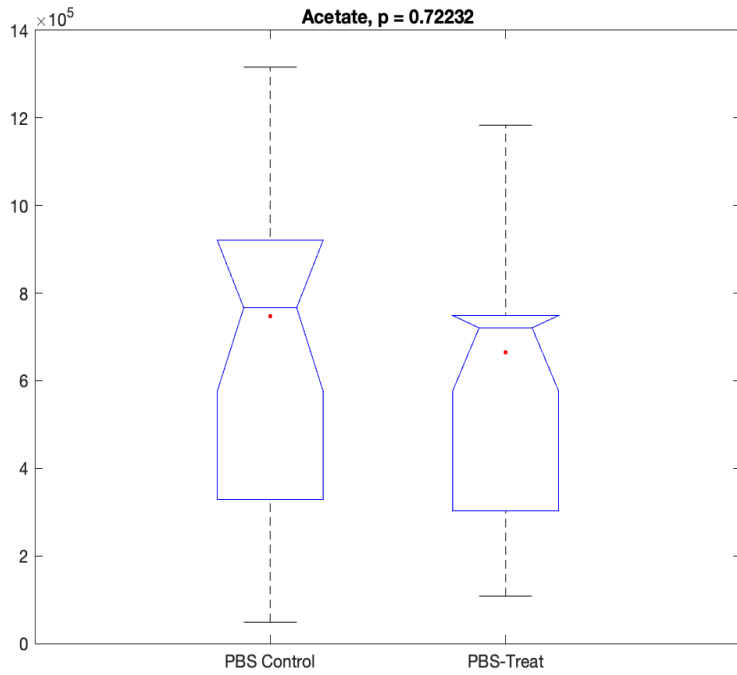
Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες περιγράφουν ένα μεγάλο μέρος της μεταβλητότητας των δεδομένων, καθώς αθροιστικά εξηγούν περίπου το 70% της συνολικής πληροφορίας, με την PC1 να εκφράζει το 47,35% και την PC2 το 22,38%. Η PCA πραγματοποιήθηκε με στόχο την εύρεση τάσης κατηγοριοποίησης μεταξύ των δειγμάτων από την ομάδα ελέγχου και αυτών από την ομάδα έκθεσης σε PBS. Δεν παρατηρείται κατηγοριοποίηση των δύο ομάδων, ωστόσο διακρίνεται ένας μικρός διαχωρισμός μεταξύ των δειγμάτων αντίστοιχων ιστών από κάθε ομάδα, όπως απεικονίζεται στο ΣΧΗΜΑ 1. Κάθε δείγμα οργάνων από τα άτομα της ομάδας ελέγχου εμφανίζεται σε όλες τις περιπτώσεις (εκτός των δειγμάτων ήπατος) αριστερά σε σχέση με το αντίστοιχο δείγμα από τα άτομα της ομάδας έκθεσης. Τα δείγματα **103-104** που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα βραγχίων από τα άτομα της ομάδας ελέγχου και έκθεσης, αντίστοιχα και τα **109-110** που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα γαστρεντερικών σωλήνων από τα άτομα της ομάδας ελέγχου και έκθεσης, αντίστοιχα φαίνεται να απέχουν μεταξύ τους τις μεγαλύτερες αποστάσεις ως προς την PC1. Ωστόσο, η απόσταση μεταξύ των ομάδων ελέγχου και έκθεσης, στην περίπτωση των δειγμάτων γαστρεντερικών σωλήνων είναι μεγάλη και ως προς την PC2. Ο διαχωρισμός μεταξύ των δειγμάτων **101-102** και **105-106** που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα γονάδων από τα άτομα της ομάδας ελέγχου και έκθεσης, αντίστοιχα και τα δείγματα σαρκών από τα άτομα της ομάδας ελέγχου και έκθεσης, αντίστοιχα είναι ελάχιστος, ενώ μεταξύ των δειγμάτων **107-108** που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα ηπάτων από τα άτομα της ομάδας ελέγχου και έκθεσης, αντίστοιχα και των **111-112** που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα εγκεφάλων από τα άτομα της ομάδας ελέγχου και έκθεσης, αντίστοιχα είναι αμελητέος. Ελάχιστος διαχωρισμός ως προς την PC2 παρατηρείται μεταξύ των δειγμάτων **105-106** και **107-108**, ενώ σημαντικός διαχωρισμός φαίνεται μεταξύ των **109-110** που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα γαστρεντερικών σωλήνων από τα άτομα της ομάδας ελέγχου και έκθεσης, αντίστοιχα. Οπότε, σύμφωνα με την τάση διαχωρισμού που αποτυπώνεται στην PCA, συμπεραίνουμε ότι το όργανο που επηρεάστηκε περισσότερο από την έκθεση σε PBS ήταν ο γαστρεντερικός σωλήνας. Ωστόσο, ο κάθε ιστός αντιπροσωπεύεται από ένα μόνο δείγμα, αποτελούμενο από 7 όργανα, ένα από κάθε ψάρι (εκτός του δείγματος γονάδων) και τα δεδομένα αποκτήθηκαν για το σύνολο αυτών με μία μέτρηση. Έτσι, η έλλειψη περισσότερων δειγμάτων για το καθένα και η φύση της PCA δεν προσδίδουν μεγάλη αξιοπιστία σε αυτές τις διαφορές, οι οποίες είναι ενδεικτικές και θα μπορούσαν να θεωρηθούν αποτελέσματα μιας προκαταρκτικής μελέτης, χρήζοντας περαιτέρω έρευνας.

Ακολούθησε μονοπαραμετρική ανάλυση και πιο συγκεκριμένα μονόδρομη ANOVA, ώστε να εξεταστεί ξεχωριστά ο κάθε μεταβολίτης για τη συνεισφορά του στη διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων ελέγχου και έκθεσης σε PBS. Με αυτήν την ανάλυση, μελετήθηκαν οι μεταβολίτες του ΠΙΝΑΚΑ 5. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή θηκογραμμάτων και η αντίστοιχη τιμή p δείχνει τη σημαντικότητα της διακύμανσης ενός μεταβολίτη μεταξύ των δύο ομάδων. Τα θηκογράμματα παρουσιάζουν ξεχωριστά τη διασπορά κάθε μεταβολίτη στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα έκθεσης, επιτρέποντας τη σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών ομάδων και η τιμή p αποτελεί κριτήριο για την αποδοχή ή απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης, η οποία υποστηρίζει ότι δύο τυχαία επιλεγμένα δείγματα από δύο πληθυσμούς ανήκουν στην πραγματικότητα στον ίδιο πληθυσμό, με άλλα λόγια ότι ο υπό μελέτη μεταβολίτης συνεισφέρει το ίδιο και στις δύο ομάδες.



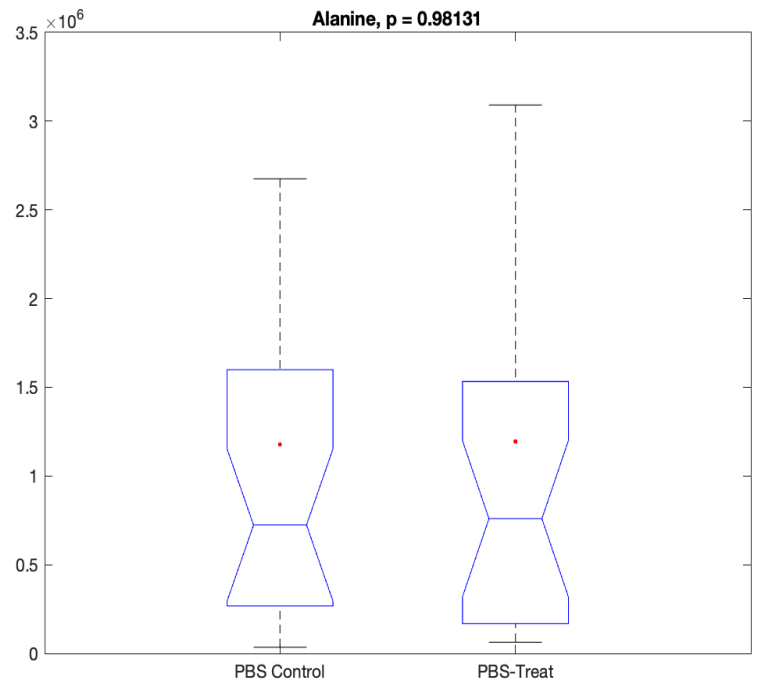
Οξικό οξύ

Acetate, $p = 0.72232$



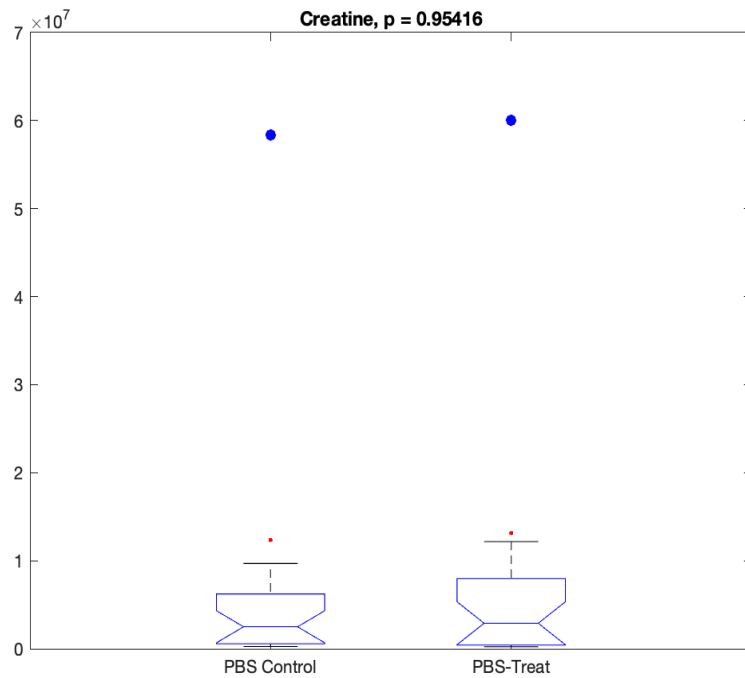
Αλανίνη

Alanine, $p = 0.98131$



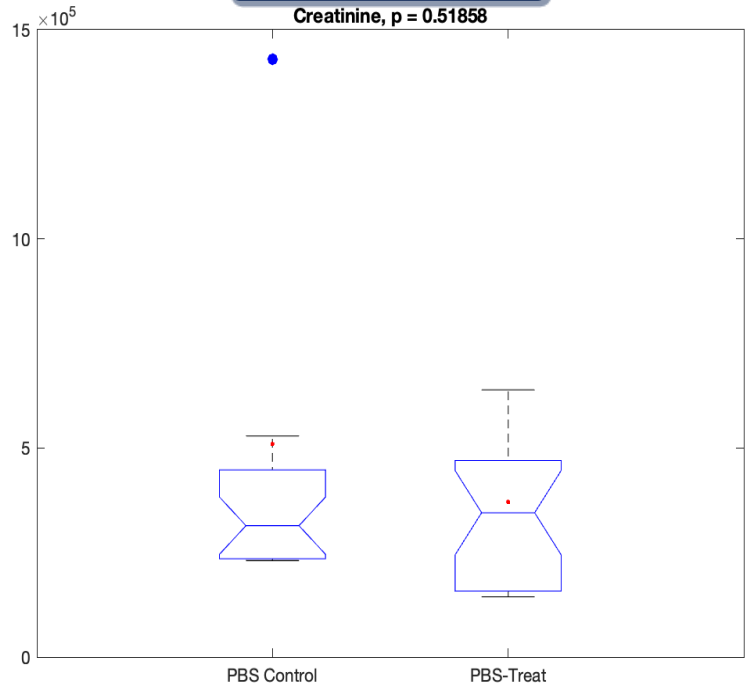
Κρεατίνη

Creatine, $p = 0.95416$



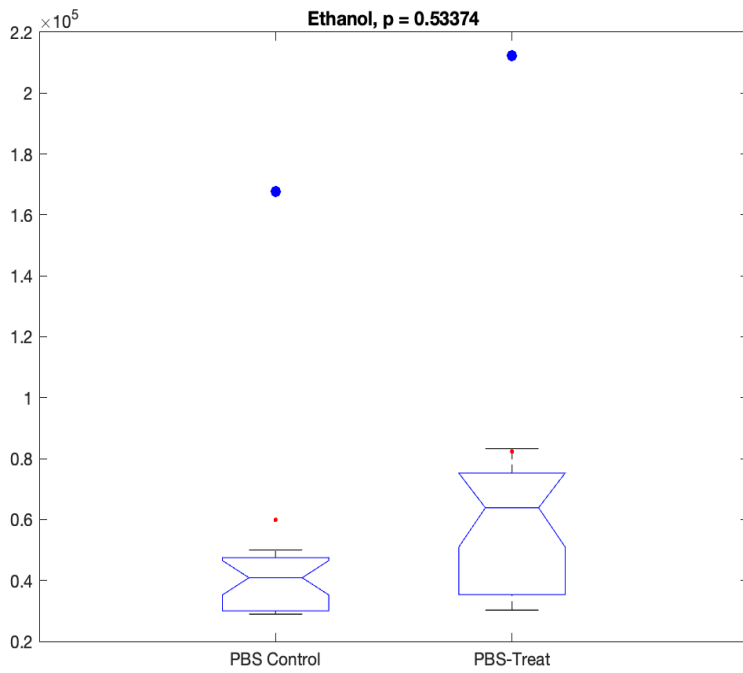
Κρεατινίνη

Creatinine, $p = 0.51858$



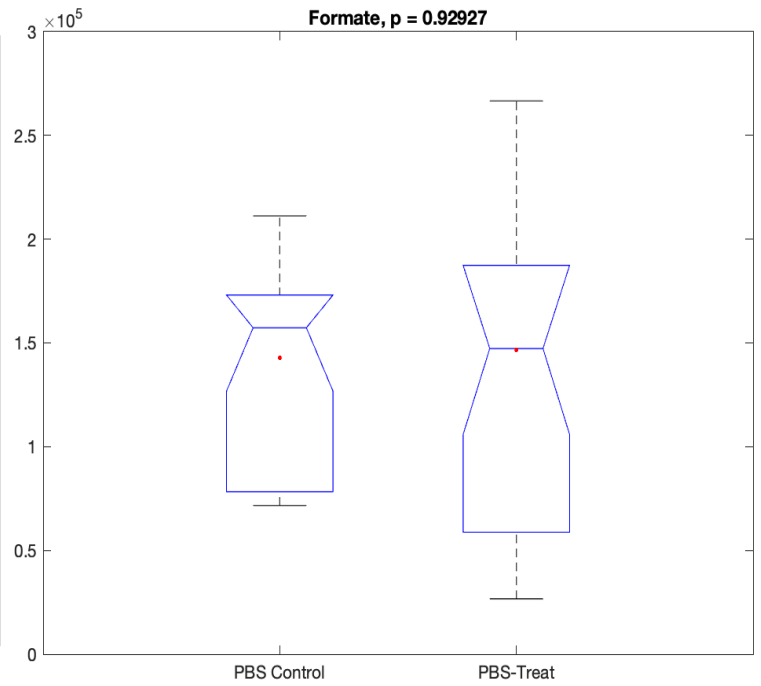
Αιθανόλη

Ethanol, $p = 0.53374$



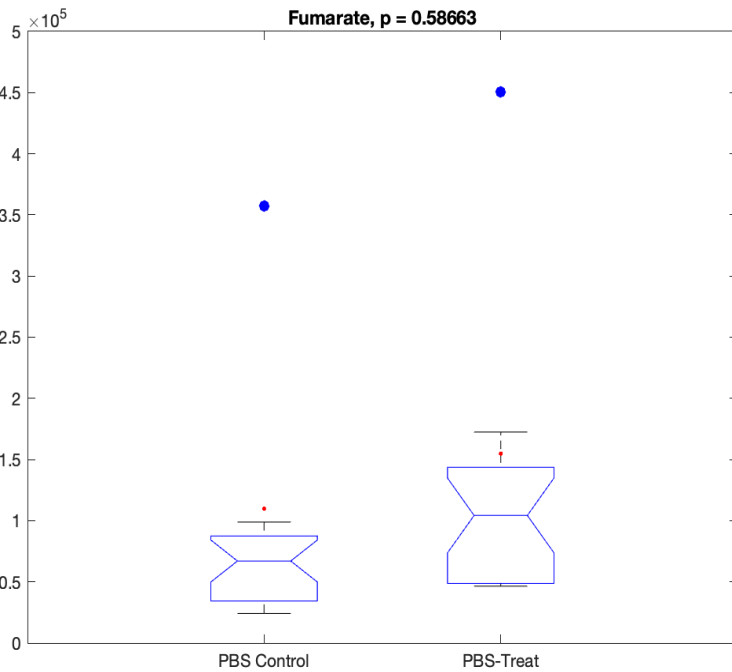
Μυρμηκικό οξύ

Formate, $p = 0.92927$



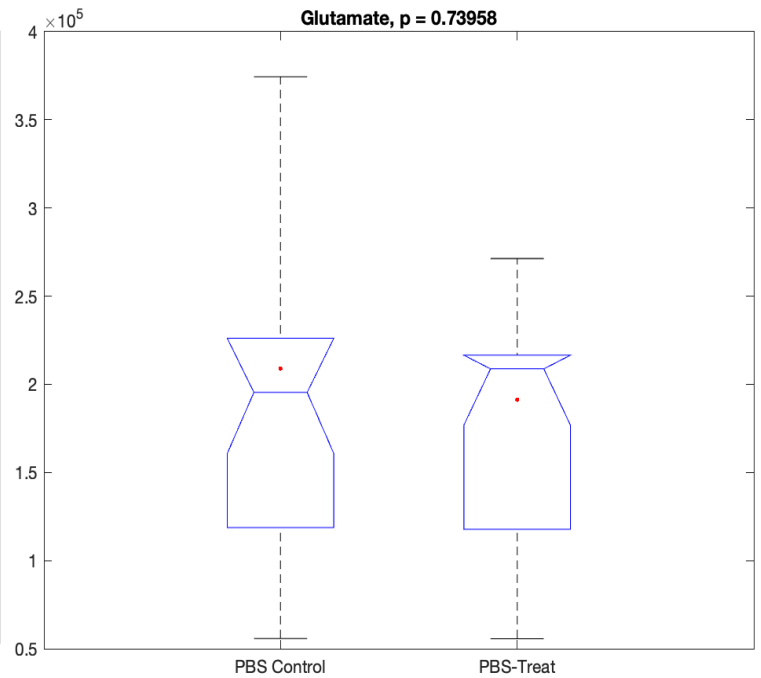
Φουμαρικό οξύ

Fumarate, $p = 0.58663$

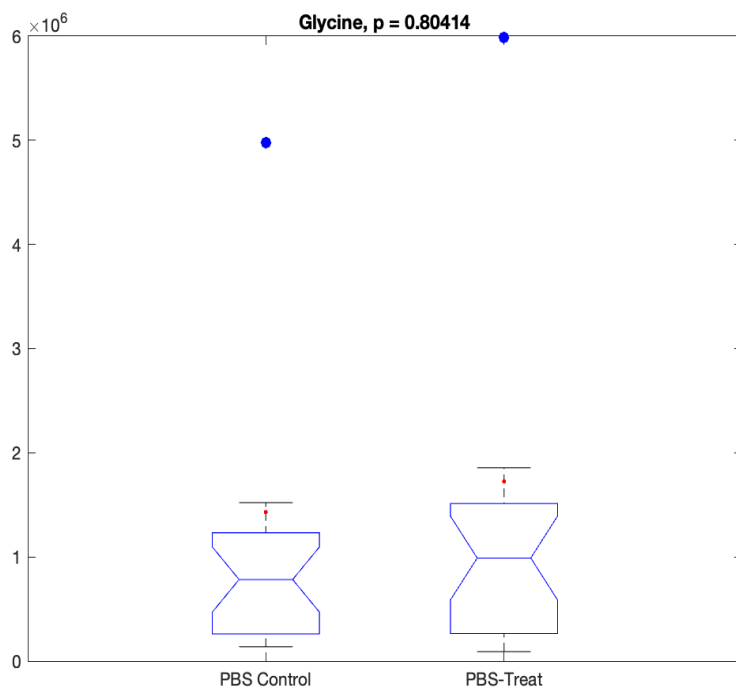


Γλουταμινικό οξύ

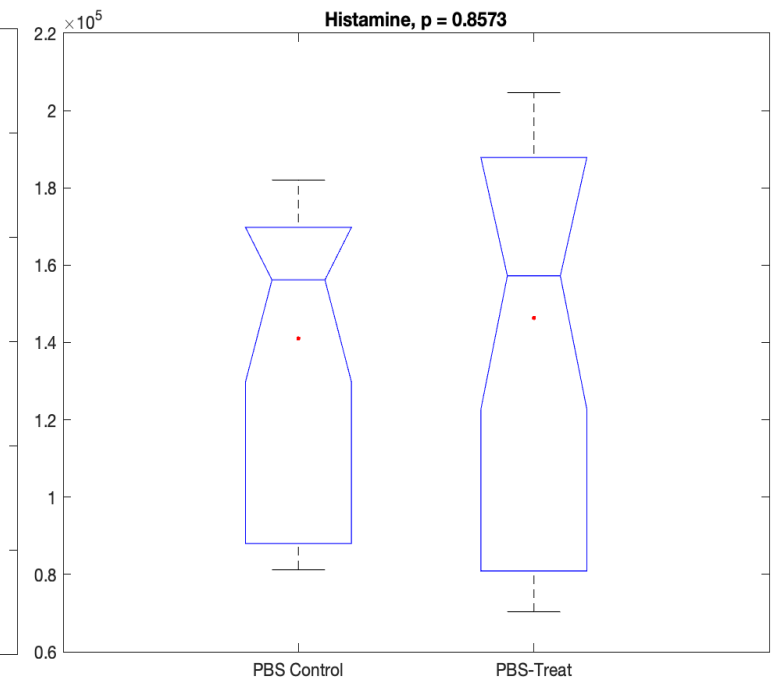
Glutamate, $p = 0.73958$



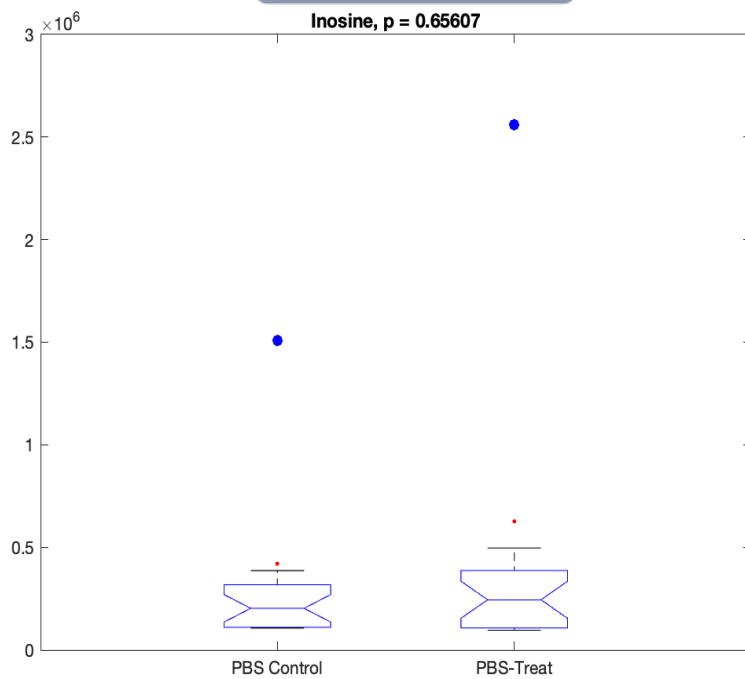
Γλυκίνη



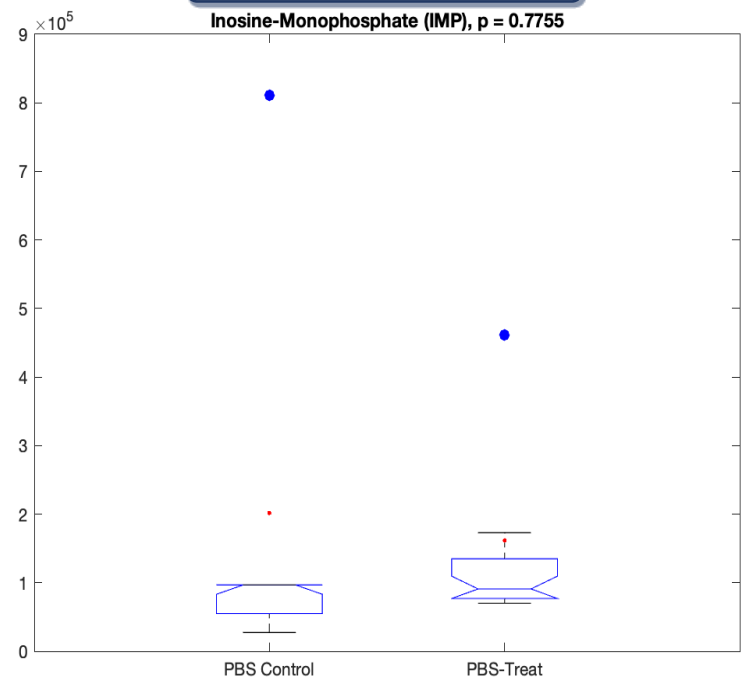
Ισταμίνη



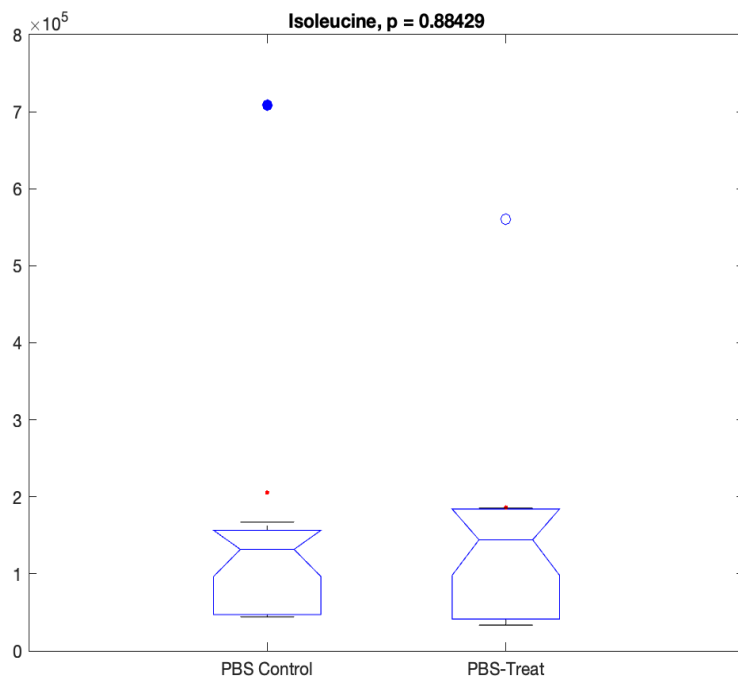
Ινοσίνη



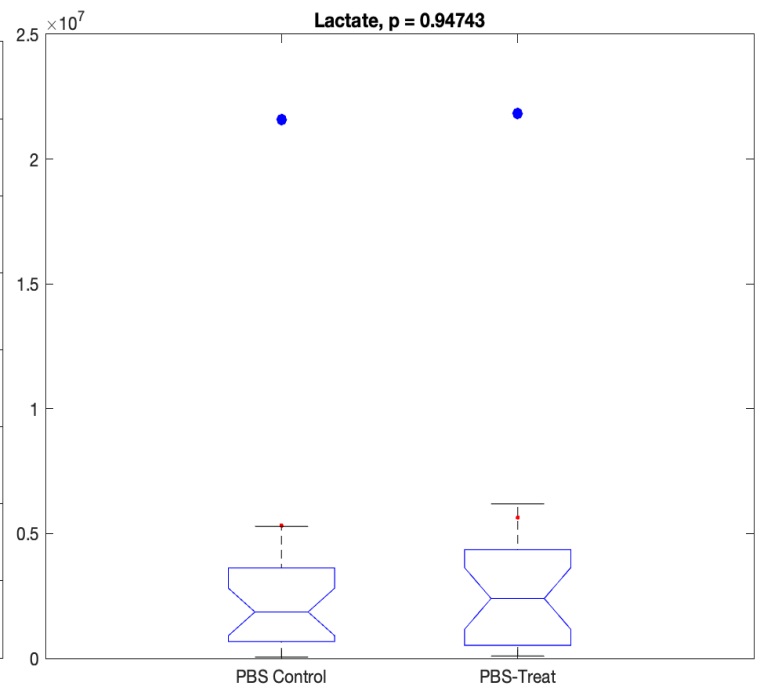
Μονοφωσφορική Ινοσίνη (IMP)



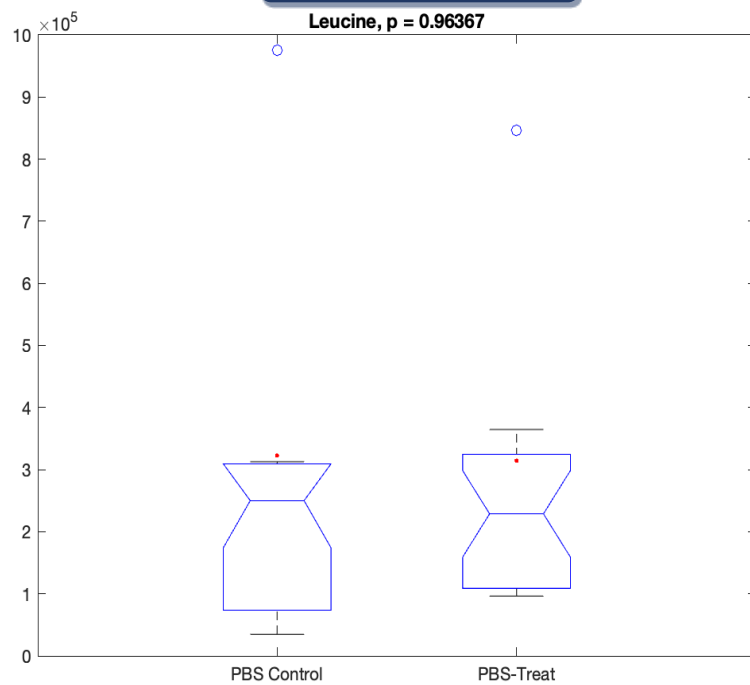
Ισολευκίνη



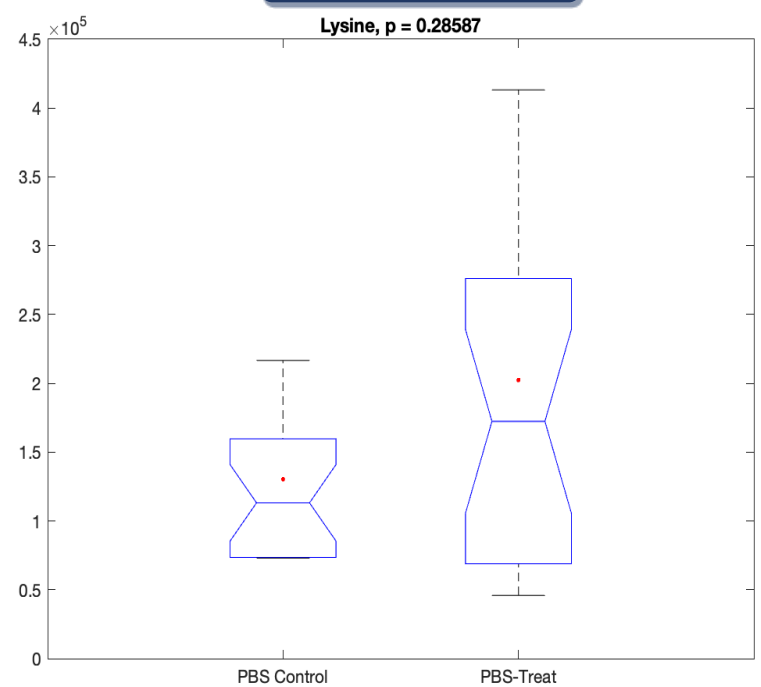
Γαλακτικό οξύ



Λευκίνη

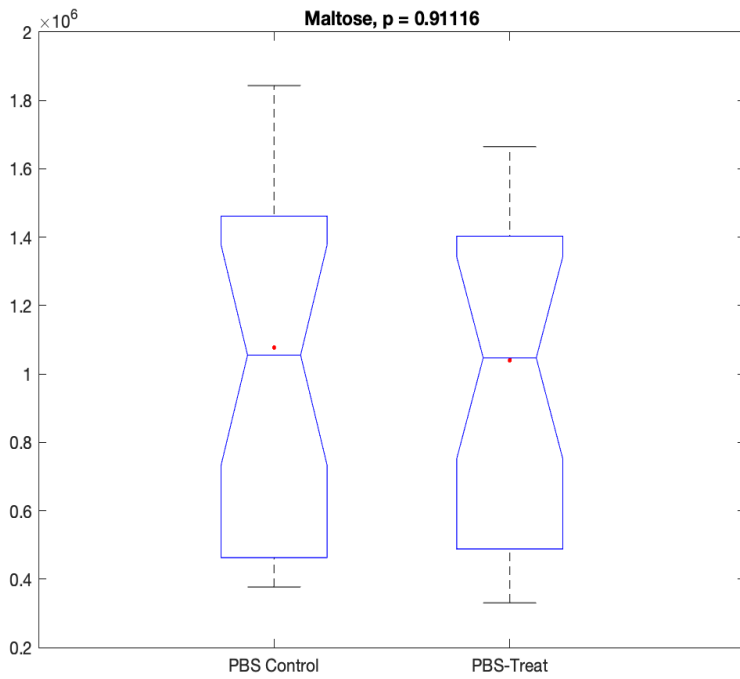


Λυσίνη



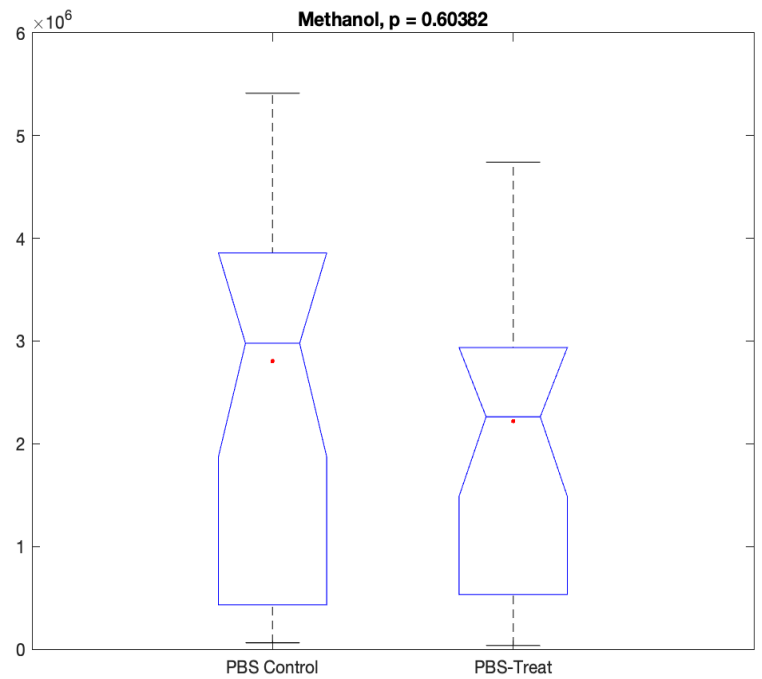
Μαλτόζη

Maltose, $p = 0.91116$



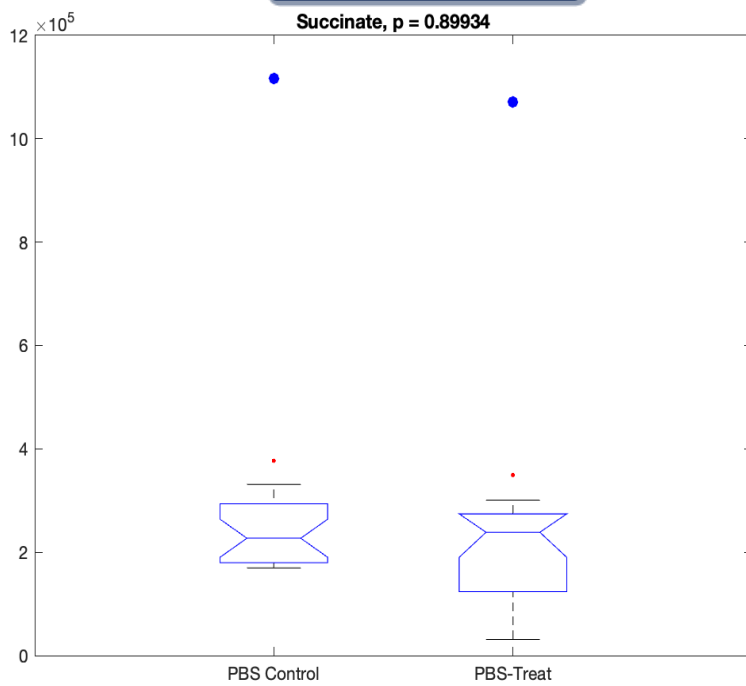
Μεθανόλη

Methanol, $p = 0.60382$



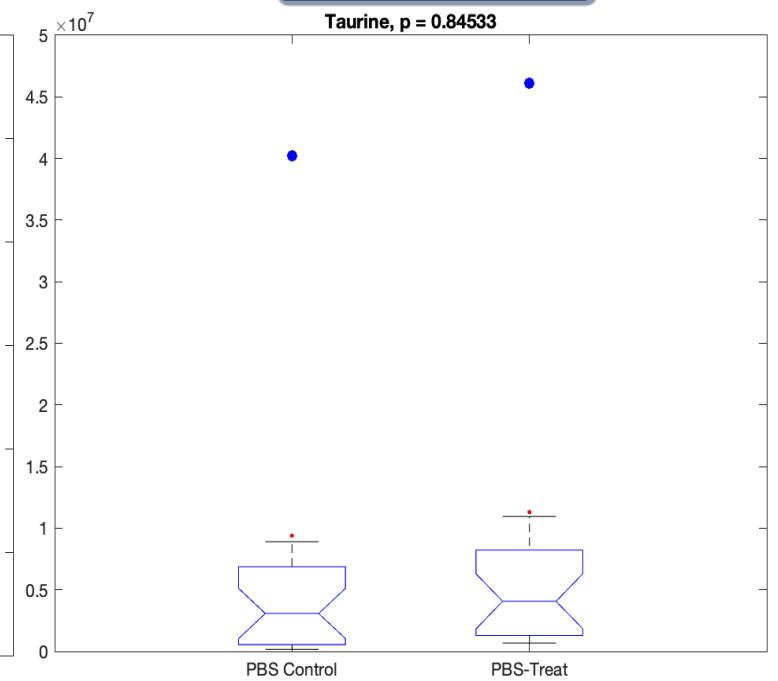
Ηλεκτρικό οξύ

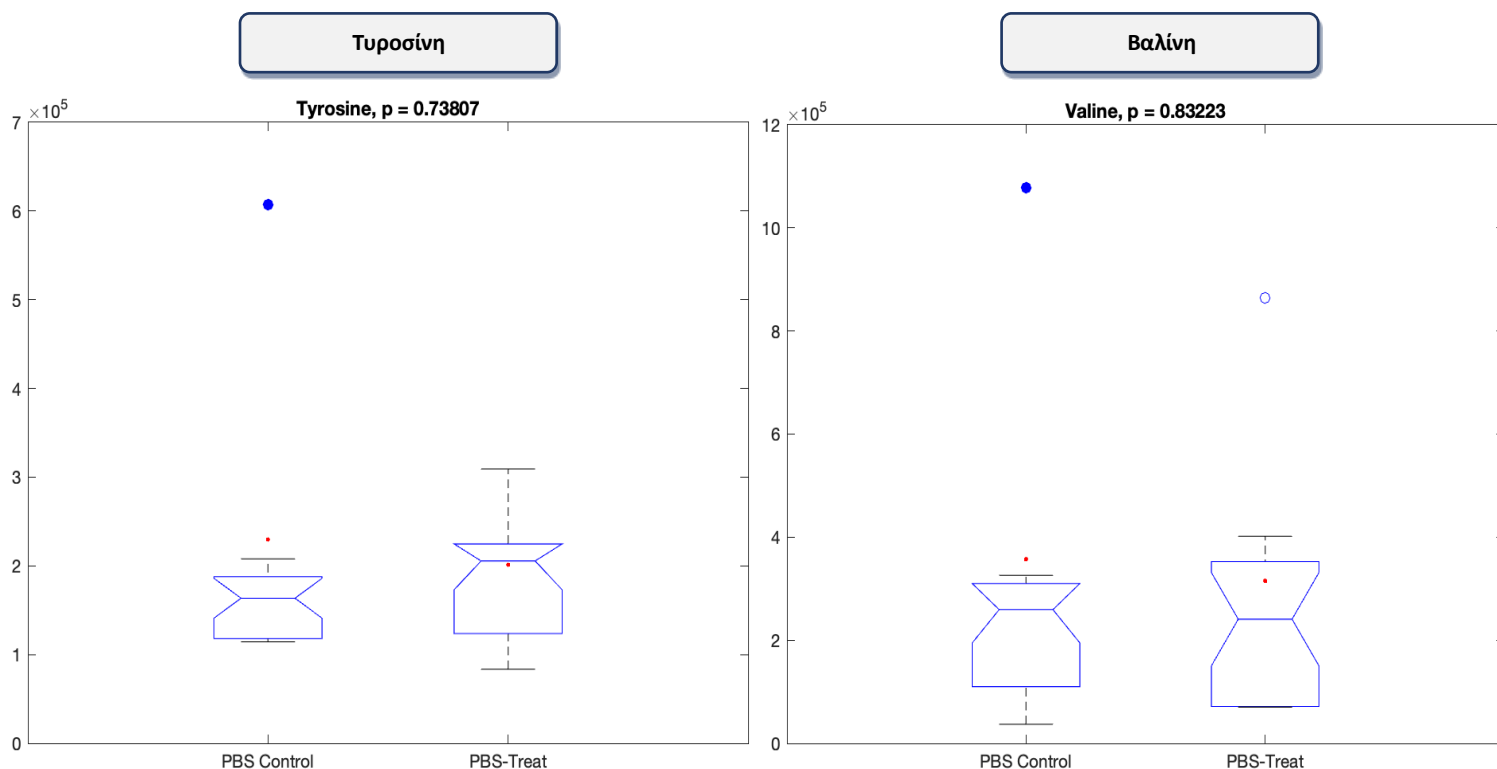
Succinate, $p = 0.89934$



Ταυρίνη

Taurine, $p = 0.84533$





ΥΠΟΜΝΗΜΑ ΣΧΗΜΑΤΟΣ 2	
	Διάμεσος
	Μέση τιμή
	Ακραία τιμή
	Ακραία τιμή

ΣΧΗΜΑ 2: Θηκογράμματα των 24 μεταβολιτών, που μελετήθηκαν, για την ομάδα ελέγχου και την ομάδα έκθεσης σε PBS και οι αντίστοιχες τιμές p , όπως προέκυψαν από τη μονοπαραμετρική ανάλυση. Αριστερά σε κάθε σχήμα φαίνεται η διασπορά των ατόμων ελέγχου και δεξιά των ατόμων έκθεσης σε PBS.

Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα (ΠΙΝΑΚΑΣ 6), όλες οι τιμές p είναι μεγαλύτερες από το επίπεδο σημαντικότητας, το οποίο ορίστηκε 0,05, δηλαδή για κάθε μεταβολίτη προκύπτει $p > 0,05$ και έχουμε αποδοχή της μηδενικής υπόθεσης. Έτσι, δεν προκύπτει κάποιος στατιστικά σημαντικός μεταβολίτης, δηλαδή κάποιος που να διαφέρει σημαντικά, μεταξύ των δύο ομάδων και να συνεισφέρει σε μεταξύ τους διαφοροποίηση. Οι παρατηρούμενες διαφορές χαρακτηρίζονται τυχαίες. Ωστόσο, ο αριθμός των δειγμάτων από κάθε ομάδα ήταν μικρός (5 δείγματα ανά ομάδα), γεγονός που μας υποδηλώνει ότι η μελέτη μεγαλύτερου αριθμού

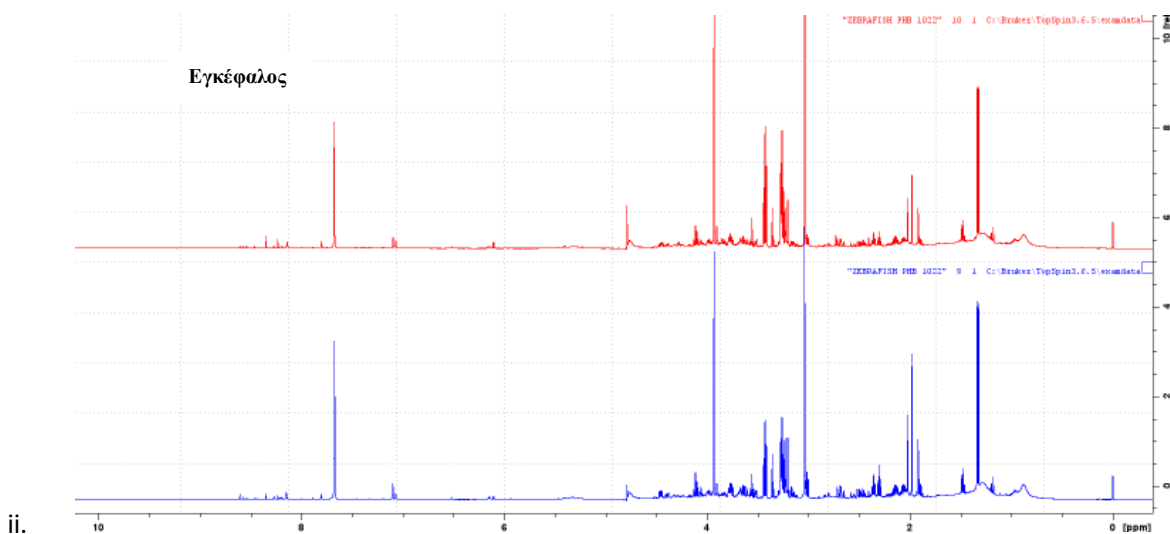
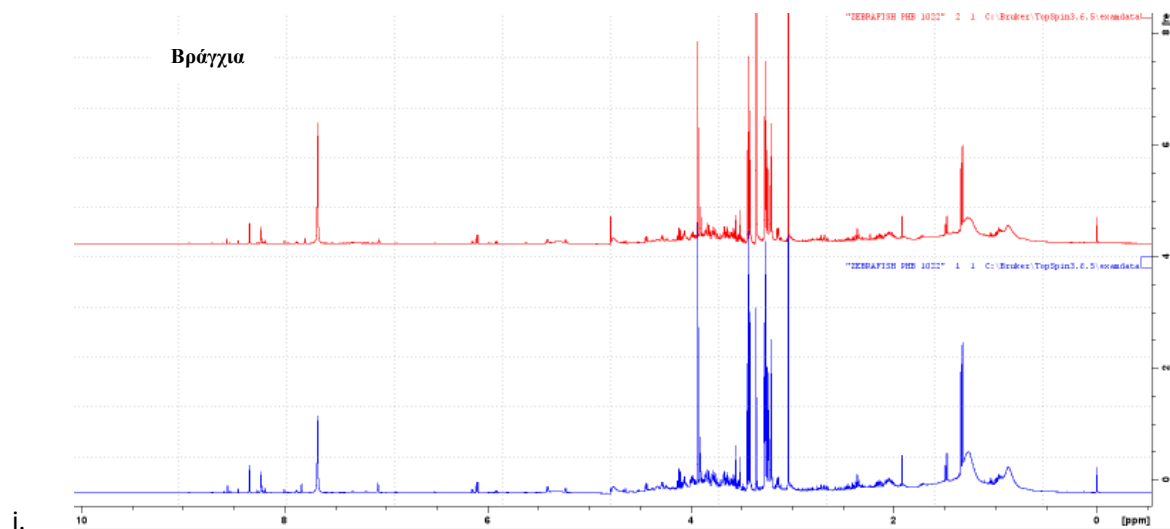
δειγμάτων ενδέχεται να καταδείξει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση και ίσως να αναδειξεί κάποιον πιθανό βιοδείκτη.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Μεταβολίτες που μελετήθηκαν με μονοπαραμετρική ανάλυση και οι αντίστοιχες τιμές p .

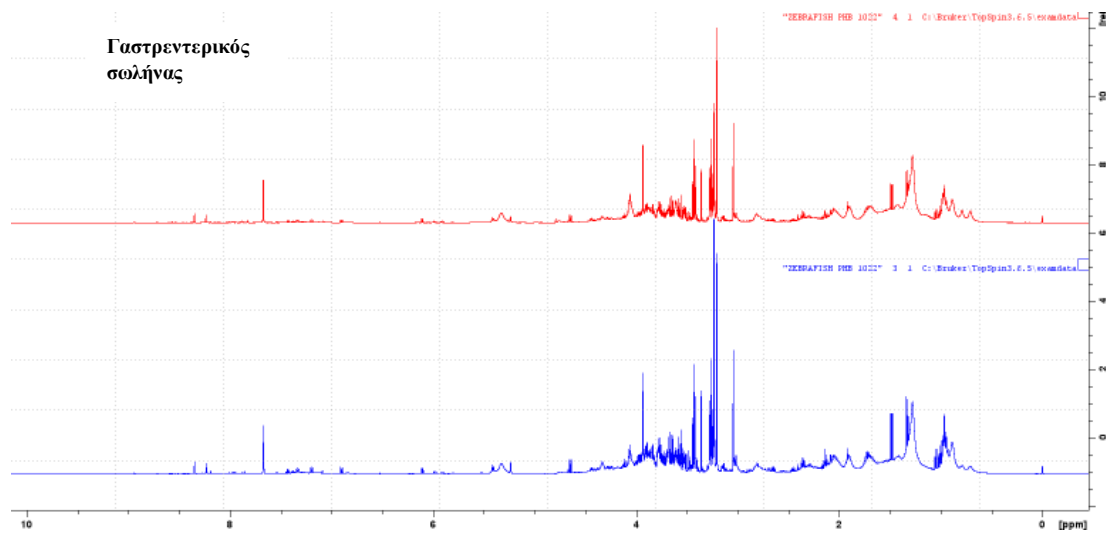
Μεταβολίτες	Τιμή p
3-υδροξυβουτυρικό οξύ	0,33115
4-αμινοβουτυρικό οξύ	0,61077
Οξικό οξύ	0,72232
Αλανίνη	0,98131
Κρεατίνη	0,95416
Κρεατινίνη	0,51858
Αιθανόλη	0,53374
Μυρμηκικό οξύ	0,92927
Φουμαρικό οξύ	0,58663
Γλουταμινικό οξύ	0,73958
Γλυκίνη	0,80414
Ισταμίνη	0,8573
Ινοσίνη	0,65607
Μονοφωσφορική Ινοσίνη (IMP)	0,7755
Ισολευκίνη	0,88429
Γαλακτικό οξύ	0,94743
Λευκίνη	0,96367
Λυσίνη	0,28587
Μαλτόζη	0,91116
Μεθανόλη	0,60382
Ηλεκτρικό οξύ	0,89934
Ταυρίνη	0,84533
Τυροσίνη	0,73807
Βαλίνη	0,83223

3.3 Μελέτη του μεταβολώματος των εκτεθειμένων σε PHB zebrafish.

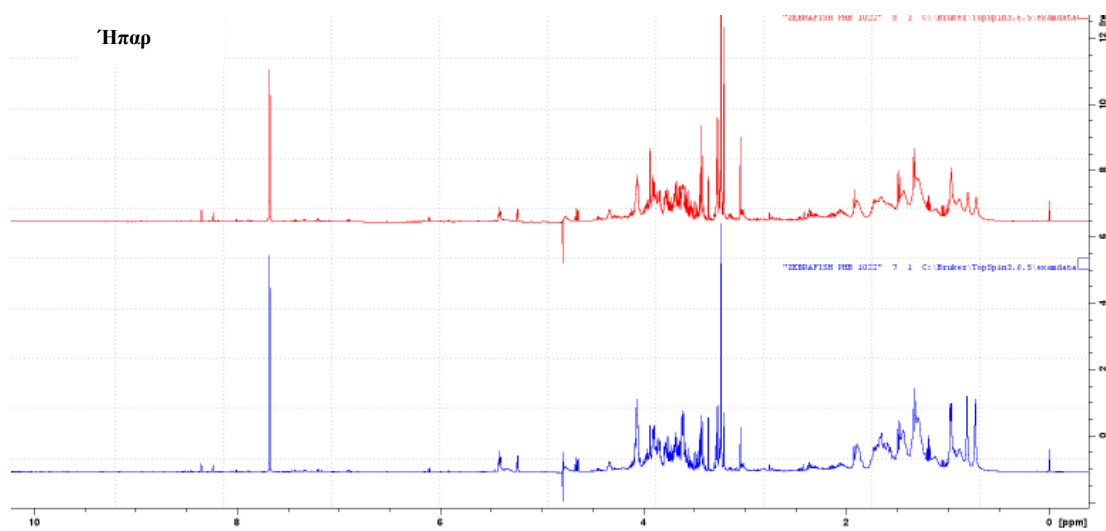
Αρχικά, λήφθηκαν τα μονοδιάστατα φάσματα ^1H -NMR (1D) για το σύνολο των δειγμάτων (ΕΙΚΟΝΑ 23). Εκ πρώτης όψεως, διαπιστώνεται η πολυπλοκότητα αυτών, που οφείλεται στο μεγάλο αριθμό μεταβολιτών, με τις περισσότερες κορυφές να εντοπίζονται περίπου στην περιοχή 4,5-1 ppm. Ωστόσο, με μία πρώτη ματιά δεν εντοπίζονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των φασμάτων, που αντιπροσωπεύουν τα μεταβολώματα των ατόμων ελέγχου και των εκτεθειμένων στο βιοπολυμερές PHB ατόμων.

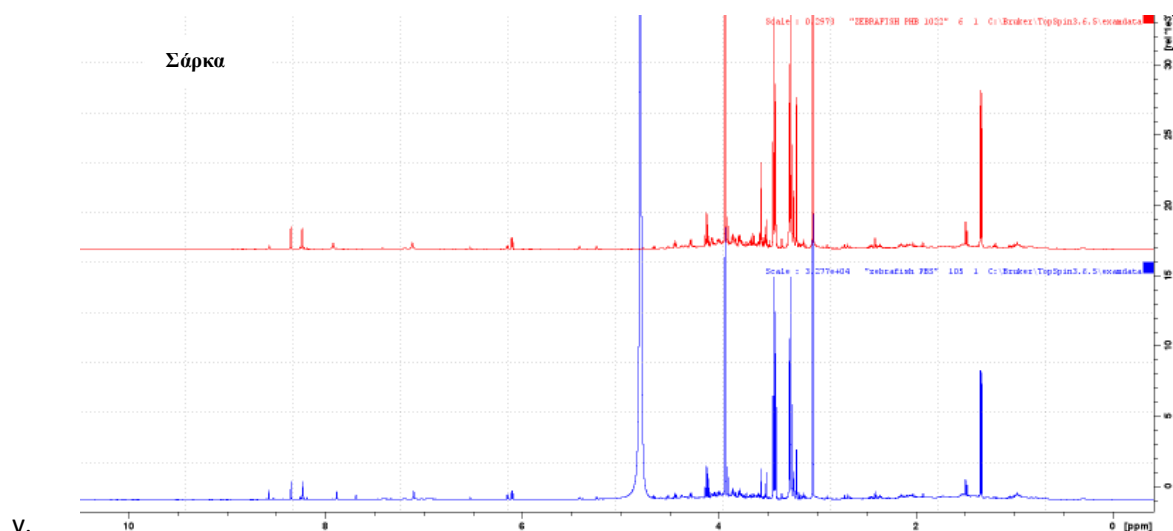


Γαστρεντερικός
σολήνας



Ήπαρ





ΕΙΚΟΝΑ 23: Φάσματα ^1H -NMR (1D) των δειγμάτων από την ομάδα ελέγχου (μπλε) και από την ομάδα έκθεσης (κόκκινα) σε PHB. Σύγκριση **i)** του δείγματος των **βραγχίων** από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης **ii)** του δείγματος των **εγκεφάλων** από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης **iii)** του δείγματος των **γαστρεντερικών σωλήνων** από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης **iv)** του δείγματος των **ηπάτων** από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης **v)** του δείγματος των **σαρκών** από τα άτομα ελέγχου με το αντίστοιχο από τα άτομα έκθεσης.

Στη συνέχεια, ακολούθησε επεξεργασία των φασμάτων, από όπου προέκυψε για κάθε δείγμα μία λίστα με τις χημικές μετατοπίσεις (ppm) των φασματικών κορυφών. Από τα δεδομένα αυτά, με τη χρήση της βάσης δεδομένων BMRB, προέκυψαν οι «πιθανοί μεταβολίτες» που περιέχονται σε κάθε δείγμα ξεχωριστά, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας. Αναφέρονται ως «πιθανοί», διότι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες και αποτελούν υποψήφιες ενώσεις που θα μπορούσαν να υπάρχουν στα δείγματα, όμως είναι αδύνατον να εντοπιστούν όλες σε κάθε δείγμα. Αναλυτικά οι λίστες με αυτούς τους μεταβολίτες παρατίθενται στο Παράρτημα (ΠΙΝΑΚΕΣ Π7-Π10). Σύγκριση των «πιθανών μεταβολιτών» κάθε δείγματος ιστών από τα άτομα ελέγχου με αυτούς των αντίστοιχων δειγμάτων από τα άτομα έκθεσης φανέρωσε πως οι περισσότεροι εντοπίζονται και στα δύο συγκρινόμενα κάθε φορά δείγματα, ωστόσο, παρατηρούνται κάποιες διαφορές οι οποίες μπορούν να αποδοθούν σε μικροαποκλίσεις των κορυφών και σε θόρυβο.

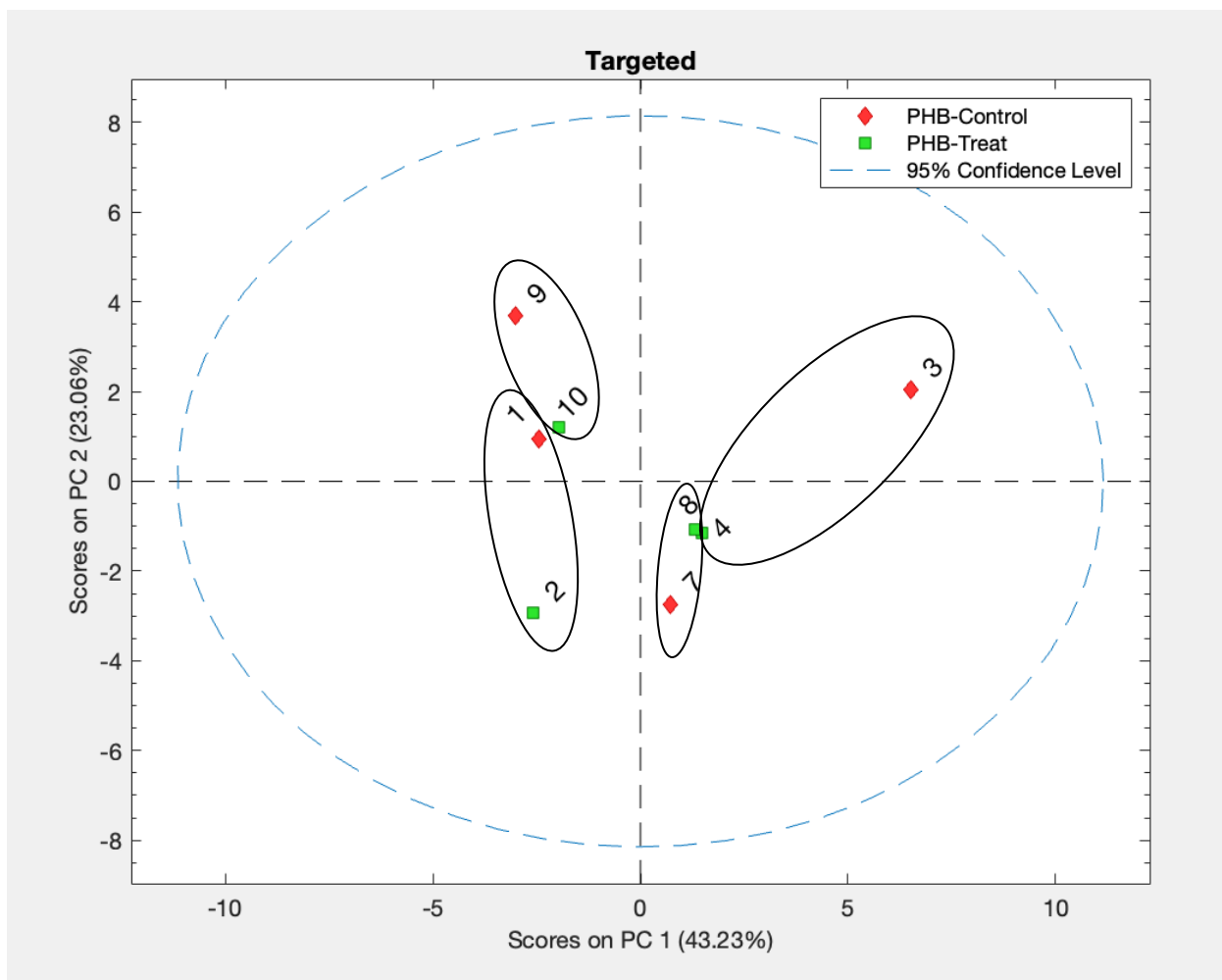
Ο μέγιστος αριθμός μεταβολιτών που μπόρεσαν να προσδιοριστούν σε κάθε φάσμα ήταν 24 και αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (ΠΙΝΑΚΑΣ 7).

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Λίστα των μεταβολιτών που προσδιορίστηκαν σε κάθε φάσμα.

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ
3-υδροξυβουτυρικό οξύ
4-αμινοβουτυρικό οξύ
Οξικό οξύ
Αλανίνη
Κρεατίνη
Κρεατινίνη
Αιθανόλη
Μυρμηκικό οξύ
Φουμαρικό οξύ
Γλουταμινικό οξύ
Γλυκίνη
Ισταμίνη
Ινοσίνη
Μονοφωσφορική Ινοσίνη (IMP)
Ισολευκίνη
Γαλακτικό οξύ
Λευκίνη
Λυσίνη
Μαλτόζη
Μεθανόλη
Ηλεκτρικό οξύ
Ταυρίνη
Τυροσίνη
Βαλίνη

Η PCA εφαρμόστηκε στα δεδομένα, με σκοπό την οπτικοποίηση της κατανομής και μεταβλητότητας τους και την εύρεση της τάσης διαχωρισμού, μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας έκθεσης, καθώς και μεταξύ των αντίστοιχων ιστών από κάθε ομάδα. Αρχικά, εφαρμόστηκε PCA στο σύνολο των δεδομένων, με στόχο να αντικατοπτριστεί η διακύμανση στο αρχικό σύνολο αυτών. Ωστόσο, η ύπαρξη μακρομορίων στα δείγματα αποφέρει ευρεία σήματα στο φάσμα που επηρεάζουν τη βασική φασματική γραμμή, με αποτέλεσμα, ανάλογα με την ποσότητα τους, να επηρεάζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στους μεταβολίτες. Έτσι, δε γνωρίζουμε εάν οι διαφορές που παρατηρούνται οφείλονται σε αλλαγή των μεταβολιτών του δείγματος ή σε διαφορά των μακρομορίων. Οπότε θεωρούμε ότι η μη στοχευμένη PCA δεν αντικατοπτρίζει αξιόπιστους διαχωρισμούς. Στη συνέχεια, αν και ολόκληρο το φάσμα περιέχει περισσότερες πληροφορίες από το άθροισμα όλων των μετρήσιμων μεταβολιτών, ακολούθησε στοχευμένη PCA, με βάση τα δεδομένα των μεταβολιτών που προσδιορίστηκαν

σε κάθε φάσμα, δηλαδή των 24 μεταβολιτών του ΠΙΝΑΚΑ 7 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω (ΣΧΗΜΑ 3).



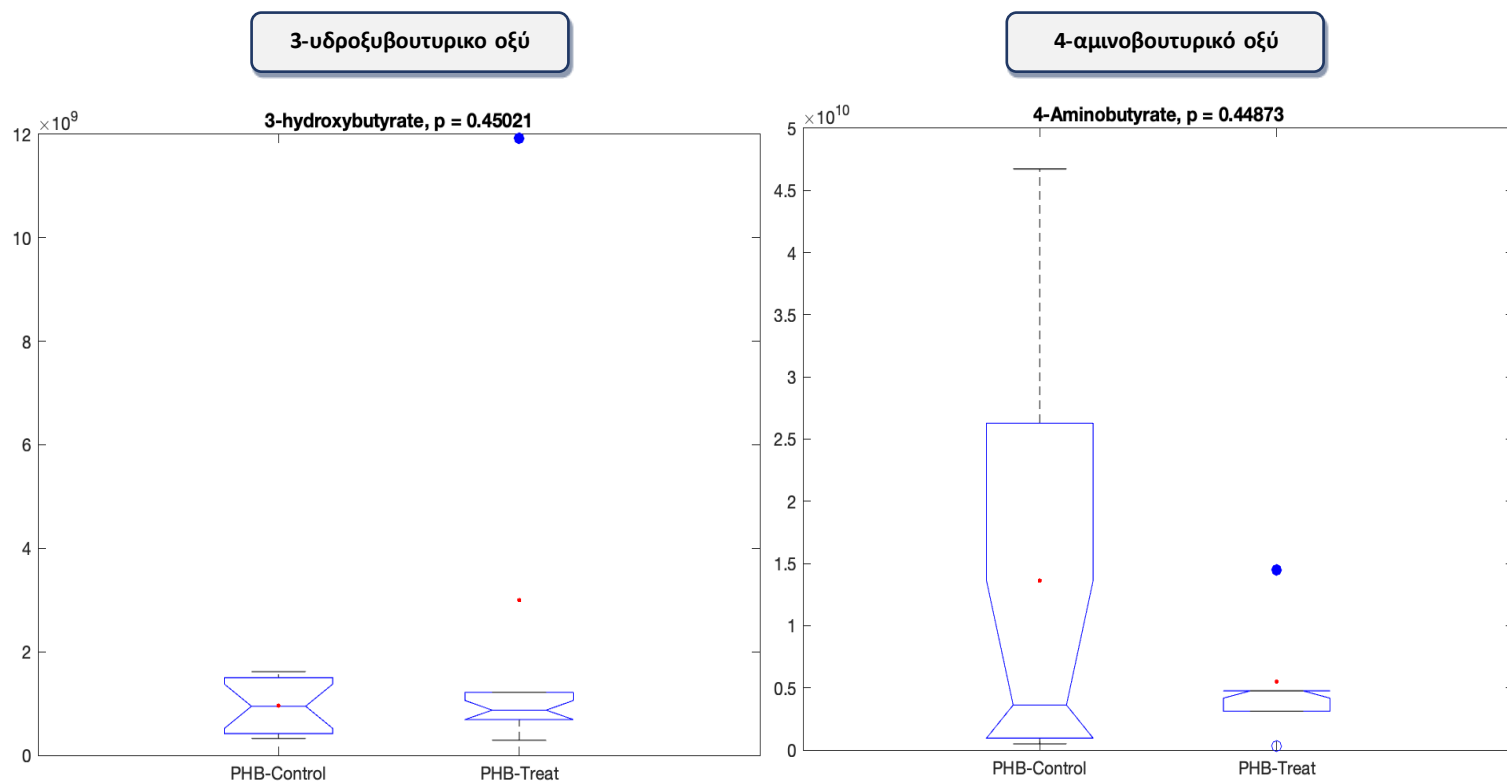
ΥΠΟΜΝΗΜΑ ΣΧΗΜΑΤΟΣ 3

Συμβολισμός Δείγματος	Ομάδα, Όργανο μελέτης
1	Control Βράγχια
2	Treated Βράγχια
3	Control Γαστρεντερικός σωλήνας
4	Treated Γαστρεντερικός σωλήνας
7	Control Ήπαρ
8	Treated Ήπαρ
9	Control Εγκέφαλος
10	Treated Εγκέφαλος
Ήtreated: εκτεθειμένα στο βιοπολυμερές	

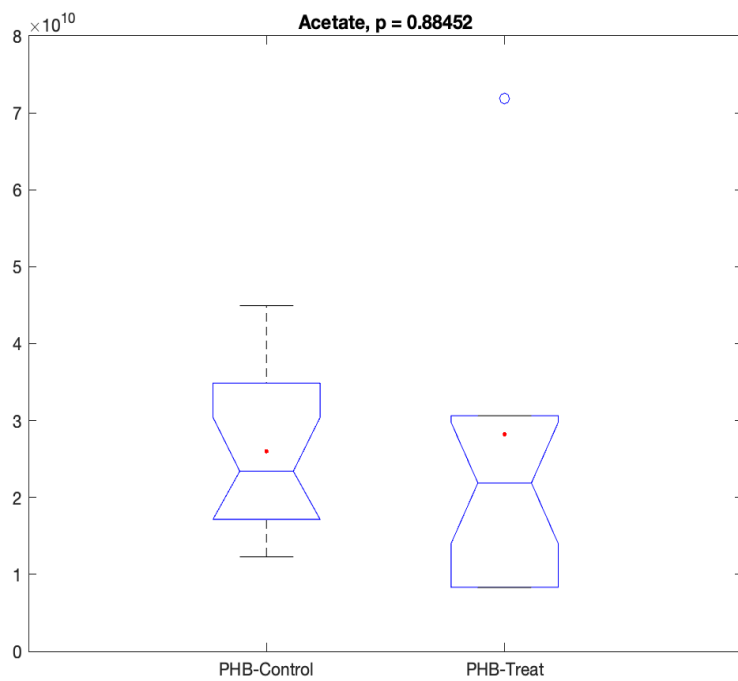
ΣΧΗΜΑ 3: Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνιστωσών δύο διαστάσεων που απεικονίζει την κατανομή των δεδομένων για κάθε ιστό από τις ομάδες ελέγχου και έκθεσης σε PHB. Τα κόκκινα σημεία παριστάνουν τα διαφορετικά δείγματα ιστών από την ομάδα ελέγχου, ενώ τα πράσινα σημεία τα διαφορετικά δείγματα ιστών από την ομάδα έκθεσης σε PHB.

Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες περιγράφουν ένα μεγάλο μέρος της μεταβλητότητας των δεδομένων, καθώς αθροιστικά εξηγούν περίπου το 66% της συνολικής πληροφορίας, με την PC1 να εκφράζει το 43,23% και την PC2 το 23,06%. Η PCA πραγματοποιήθηκε με στόχο την εύρεση τάσης κατηγοριοποίησης μεταξύ των δειγμάτων από την ομάδα ελέγχου και αυτών από την ομάδα έκθεσης σε PHB. Δεν παρατηρείται κατηγοριοποίηση των δύο ομάδων, ωστόσο διακρίνεται διαχωρισμός μεταξύ των δειγμάτων αντίστοιχων ιστών από κάθε ομάδα, όπως απεικονίζεται στο ΣΧΗΜΑ 3. Μεγαλύτερος διαχωρισμός, ως προς την PC1 παρατηρείται μεταξύ των δειγμάτων **3-4**, που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα γαστρεντερικών σωλήνων από τα άτομα της ομάδας ελέγχου και έκθεσης, αντίστοιχα και ακολουθεί μικρότερος διαχωρισμός των δειγμάτων **9-10**, που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα εγκεφάλων από τα άτομα της ομάδας ελέγχου και έκθεσης, αντίστοιχα, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα είναι αμελητέος. Μεγαλύτερος διαχωρισμός ως προς την PC2 παρατηρείται μεταξύ των δειγμάτων **1-2** που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα βραγχίων από τα άτομα της ομάδας ελέγχου και έκθεσης, αντίστοιχα, ακολουθεί ο διαχωρισμός των δειγμάτων **3-4** που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα γαστρεντερικών σωλήνων από τα άτομα της ομάδας ελέγχου και έκθεσης, αντίστοιχα, ενώ μικρότερος διαχωρισμός παρατηρείται στα **9-10** που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα εγκεφάλων από τα άτομα της ομάδας ελέγχου και έκθεσης, αντίστοιχα και στα **7-8** που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα ηπάτων από τα άτομα της ομάδας ελέγχου και έκθεσης, αντίστοιχα. Οπότε, σύμφωνα με την τάση διαχωρισμού που αποτυπώνεται στην PCA, συμπεραίνουμε ότι το όργανο που επηρεάστηκε περισσότερο από την έκθεση σε PHB ήταν ο γαστρεντερικός σωλήνας. Επιπλέον, ο διαχωρισμός όλων των δειγμάτων ως προς την PC2 υποδηλώνει ότι και οι υπόλοιποι ιστοί έχουν επηρεαστεί σε ένα βαθμό. Ωστόσο, ο κάθε ιστός αντιπροσωπεύεται από ένα μόνο δείγμα, αποτελούμενο από 6 όργανα, ένα από κάθε ψάρι και τα δεδομένα αποκτήθηκαν για το σύνολο αυτών με μία μέτρηση. Έτσι, η έλλειψη περισσότερων δειγμάτων για το καθένα και η φύση της PCA δεν προσδίδουν μεγάλη αξιοπιστία σε αυτές τις διαφορές, οι οποίες είναι ενδεικτικές και θα μπορούσαν να θεωρηθούν αποτελέσματα μιας προκαταρκτικής μελέτης, χρήζοντας περαιτέρω έρευνας.

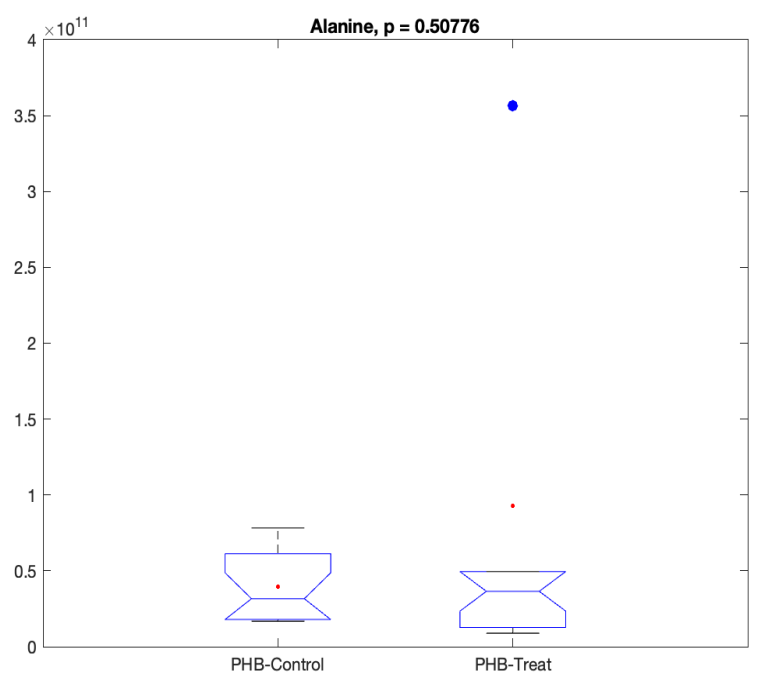
Ακολούθησε μονοπαραμετρική ανάλυση και πιο συγκεκριμένα μονόδρομη ANOVA, ώστε να εξεταστεί ξεχωριστά ο κάθε μεταβολίτης για τη συνεισφορά του σε διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων ελέγχου και έκθεσης σε PHB. Με αυτήν την ανάλυση, μελετήθηκαν οι μεταβολίτες του ΠΙΝΑΚΑ 7. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή θηκογραμμάτων και η αντίστοιχη τιμή p δείχνει τη σημαντικότητα της διακύμανσης ενός μεταβολίτη μεταξύ των δύο ομάδων. Τα θηκογράμματα παρουσιάζουν ξεχωριστά τη διασπορά κάθε μεταβολίτη στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα έκθεσης, επιτρέποντας τη σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών ομάδων και η τιμή p αποτελεί κριτήριο για την αποδοχή ή απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης, η οποία υποστηρίζει ότι δύο τυχαία επιλεγμένα δείγματα από δύο πληθυσμούς ανήκουν στην πραγματικότητα στον ίδιο πληθυσμό, με άλλα λόγια ότι ο υπό μελέτη μεταβολίτης συνεισφέρει το ίδιο και στις δύο ομάδες.



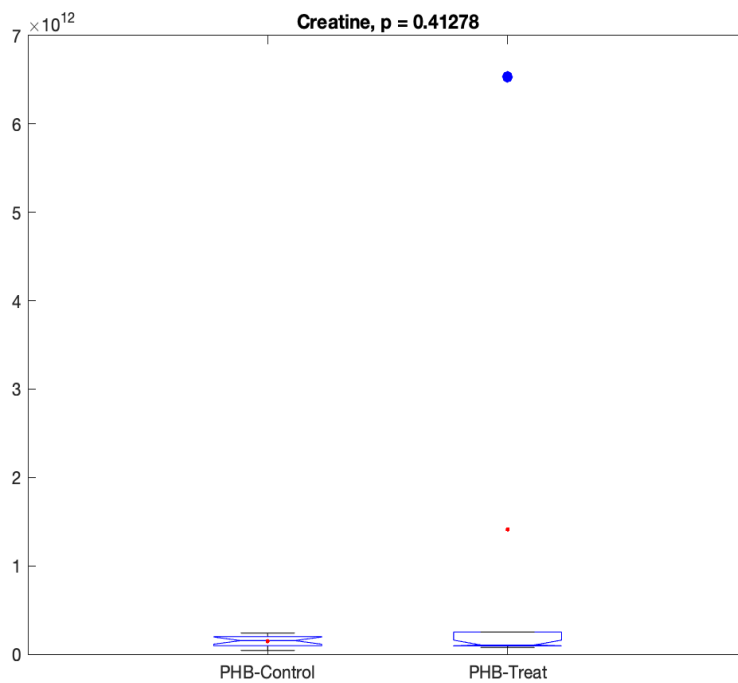
Οξικό οξύ



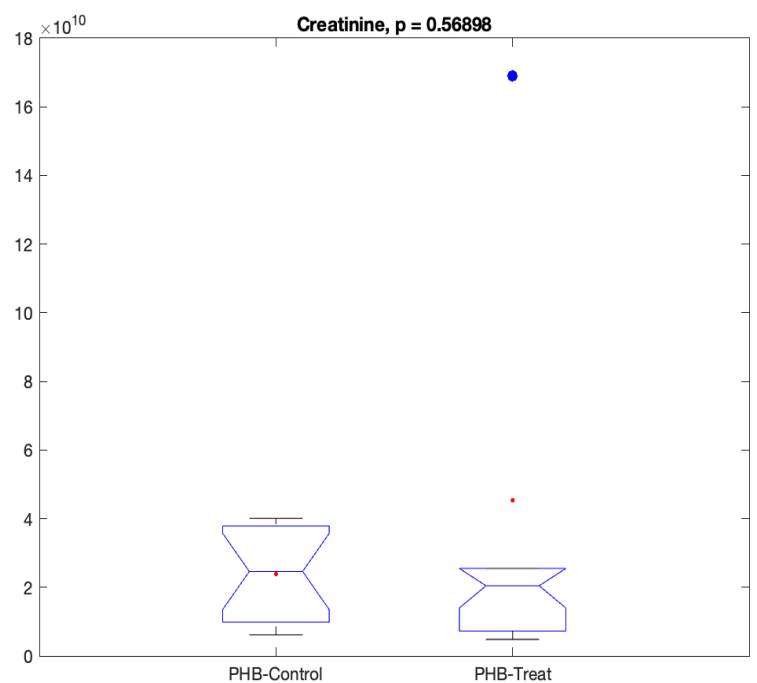
Αλανίνη



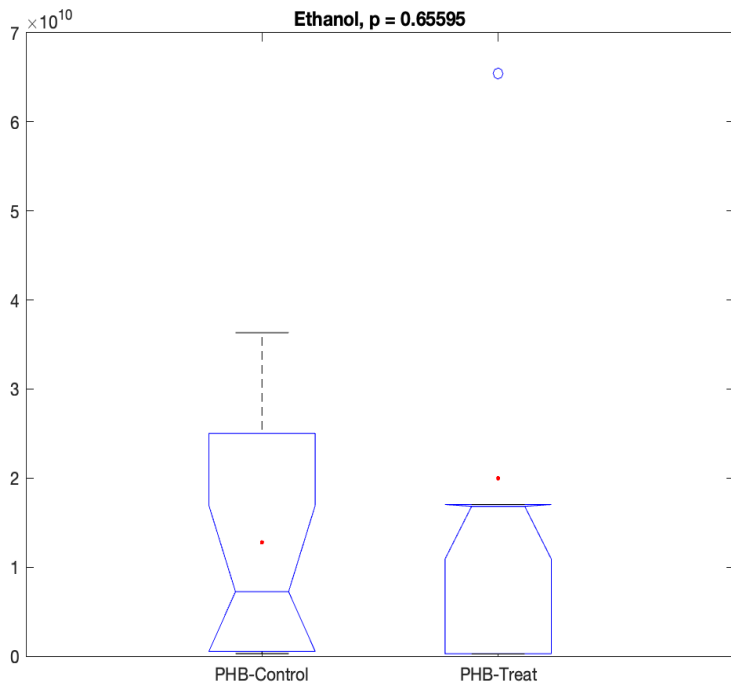
Κρεατίνη



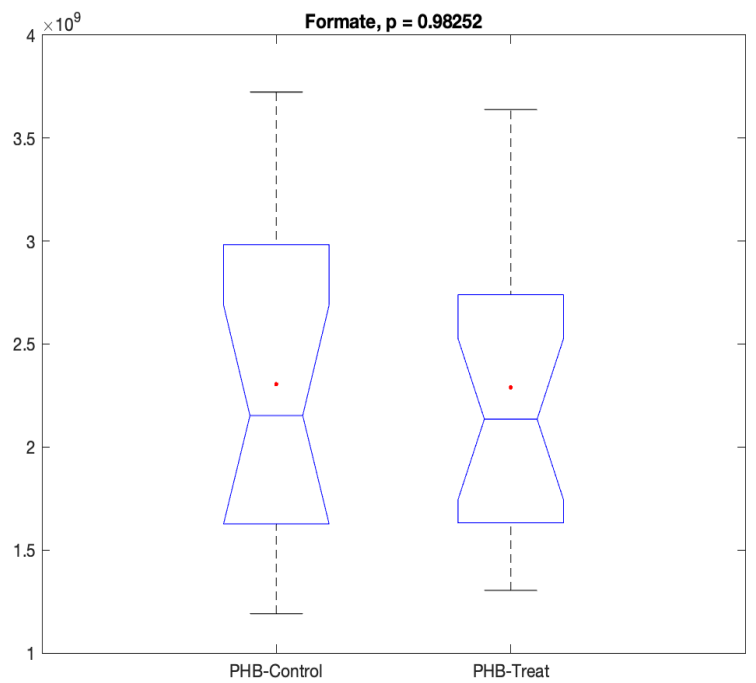
Κρεατινίνη



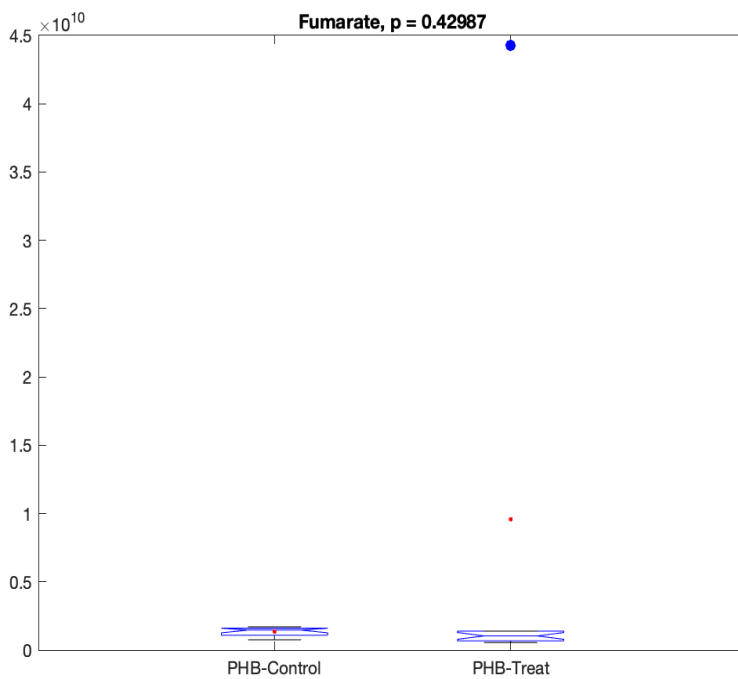
Αιθανόλη



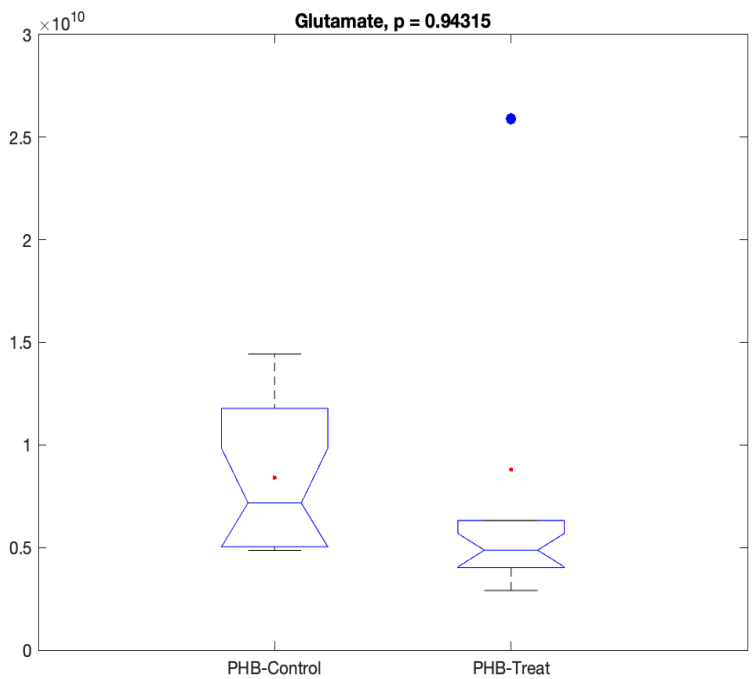
Μυρμηκικό οξύ

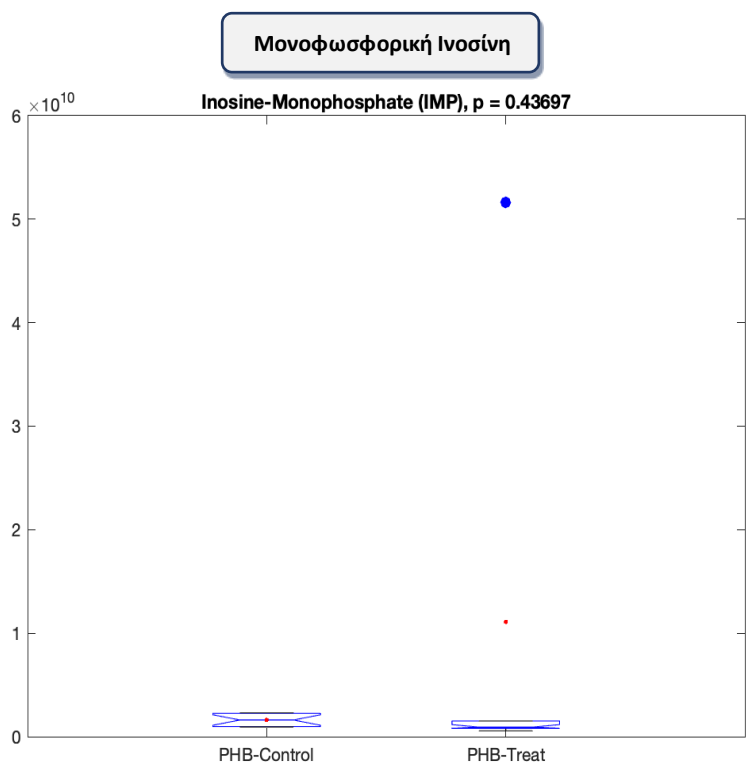
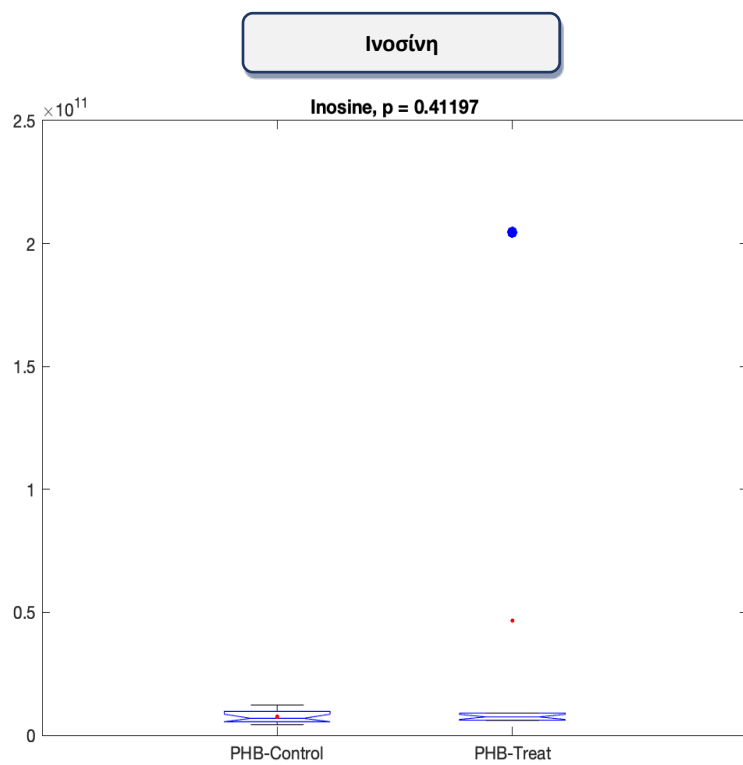
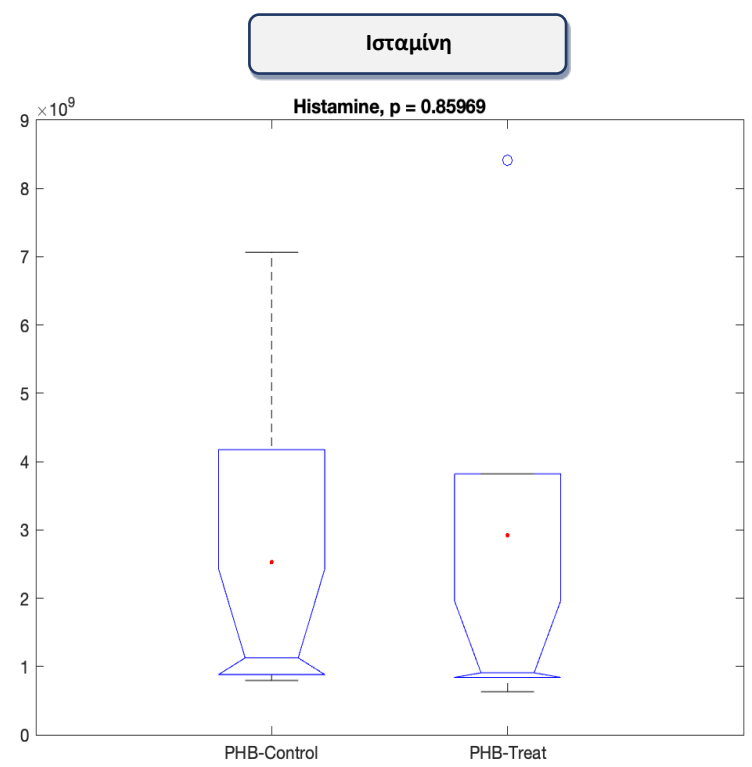
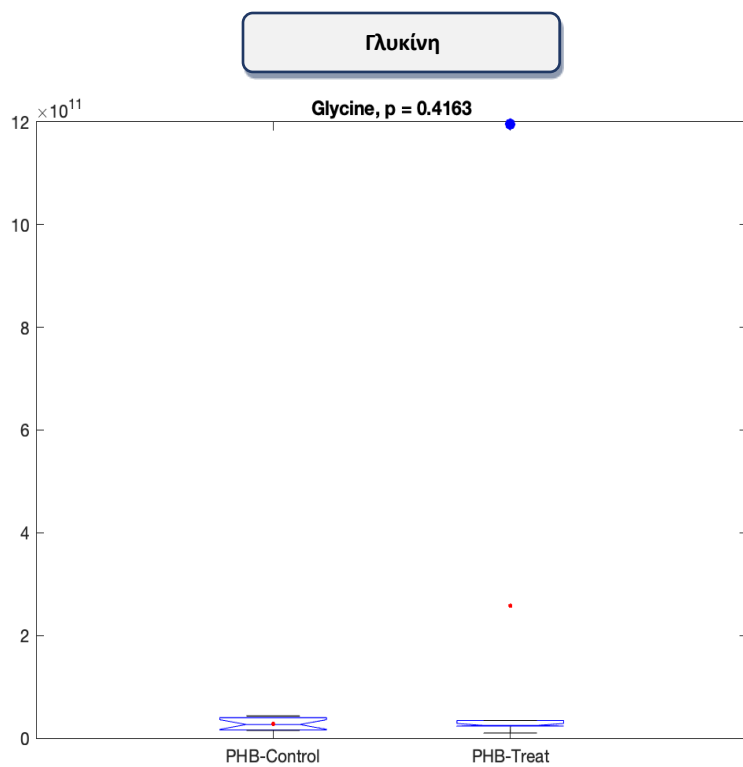


Φουμαρικό οξύ

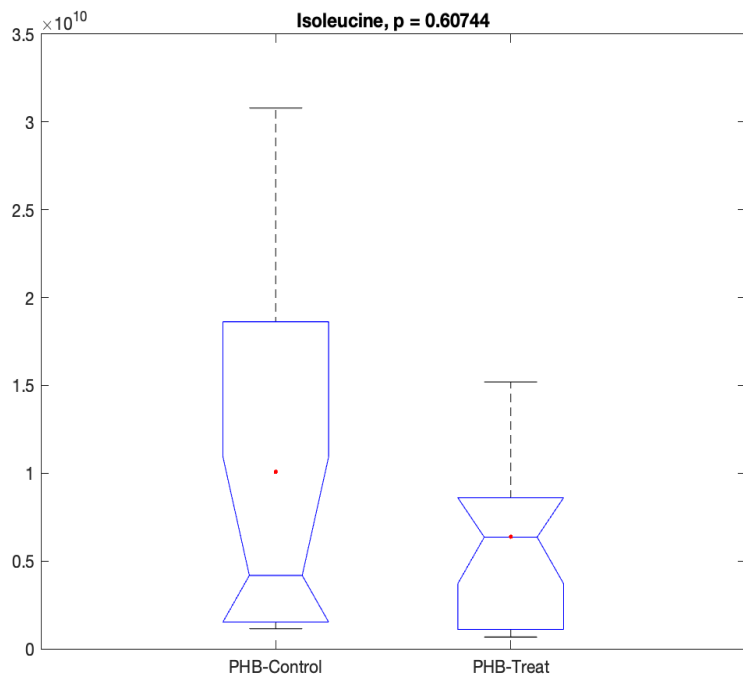


Γλουταμινικό οξύ

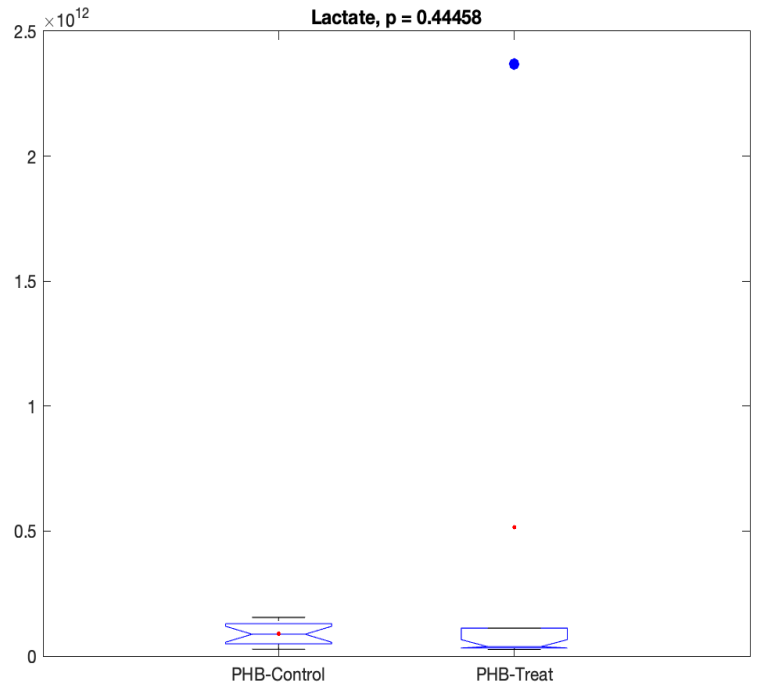




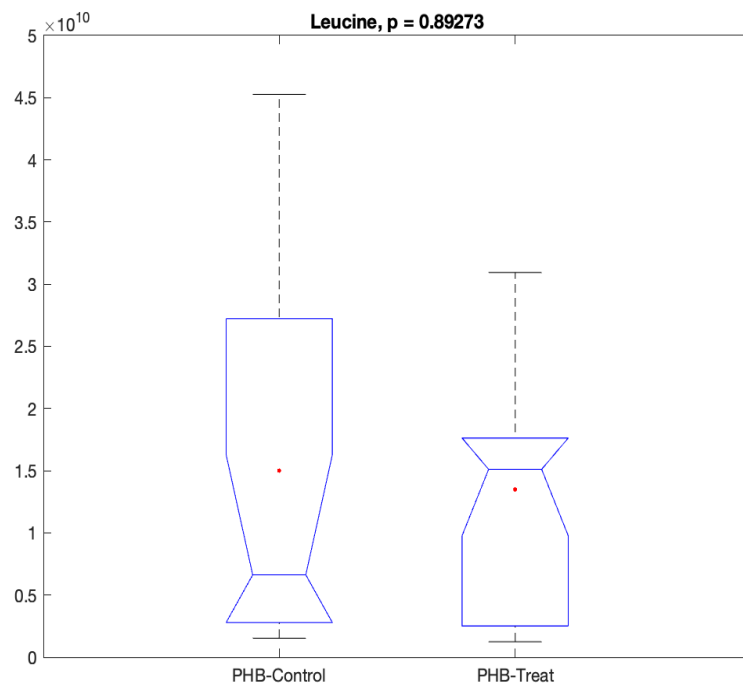
Ισολευκίνη



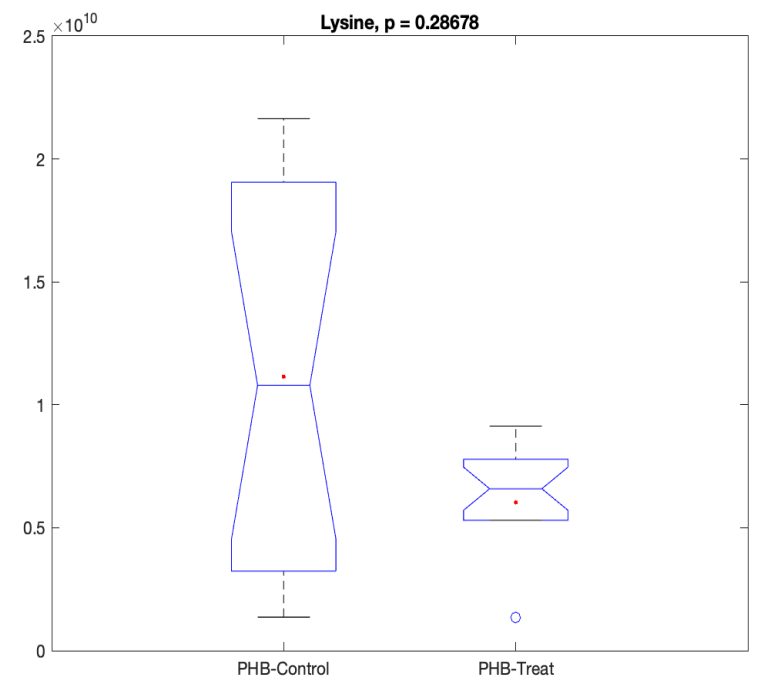
Γαλακτικό οξύ



Λευκίνη

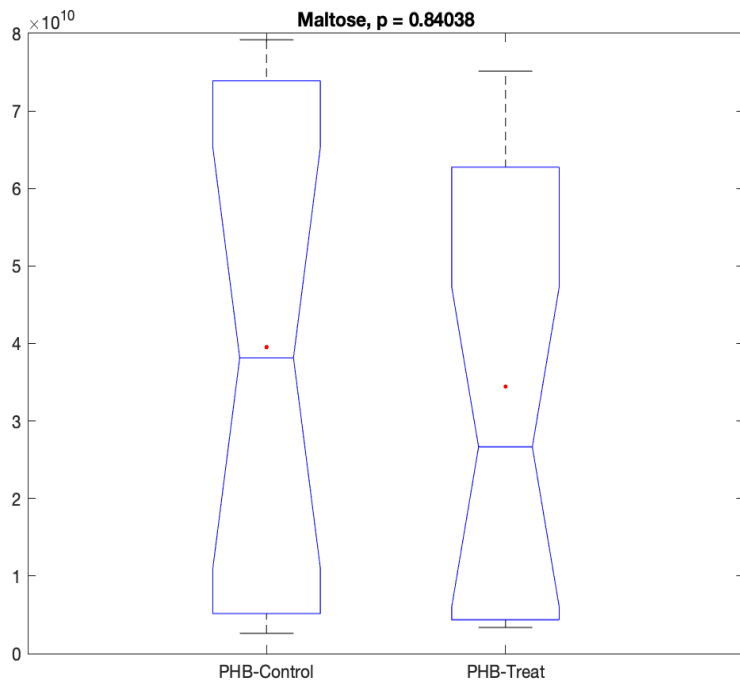


Λυσίνη



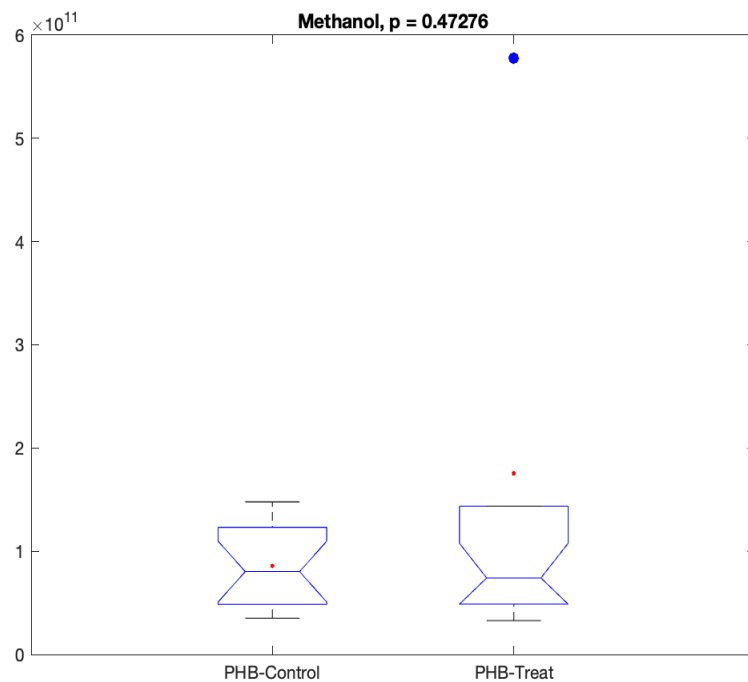
Μαλτόζη

Maltose, $p = 0.84038$



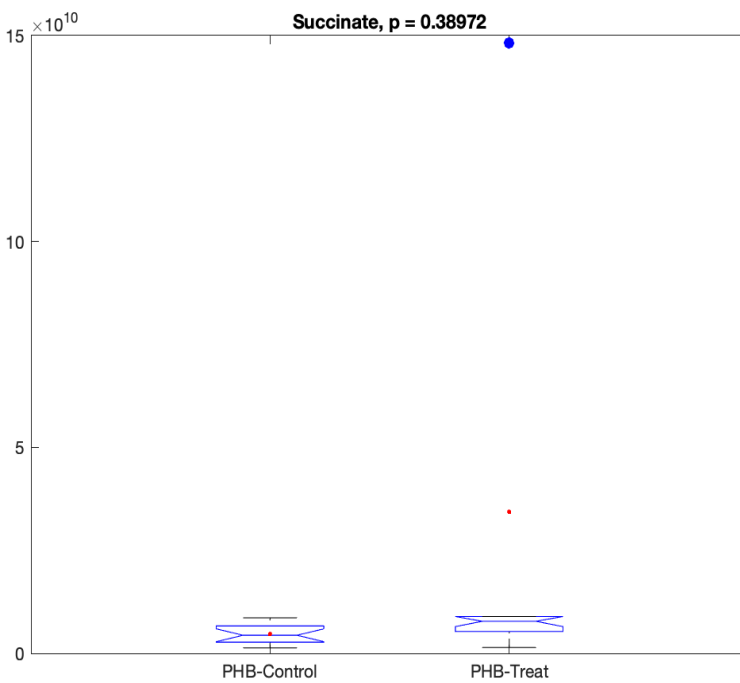
Μεθανόλη

Methanol, $p = 0.47276$



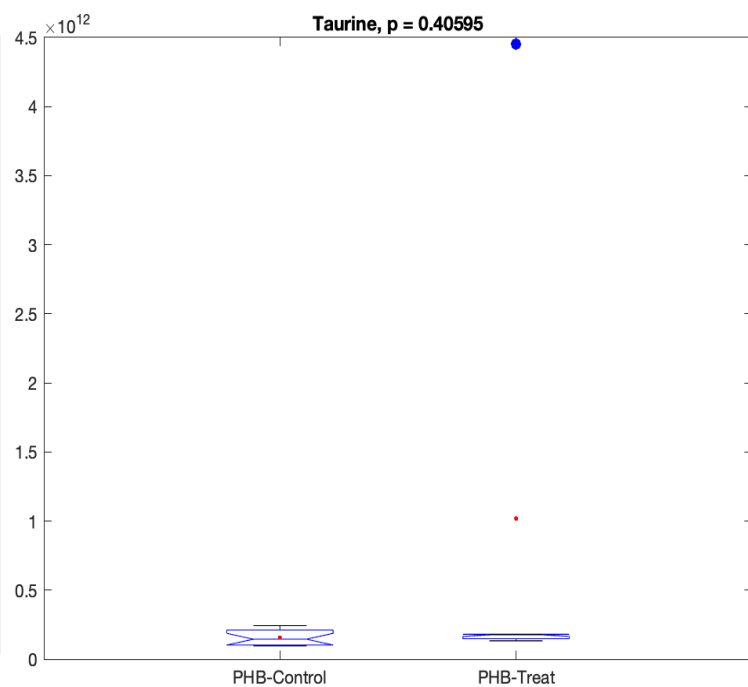
Ηλεκτρικό οξύ

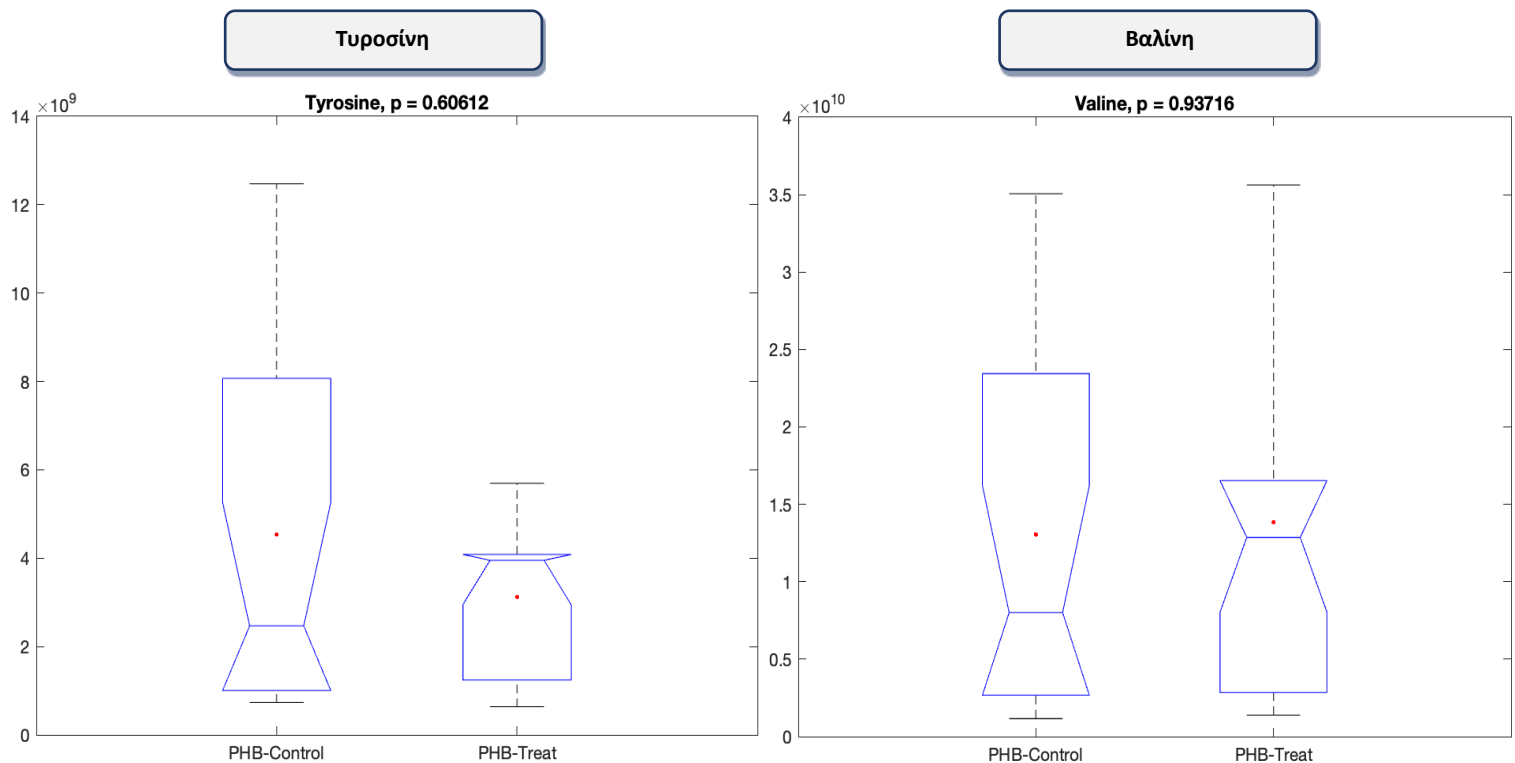
Succinate, $p = 0.38972$



Ταυρίνη

Taurine, $p = 0.40595$





ΥΠΟΜΝΗΜΑ ΣΧΗΜΑΤΟΣ 4	
	Διάμεσος
	Μέση τιμή
	Ακραία τιμή
	Ακραία τιμή

ΣΧΗΜΑ 4: Θηκογράμματα των 24 μεταβολιτών, που μελετήθηκαν, για την ομάδα ελέγχου και την ομάδα έκθεσης σε PHB και οι αντίστοιχες τιμές p , όπως προέκυψαν από τη μονοπαραμετρική ανάλυση. Αριστερά σε κάθε σχήμα φαίνεται η διασπορά των ατόμων ελέγχου και δεξιά των ατόμων έκθεσης σε PHB.

Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα (ΠΙΝΑΚΑΣ 8), όλες οι τιμές p είναι μεγαλύτερες από το επίπεδο σημαντικότητας, το οποίο ορίστηκε 0,05, δηλαδή για κάθε μεταβολίτη προκύπτει $p > 0,05$ και έχουμε αποδοχή της μηδενικής υπόθεσης. Έτσι, δεν προκύπτει κάποιος στατιστικά σημαντικός μεταβολίτης, δηλαδή κάποιος που να διαφέρει σημαντικά, μεταξύ των δύο ομάδων και να συνεισφέρει σε μεταξύ τους διαφοροποίηση. Οι παρατηρούμενες διαφορές χαρακτηρίζονται τυχαίες. Ωστόσο, ο αριθμός των δειγμάτων από κάθε ομάδα ήταν μικρός (4

δείγματα ανά ομάδα), γεγονός που μας υποδηλώνει ότι η μελέτη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων από κάθε ομάδα ενδέχεται να καταδείξει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση και ίσως να αναδείξει κάποιον πιθανό βιοδείκτη.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Μεταβολίτες που μελετήθηκαν με μονοπαραμετρική ανάλυση και οι αντίστοιχες τιμές p .

Μεταβολίτες	Τιμή p
3-υδροξυβουτυρικό οξύ	0,45021
4-αμινοβουτυρικό οξύ	0,44873
Οξικό οξύ	0,88452
Αλανίνη	0,50776
Κρεατίνη	0,41278
Κρεατινίνη	0,56898
Αιθανόλη	0,65595
Μυρμηκικό οξύ	0,98252
Φουμαρικό οξύ	0,42987
Γλουταμινικό οξύ	0,94315
Γλυκίνη	0,4163
Ισταμίνη	0,85969
Ινοσίνη	0,41197
Μονοφωσφορική Ινοσίνη (IMP)	0,43697
Ισολευκίνη	0,60744
Γαλακτικό οξύ	0,44458
Λευκίνη	0,89273
Λυσίνη	0,28678
Μαλτόζη	0,84038
Μεθανόλη	0,47276
Ηλεκτρικό οξύ	0,38972
Ταυρίνη	0,40595
Τυροσίνη	0,60612
Βαλίνη	0,93716

3.4 Ανάλυση μεταβολικών μονοπατιών

Αρχικά, για κάθε δείγμα εισήχθησαν στη MetaboAnalyst 5.0 οι «πιθανοί μεταβολίτες» (ΠΙΝΑΚΕΣ Π1-Π10) και αποκαλύφθηκαν τα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία ενέχονται. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των προκύπτοντων μονοπατιών για κάθε ιστό, μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας έκθεσης και για τα δύο βιοπολυμερή. Και στις δύο περιπτώσεις, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές, δηλαδή δεν εντοπίστηκε ενεργοποίηση ή αποσιώπηση κάποιου μεταβολικού μονοπατιού, λόγω της έκθεσης.

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η μεταβολική απόκριση στα βιοπολυμερή θα μπορούσε να αξιοποιηθεί λίστα των στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών, όπως προκύπτουν από τη μονοπαραμετρική ανάλυση. Μέσω ανάλυσης εμπλουτισμού και τοπολογίας μονοπατιών προκύπτουν τα μονοπάτια στα οποία ενέχονται και οι αντίστοιχες τιμές p και $impact$ για το καθένα, που δείχνουν την πιθανότητα του κάθε μονοπατιού να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων. Εφόσον από τη μελέτη δεν αναδείχθηκε κάποιος στατιστικά σημαντικός μεταβολίτης, που να συνεισφέρει σε διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων ελέγχου και έκθεσης, σε κανένα από τα δύο βιοπολυμερή, δεν μπορέσαμε να προχωρήσουμε σε ανάλυση μονοπατιών για να εντοπίσουμε τα μεταβολικά μονοπάτια με τα οποία θα συσχετιζόνταν και θα ήταν τα ενδεχομένως επηρεασμένα, λόγω της έκθεσης στα βιοπολυμερή.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση μονοπατιών, ώστε να προκύψουν τα μονοπάτια στα οποία ενέχονται οι μεταβολίτες που προσδιορίστηκαν και οι τιμές p , που δείχνουν την πιθανότητα του κάθε μονοπατιού να είναι ενεργό (ΠΙΝΑΚΑΣ 9).

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Τα μεταβολικά μονοπάτια που προέκυψαν από την ανάλυση με τιμές $p < 0.05$, καθώς και οι ευρεθέντες μεταβολίτες στο καθένα.

Μεταβολικά Μονοπάτια		Μεταβολίτες	Τιμή p
Μεταβολισμός Αλανίνης, Ασπαρτικού και Γλουταμινικού οξέος	5/27	Αλανίνη, Γλουταμινικό οξύ, 4-αμινοβουτυρικό οξύ Φουμαρικό οξύ, Ηλεκτρικό οξύ	3.2351E-5
Μεταβολισμός Βουτυρικού οξέος	4/15	3-υδροξυβουτυρικό οξύ, 4-αμινοβουτυρικό οξύ, Γλουταμινικό οξύ, Ηλεκτρικό οξύ	4.8888E-5
Βιοσύνθεση Βαλίνης, Λευκίνης και Ισολευκίνης	3/8	Λευκίνη, Ισολευκίνη, Βαλίνη	1.622E-4
Μεταβολισμός Πυροσταφυλικού οξέος	4/23	Γαλακτικό οξύ, Οξικό οξύ, Αιθανόλη, Φουμαρικό οξύ	2.9268E-4
Μεταβολισμός Γλυοξυλικού και Δικαρβοξυλικού οξέος	4/32	Γλυκίνη, Γλουταμινικό οξύ, Οξικό οξύ, Μυρμηκικό οξύ	0.0010858
Γλυκόλυση / Γλυκονεογένεση	3/26	Αιθανόλη, Γαλακτικό οξύ, Οξικό οξύ	0.0063031
Μεταβολισμός Αργινίνης, Προλίνης	3/35	Κρεατίνη, 4-αμινοβουτυρικό οξύ, Γλουταμινικό οξύ	0.014519
Βιοσύνθεση Αργινίνης	2/14	Γλουταμινικό οξύ, Φουμαρικό οξύ	0.017938
Αποικοδόμηση Βαλίνης, Λευκίνης και Ισολευκίνης	3/40	Βαλίνη, Ισολευκίνη, Λευκίνη	0.020864
Μεταβολισμός Ιστιδίνης	2/17	Γλουταμινικό οξύ, Ισταμίνη	0.026081
Κύκλος Κιτρικού οξέος (κύκλος TCA)	2/20	Ηλεκτρικό οξύ, Φουμαρικό οξύ	0.035449

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μεταβολομική ανάλυση ενήλικων zebrafish, ύστερα από έκθεση τους στα βιοπολυμερή PBS και PHB, για χρονική διάρκεια 15 ημερών δεν έδειξε επίδραση στο μεταβόλωμά τους, σε καμία από τις δύο περιπτώσεις. Τα υλικά προσλήφθηκαν από τα πειραματόζωα και είτε μέρος αυτών αποβλήθηκε μαζί με τα περιττώματα από τον οργανισμό τους, χωρίς να προκαλέσουν τραυματισμούς και φλεγμονές σε αυτόν, είτε διέφυγαν του εντερικού επιθηλίου και σε αυτή την ποσότητα, το μέγεθος και το σχήμα δεν είναι ικανά να διαταράξουν σημαντικά το μεταβολισμό του ψαριού. Η εύρεση σε περιττώματα ζώων που έχουν εκτεθεί σε μικροπλαστικά έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, όπως και η μετατόπιση σε άλλα όργανα [57], [153]–[155]. Η πιθανότητα σοβαρής εντερικής βλάβης δεν ήταν σημαντική, λόγω του μη αιχμηρού σχήματος των υλικών, ενώ το μικρό μέγεθος καθιστά δυνατή τη μετατόπιση τους σε άλλα όργανα. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τις ενδείξεις από την εφαρμογή της PCA, από τη λήψη τους, είναι πιο πιθανό να επηρεάζεται ο γαστρεντερικός σωλήνας και τα βράγχια.

Στην περίπτωση του PHB, το μικρό μέγεθος του οποίου καθιστά πιο πιθανή τη μετατόπισή του, παρατηρήθηκαν ενδείξεις επιρροής και των υπόλοιπων οργάνων, όπως δεικνύεται από την εφαρμογή της PCA, με το διαχωρισμό τους ως προς τη δεύτερη κύρια συνιστώσα. Η μονοπαραμετρική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στους μεταβολίτες που κατάφεραν να προσδιοριστούν δεν ανέδειξε κάποιον στατιστικό σημαντικό, υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ατόμων ελέγχου και έκθεσης, τόσο στο PBS, όσο και στο PHB. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των στατιστικών αναλύσεων ήταν περιορισμένος, με αποτέλεσμα να μην προκύπτουν ασφαλή τελικά συμπεράσματα διαφοροποίησης μεταξύ των ομάδων ελέγχου και έκθεσης, αλλά μπορούν να θεωρηθούν αποτελέσματα μιας προκαταρκτικής μελέτης και να αξιοποιηθούν σε μετέπειτα έρευνα. Τέλος, η ανάλυση μεταβολικών μονοπατιών δεν έδειξε κάποια αλλαγή στα μεταβολικά μονοπάτια, λόγω της έκθεσης.

Σύμφωνα με τα ευρήματα, τα βιοπολυμερή που εξετάστηκαν δε φαίνεται να επιδρούν δυσμενώς στον οργανισμό zebrafish, υποδεικνύοντας πιθανά ότι είναι πιο φιλικά προς το περιβάλλον σε σχέση με τα συμβατικά πολυμερή. Ωστόσο, απαιτείται περισσότερη έρευνα για την επιβεβαίωση και εξαγωγή αξιόπιστου συμπεράσματος. Η μελέτη μεγαλύτερου αριθμού

δειγμάτων θα μπορέσει να καταδείξει μια πιο αξιόπιστη εικόνα, ελαχιστοποιώντας την επίδραση της ενδογενούς διακύμανσης των αποτελεσμάτων μεταξύ των ατόμων και προσφέροντας τη δυνατότητα στατιστικά πιο αξιόπιστων συμπερασμάτων. Για την εκτίμηση του πραγματικού περιβαλλοντικού κινδύνου θα πρέπει να εξεταστεί η επίδραση μείγματος μικροπλαστικών από το περιβάλλον που θα περιλαμβάνει διαφορετικά είδη, σχήματα και μεγέθη πολυμερών, τα οποία ενδεχομένως στην επιφάνεια τους θα έχουν προσροφημένους ρύπους, αντικατοπτρίζοντας καλύτερα τη σύνθεση στο περιβάλλον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] H. Namazi, “Polymers in our daily life,” *BioImpacts*, vol. 7, no. 2, pp. 73–74, 2017, doi: 10.15171/bi.2017.09.
- [2] L. Van Cauwenberghe, L. Devriese, F. Galgani, J. Robbens, and C. R. Janssen, “Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects,” *Mar. Environ. Res.*, vol. 111, pp. 5–17, 2015, doi: 10.1016/j.marenvres.2015.06.007.
- [3] H. Park and B. S. Park, “Review of microplastic distribution, toxicity, analysis methods, and removal technologies,” *Water (Switzerland)*, vol. 13, no. 19, 2021, doi: 10.3390/w13192736.
- [4] V. Tserki, P. Matzinos, E. Pavlidou, D. Vachliotis, and C. Panayiotou, “Biodegradable aliphatic polyesters. Part I. Properties and biodegradation of poly(butylene succinate-co-butylene adipate),” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 91, no. 2, pp. 367–376, 2006, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2005.04.035.
- [5] S. A. Rafiqah *et al.*, “A review on properties and application of bio-based poly(Butylene succinate),” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 9, pp. 1–28, 2021, doi: 10.3390/polym13091436.
- [6] S. M. Emadian, T. T. Onay, and B. Demirel, “Biodegradation of bioplastics in natural environments,” *Waste Manag.*, vol. 59, pp. 526–536, 2017, doi: 10.1016/j.wasman.2016.10.006.
- [7] X. Xiong, J. Wang, J. Liu, and T. Xiao, “Microplastics and potentially toxic elements: A review of interactions, fate and bioavailability in the environment,” *Environ. Pollut.*, vol. 340, no. P2, p. 122754, 2024, doi: 10.1016/j.envpol.2023.122754.
- [8] V. Kaing, Z. Guo, T. Sok, D. Kodikara, F. Breider, and C. Yoshimura, “Photodegradation of biodegradable plastics in aquatic environments: Current understanding and challenges,” *Sci. Total Environ.*, vol. 911, no. August 2023, p. 168539, 2024, doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.168539.
- [9] D. Garcia-Garcia, L. Quiles-Carrillo, R. Balart, S. Torres-Giner, and M. P. Arrieta, “Innovative solutions and challenges to increase the use of Poly(3-hydroxybutyrate) in food packaging and disposables,” *Eur. Polym. J.*, vol. 178, no. May, p. 111505, 2022, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111505.
- [10] K. Ugwu, A. Herrera, and M. Gómez, “Microplastics in marine biota: A review,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 169, no. February, 2021, doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.112540.
- [11] H. C. Lu, S. Ziajahromi, P. A. Neale, and F. D. L. Leusch, “A systematic review of freshwater microplastics in water and sediments: Recommendations for harmonisation to enhance future study comparisons,” *Sci. Total Environ.*, vol. 781, p. 146693, 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146693.
- [12] H. M. Kim and J. S. Kang, “Metabolomic studies for the evaluation of toxicity induced by environmental toxicants on model organisms,” *Metabolites*, vol. 11, no. 8, 2021, doi: 10.3390/metabo11080485.
- [13] A. Di Bartolo, G. Infurna, and N. T. Dintcheva, “A review of bioplastics and their adoption in the circular economy,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 8, 2021, doi: 10.3390/polym13081229.
- [14] M. Chen *et al.*, “Environmental risk assessment of microplastics and nanoplastics generated from biodegradable plastics in marine ecosystem,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 169, no. August, p. 117381, 2023, doi: 10.1016/j.trac.2023.117381.

- [15] European bioplastics, “December 2023 Bioplastics Market Development Update 2023,” no. December, pp. 2022–2023, 2023, [Online]. Available: https://docs.european-bioplastics.org/publications/market_data/2023/EUBP_Market_Data_Report_2023.pdf
- [16] Plastics Europe, “Plastics - the fast facts 2023,” 2023, p. 2023, 2023.
- [17] S. Su, R. Kopitzky, S. Tolga, and S. Kabasci, “Polylactide (PLA) and Its Blends with Poly (butylene,” *Polymers (Basel)*., pp. 1–21, 2019.
- [18] A. Folino, D. Pangallo, and P. S. Calabrò, “Assessing bioplastics biodegradability by standard and research methods: Current trends and open issues,” *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 11, no. 2, 2023, doi: 10.1016/j.jece.2023.109424.
- [19] B. Agostinho, A. J. D. Silvestre, J. A. P. Coutinho, and A. F. Sousa, “Synthetic (bio)degradable polymers - when does recycling fail?,” *Green Chem.*, vol. 25, no. 1, pp. 13–31, 2023, doi: 10.1039/d2gc02726g.
- [20] E. Bioplastics, “Position of European Bioplastics Marine Litter,” *Eur. Bioplastics*, vol. 15, no. 4, 2016.
- [21] L. Manfra, V. Marengo, G. Libralato, M. Costantini, F. De Falco, and M. Cocca, “Biodegradable polymers: A real opportunity to solve marine plastic pollution?,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 416, no. December 2020, p. 125763, 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.125763.
- [22] C. Venâncio, I. Lopes, and M. Oliveira, “Bioplastics: known effects and potential consequences to marine and estuarine ecosystem services,” *Chemosphere*, vol. 309, no. January, 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.136810.
- [23] T. Narancic *et al.*, “Biodegradable Plastic Blends Create New Possibilities for End-of-Life Management of Plastics but They Are Not a Panacea for Plastic Pollution,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 52, no. 18, pp. 10441–10452, 2018, doi: 10.1021/acs.est.8b02963.
- [24] B. Plastics and S. U. Plastics, “ΠΛΑΣΤΙΚΑ & ΠΛΑΣΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΜΙΑΣ Είδη βιοπλαστικών,” pp. 1–8, 2022.
- [25] D. Bourguignon, “Plastics in a circular economy: Opportunities and challenges,” *Eur. Parliam. Res. Serv.*, no. May, p. 8, 2017.
- [26] M. Wagner and S. Lambert, “Freshwater Microplastics - The Handbook of Environmental Chemistry 58,” p. 302, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-61615-5.
- [27] Y. Picó and D. Barceló, “Analysis and prevention of microplastics pollution in water: Current perspectives and future directions,” *ACS Omega*, vol. 4, no. 4, pp. 6709–6719, 2019, doi: 10.1021/acsomega.9b00222.
- [28] M. Sharifinia, Z. A. Bahmanbeigloo, M. Keshavarzifard, M. H. Khanjani, and B. P. Lyons, “Microplastic pollution as a grand challenge in marine research: A closer look at their adverse impacts on the immune and reproductive systems,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 204, no. July, p. 111109, 2020, doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111109.
- [29] P. Burkhardt-Holm and A. N’Guyen, “Ingestion of microplastics by fish and other prey organisms of cetaceans, exemplified for two large baleen whale species,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 144, no. April, pp. 224–234, 2019, doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.04.068.
- [30] L. Zhu, H. Wang, B. Chen, X. Sun, K. Qu, and B. Xia, “Microplastic ingestion in deep-sea fish from the South China Sea,” *Sci. Total Environ.*, vol. 677, pp. 493–501, 2019, doi:

10.1016/j.scitotenv.2019.04.380.

- [31] A. Thacharodi *et al.*, “Microplastics in the environment: A critical overview on its fate, toxicity, implications, management, and bioremediation strategies,” *J. Environ. Manage.*, vol. 349, no. September 2023, p. 119433, 2024, doi: 10.1016/j.jenvman.2023.119433.
- [32] A. Mathalon and P. Hill, “Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 81, no. 1, pp. 69–79, 2014, doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.02.018.
- [33] J. Gerritse, H. A. Leslie, C. A. de Tender, L. I. Devriese, and A. D. Vethaak, “Fragmentation of plastic objects in a laboratory seawater microcosm,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–16, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-67927-1.
- [34] I. Oluwoye *et al.*, “Degradation and lifetime prediction of plastics in subsea and offshore infrastructures,” *Sci. Total Environ.*, vol. 904, no. August, p. 166719, 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.166719.
- [35] L. Van Cauwenberghe, A. Vanreusel, J. Mees, and C. R. Janssen, “Microplastic pollution in deep-sea sediments,” *Environ. Pollut.*, vol. 182, pp. 495–499, 2013, doi: 10.1016/j.envpol.2013.08.013.
- [36] S. Savoca *et al.*, “Microplastics occurrence in the Tyrrhenian waters and in the gastrointestinal tract of two congener species of seabreams,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 67, no. December 2018, pp. 35–41, 2019, doi: 10.1016/j.etap.2019.01.011.
- [37] R. W. Obbard, S. Sadri, Y. Q. Wong, A. A. Khitun, I. Baker, and C. Richard, “Who Where Why - wordpress blog - Community mapping examples,” *Earth’s Futur.*, vol. 2, pp. 315–320, 2014, doi: 10.1002/2014EF000240.Abstract.
- [38] N. P. Ivleva, A. C. Wiesheu, and R. Niessner, “Microplastic in Aquatic Ecosystems,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 56, no. 7, pp. 1720–1739, 2017, doi: 10.1002/anie.201606957.
- [39] P. Lestari, Y. Trihadiningrum, and I. D. A. A. Warmadewanthi, “Investigation of microplastic ingestion in commercial fish from Surabaya river, Indonesia,” *Environ. Pollut.*, vol. 331, no. P2, p. 121807, 2023, doi: 10.1016/j.envpol.2023.121807.
- [40] A. A. Horton, M. D. Jürgens, E. Lahive, P. M. van Bodegom, and M. G. Vijver, “The influence of exposure and physiology on microplastic ingestion by the freshwater fish *Rutilus rutilus* (roach) in the River Thames, UK,” *Environ. Pollut.*, vol. 236, pp. 188–194, 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2018.01.044.
- [41] P. Lestari, Y. Trihadiningrum, B. A. Wijaya, K. A. Yunus, and M. Firdaus, “Distribution of microplastics in Surabaya River, Indonesia,” *Sci. Total Environ.*, vol. 726, p. 138560, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138560.
- [42] S. Franzellitti, L. Canesi, M. Auguste, R. H. G. R. Wathsala, and E. Fabbri, “Microplastic exposure and effects in aquatic organisms: A physiological perspective,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 68, no. November 2018, pp. 37–51, 2019, doi: 10.1016/j.etap.2019.03.009.
- [43] J. Li, D. Yang, L. Li, K. Jabeen, and H. Shi, “Microplastics in commercial bivalves from China,” *Environ. Pollut.*, vol. 207, pp. 190–195, 2015, doi: 10.1016/j.envpol.2015.09.018.
- [44] U. R. Gurjar *et al.*, “Microplastics in shrimps: a study from the trawling grounds of north eastern part of Arabian Sea,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 28, no. 35, pp. 48494–48504, 2021, doi: 10.1007/s11356-021-14121-z.

- [45] M. P. Verlaan, G. T. Banta, F. R. Khan, and K. Syberg, “Abundance of microplastics in the gastrointestinal tracts of the eelpout (*Zoacres viviparous* L.) collected in Roskilde Fjord, Denmark: Implications for use as a monitoring species under the Marine Strategy Framework Directive,” *Reg. Stud. Mar. Sci.*, vol. 32, p. 100900, 2019, doi: 10.1016/j.rsma.2019.100900.
- [46] M. Compa, A. Ventero, M. Iglesias, and S. Deudero, “Ingestion of microplastics and natural fibres in *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) and *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) along the Spanish Mediterranean coast,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 128, no. October 2017, pp. 89–96, 2018, doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.01.009.
- [47] M. Zakeri, A. Naji, A. Akbarzadeh, and S. Uddin, “Microplastic ingestion in important commercial fish in the southern Caspian Sea,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 160, no. July, p. 111598, 2020, doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111598.
- [48] G. Pellini *et al.*, “Characterization of microplastic litter in the gastrointestinal tract of *Solea solea* from the Adriatic Sea,” *Environ. Pollut.*, vol. 234, pp. 943–952, 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2017.12.038.
- [49] L. Van Cauwenberghe, M. Claessens, M. B. Vandegehuchte, and C. R. Janssen, “Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats,” *Environ. Pollut.*, vol. 199, pp. 10–17, 2015, doi: 10.1016/j.envpol.2015.01.008.
- [50] J. P. G. L. Frias, V. Otero, and P. Sobral, “Evidence of microplastics in samples of zooplankton from Portuguese coastal waters,” *Mar. Environ. Res.*, vol. 95, pp. 89–95, 2014, doi: 10.1016/j.marenvres.2014.01.001.
- [51] N. Ajith, S. Arumugam, S. Parthasarathy, S. Manupoori, and S. Janakiraman, “Global distribution of microplastics and its impact on marine environment—a review,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 27, no. 21, pp. 25970–25986, 2020, doi: 10.1007/s11356-020-09015-5.
- [52] L. Su *et al.*, “The occurrence of microplastic in specific organs in commercially caught fishes from coast and estuary area of east China,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 365, no. October 2018, pp. 716–724, 2019, doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.11.024.
- [53] J. B. Koongolla *et al.*, “Occurrence of microplastics in gastrointestinal tracts and gills of fish from Beibu Gulf, South China Sea,” *Environ. Pollut.*, vol. 258, p. 113734, 2020, doi: 10.1016/j.envpol.2019.113734.
- [54] M. Cole, P. Lindeque, E. Fileman, C. Halsband, and T. S. Galloway, “The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 49, no. 2, pp. 1130–1137, 2015, doi: 10.1021/es504525u.
- [55] A. Pappa *et al.*, “Insights into the toxicity of biomaterials microparticles with a combination of cellular and oxidative biomarkers,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 413, no. November 2020, p. 125335, 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.125335.
- [56] K. Mattsson, E. V. Johnson, A. Malmendal, S. Linse, L. A. Hansson, and T. Cedervall, “Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–7, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-10813-0.
- [57] E. E. Burns and A. B. A. Boxall, “Microplastics in the aquatic environment: Evidence for or against adverse impacts and major knowledge gaps,” *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 37, no. 11, pp. 2776–2796, 2018, doi: 10.1002/etc.4268.
- [58] J. H. Kim, Y. Bin Yu, and J. H. Choi, “Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and neurotoxicity in fish exposed to microplastics:

- A review,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 413, no. December 2020, p. 125423, 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.125423.
- [59] H. K. McIlwraith, J. Kim, P. Helm, S. P. Bhavsar, J. S. Metzger, and C. M. Rochman, “Evidence of Microplastic Translocation in Wild-Caught Fish and Implications for Microplastic Accumulation Dynamics in Food Webs,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 55, no. 18, pp. 12372–12382, 2021, doi: 10.1021/acs.est.1c02922.
 - [60] J. Ding, S. Zhang, R. M. Razanajatovo, H. Zou, and W. Zhu, “Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*),” *Environ. Pollut.*, vol. 238, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2018.03.001.
 - [61] Y. Lu *et al.*, “Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 50, no. 7, pp. 4054–4060, 2016, doi: 10.1021/acs.est.6b00183.
 - [62] F. Collard *et al.*, “Microplastics in livers of European anchovies (*Engraulis encrasicolus*, L.),” *Environ. Pollut.*, vol. 229, pp. 1000–1005, 2017, doi: 10.1016/j.envpol.2017.07.089.
 - [63] F. Collard *et al.*, “Anthropogenic particles in the stomach contents and liver of the freshwater fish *Squalius cephalus*,” *Sci. Total Environ.*, vol. 643, pp. 1257–1264, 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.313.
 - [64] S. Abbasi, N. Soltani, B. Keshavarzi, F. Moore, A. Turner, and M. Hassanaghahi, “Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf,” *Chemosphere*, vol. 205, pp. 80–87, 2018, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.04.076.
 - [65] M. A. Browne, A. Dissanayake, T. S. Galloway, D. M. Lowe, and R. C. Thompson, “Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.),” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, no. 13, pp. 5026–5031, 2008, doi: 10.1021/es800249a.
 - [66] E. Fröhlich, “Role of omics techniques in the toxicity testing of nanoparticles,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 15, no. 1, pp. 1–22, 2017, doi: 10.1186/s12951-017-0320-3.
 - [67] J. Bhagat, L. Zang, N. Nishimura, and Y. Shimada, “Zebrafish: An emerging model to study microplastic and nanoplastic toxicity,” *Sci. Total Environ.*, vol. 728, p. 138707, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138707.
 - [68] B. R. Kiran, H. Kopperi, and S. Venkata Mohan, *Micro/nano-plastics occurrence, identification, risk analysis and mitigation: challenges and perspectives*, vol. 21, no. 1. Springer Netherlands, 2022. doi: 10.1007/s11157-021-09609-6.
 - [69] L. Lei *et al.*, “Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*,” *Sci. Total Environ.*, vol. 619–620, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.103.
 - [70] R. Qiao, C. Sheng, Y. Lu, Y. Zhang, H. Ren, and B. Lemos, “Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish,” *Sci. Total Environ.*, vol. 662, pp. 246–253, 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.01.245.
 - [71] Y. Zhao, R. Qiao, S. Zhang, and G. Wang, “Metabolomic profiling reveals the intestinal toxicity of different length of microplastic fibers on zebrafish (*Danio rerio*),” *J. Hazard. Mater.*, vol. 403, no. July 2020, p. 123663, 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123663.
 - [72] G. Ye *et al.*, “Polystyrene microplastics induce metabolic disturbances in marine medaka (*Oryzias*

- melastigmas) liver,” *Sci. Total Environ.*, vol. 782, p. 146885, 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146885.
- [73] L. Yin, B. Chen, B. Xia, X. Shi, and K. Qu, “Polystyrene microplastics alter the behavior, energy reserve and nutritional composition of marine jacobever (Sebastes schlegelii),” *J. Hazard. Mater.*, vol. 360, no. August, pp. 97–105, 2018, doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.07.110.
- [74] Q. Chen, C. Lackmann, W. Wang, T. B. Seiler, H. Hollert, and H. Shi, “Microplastics Lead to Hyperactive Swimming Behaviour in Adult Zebrafish,” *Aquat. Toxicol.*, vol. 224, no. April, p. 105521, 2020, doi: 10.1016/j.aquatox.2020.105521.
- [75] A. H. D’Costa, “Microplastics in decapod crustaceans: Accumulation, toxicity and impacts, a review,” *Sci. Total Environ.*, vol. 832, no. December 2021, p. 154963, 2022, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.154963.
- [76] K. W. Lee, W. J. Shim, O. Y. Kwon, and J. H. Kang, “Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod tigrionus japonicus,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, no. 19, pp. 11278–11283, 2013, doi: 10.1021/es401932b.
- [77] K. Savva, M. Farré, and C. Barata, “Sublethal effects of bio-plastic microparticles and their components on the behaviour of Daphnia magna,” *Environ. Res.*, vol. 236, no. July, 2023, doi: 10.1016/j.envres.2023.116775.
- [78] T. Viel *et al.*, “Effects of biodegradable-based microplastics in Paracentrotus lividus Lmk embryos: Morphological and gene expression analysis,” *Environ. Pollut.*, vol. 334, no. June, p. 122129, 2023, doi: 10.1016/j.envpol.2023.122129.
- [79] G. Malafaia *et al.*, “Green toxicology approach involving polylactic acid biomicroplastics and neotropical tadpoles: (Eco)toxicological safety or environmental hazard?,” *Sci. Total Environ.*, vol. 783, p. 146994, 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146994.
- [80] Z. Duan *et al.*, “Diet preference of zebrafish (Danio rerio) for bio-based polylactic acid microplastics and induced intestinal damage and microbiota dysbiosis,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 429, no. November 2021, p. 128332, 2022, doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.128332.
- [81] T. Q. Chagas *et al.*, “Multiple endpoints of polylactic acid biomicroplastic toxicity in adult zebrafish (Danio rerio),” *Chemosphere*, vol. 277, 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.130279.
- [82] J. P. J. de Oliveira, F. N. Estrela, A. S. de L. Rodrigues, A. T. B. Guimarães, T. L. Rocha, and G. Malafaia, “Behavioral and biochemical consequences of Danio rerio larvae exposure to polylactic acid bioplastic,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 404, no. July 2020, 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124152.
- [83] S. Sai *et al.*, “Risk assessment of potential toxicity induced by bio and synthetic plastic microspheres in Lates calcarifer,” *Chemosphere*, vol. 298, no. February, p. 134269, 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.134269.
- [84] M. M. Mourão *et al.*, “Characterization and biotechnological potential of intracellular polyhydroxybutyrate by stigeoclonium sp. B23 using cassava peel as carbon source,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 5, pp. 1–21, 2021, doi: 10.3390/polym13050687.
- [85] G. Magara, F. R. Khan, M. Pinti, K. Syberg, A. Inzirillo, and A. C. Elia, “Effects of combined exposures of fluoranthene and polyethylene or polyhydroxybutyrate microplastics on oxidative stress biomarkers in the blue mussel (Mytilus edulis),” *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues*, vol. 82, no. 10, pp. 616–625, 2019, doi: 10.1080/15287394.2019.1633451.

- [86] M. González-Pleiter *et al.*, “Secondary nanoplastics released from a biodegradable microplastic severely impact freshwater environments,” *Environ. Sci. Nano*, vol. 6, no. 5, pp. 1382–1392, 2019, doi: 10.1039/c8en01427b.
- [87] Y. Su *et al.*, “Biodegradable and conventional microplastics posed similar toxicity to marine algae *Chlorella vulgaris*,” *Aquat. Toxicol.*, vol. 244, no. January, p. 106097, 2022, doi: 10.1016/j.aquatox.2022.106097.
- [88] O. Setälä, J. Norkko, and M. Lehtiniemi, “Feeding type affects microplastic ingestion in a coastal invertebrate community,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 102, no. 1, pp. 95–101, 2016, doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.11.053.
- [89] T. Wang, L. Wang, Q. Chen, N. Kalogerakis, R. Ji, and Y. Ma, “Interactions between microplastics and organic pollutants: Effects on toxicity, bioaccumulation, degradation, and transport,” *Sci. Total Environ.*, vol. 748, p. 142427, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142427.
- [90] V. Rajgond, A. Mohite, N. More, and A. More, *Biodegradable polyester-polybutylene succinate (PBS): a review*, no. 0123456789. Springer Berlin Heidelberg, 2023. doi: 10.1007/s00289-023-04998-w.
- [91] J. Xu and B.-H. Guo, *Microbial Succinic Acid, Its Polymer Poly(butylene succinate), and Applications*, no. May. 2010. doi: 10.1007/978-3-642-03287-5_14.
- [92] M. Barletta *et al.*, “Poly(butylene succinate) (PBS): Materials, processing, and industrial applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 132, p. 101579, 2022, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2022.101579.
- [93] O. Platnieks, A. Barkane, N. Ijudina, G. Gaidukova, V. K. Thakur, and S. Gaidukovs, “Sustainable tetra pak recycled cellulose / Poly(Butylene succinate) based woody-like composites for a circular economy,” *J. Clean. Prod.*, vol. 270, p. 122321, 2020, doi: 10.1016/j.jclepro.2020.122321.
- [94] K. Zhang, A. K. Mohanty, and M. Misra, “Fully biodegradable and biorenewable ternary blends from polylactide, poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(butylene succinate) with balanced properties,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 4, no. 6, pp. 3091–3101, 2012, doi: 10.1021/am3004522.
- [95] M. Carus, “Biodegradable Polymers in Various Environments,” *Nova-Institute (Germany)*, p. 1, 2020.
- [96] D. Adhikari *et al.*, “Degradation of Bioplastics in Soil and Their Degradation Effects on Environmental Microorganisms,” *J. Agric. Chem. Environ.*, vol. 05, no. 01, pp. 23–34, 2016, doi: 10.4236/jacen.2016.51003.
- [97] K. Shen, “Synthesis, Properties and Applications of Poly (Butylene Succinate),” *MATEC Web Conf.*, vol. 386, p. 01005, 2023, doi: 10.1051/mateconf/202338601005.
- [98] P. Bionolle, “Showa Denko K. K.,” *Anal. Chem.*, vol. 59, no. 3, p. 174, 1987, doi: 10.1021/ac00130a744.
- [99] “PTTMCC_Brochure.pdf.”
- [100] K. Y. Perera, A. K. Jaiswal, and S. Jaiswal, “Biopolymer-Based Sustainable Food Packaging Materials: Challenges, Solutions, and Applications,” *Foods*, vol. 12, no. 12, pp. 1–59, 2023, doi: 10.3390/foods12122422.
- [101] P. Jambunathan and K. Zhang, “Engineered biosynthesis of biodegradable polymers,” *J. Ind.*

- Microbiol. Biotechnol.*, vol. 43, no. 8, pp. 1037–1058, 2016, doi: 10.1007/s10295-016-1785-z.
- [102] T. Keshavarz and I. Roy, “Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 13, no. 3, pp. 321–326, 2010, doi: 10.1016/j.mib.2010.02.006.
- [103] J. Możejko-Ciesielska and R. Kiewisz, “Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?,” *Microbiol. Res.*, vol. 192, no. 2016, pp. 271–282, 2016, doi: 10.1016/j.micres.2016.07.010.
- [104] B. McAdam, M. B. Fournet, P. McDonald, and M. Mojicevic, “Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics,” *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 12, pp. 1–20, 2020, doi: 10.3390/polym12122908.
- [105] A. J. dos Santos, L. V. Oliveira Dalla Valentina, A. A. Hidalgo Schulz, and M. A. Tomaz Duarte, “From Obtaining to Degradation of PHB:Material Properties. Part I,” *Ing. y Cienc.*, vol. 13, no. 26, pp. 269–298, 2017, doi: 10.17230/ingciencia.13.26.10.
- [106] T. G. Volova *et al.*, “Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 95, no. 12, pp. 2350–2359, 2010, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.08.023.
- [107] M. Zaborowska and K. Bernat, “The development of recycling methods for bio-based materials – A challenge in the implementation of a circular economy: A review,” *Waste Manag. Res.*, vol. 41, no. 1, pp. 68–80, 2023, doi: 10.1177/0734242X221105432.
- [108] N. Tanadchangsang and A. Pattanasupong, “Evaluation of Biodegradabilities of Biosynthetic Polyhydroxyalkanoates in Thailand Seawater and Toxicity Assessment of Environmental Safety Levels,” *Polymers (Basel)*, vol. 14, no. 3, 2022, doi: 10.3390/polym14030428.
- [109] C. Thellen, M. Coyne, D. Froio, M. Auerbach, C. Wirsén, and J. A. Ratto, “A processing, characterization and marine biodegradation study of melt-extruded polyhydroxyalkanoate (PHA) films,” *J. Polym. Environ.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–11, 2008, doi: 10.1007/s10924-008-0079-6.
- [110] L. S. Dilkes-Hoffman, P. A. Lant, B. Laycock, and S. Pratt, “The rate of biodegradation of PHA bioplastics in the marine environment: A meta-study,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 142, no. February, pp. 15–24, 2019, doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.03.020.
- [111] R. Kumar, K. Sadeghi, J. Jang, and J. Seo, “Mechanical, chemical, and bio-recycling of biodegradable plastics: A review,” *Sci. Total Environ.*, vol. 882, no. February, p. 163446, 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.163446.
- [112] J. R. Meyers, “Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism,” *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–26, 2018, doi: 10.1002/cpet.19.
- [113] R. Willemsen, S. V. T. Padje, J. C. Van Swieten, and B. A. Oostra, “Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for dementia,” *Neuromethods*, vol. 48, pp. 255–269, 2011, doi: 10.1007/978-1-60761-898-0_14.
- [114] R. Spence, G. Gerlach, C. Lawrence, and C. Smith, “The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*,” *Biol. Rev.*, vol. 83, no. 1, pp. 13–34, 2008, doi: 10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x.
- [115] R. L. Bailone *et al.*, “Zebrafish as an alternative animal model in human and animal vaccination research,” *Lab. Anim. Res.*, vol. 36, no. 1, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1186/s42826-020-00042-4.
- [116] S. Subramanian, “Zebrafish as a model organism - Can a fish mimic human?,” *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, vol. 34, no. 5, pp. 559–575, 2023, doi: 10.1515/jbcpp-2021-0113.
- [117] R. Spence *et al.*, “The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh,” *J. Fish*

- Biol.*, vol. 69, no. 5, pp. 1435–1448, 2006, doi: 10.1111/j.1095-8649.2006.01206.x.
- [118] A. Kolb, F. Hildebrandt, and C. Lawrence, “Effects of Diet and Social Housing on Reproductive Success in Adult Zebrafish, *Danio rerio*,” *Zebrafish*, vol. 15, no. 5, pp. 445–453, 2018, doi: 10.1089/zeb.2018.1599.
 - [119] C. Lawrence, “The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review,” *Aquaculture*, vol. 269, no. 1–4, pp. 1–20, 2007, doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.077.
 - [120] R. Spence, M. K. Fatema, S. Ellis, Z. F. Ahmed, and C. Smith, “Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh,” *J. Fish Biol.*, vol. 71, no. 1, pp. 304–309, 2007, doi: 10.1111/j.1095-8649.2007.01492.x.
 - [121] H. R. Jia, Y. X. Zhu, Q. Y. Duan, Z. Chen, and F. G. Wu, “Nanomaterials meet zebrafish: Toxicity evaluation and drug delivery applications,” *J. Control. Release*, vol. 311–312, no. August, pp. 301–318, 2019, doi: 10.1016/j.jconrel.2019.08.022.
 - [122] M. V. Caballero and M. Candiracci, “Zebrafish as Toxicological model for screening and recapitulate human diseases,” *J. Unexplored Med. Data*, vol. 3, no. 2, p. 4, 2018, doi: 10.20517/2572-8180.2017.15.
 - [123] J. S. Eisen, “History of zebrafish research,” *Zebrafish Biomed. Res. Biol. Husbandry, Dis. Res. Appl.*, pp. 3–14, 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-812431-4.00001-4.
 - [124] T. Y. Choi, T. I. Choi, Y. R. Lee, S. K. Choe, and C. H. Kim, “Zebrafish as an animal model for biomedical research,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 53, no. 3, pp. 310–317, 2021, doi: 10.1038/s12276-021-00571-5.
 - [125] J. Jeevanandam, Y. S. Chan, and M. K. Danquah, “Zebrafish as a model organism to study nanomaterial toxicity,” *Emerg. Sci. J.*, vol. 3, no. 3, pp. 195–208, 2019, doi: 10.28991/esj-2019-01182.
 - [126] C. Chakraborty, A. R. Sharma, G. Sharma, and S. S. Lee, “Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 14, no. 1, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1186/s12951-016-0217-6.
 - [127] R. Naomi, H. Bahari, M. D. Yazid, H. Embong, and F. Othman, “Zebrafish as a model system to study the mechanism of cutaneous wound healing and drug discovery: Advantages and challenges,” *Pharmaceuticals*, vol. 14, no. 10, 2021, doi: 10.3390/ph14101058.
 - [128] V. A. Porto *et al.*, “NMR-based metabolomics applied to ecotoxicology with zebrafish (*Danio rerio*) as a prominent model for metabolic profiling and biomarker discovery: Overviewing the most recent approaches,” *Sci. Total Environ.*, vol. 868, no. December 2022, 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.161737.
 - [129] P. S. Reel, S. Reel, E. Pearson, E. Trucco, and E. Jefferson, “Using machine learning approaches for multi-omics data analysis: A review,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 49, no. March, p. 107739, 2021, doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107739.
 - [130] X. Dai and L. Shen, “Advances and Trends in Omics Technology Development,” *Front. Med.*, vol. 9, no. July, 2022, doi: 10.3389/fmed.2022.911861.
 - [131] Γ. Θεοδωρίδης, “Κεφάλαιο 2 : Βιολογία Συστημάτων , Τεχνολογίες Omics,” pp. 1–21.
 - [132] C. P. Braga and J. Adamec, “Metabolome analysis,” *Encycl. Bioinforma. Comput. Biol. ABC Bioinforma.*, vol. 1–3, pp. 463–475, 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20134-9.

- [133] F. Danzi *et al.*, “To metabolomics and beyond: a technological portfolio to investigate cancer metabolism,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 8, no. 1, 2023, doi: 10.1038/s41392-023-01380-0.
- [134] A. Vignoli *et al.*, “High-Throughput Metabolomics by 1D NMR,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 58, no. 4, pp. 968–994, 2019, doi: 10.1002/anie.201804736.
- [135] C. B. Clish, “Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine,” *Mol. Case Stud.*, vol. 1, no. 1, p. a000588, 2015, doi: 10.1101/mcs.a000588.
- [136] R. Goodacre, S. Vaidyanathan, W. B. Dunn, G. G. Harrigan, and D. B. Kell, “Metabolomics by numbers: Acquiring and understanding global metabolite data,” *Trends Biotechnol.*, vol. 22, no. 5, pp. 245–252, 2004, doi: 10.1016/j.tibtech.2004.03.007.
- [137] O. Fiehn, “Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes,” *Plant Mol. Biol.*, vol. 48, no. 1–2, pp. 155–171, 2002, doi: 10.1023/A:1013713905833.
- [138] K. E. Hillyer, E. Raes, K. Karsh, B. Holmes, A. Bissett, and D. J. Beale, “Metabolomics as a tool for in situ study of chronic metal exposure in estuarine invertebrates,” *Environ. Pollut.*, vol. 292, no. PB, p. 118408, 2022, doi: 10.1016/j.envpol.2021.118408.
- [139] L. Liu *et al.*, “Study on toxicity effects of environmental pollutants based on metabolomics: A review,” *Chemosphere*, vol. 286, no. P2, p. 131815, 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131815.
- [140] S. Moco, “Studying Metabolism by NMR-Based Metabolomics,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 9, no. April, pp. 1–12, 2022, doi: 10.3389/fmolb.2022.882487.
- [141] Y. Chen, E. M. Li, and L. Y. Xu, “Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow,” *Metabolites*, vol. 12, no. 4, 2022, doi: 10.3390/metabo12040357.
- [142] B. P. Lankadurai, E. G. Nagato, and M. J. Simpson, “Environmental metabolomics: An emerging approach to study organism responses to environmental stressors,” *Environ. Rev.*, vol. 21, no. 3, pp. 180–205, 2013, doi: 10.1139/er-2013-0011.
- [143] V. Ghini *et al.*, “Fingerprinting and profiling in metabolomics of biosamples,” *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 138–139, no. June, pp. 105–135, 2023, doi: 10.1016/j.pnmrs.2023.10.002.
- [144] J. C. Hoch *et al.*, “Biological Magnetic Resonance Data Bank,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 51, no. D1, pp. D368–D376, 2023, doi: 10.1093/nar/gkac1050.
- [145] J. R. Montenegro-Burke, C. Guigas, and G. Siuzdak, “METLIN: A Tandem Mass Spectral Library of Standards,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 2104, no. November 2019, pp. 149–163, 2020, doi: 10.1007/978-1-0716-0239-3_9.
- [146] L. R. Euceda, G. F. Giskeodegård, and T. F. Bathen, “Preprocessing of NMR metabolomics data,” *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 75, no. 3, pp. 193–203, 2015, doi: 10.3109/00365513.2014.1003593.
- [147] P. G. Takis, V. Ghini, L. Tenori, P. Turano, and C. Luchinat, “Uniqueness of the NMR approach to metabolomics,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 120, p. 115300, 2019, doi: 10.1016/j.trac.2018.10.036.
- [148] (James N. Miller)

- [149] S. Ren, A. A. Hinzman, E. L. Kang, R. D. Szczesniak, and L. J. Lu, *Computational and statistical analysis of metabolomics data*, vol. 11, no. 6. 2015. doi: 10.1007/s11306-015-0823-6.
- [150] P. Khatri, M. Sirota, and A. J. Butte, “Ten years of pathway analysis: Current approaches and outstanding challenges,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 8, no. 2, 2012, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002375.
- [151] L. F. Eggers and D. Schwudke, “Encyclopedia of Lipidomics,” *Encycl. Lipidomics*, vol. 3, pp. 1–6, 2016, doi: 10.1007/978-94-007-7864-1.
- [152] O. Cloarec *et al.*, “Statistical total correlation spectroscopy: An exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic ¹H NMR data sets,” *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 5, pp. 1282–1289, 2005, doi: 10.1021/ac048630x.
- [153] D. Mazurais *et al.*, “Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae,” *Mar. Environ. Res.*, vol. 112, pp. 78–85, 2015, doi: 10.1016/j.marenvres.2015.09.009.
- [154] K. L. Kaposi, B. Mos, B. P. Kelaher, and S. A. Dworjanyn, “Ingestion of microplastic has limited impact on a marine larva,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 48, no. 3, pp. 1638–1645, 2014, doi: 10.1021/es404295e.
- [155] C. W. Mak, K. Ching-Fong Yeung, and K. M. Chan, “Acute toxic effects of polyethylene microplastic on adult zebrafish,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 182, no. July, pp. 1–10, 2019, doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109442.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ Π1: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα βραγχίων από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PBS, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).

«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΒΡΑΓΧΙΩΝ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ	«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΒΡΑΓΧΙΩΝ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ
NADH	✓	✓	Butyric acid	✓	✓
Selenomethionine	✓	✓	L-Asparagine	✓	✓
Panthenol	✓	✓	O-Phosphoethanolamine	✓	✓
3-Hexen-1-ol	✓	✓	ortho-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓
Isobutyric acid	✓	✓	muco-Inositol	✓	✓
Galacturonic acid	✓	✓	Tyramine	✓	✓
Glucose 6-phosphate	✓	✓	L-Valine	✓	✓
Nicotinuric acid	✓	✓	Isoleucine	✓	✓
Ethacrynic acid	✓	✓	Pyridoxal	✓	✓
N-Acetyl-L-alanine	✓	✓	Phenylethylamine	✓	✓
Galactose 1-phosphate	✓	✓	Shikimic acid	✓	-
2,3-Diphosphoglyceric acid	✓	✓	D-Pinitol	✓	✓
1-Butanol	✓	✓	2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	✓	✓
Amygdalin	✓	✓	Pantothenic acid	✓	-
Guanidoacetic acid	✓	✓	N-Acetylneuraminic acid	✓	✓
Tropate	✓	✓	2-Fucosyllactose	✓	✓
Propyl alcohol	✓	✓	Homovanillic acid	✓	✓
2-Ketobutyric acid	✓	✓	Butyric acid	✓	✓
Ketoleucine	✓	✓	Ureidosuccinic acid	✓	-
Phosphoserine	✓	✓	Benzyl methyl sulfide	✓	✓
Betaine aldehyde	✓	✓	2-Amino-3-phosphonopropionic acid	✓	✓
Tyrosol	✓	✓	L-Alanine	✓	✓
Phenylacetic acid	✓	✓	Carnosine	✓	✓
Epinephrine	✓	✓	Glutamic acid	✓	✓
Ferulic acid	✓	✓	alpha-Ketisovaleric acid	✓	✓
Isoferulic acid	✓	✓	Valeric acid	✓	✓
Phosphonoacetate	✓	✓	Methionine sulfoxide	✓	✓
2,2-Dimethylsuccinic acid	✓	✓	N-alpha-Acetyl-L-lysine	✓	✓
1,3-Diaminopropane	✓	✓	L-Gulonolactone	✓	✓
Glucose 1-phosphate	✓	✓	1-Methylhistidine	✓	✓
Pyruvic acid	✓	✓	L-Cystine	✓	✓
Choline	✓	✓	Leucine	✓	✓
N-Methylurea	✓	-	Propionic acid	✓	✓
Sarcosine	✓	✓	N-Acetyl-L-glutamic acid	✓	✓
Glyceraldehyde	✓	✓	Cyclohexylamine	✓	✓
Malic acid	✓	✓	N-Acetylmannosamine	✓	✓
5-Hydroxyindoleacetic acid	✓	✓	trans-Cinnamic acid	✓	✓
Levogluconan	✓	✓	Purine	✓	✓
Methionine	✓	✓	Glycine	✓	✓
Erythritol	✓	✓	Itaconic acid	✓	-
Caffeine	✓	✓	Ethanol	✓	✓
Cysteic acid	✓	✓	Deoxycytidine	✓	-
Hydroxyoctanoic acid	✓	-	Methylmalonic acid	✓	✓
Glycerol 3-phosphate	✓	✓	4-Methylbenzoic acid	✓	✓
O-Acetylserine	✓	✓	Citric acid	✓	-
D-Alanyl-D-alanine	✓	-	Gluconic acid	✓	-
N6-Acetyl-L-lysine	✓	✓	Spermine	✓	✓
Lactic acid	✓	✓	Trigonelline	✓	✓
15(R)-hydroperoxy-EPE	✓	✓	Glycogen	✓	✓
D-Galactose	✓	-	Dimethylurea	✓	✓
3-(2-Hydroxyphenyl)propanoic acid	✓	✓	Uridine 5'-monophosphate	✓	✓
Acetophenone	✓	✓	Guaicol	✓	✓
Glycocholic acid	✓	-	L-Threonine	✓	-
Glycylproline	✓	✓	5-Phenylvaleric acid	✓	-
Citrulline	✓	-	1-Hexanol	✓	-
Cyclic AMP	✓	✓	DL-2-Aminooctanoic acid	✓	✓
Stachyose	✓	✓	L-Sorbose	✓	✓
Pyridoxine	✓	-	L-Cysteine	✓	✓
2-Hydroxyphenethylamine	✓	✓	Serine	✓	✓
Ciliatine	✓	✓	Cadaverine	✓	-
5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazole	✓	✓	Ornithine	✓	✓
2-Octenoic acid	✓	-	Pimelic acid	✓	✓
3-Methoxytyramine	✓	-	Glutaric acid	✓	✓
Lysine	✓	✓	p-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓
Erythritol	✓	✓	Dopamine	✓	✓
Mannitol	✓	✓	Sorbitol	✓	✓
beta-Alanine	✓	-	Indoleacetic acid	✓	✓
Succinic acid	✓	-	Glycerol	✓	✓
Propane-1,3-diol	✓	-	m-Cresol	✓	✓
3-Hydroxymethylglutaric acid	✓	-	4-Hydroxybenzaldehyde	✓	✓
L-Dihydroorotic acid	✓	✓	Adipic acid	✓	✓
Norepinephrine	✓	-	Glutamine	✓	-
alpha-D-Glucose 1,6-bisphosphate	✓	✓	L-Tryptophan	✓	-
Prephenate	✓	✓	myo-Inositol	✓	✓
Caproic acid	✓	-	D-Xylitol	✓	✓
Pyridine	✓	✓	4-Nitrophenyl phosphate	✓	✓
o-Cresol	✓	✓	Guanosine diphosphate	✓	✓

4-Hydroxy-3-methoxybenzenemethanol	✓	✓	5-Hydroxy-L-tryptophan	✓	✓
4-Acetamidobutanoic acid	✓	-	Homo-L-arginine	✓	✓
cis-1,2-Cyclohexanediol	✓	✓	Agmatine	✓	✓
3-Cresotinic acid	✓	-	D-Carnitine	✓	✓
4-Hydroxybenzyl alcohol	✓	✓	Pipecolic acid	✓	-
3,5-Diiodo-L-tyrosine	✓	-	L-Histidinol	✓	✓
Vanillic acid	✓	✓	Pyridoxamine	✓	✓
Neostigmine	✓	✓	4-Hydroxycinnamic acid	✓	✓
L-Arginine	✓	-	Raffinose	✓	✓
L-Fucose	✓	✓	D-Fructose 2,6-bisphosphate	✓	-
L-Homoserine	✓	✓	L-Norleucine	✓	✓
Cotinine	✓	✓	Homocitrulline	✓	✓
Spermidine	✓	✓	Tryptamine	✓	✓
Trehalose	✓	-	2-Hydroxycaproic acid	✓	✓
2-Methylglutaric acid	✓	✓	3-Fucosyllactose	✓	✓
Adenosine triphosphate	✓	✓	Glycolaldehyde	-	✓
5-Adenosylmethionine	✓	✓	Phenylalanine	-	✓
Glucosamine 6-phosphate	✓	-	Beta-Leucine	-	✓
L-Acetylcarnitine	✓	✓	Homogentisic acid	-	✓
Lactulose	✓	✓	4-Chlorophenylacetate	-	✓
Gibberellin A3	✓	✓	Nicotinic acid	-	✓
Deoxyinosine	✓	-	Mesaconic acid	-	✓
Sucrose	✓	-	3-Methyladipic acid	-	✓
Argininosuccinic acid	✓	✓	Acetamide	-	✓
Serotonin	✓	✓	Adenosine	-	✓
Arecoline	✓	-	4-Pyridoxic acid	-	✓
Uridine	✓	✓	3-Methyl-2-butenal	-	✓
N-Acetyl-D-glucosamine	✓	✓	5-Methylcytosine	-	✓
D-Maltose	✓	✓	Anserine	-	✓
Melibiose	✓	✓			
ADP	-	✓			
Arbutin	-	✓			
D-Xylose	-	✓			
Guanosine	-	✓			
Inosin	-	✓			
Deoxyuridine	-	✓			
Folic acid	-	✓			
Inosinic acid	-	✓			
NADPH	-	✓			

ΠΙΝΑΚΑΣ Π2: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα εγκεφάλων από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PBS, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).

«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ	«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ
Alanine	✓	✓	L-Cysteine	✓	✓
alpha-Ketisovaleric acid	✓	✓	Gallic acid	✓	-
Tyrosol	✓	✓	Uridine triphosphate	✓	✓
1-Butanol	✓	✓	Indolelactic acid	✓	✓
Glycerol	✓	✓	Serine	✓	✓
Guanidoacetic acid	✓	✓	Erythritol	✓	✓
Vanillic acid	✓	✓	Indoleacetic acid	✓	✓
L-Valine	✓	✓	L-Sorbose	✓	✓
D-Ornithine	✓	✓	Agmatine	✓	✓
Glutamine	✓	✓	Epsilon-caprolactam	✓	✓
Ethanol	✓	✓	Glutamic acid	✓	✓
Sarcosine	✓	✓	Guanosine	✓	-
3-Hexen-1-ol	✓	✓	5-Methylcytosine	✓	✓
D-Maltose	✓	✓	Ketoleucine	✓	✓
L-Arginine	✓	✓	L-alpha-Aminobutyric acid	✓	✓
Uridine diphosphate glucuronic acid	✓	✓	cis-1,2-Cyclohexanediol	✓	✓
3-Fucosyllactose	✓	✓	Diethanolamine	✓	✓
Trigonelline	✓	✓	2-Octenoic acid	✓	✓
6-Aminopenicillanic acid	✓	✓	Galactose 1-phosphate	✓	✓
Creatine	✓	✓	Methylmalonic acid	✓	✓
Pyridoxamine 5'-phosphate	✓	✓	Phenylethylamine	✓	✓
Pyridoxal 5'-phosphate	✓	✓	Beta-Leucine	✓	✓
Creatinine	✓	✓	2-Amino-3-phosphonopropionic acid	✓	✓
Phenylacetic acid	✓	✓	D-Pinitol	✓	✓
Cysteamine	✓	✓	Adipic acid	✓	✓
ortho-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓	Diaminopimelic acid	✓	✓
Pyridoxal	✓	✓	3-Methyl-2-butenal	✓	✓
Pyridoxamine	✓	✓	Methylglutaric acid	✓	✓
Phosphoserine	✓	✓	L-Cystine	✓	✓
Pyruvic acid	✓	✓	Lactic acid	✓	✓
Tropate	✓	✓	5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazole	✓	✓
Amygdalin	✓	✓	L-Asparagine	✓	✓
4-Methylbenzoic acid	✓	✓	3,5-Diiodo-L-tyrosine	✓	✓
Propyl alcohol	✓	✓	N-Acetyl-L-aspartic acid	✓	✓
Glucose 6-phosphate	✓	✓	Glycerol 3-phosphate	✓	✓
Ethacrynic acid	✓	✓	Decamethonium	✓	✓
gamma-Aminobutyric acid	✓	✓	NADPH	✓	-
Butyric acid	✓	✓	dADP	✓	✓

Raffinose	✓	✓	Spermidine	✓	✓
Acetophenone	✓	✓	Homovanillic acid	✓	✓
Nicotinic acid	✓	✓	Salicin	✓	✓
Neostigmine	✓	✓	Vanillylmandelic acid	✓	-
Erythritol	✓	✓	Galacturonic acid	✓	✓
Valeric acid	✓	✓	D-Xylitol	✓	✓
Ornithine	✓	✓	Flavin mononucleotide	✓	-
D-Ribose 5-phosphate	✓	✓	Pipecolic acid	✓	✓
Oxidized glutathione	✓	✓	Homo-L-arginine	✓	✓
Deoxyuridine	✓	✓	Methionine	✓	✓
Spectinomycin	✓	✓	Trehalose	✓	✓
Pantothenic acid	✓	✓	Phenylalanine	✓	✓
Lysine	✓	✓	Cotinine	✓	✓
Monoethyl malonic acid	✓	✓	Oxoglutaric acid	✓	✓
2-Hydroxybutyric acid	✓	✓	N6-Acetyl-L-lysine	✓	✓
N-Acetyl-L-alanine	✓	✓	L-Histidinol	✓	✓
3-Phosphoglyceric acid	✓	✓	Citrulline	✓	✓
D-Lactic acid	✓	✓	Shikimic acid	✓	✓
Ribothymidine	✓	✓	Carglumic acid	✓	✓
N-Acetylneuraminic acid	✓	✓	1-Methylhistidine	✓	✓
Xanthosine	✓	✓	Adenosine triphosphate	✓	✓
Citric acid	✓	✓	Propylene glycol	✓	✓
Glycogen	✓	✓	Arbutin	✓	-
Betaine aldehyde	✓	✓	Chlorogenic acid	✓	✓
Tetramethylammonium	✓	✓	alpha-D-Glucose 1,6-bisphosphate	✓	✓
Tyramine	✓	✓	Cellobiose	✓	✓
Epinephrine	✓	✓	3-Methyladipic acid	✓	✓
1-Hexanol	✓	✓	Homocysteine	✓	✓
o-Cresol	✓	✓	N-Methyl-D-aspartic acid	✓	✓
Glycine	✓	✓	Uridine	✓	-
2-Phenylethanol	✓	✓	Cytidine	✓	✓
4-Guanidinobutanoic acid	✓	✓	L-Threonine	✓	✓
Pyridoxine	✓	✓	Allose	✓	✓
Ureidosuccinic acid	✓	✓	D-Fructose 2,6-bisphosphate	✓	✓
Ascorbic acid	✓	✓	Panthenol	✓	✓
Acetylphosphate	✓	✓	FAD	✓	✓
Sulfoacetate	✓	✓	D-Galactose	✓	✓
Spermine	✓	✓	Methionine sulfoxide	✓	✓
Histamine	✓	✓	Alpha-Lactose	✓	✓
Dihydroxyacetone	✓	✓	Citramalic acid	✓	✓
Diethyldithiophosphate	✓	-	N-Acetyl-L-glutamic acid	✓	✓
Tryptamine	✓	✓	D-Alanyl-D-alanine	✓	✓
D-threo-Isocitric acid	✓	✓	Carnosine	✓	-
Isobutyric acid	✓	✓	Melibiose	✓	✓
Aminoadipic acid	✓	✓	N-Acetylmannosamine	✓	✓
Itaconic acid	✓	✓	Glycocholic acid	✓	✓
2,2-Dimethylsuccinic acid	✓	✓	N-acetyl-D-glucosamine	✓	-
Sinapic acid	✓	✓	Gibberellin A3	✓	✓
2-Hydroxyphenethylamine	✓	✓	S-Adenosylmethionine	✓	✓
3-(2-Hydroxyphenyl)propanoic acid	✓	✓	Kanamycin	✓	✓
L-threo-3-Methylaspartate	✓	✓	Lacto-N-tetraose	✓	✓
3,4-Dihydro-2H-1-benzopyran-2-one	✓	✓	2-Fucosylactose	✓	✓
4-Methylcatechol	✓	✓	Selenomethionine	✓	✓
Sorbitol	✓	✓			
D-Serine	✓	✓			
Vanillin	✓	✓			
2,3-Dihydroxytoluene	✓	✓			
3-Cresotinic acid	✓	✓			
Citrulline	✓	✓			
Prephenate	✓	✓			
Propane-1,3-diol	✓	✓			
L-Threonine	✓	✓			
4-Hydroxybenzeneacetonitrile	✓	✓			
3-Methoxytyramine	✓	-			
Glyceraldehyde	✓	✓			
Gluconolactone	✓	✓			
Propionic acid	✓	✓			
Pimelic acid	✓	✓			
Gluconic acid	✓	✓			
Choline	✓	✓			
Mannitol	✓	✓			

ΠΙΝΑΚΑΣ Π3: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα γαστρεντερικών σωλήνων από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PBS, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη)

«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ	«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ
NADH	✓	✓	Glycine	✓	✓
Selenomethionine	✓	✓	Glycogen	✓	✓
Phenylacetic acid	✓	✓	Methylmalonic acid	✓	✓
ortho-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓	Acetic acid	✓	✓
3-Hexen-1-ol	✓	✓	Malic acid	✓	✓
Ketoleucine	✓	✓	2-Hydroxyphenethylamine	✓	✓
Pyridoxal	✓	✓	Propyl alcohol	✓	✓
Ethacrynic acid	✓	✓	Ascorbic acid	✓	✓
m-Cresol	✓	✓	Glutaric acid	✓	✓
Isobutyric acid	✓	✓	D-Xylitol	✓	✓
L-Tryptophan	✓	✓	Glycerol 3-phosphate	✓	✓
Homo-L-arginine	✓	✓	Gluconic acid	✓	✓
L-Valine	✓	✓	Citraconic acid	✓	-
1-Methylhistidine	✓	✓	Propane-1,3-diol	✓	✓
Benzyl methyl sulfide	✓	✓	N6-Acetyl-L-lysine	✓	✓
Phenylethylamine	✓	✓	Amygdalin	✓	✓
Gibberellin A3	✓	-	L-Dihydroroctic acid	✓	✓
2,3-Diphosphoglyceric acid	✓	✓	O-Phosphoethanolamine	✓	✓
3-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓	2-Methylglutaric acid	✓	-
Homogentisic acid	✓	✓	1,3-Diaminopropane	✓	-
Glycolaldehyde	✓	✓	L-Gulonolactone	✓	✓
Sulfoacetate	✓	✓	Choline	✓	✓
Tyrosol	✓	✓	3,4-Dihydroxybenzeneacetic acid	✓	✓
Epinephrine	✓	✓	Prephenate	✓	-
3-Phosphoglyceric acid	✓	-	Glycerol	✓	✓
Guanidoacetic acid	✓	✓	L-Sorbose	✓	✓
Citrulline	✓	✓	D-Aspartic acid	✓	✓
2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	✓	✓	Mannitol	✓	✓
Tartaric acid	✓	-	Indoleacetic acid	✓	✓
Glyceraldehyde	✓	✓	Creatinine	✓	✓
L-Cystine	✓	✓	Levogluconan	✓	✓
Pyruvic acid	✓	✓	Glutamic acid	✓	✓
Pyridoxamine	✓	✓	Sorbitol	✓	✓
1-Butanol	✓	✓	L-Aspartic acid	✓	✓
gamma-Aminobutyric acid	✓	✓	p-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓
Serine	✓	✓	L-Homoserine	✓	✓
Butyric acid	✓	✓	Acetylphosphate	✓	-
D-Ornithine	✓	✓	2-Octenoic acid	✓	✓
L-Asparagine	✓	✓	2-Hydroxycaproic acid	✓	✓
Norvaline	✓	✓	L-Acetylcarnitine	✓	✓
Phosphocreatine	✓	✓	Pipecolic acid	✓	✓
2-Hydroxyethanesulfonate	✓	✓	2-Phenylbutyric acid	✓	-
Lysine	✓	✓	Glucose 6-phosphate	✓	✓
L-Cysteine	✓	✓	Pyridine	✓	✓
L-Alanine	✓	✓	muco-Inositol	✓	✓
2-Amino-3-phosphonopropionic acid	✓	✓	3,5-Diiodo-L-tyrosine	✓	✓
Cysteic acid	✓	✓	Pimelic acid	✓	✓
Sarcosine	✓	✓	L-Fucose	✓	✓
Tyramine	✓	✓	Cysteamine	✓	✓
Cyclohexylamine	✓	✓	D-Pinitol	✓	✓
Acetylglutamine	✓	✓	Fructose 6-phosphate	✓	✓
O-Acetylserine	✓	✓	Acetylcholine	✓	✓
Erythritol	✓	✓	4-Hydroxybenzaldehyde	✓	-
Nicotinic acid	✓	✓	Dihydrouracil	✓	✓
Propionic acid	✓	✓	3-Hydroxybutyric acid	✓	✓
1-Hexanol	✓	✓	Raffinose	✓	✓
Indolelactic acid	✓	-	Valeric acid	✓	✓
L-Histidinol	✓	✓	Creatine	✓	✓
4-Chlorophenylacetate	✓	✓	Glucose 1-phosphate	✓	✓
Shikimic acid	✓	-	DL-2-Amino-octanoic acid	✓	✓
Betaine	✓	-	Taurine	✓	✓
N-Acetyl-L-alanine	✓	✓	N-Acetyl-L-glutamic acid	✓	✓
D-Carnitine	✓	✓	Hydroxyoctanoic acid	✓	✓
Panthenol	✓	✓	Leucine	✓	✓
N-Acetyl-D-Glucosamine 6-Phosphate	✓	✓	Isoleucine	✓	✓
N-Acetylmannosamine	✓	✓	Guanosine diphosphate	✓	-
Neostigmine	✓	✓	4-Hydroxycinnamic acid	✓	✓
Pantothenic acid	✓	✓	Arbutin	✓	✓
5-Adenosylhomocysteine	✓	-	Phenylalanine	✓	-
Caffeine	✓	✓	Triethanolamine	✓	-
3-(2-Hydroxyphenyl)propanoic acid	✓	✓	Glutamine	✓	✓
2-Fucosyllactose	✓	✓	Cyclamic acid	✓	✓
Thiamine	✓	-	Ethylmalonic acid	✓	✓
Phosphoserine	✓	-	Agmatine	✓	✓
4-Methylbenzoic acid	✓	-	alpha-D-Glucose 1,6-bisphosphate	✓	✓
Betaine aldehyde	✓	✓	Spermidine	✓	✓
L-Norleucine	✓	✓	N-alpha-Acetyl-L-lysine	✓	✓
Itaconic acid	✓	✓	Methionine sulfoxide	✓	-
Isoferulic acid	✓	✓	Homocitrulline	✓	✓
Homovanillic acid	✓	✓	D-Xylose	✓	✓
Ethanol	✓	✓	Acetophenone	✓	✓

Spermine	✓	✓	5-Hydroxyindoleacetic acid	✓	✓
Beta-Leucine	✓	✓	Melibiose	✓	✓
Stachyose	✓	✓	Caproic acid	✓	✓
5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazole	✓	✓	D-Lactic acid	✓	✓
N-Formiminoglycine	✓	✓	Lactulose	✓	✓
Pyridoxine	✓	✓	D-Galactose	✓	✓
2,2-Dimethylsuccinic acid	✓	-	Spectinomycin	✓	-
Trigonelline	✓	✓	Trehalose	✓	-
L-Threonine	✓	✓			
D-Alanyl-D-alanine	✓	-			
Methionine	✓	✓			
Galactose 1-phosphate	✓	-			
Flavin mononucleotide	✓	✓			
Serotonin	✓	✓			
Adenosine triphosphate	✓	✓			
L-Cystathionine	✓	✓			
3-Sulfinoolanine	✓	✓			
Sucrose	✓	-			
Argininosuccinic acid	✓	✓			
L-Arginine	✓	✓			
Glucosamine 6-phosphate	✓	✓			
Glycylproline	✓	✓			
Uridine	✓	✓			
D-Maltose	✓	-			
D-Mannose	✓	✓			
5-Adenosylmethionine	✓	✓			
3-Fucosyllactose	✓	✓			
N-Acetyl-glucosamine 1-phosphate	-	✓			
Deoxycytidine	-	✓			
3-Hexenedioic acid	-	✓			
alpha-Ketoisovaleric acid	-	✓			
D-Fructose 2,6-bisphosphate	-	✓			
4-Pyridoxic acid	-	✓			
Ethanolamine	-	✓			
Folic acid	-	✓			
myo-Inositol	-	✓			
Ribitol	-	✓			
N-Acetylglutamine	-	✓			
Deoxyuridine	-	✓			
Cytidine	-	✓			
3-Methyladipic acid	-	✓			
Cholic acid	-	✓			

ΠΙΝΑΚΑΣ Π4: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα ηπάτων από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PBS, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).

«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΗΠΑΤΟΣ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ	«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΗΠΑΤΟΣ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ
Nicotinic acid	✓	✓	Glucose 1-phosphate	✓	✓
O-Acetylserine	✓	✓	Glycolaldehyde	✓	✓
N-Acetyl-L-alanine	✓	✓	Shikimic acid	✓	✓
L-Threonine	✓	✓	Ascorbic acid	✓	✓
D-Lactic acid	✓	✓	S-Adenosylhomocysteine	✓	✓
Selenomethionine	✓	✓	Sulfoacetate	✓	✓
Guanidoacetic acid	✓	✓	L-Gulonolactone	✓	✓
Pyridoxal 5'-phosphate	✓	✓	Trimethylamine N-oxide	✓	✓
Phenylacetic acid	✓	✓	Pimelic acid	✓	-
Phosphoserine	✓	✓	1-Methylhistidine	✓	✓
Pyridoxine	✓	✓	D-Xylitol	✓	-
1-Hexanol	✓	✓	3,4-Dihydroxybenzeneacetic acid	✓	✓
Pyridoxamine	✓	✓	Creatine	✓	✓
Vanillic acid	✓	✓	Hippuric acid	✓	✓
Dihydrouracil	✓	✓	N-alpha-Acetyl-L-lysine	✓	✓
3-Phosphoglyceric acid	✓	✓	Trigonelline	✓	-
N-Acetyl-glucosamine 1-phosphate	✓	✓	Homocitrulline	✓	✓
Tropate	✓	✓	L-Cysteine	✓	✓
ortho-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓	Indoleacetic acid	✓	✓
Choline	✓	✓	L-Sorbose	✓	✓
Biotin	✓	✓	D-Fructose 2,6-bisphosphate	✓	✓
Amygdalin	✓	✓	D-Galactono-1,4-lactone	✓	✓
Inosine	✓	✓	N-Acetyl-L-glutamic acid	✓	✓
NADPH	✓	✓	D-Serine	✓	✓
Pyridoxal	✓	✓	Spectinomycin	✓	✓
Tyramine	✓	✓	Valeric acid	✓	✓
L-Tryptophan	✓	✓	1-Butanol	✓	✓
dADP	✓	✓	cis-1,2-Cyclohexanediol	✓	✓
Cytidine	✓	✓	Betaine	✓	✓
alpha-D-Glucose 1,6-bisphosphate	✓	✓	Epsilon-caprolactam	✓	✓
Propionic acid	✓	✓	Indolelactic acid	✓	✓
2-Ketobutyric acid	✓	✓	Guaiacol	✓	✓
Lactic acid	✓	✓	Pipecolic acid	✓	✓
L-Alanine	✓	✓	2-Octenoic acid	✓	✓
3-Hexen-1-ol	✓	✓	3,5-Diiodo-L-tyrosine	✓	✓
Ethacrynic acid	✓	✓	Leucine	✓	✓
2-Methylglutaric acid	✓	✓	Sarcosine	✓	✓
L-Valine	✓	✓	Phenylacetylglutamine	✓	✓
N-Acetyl-D-Glucosamine 6-Phosphate	✓	✓	Glyceraldehyde	✓	✓
N-Acetylmannosamine	✓	-	Pantothenic acid	✓	✓
2-Fucosyllactose	✓	✓	Glucaric acid	✓	✓
3-Fucosyllactose	✓	✓	D-Aspartic acid	✓	✓
Homogentisic acid	✓	✓	L-Acetylcarnitine	✓	✓
2-Hydroxybenzyl alcohol	✓	✓	Cadaverine	✓	-
Homovanillic acid	✓	✓	Caffeine	✓	✓
Betaine aldehyde	✓	✓	L-Homoserine	✓	✓
Isoferulic acid	✓	✓	Serine	✓	✓
Benzyl methyl sulfide	✓	✓	4-Hydroxybenzaldehyde	✓	-
Ethanol	✓	✓	5-Hydroxy-L-tryptophan	✓	✓
Butyric acid	✓	✓	Phosphocreatine	✓	✓
Tartaric acid	✓	✓	FAD	✓	-
Ureidosuccinic acid	✓	✓	Proline	✓	✓
Glycerol 3-phosphate	✓	✓	Erythritol	✓	✓
L-Acetylcarnitine	✓	✓	Lactulose	✓	✓
Galacturonic acid	✓	✓	L-Fucose	✓	✓
2-Hydroxyethanesulfonate	✓	✓	Neostigmine	✓	✓
Deoxycytidine	✓	✓	Methionine sulfoxide	✓	✓
p-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓	Triethanolamine	✓	✓
L-Norleucine	✓	✓	Acetylcholine	✓	✓
N-Formiminoglycine	✓	✓	Fructose 6-phosphate	✓	✓
Deoxyinosine	✓	✓	2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	✓	✓
Tyrosol	✓	✓	L-Histidinol	✓	✓
O-Phosphoethanolamine	✓	✓	L-Cystathionine	✓	✓
Stachyose	✓	✓	Arbutin	✓	✓
L-Cystine	✓	✓	Homo-L-arginine	✓	✓
Glycine	✓	✓	Gibberellin A3	✓	-
Cysteamine	✓	✓	Lysine	✓	✓
Acetylglutamine	✓	✓	D-Xylose	✓	✓
2,3-Diphosphoglyceric acid	✓	✓	Isoleucine	✓	✓
Phenylalanine	✓	✓	Folic acid	✓	✓
Epinephrine	✓	✓	Cotinine	✓	-
Uridine triphosphate	✓	-	Raffinose	✓	✓
Propyl alcohol	✓	✓	N-Acetylneuraminic acid	✓	✓
2-Hydroxyphenethylamine	✓	✓	Serotonin	✓	-
alpha-Ketoisovaleric acid	✓	-	Adenosine triphosphate	✓	✓
D-Ornithine	✓	✓	Trehalose	✓	-
D-Alanyl-D-alanine	✓	✓	Uridine diphosphate glucuronic acid	✓	✓
Deoxyguanosine	✓	✓	Cysteic acid	✓	✓
Homocysteine	✓	✓	N-Acetyl-D-glucosamine	✓	✓
Taurine	✓	✓	Levogluconan	✓	✓
3-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓	Methionine	✓	✓
2-Amino-3-phosphonopropionic acid	✓	✓	Cellobiose	✓	✓

Norvaline	✓	-	Glycylproline	✓	✓
Propane-1,3-diol	✓	✓	Melibiose	✓	✓
Ferulic acid	✓	✓	Cholic acid	✓	✓
Isobutyric acid	✓	✓	Galactose 1-phosphate	✓	✓
N6-Acetyl-L-lysine	✓	✓	Arecoline	✓	✓
5-Hydroxyindoleacetic acid	✓	-	S-Adenosylmethionine	✓	✓
Agmatine	✓	✓	D-Mannose	✓	✓
D-Maltose	✓	✓	Gluconolactone	-	✓
Lacto-N-tetraose	✓	✓	Glutamine	-	✓
Kanamycin	✓	✓	3-Methoxytyramine	-	✓
Phenylethylamine	✓	✓	Caproic acid	-	✓
Deoxyuridine	✓	✓	Ureidopropionic acid	-	✓
Flavin mononucleotide	✓	✓	L-Tyrosine	-	✓
D-Galactose	✓	✓	myo-Inositol	-	✓
Guanosine	✓	✓	Glycerol	-	✓
4-Hydroxy-3-methoxybenzenemethanol	✓	✓	D-Carnitine	-	✓
Adenosine	✓	✓	L-Arginine	-	✓
Histamine	✓	✓	DL-2-Aminooctanoic acid	-	✓
2-Phenylbutyric acid	✓	✓	Sucrose	-	✓
Argininosuccinic acid	✓	✓	Nicotine	-	✓

ΠΙΝΑΚΑΣ Π5: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα σαρκών από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PBS, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).

«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΣΑΡΚΑΣ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ	«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΣΑΡΚΑΣ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ
Selenomethionine	✓	✓	3-Methyladipic acid	✓	✓
L-Alanine	✓	✓	Glyceraldehyde	✓	✓
Isobutyric acid	✓	✓	Erythritol	✓	✓
Ethacrynic acid	✓	✓	L-Norleucine	✓	✓
L-Valine	✓	✓	Gluconic acid	✓	✓
Pyridoxine	✓	✓	2-Amino-3-phosphonopropionic acid	✓	✓
Nicotinic acid	✓	✓	N-alpha-Acetyl-L-lysine	✓	✓
Cyclohexylamine	✓	✓	muco-Inositol	✓	✓
Amygdalin	✓	✓	Tyramine	✓	✓
Phosphoserine	✓	✓	Cyclamic acid	✓	✓
Leucinic acid	✓	✓	5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazole	✓	✓
Choline	✓	✓	4-Acetamidobutanoic acid	✓	-
1-Butanol	✓	✓	L-Sorbose	✓	✓
Anserine	✓	✓	Cysteic acid	✓	✓
2-Fucosyllactose	✓	✓	2-Phenylethanol	✓	-
Propane-1,3-diol	✓	✓	1,3-Diaminopropane	✓	-
4-Methylbenzoic acid	✓	✓	Homocitrulline	✓	✓
Trigonelline	✓	✓	3-(2-Hydroxyphenyl)propanoic acid	✓	✓
1-Amino-propan-2-ol	✓	✓	Mannitol	✓	✓
Pyruvic acid	✓	✓	Prephenate	✓	✓
Chloroacetic acid	✓	✓	Thymidine	✓	-
Glycerol	✓	✓	O-Acetylserine	✓	✓
1-Hexanol	✓	✓	Caproic acid	✓	✓
Propyl alcohol	✓	✓	Butyric acid	✓	✓
Pyridoxal 5'-phosphate	✓	✓	Histamine	✓	✓
cis-1,2-Cyclohexanediol	✓	✓	m-Cresol	✓	✓
N-Acetyl-L-alanine	✓	✓	Glycylproline	✓	✓
Sarcosine	✓	✓	Methionine sulfoxide	✓	✓
Ethanol	✓	✓	Norvaline	✓	✓
5-Hydroxyindoleacetic acid	✓	✓	Pantothenic acid	✓	✓
L-Arginine	✓	✓	N-Acetyl-L-glutamic acid	✓	✓
Glucose 6-phosphate	✓	✓	Aminocaproic acid	✓	✓
Malic acid	✓	✓	Epinephrine	✓	✓
Galacturonic acid	✓	✓	Guanosine diphosphate	✓	✓
Phenylethylamine	✓	✓	N6-Acetyl-L-lysine	✓	✓
L-Threonine	✓	✓	Gluconolactone	✓	✓
Oxidized glutathione	✓	✓	Tryptamine	✓	✓
Pyridoxal	✓	✓	Caffeine	✓	✓
Lysine	✓	✓	ortho-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓
D-Ornithine	✓	✓	Spectinomycin	✓	✓
Galactose 1-phosphate	✓	✓	Argininosuccinic acid	✓	-
Creatinine	✓	✓	Uridine 5'-monophosphate	✓	✓
Benzyl methyl sulfide	✓	✓	Glutamic acid	✓	✓
L-Asparagine	✓	✓	N-Acetyl-glucosamine 1-phosphate	✓	✓
L-Cystine	✓	✓	Dopamine	✓	✓
Phenylacetic acid	✓	✓	Serotonin	✓	-
6-Aminopenicillanic acid	✓	✓	N-Acetylneuraminic acid	✓	-
2-Hydroxybutyric acid	✓	✓	D-Maltose	✓	✓
Flavin mononucleotide	✓	✓	Pipecolic acid	✓	✓
Canavanine	✓	✓	D-Alanyl-D-alanine	✓	✓
D-Fructose 2,6-bisphosphate	✓	✓	Pantherol	✓	✓
Methylmalonic acid	✓	✓	FAD	✓	-
D-Pinitol	✓	✓	3-Hydroxybenzoic acid	✓	-
L-Gulonolactone	✓	✓	Glucosamine 6-phosphate	✓	✓
Glutamine	✓	✓	Lactulose	✓	✓
Neostigmine	✓	✓	D-Xylitol	✓	✓
Lactic acid	✓	✓	Biotin	✓	✓
3-Aminoisobutanoic acid	✓	✓	alpha-D-Glucose 1,6-bisphosphate	✓	✓
myo-Inositol	✓	✓	3-Hexen-1-ol	✓	✓

Acetophenone	✓	✓	Proline	✓	✓
Isoleucine	✓	✓	L-Acetylcarnitine	✓	✓
2-Ketobutyric acid	✓	✓	Raffinose	✓	✓
Cholic acid	✓	✓	L-Fucose	✓	✓
N-Methylurea	✓	✓	Deoxycytidine	✓	✓
Acetylglucine	✓	✓	N-Acetylmannosamine	✓	✓
4-Chlorophenylacetate	✓	✓	3-Fucosyllactose	✓	✓
2,2-Dimethylsuccinic acid	✓	-	S-Adenosylmethionine	✓	✓
2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	✓	✓	Lacto-N-tetraose	✓	✓
Dimethylurea	✓	✓	trans-Cinnamic acid	-	✓
Phosphonoacetate	✓	✓	Benzyl alcohol	-	✓
Glycine	✓	✓	Hydroxyoctanoic acid	-	✓
Xanthosine	✓	-	Itaconic acid	-	✓
Glycolaldehyde	✓	✓	5-Phenylvaleric acid	-	✓
Guanidoacetic acid	✓	✓	Glycogen	-	✓
2-Octenoic acid	✓	✓	5-Methylcytosine	-	✓
2,3-Diphosphoglyceric acid	✓	✓	L-Dihydroorotic acid	-	✓
Acetamide	✓	✓	Acetylcholine	-	✓
Propionic acid	✓	✓	m-Coumaric acid	-	✓
3-Methyl-2-butenal	✓	✓	Homogentisic acid	-	✓
Betaine	✓	✓	D-Ribose 5-phosphate	-	✓
Pyridoxamine 5'-phosphate	✓	✓	4-Nitrophenyl phosphate	-	✓
Cotinine	✓	✓	2-Hydroxyphenethylamine	-	✓
Spermidine	✓	✓	L-4-Hydroxyphenylglycine	-	✓
Ferulic acid	✓	✓	Melibiose	-	✓
Stachyose	✓	✓	Norepinephrine	-	✓
Ureidosuccinic acid	✓	✓	5-Hydroxy-L-tryptophan	-	✓
2-Methylglutaric acid	✓	✓	D-Carnitine	-	✓
O-Phosphoethanolamine	✓	✓	Phenylacetylglucine	-	✓
Leucine	✓	✓	Adenosine triphosphate	-	✓

ΠΙΝΑΚΑΣ Π6: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα γονάδων από τα θηλυκά άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PBS, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).

«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΓΟΝΑΔΩΝ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ	«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΓΟΝΑΔΩΝ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ
Selenomethionine	✓	✓	p-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓
3-Hexen-1-ol	✓	✓	Pipecolic acid	✓	✓
Tropate	✓	✓	1-Hexanol	✓	✓
1-Butanol	✓	✓	D-Galactono-1,4-lactone	✓	-
Amygdalin	✓	✓	Glycogen	✓	✓
Norvaline	✓	✓	2-Hydroxybutyric acid	✓	✓
D-Ribose 5-phosphate	✓	✓	Biotin	✓	✓
Pyridoxal	✓	✓	Citrulline	✓	✓
Ethacrynic acid	✓	✓	Homovanillic acid	✓	✓
NADPH	✓	✓	Trigonelline	✓	✓
Isobutyric acid	✓	✓	6-Aminopenicillanic acid	✓	✓
Nicotinic acid	✓	✓	L-Asparagine	✓	✓
Isoleucine	✓	✓	Agmatine	✓	✓
Tyramine	✓	✓	Gluconolactone	✓	-
Leucine	✓	✓	2-Phenylethanol	✓	✓
L-Valine	✓	✓	alpha-Ketoisovaleric acid	✓	-
O-Acetylserine	✓	✓	Glycerol	✓	✓
L-Acetylcarnitine	✓	✓	1-Amino-propan-2-ol	✓	✓
Phenylethylamine	✓	✓	Galacturonic acid	✓	✓
Panthenol	✓	✓	2-Hydroxyethanesulfonate	✓	✓
Indoleacetic acid	✓	-	Indolelactic acid	✓	✓
Glucose 1-phosphate	✓	✓	Histidine	✓	✓
Pyridoxamine	✓	✓	L-Cystine	✓	✓
3-Phosphoglyceric acid	✓	-	Sorbitol	✓	✓
N6-Acetyl-L-lysine	✓	✓	L-Sorbose	✓	✓
Acetylcholine	✓	✓	Homocysteine	✓	✓
Acetylglucine	✓	✓	Glutamic acid	✓	✓
Pyruvic acid	✓	✓	Arbutin	✓	✓
3,5-Diiodo-L-tyrosine	✓	✓	Epsilon-caprolactam	✓	✓
L-Norleucine	✓	✓	Ornithine	✓	✓
Sulfoacetate	✓	✓	Pyridine	✓	✓
L-Fucose	✓	✓	ortho-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓
Ferulic acid	✓	✓	4-Hydroxybenzaldehyde	✓	✓
Sarcosine	✓	✓	Vanillic acid	✓	✓
5-Hydroxyindoleacetic acid	✓	✓	Spectinomycin	✓	✓
Glyceraldehyde	✓	✓	Inosine	✓	✓
Glucose 6-phosphate	✓	✓	4-Hydroxybenzyl alcohol	✓	✓
L-Cysteine	✓	✓	Adenosine	✓	✓
Beta-Leucine	✓	✓	Propylene glycol	✓	✓
N-Acetylhistidine	✓	-	N-Acetyl-L-aspartic acid	✓	-
alpha-D-Glucose 1,6-bisphosphate	✓	✓	Spermidine	✓	✓
L-Homoserine	✓	✓	D-Xylitol	✓	✓
O-Phosphoethanolamine	✓	✓	Creatinine	✓	✓
D-Serine	✓	✓	dADP	✓	✓
1-Methylhistidine	✓	✓	4-Hydroxy-3-methoxybenzenemethanol	✓	✓
L-Histidinol	✓	✓	3-Hydroxybutyric acid	✓	✓

L-Alanine	✓	✓	Monoethyl malonic acid	✓	-
L-Threonine	✓	✓	Ketoleucine	✓	✓
2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	✓	✓	Phosphocreatine	✓	✓
Homo-L-arginine	✓	✓	Erythritol	✓	✓
Lysine	✓	✓	Oxidized glutathione	✓	✓
N-Acetyl-L-alanine	✓	✓	Methionine sulfoxide	✓	✓
Caffeine	✓	✓	ADP	✓	✓
Neostigmine	✓	✓	Dihydrouracil	✓	✓
D-Fructose 2,6-bisphosphate	✓	✓	Betaine	✓	✓
D-Xylose	✓	✓	4-Hydroxycinnamic acid	✓	✓
myo-Inositol	✓	✓	Ribothymidine	✓	✓
2-Fucosyllactose	✓	✓	Glutamine	✓	✓
Kanamycin	✓	✓	Fructose 6-phosphate	✓	✓
Cysteamine	✓	✓	Ribitol	✓	✓
Guanidoacetic acid	✓	✓	Trehalose	✓	✓
Guanosine	✓	-	Folic acid	✓	✓
Isoferulic acid	✓	✓	D-Pinitol	✓	✓
Betaine aldehyde	✓	✓	Deoxyadenosine monophosphate	✓	✓
Hippuric acid	✓	✓	N-Acetylneuraminic acid	✓	✓
4-Methylbenzoic acid	✓	✓	N-Acetylglutamine	✓	-
Dimethylglycine	✓	✓	D-Lactic acid	✓	✓
Epinephrine	✓	✓	Sucrose	✓	✓
Pyridoxine	✓	✓	Inosinic acid	✓	✓
Deoxycytidine	✓	✓	Serotonin	✓	✓
Glycerol 3-phosphate	✓	✓	FAD	✓	✓
Homocitrulline	✓	✓	Melibiose	✓	✓
Spermine	✓	✓	D-Galactose	✓	✓
Methylmalonic acid	✓	✓	3-Sulfinioalanine	✓	✓
Tyrosol	✓	✓	D-Maltose	✓	✓
N-Formiminoglycine	✓	✓	Allose	✓	✓
Nicotinic acid	✓	✓	Gibberellin A3	✓	✓
Stachyose	✓	✓	3-(2-Hydroxyphenyl)propanoic acid	✓	✓
Benzyl methyl sulfide	✓	✓	Uridine	✓	✓
Chloroacetic acid	✓	✓	Raffinose	✓	✓
Diethanolamine	✓	✓	Argininosuccinic acid	✓	✓
Phosphoserine	✓	-	Glycylproline	✓	✓
muco-Inositol	✓	✓	N-Acetyl-D-glucosamine	✓	✓
Ethanol	✓	✓	Anserine	✓	✓
Propane-1,3-diol	✓	✓	Glycocholic acid	✓	✓
Methionine	✓	✓	S-Adenosylmethionine	✓	✓
Itaconic acid	✓	✓	NAD	✓	✓
2-Hydroxyphenethylamine	✓	✓	D-Fructose	✓	✓
Chlorogenic acid	✓	✓	Arecoline	✓	✓
3-Fucosyllactose	✓	✓			
L-Dihydroorotic acid	-	✓			
2-Amino-3-phosphonopropionic acid	-	✓			
Pantothenic acid	-	✓			
1,3-Diaminopropane	-	✓			
2,2-Dimethylsuccinic acid	-	✓			
5-Methylcytosine	-	✓			
Oxoglutaric acid	-	✓			
Kynurenine	-	✓			
Histamine	-	✓			
L-Arginine	-	✓			
N-Acetylmannosamine	-	✓			
Proline	-	✓			
N-Methyl-D-aspartic acid	-	✓			

ΠΙΝΑΚΑΣ Π7: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα βραγχιών από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PHB, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).

«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΒΡΑΓΧΙΩΝ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ	«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΒΡΑΓΧΙΩΝ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ
NADH	✓	✓	Butyric acid	✓	✓
Selenomethionine	✓	✓	L-Asparagine	✓	✓
Panthenol	✓	✓	O-Phosphoethanolamine	✓	✓
3-Hexen-1-ol	✓	✓	ortho-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓
Isobutyric acid	✓	✓	muco-Inositol	✓	✓
Galacturonic acid	✓	✓	Tyramine	✓	✓
Glucose 6-phosphate	✓	✓	L-Valine	✓	✓
Nicotinic acid	✓	✓	Isoleucine	✓	✓
Ethacrynic acid	✓	✓	Pyridoxal	✓	✓
N-Acetyl-L-alanine	✓	✓	Phenylethylamine	✓	✓
Galactose 1-phosphate	✓	✓	Shikimic acid	✓	-
2,3-Diphosphoglyceric acid	✓	✓	D-Pinitol	✓	✓
1-Butanol	✓	✓	2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	✓	✓
Amygdalin	✓	✓	Pantothenic acid	✓	-
Guanidoacetic acid	✓	✓	N-Acetylneuraminic acid	✓	✓
Tropate	✓	✓	2-Fucosyllactose	✓	✓
Propyl alcohol	✓	✓	Homovanillic acid	✓	✓
2-Ketobutyric acid	✓	✓	Butyric acid	✓	✓
Ketoleucine	✓	✓	Ureidosuccinic acid	✓	-
Phosphoserine	✓	✓	Benzyl methyl sulfide	✓	✓
Betaine aldehyde	✓	✓	2-Amino-3-phosphonopropionic acid	✓	✓
Tyrosol	✓	✓	L-Alanine	✓	✓
Phenylacetic acid	✓	✓	Carnosine	✓	✓
Epinephrine	✓	✓	Glutamic acid	✓	✓
Ferulic acid	✓	✓	alpha-Ketoisovaleric acid	✓	✓
Isoferulic acid	✓	✓	Valeric acid	✓	✓
Phosphonoacetate	✓	✓	Methionine sulfoxide	✓	✓
2,2-Dimethylsuccinic acid	✓	✓	N-alpha-Acetyl-L-lysine	✓	✓
1,3-Diaminopropane	✓	✓	L-Gulonolactone	✓	✓
Glucose 1-phosphate	✓	✓	1-Methylhistidine	✓	✓
Pyruvic acid	✓	✓	L-Cystine	✓	✓
Choline	✓	✓	Leucine	✓	✓
N-Methylurea	✓	-	Propionic acid	✓	✓
Sarcosine	✓	✓	N-Acetyl-L-glutamic acid	✓	✓
Glyceraldehyde	✓	✓	Cyclohexylamine	✓	✓
Malic acid	✓	✓	N-Acetylmannosamine	✓	✓
5-Hydroxyindoleacetic acid	✓	✓	trans-Cinnamic acid	✓	✓
Levogluconan	✓	✓	Purine	✓	✓
Methionine	✓	✓	Glycine	✓	✓
Erythritol	✓	✓	Itaconic acid	✓	-
Caffeine	✓	✓	Ethanol	✓	✓
Cysteic acid	✓	✓	Deoxycytidine	✓	-
Hydroxyoctanoic acid	✓	-	Methylmalonic acid	✓	✓
Glycerol 3-phosphate	✓	✓	4-Methylbenzoic acid	✓	✓
O-Acetylserine	✓	✓	Citric acid	✓	-
D-Alanyl-D-alanine	✓	-	Gluconic acid	✓	-
N6-Acetyl-L-lysine	✓	✓	Spermine	✓	✓
Lactic acid	✓	✓	Trigonelline	✓	✓
15(R)-hydroperoxy-EPE	✓	✓	Glycogen	✓	✓
D-Galactose	✓	-	Dimethylurea	✓	✓
3-(2-Hydroxyphenyl)propanoic acid	✓	✓	Uridine 5'-monophosphate	✓	✓
Acetophenone	✓	✓	Guaiacol	✓	✓
Glycocholic acid	✓	-	L-Threonine	✓	-
Glycylproline	✓	✓	5-Phenylvaleric acid	✓	-
Citrulline	✓	-	1-Hexanol	✓	-
Cyclic AMP	✓	✓	DL-2-Aminooctanoic acid	✓	✓
Stachyose	✓	✓	L-Sorbose	✓	✓
Pyridoxine	✓	-	L-Cysteine	✓	✓
2-Hydroxyphenethylamine	✓	✓	Serine	✓	✓
Ciliatine	✓	✓	Cadaverine	✓	-
5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazole	✓	✓	Ornithine	✓	✓
2-Octenoic acid	✓	-	Pimelic acid	✓	✓
3-Methoxytyramine	✓	-	Glutaric acid	✓	✓
Lysine	✓	✓	p-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓
Erythritol	✓	✓	Dopamine	✓	✓
Mannitol	✓	✓	Sorbitol	✓	✓
beta-Alanine	✓	-	Indoleacetic acid	✓	✓
Succinic acid	✓	-	Glycerol	✓	✓
Propane-1,3-diol	✓	-	m-Cresol	✓	✓
3-Hydroxymethylglutaric acid	✓	✓	4-Hydroxybenzaldehyde	✓	✓
L-Dihydroorotic acid	✓	-	Adipic acid	✓	✓
Norepinephrine	✓	-	Glutamine	✓	-
alpha-D-Glucose 1,6-bisphosphate	✓	✓	L-Tryptophan	✓	-
Prephenate	✓	✓	myo-Inositol	✓	✓
Caproic acid	✓	-	D-Xylitol	✓	✓
Pyridine	✓	✓	4-Nitrophenyl phosphate	✓	✓
o-Cresol	✓	✓	Guanosine diphosphate	✓	✓
4-Hydroxy-3-methoxybenzenemethanol	✓	✓	5-Hydroxy-L-tryptophan	✓	✓
4-Acetamidobutanoic acid	✓	-	Homo-L-arginine	✓	✓
cis-1,2-Cyclohexanediol	✓	✓	Agmatine	✓	✓
3-Cresotinic acid	✓	-	D-Carnitine	✓	✓
4-Hydroxybenzyl alcohol	✓	✓	Pipecolic acid	✓	-

3,5-Diiodo-L-tyrosine	✓	-	L-Histidinol	✓	✓
Vanillic acid	✓	✓	Pyridoxamine	✓	✓
Neostigmine	✓	✓	4-Hydroxycinnamic acid	✓	✓
L-Arginine	✓	-	Raffinose	✓	✓
L-Fucose	✓	✓	D-Fructose 2,6-bisphosphate	✓	-
L-Homoserine	✓	✓	L-Norleucine	✓	✓
Cotinine	✓	✓	Homocitrulline	✓	✓
Spermidine	✓	✓	Tryptamine	✓	✓
Trehalose	✓	-	2-Hydroxycaproic acid	✓	✓
2-Methylglutaric acid	✓	✓	3-Fucosyllactose	✓	✓
Adenosine triphosphate	✓	✓	Glycolaldehyde	-	✓
S-Adenosylmethionine	✓	✓	Phenylalanine	-	✓
Glucosamine 6-phosphate	✓	-	Beta-Leucine	-	✓
L-Acetylcarnitine	✓	✓	Homogentisic acid	-	✓
Lactulose	✓	✓	4-Chlorophenylacetate	-	✓
Gibberellin A3	✓	✓	Nicotinic acid	-	✓
Deoxyinosine	✓	-	Mesaconic acid	-	✓
Sucrose	✓	-	3-Methyladipic acid	-	✓
Argininosuccinic acid	✓	✓	Acetamide	-	✓
Serotonin	✓	✓	Adenosine	-	✓
Arecoline	✓	-	4-Pyridoxic acid	-	✓
Uridine	✓	✓	3-Methyl-2-butenal	-	✓
N-Acetyl-D-glucosamine	✓	✓	5-Methylcytosine	-	✓
D-Maltose	✓	✓	Anserine	-	✓
Melibiose	✓	✓	Deoxyuridine	-	✓
ADP	-	✓	Folic acid	-	✓
Arbutin	-	✓	Inosinic acid	-	✓
D-Xylose	-	✓	NADPH	-	✓
Guanosine	-	✓			
Inosin	-	✓			

ΠΙΝΑΚΑΣ Π8: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα γαστρεντερικών σωλήνων από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PHB, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).

«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ	«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ
NADH	✓	✓	1-Butanol	✓	✓
Selenomethionine	✓	✓	1-Methylhistidine	✓	✓
Butyric acid	✓	✓	L-Gulonolactone	✓	✓
3-Hexen-1-ol	✓	✓	Isobutyric acid	✓	✓
L-Threonine	✓	✓	Leucine	✓	✓
2,3-Diphosphoglyceric acid	✓	✓	Nicotinic acid	✓	✓
Phosphoserine	✓	✓	Cyclohexylamine	✓	✓
Amygdalin	✓	✓	2-Amino-3-phosphonopropionic acid	✓	✓
5-Methylcytosine	✓	✓	Phenylacetic acid	✓	✓
Beta-Leucine	✓	✓	Seneciolic acid	✓	✓
L-Cystine	✓	✓	L-Valine	✓	✓
Tartaric acid	✓	✓	Pyridoxal	✓	✓
Guanidoacetic acid	✓	✓	N-Acetyl-L-alanine	✓	✓
ortho-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓	Homo-L-arginine	✓	✓
Ketoleucine	✓	✓	2-Octenoic acid	✓	-
2-Methylglutaric acid	✓	✓	5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazole	✓	-
Benzyl methyl sulfide	✓	✓	Malic acid	✓	✓
Caffeine	✓	✓	Mesaconic acid	✓	✓
S-Adenosylhomocysteine	✓	✓	Gualacol	✓	✓
Spectinomycin	✓	-	Acetic acid	✓	✓
Phenylethylamine	✓	✓	Acetylglucine	✓	✓
Pantothenic acid	✓	✓	Citraconic acid	✓	✓
L-Tryptophan	✓	✓	Norvaline	✓	✓
Homogentisic acid	✓	✓	Pyruvic acid	✓	✓
Ascorbic acid	✓	✓	cis-1,2-Cyclohexanediol	✓	✓
D-Aspartic acid	✓	✓	2-Hydroxyethanesulfonate	✓	✓
3-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓	Phosphocreatine	✓	✓
Sulfoacetate	✓	✓	Valeric acid	✓	✓
Tyrosol	✓	✓	Caproic acid	✓	✓
Citrulline	✓	✓	Choline	✓	✓
Sarcosine	✓	✓	Serine	✓	✓
O-Phosphoethanolamine	✓	✓	Lysine	✓	✓
3-Phosphoglyceric acid	✓	✓	Propyl alcohol	✓	✓
D-Xylitol	✓	✓	Levogluconan	✓	-
L-Alanine	✓	✓	5-Phenylvaleric acid	✓	✓
4-Methylbenzoic acid	✓	✓	D-Xylulose	✓	✓
L-Cysteine	✓	✓	Fructose 6-phosphate	✓	✓
N-Acetyl-glucosamine 1-phosphate	✓	✓	Ethacrynic acid	✓	✓
Glycerol	✓	✓	Betaine	✓	✓
O-Acetylserine	✓	✓	N-Acetyl-D-Glucosamine 6-Phosphate	✓	✓
dGTP	✓	✓	Glucosamine 6-phosphate	✓	✓
Tyramine	✓	✓	5-Hydroxyindoleacetic acid	✓	✓
NADP	✓	✓	Glycylproline	✓	✓
N-Acetyl-L-aspartic acid	✓	✓	3-Methyladipic acid	✓	✓
Erythritol	✓	✓	Trehalose	✓	✓
Mannitol	✓	✓	5-Hydroxy-L-tryptophan	✓	✓
Lactic acid	✓	✓	D-Galactose	✓	✓
D-Galactono-1,4-lactone	✓	✓	Deoxycytidine	✓	✓

Isoleucine	✓	✓	Itaconic acid	✓	✓
Propionic acid	✓	✓	Spermine	✓	✓
Neostigmine	✓	✓	Glycogen	✓	-
3-(2-Hydroxyphenyl)propanoic acid	✓	✓	4-Pyridoxic acid	✓	✓
Thymidine	✓	✓	Stachyose	✓	✓
Gibberellin A3	✓	✓	Trigonelline	✓	✓
Acetophenone	✓	✓	N-Methylurea	✓	-
N-Acetylmannosamine	✓	✓	Pyridoxine	✓	✓
Panthenol	✓	-	2-Furoic acid	✓	✓
N-Acetylneuraminic acid	✓	✓	2,2-Dimethylsuccinic acid	✓	✓
Suberic acid	✓	✓	2-Hydroxyphenethylamine	✓	✓
Methylmalonic acid	✓	✓	Propane-1,3-diol	✓	✓
Citric acid	✓	✓	Glutaric acid	✓	✓
Guanine	✓	✓	L-Norleucine	✓	✓
Betaine aldehyde	✓	✓	Ornithine	✓	✓
Homovanillic acid	✓	✓	Uridosuccinic acid	✓	✓
Ethanol	✓	✓	D-Alanyl-D-alanine	✓	✓
Isoferulic acid	✓	✓	D-Pinitol	✓	✓
Phosphonoacetate	✓	✓	p-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓
1-Hexanol	✓	✓	Nicotinic acid	✓	✓
N6-Acetyl-L-lysine	✓	✓	Indoleacetic acid	✓	-
Uridine 5'-monophosphate	✓	✓	N-Acetyl-L-glutamic acid	✓	✓
3,4-Dihydroxybenzeneacetic acid	✓	✓	Prephenate	✓	-
N-alpha-Acetyl-L-lysine	✓	✓	m-Cresol	✓	✓
muco-Inositol	✓	-	Glutamine	✓	-
Homocitrulline	✓	-	Thiamine	✓	✓
Gluconic acid	✓	✓	L-Threonine	✓	✓
alpha-Ketoisovaleric acid	✓	✓	Acetylphosphate	✓	✓
Glutamic acid	✓	✓	N-Acetylglutamine	✓	✓
D-Fructose 2,6-bisphosphate	✓	✓	Cysteamine	✓	-
Diethanolamine	✓	✓	Pyridine	✓	✓
Histidine	✓	✓	Phenylglyoxylic acid	✓	✓
Glycerol 3-phosphate	✓	✓	Pipecolic acid	✓	✓
Homocysteine	✓	✓	Ethanolamine	✓	✓
L-Arginine	✓	✓	Methionine sulfoxide	✓	-
Acetylcholine	✓	-	Cysteic acid	✓	✓
Raffinose	✓	✓	Glucose 1-phosphate	✓	✓
4-Hydroxybenzaldehyde	✓	✓	2-Ketobutyric acid	✓	✓
Epinephrine	✓	✓	Taurine	✓	✓
Dihydrouracil	✓	✓	Ribitol	✓	✓
Sorbitol	✓	✓	Arbutin	✓	-
myo-Inositol	✓	✓	Pyridoxamine	✓	✓
3-Hydroxymethylglutaric acid	✓	✓	alpha-D-Glucose 1,6-bisphosphate	✓	-
Agmatine	✓	✓	Propylene glycol	✓	✓
Glucaric acid	✓	✓	Guanosine diphosphate	✓	✓
3-Methyl-2-oxovaleric acid	✓	-	Flavin mononucleotide	✓	✓
Ribothymidine	✓	-	Phenylalanine	✓	✓
Creatine	✓	✓	Proline	✓	✓
L-Acetylcarnitine	✓	✓	Triethanolamine	✓	-
4-Hydroxycinnamic acid	✓	✓	L-Dihydroorotic acid	✓	✓
Shikimic acid	✓	✓	L-Aspartic acid	✓	✓
D-Carnitine	✓	-	Ethylmalonic acid	✓	✓
Glycocholic acid	✓	✓	N-Acetyl-D-glucosamine	✓	✓
D-Xylose	✓	✓	D-Maltose	✓	✓
2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	✓	✓	Sucrose	✓	✓
DL-2-Aminooctanoic acid	✓	✓	Uridine	✓	✓
2-Isopropylmalic acid	✓	✓	Cholic acid	✓	✓
Adenosine triphosphate	✓	-	3-Fucosyllactose	✓	✓
Methionine	✓	✓			
Allose	✓	✓			
Melibiose	✓	-			
2-Phenylbutyric acid	✓	✓			
Argininosuccinic acid	✓	✓			
Spermidine	✓	✓			
5-Adenosylmethionine	✓	✓			
Pimelic acid	✓	✓			
Lactulose	✓	✓			
DL-2-Aminooctanoic acid	✓	✓			
trans-Cinnamic acid	-	✓			
N-Formiminoglycine	-	✓			
Glucose 6-phosphate	-	✓			
Gentisic acid	-	✓			
L-Asparagine	-	✓			
3-Hydroxyanthranilic acid	-	✓			
Deoxyuridine	-	✓			
4-Hydroxy-3-methoxybenzenemethanol	-	✓			
4-Nitrophenyl phosphate	-	✓			
Galactose 1-phosphate	-	✓			
L-Cystathionine	-	✓			
Indolelactic acid	-	✓			
L-Histidinol	-	✓			
Carnosine	-	✓			
Alpha-Lactose	-	✓			
D-Ribose 5-phosphate	-	✓			
Arecoline	-	✓			

ΠΙΝΑΚΑΣ Π9: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα ηπάτων από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PHB, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).

«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΗΠΑΤΟΣ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ	«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΗΠΑΤΟΣ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ
Selenomethionine	✓	✓	Glycine	✓	✓
L-Alanine	✓	✓	Shikimic acid	✓	✓
Tartaric acid	✓	✓	D-Alanyl-D-alanine	✓	✓
Butyric acid	✓	✓	Phosphocreatine	✓	✓
ortho-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓	Propane-1,3-diol	✓	✓
Ethacrynic acid	✓	✓	Cyclic AMP	✓	✓
Isobutyric acid	✓	✓	1,3-Diaminopropane	✓	✓
Citrulline	✓	✓	L-Dihydroorotic acid	✓	✓
Homo-L-arginine	✓	✓	p-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓
Spectinomycin	✓	✓	Stachyose	✓	✓
Pyridoxal	✓	✓	Glycolaldehyde	✓	✓
Neostigmine	✓	✓	O-Phosphoethanolamine	✓	✓
L-Threonine	✓	✓	2-Hydroxyphenethylamine	✓	✓
Phenylethylamine	✓	✓	L-Gulonolactone	✓	✓
3-Fucosyllactose	✓	✓	Leucinic acid	✓	-
Phenylacetic acid	✓	✓	2-Methylglutaric acid	✓	✓
Ascorbic acid	✓	✓	Choline	✓	✓
Guanidoacetic acid	✓	✓	Ferulic acid	✓	✓
Sulfoacetate	✓	✓	N6-Acetyl-L-lysine	✓	✓
Mesaconic acid	✓	✓	D-Carnitine	✓	✓
N-Acetyl-L-glutamic acid	✓	✓	Homocitrulline	✓	✓
4-Methylbenzoic acid	✓	✓	3,4-Dihydroxybenzeneacetic acid	✓	✓
Pyruvic acid	✓	✓	3-Methyladipic acid	✓	✓
Tyrosol	✓	✓	Galacturonic acid	✓	-
Epinephrine	✓	✓	Creatinine	✓	✓
Ketoleucine	✓	✓	L-Cysteine	✓	✓
Acetylglucine	✓	✓	Caproic acid	✓	✓
3-Phosphoglyceric acid	✓	✓	2-Phenylbutyric acid	✓	-
Propyl alcohol	✓	✓	N-Acetyl-glucosamine 1-phosphate	✓	✓
Norvaline	✓	✓	Cysteic acid	✓	✓
Prephenate	✓	✓	Cysteamine	✓	✓
1-Methylhistidine	✓	✓	m-Cresol	✓	✓
Ethanol	✓	✓	3,5-Diiodo-L-tyrosine	✓	✓
Malic acid	✓	✓	Guanosine	✓	-
Phosphoserine	✓	✓	NADP	✓	-
Taurine	✓	✓	3-Sulfinoolanine	✓	✓
Glyceraldehyde	✓	✓	D-Fructose 2,6-bisphosphate	✓	✓
1-Hexanol	✓	✓	Pipecolic acid	✓	✓
5-Hydroxy-L-tryptophan	✓	✓	Glutamine	✓	✓
Uridine 5'-monophosphate	✓	-	Serine	✓	✓
Tropate	✓	✓	Propionic acid	✓	✓
2-Octenoic acid	✓	✓	4-Hydroxybenzyl alcohol	✓	✓
Lysine	✓	✓	Acetylcholine	✓	✓
D-Galactono-1,4-lactone	✓	✓	L-Norleucine	✓	✓
Erythritol	✓	✓	Glucaric acid	✓	✓
O-Acetylserine	✓	✓	L-Homoserine	✓	✓
Glutamic acid	✓	✓	Valeric acid	✓	✓
Lactic acid	✓	✓	alpha-D-Glucose 1,6-bisphosphate	✓	✓
L-Fucose	✓	✓	3-Hydroxybutyric acid	✓	✓
N-Acetyl-L-alanine	✓	✓	Betaine	✓	-
Gibberellin A3	✓	✓	Levogluconan	✓	✓
Ornithine	✓	✓	L-Histidinol	✓	-
Benzyl methyl sulfide	✓	✓	Guanosine diphosphate	✓	✓
Nicotinic acid	✓	✓	Ribitol	✓	-
Isoleucine	✓	✓	2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	✓	✓
N-alpha-Acetyl-L-lysine	✓	✓	cis-1,2-Cyclohexanediol	✓	✓
5-Adenosylhomocysteine	✓	✓	myo-Inositol	✓	-
3-Hexen-1-ol	✓	✓	trans-Cinnamic acid	✓	✓
Pantothenic acid	✓	✓	D-Xylulose	✓	-
2-Amino-3-phosphonopropionic acid	✓	✓	Flavin mononucleotide	✓	-
N-Acetylmannosamine	✓	✓	Adenosine triphosphate	✓	✓
Glycylproline	✓	✓	Triethanolamine	✓	✓
2-Ketobutyric acid	✓	✓	4-Hydroxy-3-methoxybenzenemethanol	✓	✓
Chloroacetic acid	✓	-	4-Hydroxycinnamic acid	✓	✓
Inosine triphosphate	✓	-	Pyridoxamine	✓	✓
Isoferulic acid	✓	✓	Fructose 6-phosphate	✓	-
Phenylglyoxylic acid	✓	✓	Lactulose	✓	✓
Homogentisic acid	✓	✓	Leucine	✓	✓
2,2-Dimethylsuccinic acid	✓	✓	Proline	✓	✓
2-Furoic acid	✓	✓	Deoxyuridine	✓	-
Ureidosuccinic acid	✓	✓	L-Valine	✓	✓
5-Methylcytosine	✓	✓	Uridine diphosphate glucuronic acid	✓	-
2,3-Diphosphoglyceric acid	✓	✓	Raffinose	✓	✓
L-Acetylcarnitine	✓	✓	N-Acetyl-D-Glucosamine 6-Phosphate	✓	✓
2-Hydroxyethanesulfonate	✓	✓	Caffeine	✓	✓
Amygdalin	✓	✓	Arbutin	✓	✓
Trigonelline	✓	✓	Methionine sulfoxide	✓	✓
Allantoin	✓	✓	Sucrose	✓	-
Homovanillic acid	✓	✓	Arecoline	✓	✓
Guanine	✓	✓	Tyramine	✓	✓
N-Formiminoglycine	✓	-	1-Butanol	✓	-
L-Cystine	✓	✓	Serotonin	✓	✓

Itaconic acid	✓	✓	Argininosuccinic acid	✓	✓
Glycerol 3-phosphate	✓	✓	Cholic acid	✓	-
Methionine	✓	✓	Panthenol	✓	✓
Pyridoxine	✓	✓	D-Galactose	✓	✓
Glycerol	✓	✓	3-(2-Hydroxyphenyl)propanoic acid	✓	✓
3-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓	Melibiose	✓	✓
5-Hydroxyindoleacetic acid	✓	✓	L-Arginine	✓	✓
D-Maltose	✓	✓			
D-Fructose	✓	✓			
2-Fucosyllactose	✓	✓			
Kanamycin	✓	-			
L-Tryptophan	-	✓			
Glycocholic acid	-	✓			
Phenylalanine	-	✓			
Histidine	-	✓			
Deoxycytidine	-	✓			
Gluconic acid	-	✓			
Glutaric acid	-	✓			
L-Asparagine	-	✓			
Nicotinic acid	-	✓			
D-Xylitol	-	✓			
Pimelic acid	-	✓			
4-Acetamidobutanoic acid	-	✓			
alpha-Ketoisovaleric acid	-	✓			
Glucose 6-phosphate	-	✓			
ADP	-	✓			
Inosine	-	✓			
Pyridine	-	✓			
Xanthosine	-	✓			
Benzoic acid	-	✓			
L-Cystathionine	-	✓			
Trehalose	-	✓			
Galactose 1-phosphate	-	✓			
Adenosine	-	✓			
N-Acetylneuraminic acid	-	✓			

ΠΙΝΑΚΑΣ Π10: «Πιθανοί μεταβολίτες» στα δείγματα εγκεφάλων από τα άτομα ελέγχου και έκθεσης σε PHB, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας και σύγκριση αυτών (✓: παρουσία μεταβολίτη, - : απουσία μεταβολίτη).

«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ	«ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ» ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ	CONTROL	ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟ
Selenomethionine	✓	✓	2-Furoic acid	✓	✓
Ethanol	✓	✓	4-Acetamidobutanoic acid	✓	✓
Isoleucine	✓	✓	Dihydroxyacetone	✓	✓
Nicotinuric acid	✓	✓	Leucinic acid	✓	✓
L-Threonine	✓	✓	3-Methoxytyramine	✓	✓
Phenylacetylglutamine	✓	✓	Acetophenone	✓	✓
Cyclohexylamine	✓	✓	Cyclamic acid	✓	✓
Erythritol	✓	✓	2,2-Dimethylsuccinic acid	✓	✓
Indoleacetic acid	✓	✓	Mesaconic acid	✓	✓
ortho-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓	3-Aminoisobutanoic acid	✓	✓
Butyric acid	✓	✓	Sorbitol	✓	✓
Tropate	✓	✓	Ethanolamine	✓	-
2-Octenoic acid	✓	✓	D-Xylitol	✓	✓
L-Alanine	✓	✓	Glycerol 3-phosphate	✓	✓
Isobutyric acid	✓	✓	Glutaric acid	✓	✓
Valeric acid	✓	✓	Isoferulic acid	✓	✓
Tyramine	✓	✓	Ciliatine	✓	✓
Propionic acid	✓	✓	Homocysteine	✓	✓
Pantothenic acid	✓	✓	Caffeine	✓	✓
N-Acetyl-L-alanine	✓	✓	Tartaric acid	✓	✓
Pyridoxal	✓	✓	Acetylglutamine	✓	✓
Phenylethylamine	✓	✓	5-Hydroxyindoleacetic acid	✓	✓
D-Lactic acid	✓	✓	Maleamate	✓	✓
3-Fucosyllactose	✓	✓	N-Acetyl-L-aspartic acid	✓	✓
Glucose 1-phosphate	✓	✓	5-Phenylvaleric acid	✓	✓
Caproic acid	✓	-	Glucose 6-phosphate		
6-Aminopenicillanic acid	✓	✓	Uridine 5'-diphosphate	✓	✓
O-Phosphoethanolamine	✓	✓	1-Amino-propan-2-ol	✓	✓
Glycerol	✓	✓	Ketoleucine	✓	✓
Phenylacetic acid	✓	✓	Hypotaurine	✓	✓
Epinephrine	✓	✓	Uridine triphosphate	✓	✓
Guanidoacetic acid	✓	✓	4-Methylcatechol	✓	✓
Amygdalin	✓	✓	N-alpha-Acetyl-L-lysine	✓	✓
Tyrosol	✓	✓	N-Acetylputrescine	✓	✓
Propyl alcohol	✓	✓	Glutamic acid	✓	✓
Pyruvic acid	✓	✓	p-Hydroxyphenylacetic acid	✓	✓
Malic acid	✓	✓	beta-Alanine	✓	✓
Propane-1,3-diol	✓	✓	D-Serine	✓	✓
Choline	✓	✓	Gluconic acid	✓	✓
L-Asparagine	✓	✓	Mannitol	✓	-
Phosphoserine	✓	✓	Homovanillic acid	✓	✓
2-Hydroxyphenethylamine	✓	✓	Ribitol	✓	-
5-Methylcytosine	✓	✓	1-Methylhistidine	✓	✓
Pimelic acid	✓	✓	Cysteamine	✓	-

cis-1,2-Cyclohexanediol	✓	✓	Chloroacetic acid	✓	✓
Glutamine	✓	✓	3-Methyl-2-butenal	✓	✓
L-Cystine	✓	✓	Galacturonic acid	✓	✓
Arbutin	✓	✓	4-Hydroxybenzaldehyde	✓	✓
3-Cresotinic acid	✓	✓	Creatine	✓	✓
alpha-Ketoisovaleric acid	✓	✓	Cadaverine	✓	✓
D-Galactose	✓	✓	4-Pyridoxic acid	✓	✓
Ethacrynic acid	✓	✓	4-Hydroxy-3-methoxybenzenemethanol	✓	✓
D-Ribose 5-phosphate	✓	-	4-Hydroxybenzyl alcohol	✓	✓
D-Pinitol	✓	✓	m-Cresol	✓	✓
Monoethyl malonic acid	✓	✓	L-Homoserine	✓	-
L-Arginine	✓	✓	Agmatine	✓	✓
Cotinine	✓	✓	5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazole	✓	-
Neostigmine	✓	✓	myo-Inositol	✓	✓
3-Phosphoglyceric acid	✓	✓	Ornithine	✓	✓
L-Threonine	✓	✓	Adipic acid	✓	✓
Panthenol	✓	✓	3,5-Diiodo-L-tyrosine	✓	✓
3-(2-Hydroxyphenyl)propanoic acid	✓	✓	o-Cresol	✓	✓
Thymidine	✓	✓	2-Amino-3-phosphonopropionic acid	✓	✓
L-Fucose	✓	✓	Tryptamine	✓	✓
Anserine	✓	✓	D-Glyceraldehyde	✓	-
Ribothymidine	✓	✓	Creatinine	✓	✓
Suberic acid	✓	-	Methylglutaric acid	✓	✓
Ferulic acid	✓	✓	Vanillic acid	✓	✓
Formaldehyde	✓	✓	Galactose 1-phosphate	✓	✓
1-Butanol	✓	✓	Pipecolic acid	✓	✓
2,3-Dihydroxytoluene	✓	✓	4-Nitrophenyl phosphate	✓	✓
Betaine aldehyde	✓	✓	Methionine sulfoxide	✓	✓
Benzyl methyl sulfide	✓	✓	O-Acetyserine	✓	✓
Purine	✓	✓	muco-Inositol	✓	✓
Glycine	✓	✓	ADP	✓	-
Glycogen	✓	✓	Melibiose	✓	✓
4-Methylbenzoic acid	✓	✓	L-Gulonolactone	✓	✓
Nicotinic acid	✓	✓	Methionine	✓	✓
N6-Acetyl-L-lysine	✓	✓	4-Hydroxycinnamic acid	✓	-
2-Methylglutaric acid	✓	✓	Senecioic acid	✓	✓
Methanol	✓	✓	Shikimic acid	✓	✓
Stachyose	✓	✓	Betaine	✓	✓
L-Norleucine	✓	✓	Raffinose	✓	✓
2,3-Diphosphoglyceric acid	✓	✓	D-Fructose 2,6-bisphosphate	✓	✓
Spermine	✓	✓	D-Carnitine	✓	✓
Acetylphosphate	✓	✓	Galacturonic acid	✓	✓
Ureidosuccinic acid	✓	✓	Adenosine triphosphate	✓	✓
Pyridoxine	✓	✓	Deoxyuridine	✓	✓
Gluconolactone	✓	✓	Guanosine	✓	✓
dADP	✓	✓	Glycocholic acid	✓	✓
2-Hydroxycaproic acid	✓	✓	N-Acetylmannosamine	✓	✓
Adenosine monophosphate	✓	✓	2-Fucosyllactose	✓	✓
L-Valine	✓	✓	NADH	✓	✓
N-Acetyl-L-glutamic acid	✓	✓	Guanine	-	✓
Carnosine	✓	✓	Methylmalonic acid	-	✓
Sucrose	✓	✓	L-Acetylcarnitine	-	✓
Spermidine	✓	✓	Trigonelline	-	✓
N-Acetylneuraminic acid	✓	✓	L-Dihydroorotic acid	-	✓
Inosine	✓	-	1,3-Diaminopropane	-	✓
Adenosine	✓	-	Deoxyguanosine	-	✓
D-Maltose	✓	✓	aconic acid	-	✓
Cholic acid	✓	✓	2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	-	✓
Spectinomycin	✓	✓	Pyridoxamine	-	✓
Allose	✓	✓	Lactulose	-	✓
Inosinic acid	✓	-	Proline	-	✓
Gibberellin A3	✓	✓	Argininosuccinic acid	-	✓
Arecoline	✓	✓	Glycylproline	-	✓
NADPH	✓	-	D-Fructose	-	✓
Serotonin	✓	✓	S-Adenosylmethionine	-	✓

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο πλαίσιο του παρόντος μεταπτυχιακού διπλώματος, πραγματοποιήθηκε μελέτη του μεταβολώματος ενήλικων zebrafish, έπειτα από έκθεση τους σε δύο διαφορετικά βιοπολυμερή: τον πολυ(ηλεκτρικό βουτυλεστέρα) (PBS) και το πολυ(3-υδροξυβουτυρικό οξύ) (PHB), μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίων ^1H -NMR. Διεξήχθη μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση και προκειμένου να δοθεί μια συνολική εικόνα της μετακίνησης και επίδρασης των βιοπολυμερών στον οργανισμό-zebrafish, μελετήθηκαν ξεχωριστά τα μεταβολώματα διαφορετικών οργάνων των ψαριών, πιο συγκεκριμένα των βραγχίων, του εγκεφάλου, του γαστρεντερικού σωλήνα, του ήπατος και της σάρκας αυτών. Για το σκοπό αυτό λήφθηκαν τα μονοδιάστατα φάσματα ^1H -NMR και με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) εντοπίστηκαν οι «πιθανοί μεταβολίτες» σε κάθε δείγμα, οι οποίοι δεν ταυτοποιήθηκαν με επιπλέον φασματοσκοπίες, όπως φασματομετρία μάζας. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του μέγιστου δυνατού αριθμού μεταβολιτών σε κάθε φάσμα. Ακολούθησε διεξαγωγή πολυπαραμετρικής και μονοπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης, με στόχο την εύρεση ποσοτικών διαφορών μεταξύ των φασμάτων, που αντιπροσωπεύουν τα μεταβολώματα των ατόμων ελέγχου που δεν εκτέθηκαν στα βιοπολυμερή και των εκτεθειμένων στα βιοπολυμερή ατόμων. Για τη βιολογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση μεταβολικών μονοπατιών, μέσω της πλατφόρμας MetaboAnalyst. Τέλος, έγινε σύγκριση των αντίστοιχων δειγμάτων ελέγχου και έκθεσης για κάθε υλικό, ώστε να προκύψουν συμπεράσματα για την επίδραση κάθε βιοπολυμερούς στο μεταβόλωμα του zebrafish. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η έκθεση δεν συνοδεύεται από μεταβολικές αλλαγές. Η πολυπαραμετρική ανάλυση υποδεικνύει ενδείξεις διαφοροποίησης μεταξύ των δειγμάτων γαστρεντερικών σωλήνων από τα άτομα της ομάδας ελέγχου και έκθεσης και στα δύο βιοπολυμερή, όμως ο αριθμός των δειγμάτων που αξιοποιήθηκαν ήταν περιορισμένος, καθιστώντας τις διαφορές αυτές αποτελέσματα προκαταρκτικής μελέτης, χρήζοντας περαιτέρω έρευνας. Σύμφωνα με τα ευρήματα, τα βιοπολυμερή που εξετάστηκαν δε φαίνεται να επιδρούν δυσμενώς στον οργανισμό zebrafish, ωστόσο, απαιτείται περισσότερη έρευνα για την επιβεβαίωση και εξαγωγή πιο αξιόπιστου συμπεράσματος.

