

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ IMIDACLOPRID ΚΑΙ METALAXYL
ΣΕ *IN VITRO* ΚΑΙ *IN VIVO* ΣΥΝΘΗΚΕΣ**

Διδακτορική Διατριβή υποβληθείσα
στο Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Υπό

Γεωργίας Ντέμσια

Για την Απόκτηση του Τίτλου του
Διδάκτορα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αγρίνιο, Ιούνιος 2011

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ IMIDACLOPRID ΚΑΙ METALAXYL
ΣΕ *IN VITRO* ΚΑΙ *IN VIVO* ΣΥΝΘΗΚΕΣ**

Υπό

Γεωργίας Ντέμσια

Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων
Σχολή Διαχείρισης Φυσικών Πόρων και Επιχειρήσεων
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βλαστός Δημήτρης
(Επιβλέπων)

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης
Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων,
Παν/μιο Ιωαννίνων

Ματθόπουλος Δημήτριος

Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης
Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων,
Παν/μιο Ιωαννίνων

Μπούρτζης Κωνσταντίνος

Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης
Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων,
Παν/μιο Ιωαννίνων

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βλαστός Δημήτρης (Επιβλέπων)	Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Παν/μιο Ιωαννίνων
Ματθόπουλος Δημήτριος	Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Παν/μιο Ιωαννίνων
Μπούρτζης Κωνσταντίνος	Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Παν/μιο Ιωαννίνων
Πιπεράκης Στυλιανός	Καθηγητής, Παιδαγωγικό Τμήμα Προσχολικής Εκπαίδευσης, Παν/μιο Θεσσαλίας
Σύρρου Μαρίκα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, Παν/μιο Ιωαννίνων
Χελά Δήμητρα	Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Διοίκησης Επιχειρήσεων Αγροτικών Προϊόντων και Τροφίμων, Παν/μιο Ιωαννίνων
Τσιάμης Γεώργιος	Λέκτορας, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Παν/μιο Ιωαννίνων

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μεταλλαξιγένεσης του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Καθοριστικό ρόλο στην απόφασή μου να ασχοληθώ ερευνητικά με το επιστημονικό αντικείμενο του εργαστηρίου και να ξεκινήσω την παρούσα διατριβή διαδραμάτισαν ο Καθηγητής κ. Δημήτρης Ματθόπουλος και ο Επίκουρος Καθηγητής κ. Δημήτρης Βλαστός, τους οποίους ευχαριστώ θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσαν και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτρη Βλαστό, ο οποίος είχε την κύρια επιβλεψη της παρούσας διατριβής. Νοιώθω πολύ τυχερή που υπήρξε καθοδηγητής, σύμβουλος και συμπαραστάτης μου σε όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου. Ιδιαίτερα το τελευταίο μέρος, της συγγραφής της διατριβής, δεν θα είχα καταφέρει να το ολοκληρώσω, μετά από μια μεγάλη διακοπή λόγω προσωπικών δυσκολιών, χωρίς την παρότρυνση και την ενθάρρυνσή του. Τον γνώρισα ως φοιτήτρια, την εποχή που εκπονούσε ο ίδιος τη διατριβή του στο Πανεπιστήμιο Πατρών και αργότερα ως συνεργάτιδά του στο Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων και οφείλω να πω, παρακολουθώντας την επαγγελματική του πορεία όλα αυτά τα χρόνια, πως τον θαυμάζω ως επιστήμονα, για την κατάρτιση, τη μεθοδικότητα και την ευσυνειδησία που τον διακρίνουν, και τον εκτιμώ ιδιαίτερα ως άνθρωπο. Είμαι ιδιαίτερα ευτυχής για τη φιλία που αναπτύχθηκε τόσο με τον ίδιο, όσο και με την οικογένειά του και εύχομαι η φιλία αυτή να συνεχιστεί και μετά το πέρας της παρούσας διατριβής.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή κ. Δημήτρη Ματθόπουλο που με την πείρα του και την επιστημονική του εγκυρότητα καθόρισε σημαντικά την ερευνητική μου προσπάθεια. Οι υποδείξεις του και οι παρεμβάσεις του, ιδιαίτερα σε δύσκολες στιγμές, υπήρξαν για μένα πολύτιμες. Θα ήθελα να του εκφράσω τον απεριόριστο σεβασμό μου και τις ευχαριστίες για την υποστήριξή του, όχι μόνο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου, αλλά και κατά την απασχόλησή μου ως εργαστηριακός συνεργάτης στο Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θέλω να εκφράσω στον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Μπούρτζη, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής και στον Λέκτορα κ. Γεώργιο Τσιάμη, μέλος της εξεταστικής επιτροπής, για τη φιλική συνεργασία τους και για το ενδιαφέρον που δείξαν καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Στυλιανό Πιπεράκη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Μαρίκα Σύρρου και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Δήμητρα Χελά για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην εξεταστική επιτροπή και να αφιερώσουν χρόνο και πνεύμα για τη μελέτη της διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στη συνάδελφο και φίλη Δρ. Μαρίνα Γούμενου, για τη μετάδοση της τεχνογνωσίας της σχετικά με το χειρισμό των πειραματόζων και για την πολύτιμη βοήθειά της στη μικροσκοπική παρατήρηση.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνάδελφο Δρ. Γεώργιο Τσιπά και όλους τους προπτυχιακούς, τότε, φοιτητές, με τους οποίους μοιράστηκα ατέλειωτες ώρες δουλειάς στο εργαστήριο και μου προσέφεραν ανιδιοτελώς πολύτιμη βοήθεια κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων με τα πειραματόζωα.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τους δότες, καλλιεργητές και συναδέλφους, οι οποίοι προσέφεραν ευγενικά αίμα, όσες φορές τους ζητήθηκε.

Όσα «ευχαριστώ» και να πω δεν θα είναι αρκετά για να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου απέναντι στους γονείς μου, για την αμέριστη συμπαράσταση, τη στήριξη που μου παρείχαν, ηθική και οικονομική, όλα τα χρόνια των σπουδών μου, και για την αγάπη τους. Τους ευγνωμονώ που πάντα στήριζαν τις αποφάσεις μου, σε κάθε βήμα της ζωής μου και με βοήθησαν να φτάσω μέχρι εδώ.

Κατά τη διάρκεια της συγγραφής αυτής της διατριβής είχα την τύχη να με συντροφεύουν και να μου συμπαραστέκονται τρεις σπουδαίοι άντρες, που κατέχουν ξεχωριστή θέση στην καρδιά μου: ο σύζυγός μου Κωνσταντίνος, ο μεγάλος μου γιος Σπύρος και ο μικρός μου γιος Αλέξανδρος - ο τελευταίος δε, κατά το μεγαλύτερο μέρος, αγέννητος ακόμα, μέσα από την κοιλιά. Τους ευχαριστώ γι' αυτό από τα βάθη της ψυχής μου και ελπίζω να με συγχωρήσουν που τους στέρησα την προσοχή μου και την αγκαλιά μου όσες ώρες μελετούσα για την ολοκλήρωση της συγγραφής. Το επιστέγασμα αυτής της πολύχρονης προσπάθειας αφιερώνεται σε αυτούς, ως ελάχιστη ένδειξη της αγάπης μου.

Ιούνιος 2011

Γεωργία Ντέμσια

*Στους άντρες της ζωής μου
Κωσταντή, Σπύρο και Αλέξανδρο*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελ.
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	3
1.1 Γενικά	3
1.2 Ιστορική αναδρομή	3
1.3. Κανονισμοί	5
1.4. Κατηγορίες φυτοφαρμάκων	7
1.5. Επίδραση στο περιβάλλον	9
1.6. Επίδραση στον άνθρωπο	11
1.6.1. Τοξικότητα	13
1.6.2. Γενοτοξική- Καρκινογόνος δράση	15
1.6.2.1. <i>In vitro</i> και <i>in vivo</i> μελέτες με πειραματόζωα	18
1.6.2.2. <i>In vivo</i> επιδημιολογικές μελέτες	19
1.7. Imidacloprid	20
1.7.1 Γενικά	20
1.7.2 Τρόπος δράσης	22
1.7.3 Μεταβολισμός	22
1.7.4 Τοξικότητα	24
1.7.4.1. Συμπτώματα τοξικότητας	25
1.7.5 Καρκινογόνος δράση	26
1.7.6 Επιπτώσεις στο περιβάλλον	27
1.8. Metalaxyl	28
1.8.1 Γενικά	28
1.8.2 Μεταβολισμός	29
1.8.3 Τοξικότητα	30
1.8.3.1. Συμπτώματα τοξικότητας	31

1.8.4	Καρκινογόνος δράση	31
1.8.5	Επιπτώσεις στο περιβάλλον	32
2.	ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΕΣ	33
2.1	Ιστορική αναδρομή	33
2.2	Η τεχνική των μικροπυρήνων σε <i>in vitro</i> συνθήκες	34
2.2.1	Μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης με κυτταροχλασίνη-B	37
2.2.2	Μηχανισμοί δημιουργίας μικροπυρήνων	39
2.2.3	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της τεχνικής των μικροπυρήνων με αναστολή της κυτταροκίνησης	45
2.2.4	Ανίχνευση του περιεχομένου των μικροπυρήνων	49
2.2.5	Σημασία και εφαρμογές της τεχνικής των μικροπυρήνων με αναστολή της κυτταροκίνησης	53
2.2.5.1.	Η χρήση της τεχνικής CBMN σε <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> μελέτες γενοτοξικότητας	53
2.2.5.2.	Η τεχνική CBMN ως βιολογικός δείκτης γήρανσης	54
2.2.5.3.	Η τεχνική CBMN ως βιολογικός δείκτης ατομικών διαφορών στη γενετική σύσταση	55
2.2.5.4.	Η τεχνική CBMN ως βιολογικός δείκτης διατροφικής ανεπάρκειας ή περίσσειας	55
2.2.5.5.	Η τεχνική CBMN ως εργαλείο για την πρόληψη ασθενειών	56
2.2.6	Προσδιορισμός της συχνότητας των μικροπυρήνων - Κριτήρια αναγνώρισης διπύρηνων κυττάρων και μικροπυρήνων	57
2.2.7	Κυτταροτοξικότητα	61
2.3.	Η τεχνική των μικροπυρήνων σε <i>in vivo</i> συνθήκες	62
2.3.1	Αρχή της μεθόδου	63
2.3.2	Κριτήρια αναγνώρισης των μικροπυρήνων	66
2.3.3	Επιλογή οργανισμού και ιστού δειγματοληψίας	67
2.3.4	Προσδιορισμός της συχνότητας των μικροπυρήνων και ερμηνεία αποτελεσμάτων	69
2.3.5	Επιλογή μεθόδου χρώσης	70
2.3.6	Πλεονεκτήματα της <i>in vivo</i> τεχνικής των μικροπυρήνων	72

2.3.7	Αυτοματοποίηση των μετρήσεων	73
2.3.8	Ανίχνευση του περιεχομένου των μικροπυρήνων	75
2.3.9	Σημασία και εφαρμογές της <i>in vivo</i> τεχνικής των μικροπυρήνων	76
3.	ΑΝΤΑΛΛΑΓΕΣ ΑΔΕΛΦΩΝ ΧΡΩΜΑΤΙΔΩΝ	80
3.1	Μέθοδοι παρατήρησης των ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων	80
3.2	Μηχανισμοί δημιουργίας ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων	84
3.3	Παράγοντες που προκαλούν ανταλλαγές αδελφών χρωματίδων	89
3.4	Παράγοντες που επηρεάζουν τη συχνότητα των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων	91
3.4.1	Παράγοντες που σχετίζονται με τη μεθοδολογία της τεχνικής	91
3.4.2	Παράγοντες που σχετίζονται με ατομικές διαφορές ανάμεσα στους δότες λεμφοκυττάρων	92
3.5	Προσδιορισμός της συχνότητας των ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων και ερμηνεία αποτελεσμάτων	94
3.6	Σημασία και εφαρμογές της μεθόδου των ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων	95
4.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	97
	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	99
5.	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΙΜΙΔΑΚΛΟΠΡΙΔ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΑΧΥΛ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΩΝ	101
5.1	Συλλογή δειγμάτων	101
5.2	Καλλιέργεια λεμφοκυττάρων	101
5.3	Προετοιμασία παρασκευασμάτων	104
5.4	Μετρήσεις – Στατιστική ανάλυση	107

6.	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ IMIDACLOPRID ΚΑΙ METALAXYL ΣΕ <i>IN VITRO</i> ΣΥΝΘΗΚΕΣ, ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	108
6.1	Χημικά	108
6.2	<i>In vitro</i> επαγωγή μικροπυρήνων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων με τη μέθοδο της κυτταροχλασίνης-B μετά από επίδραση των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl	108
6.2.1	Συλλογή δειγμάτων	108
6.2.2	Καλλιέργεια λεμφοκυττάρων	109
6.2.3	Προετοιμασία παρασκευασμάτων	110
6.2.4	Μετρήσεις – Στατιστική ανάλυση	110
6.3	<i>In vitro</i> επαγωγή ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από επίδραση των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl	110
6.3.1	Συλλογή δειγμάτων	110
6.3.2	Καλλιέργεια λεμφοκυττάρων	110
6.3.3	Προετοιμασία παρασκευασμάτων	111
6.3.4	Μετρήσεις – Στατιστική ανάλυση	113
7.	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ IMIDACLOPRID ΚΑΙ METALAXYL ΣΕ <i>IN VIVO</i> ΣΥΝΘΗΚΕΣ, ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	114
7.1	Προετοιμασία πειραματοζώων	114
7.2	Προετοιμασία παρασκευασμάτων	115
7.3	Μετρήσεις – Στατιστική ανάλυση	115
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	117
8.	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ IMIDACLOPRID ΚΑΙ METALAXYL ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΩΝ	119

9. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ IMIDACLOPRID ΚΑΙ METALAXYL ΣΕ <i>IN VITRO</i> ΣΥΝΘΗΚΕΣ, ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	132
9.1 <i>In vitro</i> επαγωγή μικροπυρήνων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων με τη μέθοδο της κυτταροχλασίνης-B μετά από επίδραση των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl	132
9.2 <i>In vitro</i> επαγωγή ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από επίδραση των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl	144
10. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ IMIDACLOPRID ΚΑΙ METALAXYL ΣΕ <i>IN VIVO</i> ΣΥΝΘΗΚΕΣ, ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	149
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	155
ΠΕΡΙΛΗΨΗ - SUMMARY	177
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	183
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	215



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Φυτοφάρμακα

1.1 Γενικά

Με τον όρο φυτοφάρμακο εννοούμε οποιαδήποτε ουσία ή μίγμα ουσιών που στοχεύει στην πρόληψη, την καταστροφή ή τον έλεγχο παρασίτων που βλάπτουν την υγεία των ανθρώπων ή των ζώων, τις γεωργικές καλλιέργειες, την παραγωγή τροφίμων, κτηνοτροφικών προϊόντων ή ξυλείας. Ο όρος χρησιμοποιείται επίσης για ουσίες που χορηγούνται σε κατοικίδια ζώα για την καταπολέμηση εντόμων ή άλλων παρασίτων στο σώμα τους. Ο όρος παράσιτα αναφέρεται σε είδη από διάφορες κατηγορίες οργανισμών όπως: έντομα, φυτά, τρωκτικά, νηματώδεις, μύκητες, βακτήρια και ιοί. Τα φυτοφάρμακα περιλαμβάνουν επίσης ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών, της πτώσης των φύλλων, της ανάπτυξης ή της ωρίμανσης των καρπών, καθώς και για την προστασία των αγροτικών προϊόντων από τη φθορά κατά τη μεταφορά και την αποθήκευση μετά τη συγκομιδή τους (FAO, 2002).

1.2 Ιστορική αναδρομή

Ο άνθρωπος ξεκίνησε αρκετά νωρίς, πριν από το 2000 π.Χ., τη χρήση χημικών ουσιών με σκοπό την προστασία των καλλιεργειών του. Το πρώτο φυτοφάρμακο που έγινε γνωστό ήταν το θείο, που χρησιμοποιήθηκε από τους Σουμέριους στην αρχαία Μεσοποταμία, το 2500 π.Χ. περίπου. Μέχρι το 15^ο αιώνα χρησιμοποιούνταν οι τοξικές ουσίες του αρσενικού, του μόλυβδου και του υδραργύρου ως εντομοκτόνα. Η χρήση όμως των τοξικών αυτών ουσιών συνδέθηκε με δηλητηριάσεις και θανάτους, με αποτέλεσμα ο άνθρωπος να στραφεί στη χρήση «φυσικών» φυτοπροστατευτικών ουσιών, όπως τηθειϊκή νικοτίνη από φύλλα καπνού που χρησιμοποιήθηκε ως εντομοκτόνο το 17^ο αιώνα, τον πύρεθρο, μια ουσία η οποία προέρχεται από τα χρυσάνθεμα και τη ροτενόννη, μια ουσία η οποία προέρχεται από τις ρίζες των ψυχανθών (leguminosae) που φύονται στα τροπικά δάση, που χρησιμοποιήθηκαν επίσης ως εντομοκτόνα κατά το 19^ο αιώνα (Miller, 2004).

Η ευρεία χρήση των φυτοφαρμάκων ξεκίνησε τον 20^ο αιώνα παράλληλα με την ανάπτυξη της εντατικής γεωργίας. Κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα κυριαρχούσαν τα οργανοχλωριωμένα, όπως είναι το Dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT), τα οργανοφωσφορικά, τα καρβαμιδικά και τα πυρεθρινικά φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνταν ως εντομοκτόνα, καθώς και τα αζωτούχα, όπως είναι η τριαζίνη, και τα καρβοξυλικά οξέα, που χρησιμοποιούνταν ως ζιζανιοκτόνα (Ritter, 2009). Το DDT ήταν μεταξύ των πρώτων αποτελεσματικών φυτοφαρμάκων που παρασκευάστηκαν. Αρχικά παρασκευάστηκε το 1874 από τον Othmar Zeidler, αλλά οι εντομοκτόνες ιδιότητές του ανακαλύφθηκαν το 1939 από τον Ελβετό εντομολόγο Paul Hermann Müller, χημικό της βιομηχανίας Geigy Pharmaceuticals, στα πλαίσια της έρευνάς του για την καταπολέμηση των εντόμων της πατάτας και του σκώρου των ρούχων. Ο Müller πρότεινε τη χρήση του DDT, θεωρώντας το ως απόλυτο και ιδανικό εντομοκτόνο (West & Campbell, 1946). Για αυτή του την ανακάλυψη τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1948. Το πρόβλημα ήταν ότι κανένας τότε δεν συνειδητοποίησε τις μελλοντικές επιπτώσεις της αλόγιστης χρήσης του στο οικοσύστημα, αλλά και στον άνθρωπο. Η βιοσυσσωρευτική ικανότητα του DDT είναι τρομακτική έτσι ώστε σήμερα έχει απαγορευτεί η χρήση του στις περισσότερες χώρες του πλανήτη.

Από το 1950, η χρήση φυτοφαρμάκων έχει 50/πλασιαστεί και έχει φτάσει σήμερα τους 2.5 εκατομμύρια τόνους το χρόνο. Το 75% όλων των φυτοφαρμάκων στον κόσμο χρησιμοποιούνται στις ανεπτυγμένες χώρες, ενώ αυξάνει η χρήση τους και στις αναπτυσσόμενες χώρες (Miller, 2004). Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής κυκλοφορούν στην αγορά πάνω από 16000 φυτοφαρμακευτικά προϊόντα (NIOSH, 2010).

Σε ότι αφορά την Ελλάδα, σύμφωνα με στοιχεία της Ευρωπαϊκής Στατιστικής Υπηρεσίας (Eurostat), το 1997 οι πωλήσεις φυτοφαρμάκων άγγιξαν τους 9.034 τόνους δραστικής ουσίας, ενώ το 2001 τους 11.111 τόνους δραστικής ουσίας. Δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για την Ελλάδα από το 2001 έως σήμερα. Η πρωταθλήτρια χώρα στην Ευρώπη σε πωλήσεις φυτοφαρμάκων είναι η Γαλλία με 77.255 τόνους (στοιχεία του 2007), ενώ σε χώρες όπως η Εσθονία με 459 τόνους (στοιχεία του 2007), η Νορβηγία με 720 τόνους (στοιχεία του 2007), η Λετονία με 1052 τόνους (στοιχεία του 2007), η

Σλοβενία με 1281 τόνους (στοιχεία του 2006), η Φιλανδία με 1.645 τόνους (στοιχεία του 2006) και η Σουηδία με 1.707 τόνους (στοιχεία του 2006) παρατηρήθηκαν χαμηλότερες πωλήσεις φυτοφαρμάκων και ενδεχομένως ορθολογικότερη χρήση τους (**Πίνακας 1.2**) (Eurostat, 2009).

Στην Ελλάδα, επίσημα στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, αναφέρουν ότι κυκλοφορούν 1.681 εμπορικά σκευάσματα φυτοφαρμάκων τα οποία περιέχουν περίπου 400 δραστικές ουσίες (Υπ. Αγροτ. Ανάπτ. και Τροφ., 2009).

1.3. Κανονισμοί

Στις περισσότερες χώρες, τα φυτοφάρμακα πρέπει να εγκριθούν για πώληση και χρήση από κάποιον κυβερνητικό οργανισμό. Για παράδειγμα, στις ΗΠΑ, υπεύθυνος για τον έλεγχο των φυτοφαρμάκων είναι ο Οργανισμός Περιβαλλοντικής Προστασίας (Environmental Protection Agency, EPA) με βάση τις νομοθετικές ρυθμίσεις για εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα και τρωκτικοκτόνα (Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act, FIFRA) ή για την προστασία της ποιότητας των τροφίμων (Food Quality Protection Act, FQPA). Οι ρυθμίσεις αυτές διατυπώνονται μετά από σύνθετες και δαπανηρές μελέτες που διαπιστώνουν εάν ένα συγκεκριμένο φυτοφάρμακο είναι αποτελεσματικό έναντι του παρασίτου-στόχου και ταυτόχρονα ασφαλές για τον άνθρωπο ή το περιβάλλον. Όλα τα καταγεγραμμένα φυτοφάρμακα επανεξετάζονται κάθε 15 χρόνια έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι ακολουθούν τα κατάλληλα πρότυπα. Για κάθε φυτοφάρμακο δημιουργείται μια ετικέτα η οποία προσδιορίζει σε ποια κατηγορία ταξινομείται το συγκεκριμένο φυτοφάρμακο ως προς την τοξικότητα, την οικοτοξικότητα και την ικανότητα καρκινογένεσης, καθώς και οδηγίες για τη σωστή χρήση του (EPA, 2010).

Άλλοι διεθνείς οργανισμοί όπως είναι ο Οργανισμός για τα Τρόφιμα και τη Γεωργία (Food and Agriculture Organization, FAO), το Πρόγραμμα για το Περιβάλλον των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Environment Programme, UNEP) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) εκδίδουν επίσης οδηγίες και κώδικες για τα επικίνδυνα

Πίνακας 1.2. Συνολικές πωλήσεις φυτοφαρμάκων σε χιλιάδες τόνους (t) δραστηκής ουσίας σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης													
Χώρα	Έτος												
	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	
Ευρωπαϊκή Ένωση (15 χώρες)	348958	355527	352904	332807	327642	:	:	:	:	:	:	:	
Βέλγιο	9276	9861	9521	9953	8845	9204	8822	9186	9776	:	:	:	
Δανία	3675	3619	2788	2747	2890	2722	:	:	:	:	:	:	
Γερμανία	30721	33644	30231	30331	27885	29531	30164	28753	29512	:	:	:	
Εσθονία	197	191	184	306	329	329	322	357	393	467	459	:	
Ιρλανδία	2356	2534	2102	2133	2486	2796	2913	3104	2776	2874	:	:	
Ελλάδα	9034	11479	10153	11131	11111	:	:	:	:	:	:	:	
Ισπανία	34023	35070	33614	34597	35700	:	:	:	:	:	:	:	
Γαλλία	109792	107753	120501	94694	99635	82448	74524	76099	78265	71612	77255	:	
Ιταλία	84796	84526	82048	79831	76346	94711	86705	84292	85073	81450	:	:	
Λετονία	:	:	:	284	369	339	418	597	733	2239	1052	:	
Λουξεμβούργο	332	430	421	:	:	:	:	:	:	:	:	:	
Ουγγαρία	5314	6230	5795	5473	6431	8232	8726	9941	9676	11523	11178	12084	
Μάλτα	:	:	:	184	217	222	243	:	:	:	:	:	
Ολλανδία	10399	10721	10196	9655	7987	8073	7868	9071	9309	9410	10740	:	
Αυστρία	3690	3341	3419	3563	3133	3080	3386	3302	3404	:	:	:	
Πολωνία	9501	8699	8469	8848	8855	10358	7184	8726	16039	17102	15303	:	
Πορτογαλία	12750	14365	15396	15469	15491	17435	17046	16938	16346	15703	16689	:	
Σλοβενία	:	:	:	1469	1399	1164	1361	1560	1384	1281	:	:	
Φιλανδία	999	1164	1141	1146	1424	1620	1667	1489	1431	1645	:	:	
Σουηδία	1608	1629	1698	1652	1738	1711	2049	942	1527	1707	:	:	
Ηνωμένο Βασίλειο	24489	25382	25299	23601	23526	23526	22564	23463	23601	21151	:	:	
Νορβηγία	754	954	796	378	518	818	658	824	511	690	720	:	
: = μη διαθέσιμα στοιχεία. Τελευταία ενημέρωση: 13.07.2009 (Eurostat)													

φυτοφάρμακα με σκοπό την ενημέρωση των υπηρεσιών, των καταναλωτών και των εργαζομένων.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση, με την οδηγία 117/79/EEC απαγορεύει τη διάθεση στην αγορά και τη χρήση ορισμένων παρασιτοκτόνων με επικίνδυνα δραστικά συστατικά. Πρόκειται για ενώσεις του υδραργύρου: οξείδιο του υδραργύρου, χλωρίδιο του υδραργύρου, αλκυλιωμένες, αλκοαξυλιωμένες ενώσεις και άλλες ανόργανες ενώσεις του υδραργύρου, και για έμμονες οργανοχλωρικές ενώσεις (persistent organic pollutants, POPs) όπως: DDT, Aldrin, Chlordane, Dieldrin, Endrin, Heptachlor, HCH, Hexachlorobenzene (EUR-Lex., 1978).

Ωστόσο, οι κανονισμοί διαφέρουν από χώρα σε χώρα και για να αντιμετωπιστούν τυχόν νομοθετικές ασυμβατότητες ο Οργανισμός για τα Τρόφιμα και τη Γεωργία (Food and Agriculture Organization, FAO) υιοθέτησε από το 1985 έναν Διεθνή Κώδικα Δεοντολογίας για τη Διανομή και Χρήση των Φυτοφαρμάκων (International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides) (FAO, 2002).

Παρόλα αυτά όμως, οι κανονισμοί δεν μπορούν να εξαλείψουν την κακή ή υπερβολική χρήση των φυτοφαρμάκων. Για το λόγο αυτό διάφορες οικολογικές και επιστημονικές οργανώσεις έχουν ξεκινήσει μια διεθνή εκστρατεία για τη χρήση εναλλακτικών τρόπων φυτοπροστασίας, όπως είναι τα βιολογικά φυτοφάρμακα που στοχεύουν στον κύκλο ζωής ενός συγκεκριμένου παρασίτου.

1.4. Κατηγορίες φυτοφαρμάκων

Τα φυτοφάρμακα, ανάλογα με το είδος του παρασίτου στο οποίο στοχεύουν διακρίνονται σε (Pesticide Action Network, 2005c):

- εντομοκτόνα, τα οποία προσβάλλουν τα έντομα που τρώνε τα διάφορα μέρη των φυτών, χωρίς να βλάπτουν τα ίδια τα φυτά, καθώς και τα έντομα που προκαλούν ασθένειες όπως ελονοσία, τύφο και κίτρινο πυρετό στον άνθρωπο.
- μυκητοκτόνα, τα οποία προσβάλλουν τα ζωοπαράσιτα και τα φυτοπαράσιτα, που τρέφονται εις βάρος των οργανισμών-φορέων.

- ζιζανιοκτόνα, τα οποία προσβάλλουν τα ζιζάνια (αγριόχορτα) που αναπτύσσονται σε βάρος των καλλιεργημένων φυτών, χωρίς όμως να προκαλούν βλάβες στις καλλιέργειες.
- νηματωδοκτόνα, τα οποία προσβάλλουν τους νηματώδεις, και τα
- τρωκτικοκτόνα, τα οποία προσβάλλουν τα διάφορα είδη τρωκτικών.

Μια άλλη κατηγοριοποίηση των φυτοφαρμάκων μπορεί να γίνει με βάση τη χημική τους δομή. Έτσι τα διακρίνουμε σε (Freedman, 1995):

- ανόργανα φυτοφάρμακα, τα οποία δημιουργούνται από χημικές ουσίες που βρίσκονται στη φύση όπως αρσενικό, χαλκό, μόλυβδο και υδράργυρο. Είναι ιδιαίτερα τοξικά και δεν αποικοδομούνται εύκολα, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στο περιβάλλον σε μεγάλες ποσότητες.
- Φυσικά οργανικά φυτοφάρμακα, όπως είναι η νικοτίνη, ο πύρεθρος, η ροτενόνη και η στρυχνίνη, τα οποία δημιουργούνται από ουσίες που προέρχονται από τα φυτά. Πολλά φυτά όπως ο καπνός, το χρυσάνθεμο αλλά και διάφορα κωνοφόρα δέντρα έχουν αναπτύξει την ικανότητα να παράγουν ουσίες οι οποίες τα προστατεύουν από τα φυτοφάγα ζώα. Στη σημερινή εποχή παράγονται συνθετικά τέτοια φυτοφάρμακα, όπως είναι τα νικοτινοειδή και τα νεονικοτινοειδή.
- χλωριωμένους υδρογονάνθρακες, συνθετικές οργανικές ενώσεις με κυκλική δομή στην οποία άτομα υδρογόνου έχουν αντικατασταθεί με χλώριο, όπως είναι το DDT, το Lindane, το Chlordane, το Dieldrin, που χρησιμοποιούνται κυρίως ως εντομοκτόνα. Οι ενώσεις αυτές είναι πολύ δύσκολο να αποσυντεθούν και μπορούν να παραμείνουν στο περιβάλλον ακόμη και 15 χρόνια.
- ενώσεις τριαζίνης, όπως είναι η σιμαζίνη, η ατραζίνη και η εξαζινόνη, που έχουν την ικανότητα να απολυμαίνουν το χώμα και να εμποδίζουν την ανάπτυξη των ζιζανίων.
- Φαινοξυ-οξέα, όπως είναι τα διχλωροφαινοξυ- και τριχλωροφαινοξυ-ακετικά οξέα, που χρησιμοποιούνται επίσης ως ζιζανιοκτόνα.
- ενώσεις υδραργύρου, συνθετικές οργανικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως μυκητοκτόνα και παρουσιάζουν υψηλή τοξικότητα για τον άνθρωπο και το περιβάλλον.

- φαινολικά, που χρησιμοποιούνται ως μυκητοκτόνα για την προστασία του ξύλου ή άλλων οργανικών υποστρωμάτων.
- οργανοφωσφορικά, συνθετικές οργανικές ενώσεις, όπως είναι το Parathion, το Malathion και το Glyphosate, οι οποίες προέκυψαν από τα αέρια που χρησιμοποιήθηκαν στον 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο. Οι ουσίες αυτές είναι 10 με 100 φορές περισσότερο τοξικές από τους χλωριωμένους υδρογονάνθρακες σε ζωικούς οργανισμούς με μέγεθος μεγαλύτερο από τα έντομα. Ωστόσο, η παραμονή τους στο οικοσύστημα είναι συνήθως μικρή και κυμαίνεται από μερικές ώρες μέχρι μερικές μέρες.
- καρβαμιδικά, όπως είναι το Aminocarb και το Carbofuran, ουσίες που επηρεάζουν το νευρικό σύστημα των παρασίτων και έχουν αρκετές ομοιότητες με τα οργανοφωσφορικά.
- μικροβιακά, δηλαδή ζωντανοί οργανισμοί, όπως είναι ο *Bacillus thuringiensis*, που παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση εναντίον συγκεκριμένων παρασίτων. Μερικά από αυτά είναι ιοί, ορισμένα βακτήρια, παρασιτικές σφήκες και κοριοί.

Μια νέα τάξη συνθετικών φυτοφαρμάκων που αναπτύχθηκε πρόσφατα αποτελούν οι παλδοξίνες (paldoxins) που δρουν ως μυκητοκτόνα παρεμποδίζοντας τα ένζυμα των μυκήτων που απενεργοποιούν έναν φυσικό αμυντικό μηχανισμό των φυτών, τις φυτοαλεξίνες. Αυτά θεωρούνται ασφαλέστερα για τον άνθρωπο και το περιβάλλον (EurekAlert, 2009).

1.5. Επίδραση στο περιβάλλον

Αναμφισβήτητα, τα φυτοφάρμακα συμβάλλουν στην αύξηση της αγροτικής παραγωγής και στη βελτίωση της ποιότητας των αγροτικών προϊόντων, όταν χρησιμοποιούνται στη σωστή αναλογία και με την καθοδήγηση ειδικών επιστημόνων. Ωστόσο, ένα ποσοστό πάνω από το 98% των ψεκαζόμενων εντομοκτόνων και το 95% των ζιζανιοκτόνων δεν καταλήγουν ποτέ στους οργανισμούς-στόχους τους, με αποτέλεσμα να μολύνουν την ατμόσφαιρα, το νερό, το έδαφος και να δηλητηριάζουν οργανισμούς που δεν αποτελούν στόχους τους (Miller, 2004).

Τα φυτοφάρμακα που ψεκάζονται στις καλλιέργειες με σκοπό την απολύμανση των εδαφών με τη μέθοδο του καπνίσματος απελευθερώνουν στην ατμόσφαιρα πτητικά οργανικά συστατικά που, αντιδρώντας με οξείδια του αζώτου, παράγουν έναν ισχυρό μολυσματικό παράγοντα: το τροποσφαιρικό όζον. Η χρήση φυτοφαρμάκων ευθύνεται για το 6% περίπου των συνολικών επιπέδων τροποσφαιρικού όζοντος (UC IPM, 2006).

Στις ΗΠΑ, σε μια μελέτη που διενεργήθηκε για τη μόλυνση του νερού από φυτοφάρμακα, βρέθηκαν μολυσμένα όλα τα ποτάμια καθώς και το 90 % των πηγαδιών που εξετάστηκαν (Gilliom et al., 2007). Στο Ηνωμένο βασίλειο, μελέτες έδειξαν επίπεδα φυτοφαρμάκων πάνω από τα επιτρεπτά όρια για το πόσιμο νερό σε δείγματα από ποτάμια και υπόγεια ύδατα (Bingham, 2007). Στην Ελλάδα, σύμφωνα με μελέτη που έχει γίνει σε βρόχινο νερό για την παρουσία φυτοφαρμάκων, βρέθηκε ότι στο 90% των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ανιχνεύθηκε σημαντική ποσότητα τουλάχιστον ενός φυτοφαρμάκου (Charizopoulos & Mourkidou, 1999).

Τα φυτοφάρμακα μειώνουν τη βιοποικιλότητα του εδάφους και τη σύστασή του σε οργανικό υλικό (Kellogg et al., 2000). Επίσης έχει βρεθεί ότι παρεμποδίζουν τις συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ ψυχανθών και των βακτηρίων του γένους *Rhizobium* με αποτέλεσμα την αναστολή της αζωτοδέσμευσης και κατά συνέπεια, τη διαταραχή του κύκλου του αζώτου στο περιβάλλον και τη μείωση της απόδοσης των καλλιεργειών (Fox, 2005).

Στους ζωικούς οργανισμούς, η χρήση των φυτοφαρμάκων είναι δυνατόν να επιφέρει άμεσα αρνητικά αποτελέσματα, λόγω της έκθεσής τους σε υψηλές δόσεις, ή έμμεσα αρνητικά αποτελέσματα, λόγω της μακροχρόνιας έκθεσής τους, ακόμα και σε χαμηλές δόσεις. Τα αρνητικά αυτά αποτελέσματα περιλαμβάνουν (Pesticide Action Network, 2005d):

- Θάνατο των οργανισμών λόγω της υψηλής τοξικότητας των χρησιμοποιούμενων φυτοφαρμάκων.
- Μείωση των επιπέδων των πληθυσμών πολλών ειδών.
- Διαταραχή των τροφικών σχέσεων μεταξύ των πληθυσμών.
- Μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας των οργανισμών.
- Μεταβολές στη συμπεριφορά των οργανισμών.

- Βιοχημικές, ορμονικές και ενζυμικές δυσλειτουργίες.
- Μεταβολές στη δομή και τη χημική σύσταση των κυττάρων και των ιστών των οργανισμών.
- Προβλήματα ανάπτυξης των οργανισμών.

Επιπλέον, κάποια φυτοφάρμακα έχουν την ικανότητα να βιοσυσσωρεύονται κατά μήκος των τροφικών αλυσίδων με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις τους να ξεπερνούν τα όρια τοξικότητας για τα είδη που βρίσκονται στα ανώτερα τροφικά επίπεδα. Για παράδειγμα, αν σε ένα υδάτινο οικοσύστημα ανιχνευθεί DDT σε συγκέντρωση 0.003 ppb (μέρη στο δισεκατομμύριο), τότε ακολουθώντας την τροφική αλυσίδα η βιοσυσσώρευση και η βιοσυμπύκνωσή του μεγεθύνονται περίπου 10.000.000 φορές στα ψαροπούλια, φτάνοντας τα 25 ppm (μέρη στο εκατομμύριο) (Shaw & Chadwick, 1998; Miller, 2004).

Πρέπει, τέλος, να σημειωθεί ότι οι εχθροί των καλλιεργειών (μύκητες, ζιζάνια, έντομα κ.λ.π.) αναπτύσσουν με το πέρασμα του χρόνου ανθεκτικότητα στα χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα με αποτέλεσμα οι ποσότητες των φυτοφαρμάκων διαρκώς να αυξάνονται για να μπορούν να έχουν αποτελέσματα στους οργανισμούς στους οποίους απευθύνονται. Από το 1950, 520 είδη εντόμων και σκουληκιών, 273 είδη ζιζανίων, 150 είδη μικροοργανισμών που προκαλούν ασθένειες φυτών και 10 είδη τρωκτικών έχουν αναπτύξει γενετική αντίσταση στα φυτοφάρμακα (Miller, 2004).

1.6. Επίδραση στον άνθρωπο

Ασφαλώς, η συμβολή των φυτοφαρμάκων στην προστασία της αγροτικής παραγωγής επέφερε πολλές ευεργετικές επιπτώσεις για τον ανθρώπινο πληθυσμό. Η προσφορά τους ήταν μεγάλη, αφενός μεν, στην προστασία της δημόσιας υγείας με την καταπολέμηση εντόμων που μετέφεραν διάφορες ασθένειες στον άνθρωπο και αφετέρου δε, στη λύση του προβλήματος της τροφής που αντιμετώπιζε η ανθρωπότητα με την πληθυσμιακή ανάπτυξη. Ταυτόχρονα όμως, η αλόγιστη χρήση των φυτοφαρμάκων οδήγησε σε αντίθετα αποτελέσματα. Το σύνολο του ανθρώπινου πληθυσμού είναι αναπόφευκτα εκτεθειμένο σε φυτοφάρμακα μέσω της ρύπανσης του

περιβάλλοντος ή λόγω επαγγελματικής ενασχόλησης. Άνθρωποι που η επαγγελματική τους ενασχόληση έχει να κάνει με την παραγωγή, την εφαρμογή ή οποιασδήποτε μορφής χειρισμό των φυτοφαρμάκων είναι εκτεθειμένοι σε σύνθετα μίγματα φυτοφαρμάκων που περιέχουν διάφορες δραστικές ουσίες, διαλύτες και παραπροϊόντα που μπορεί να είναι αδρανή συστατικά, αλλά να αποτελούν τα πιο τοξικά στοιχεία ενός σκευάσματος. Επιπλέον, υπολείμματα των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον διοχετεύονται μέσα από τις τροφικές αλυσίδες στον ανθρώπινο οργανισμό. Το γεγονός ότι τα περισσότερα φυτοφάρμακα, παρά την επιλεκτική τους δράση, παρουσιάζουν τοξικότητα ακόμα και για οργανισμούς που δεν αποτελούν στόχους τους, τα καθιστά ιδιαίτερα επικίνδυνα για τον άνθρωπο (Bolognesi, 2003). Η οξεία τοξικότητα από φυτοφάρμακα αποτελεί την πιο συχνή αιτία θανάτου λόγω δηλητηρίασης σε παγκόσμιο επίπεδο. Κάθε χρόνο σημειώνονται 3.000.000 περιπτώσεις δηλητηριάσεων από φυτοφάρμακα, από τις οποίες, 220.000 περίπου είναι θανατηφόρες (Eddleston et al., 2002). Ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου συχνά παρατηρείται ακατάλληλη χρήση ή ακατάλληλος χειρισμός των φυτοφαρμάκων (μη-τήρηση κανόνων ασφαλείας, μη-χρησιμοποίηση προστατευτικού εξοπλισμού) το φαινόμενο των δηλητηριάσεων είναι έντονο (Racke et al., 1997; Gonzalez-Arias, 2010).

Πολύ περισσότερες και πιο ανησυχητικές όμως είναι οι μακροπρόθεσμες αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία που επέφερε η μακροχρόνια έκθεση στα φυτοφάρμακα, οι οποίες περιλαμβάνουν νευρολογικές διαταραχές, αναπαραγωγικά προβλήματα, προβλήματα ανάπτυξης και καρκίνους διαφόρων μορφών. Επιδημιολογικές μελέτες σε αγρότες, εργαζόμενους σε βιομηχανίες παραγωγής φυτοφαρμάκων, εργάτες που ψεκάζουν, εργάτες ή κατοίκους που έχουν εκτεθεί μετά από κάποιο βιομηχανικό ατύχημα, έχουν δείξει ότι η έκθεση σε φυτοφάρμακα μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε εξειδικευμένους ιστούς (Bolognesi et al., 2011). Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του εγκεφάλου, λευχαιμίας, σαρκώματος Ewing, λεμφώματος non-Hodgkin's, καρκίνου των νεφρών, των όρχεων, του εντέρου και των ενδοκρινών αδένων σε παιδιά που εκτίθενται σε

φυτοφάρμακα στο σπίτι ή των οποίων οι γονείς έχουν εκτεθεί σε φυτοφάρμακα λόγω επαγγελματικής ενασχόλησης (Blair & Freeman, 2009). Αναπαραγωγικά προβλήματα, προβλήματα ανάπτυξης (Hanke & Jurewicz, 2004; Lauria et al., 2006) και νευρολογικές διαταραχές, όπως είναι η νόσος Parkinson (Dhillon et al., 2008; Costello et al., 2009) και η νόσος Alzheimer (Dosunmu et al., 2007; Santibáñez et al., 2007), έχουν επίσης συνδεθεί με την έκθεση σε φυτοφάρμακα λόγω επαγγελματικής ενασχόλησης.

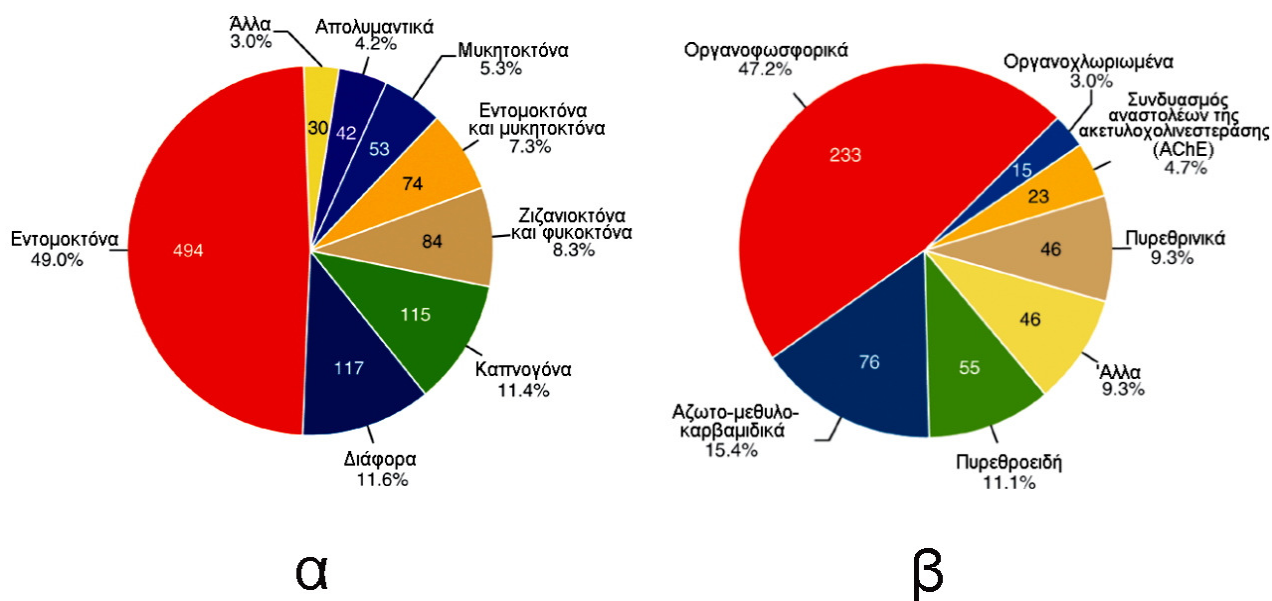
1.6.1. Τοξικότητα

Η τοξικότητα των φυτοφαρμάκων ελέγχεται με τη χρήση πειραματόζων, συνήθως ποντικών ή αρουραίων, και προσδιορίζεται με βάση τη «θανατηφόρο δόση-50%» (Lethal dose 50, LD₅₀). Η τιμή του δείκτη LD₅₀ αντιστοιχεί στη δόση που είναι ικανή να σκοτώσει το 50% των ατόμων ενός πληθυσμού που έχει υποβληθεί σε μια περιορισμένης έκτασης επίδραση μιας συγκεκριμένης χημικής ουσίας. Δίνεται συνήθως σε μέρη στο εκατομμύριο (parts per million, ppm) ή σε mg ουσίας/kg βάρους πειραματόζωου και εκφράζει την τοξικότητα μιας χημικής ουσίας. Όσο πιο μικρή είναι η τιμή αυτή, τόσο πιο τοξική είναι η χημική ουσία. Οι οδοί λήψης των δόσεων είναι είτε από το στόμα, είτε μέσω του δέρματος. Όταν η χορήγηση γίνεται με εισπνοή χρησιμοποιείται ο δείκτης «θανατηφόρος συγκέντρωση-50%» (Lethal Concentration 50, LC₅₀), δηλαδή η συγκέντρωση της χημικής ουσίας στον αέρα, σε mg/λίτρο, που είναι ικανή να σκοτώσει το 50% των ατόμων ενός πληθυσμού (Pesticide Action Network, 2005a).

Όπως προαναφέρθηκε, διάφοροι οργανισμοί είναι υπεύθυνοι για την εκτίμηση και την κατάταξη των φυτοφαρμάκων ως προς την τοξικότητά τους. Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 1.6.1**) φαίνονται οι κατηγορίες τοξικότητας και οι προειδοποιητικές σημάνσεις των φυτοφαρμάκων με βάση τις τιμές του δείκτη LD₅₀ σε αρουραίους, όπως δίνονται από τον Οργανισμό Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (Environmental Protection Agency, EPA):

Πίνακας 1.6.1. Κατηγορίες τοξικότητας των φυτοφαρμάκων					
Κατηγορία	Περιγραφή	Προειδο- ποιητική σήμανση	LD₅₀ στοματ.προσλ. mg/kg	LD₅₀ δερματ.προσλ. mg/kg	LC₅₀ εισπνοή mg/L
I	πολύ τοξικό	κίνδυνος	<50	<200	<0.05
II	Μέτρια τοξικό	προσοχή	50-500	200-2000	0.05-0.5
III	ελαφρώς τοξικό	προσοχή	500-5000	2000-5000	0.5-2
IV	δεν παρουσιάζει οξεία τοξικότητα	καμία	>5000	>5000	>2

Η πιο τοξική για τον άνθρωπο κατηγορία φυτοφαρμάκων είναι τα εντομοκτόνα, ενώ από τα εντομοκτόνα, τα πιο επικίνδυνα θεωρούνται τα οργανοφωσφορικά. Μια μελέτη που διενεργήθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες κατά την περίοδο 1998-1999 έδειξε ότι οι ασθένειες που παρουσιάστηκαν σε μια ομάδα εργαζομένων και σχετίζονταν με φυτοφάρμακα, οφείλονταν κατά 49% στα εντομοκτόνα και από αυτά το 47.2% ήταν οργανοφωσφορικά (**Εικόνα 1.6.1**) (NIOSH, 2004; Calvert et al., 2004).



Εικόνα 1.6.1. α) ποσοστιαία κατανομή και αριθμός περιπτώσεων ασθενειών που σχετίζονται με φυτοφάρμακα, ανά κατηγορία φυτοφαρμάκων, κατά την περίοδο 1988-1989 β) ποσοστιαία κατανομή και αριθμός περιπτώσεων ασθενειών που σχετίζονται με φυτοφάρμακα, ανά κατηγορία εντομοκτόνων, κατά την περίοδο 1998-1999 (αναπροσαρμογή από NIOSH, 2004).

1.6.2. Γενοτοξική- Καρκινογόνος δράση

Η γενοτοξική δράση των φυτοφαρμάκων συνήθως ελέγχεται με βραχυχρόνιες δοκιμασίες *in vitro*, βραχυχρόνιες και μακροχρόνιες δοκιμασίες *in vivo* σε πειραματόζωα, αλλά και με επιδημιολογικές μελέτες σε ανθρώπους που έχουν υποστεί μακροχρόνια έκθεση σε φυτοφάρμακα (Bolognesi et al., 2011). Οι *in vitro* δοκιμασίες και οι *in vivo* δοκιμασίες σε πειραματόζωα εξετάζουν συνήθως τη μεμονωμένη δράση κάποιου συγκεκριμένου ενεργού συστατικού φυτοφαρμάκου, ενώ οι επιδημιολογικές μελέτες εξετάζουν τη συνδυασμένη δράση περισσότερων φυτοφαρμάκων ή φυτοφαρμάκων και άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων στους οποίους εκτίθενται τα υπό μελέτη άτομα. Οι μελέτες γενοτοξικών επιδράσεων των φυτοφαρμάκων εκτιμούν και την πιθανή συσχέτισή τους με καρκινογενετικές διαδικασίες (Bolognesi, 2003).

Μια από τις κατηγοριοποιήσεις που εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της καρκινογόνου δράσης των φυτοφαρμάκων είναι αυτή που καθιερώθηκε από τον Οργανισμό Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (Environmental Protection Agency, EPA) το 1986:

- Group A: ουσία γνωστή ως καρκινογόνος για τον άνθρωπο. Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις συσχετισμού μεταξύ έκθεσης στην ουσία και εκδήλωσης καρκίνου στον άνθρωπο.
- Group B: ουσία πιθανώς καρκινογόνος για τον άνθρωπο. Προκαλεί καρκίνο στα ζώα, αλλά δεν έχει ξεκαθαριστεί αν προκαλεί καρκίνο στον άνθρωπο.
- Group C: ουσία δυνητικά καρκινογόνος για τον άνθρωπο, με περιορισμένες ενδείξεις καρκινογένεσης.
- Group D: ουσία που δεν μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως προς την καρκινογένεση, λόγω ελλείπων, ανεπαρκών ή διφορούμενων στοιχείων.
- Group E: ουσία πιθανώς μη-καρκινογόνος, χωρίς καμία ένδειξη καρκινογόνου δράσης σε δυο τουλάχιστον δοκιμασίες με διαφορετικά είδη πειραματόζων. Η κατηγοριοποίηση αυτή βασίζεται σε διαθέσιμες ενδείξεις και δεν αποκλείει ικανότητα καρκινογένεσης του παράγοντα κάτω από ορισμένες συνθήκες. (Pesticide Action Network, 2005b)

Η γενετική βλάβη σε χρωμοσωματικό επίπεδο είναι δυνατόν να εκτιμηθεί με την εφαρμογή διαφόρων συστημάτων ελέγχου, μεθόδων και τεχνικών. Ορισμένες από αυτές τις τεχνικές που εφαρμόζονται κυρίως στο γενετικό υλικό ανθρώπινων λεμφοκυττάρων σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα είναι (Bolognesi, 2003):

- η ανάλυση χρωμοσωματικών βλαβών (chromosome aberration test, CA),
- η ανίχνευση μικροπυρήνων με αναστολή της κυτταροκίνησης (Cytokinesis-blocked micronucleus assay, CBMN)
- η ανάλυση των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων (sister chromatid exchanges, SCEs).

Μεταξύ των πολλών διαθέσιμων ερευνητικών προσεγγίσεων, άλλες ενδεικτικές μέθοδοι με τις οποίες μπορούμε να εκτιμήσουμε τη γενετοξική επίδραση φυτοφαρμάκων, αλλά και διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων γενικότερα, είναι:

- η ανίχνευση μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών ποντικών ή αρουραίων που έχουν δεχτεί *in vivo* επίδραση φυτοφαρμάκου (Schmid, 1973; Heddle, 1973; Vanderkerken et al., 1989)
- ο προσδιορισμός των αλλοιώσεων του γενετικού υλικού με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης του πυρηνικού DNA σε ολόκληρα κύτταρα (single cell gel electrophoresis, SCGE ή comet assay) (Ostling & Johanson, 1984; Valverde & Rojas, 2009; Piperakis et al., 2009; Piperakis, 2009).
- η μεθοδολογία της πρώιμης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης που παρέχει χρήσιμες πληροφορίες όσον αφορά το στάδιο του κυτταρικού κύκλου στο οποίο ενδεχομένως να παρεμβαίνουν οι χημικές ενώσεις, ώστε να προκαλέσουν τις όποιες επιδράσεις τους στο γενετικό υλικό (Johnson & Rao, 1970; Pantelias & Maillie, 1983; Malik et al., 2004; Hatzi et al., 2006).

Ο Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα στον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer, IARC) έχει χαρακτηρίσει 50 έως 60 φυτοφάρμακα ως καρκινογόνα, μετά από μελέτες σε πειραματόζωα. Μελέτες στον άνθρωπο έχουν αποδείξει την καρκινογόνο δράση διαφόρων δραστικών ουσιών, συστατικών φυτοφαρμάκων, όπως τα 2,4,5-trichloro-phenoxy-acetic acid (2,4,5-T), lindane, methoxychlor, toxaphene, καθώς και αρκετών οργανοφωσφορικών (IARC, 2010).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρόλο που πολλά φυτοφάρμακα έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανά ή δυνητικά καρκινογόνα από διεθνείς οργανισμούς και έχει απαγορευτεί ή περιοριστεί η χρήση τους, εξακολουθούν να αποτελούν ευρέως διαδεδομένους περιβαλλοντικούς ρυπαντές, λόγω της παραμονής τους και της βιοσυσσώρευσής τους στα οικοσυστήματα. Υπολείμματα αυτών των φυτοφαρμάκων έχουν ανιχνευθεί στην τροφική

αλυσίδα καθώς και σε διάφορους ιστούς στον άνθρωπο (Bolognesi et al., 2011).

1.6.2.1. *In vitro* και *in vivo* μελέτες με πειραματόζωα

Τα περισσότερα φυτοφάρμακα έχουν ελεγχθεί για πιθανή γενotoξική δράση σε *in vitro* ή *in vivo* συνθήκες με μια ποικιλία δοκιμασιών ελέγχου που καλύπτουν γονιδιακές μεταλλάξεις, χρωμοσωματικές αλλοιώσεις και βλάβες στο DNA (Garrett et al., 1986; Dearfield et al., 1993 & 1999; IARC, 2010). Οι περισσότερες μελέτες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία αφορούν στη γενotoξική δράση συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων, χορηγούμενων μεμονωμένα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Surallès et al., 1995; Kevekordes et al., 1996; Titenko-Holland et al., 1997; Villarini et al., 1998; Papapaulou et al., 2001). Περιορισμένες είναι οι μελέτες που εξετάζουν την επίδραση μίγματος συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vitro* (Dolara et al., 1992 & 1993; Bianchi-Santamaria et al., 1997) ή *in vivo* σε διάφορους ιστούς τρωκτικών (Kligerman et al., 1993; Goumenou & Machera, 2004).

Τα πειραματικά αποτελέσματα αυτών των μελετών, σε γενικές γραμμές, αποκαλύπτουν ότι πολλά από τα εξεταζόμενα φυτοφάρμακα έχουν μεταλλαξιγόνες ιδιότητες, αλλά η γενotoξική τους δράση είναι γενικά χαμηλή, αφού δεν δίνουν θετικά αποτελέσματα σε όλες τις χρησιμοποιούμενες δοκιμασίες ελέγχου και η χαμηλότερη δραστική δόση, ικανή να επάγει γενετικές βλάβες, είναι συνήθως αρκετά υψηλή. Επειδή όμως η επαγγελματική ή περιβαλλοντική έκθεση στα φυτοφάρμακα αφορά πάντα μίγματα αυτών, η γενotoξική δράση που αποδίδεται σε μεμονωμένα φυτοφάρμακα δεν είναι απαραίτητα η ίδια όταν εξετάζονται άνθρωποι πληθυσμοί εκτεθειμένοι *in vivo* σε μίγματα φυτοφαρμάκων (Bolognesi, 2003).

1.6.2.2. *In vivo* επιδημιολογικές μελέτες

Μια πληθώρα επιδημιολογικών μελετών έχουν πραγματοποιηθεί σε εκτεθειμένους σε φυτοφάρμακα ανθρώπινους πληθυσμούς από διάφορες χώρες, με σκοπό την εκτίμηση του γενετικού κινδύνου που σχετίζεται με την έκθεση σε συγκεκριμένα συστατικά ή κατηγορίες φυτοφαρμάκων ή με συγκεκριμένες μορφές ενασχόλησης σχετικές με φυτοφάρμακα (Bolognesi, 2003; Bull et al., 2006; Bolognesi et al., 2011).

Η Bolognesi (2003), κάνοντας μια εκτενή ανασκόπηση όλων των σχετικών δημοσιευμένων μελετών μέχρι το 2003, συμπέρανε ότι η έκθεση σε μίγματα φυτοφαρμάκων λόγω επαγγελματικής ενασχόλησης συνδέεται με αύξηση της παρατηρούμενης γενετικής βλάβης και μάλιστα, η έκταση της βλάβης εξαρτάται από το βαθμό της έκθεσης: αρνητικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε περιπτώσεις χαμηλών επιπέδων έκθεσης. Αντίθετα, ξεκάθαρα θετικά αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν σε περιπτώσεις πληθυσμών που είχαν εκτεθεί σε μεγάλο βαθμό, κυρίως σε άτομα που είχαν δηλητηριαστεί προσπαθώντας να αυτοκτονήσουν ή σε εργάτες που είχαν αμελήσει να πάρουν τα κατάλληλα μέτρα προφύλαξης κατά τη διάρκεια των ψεκασμών. Επειδή οι εργάτες είναι συνήθως εκτεθειμένοι σε σύνθετα μίγματα φυτοφαρμάκων, δεν ήταν εύκολο να αποδοθεί η παρατηρούμενη γενετική βλάβη σε μια συγκεκριμένη κατηγορία φυτοφαρμάκων. Από την ανάλυση των διαφόρων μελετών όμως φαίνεται πως τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα που επάγουν γενοτοξικότητα είναι τα οργανοφωσφορικά, τα καρβαμιδικά και τα πυρεθροειδή.

Οι Bull et al. (2006) παρατήρησαν επίσης αυξημένες ενδείξεις γενοτοξικότητας σε εργαζόμενους εκτεθειμένους σε φυτοφάρμακα, σε 17 από τις 24 μελέτες των οποίων τα αποτελέσματα επέλεξαν να εκτιμήσουν. Οι περισσότερες μελέτες με θετικά αποτελέσματα αφορούσαν ανθοκόμους εργαζόμενους σε θερμοκήπια. Είναι πολύ πιθανόν αυτή η τάξη εργαζόμενων να υπόκειται σε αυξημένο κίνδυνο γενετικής βλάβης λόγω του υψηλού βαθμού έκθεσης που επιβάλλουν οι συνθήκες εργασίας τους. Στις μελέτες αυτές, τα χρησιμοποιούμενα μίγματα φυτοφαρμάκων περιλάμβαναν κάποια με αποδεδειγμένη *in vivo* γενοτοξική δράση σε πειραματόζωα, κυρίως

βενζιμιδαζόλες όπως είναι το carbendazim, αλλά και κάποια που θεωρούνταν ότι δεν είχαν γενοτοξική δράση.

Τέλος, οι Bolognesi et al. (2011), σε μια πιο πρόσφατη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που αφορά την εκτίμηση του γενετικού κινδύνου σε ανθρώπινους πληθυσμούς εκτεθειμένους σε φυτοφάρμακα λόγω επαγγελματικής ενασχόλησης, κατέληξαν στις παρακάτω παρατηρήσεις: Οι εργαζόμενοι σε βιομηχανίες παραγωγής φυτοφαρμάκων παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση στη συχνότητα επαγωγής γενετικών βλαβών με τη μορφή των μικροπυρήνων. Εργάτες που ψεκάζουν με ένα ή με λίγα φυτοφάρμακα και που δουλεύουν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, δεν παρουσιάζουν αύξηση χρωμοσωματικών βλαβών. Αντίθετα, εργάτες που απασχολούνται σε πολλές διαφορετικές καλλιέργειες και ψεκάζουν με ένα σύνθετο μίγμα φυτοφαρμάκων, στην πλειοψηφία των μελετών, παρουσιάζουν αύξηση χρωμοσωματικών βλαβών. Ανθοκόμοι που εργάζονται σε θερμοκήπια, σε πολλές μελέτες, παρουσιάζουν επίσης αύξηση στη συχνότητα επαγωγής γενετικών βλαβών με τη μορφή των μικροπυρήνων και μάλιστα σε κάποια μελέτη βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στα χρόνια απασχόλησης και στη συχνότητα των μικροπυρήνων.

1.7. Imidacloprid

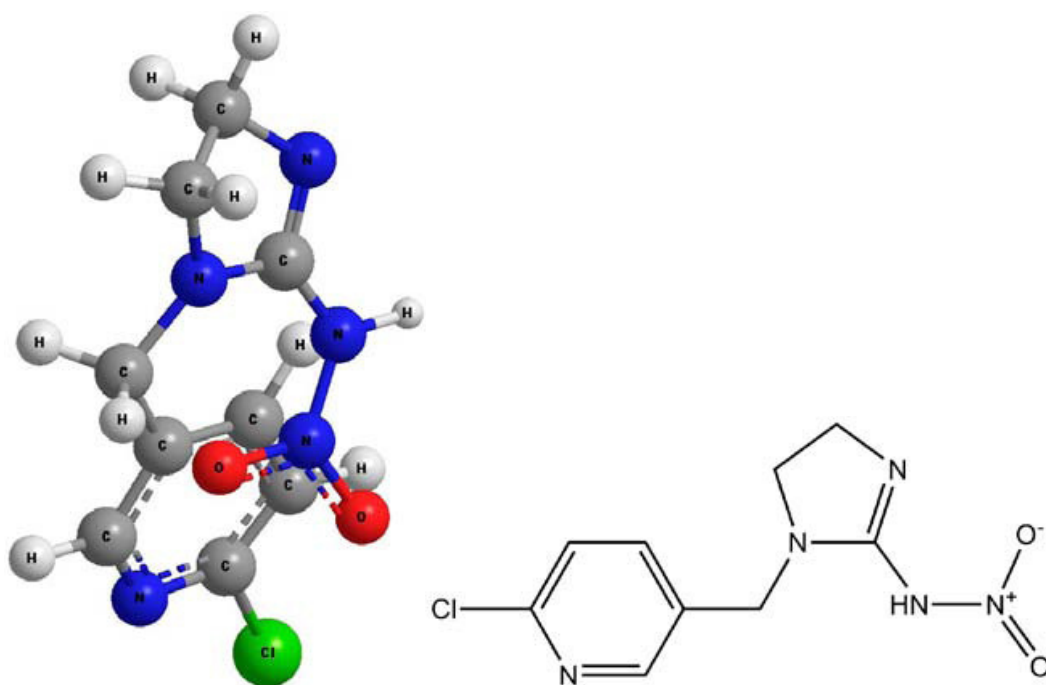
1.7.1. Γενικά

Το Imidacloprid [1-(6-chloro-3-pyridinylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine] (CAS number: 138261-41-3) είναι ευρέος φάσματος χλωρο-νικοτινικό εντομοκτόνο (Tomlin, 2006). Το μοριακό του μοντέλο και η χημική του δομή απεικονίζονται στην **εικόνα 1.7.1**. Είναι ένα σχετικά νέο εντομοκτόνο, που πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1993 και στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής το 1994 (Honda & Hooser, 2002).

Κατασκευάστηκε από την Bayer το 1985 και κυκλοφορεί σε περίπου 120 χώρες για περισσότερες από 140 γεωργικές καλλιέργειες. Με ετήσιες πωλήσεις περισσότερο από 600 εκατομμύρια ευρώ (2001), το Imidacloprid

είναι ένα από τα κορυφαία σε πωλήσεις προϊόντα της Bayer. Στο εμπόριο το βρίσκουμε με διάφορα ονόματα όπως Gaucho, Admire, Confidor και Winner (Cox, 2001).

Έχει ένα ευρύ πεδίο χρήσεων στο έδαφος, τους σπόρους και το φύλλωμα καλλιεργειών όπως τον καπνό, το ρύζι, τα δημητριακά, τις πατάτες, κ.α. Χρησιμοποιείται ενάντια σε μυζητικά έντομα όπως τα αφίδια, η σιταρόψειρα και οι ψύλλοι ή ενάντια σε έντομα που απαντώνται στο έδαφος, όπως οι τερμίτες (Tomlin, 2006; Fossen, 2006). Χρησιμοποιείται επίσης για την καταπολέμηση των ψύλλων σε κατοικίδια ζώα (NPIC, 2010).



Εικόνα 1.7.1. Μοριακό μοντέλο και χημική δομή του Imidacloprid (NPIC, 2010)

Ορισμένα βασικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του Imidacloprid είναι τα εξής:

Σχηματίζει άχρωμους κρυστάλλους με μια ελαφριά χαρακτηριστική οσμή.

Το μοριακό του βάρος είναι: 255.7 g/mol.

Το σημείο τήξης του είναι : 136.4-143.8 °C.

Η διαλυτότητά του στο νερό είναι: 0.61 g/L στους 20° C, τιμή που το καθιστά αρκετά ευδιάλυτο (Tomlin, 2006).

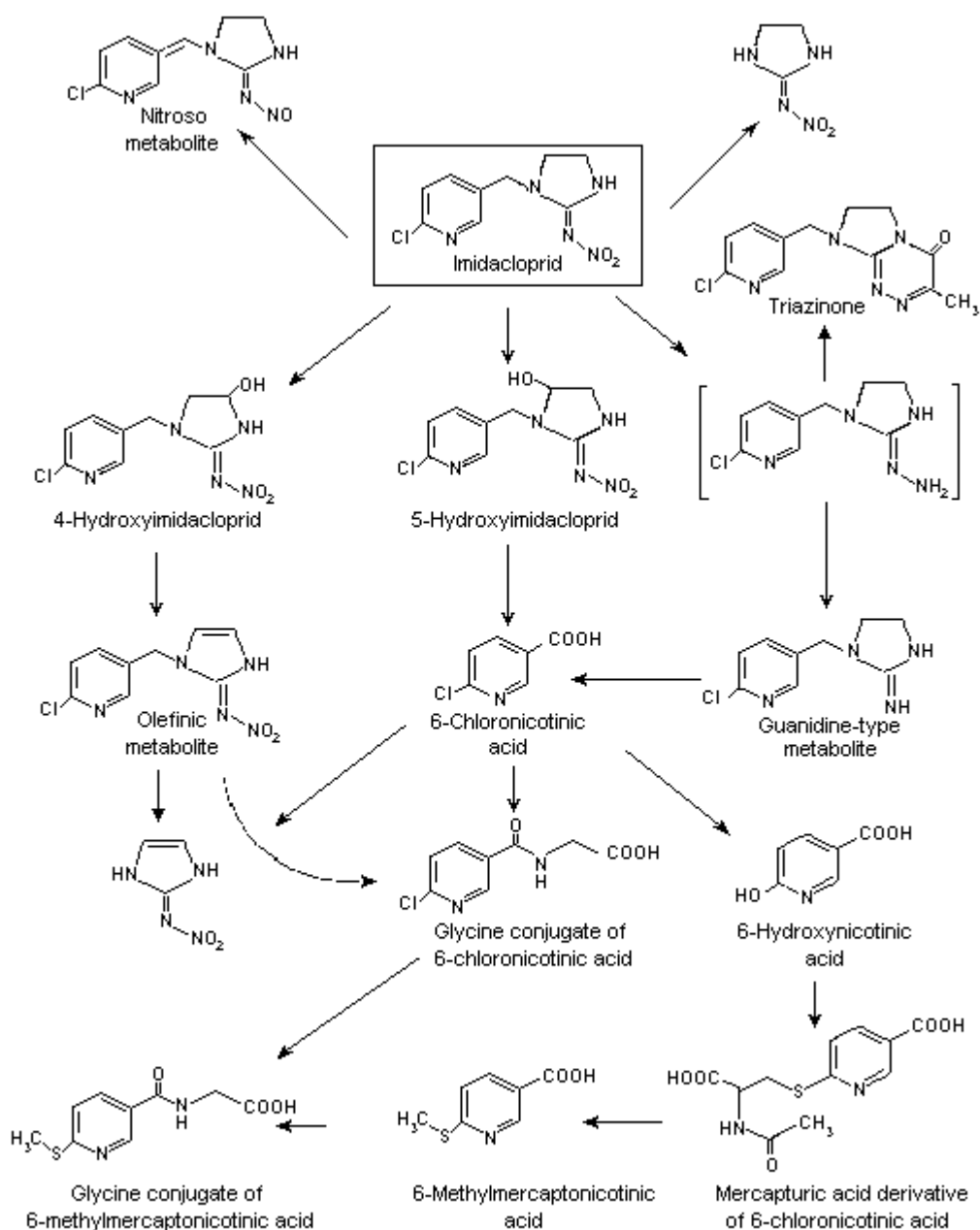
1.7.2. Τρόπος δράσης

Το Imidacloprid παρεμποδίζει την μετάδοση των νευρικών σημάτων, καταλαμβάνοντας την θέση της ακετυλοχολίνης στους νικοτινεργικούς υποδοχείς της (Tomizawa & Yamamoto, 1993). Σε αντίθεση με την ακετυλοχολίνη, η οποία αποδομείται ταχύτατα από το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση, το Imidacloprid δεν μπορεί να αποδομηθεί ή αποδομείται εξαιρετικά αργά. Τα έντομα που δέχονται αυτή την επίδραση πεθαίνουν ως αποτέλεσμα της δυσλειτουργίας του νευρικού τους συστήματος. Αυτός ο τρόπος δράσης επηρεάζει κυρίως τα έντομα και πολύ λιγότερο τα θηλαστικά (Liu & Casida, 1993; Chao & Casida, 1997). Η εκλεκτικότητά του αυτή αποδίδεται στη μικρότερη τάση που έχει να προσδένεται στους υποδοχείς της ακετυλοχολίνης των θηλαστικών, σε σχέση με τους αντίστοιχους των εντόμων (Tomizawa & Casida, 1999).

Δυστυχώς όμως, εκτός από τη δράση του έναντι στα βλαβερά για τις καλλιέργειες έντομα, είναι πολύ τοξικό και για ωφέλιμα έντομα, όπως είναι οι μέλισσες (Suchail et al., 2001). Έχει απαγορευτεί σε 3 ευρωπαϊκές χώρες: Ιταλία, Γερμανία και Σλοβενία και έχει περιοριστεί η πώλησή του στη Γαλλία, αφού παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση στον πληθυσμό των μελισσών (City of Ottawa, 2005).

1.7.3. Μεταβολισμός

Στα θηλαστικά, ο μεταβολισμός του Imidacloprid πραγματοποιείται κυρίως στο συκώτι από το κυτόχρωμα P450, ακολουθώντας 2 μεταβολικά μονοπάτια: α) με οξειδωτική διάσπαση δίνει 6-χλωρονικοτινικό οξύ (6-chloronicotinic acid) που μεταβολίζεται περαιτέρω σε μερκαπτονικοτινικό (mercaptonicotinic acid) και ιππουρικό οξύ (hippuric acid) β) με υδροξυλίωση του ιμιδαζολικού δακτυλίου (imidazolidine ring) δίνει 4- και 5-υδροξυ-imidacloprid και στη συνέχεια ολεφινικά παράγωγα (Schultz-Jander & Casida, 2002). Στην **εικόνα 1.7.3** παριστάνονται αναλυτικά τα παραπάνω μεταβολικά μονοπάτια.



Εικόνα 1.7.3. Μεταβολισμός του Imidacloprid στα θηλαστικά (Proença et al., 2005)

Το Imidacloprid απορροφάται γρήγορα από τον οργανισμό και μετατρέπεται άμεσα σε 6-χλωρονικοτινικό οξύ. Το 70-80% περίπου της προσλαμβανόμενης δόσης αποβάλλεται με τα ούρα, ενώ το 20-30% περίπου με τα κόπρανα μέσα σε 24 ώρες (Moffat et al, 2004).

1.7.4. Τοξικότητα

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (Environmental Protection Agency, EPA) ταξινομείται ως φυτοφάρμακο μικρής και μέτριας τοξικότητας (Toxicity Class III και Class II) όταν λαμβάνεται από το στόμα (EPA, 2009). Στους αρουραίους, η θανατηφόρος δόση-50% με στοματική πρόσληψη (oral Lethal Dose 50, LD₅₀) υπολογίστηκε στα 450 mg/kg σωματικού βάρους (NPIC, 2010). Το Imidacloprid παρουσιάζει πολύ χαμηλή τοξικότητα (Toxicity Class IV) μέσω δερματικής πρόσληψης (EPA, 2009). Η θανατηφόρος δόση-50% μέσω δερματικής πρόσληψης στα ποντίκια (dermal Lethal Dose 50, LD₅₀) υπολογίστηκε ότι είναι μεγαλύτερη από 5000 mg/kg σωματικού βάρους (WHO, 2004). Αντίθετα, η τοξικότητά του όταν εισπνέεται ποικίλλει: σε μορφή σκόνης ταξινομείται ως ελαφρά τοξικό (Toxicity Class IV), ενώ σε μορφή αερολύματος ως ισχυρά τοξικό (Toxicity Class I) (EPA, 2009).

Η χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά αποδίδεται στη χαμηλή τάση πρόσδεσης του Imidacloprid στους υποδοχείς της ακετυλοχολίνης των θηλαστικών. Εξάλλου, λόγω της υψηλής του διαλυτότητας στο νερό και του αργού μεταβολισμού του στον οργανισμό των θηλαστικών, το Imidacloprid αποβάλλεται αμετάβλητο με τα ούρα. Ωστόσο, τοξικολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι κάποιοι μεταβολίτες του Imidacloprid, όπως ο δινίτρο-μεταβολίτης (DN-IMI) και το νιτρομεθυλιομένο ανάλογό του (CH-IMI), θεωρούνται επικίνδυνοι για τα θηλαστικά (Chao & Casida, 1997; D'Amour & Casida, 1999; Tomizawa & Casida, 2000). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί απορρόφηση του Imidacloprid με πολύ γρήγορο ρυθμό, από ανθρώπινα κύτταρα εντέρου, σε πειράματα με την κυτταρική σειρά Caco-2 (Brunet et al., 2004). Οι μελέτες αυτές, σε συνδυασμό με την παρουσία υπολειμμάτων τόσο του Imidacloprid, όσο και των μεταβολιτών του σε τρόφιμα (Fernandez-Alba et al., 2000) ή στον καπνό (Liu et al., 2005), υποδεικνύουν ότι το Imidacloprid πιθανόν να ενέχει κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, ιδιαίτερα μετά από χρόνια έκθεση σε αυτό.

Δεν έχουν αναφερθεί μελέτες χρόνιας τοξικότητας στον άνθρωπο, ωστόσο μετά από ανάλογες μελέτες σε αρουραίους έχει καθοριστεί η τιμή της δόσης

αναφοράς για χρόνια πρόσληψη (chronic dietary Reference Dose, RfD) στα 0.057 mg/kg/day. Η δόση αναφοράς (RfD) αποτελεί μια εκτίμηση της ποσότητας ενός συγκεκριμένου χημικού παράγοντα, στην οποία μπορεί να εκτίθεται καθημερινά ένα άτομο, χωρίς κίνδυνο για την υγεία του. Η τιμή της εκφράζεται σε mg του χημικού ανά κιλό σωματικού βάρους, ανά μέρα (NPIC, 2010).

1.7.4.1. Συμπτώματα τοξικότητας

Στα ζώα, υψηλές δόσεις στοματικής πρόσληψης του Imidacloprid μπορούν να οδηγήσουν σε λήθαργο, εμετό, διάρροια, σιελόρροια και μυϊκή αδυναμία (Wismer, 2004). Ωστόσο, τα συμπτώματα αυτά εξαφανίζονται γρήγορα, μέσα στο πρώτο 24ωρο μετά την έκθεση (Sheets, 2002).

Μελέτες που έγιναν σε θηλυκούς αρουραίους και θηλυκά κουνέλια κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης έδειξαν ότι η χορήγηση Imidacloprid σε δόσεις 10, 30 και 100 mg/kg/day και 8, 24 και 72 mg/kg/day αντίστοιχα για τους αρουραίους και τα κουνέλια, προκάλεσε αναπαραγωγικές ανωμαλίες όπως μειωμένη εμβρυϊκή ανάπτυξη και οστεοποίηση, καθώς και συμπτώματα τοξικότητας στις μητέρες (Becker et al., 1988a & 1988b).

Στους ανθρώπους, έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις δηλητηρίασης που κατέληξαν στο θάνατο μετά από κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων εμπορικών σκευασμάτων που περιείχαν Imidacloprid ως ενεργό συστατικό (Proença et al., 2005; Huang et al., 2006). Έχουν παρατηρηθεί συμπτώματα αποπροσανατολισμού, ζάλης, ταραχής, εφίδρωσης και δύσπνοιας μετά από εισπνοή του συγκεκριμένου φυτοφαρμάκου σε ανθρώπους που ψέκαζαν τις καλλιέργειές τους (Agarwal, 2008).

Επίσης έχουν αναφερθεί περιπτώσεις δερματίτιδας σε κατόχους κατοικίδιων ζώων που είχαν χρησιμοποιήσει κτηνιατρικά προϊόντα που περιείχαν Imidacloprid (WHO, 2004).

1.7.5. Καρκινογόνος δράση

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (Environmental Protection Agency, EPA) ταξινομείται ως Group E καρκινογόνο (EPA, 2009), δηλαδή χωρίς αποδεδειγμένη καρκινογόνο δράση. Ωστόσο, έχουν βρεθεί στη βιβλιογραφία αρκετές μελέτες με θετικά αποτελέσματα ως προς τη γενotoξική δράση του Imidacloprid σε μια ποικιλία οργανισμών όπως ασπόνδυλα, αμφίβια, αλλά και θηλαστικά. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί *in vitro* επαγωγή βλαβών στο DNA σκουληκιών, η οποία αυξάνονταν με την αύξηση της χορηγούμενης δόσης (Zang et al., 2000). Επιπλέον, μελέτες των Feng et al. (2004) έδειξαν ότι το Imidacloprid παρουσιάζει γενotoξική δράση σε ερυθροκύτταρα βατράχων, τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* πειράματα.

Όσον αφορά στη γενotoξική δράση του Imidacloprid στα θηλαστικά, έχει βρεθεί ότι το εντομοκτόνο Admire προκαλεί αυξημένη συχνότητα βλαβών στο DNA κυττάρων του θύμου αδένος βοοειδών μετά από *in vitro* επίδραση με μεταβολίτες του Imidacloprid (Shah et al., 1997). Η πιθανότητα να επάγουν γενotoξικότητα κάποιοι μεταβολίτες του Imidacloprid έχει διερευνηθεί και έχει βρεθεί ότι ο μεταβολίτης 2-imidazolidone (γνωστός και ως εθυλενουρία), σε συνδυασμό με νιτρικά, επάγει όγκους και προκαλεί γενετικές βλάβες σε αρουραίους μετά από στοματική χορήγηση (Sander & Buerkle, 1971 in Cox, 2001). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες των Stapleton et al. (2008) και των Vlastos et al. (2010b) αναφέρουν ότι ένα προϊόν της διάσπασης των μεταβολιτών του Imidacloprid, η 2-χλωροπυριδίνη (2-Chloropyridine, 2-CPY), εμφανίζει γενotoξική δράση στη συγκέντρωση των 100 µg/ml, μετά την εφαρμογή της τεχνικής των μικροπυρήνων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων, ενώ παράλληλα παράγει γενotoξικά δραστικά υποπροϊόντα όταν υφίσταται φωτολυτική διάσπαση.

Εξάλλου, αυξημένες συχνότητες χρωμοσωματικών ανωμαλιών και μικροπυρήνων έχουν βρεθεί *in vivo* στο μυελό των οστών αρουραίων υπό την επίδραση του Imidacloprid μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με το οργανοφωσφορικό φυτοφάρμακο Methamidophos (Karabay & Oguz, 2005).

Επίσης, μελέτες των Feng et al. (2005) έδειξαν ότι το Imidacloprid παρουσιάζει γενοτοξική δράση σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vitro*, αφού επάγει αυξημένες συχνότητες μικροπυρήνων (MN) και ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων (SCEs) σε συγκέντρωση 0.1 mg/L καθώς και αυξημένες συχνότητες βλαβών στο DNA οι οποίες ανιχνεύθηκαν με την εφαρμογή της μεθόδου Comet Assay, σε συγκέντρωση 0.05 mg/L. Αύξηση στη συχνότητα των μικροπυρήνων και βλαβών στο DNA παρατηρήθηκαν επίσης σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vitro* μετά από επίδραση 20 μ M Imidacloprid (Costa et al., 2009). Στην τελευταία μελέτη, οι βλάβες στο DNA αυξήθηκαν ακόμη περισσότερο μετά από χορήγηση εμπορικού σκευάσματος με Imidacloprid, καθώς και μετά από μεταβολική ενεργοποίηση.

Τέλος, οι Stivaktakis et al. (2010), παρόλο που δεν ανίχνευσαν γενοτοξική δράση σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα *in vitro* μετά από μεμονωμένη χορήγηση Imidacloprid, έδειξαν ότι το Imidacloprid απορροφάται καλύτερα από τα λεμφοκύτταρα και επάγει στατιστικά σημαντική αύξηση στη συχνότητα των μικροπυρήνων όταν χορηγείται σε συνδυασμό με νιτρικό κάλιο (KNO_3). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την επαγωγή γενοτοξικότητας του Imidacloprid μετά από συνεργιστική δράση με ακίνδυνο χημικό παράγοντα όπως το νιτρικό κάλιο (KNO_3).

1.7.6. Επιπτώσεις στο περιβάλλον

Ο χρόνος ημιζωής του Imidacloprid στο έδαφος ποικίλλει πολύ. Μελέτες σε πειραματικά χωράφια καλλιέργειας καπνού που προσομοιάζουν τις συνθήκες μιας τυπικής καπνοκαλλιέργειας στην Ελλάδα έχουν υπολογίσει τον χρόνο ημιζωής του στο έδαφος στις 16,9 ημέρες (Triantafyllidis et al., 2006). Γενικά έχει παρατηρηθεί μακρόχρονη παραμονή και συσσώρευση του στο έδαφος (Cox et al., 1997; Sarkar et al., 2001; Liu et al., 2006).

Το Imidacloprid έχει την ικανότητα να κινείται ταχύτατα μέσα στο έδαφος και να στραγγίζει στα υπόγεια νερά, μολύνοντας έτσι τον υδροφόρο ορίζοντα (Gonzalez-Pradas et al., 2000; Flores-Céspedes et al., 2002).

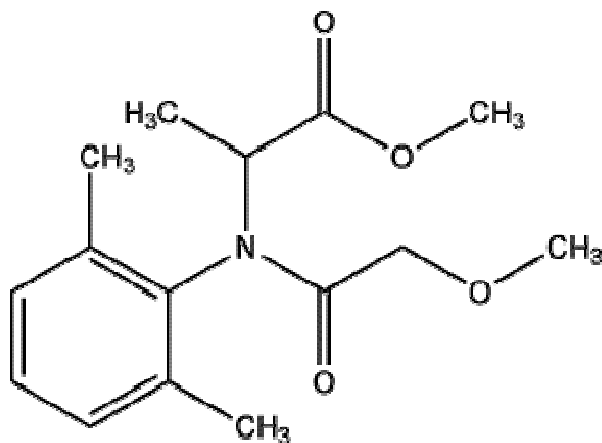
Ως συστηματικό εντομοκτόνο, μετά την εφαρμογή του στο έδαφος, το Imidacloprid απορροφάται από τις ρίζες των φυτών και μετακινείται προς όλους τους φυτικούς ιστούς (Tomlin, 2006). Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας, υπολείμματα τόσο του Imidacloprid, όσο και των μεταβολιτών του, ανιχνεύονται σε φρούτα και λαχανικά όπως ζαχαρότευτλα, ντομάτες, λάχανα, μελιτζάνες κ.α. (Westwood et al., 1998; Mukherjee & Gopal, 2000; Alsayeda et al., 2008).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω χαρακτηριστικά, είναι φανερό ότι οι πιθανοί τρόποι έκθεσης στο Imidacloprid είναι ποικίλοι και αφορούν το σύνολο των καταναλωτών, και όχι μόνο τους καλλιεργητές.

1.8. Metalaxyl

1.8.1. Γενικά

Το Metalaxyl N- (2,6-dimethylphenyl)-N- (methoxyacetyl)-alaninate είναι ένα συστηματικό βενζενοϊδές μυκητοκτόνο (CAS number: 57837-19-1). Η χημική του δομή απεικονίζεται στην **εικόνα 1.8.1**



Εικόνα 1.8.1. Χημική δομή του Metalaxyl (<http://en.wikipedia.org/wiki/Metalaxyl>)

Κατασκευάστηκε από την Ciba-Geigy Corporation το 1979 και αποτελεί ενεργό συστατικό εμπορικών σκευασμάτων όπως είναι το Ridomil, το Apron, το Delta-Coat AD, το Subdue. Ο Οργανισμός Περιβαλλοντικής Προστασίας

των ΗΠΑ (Environmental Protection Agency, EPA) έχει καταγράψει 81 προϊόντα που περιέχουν το Metalaxyl ως ενεργό συστατικό.

Χρησιμοποιείται ευρέως σε περισσότερες από 100 γεωργικές καλλιέργειες για τον έλεγχο ασθενειών που οφείλονται σε ωομύκητες όπως στον καπνό, στην πατάτα, στο λυκίσκο, στο αμπέλι, στις φράουλες, σε καλλωπιστικά φυτά και στο γρασίδι. Εφαρμόζεται στα φύλλα, στο έδαφος ή στους σπόρους του φυτού (EPA, 1994).

Ορισμένα βασικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του Metalaxyl είναι τα εξής: Σχηματίζει άχρωμους άοσμους κρυστάλλους.

Το μοριακό του βάρος είναι: 279.34 g/mol.

Το σημείο τήξης του είναι : 71.8-72.3 °C.

Η διαλυτότητά του στο νερό είναι: 7.1 g/L στους 20° C (EXTOXNET, 1996).

1.8.2. Μεταβολισμός

Μελέτες του μεταβολισμού του Metalaxyl σε αρουραίους έδειξαν ότι μετά από στοματική πρόσληψη, απορροφάται και περνά πολύ εύκολα στην κυκλοφορία του αίματος, απ' όπου αποβάλλεται γρήγορα: το 96% της χορηγούμενης δόσης αποβάλλεται μέσα σε 48 ώρες. Η κύρια οδός απέκκρισης είναι τα ούρα για τους θηλυκούς αρουραίους και τα κόπρανα για τους αρσενικούς. Έξι μέρες μετά τη χορήγηση δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα του Metalaxyl στους ιστούς των ζώων (Hamboeck, 1977 & 1981).

Ο μεταβολισμός του Metalaxyl πραγματοποιείται με οξειδωτικές και υδρολυτικές διαδικασίες, όπως είναι η μεθυλ-εστερική υδρόλυση και η βενζυλ-μεθυλική οξειδωση. Στην **εικόνα 1.8.2** παριστάνονται αναλυτικά τα μεταβολικά μονοπάτια του Metalaxyl στους αρουραίους.

Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες που προκύπτουν είναι οι εξής:

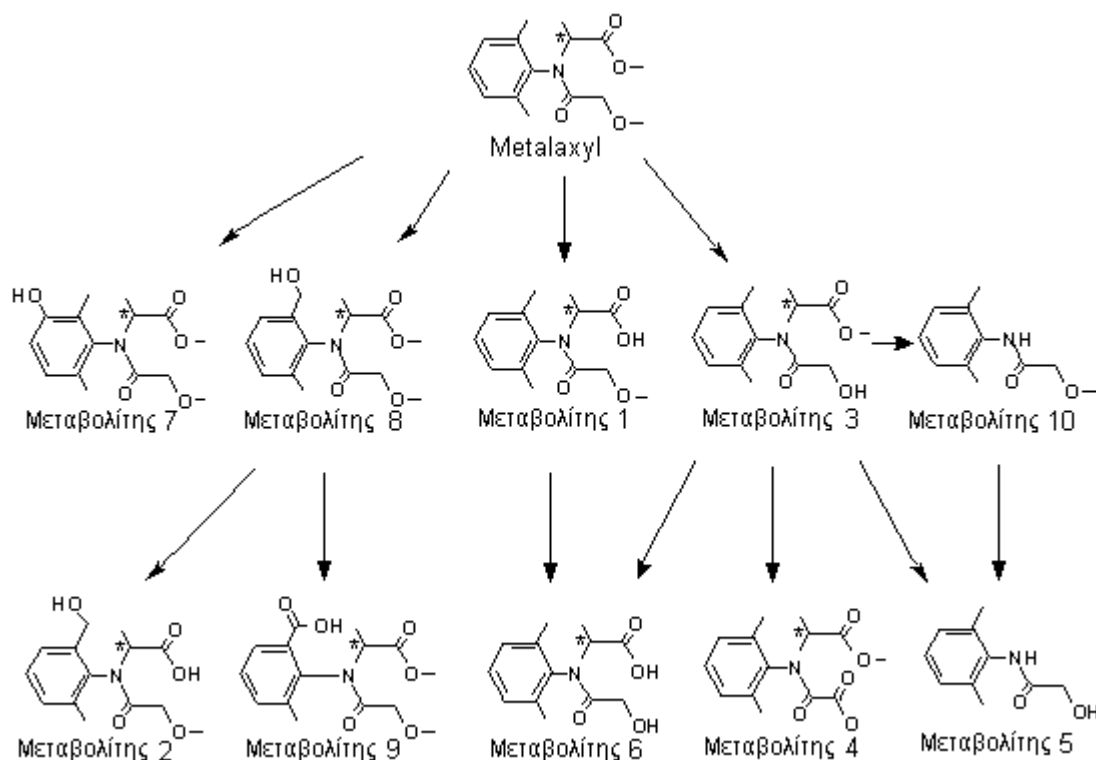
N-(2-hydroxymethyl-6-methylphenyl)-*N*-(methoxyacetyl)-alanine methyl ester (μεταβολίτης 8),

N-(2,6-dimethylphenyl)hydroxy-acetamide ή *N*-hydroxyacetyl-2,6-dimethylaniline (μεταβολίτης 5),

N-(2,6-dimethylphenyl)-*N*-(methoxyacetyl)alanine (μεταβολίτης 1) και

N-(2,6-dimethylphenyl)methoxyacetamide (μεταβολίτης 10).

Τελικά, οι μεταβολίτες αυτοί δημιουργούν σύμπλοκα με το γλυκουρονικό οξύ και αποβάλλονται μέσω των νεφρών (Hamboeck, 1978).



Εικόνα 1.8.2. Μεταβολισμός του Metalaxyl στους αρουραίους (INCHEM, 2002)

1.8.3. Τοξικότητα

Το Metalaxyl έχει κατηγοριοποιηθεί από τον Οργανισμό Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (Environmental Protection Agency, EPA) στην τάξη III όσον αφορά στην τοξική του δράση, δηλαδή ελαφρώς τοξικό, εξαιτίας κυρίως των ερεθισμών που προκαλεί στα μάτια (EPA, 1994).

Στους αρουραίους, η θανατηφόρος δόση-50% με στοματική πρόσληψη (oral Lethal Dose 50, LD₅₀) υπολογίστηκε στα 669 mg/kg σωματικού βάρους, ενώ η θανατηφόρος δόση-50% μέσω δερματικής πρόσληψης (dermal Lethal Dose 50, LD₅₀) υπολογίστηκε ότι είναι μεγαλύτερη από 3100 mg/kg σωματικού βάρους, τιμές που επιβεβαιώνουν την ελαφρά τοξικότητα του Metalaxyl (EXTOXNET, 1996).

Η δόση αναφοράς για χρόνια πρόσληψη (chronic dietary Reference Dose, RfD) έχει καθοριστεί στα 0.06 mg/kg/day (EXTOXNET, 1996).

1.8.3.1. Συμπτώματα τοξικότητας

Το Metalaxyl μπορεί να προκαλέσει βραδυκαρδία στους αρουραίους (Naidu & Radhakrishnamurty, 1988 & 1989) ή να επηρεάσει την ενεργότητα της μονο-αμινο οξειδάσης στην καρδιά των αρουραίων (Naidu, 1989).

Αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης στο αίμα και υπερτροφία του συκωτιού παρατηρήθηκαν σε σκύλους μετά από χρόνια πρόσληψη Metalaxyl (Beck et al., 1981).

Στους ανθρώπους η επικινδυνότητα του Metalaxyl αποδίδεται κυρίως στους ερεθισμούς που προκαλεί στα μάτια (EPA, 1994).

1.8.4. Καρκινογόνος δράση

Το Metalaxyl έχει κατηγοριοποιηθεί από τον Οργανισμό Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (Environmental Protection Agency, EPA) στο Group E, όσον αφορά στην καρκινογενετική του δράση, δηλαδή ως χημικό που δεν παρουσιάζει ενδείξεις καρκινογένεσης στους ανθρώπους (EPA, 1994). Ωστόσο, η κατηγοριοποίηση αυτή έχει γίνει σύμφωνα με τα διαθέσιμα στοιχεία και δεν αποκλείει την καρκινογόνο δράση του παράγοντα κάτω από ορισμένες συνθήκες.

Μελέτες των Hrelia et al. (1996) έχουν δείξει ότι προκαλεί επαγωγή χρωμοσωματικών θραύσεων *in vitro* στο γενετικό υλικό ανθρώπινων λεμφοκυττάρων σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις με την τεχνική της ανίχνευσης χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Παρόλο που η ίδια επιστημονική ομάδα δεν ανίχνευσε *in vivo* επαγωγή γενοτοξικότητας με τη δοκιμασία των μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα ποντικών, πιστεύει πως τα θετικά *in vitro* αποτελέσματα πιθανόν να υποδηλώνουν πως το Metalaxyl προκαλεί αλλοιώσεις στην ομοιόσταση των κυττάρων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς καρκινογένεσης.

Χρωμοσωματικές θραύσεις ανιχνεύθηκαν και σε κύτταρα ωοθηκών κινεζικών hamster (Chinese hamster ovary, CHO cells) μετά από *in vitro* χορήγηση 1200 µg/ml Metalaxyl, χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση (Murli & Ivett, 1986).

Επίσης, μελέτες των Perocco et al. (1995) έδειξαν ότι το Metalaxyl προκαλεί *in vitro* κυτταρική διαφοροποίηση σε BALB/c 3T3 κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να δρα ως ενεργοποιητής καρκινογενετικών μηχανισμών.

Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώνεται και από τις μελέτες των Hrelia et al. (1995) και των Paolini et al. (1996) που δείχνουν ότι το Metalaxyl παρουσιάζει συν-καρκινογόνο (cocarcinogenic) δράση, ικανή να επάγει σημαντικές γενετικές βλάβες.

Εξάλλου, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι το Metalaxyl ενισχύει την γενετοξικότητα που έχουν προκαλέσει πρωταρχικά άλλοι χημικοί παράγοντες σε έναν κυτταρικό πληθυσμό (Hrelia et al. 1996). Πολύ συχνά το Metalaxyl χορηγείται σε συνδυασμό με άλλα μυκητοκτόνα που έχουν αποδεδειγμένη γενετοξική δράση (Waters et al., 1982; Garrett et al., 1986).

1.8.5 Επιπτώσεις στο περιβάλλον

Το Metalaxyl παρουσιάζει μέτρια σταθερότητα στο έδαφος κάτω από φυσιολογικές συνθήκες περιβάλλοντος. Ο χρόνος ημιζωής του στο έδαφος κυμαίνεται από 7 έως 170 μέρες και η διάσπασή του μπορεί να επιταχυνθεί από αυξημένη ηλιοφάνεια. Στραγγίζει εύκολα και έχει μεγάλη διαλυτότητα στο νερό (Wauchope et al., 1992), που σημαίνει ότι μπορεί να μολύνει τον υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα.

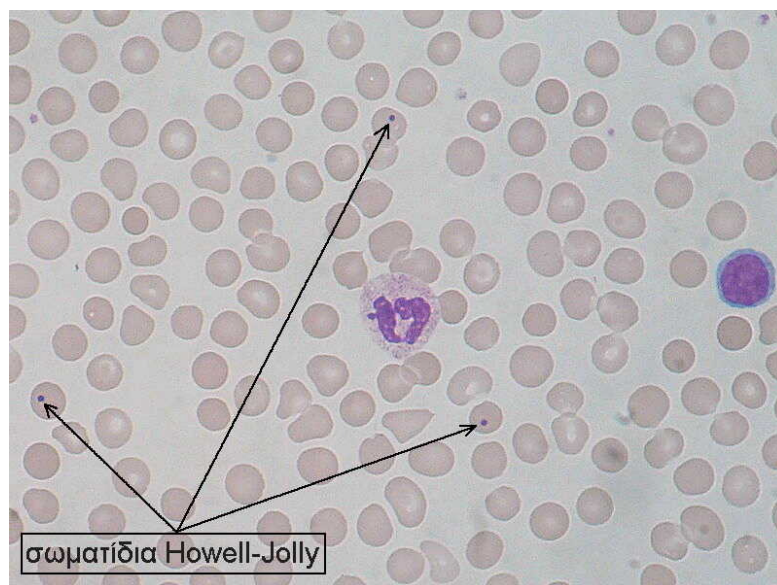
Στο νερό παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα, με χρόνο ημιζωής μεγαλύτερο από 400 ημέρες σε κανονικές συνθήκες (EPA, 1994).

Στα φυτά, το Metalaxyl απορροφάται από τα φύλλα και το βλαστό, αλλά όχι από το έδαφος. Υπολείμματα του Metalaxyl βρέθηκαν σε κονδύλους πατάτας και σε σταφύλια, ενώ υπολείμματα μεταβολιτών του βρέθηκαν σε φύλλα πατάτας και σε μαρούλια (FAO, 1983).

2. Μικροπυρήνες

2.1. Ιστορική αναδρομή

Οι μικροπυρήνες είναι μικρά πυρηνικά σωματίδια, διακριτά από τον κυρίως πυρήνα, που σχηματίζονται όταν ένα ολόκληρο χρωμόσωμα ή ένα τμήμα χρωμοσώματος του κυρίως πυρήνα δεν ενσωματώνεται σε κάποιον από τους θυγατρικούς πυρήνες που προκύπτουν κατά την κυτταρική διαίρεση. Στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα οι δομές αυτές είναι γνωστές ως σωματίδια Howell-Jolly (Howell-Jolly bodies) (**Εικόνα 2.1**). Σε υγιείς ανθρώπους και άλλα θηλαστικά που έχουν απύρηνα ώριμα ερυθροκύτταρα, οι μικροπυρήνες απομακρύνονται γρήγορα μέσω του σπλήνα κατά την ωρίμανση των ερυθροκυττάρων. Έτσι, άτομα με προβλήματα λειτουργίας του σπλήνα ή χωρίς σπλήνα, παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα μικροπυρήνων στα ερυθροκύτταρα του περιφερικού αίματος (Howell, 1890-91; Jolly, 1905).



Εικόνα 2.1. Παρασκεύασμα περιφερικού αίματος με χρώση May-Grünwald/Giemsa, όπου διακρίνονται ερυθροκύτταρα που περιέχουν σωματίδια Howell-Jolly. (http://en.wikipedia.org/wiki/Howell-Jolly_body)

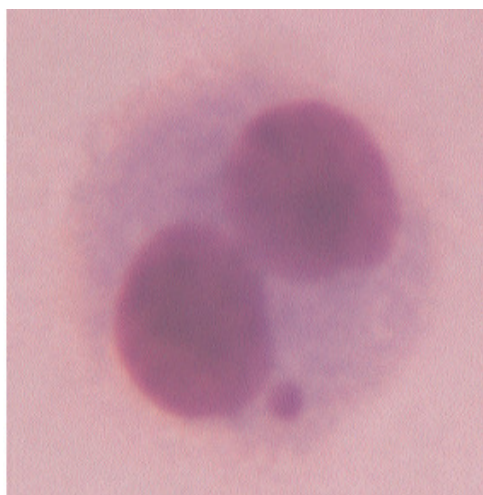
Η τεχνική των μικροπυρήνων αποτελεί ένα πολύ καλά μελετημένο σύστημα ελέγχου που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γενετικών βλαβών που προκαλούνται από την επίδραση γενοτοξικών παραγόντων. Εφαρμόζεται τόσο σε *in vivo*, όσο και σε *in vitro* συνθήκες.

Η πρώτη εφαρμογή αυτού του συστήματος ελέγχου έγινε από τους Evans et al. (1959) σε κύτταρα ακροριζίου της *Vicia faba*, τα οποία είχαν δεχτεί την επίδραση νετρονίων και γ-ακτινοβολίας, παρουσία και απουσία οξυγόνου. Αργότερα, στις αρχές της δεκαετίας του '70, πραγματοποιήθηκαν ανεξάρτητες ερευνητικές μελέτες από τους Schmid και Heddle σχετικά με την επαγωγή μικροπυρήνων *in vivo* σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα ποντικών. Οι μελέτες αυτές συνετέλεσαν στην εφαρμογή μιας αξιόπιστης, απλής και γρήγορης μεθόδου για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό χρωμοσωματικών βλαβών που προκαλούνται σε μικρά θηλαστικά μετά από έκθεση σε μεταλλαξιγόνους παράγοντες *in vivo* (Schmid, 1973; Heddle, 1973). Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε περαιτέρω από τους Mac Gregor et al. (1987) και αργότερα συνδυάστηκε με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής (flow cytometry) για την πιο αποτελεσματική καταμέτρηση των κυττάρων με μικροπυρήνα από τους Tometsko et al. (1993), Dertinger et al. (1996) και Torous et al. (2000).

2.2. Η τεχνική των μικροπυρήνων σε *in vitro* συνθήκες (*in vitro* Micronucleus Test, MNT)

Η πρώτη εφαρμογή της μεθόδου των μικροπυρήνων σε καλλιέργειες κυττάρων *in vitro* έγινε από τους Countryman και Heddle (1976) που χρησιμοποίησαν ανθρώπινα λεμφοκύτταρα τα οποία εξέθεσαν σε ακτίνες-Χ και σε μιτομυκίνη-С και διαπίστωσαν μια γραμμική σχέση μεταξύ της δόσης ακτινοβολίας ή της συγκέντρωσης της μιτομυκίνης-С και του αριθμού των επαγόμενων μικροπυρήνων. Ένα σημαντικό πρόβλημα σε αυτό το κυτταρικό σύστημα ήταν η καταστροφή του κυτταροπλάσματος λόγω της επεξεργασίας των λεμφοκυττάρων με υποτονικό διάλυμα, με αποτέλεσμα να εκτοπίζονται οι μικροπυρήνες από τα κύτταρα που προέρχονται. Η λύση δόθηκε με τη χρήση κατάλληλων υποτονικών διαλυμάτων που διατηρούσαν άθικτο το κυτταρόπλασμα (Högstedt, 1984). Ένα δεύτερο και σημαντικότερο πρόβλημα ήταν η διαφορετική απόκριση των λεμφοκυττάρων στο μιτογόνο παράγοντα. Αποτέλεσμα της διαφορετικής απόκρισης ήταν η παρουσία στην καλλιέργεια κυττάρων που δεν είχαν υποστεί κυτταρική διαίρεση και

επομένως δεν υπήρχε η δυνατότητα σχηματισμού μικροπυρήνων. Η καταμέτρησή των διαιρεμένων και μη κυττάρων είχε ως αποτέλεσμα την αλλοίωση της πραγματικής συχνότητας των επαγόμενων μικροπυρήνων. Την τελική λύση στο πρόβλημα αυτό έδωσαν οι Fenech και Morley (1985a) που πρότειναν δυο διαφορετικές μεθόδους: η πρώτη μέθοδος αφορά τη χρήση της τεχνικής της αυτοραδιογραφίας, ενώ η δεύτερη την αναστολή της κυτταροκίνησης (Cytokinesis-Block method) με τη χρήση της κυτταροχαλασίνης-B. Με την αυτοραδιογραφική μέθοδο γίνεται επίδραση με τριτιωμένη θυμιδίνη 48 ώρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας και στη συνέχεια ανιχνεύονται οι μικροπυρήνες με αυτοραδιογραφία στο χρονικό διάστημα μεταξύ 72 και 84 ωρών, σε κύτταρα που έχουν υποστεί μια μίτωση και εκπροσωπούν ένα συγχρονισμένο, στη φάση S, υποπληθυσμό λεμφοκυττάρων. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι η τριτιωμένη θυμιδίνη ενέχεται στην επαγωγή μικροπυρήνων. Παρόλα αυτά αποτελεί χρήσιμη μέθοδο για την ποσοτική ανίχνευση και καταμέτρηση μικροπυρήνων οι οποίοι επάγονται από την ακτινοβόληση λεμφοκυττάρων *in vitro*. Η μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης με τη χρήση της κυτταροχαλασίνης-B έχει καθιερωθεί και χρησιμοποιείται ευρύτατα μέχρι σήμερα. Η εφαρμογή της καθιστά εξαιρετικά εύκολη την αναγνώριση των κυττάρων που έχουν συμπληρώσει έναν κύκλο διαίρεσης και εμφανίζονται ως διπύρηνα κύτταρα με αποτέλεσμα την απλή και αξιόπιστη ανίχνευση και καταμέτρηση των μικροπυρήνων σε αυτά (**Εικόνα 2.2**).



Εικόνα 2.2. Διπύρηνο κύτταρο με μικροπυρήνα μετά από χρώση Giemsa (Γ. Ντέμσια).

Εξαιτίας της παγκόσμιας απήχησης που είχε η εφαρμογή αυτής της μεθόδου για την εκτίμηση της δράσης περιβαλλοντικών παραγόντων στο ανθρώπινο γενετικό υλικό, δημιουργήθηκε το 1997 από διακεκριμένους ερευνητές (Fenech, Bonassi, Holland κ.α.) ένα διεθνές πρόγραμμα μελέτης των παρατηρούμενων συχνοτήτων μικροπυρήνων σε ανθρώπινους πληθυσμούς (Human Micronucleus Project, HUMN). Στο πρόγραμμα αυτό συμμετέχουν σήμερα πάνω από 40 εργαστήρια σε όλο τον κόσμο που συλλέγουν στοιχεία σχετικά με τους μελετώμενους πληθυσμούς, τα χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα και τα πειραματικά αποτελέσματα, με σκοπό τη συγκρότηση μιας ενιαίας βάσης δεδομένων. Οι στόχοι αυτού του προγράμματος είναι: α) ο καθορισμός ενός διεθνώς αποδεκτού πρωτοκόλλου που θα επιτρέπει τη σύγκριση αποτελεσμάτων ανάμεσα σε διαφορετικά εργαστήρια, διαφορετικών χωρών, β) η εκτίμηση της διακύμανσης της συχνότητας των μικροπυρήνων που μπορεί να οφείλεται στους διαφορετικούς δημογραφικούς (ηλικία, φύλο, κάπνισμα) ή γενετικούς παράγοντες, γ) η εκτίμηση της επίδρασης των διαφορετικών εργαστηριακών μεθοδολογιών στη συχνότητα των μικροπυρήνων και δ) η συσχέτιση της συχνότητας των μικροπυρήνων με την προδιάθεση για εμφάνιση καρκίνου, γήρανσης, επιλεγμένων γενετικών συνδρόμων και άλλων ασθενειών (HUMN, 2010; Fenech et al., 2011a).

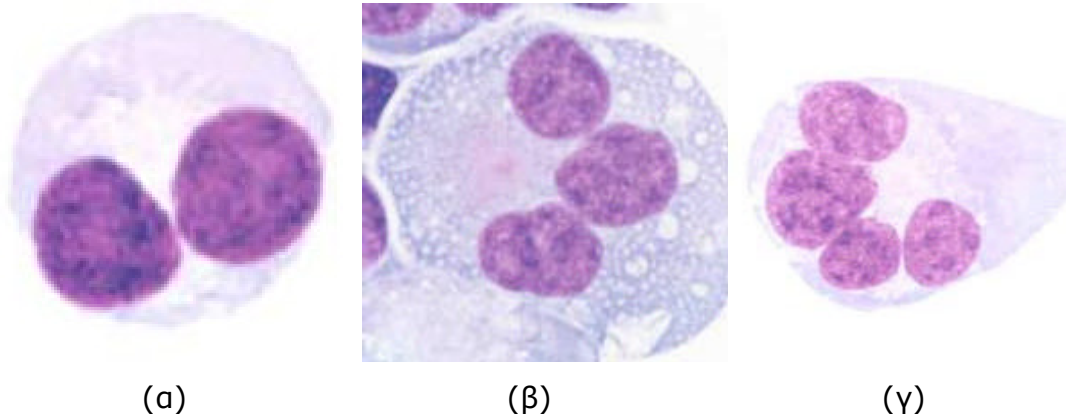
Η τεχνική των μικροπυρήνων σε *in vitro* συνθήκες (*in vitro* Micronucleus Test, MNT) έγινε πρόσφατα αποδεκτή από τον Οργανισμό για την Οικονομική Συνεργασία και Ανάπτυξη (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD), ο οποίος συνέταξε την οδηγία 487 (OECD, 2010). Οι οδηγίες του OECD για τον έλεγχο χημικών ουσιών (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals) είναι μια συλλογή από 100 περίπου διεθνώς αναγνωρισμένες τεχνικές ελέγχου που χρησιμοποιούνται από κυβερνήσεις, από τη βιομηχανία και από ανεξάρτητα εργαστήρια για να προσδιορίσουν πιθανούς κινδύνους από νεοσυντιθέμενες ή υπάρχουσες χημικές ουσίες, χημικά παρασκευάσματα ή χημικά μίγματα. Η οδηγία 487 για την *in vitro* τεχνική MNT μαζί με την οδηγία 474 για την τεχνική των μικροπυρήνων σε *in vivo* συνθήκες (*in vivo* Micronucleus Test, MNT) (OECD, 1997) επιστημονοποιούν την εγκυρότητα και την αποτελεσματικότητα της τεχνικής των μικροπυρήνων για τον προσδιορισμό γενοτοξικών επιδράσεων, τόσο στο

πεδίο της έρευνας, όσο και στα πεδία των διεθνών κανονισμών και νομοθετικών ρυθμίσεων (Elhajouji et al., 2011). Η τελική αποδοχή από τον OECD προέκυψε μετά την υποβολή ενός διεθνώς εναρμονισμένου πρωτοκόλλου που στηρίχτηκε σε διεθνείς μελέτες συντονισμένες από τη Γαλλική Ένωση Γενετικής Τοξικολογίας (Société Française de Toxicologie Génétique SFTG) (Lorge et al., 2006; Clare et al., 2006; Aardema et al., 2006; Wakata et al., 2006; Oliver et al., 2006) καθώς και στις αναφορές από 2 διεθνή συνέδρια με θέμα τις Διαδικασίες Ελέγχου Γενοτοξικότητας (International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, IWGTP) (Kirsch-Volders et al., 2000 & 2003).

Επιπλέον, τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα εκτιμήθηκαν σε μια μελέτη με σκοπό την επικύρωση της *in vitro* τεχνικής MNT, που διενεργήθηκε από το Ευρωπαϊκό Κέντρο για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM) της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ECVAM, 2006). Βασισμένη στη μελέτη αυτή, η Επιστημονική Συμβουλευτική Επιτροπή του ECVAM (ECVAM Scientific Advisory Committee, ESAC) επικύρωσε την επιστημονική εγκυρότητα της *in vitro* τεχνικής MNT και την πρότεινε ως εναλλακτική μέθοδο για τον έλεγχο γενοτοξικότητας έναντι της *in vitro* μεθόδου των χρωμοσωματικών ανωμαλιών (*in vitro* Chromosome Aberration Test, CAT) (ESAC, 2006; Corvi et al., 2008).

2.2.1. Μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης με κυτταροχαλασίνη-B (Cytokinesis Block MicroNucleus, CBMN method)

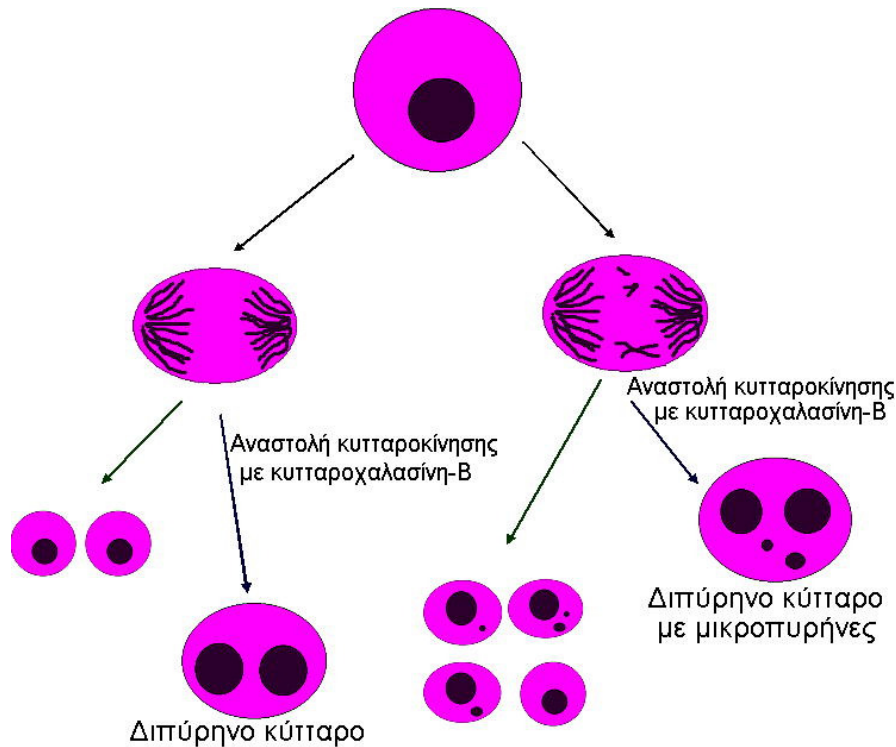
Η μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης βασίζεται στη χρήση της κυτταροχαλασίνης-B (Cytochalasin-B, Cyt-B), η οποία αναστέλλει την κυτταροπλασματική διαίρεση, ενώ επιτρέπει την πυρηνική διαίρεση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διπύρηνων ή πολυπύρηνων κυττάρων ανάλογα με το χρόνο παραμονής της ουσίας στην καλλιέργεια (Fenech & Morley, 1985a; Fenech, 1993 & 2000). **(Εικόνα 2.2.1.1)**



Εικόνα 2.2.1.1. (α) Διπύρρηνο, (β) Τριπύρρηνο και (γ) Τετραπύρρηνο κύτταρο (με χρώση Giemsa) (HUMN, 2010).

Η κυτταροχλασίνη-B δρα σαν ανασταλτικός παράγοντας του πολυμερισμού των ινιδίων της ακτίνης που απαιτούνται για το σχηματισμό του συσταλτού δακτυλίου κατά τη διαίρεση ενός κυττάρου. Ο συσταλτός δακτύλιος συγκροτείται αυθόρμητα με κάποιον άγνωστο μηχανισμό αμέσως κάτω από την πλασματική μεμβράνη στην αρχή της ανάφασης και περισφίγγεται μέχρι το κυτταρόπλασμα να χωριστεί και τελικά να προκύψουν τα δυο νέα κύτταρα (Carter, 1967). Η χρήση της κυτταροχλασίνης-B επιτρέπει τη συσσώρευση σχεδόν όλων των κυττάρων στη διπύρρηνη κατάσταση, ανεξάρτητα από το βαθμό συγχρονισμού τους και το ποσοστό των κυττάρων που διαιρούνται. Έτσι, οι μικροπυρήνες καταμετρούνται αποκλειστικά σε κύτταρα που έχουν ολοκληρώσει τον πρώτο κύκλο διαίρεσης και μπορούν να αναγνωριστούν από τη διπύρρηνη εμφάνισή τους (Fenech, 2000). (**Εικόνα 2.2.1.2**)

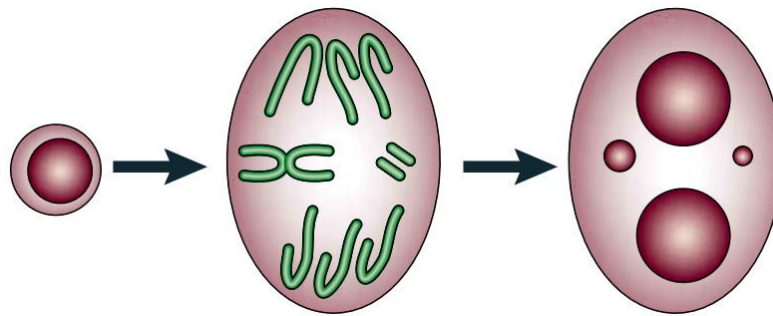
Αρχικά η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων (Fenech & Morley, 1985a & 1985b). Αργότερα όμως εφαρμόστηκε και σε μη-καλλιιεργημένα λεμφοκύτταρα (Surallès et al., 1996) καθώς και σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από το στοματικό και το ρινικό βλεννογόνο ή το βλεννογόνο της ουροδόχου κύστης (Moore et al., 1993; Surallès et al., 1997; Fontana et al., 2001). Από το 2007 μάλιστα, η επιστημονική ομάδα του προγράμματος HUMN ξεκίνησε ένα νέο αντίστοιχο πρόγραμμα, το HUMNxL, που εστιάζει στην εφαρμογή της τεχνικής των μικροπυρήνων σε στοματικά επιθηλιακά κύτταρα επειδή πρόκειται για έναν ιστό που είναι εύκολα προσβάσιμος και δεν απαιτεί κυτταρική καλλιέργεια (Fenech et al., 2011a).



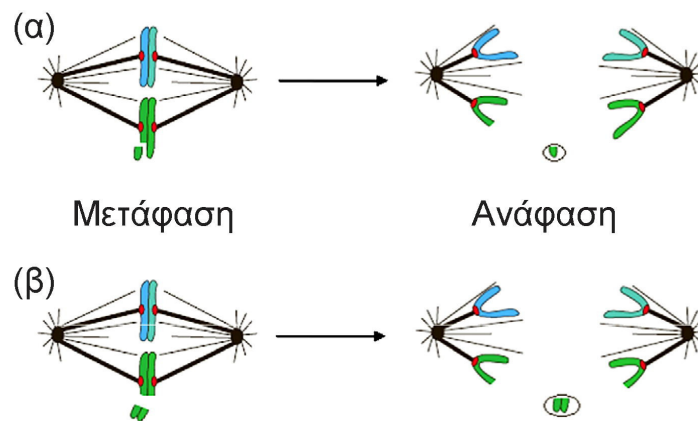
Εικόνα 2.2.1.2. Σχηματισμός διπύρηνων κυττάρων και διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνες μετά από αναστολή της κυτταροκίνησης με τη χρήση κυτταροχάλασίνης-B (Γ. Ντέμσια).

2.2.2. Μηχανισμοί δημιουργίας μικροπυρήνων

Τα δύο βασικά φαινόμενα που οδηγούν στο σχηματισμό των μικροπυρήνων είναι η θραύση των χρωμοσωμάτων και η απώλεια ολόκληρων χρωμοσωμάτων λόγω δυσλειτουργίας της μιτωτικής συσκευής (Norppa & Falck, 2003). Τα άκεντρα χρωμοσωματικά ή χρωματιδικά θραύσματα ή τα ολόκληρα χρωμοσώματα αδυνατούν να συνδεθούν με τα ινίδια της ατράκτου κατά την ανάφαση και μένουν έξω από τους θυγατρικούς πυρήνες κατά την τελόφαση, οπότε περιβάλλονται από πυρηνική μεμβράνη και σχηματίζουν μικροπυρήνες οι οποίοι, με εξαίρεση το μικρότερο μέγεθός τους, εμφανίζονται μορφολογικά όμοιοι με τους κυρίως πυρήνες μετά από κατάλληλη πυρηνική χρώση (Fenech et al., 2011b). (**Εικόνες 2.2.2.1 & 2.2.2.2**)



Εικόνα 2.2.2.1. Σχηματισμός μικροπυρήνων σε διαιρούμενο κύτταρο με τη μέθοδο CBMN. Οι μικροπυρήνες προέρχονται από ολόκληρα χρωμοσώματα ή από χρωμοσωματικά θραύσματα (Αναπροσαρμογή από Fenech, 2007).

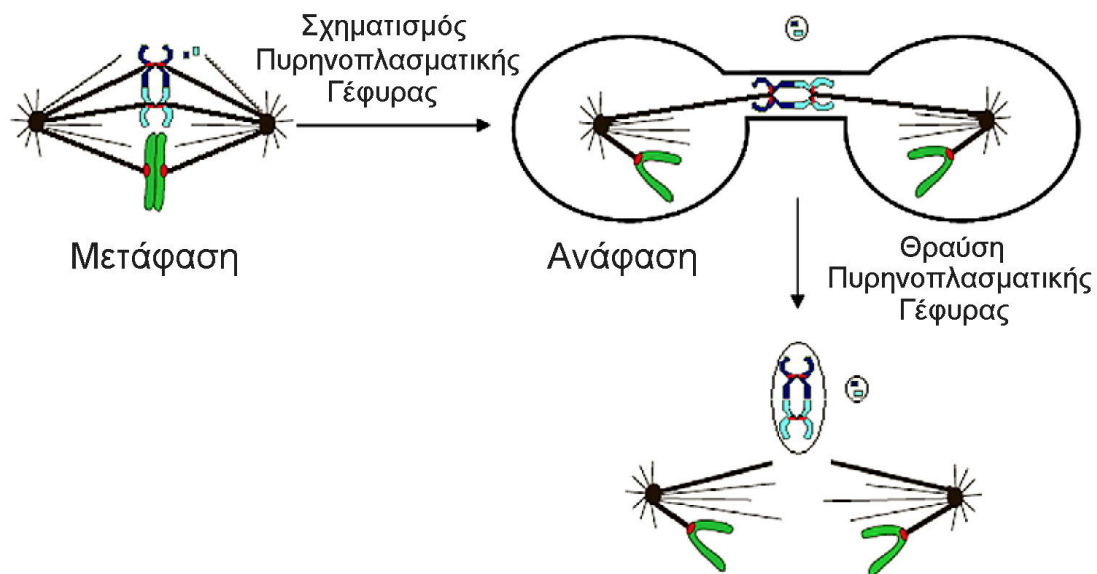


Εικόνα 2.2.2.2. Μηχανισμός δημιουργίας μικροπυρήνων μετά από χρωματιδική (α) ή χρωμοσωματική (β) θραύση (Αναπροσαρμογή από Mateuca et al., 2006).

Τα χρωμοσωματικά ή χρωματιδικά θραύσματα προέρχονται από ρήγματα στους δυο κλώνους του DNA (double-strand DNA breaks) που είτε δεν επιδιορθώνονται σωστά, οδηγώντας έτσι σε συμμετρικές και ασύμμετρες χρωμοσωματικές ή χρωματιδικές ανταλλαγές, είτε δεν επιδιορθώνονται καθόλου. Δίκλωνα ρήγματα στο DNA προκαλούνται και από ταυτόχρονη επιδιόρθωση με εκτομή (excision repair) κατεστραμμένων (π.χ. 8-οξο-δεοξυγουανοσίνη) ή λανθασμένων (π.χ. ουρακίλη) βάσεων που βρίσκονται σε απέναντι γειτονικές θέσεις στις δυο κλώνους του DNA (Fenech et al., 2011b). Ένας από τους κύριους παράγοντες πρόκλησης δίκλωνων ρηγμάτων στο DNA αποτελεί η ιονίζουσα ακτινοβολία, είτε άμεσα εξαιτίας ενός ή περισσότερων γεγονότων ιονισμού, είτε έμμεσα ως συνέπεια διαδικασιών επιδιόρθωσης στις αλυσίδες του DNA (Pfeiffer et al., 2000).

Μικροπυρήνες μπορεί να δημιουργηθούν και μετά από θραύση πυρηνοπλασματικών γεφυρών (nucleoplasmic bridges, NPBs) που σχηματίζονται κατά την ανάφαση. Η λανθασμένη επιδιόρθωση δυο χρωμοσωματικών ρηγμάτων είναι δυνατόν να οδηγήσει σε ασύμμετρη χρωμοσωματική αναδιάταξη, με συνέπεια τη δημιουργία ενός δίκεντρου χρωμοσώματος και ενός άκεντρου χρωμοσωματικού θραύσματος. Συχνά, τα κεντρομέρη δίκεντρων χρωμοσωμάτων ωθούνται προς τους δυο αντίθετους πόλους του κυττάρου κατά την ανάφαση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας πυρηνοπλασματικής γέφυρας ανάμεσα στους θυγατρικούς πυρήνες και ενός άκεντρου χρωμοσωματικού θραύσματος που καθυστερεί και σχηματίζει μετέπειτα ένα μικροπυρήνα (Thomas et al., 2003; Mateuca et al., 2006).

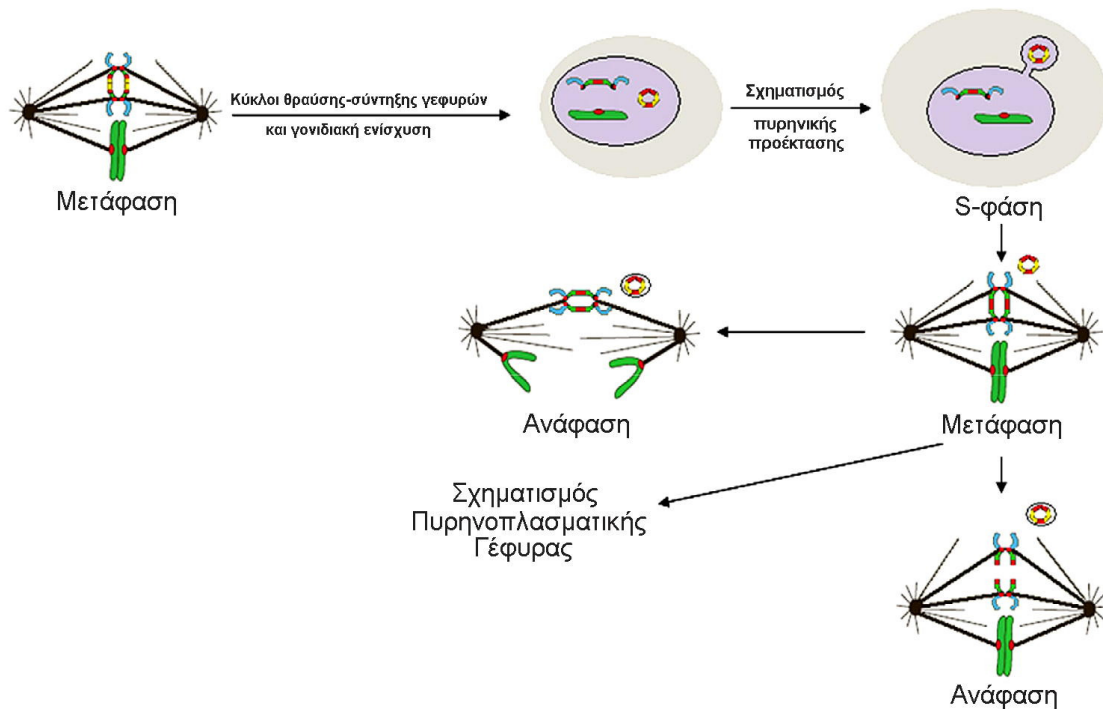
(Εικόνα 2.2.2.3)



Εικόνα 2.2.2.3. Μηχανισμός δημιουργίας μικροπυρήνων μετά από θραύση πυρηνοπλασματικής γέφυρας (Αναπροσαρμογή από Mateuca et al., 2006).

Άλλος ένας μηχανισμός δημιουργίας μικροπυρήνων είναι με γονιδιακή ενίσχυση μέσω κύκλων θραύσης-σύντηξης γεφυρών (breakage-fusion-bridge cycles, BFB cycles) όταν τμήματα ενισχυμένου DNA εντοπίζονται επιλεκτικά σε συγκεκριμένες θέσεις στην περιφέρεια του πυρήνα και απομακρύνονται από αυτόν μέσω πυρηνικής προέκτασης (nuclear budding,

NBUD) κατά τη διάρκεια της S φάσης του κυτταρικού κύκλου (Mateuca et al., 2006). (**Εικόνα 2.2.2.4**).

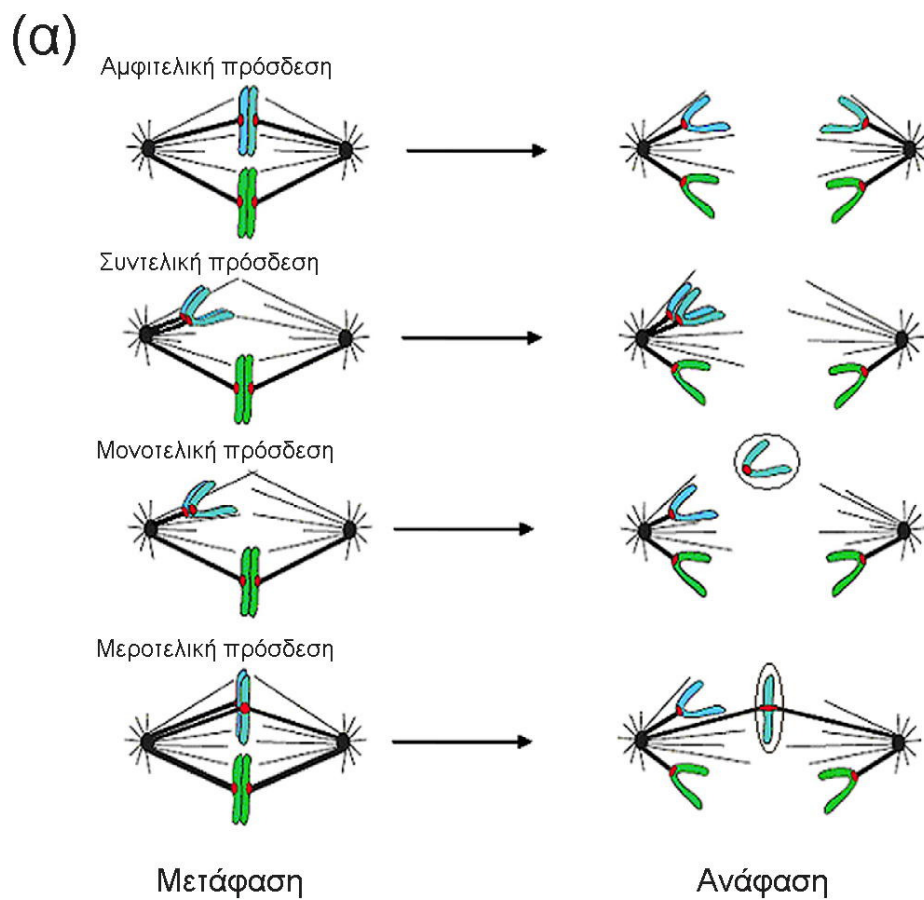


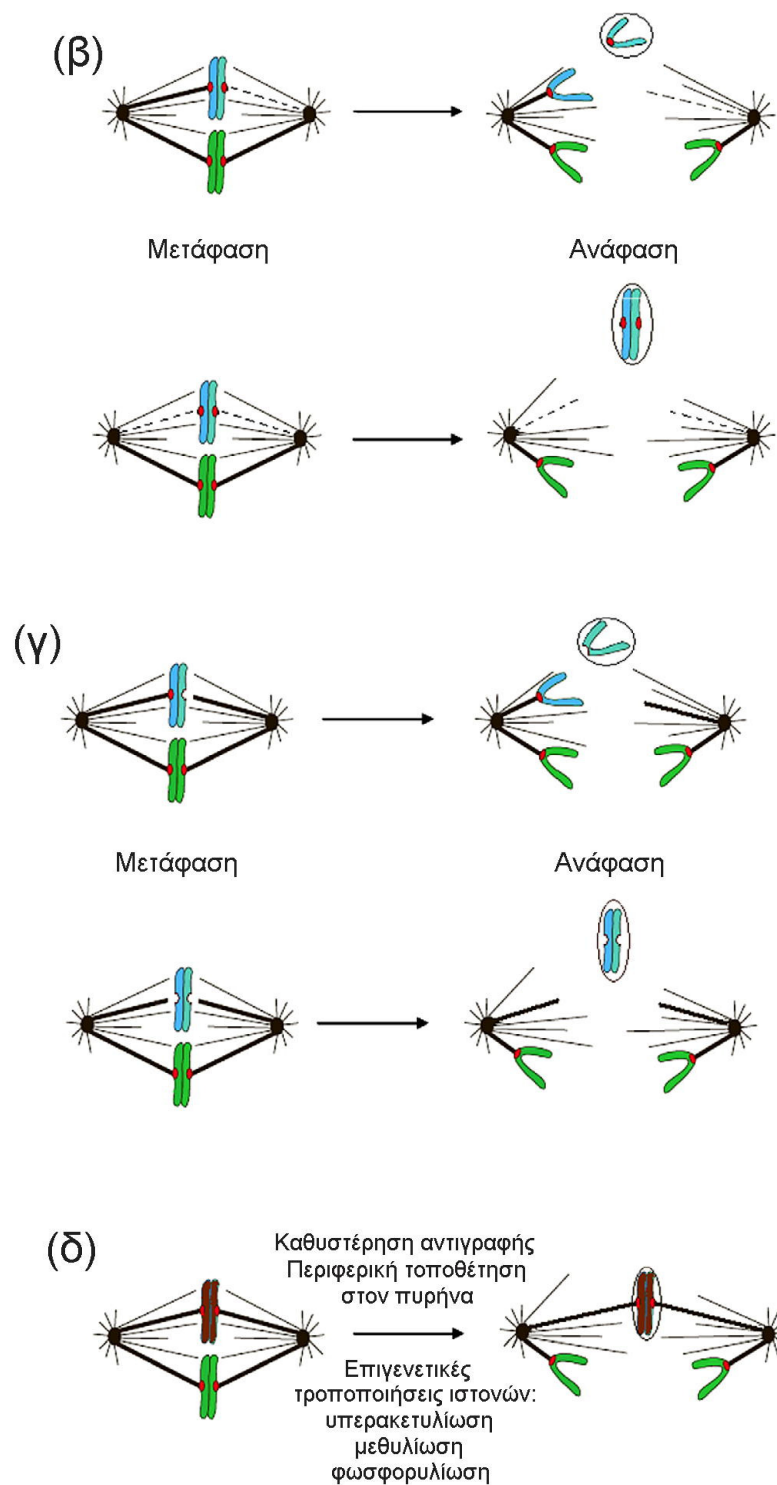
Εικόνα 2.2.2.4. Μηχανισμός δημιουργίας μικροπυρήνων με γονιδιακή ενίσχυση μέσω κύκλων θραύσης-σύντηξης γεφυρών (Αναπροσαρμογή από Mateuca et al., 2006).

Οι μικροπυρήνες που περιέχουν ολόκληρα χρωμοσώματα σχηματίζονται ως αποτέλεσμα βλαβών που σχετίζονται με το μηχανισμό του χρωμοσωματικού αποχωρισμού, όπως: α) ανωμαλίες σε γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, β) βλάβη στους κινητοχώρους, στη μιτωτική άτρακτο ή σε άλλες δομές της μιτωτικής συσκευής, γ) μηχανική καταστροφή και υπομεθυλίωση του κεντρομερικού DNA (Mateuca et al., 2006).

Στο τέλος της μετάφασης της μίτωσης οι ίνες τουμπουλίνης των μικροσωληνίσκων της ατράκτου προσδένονται στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων δημιουργώντας σταθερές προσδέσεις (αμφιτελικές) για τη μετακίνηση των χρωμοσωμάτων στους πόλους της ατράκτου. Είναι δυνατόν όμως, φαινόμενα όπως: α) λανθασμένες προσδέσεις (συντελικές, μονοτελικές ή μεροτελικές), β) αποπολυμερισμός των ινών τουμπουλίνης, γ) βλάβες στο κεντρομερικό DNA, στις πρωτεΐνες ή την περιοχή του

κινητοχώρου καθώς και δ) καθυστέρηση της αντιγραφής, περιφερική τοποθέτηση στον πυρήνα ή επιγενετικές τροποποιήσεις των ιστονών (υπερακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση) να οδηγούν σε απώλεια ολόκληρου χρωμοσώματος κατά την ανάφαση το οποίο περικλείεται τελικά σε μικροπυρήνα (Cimini & Degraffi, 2005; Mateuca et al., 2006). **(Εικόνα 2.2.2.5)**





Εικόνα 2.2.2.5. Μηχανισμοί δημιουργίας μικροπυρήνων εξαιτίας (α) λανθασμένων προσδέσεων (β) αποπολυμερισμού των ινών τουμπουλίνης (γ) βλαβών στο κεντρομερικό DNA, στις πρωτεΐνες ή την περιοχή του κινητοχώρου και (δ) καθυστέρησης της αντιγραφής, περιφερικής τοποθέτησης στον πυρήνα ή επιγενετικών τροποποιήσεων των ιστονών (Αναπροσαρμογή από Mateuca et al., 2006).

2.2.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της τεχνικής των μικροπυρήνων με αναστολή της κυτταροκίνησης (CBMN method)

Το βασικότερο πλεονέκτημα της τεχνικής των μικροπυρήνων με αναστολή της κυτταροκίνησης με τη χρήση κυτταροχαλασίνης-B είναι η αξιόπιστη αναγνώριση των κυττάρων που έχουν ολοκληρώσει μια μόνο πυρηνική διαίρεση. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, όταν σημειωθεί κάποια βλάβη στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου, αυτή μπορεί να εκφραστεί με τη μορφή μικροπυρήνων μόνο αν το κύτταρο συμπληρώσει μια τουλάχιστον πυρηνική διαίρεση μετά την επαγωγή της βλάβης. Αυτό σημαίνει ότι δεν σχηματίζονται μικροπυρήνες σε κύτταρα που δεν διαιρούνται και ότι τα επίπεδα των μικροπυρήνων σε ένα διαιρούμενο κυτταρικό πληθυσμό εξαρτώνται από το ποσοστό των διαιρούμενων κυττάρων. Επιπλέον, η συχνότητα των μικροπυρήνων μειώνεται καθώς τα κύτταρα προχωρούν σε περαιτέρω πυρηνικές διαιρέσεις μετά την επαγωγή της βλάβης. Για την αξιόπιστη καταμέτρηση των μικροπυρήνων λοιπόν, είναι αναγκαίο να διαχωριστούν τα κύτταρα που διαιρούνται από εκείνα που δεν διαιρούνται. Με την προσθήκη της κυτταροχαλασίνης-B στην κυτταρική καλλιέργεια πριν από την πρώτη μιτωτική διαίρεση, τα κύτταρα που έχουν ολοκληρώσει την πρώτη πυρηνική διαίρεση είναι εύκολα αναγνωρίσιμα από τη διπύρηνη εμφάνισή τους και η καταμέτρηση των μικροπυρήνων σε αυτά είναι απλή και αξιόπιστη (Fenech, 1997).

Η εφαρμογή της μεθόδου της κυτταροχαλασίνης-B στην τεχνική των μικροπυρήνων δίνει αξιόπιστα και άμεσα αποτελέσματα συγκριτικά και με τις κλασικές μεθόδους ανίχνευσης χρωμοσωματικών ανωμαλιών (chromosome aberrations, CA). Οι Ramalho et al. (1988) και οι Littlefield et al. (1989) απέδειξαν ότι με την εφαρμογή αυτής της μεθόδου στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα είναι δυνατόν να ανιχνευθούν το 60% έως το 90% του συνόλου των άκεντρων χρωμοσωματικών θραυσμάτων. Το βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής των μικροπυρήνων έναντι της τεχνικής των χρωμοσωματικών ανωμαλιών είναι ότι η καταμέτρηση των μικροπυρήνων είναι λιγότερο κοπιαστική και χρονοβόρα και δεν απαιτεί την εκπαίδευση και την εμπειρία που απαιτούνται για την ανάλυση των μεταφάσεων. Επιπλέον, η

τεχνική των μικροπυρήνων έχει μεγαλύτερη στατιστική ισχύ εφόσον αναλύονται πολύ περισσότερα κύτταρα (χιλιάδες) σε σύγκριση με την ανάλυση μεταφασικών κυττάρων (εκατό ή μερικές εκατοντάδες) (Mateuca et al., 2006).

Ένα άλλο πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής έγκειται στην αυξημένη ευαισθησία της. Η συχνότητα των μικροπυρήνων ανά κύτταρο σε διπύρηνα κύτταρα είναι διπλάσια από αυτή που θα παρατηρούσαμε στα θυγατρικά μονοπύρηνα κύτταρα, αν επιτρέπαμε στο διπύρηνο κύτταρο να ολοκληρώσει την κυτταροκίνηση. Απουσία της κυτταροχαλασίνης-B λοιπόν, θα έπρεπε να αναλυθεί διπλάσιος αριθμός μονοπύρηνων κυττάρων για να παρατηρηθεί το ίδιο επίπεδο μικροπυρήνων που εμφανίζεται στα διπύρηνα κύτταρα (Fenech, 1997).

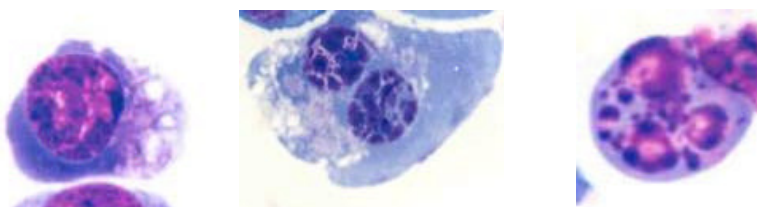
Επιπλέον, η εφαρμογή της αναστολής της κυτταροκίνησης στην τεχνική των μικροπυρήνων επιτρέπει παράλληλα με την ανίχνευση γεγονότων χρωμοσωματικής θραύσης και απώλειας, την εκτίμηση επιπρόσθετων παραμέτρων κυτταροτοξικότητας και γενοτοξικότητας (Fenech, 1997; Kirsch-Volders, 1997b; Kirsch-Volders et al., 1997; Fenech, 2007; Heddle et al., 2011):

- Ο συνδυασμός της τεχνικής αυτής με μοριακές κυτταρογενετικές τεχνικές μας επιτρέπει να διακρίνουμε αν η χρωμοσωματική βλάβη οφείλεται σε θραύση, σε απώλεια χρωμοσωμάτων ή σε μη-αποχωρισμό των χρωμοσωμάτων.
- Υπολογίζεται η συχνότητα των μονοπύρηνων, διπύρηνων και πολυπύρηνων κυττάρων για τον προσδιορισμό δυο δεικτών που αποτελούν μέτρο του ρυθμού της κυτταρικής διαίρεσης: του Δείκτη Πυρηνικής Διαίρεσης (Nuclear Division Index, NDI) και του Δείκτη Πολλαπλασιασμού των Κυττάρων (Cytokinesis Block Proliferation Index, CBPI).
- Τα κύτταρα εξετάζονται ως προς τη ζωτικότητά τους με την καταμέτρηση αποπτωτικών και νεκρωτικών μορφών. Αποπτωτικά είναι τα κύτταρα που οδηγούνται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Εμφανίζουν συμπυκνωμένη χρωματίνη στον πυρήνα και άθικτα κυτταροπλασματικά και πυρηνικά όρια ή πυρήνα διασπασμένο σε πολλά

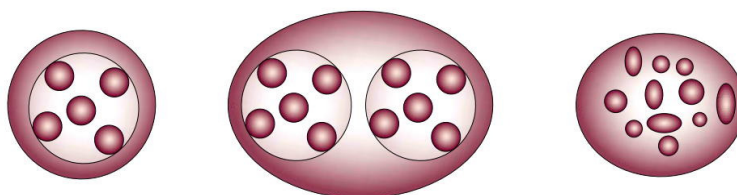
κομμάτια μέσα στο άθικτο κυτταρόπλασμα τους (**Εικόνα 2.2.3.1**). Η νέκρωση είναι μια εναλλακτική μορφή κυτταρικού θανάτου που οφείλεται σε καταστροφή κυτταρικών μεμβρανών, οργανιδίων ή μεταβολικών μονοπατιών απαραίτητων για την επιβίωση των κυττάρων. Τα νεκρωτικά κύτταρα είναι κύτταρα με αχνό κυτταρόπλασμα, πολυάριθμα κυτταροπλασματικά και πυρηνοπλασματικά κενοτόπια, κατεστραμμένη κυτταροπλασματική μεμβράνη, αλλά καλά διατηρημένο πυρήνα ή κύτταρα χωρίς κυτταρόπλασμα με κατεστραμμένη ή ανώμαλη πυρηνική μεμβράνη που αφήνει συχνά πυρηνικό υλικό να ξεφύγει από τα όρια του πυρήνα (**Εικόνα 2.2.3.2**) (Fenech et al., 2003; Fenech, 2007).

- Επιτρέπει την παρατήρηση πυρηνοπλασματικών γεφυρών (nucleoplasmic bridges, NBPs) ανάμεσα στους θυγατρικούς πυρήνες των διπύρηνων κυττάρων, οι οποίες αποτελούν δείγμα ασύμμετρης χρωμοσωματικής αναδιάταξης που δεν θα μπορούσε να ανιχνευτεί μόνο με την καταμέτρηση των μικροπυρήνων. Οι πυρηνοπλασματικές γέφυρες σχηματίζονται κατά την ανάφαση όταν τα κεντρομέρη δίκεντρων χρωμοσωμάτων ωθούνται προς τους δυο αντίθετους πόλους του κυττάρου. Σε περίπτωση που διατηρηθεί η γέφυρα της ανάφασης, περιβάλλεται από πυρηνική μεμβράνη μαζί με τους θυγατρικούς πυρήνες και σχηματίζεται έτσι μια πυρηνοπλασματική γέφυρα. Τα δίκεντρα χρωμοσώματα προέρχονται από λανθασμένη επιδιόρθωση χρωμοσωματικών θραυσμάτων ή από σύντηξη τελομερικών περιοχών. Η τελευταία οφείλεται σε μείωση του μήκους ή και αποκοπή των τελομερών, ή σε βλάβη κάποιας βάσης στην τελομερική αλληλουχία (Thomas et al., 2003; Fenech, 2007; Fenech et al., 2011b).
- Επιτρέπει τέλος, την παρατήρηση πυρηνικών προεκτάσεων (nuclear buds, NBUDs), που αποτελούν δείγμα γονιδιακής ενίσχυσης. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται σε καλλιέργειες που πραγματοποιούνται κάτω από αυστηρά επιλεκτικές συνθήκες ή κάτω από συνθήκες έλλειψης φολικού οξέος. Το ενισχυμένο DNA εντοπίζεται σε συγκεκριμένες θέσεις στην περιφέρεια του πυρήνα και απομακρύνεται από αυτόν μέσω πυρηνικής προέκτασης, η οποία εμφανίζει την ίδια

μορφολογία με ένα μικροπυρήνα, με τη διαφορά ότι είναι συνδεδεμένη με τον κυρίως πυρήνα μέσω μιας στενής ή φαρδιάς λωρίδας πυρηνοπλασματικού υλικού (Fenech, 2007; Fenech et al., 2011b).

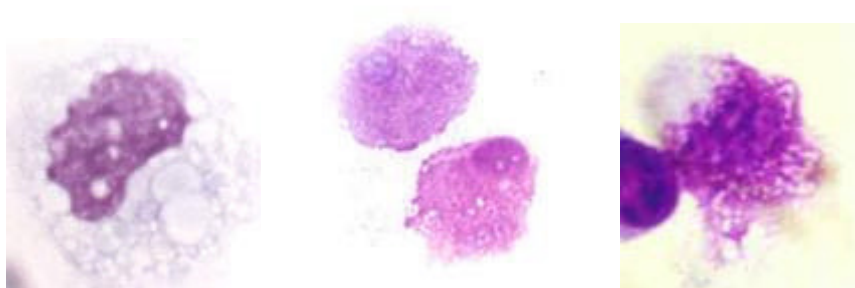


(α)

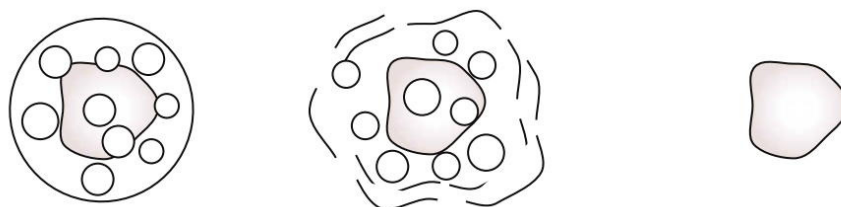


(β)

Εικόνα 2.2.3.1. (α) Μικροφωτογραφίες (HUMN, 2010) και (β) Σχηματική παράσταση αποπτωτικών κυττάρων (Αναπροσαρμογή από Fenech, 2007).



(α)



(β)

Εικόνα 2.2.3.2. (α) Μικροφωτογραφίες (HUMN, 2010) και (β) Σχηματική παράσταση νεκρωτικών κυττάρων (Αναπροσαρμογή από Fenech, 2007).

Συμπερασματικά, η μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης θεωρείται πλέον μια αποτελεσματική μέθοδος μελέτης γεγονότων χρωμοσωματικής βλάβης ή αστάθειας, μιτωτικών δυσλειτουργιών, κυτταρικού θανάτου και κυτταρικού πολλαπλασιασμού ταυτόχρονα. Για το λόγο αυτό αναφέρεται πλέον ως CBMN "cytome assay" (Fenech, 2007; Heddle et al., 2011).

Το κύριο μειονέκτημα της χρήσης της κυτταροχλασίνης-B στην τεχνική των μικροπυρήνων είναι ότι καθιστά αδύνατη τη μελέτη χημικών ενώσεων με ανάλογη δράση, οι οποίες αναστέλλουν την κυτταροκίνηση ή τον πολυμερισμό των μικροϊνιδίων. Επιπλέον, με δεδομένο ότι οι μικροπυρήνες μπορούν να εμφανιστούν μόνο σε υπό διαίρεση ευκαρυωτικά κύτταρα, η συγκεκριμένη τεχνική δεν ενδείκνυται για άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς όπου τα κύτταρα δεν βρίσκονται σε διαίρεση ή όπου η διαδικασία της διαίρεσης τους δεν έχει κατανοηθεί πλήρως ή δεν μπορεί να ελεγχθεί, όπως για παράδειγμα οι πρωτογενείς καλλιέργειες μυϊκού και νευρικού (εγκεφαλικού) ιστού (Fenech, 1997). Τέλος, η τεχνική των μικροπυρήνων δεν είναι δυνατόν να ανιχνεύσει όλες τις περιπτώσεις χρωμοσωματικής βλάβης, όπως για παράδειγμα ανωμαλίες που οφείλονται σε συμμετρικές μετατοπίσεις (reciprocal translocations) και δεν εκφράζονται ως μικροπυρήνες (Mateuca et al., 2006).

2.2.4. Ανίχνευση του περιεχομένου των μικροπυρήνων

Ένα από τα πλεονεκτήματα της τεχνικής των μικροπυρήνων, όπως προαναφέρθηκε, είναι η ικανότητά της να ξεχωρίζει παράγοντες που προκαλούν θραύσεις χρωμοσωμάτων και χαρακτηρίζονται ως θραυσματογόνοι (clastogens), και παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία της ατράκτου κατά τη διαίρεση ενός κυττάρου προκαλώντας έτσι χρωμοσωματική καθυστέρηση κατά την ανάφαση και απώλεια ολόκληρων χρωμοσωμάτων. Οι τελευταίοι χαρακτηρίζονται ως ανευπλοειδογόνοι (aneugens). Αυτό επιτυγχάνεται με τον συνδυασμό της τεχνικής των μικροπυρήνων με μοριακές κυτταρογενετικές τεχνικές όπως:

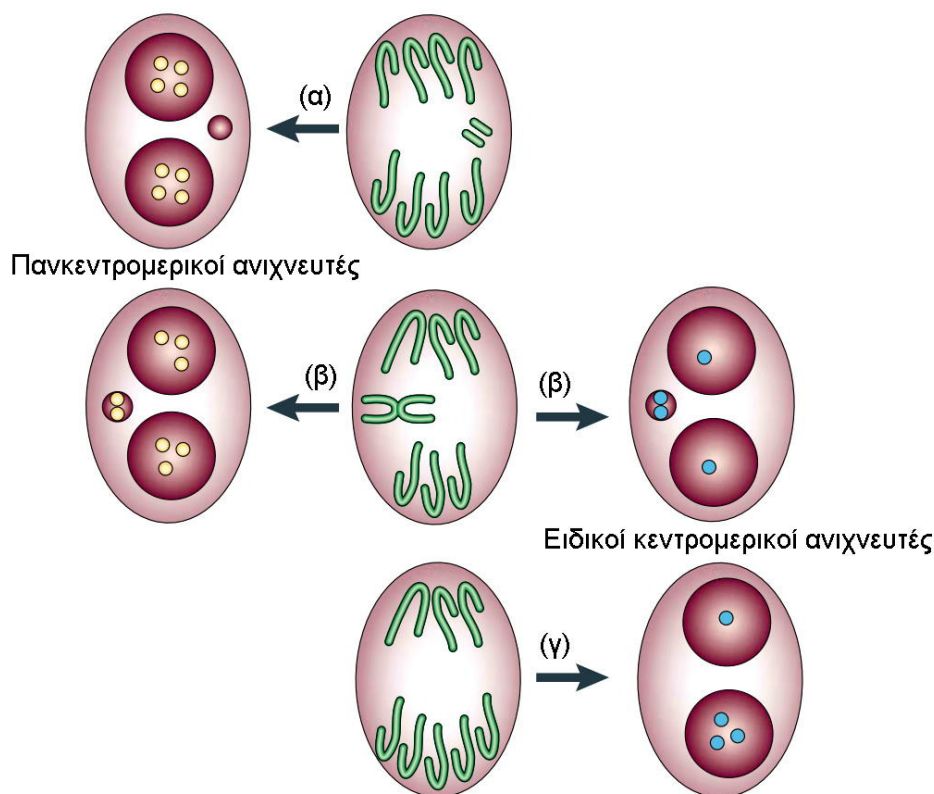
α) η ανοσοχημική μέθοδος CREST που χρησιμοποιεί αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών του κινητοχώρου (Thomson & Perry, 1988; Hennig et al., 1988; Eastmond & Tucker, 1989; Lynch & Parry, 1993; Stephanou et al., 1997). Τα αντισώματα αυτά ανακαλύφθηκαν στον ορό του αίματος μιας ομάδας ασθενών που έπασχαν από σκληροδερμία, ένα αυτοάνοσο νόσημα που επηρεάζει πολλά οργανικά συστήματα και παρουσιάζει ένα συνδυασμό συγκεκριμένων συμπτωμάτων όπως ασβέσωση (Calcinosis), το φαινόμενο Raynaud's (Raynaud's phenomenon), δυσλειτουργία οισοφάγου (Esophageal dysmotility), σκληροδακτυλία (Sclerodactyly) και τηλαγγειεκτασία (Telangiectasia) (Moroi et al., 1980).

β) η τεχνική της *in situ* υβριδοποίησης με φθοριοχρώματα (Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH) που χρησιμοποιεί ανιχνευτές έναντι ειδικών αλληλουχιών κεντρομερικού DNA (Becker et al., 1990; Migliore et al., 1993; Vlastos & Stephanou, 1998; Andrianopoulos et al., 2000).

Είναι γνωστό ότι τα χρωμοσώματα συνδέουν τις αδελφές χρωματίδες τους μέσω μιας χαρακτηριστικά διαφοροποιημένης περιοχής, του κεντρομέρους, το οποίο εμπεριέχει τον κινητοχώρο, ένα εξειδικευμένο πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Με την εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων και τη «σήμανση» των δομών του κεντρομέρους και του κινητοχώρου είναι δυνατή η ακριβής διάκριση των μικροπυρήνων σε δυο τύπους: α) σε αυτούς που εμφανίζουν σήμα και β) σε αυτούς που δεν εμφανίζουν σήμα. Η παρουσία ή απουσία σήματος για την κεντρομερική περιοχή προσδιορίζει το περιεχόμενο του μικροπυρήνα. Όταν ένας μικροπυρήνας περιέχει ένα ολόκληρο χρωμόσωμα, χαρακτηρίζεται από την παρουσία σήματος για την κεντρομερική περιοχή, ενώ όταν περιέχει άκεντρα θραύσματα χαρακτηρίζεται από την απουσία σήματος για την κεντρομερική περιοχή (Albertini et al., 2000). **(Εικόνα 2.2.4)**

Έχει βρεθεί, για παράδειγμα, ότι η αυξημένη συχνότητα μικροπυρήνων που παρατηρείται με την αύξηση της ηλικίας, αντικατοπτρίζει μια αύξηση των μικροπυρήνων με παρουσία σήματος για την κεντρομερική περιοχή. Αυτό συμβαίνει επειδή οι μικροπυρήνες αυτοί περιέχουν ως επί το πλείστον τα φυλετικά χρωμοσώματα (X και Y) ολόκληρα, με το X χρωμόσωμα να κυριαρχεί κυρίως στους μικροπυρήνες των θηλυκών ατόμων. Επίσης, στους

μικροπυρήνες που σχηματίζονται αυθόρμητα σε φυσιολογικά άτομα, έχει βρεθεί ότι επικρατούν θραύσματα από το χρωμόσωμα 9, ενώ στους μικροπυρήνες που προέρχονται από *in vitro* επίδραση κάποιων θραυσματογόνων παραγόντων επικρατούν θραύσματα από τα χρωμοσώματα 1, 9 και 16, αντικατοπτρίζοντας μια αυξημένη ευαισθησία της περικεντρομερικής ετεροχρωματίνης στα χρωμοσώματα αυτά. Η ανίχνευση του περιεχομένου των μικροπυρήνων και η διάκρισή τους στους δυο παραπάνω τύπους με τη χρήση αυτών των μοριακών κυτταρογενετικών τεχνικών αυξάνει κατά πολύ την ευαισθησία της τεχνικής των μικροπυρήνων και έχει μεγάλη σημασία για την καταλληλότητά της σε μελέτες γενοτοξικότητας (Norppa & Falck, 2003).



Εικόνα 2.2.4. Χρήση μοριακών κυτταρογενετικών τεχνικών για την αναγνώριση α) μικροπυρήνων που προέρχονται από θραύση χρωμοσωμάτων β) μικροπυρήνων που προέρχονται από απώλεια ολόκληρων χρωμοσωμάτων και γ) ανευπλοειδικών πυρήνων που οφείλονται σε μη-αποχωρισμό χρωμοσωματικού υλικού (Αναπροσαρμογή από Fenech, 2007).

Η τεχνική FISH πλεονεκτεί έναντι της τεχνικής CREST γιατί παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού ανευπλοειδικών φαινομένων που οφείλονται σε

μη-αποχωρισμό του χρωμοσωματικού υλικού καθώς και τη δυνατότητα αναγνώρισης συγκεκριμένων χρωμοσωμάτων σε ένα μικροπυρήνα διπύρηνου κυττάρου, εφόσον χρησιμοποιούνται ανιχνευτές εξειδικευμένοι για τη σήμανση του κεντρομέρους κάθε ανθρώπινου χρωμοσώματος ξεχωριστά (Farooqi et al., 1993; Kirsch-Volders et al., 1997; Bakou et al., 2002).

Ένας άλλος τρόπος για να προσδιορίσουμε το περιεχόμενο των μικροπυρήνων είναι η διάκριση με βάση το μέγεθός τους (Papapaulou et al., 2001; Hashimoto et al., 2010). Συγκρίνοντας τη διάμετρό τους με την αντίστοιχη του κυρίως πυρήνα διακρίνονται σε μικρού, μεσαίου και μεγάλου μεγέθους μικροπυρήνες: οι μικρού μεγέθους μικροπυρήνες έχουν διάμετρο $\leq 1/10$ της διαμέτρου του κυρίως πυρήνα, οι μεσαίου μεγέθους μικροπυρήνες έχουν διάμετρο μεταξύ $1/9$ και $1/3$ της διαμέτρου του κυρίως πυρήνα και οι μεγάλου μεγέθους μικροπυρήνες έχουν διάμετρο ίση με το $1/3$ περίπου της διαμέτρου του κυρίως πυρήνα (Papapaulou et al., 2001). Οι μικροπυρήνες μικρού μεγέθους έχουν αυξημένη πιθανότητα να περιέχουν χρωμοσωματικά θραύσματα, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι ο παράγοντας που τους επάγει είναι θραυσματογόνο. Οι μικροπυρήνες μεγάλου μεγέθους έχουν αυξημένη πιθανότητα να περιέχουν ολόκληρα χρωμοσώματα, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι ο παράγοντας που τους επάγει είναι ανευπλοειδογόνο (Yamamoto & Kikuchi, 1980; Högstedt et al., 1988; Vanderkerken et al., 1989).

Η χρήση της διάκρισης του μεγέθους των μικροπυρήνων για τον προσδιορισμό του μηχανισμού δράσης του παράγοντα που τους επάγει δεν θεωρείται ιδιαίτερα αξιόπιστη για ανθρώπινα κύτταρα ή άλλους κυτταρικούς τύπους με ετερογενή μεγέθη χρωμοσωμάτων γιατί υπάρχει μεγάλη πιθανότητα σφάλματος: π.χ. ένας μικροπυρήνας μικρού μεγέθους μπορεί να περιέχει εξίσου ένα θραύσμα μεγάλου χρωμοσώματος ή ένα ολόκληρο μικρό χρωμόσωμα (Fenech, 2007).

Ωστόσο, μελέτες που εφάρμοσαν συγκριτικά και τις δύο προσεγγίσεις (ανάλυση μεγέθους μικροπυρήνων παράλληλα με την τεχνική FISH) για τον προσδιορισμό του μηχανισμού δράσης του ίδιου παράγοντα έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα (Βλαστός, 1997; Papapaulou et al., 2001). Επιπλέον,

πρόσφατη μελέτη των Hashimoto et al. (2010) η οποία χρησιμοποίησε και τις δύο προσεγγίσεις, αντίστοιχα με τις παραπάνω μελέτες, έδειξε ότι η αυξημένη συχνότητα μεγάλου μεγέθους μικροπυρήνων (με διάμετρο μεταξύ του $\frac{1}{4}$ και του $\frac{1}{2}$ της διαμέτρου του κυρίως πυρήνα) αποτελεί δείκτη ανευπλοειδικών φαινομένων και ότι η αναλογία των μεγάλου μεγέθους μικροπυρήνων προς το συνολικό αριθμό στατιστικά σημαντικά επαγόμενων μικροπυρήνων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό παραγόντων που προκαλούν θραύσεις χρωμοσωμάτων (clastogens) ή απώλεια ολόκληρων χρωμοσωμάτων (aneugens), με την ίδια αξιοπιστία που παρουσιάζει η ανάλυση με την τεχνική FISH.

2.2.5. Σημασία και εφαρμογές της τεχνικής των μικροπυρήνων με αναστολή της κυτταροκίνησης (CBMN method)

2.2.5.1. Η χρήση της τεχνικής CBMN σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες γενοτοξικότητας

Η μελέτη της γενοτοξικής δράσης φαρμακευτικών και άλλων χημικών ουσιών μετά από *in vitro* επίδραση σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα με τη χρήση της τεχνικής CBMN, έχει αναλυθεί εκτενώς από την Kirsch-Volders (1997a). Έκτοτε, και ειδικά μετά την επισημοποίηση της εγκυρότητας και της αξιοπιστίας της τεχνικής από διεθνείς φορείς, έχει πραγματοποιηθεί πολύ μεγάλος αριθμός μελετών που διερευνούν την πιθανή γενοτοξική δράση μιας πληθώρας παραγόντων με τη βοήθεια της τεχνικής αυτής, από διάφορα ερευνητικά εργαστήρια, κυβερνητικούς φορείς, φαρμακευτικές και χημικές βιομηχανίες.

Επιπλέον, η τεχνική CBMN έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε *in vivo* πληθυσμιακές μελέτες για την εκτίμηση της έκθεσης σε γενοτοξικούς παράγοντες λόγω της επαγγελματικής ενασχόλησης ή του τρόπου ζωής, π.χ. λόγω της συνήθειας καπνίσματος (Bonassi et al., 2003), της λήψης φαρμάκων (kouloumenta et al., 2005; Abou-Eisha, 2006; Andrianopoulos et al., 2006; Efthimiou et al., 2007), της λήψης ναρκωτικών ουσιών (Fenech & Bonassi, 2011) και της κατανάλωσης αλκοόλ (Fenech & Bonassi, 2011). Σε

μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που αφορά τέτοιου είδους μελέτες και διενεργήθηκε από τους Bonassi et al. (2005), αναφέρεται ότι ανάμεσα στους παράγοντες που έχουν μελετηθεί, μετά από *in vivo* έκθεση σε αυτούς, επικρατούν οργανικές χημικές ενώσεις όπως το στυρένιο, το βενζόλιο, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), το οξείδιο του αιθυλενίου και η φορμαλδεΐδη, καθώς και ανόργανες χημικές ενώσεις όπως το χρώμιο, το αρσενικό, ο μόλυβδος και ο υδράργυρος. Επίσης, πολλές μελέτες εξετάζουν τα αποτελέσματα της έκθεσης στην ιονίζουσα ακτινοβολία, σε διάφορα φυτοφάρμακα, σε αντινεοπλασματικά φάρμακα και σε περιβαλλοντικούς ρυπαντές.

Η δυνατότητα που δίνει η τεχνική CBMN να καταμετρηθούν πυρηνοπλασματικές γέφυρες ως αποτέλεσμα φαινομένων ιονισμού, την καθιστά βιολογικό δείκτη ιδιαίτερης σημασίας για την εκτίμηση της γενετοξικής δράσης της ιονίζουσας ακτινοβολίας (Streffer et al., 1998; Fenech, 2010).

Όσον αφορά στη χρήση της τεχνικής CBMN για τον προσδιορισμό του γενετικού κινδύνου που σχετίζεται με την έκθεση σε φυτοφάρμακα, μια πρόσφατη μελέτη των Bolognesi et al. (2011) κάνει μια εκτενή ανασκόπηση όλων των δημοσιευμένων πληθυσμιακών μελετών που αφορούν εργαζόμενους σε εργοστάσια παραγωγής φυτοφαρμάκων, καλλιεργητές που ψεκάζουν με φυτοφάρμακα, ανθοκόμους σε θερμοκήπια και εργάτες σε γεωργικές καλλιέργειες.

2.2.5.2. Η τεχνική CBMN ως βιολογικός δείκτης γήρανσης

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα που έχει συλλέξει το πρόγραμμα HUMN, οι συχνότητες των μικροπυρήνων αυξάνουν με την ηλικία σε ενήλικα άτομα και των δυο φύλων, με τη μεγαλύτερη αύξηση να παρουσιάζεται μετά την ηλικία των 30. Επιπλέον, οι γυναίκες εμφανίζουν υψηλότερες συχνότητες μικροπυρήνων σε σχέση με τους άντρες (Bonassi et al., 2001). Αλλά και στα παιδιά και τους εφήβους έχει παρατηρηθεί αύξηση στη συχνότητα των μικροπυρήνων σχετιζόμενη με την ηλικία, ενώ στα νεογέννητα οι τιμές είναι σημαντικά χαμηλότερες (Neri et al., 2005).

2.2.5.3. Η τεχνική CBMN ως βιολογικός δείκτης ατομικών διαφορών στη γενετική σύσταση

Έχει δειχθεί σε πολλές μελέτες ότι διαφορές στη γενετική σύσταση που σχετίζονται με πολυμορφισμούς ορισμένων γονιδίων, επηρεάζουν τη συχνότητα των μικροπυρήνων και συνεπάγονται διαφορές ως προς την ευαισθησία συγκεκριμένων ομάδων ατόμων στην πρόκληση γενετικών βλαβών από διάφορους γενοτοξικούς παράγοντες. Τα γονίδια αυτά είναι κυρίως γονίδια που σχετίζονται με τη μεταβολική ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση ξеноβιοτικών ενώσεων (καρκινογόνων ουσιών, φαρμάκων, αλκοόλ κ.α.), με την επιδιόρθωση του DNA και με το μεταβολισμό του φολικού οξέος. Για παράδειγμα, πολυμορφισμοί των γονιδίων EPHX, GSTT1 και GSTM1 επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη συχνότητα των χρωμοσωματικών βλαβών σε άτομα που εκτίθενται σε γενοτοξικούς παράγοντες, αλλά και σε μη-εκτεθειμένα άτομα. Μεταλλάξεις των γονιδίων ALDH2 συσχετίζονται με την επαγωγή μικροπυρήνων από την κατανάλωση αλκοόλ. Άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε θραυσματογόνους παράγοντες. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα γονίδια XRCC1 και XRCC3 που έχουν σχέση με την επιδιόρθωση του DNA, καθώς και το γονίδιο MTHFR που σχετίζεται με το μεταβολισμό του φολικού οξέος, επηρεάζουν επίσης τη συχνότητα των μικροπυρήνων (Iarmarcovai et al., 2008; Dhillon et al., 2011).

2.2.5.4. Η τεχνική CBMN ως βιολογικός δείκτης διατροφικής ανεπάρκειας ή περίσσειας

Έχει αποδειχθεί ότι η ανεπάρκεια ή αντίθετα η περίσσεια ορισμένων ιχνοστοιχείων στη διατροφή ή στη συγκέντρωση του πλάσματος του αίματος μπορεί να προκαλέσουν πληθώρα γενετικών βλαβών και κατά συνέπεια να επάγουν αυξημένες συχνότητες μικροπυρήνων. Για παράδειγμα, η ανεπάρκεια φολικού οξέος και βιταμίνης B12 οδηγεί σε ρήγματα στον έναν ή και στους δύο κλώνους του DNA, καθώς και σε χρωμοσωματικές θραύσεις και κατά συνέπεια, επάγει το σχηματισμό μικροπυρήνων (Thomas et al.,

2011). Άλλα ιχνοστοιχεία που συσχετίζονται σημαντικά με τη συχνότητα μικροπυρήνων στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα είναι η ριβοφλαβίνη, η βιοτίνη, το παντοθενικό οξύ, το β-καροτένιο, η βιταμίνη E, η ρετινόλη και το ασβέστιο (Fenech & Bonassi, 2011). Διερευνώντας λοιπόν την επίδραση των ιχνοστοιχείων αυτών στις συχνότητες των μικροπυρήνων είναι δυνατόν να εντοπισθούν οι διατροφικοί παράγοντες που είναι απαραίτητοι για γενετική σταθερότητα και να καθοριστούν τα βέλτιστα επίπεδα πρόσληψής τους (Fenech, 2003).

2.2.5.5. Η τεχνική CBMN ως εργαλείο για την πρόληψη ασθενειών

Αυξημένα επίπεδα μικροπυρήνων έχουν παρατηρηθεί σε άτομα που εμφανίζουν τη νευροεκφυλιστική ασθένεια Alzheimer και την ασθένεια Parkinson (Petrozzi et al., 2002). Επίσης, αυξημένες συχνότητες μικροπυρήνων συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο θανάτου από καρδιαγγειακές παθήσεις (Murgia et al., 2007).

Τέλος, υπάρχουν πλέον αρκετές αποδείξεις ότι η τεχνική CBMN μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την πρόβλεψη αυξημένου κινδύνου καρκινογένεσης. Πρόσφατα, μια εκτεταμένη διεθνής μελέτη έδειξε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ των συχνοτήτων των μικροπυρήνων σε υγιή άτομα και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου. Στη μελέτη αυτή συγκεντρώθηκαν δεδομένα από 6718 άτομα από 10 χώρες. Η εκδήλωση καρκίνου ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ομάδες ατόμων με μεσαία και υψηλή συχνότητα μικροπυρήνων (Bonassi et al., 2011). Επιπλέον, η υπόθεση ότι αυξημένες συχνότητες μικροπυρήνων συνδέονται με πρώιμα στάδια καρκινογένεσης υποστηρίζεται από τα παρακάτω ευρήματα (Mateuca et al., 2006):

- Μηχανιστικές ομοιότητες με χρωμοσωματικές βλάβες που έχει αποδειχτεί ότι οδηγούν στην εμφάνιση καρκίνου υποδηλώνουν συσχέτιση μεταξύ των συχνοτήτων των μικροπυρήνων και υψηλού κινδύνου εμφάνισης καρκίνου.
- Οι τεχνικές των χρωμοσωματικών βλαβών (CA) και των μικροπυρήνων (MN), όταν εφαρμόζονται *in vitro*, συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό.

- Παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα μικροπυρήνων σε λεμφοκύτταρα καρκινοπαθών και ασθενών με σύνδρομο τα οποία τους καθιστούν επιρρεπείς στην καρκινογένεση, όπως είναι το σύνδρομο Bloom και η αταξία τηλαγγειεκτασία.
- Η συχνότητα των μικροπυρήνων σχετίζεται σε πολύ μεγάλο βαθμό με την συγκέντρωση βιταμινών στο αίμα, όπως είναι το φολικό οξύ, ανεπάρκεια των οποίων συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μερικών τύπων καρκίνων.
- Παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη συχνότητα μικροπυρήνων σε γυναίκες με διάγνωση για καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

2.2.6. Προσδιορισμός της συχνότητας των μικροπυρήνων - Κριτήρια αναγνώρισης διπύρηνων κυττάρων και μικροπυρήνων

Βασική αρχή για την παρατήρηση και καταμέτρηση των γενετικών βλαβών που είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με την τεχνική των μικροπυρήνων είναι η ασφαλής και ανεπηρέαστη από προσωπικούς παράγοντες καταγραφή των δεδομένων. Για το λόγο αυτό τα μικροσκοπικά παρασκευάσματα κωδικοποιούνται πριν από την οποιαδήποτε ανάλυση. Τα κωδικοποιημένα παρασκευάσματα, παρατηρούνται σε φωτονικό μικροσκόπιο ή σε μικροσκόπιο φθορισμού με μεγέθυνση 1000 X. Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα, θα πρέπει να καταμετρώνται τουλάχιστον 1000 διπύρηνια κύτταρα (Binucleated cells, BN cells) και από 500 έως 2000 συνολικά κύτταρα για τον υπολογισμό διαφόρων δεικτών. Επίσης, για κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα θα πρέπει να καταγράφονται τα εξής (Fenech et al., 2003; Fenech, 2007):

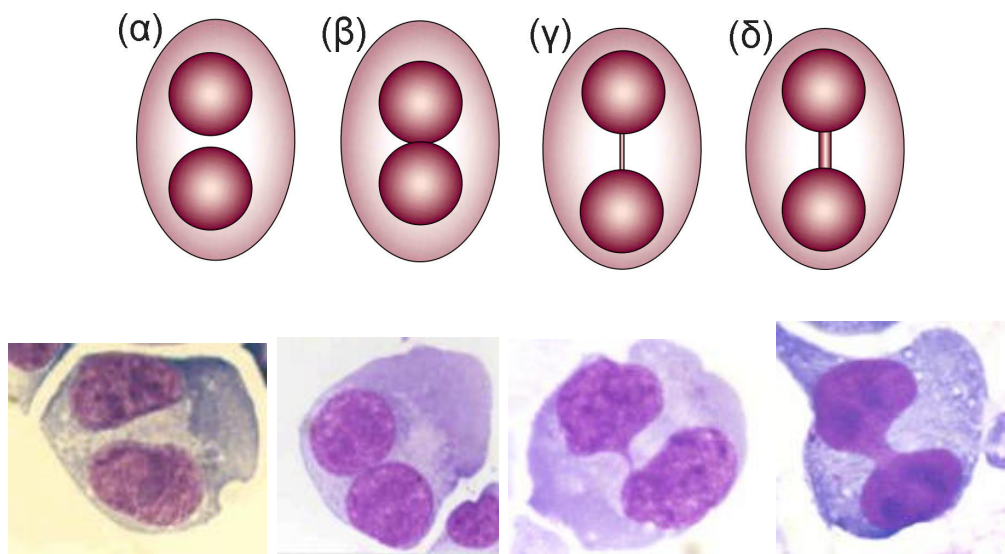
- Ο αριθμός των μικροπυρήνων (MN) σε 1000 διπύρηνια κύτταρα (BN).
- Η κατανομή των διπύρηνων κυττάρων με 0, 1, 2, 3 ή και περισσότερους μικροπυρήνες.
- Το ποσοστό των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα σε σύνολο 1000 διπύρηνων.
- Το ποσοστό των μονοπύρηνων, διπύρηνων, τριπύρηνων και τετραπύρηνων κυττάρων σε σύνολο 2000 κυττάρων. Από το ποσοστό αυτό προκύπτει ο δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων.

Για τον ασφαλέστερο υπολογισμό του ποσοστού των μικροπυρήνων είναι προτιμότερο να μη συνυπολογιστούν κύτταρα που δεν μπορούν να ταξινομηθούν κάπου σύμφωνα με τα κριτήρια που περιγράφονται.

Τα διπύρρηνα κύτταρα που καταμετρώνται για τον προσδιορισμό της συχνότητας των MN πρέπει να έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά (Fenech et al., 2003; Fenech, 2007):

- Τα κύτταρα πρέπει να έχουν 2 πυρήνες.
- Οι δύο πυρήνες σε κάθε κύτταρο πρέπει να έχουν σαφή όρια (άθικτες πυρηνικές μεμβράνες) και να βρίσκονται μέσα στο ίδιο κυτταροπλασματικό όριο.
- Οι δύο πυρήνες πρέπει να είναι περίπου ίσου μεγέθους και πυκνότητας.
- Οι δύο πυρήνες μπορούν να συνδέονται με μια λεπτή πυρηνοπλασματική γέφυρα που δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από το $1/4$ της πυρηνικής διαμέτρου.
- Οι δύο κύριοι πυρήνες ενός BN κυττάρου μπορούν να εφάπτονται αλλά δεν πρέπει να επικαλύπτουν ο ένας τον άλλον.
- Ένα κύτταρο με δύο επικαλυπτόμενους πυρήνες μπορεί να καταμετρηθεί μόνο εάν τα πυρηνικά όρια κάθε πυρήνα είναι διακριτά.
- Το κυτταροπλασματικό όριο ή η μεμβράνη ενός κυττάρου πρέπει να είναι άθικτα και σαφώς διακριτά από τα κυτταροπλασματικά όρια των παρακείμενων κυττάρων.

Μερικά φωτογραφικά παραδείγματα της εικόνας των διπύρηνων κυττάρων που συνήθως καταμετρώνται φαίνονται παρακάτω (**Εικόνα 2.2.6.1**):

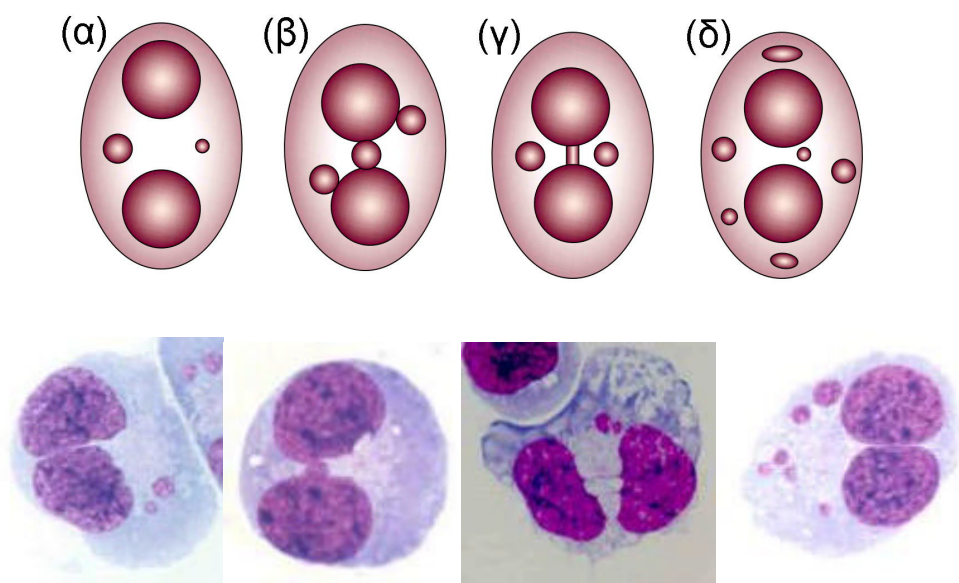


Εικόνα 2.2.6.1. Σχηματική παράσταση (Αναπροσαρμογή από Fenech, 2007) και μικροφωτογραφίες (HUMN, 2010) διπύρηνων κυττάρων που καταμετρώνται.

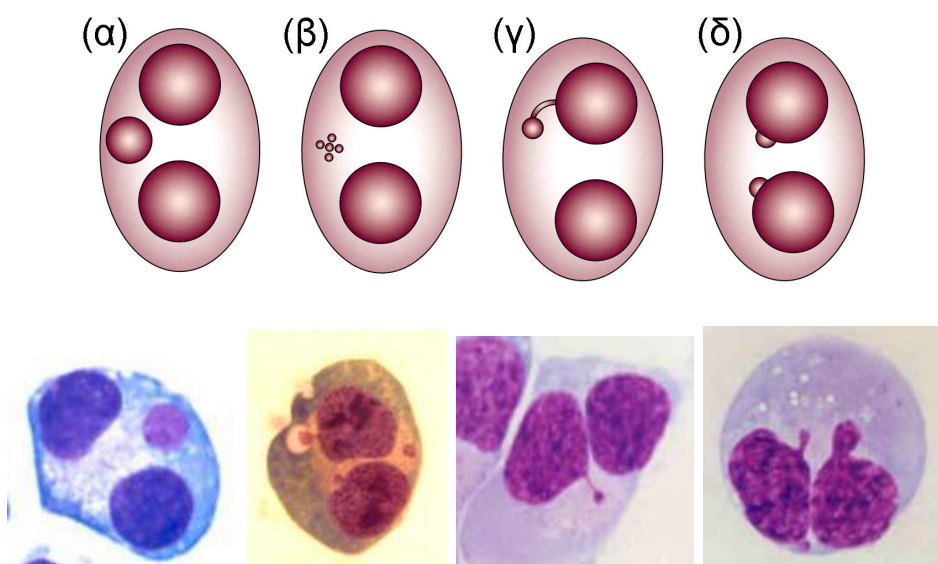
Οι μικροπυρήνες είναι μορφολογικά ίδιοι αλλά μικρότεροι από τους κύριους πυρήνες. Για να καταμετρηθούν ως μικροπυρήνες οι αντίστοιχες παρατηρούμενες δομές πρέπει να πληρούν τα ακόλουθα κριτήρια (Fenech et al., 2003; Fenech, 2007):

- Η διάμετρος των μικροπυρήνων στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ του 1/16 και του 1/3 της μέσης διαμέτρου των κύριων πυρήνων.
- Οι μικροπυρήνες δεν πρέπει να παρουσιάζουν διαθλαστικότητα αλλά να χαρακτηρίζονται από ομοιογένεια για να μπορούν να διακριθούν εύκολα από άλλα μορφώματα (artifacts).
- Οι μικροπυρήνες δεν πρέπει να συνδέονται με τους κύριους πυρήνες.
- Οι μικροπυρήνες είναι δυνατόν να εφάπτονται χωρίς όμως να αλληλεπικαλύπτονται με τους κύριους πυρήνες.
- Οι μικροπυρήνες πρέπει να έχουν την ίδια ή πιο έντονη χρώση με τους κύριους πυρήνες.

Μερικά φωτογραφικά παραδείγματα της εικόνας των μικροπυρήνων που συνήθως καταμετρώνται καθώς και μορφωμάτων (artifacts) που συγχέονται με μικροπυρήνες και δεν πρέπει να καταγράφονται φαίνονται παρακάτω (**Εικόνες 2.2.6.2 & 2.2.6.3**):



Εικόνα 2.2.6.2. Σχηματική παράσταση (Αναπροσαρμογή από Fenech, 2007) και μικροφωτογραφίες (HUMN, 2010) μικροπυρήνων που πληρούν τα παραπάνω κριτήρια αναγνώρισης.



Εικόνα 2.2.6.3. Σχηματική παράσταση (Αναπροσαρμογή από Fenech, 2007) και μικροφωτογραφίες (HUMN, 2010) κυτταρικών δομών ή μορφωμάτων (artifacts) που συγχέονται με μικροπυρήνες και δεν πρέπει να καταγράφονται.

2.2.7. Κυτταροτοξικότητα

Η μέτρηση των μονοπύρηνων, διπύρηνων και πολυπύρηνων κυττάρων μετά την προσθήκη της κυτταροχλασίνης-B αποτελεί, όπως προαναφέρθηκε, πρόσθετο πλεονέκτημα της μεθόδου που επιτρέπει την εκτίμηση της έκτασης και εξέλιξης της πυρηνικής διαίρεσης σε έναν διαιρούμενο κυτταρικό πληθυσμό. Αυτό επιτυγχάνεται με τον προσδιορισμό δυο δεικτών: του Δείκτη Πυρηνικής Διαίρεσης (Nuclear Division Index, NDI) και του Δείκτη Πολλαπλασιασμού των Κυττάρων (Cytokinesis Block Proliferation Index, CBPI) (Surrallès et al., 1995; Fenech, 1997).

Ο Δείκτης Πυρηνικής Διαίρεσης (Nuclear Division Index, NDI) υπολογίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Eastmond και Tucker (1989), καταμετρώντας 500 κύτταρα, και δίνεται από τη σχέση: $NDI = (M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4) / N$ όπου M_1 , M_2 , M_3 και M_4 ο αριθμός των κυττάρων που περιέχουν αντίστοιχα έναν, δύο, τρεις και τέσσερις πυρήνες και N το σύνολο των κυττάρων που αναλύθηκαν. Η χαμηλότερη δυνατή τιμή του δείκτη NDI είναι 1.0, η οποία παρατηρείται αν όλα τα ζωντανά κύτταρα αποτυγχάνουν να διαιρεθούν και είναι επομένως μονοπύρηννα. Αν όλα τα ζωντανά κύτταρα συμπληρώσουν έναν κύκλο διαίρεσης, και είναι επομένως διπύρηννα, η τιμή του NDI είναι 2.0. Ο δείκτης NDI παρέχει ενδείξεις κυτταροστατικών γεγονότων και, στην περίπτωση των λεμφοκυττάρων, αποτελεί μέτρο της μιτογόνου απόκρισής τους (Fenech, 2007).

Ο Δείκτης Πολλαπλασιασμού των Κυττάρων (Cytokinesis Block Proliferation Index, CBPI) υπολογίζεται από τον τύπο: $CBPI = [M_1 + 2M_2 + 3(M_3 + M_4)] / N$ όπου, M_1 έως M_4 είναι ο αριθμός των κυττάρων με 1 έως 4 πυρήνες αντίστοιχα σε σύνολο 500 έως 2000 κυττάρων, που συμβολίζεται με N . Με το δείκτη CBPI υπολογίζεται ο μέσος αριθμός των κυτταρικών κύκλων που έχει ολοκληρώσει ο κυτταρικός πληθυσμός (Surrallès et al., 1995; Lorge et al., 2008).

Ο υπολογισμός του Δείκτη Πολλαπλασιασμού των Κυττάρων χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας (cytotoxicity) που προκαλείται με την επίδραση των χημικών ενώσεων. Ο όρος κυτταροτοξικότητα αντιπροσωπεύει την αναστολή του ρυθμού κυτταρικής διαίρεσης και την

επαγωγή του κυτταρικού θανάτου (νέκρωσης και απόπτωσης). Υπολογίζεται σύμφωνα με τη σχέση: $\text{Cytotoxicity} = 100 - 100 [\text{CBPI}_T - 1 / \text{CBPI}_C - 1]$, όπου T η καλλιέργεια με την υπό εξέταση χημική ένωση και C η καλλιέργεια του μάρτυρα. Όταν η τιμή του CBPI είναι ίση με τη μονάδα, τότε η κυτταροτοξικότητα αντιστοιχεί στο 100% και όλα τα κύτταρα είναι μονοπύρηννα, αφού αδυνατούν να ολοκληρώσουν την κυτταρική διαίρεση (Kirsch-Volders et al., 2003; Lorge et al., 2008).

2.3. Η τεχνική των μικροπυρήνων σε *in vivo* συνθήκες (*in vivo* Micronucleus Test, MNT)

Όπως προαναφέρθηκε, μια απλή και γρήγορη μέθοδος για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό βλαβών που προκαλούνται μετά από έκθεση σε μεταλλαξιγόνους παράγοντες *in vivo*, είναι η τεχνική των μικροπυρήνων σε ερυθροκύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών ή το περιφερικό αίμα τρωκτικών (Schmid, 1973; Heddle, 1973).

Όπως και η *in vitro* τεχνική των μικροπυρήνων, η *in vivo* τεχνική είναι ικανή να ανιχνεύσει παράγοντες που προκαλούν βλάβες είτε στα χρωμοσώματα, επάγοντας έτσι μικροπυρήνες που περιέχουν χρωμοσωματικά θραύσματα, είτε στη μιτωτική συσκευή, επάγοντας έτσι μικροπυρήνες που περιέχουν ολόκληρα χρωμοσώματα (US FDA/CFSAN, 2000).

Η τεχνική αυτή έχει αξία γιατί μπορούμε να μελετήσουμε την γενοτοξική δράση μιας ουσίας σε ένα ενεργό μεταβολικό σύστημα όπως είναι αυτό ενός ζωντανού οργανισμού, λαμβάνοντας υπόψη φαρμακοκινητικές παραμέτρους και διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA. Επιπλέον, μια *in vivo* τεχνική είναι πάντα χρήσιμη για περαιτέρω διερεύνηση γενοτοξικών δράσεων που έχουν ήδη ανιχνευθεί σε *in vitro* συνθήκες (US FDA/CFSAN, 2000).

Οι πρώτοι ερευνητές που εισήγαγαν την τεχνική και καθιέρωσαν τα πρωτόκολλα της πειραματικής διαδικασίας και της ανάλυσης των αποτελεσμάτων ήταν ο Schmid (1973 & 1975) και ο Heddle (1973). Έκτοτε, εξαιτίας της ευρείας χρήσης της και της αυξανόμενης βαρύτητάς της ως δοκιμασία ελέγχου γενοτοξικότητας, πολλοί ερευνητές ασχολήθηκαν με τη βελτίωσή της και την καθιέρωση ενός διεθνώς εναρμονισμένου πρωτοκόλλου

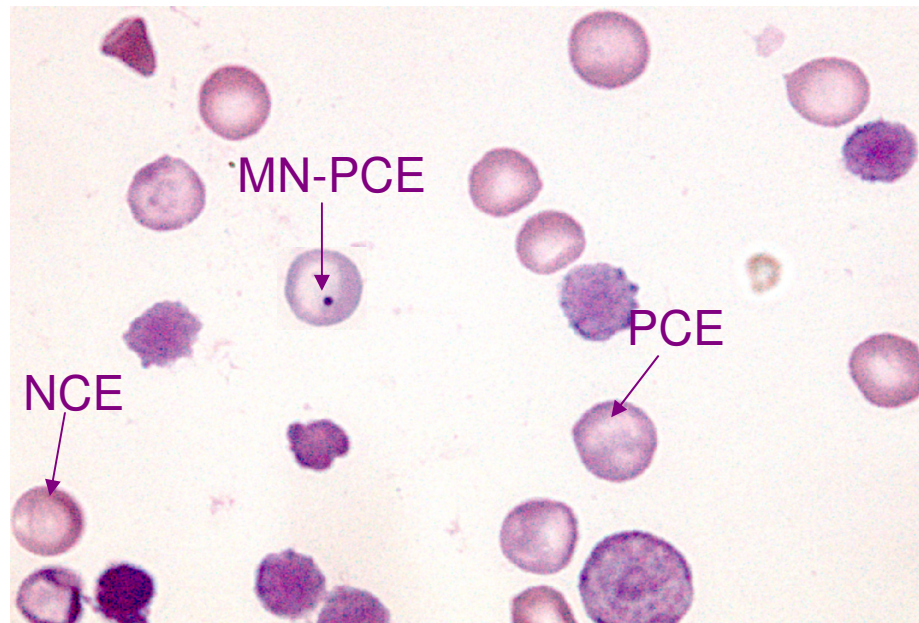
για την εφαρμογή της. Έτσι δημιουργήθηκε η Συνεργατική Ομάδα Μελέτης για την Τεχνική των Μικροπυρήνων (Collaborative Study Group for the Micronucleus Test, CSGMT) ως υποομάδα της Ομάδας Μελέτης της Μεταλλαξιγένεσης στα Θηλαστικά (Mammalian Mutagenicity Study Group, MMS) που αποτελεί μέλος της Επιστημονικής Ένωσης Περιβαλλοντικής Μεταλλαξιγένεσης της Ιαπωνίας (Environmental Mutagen Society of Japan, JEMS). Η ομάδα CSGMT ασχολήθηκε με τη διερεύνηση των παραγόντων που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της *in vivo* τεχνικής των μικροπυρήνων όπως είναι το φύλο, η ηλικία, το είδος ή η φυλή των πειραματόζων, ο τρόπος χορήγησης του υπό μελέτη παράγοντα, ο αριθμός των δόσεων χορήγησης, ο ιστός από τον οποίο λαμβάνεται δείγμα προς ανάλυση, καθώς και η μέθοδος χρώσης που εφαρμόζεται. Τα συμπεράσματα στα οποία κατέληξε η παραπάνω ομάδα μελέτης έχουν συγκεντρωθεί και δημοσιευτεί από τους Sutou (1996), Wakata et al. (1998) και Hamada et al. (2001).

Επιπλέον, η μεθοδολογία της *in vivo* τεχνικής των μικροπυρήνων συζητήθηκε και αναπτύχθηκε περαιτέρω από διάφορες ομάδες εργασίας κατά τη διάρκεια διεθνών συνεδρίων με θέμα τις Διαδικασίες Ελέγχου Γενοτοξικότητας (International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, IWGTP) και τα συμπεράσματα στα οποία κατέληξαν έχουν δημοσιευτεί από τους Hayashi et al. (1994 & 2000) και Kirkland et al. (2007).

2.3.1. Αρχή της μεθόδου

Οι μικροπυρήνες είναι δυνατόν να σχηματιστούν μόνο σε διαιρούμενα κύτταρα. Στην περίπτωση της ερυθροποίησης, αυτό συμβαίνει στους ερυθροβλάστες, που βρίσκονται στο μυελό των οστών. Όταν ένας ερυθροβλάστης διαφοροποιείται σε πρώιμο ερυθροκύτταρο, ο πυρήνας του αποβάλλεται. Αν σχηματίστηκαν μικροπυρήνες, αυτοί παραμένουν στο κυτταρόπλασμα των πρώιμων ερυθροκυττάρων κι έτσι είναι εύκολα διακριτοί. Τα πρώιμα αυτά ερυθροκύτταρα εξακολουθούν να περιέχουν ριβοσωμικό RNA και ονομάζονται πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα (Polychromatic Erythrocytes, PCEs). Αυτά χρωματίζονται διαφορετικά κι έτσι

ξεχωρίζουν από τα ώριμα νορμοχρωματικά ερυθροκύτταρα (Normochromatic Erythrocytes, NCEs) τα οποία χαρακτηρίζονται από έλλειψη ριβοσωμάτων. Συγκεκριμένα, μετά από χρώση Giemsa, τα πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα εμφανίζονται κυανωπά, ενώ τα νορμοχρωματικά ερυθροκύτταρα εμφανίζονται ερυθρωπά (**Εικόνα 2.3.1**).



Εικόνα 2.3.1. Παρασκεύασμα μυελού των οστών αρουραίων με χρώση Giemsa, όπου διακρίνονται πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα (PCE), νορμοχρωματικά ερυθροκύτταρα (NCE) και πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα που περιέχουν μικροπυρήνα (MN-PCE). (Γ. Ντέμσια)

Μικροπυρήνες είναι δυνατόν να εμφανιστούν και στους δυο τύπους ερυθροκυττάρων, αλλά η καταμέτρησή τους περιορίζεται στα πολυχρωματικά (PCEs). Επειδή τα πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα είναι νεοσχηματιζόμενα κύτταρα, οι μικροπυρήνες που υπάρχουν σε αυτά μπορούν να αποδοθούν σε χρωμοσωματικές βλάβες που συνέβησαν κατά τις αμέσως προηγούμενες κυτταρικές διαιρέσεις, εξαιτίας της οξείας δράσης κάποιου μεταλλαξιγόνου παράγοντα. Αντίθετα, η καταμέτρηση μικροπυρήνων στα ώριμα ερυθροκύτταρα (NCEs), τα οποία παραμένουν περίπου ένα μήνα μετά το σχηματισμό τους στο περιφερικό αίμα, δεν αποτελεί αξιόπιστη ένδειξη χρωμοσωματικών βλαβών. Αυτό συμβαίνει γιατί είναι δυνατόν να έχουν

χαθεί μικροπυρήνες κατά το μετασχηματισμό των PCEs σε NCEs. Επιπλέον, λόγω της αυξημένης διάρκειας ζωής των NCEs, συσσωρεύονται στο πληθυσμό των ερυθροκυττάρων ώριμα ερυθροκύτταρα που προϋπήρχαν της επίδρασης του μεταλλαξιγόνου παράγοντα, με αποτέλεσμα να μειώνεται τόσο πολύ η συχνότητα των NCEs με μικροπυρήνα, ώστε να γίνεται μη-ανιχνεύσιμη (Schmid, 1975; Mavournin et al., 1990).

Στο μυελό των οστών των ποντικών, η αποβολή του πυρήνα των ερυθροβλαστών πραγματοποιείται περίπου 6 ώρες μετά την τελική μίτωση. Το στάδιο των PCEs που ακολουθεί διαρκεί 12 έως 24 ώρες στο μυελό των οστών και στη συνέχεια, ανάλογο χρονικό διάστημα στο περιφερικό αίμα, όπου τα PCEs ωριμάζουν σε NCEs. Επειδή η ερυθροποίηση είναι μια συνεχής διαδικασία, υπάρχει μια διαρκής μεταβολή των κυττάρων από ερυθροβλάστες σε NCEs με ενδιάμεσο στάδιο αυτό των PCEs. Όταν ένα ποντίκι εκτίθεται σε κάποιο χημικό παράγοντα που επάγει μικροπυρήνες, μεσολαβεί ένα διάστημα περίπου 6 ωρών (ή περισσότερων αν υπάρχει καθυστέρηση στον κυτταρικό κύκλο) μεταξύ της έκθεσης και της αρχικής εμφάνισης των μικροπυρήνων στα PCEs του μυελού των οστών. Η περίοδος αυτή περιλαμβάνει το χρόνο που χρειάζεται για να μεταβολιστεί το χημικό, για να ολοκληρωθεί η ωρίμανση των ερυθροβλαστών και για να αποβληθεί ο πυρήνας από τους ερυθροβλάστες. Στις επόμενες 12 έως 24 ώρες, στο μυελό των οστών, εισέρχονται στο στάδιο των PCEs κύτταρα τα οποία είχαν εκτεθεί στον υπό μελέτη παράγοντα πριν από το διπλασιασμό τους, ενώ προϋπάρχοντα PCEs μεταφέρονται στην κυκλοφορία του αίματος για να μετατραπούν σε NCEs. Ο βαθμός στον οποίο θα συνεχίσουν να επάγονται μικροπυρήνες εξαρτάται από τη διάρκεια δράσης του παράγοντα που εξετάζεται ή/και από τις αλλοιώσεις του DNA, από το ρυθμό αποκατάστασης των χρωμοσωματικών βλαβών, καθώς και από το ρυθμό αποκατάστασης της καθυστέρησης του κυτταρικού κύκλου. Σταδιακά, η συχνότητα των μικροπυρήνων επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Όπως είναι φανερό, η διακύμανση της συχνότητας των μικροπυρήνων σε σχέση με το χρόνο είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες και ο ακριβής χρόνος στον οποίο παρουσιάζεται η μέγιστη συχνότητα μικροπυρήνων δεν μπορεί να

προβλεφθεί. Στις περισσότερες περιπτώσεις η κορυφή θα εμφανιστεί κάπου μεταξύ 24 και 60 ωρών μετά την έκθεση (Mavournin et al., 1990).

Σε περίπτωση που κάποιος χημικός παράγοντας αναστέλλει ισχυρά τη μίτωση στο μυελό των οστών, θα σχηματιστούν πολύ λίγα PCEs και έτσι η καταμέτρηση αυτών γίνεται πολύ χρονοβόρα. Επιπλέον, τα PCEs αυτά μπορεί να είναι άτυπα, να προέρχονται δηλαδή από μια ομάδα ανθεκτικών πρώιμων κυττάρων ή να εκπροσωπούν κάποια υποομάδα κυττάρων που αργούν να ωριμάσουν, αλλά είχαν ολοκληρώσει την τελευταία τους μίτωση πριν την έκθεσή τους στον παράγοντα. Είναι εμφανές από τα παραπάνω ότι το ποσοστό των PCEs προς τα NCEs αποτελεί δείκτη για την τοξικότητα στο μυελό των οστών. Όταν λοιπόν μειωθεί ο αριθμός των ερυθροβλαστών που μετατρέπονται σε PCEs από την επίδραση ενός χημικού, θα μειωθεί ανάλογα και το παραπάνω ποσοστό. Μέχρι σε ένα βαθμό, είναι αναμενόμενο ένας χημικός παράγοντας να επάγει τοξικότητα. Υψηλά επίπεδα τοξικότητας όμως είναι ανεπιθύμητα για την εφαρμογή της τεχνικής (Mavournin et al., 1990).

2.3.2. Κριτήρια αναγνώρισης των μικροπυρήνων

Οι μικροπυρήνες στα πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μπορούν να ελεγχθούν χωρίς να είναι απαραίτητη κάποια ιδιαίτερη εκπαίδευση στην κυτταρογενετική. Συνήθως, οι μικροπυρήνες εμφανίζονται ως σφαιρικά μορφώματα με διάμετρο περίπου 1/20 έως 1/5 της διαμέτρου του ερυθροκυττάρου. Στις περισσότερες περιπτώσεις συναντάμε μόνο έναν μικροπυρήνα ανά ερυθροκύτταρο, ακόμα και μετά από επίδραση πολύ ισχυρών θραυσματογόνων παραγόντων. Σε κάποιες περιπτώσεις όμως μπορεί να εμφανιστούν PCEs με περισσότερους από έναν μικροπυρήνες, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις όπου το σχήμα των μικροπυρήνων έχει τη μορφή έλλειψης. Επιπλέον, σε σπάνιες περιπτώσεις εμφανίζονται μορφώματα (artifacts) που μοιάζουν και συγχέονται εύκολα με μικροπυρήνες. Αυτά σχηματίζονται συνήθως από υπολείμματα της χρωστικής ή, ειδικά στο μυελό των οστών αρουραίων, από βασεόφιλα σφαιρίδια που προέρχονται από κατεστραμμένα πρώιμα βασεόφιλα λευκοκύτταρα. Σε αντίθεση με τους μικροπυρήνες, που αναμένεται να εντοπίζονται μόνο στα πολυχρωματικά

ερυθροκύτταρα, τα μορφώματα αυτά είναι διασκορπισμένα σε όλους τους τύπους ερυθροκυττάρων του μυελού των οστών. Για αυτό το λόγο συνίσταται να καταμετρώνται και τα ώριμα ερυθροκύτταρα με μικροπυρήνα του μυελού των οστών και αν ο αριθμός τους ξεπερνά κάποιο όριο, αποτελούν ένδειξη παρουσίας τέτοιων μορφωμάτων (Schmid, 1975).

2.3.3. Επιλογή οργανισμού και ιστού δειγματοληψίας

Για την εφαρμογή της *in vivo* τεχνικής των μικροπυρήνων χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τα ποντίκια ως πειραματόζωα και ο μυελός των οστών ως ιστός δειγματοληψίας. Αργότερα όμως καθιερώθηκε και η χρήση των αρουραίων, αφού για τους οργανισμούς αυτούς ήταν διαθέσιμα περισσότερα τοξικολογικά, φαρμακοκινητικά και τοξικοκινητικά δεδομένα (Wakata et al., 1998). Με τους αρουραίους όμως, κρίνεται απαραίτητη η χρησιμοποίηση ειδικών χρωστικών για χρώση του DNA, ώστε να είναι δυνατή η διάκριση των μικροπυρήνων από παρόμοια μορφώματα που προέρχονται από βασεόφιλα λευκοκύτταρα του μυελού των οστών των αρουραίων (Mavournin et al., 1990). Η χρήση της χρωστικής πορτοκαλί της ακριδίνης (acridine orange) επέτρεψε την εφαρμογή της τεχνικής σε αρουραίους, που προτιμώνται, σε σχέση με τα ποντίκια, για τη διεξαγωγή τοξικολογικών μελετών (Heddle et al., 2011).

Όταν χρησιμοποιούνται τα ποντίκια ως πειραματόζωα, τόσο ο μυελός των οστών, όσο και το περιφερικό αίμα, κρίνονται ως κατάλληλοι ιστοί για δειγματοληψία, αρκεί αυτή να πραγματοποιηθεί την κατάλληλη χρονική στιγμή για τον κάθε ιστό. Στα ποντίκια, τα πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα που περιέχουν επαγόμενους μικροπυρήνες πρωτοεμφανίζονται στο περιφερικό αίμα 24 ώρες μετά την αρχική τους εμφάνιση στο μυελό των οστών. Επιπλέον, στις περισσότερες φυλές ποντικών, έχει βρεθεί ότι ο σπλήνας δεν αφαιρεί τα κύτταρα με μικροπυρήνα από την κυκλοφορία του αίματος (όπως συμβαίνει σε άλλα είδη, π.χ. αρουραίους, σκύλους και ανθρώπους), με αποτέλεσμα να εμφανίζουν παρόμοιες συχνότητες μικροπυρήνων, τόσο στα ερυθροκύτταρα του μυελού των οστών, όσο και στα ανώριμα και ώριμα ερυθροκύτταρα του περιφερικού αίματος. Έτσι, σε

μελέτες για τον προσδιορισμό της οξείας δράσης ενός χημικού παράγοντα, η τεχνική των μικροπυρήνων μπορεί να εφαρμοστεί εξίσου αποτελεσματικά με το μυελό των οστών, και με το περιφερικό αίμα. Όταν πρόκειται όμως για τον προσδιορισμό της χρόνιας δράσης ενός χημικού παράγοντα, προτιμάται η λήψη ερυθροκυττάρων του περιφερικού αίματος (Manournin et al., 1990; Hayashi et al., 2000).

Το πλεονέκτημα της λήψης περιφερικού αίματος είναι ότι δεν χρειάζεται να θανατωθούν τα πειραματόζωα. Πολύ μικρές ποσότητες περιφερικού αίματος είναι απαραίτητες για την εφαρμογή της τεχνικής, οπότε, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν επαναλαμβανόμενες δειγματοληψίες από το ίδιο πειραματόζωο. Το γεγονός αυτό μειώνει κατά πολύ τον αριθμό των απαιτούμενων πειραματόζωων σε μελέτες με επαναλαμβανόμενες δόσεις χορήγησης, για τον προσδιορισμό της χρόνιας δράσης κάποιου χημικού παράγοντα. Επιπλέον, επιτρέπει την εκτίμηση της επίδρασης της ηλικίας του ζώου στη συχνότητα των μικροπυρήνων (Heddle et al., 2011).

Το γεγονός ότι οι αρουραίοι, όπως και πολλά άλλα είδη, π.χ. ο σκύλος και ο άνθρωπος, απομακρύνουν, μέσω της λειτουργίας του σπλήνα, τα κύτταρα που περιέχουν μικροπυρήνα από την κυκλοφορία του αίματος, απέκλειε τη δειγματοληψία περιφερικού αίματος κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων με τα είδη αυτά. Ωστόσο, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι αν η στατιστική ισχύς της μεθόδου μπορούσε να βελτιωθεί ή αν τα ανώριμα ερυθροκύτταρα μπορούσαν να αναλυθούν πριν δεσμευτούν από το σπλήνα, τότε θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί το περιφερικό αίμα αρουραίων για τη διεξαγωγή πειραμάτων (Wakata et al., 1998). Πράγματι, η εφαρμογή κατάλληλων τεχνικών χρώσης, καθώς και η χρήση της κυτταρομετρίας ροής για την καταμέτρηση των κυττάρων, έκαναν εφικτή την ανάλυση πολύ μεγαλύτερου αριθμού κυττάρων, αυξάνοντας έτσι τη στατιστική ισχύ της μεθόδου (Wakata et al., 1998; MacGregor et al., 2006; Dertinger et al., 2006). Επιπλέον, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από την ομάδα μελέτης για την τεχνική των μικροπυρήνων (CSGMT), με σκοπό την εκτίμηση της καταλληλότητας της χρήσης αρουραίων ως πειραματόζωα, σε σχέση με τα ποντίκια, έδειξαν συμφωνία αποτελεσμάτων σε ποσοστό 92% μεταξύ πειραμάτων με μυελό των οστών και περιφερικό αίμα αρουραίων και 88%

μεταξύ πειραμάτων με ερυθροκύτταρα αρουραίων και ποντικών (Wakata et al., 1998).

Συμπερασματικά λοιπόν, ο μυελός των οστών ποντικών είναι ο ιστός που χρησιμοποιείται πιο συχνά κατά την εφαρμογή της *in vivo* τεχνικής των μικροπυρήνων. Ακολουθεί το περιφερικό αίμα ποντικών. Ο μυελός των οστών αρουραίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά, χωρίς να μειωθεί η απόδοση της τεχνικής. Το ίδιο ισχύει και για το περιφερικό αίμα αρουραίων, αρκεί να ληφθεί υπόψη η πιθανή επίδραση του εξεταζόμενου χημικού παράγοντα στη λειτουργία του σπλήνα, γιατί είναι πιθανόν αυξημένες συχνότητες ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνα να οφείλονται σε σπληνοτοξική και όχι σε γενοτοξική δράση του παράγοντα (Wakata et al., 1998).

2.3.4. Προσδιορισμός της συχνότητας των μικροπυρήνων και ερμηνεία αποτελεσμάτων

Με βάση τα πρωτόκολλα στα οποία κατέληξε η ομάδα μελέτης για την τεχνική των μικροπυρήνων (CSGMT) μετά από αλληπάλληλες μελέτες, προκειμένου να προσδιοριστεί η συχνότητα των μικροπυρήνων, είναι απαραίτητο να αναλύονται δείγματα από 4 τουλάχιστον ζώα και να εξετάζονται για την παρουσία μικροπυρήνων τουλάχιστον 2000 πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα ανά ζώο. Επίσης, για κάθε ζώο πρέπει να προσδιορίζεται το ποσοστό των ανώριμων (PCEs) προς τα συνολικά ερυθροκύτταρα (PCEs + NCEs) καταμετρώντας συνολικά τουλάχιστον 200 ερυθροκύτταρα στο μυελό των οστών και 1000 ερυθροκύτταρα στο περιφερικό αίμα. Στα διάφορα δείγματα, το ποσοστό αυτό δεν θα πρέπει να είναι λιγότερο από το 20% της αντίστοιχης τιμής στους αρνητικούς μάρτυρες. Συνολικά, για κάθε ζώο πρέπει να καταγράφονται οι εξής αριθμοί:

- Ο αριθμός των ανώριμων ερυθροκυττάρων που καταμετρήθηκαν.
- Ο αριθμός των ανώριμων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνα.
- Ο αριθμός των ανώριμων ερυθροκυττάρων προς το συνολικό αριθμό ερυθροκυττάρων (Mavournin et al., 1990; Gollapudi & McFadden, 1995; Hayashi et al., 2000).

Στα πειράματα με ποντίκια όπου μελετώνται τα αποτελέσματα της χρόνιας δράσης κάποιου χημικού παράγοντα, πιθανόν να είναι χρήσιμη και η καταμέτρηση μικροπυρήνων στα ώριμα ερυθροκύτταρα (NCEs) του περιφερικού αίματος. Επειδή τα κύτταρα αυτά έχουν μεγάλο χρόνο ζωής και δεν απομακρύνονται από το σπλήνα των ποντικών, παρέχουν ένα μέτρο της μέσης τιμής της χρωμοσωματικής βλάβης που έχει συμβεί καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους, που είναι περίπου ένας μήνας (MacGregor et al., 1990).

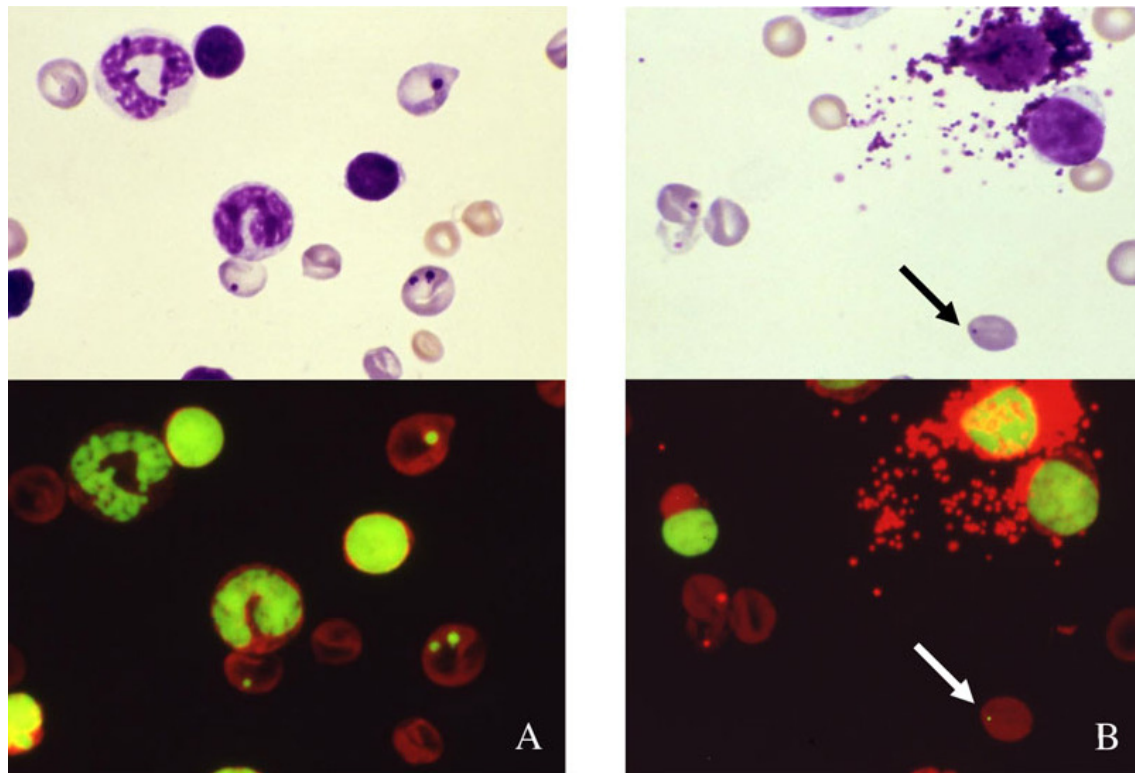
Υπάρχουν διάφορα κριτήρια με βάση τα οποία προσδιορίζεται αν ένα πείραμα με την *in vivo* τεχνική των μικροπυρήνων έχει θετικό αποτέλεσμα, όπως είναι: α) μια δοσο-εξαρτώμενη αύξηση στον αριθμό των κυττάρων με μικροπυρήνα ή β) μια καθαρή αύξηση στον αριθμό των κυττάρων με μικροπυρήνα μετά από μια μόνο δόση χορήγησης και μια μόνο δειγματοληψία. Τα αποτελέσματα του πειράματος θα πρέπει να αναλύονται με στατιστικές μεθόδους (Lovell et al., 1989; Richold et al., 1990). Ωστόσο, η στατιστική σημαντικότητα δεν θα έπρεπε να είναι ο μόνος καθοριστικός παράγοντας για την εξαγωγή συμπερασμάτων, καθώς διάφοροι βιολογικοί παράγοντες πιθανόν να επηρεάσουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Hayashi et al., 2000).

Θετικά αποτελέσματα στην τεχνική των μικροπυρήνων υποδηλώνουν ότι ο εξεταζόμενος παράγοντας επάγει μικροπυρήνες, ως αποτέλεσμα χρωμοσωματικής βλάβης ή βλάβης στη μιτωτική συσκευή των ερυθροβλαστών των ειδών που χρησιμοποιούνται, κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες του πειράματος. Αρνητικά αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι, κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες, ο εξεταζόμενος παράγοντας δεν επάγει χρωμοσωματική ή μιτωτική βλάβη που να οδηγεί στο σχηματισμό μικροπυρήνων στα ερυθροκύτταρα των ειδών που χρησιμοποιούνται (Hayashi et al., 2000).

2.3.5. Επιλογή μεθόδου χρώσης

Μία από τις προκλήσεις της τεχνικής των μικροπυρήνων σε ερυθροκύτταρα τρωκτικών ήταν η ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής μεθόδου χρώσης για τη

διάκριση των PCEs από τα NCEs. Η εφαρμογή της χρώσης Giemsa, όπως προτάθηκε αρχικά από τον Schmid (1975), χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς. Ωστόσο, η διαφορά στην απόχρωση των PCEs και NCEs ήταν συχνά ανεπαίσθητη και απαιτούσε την υποκειμενική κρίση του εκάστοτε μελετητή. Επιπλέον, η παρουσία μορφωμάτων που μοιάζουν με μικροπυρήνες καθώς και η συσσώρευση δομών που επάγονται από συγκεκριμένους χημικούς παράγοντες και περιέχουν RNA, δυσκόλευαν ακόμα περισσότερο την καταμέτρηση. Για να αντιμετωπιστούν αυτά τα προβλήματα, υιοθετήθηκαν μέθοδοι με φθορίζουσες χρωστικές που παρουσιάζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση ως προς τη χρώση όπως συνοψίζεται σε πρόσφατη βιβλιογραφική ανασκόπηση (Heddle et al., 2011). Συγκεκριμένα, είχε



Εικόνα 2.3.5. Πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα με μικροπυρήνες **(Α)** Κύτταρα μυελού των οστών ποντικών με χρώση Giemsa (επάνω) και με χρώση Acridine Orange (κάτω) όπου διακρίνονται μικροπυρήνες που φθορίζουν κιτρινο-πράσινοι. **(Β)** Κύτταρα μυελού των οστών αρουραίων με διασκορπισμένα βασεόφιλα σφαιρίδια, με χρώση Giemsa (επάνω) και με χρώση Acridine Orange (κάτω). Οι πραγματικοί μικροπυρήνες δείχνονται με βέλη (Αναπροσαρμογή από: Heddle et al, 2011).

προταθεί από τους MacGregor et al. (1983), η χρήση της πυρονίνης Υ (pyronin Y), που βάφει μόνο το RNA, και της Hoechst 33258, που βάφει μόνο το DNA, καθώς και η χρήση του πορτοκαλί της ακριδίνης (acridine orange) από τους Hayashi et al. (1983), η οποία και επικράτησε τελικά. Με το πορτοκαλί της ακριδίνης βάφονται και τα δυο, αλλά φθορίζουν διαφορετικά: το RNA φθορίζει κόκκινο, ενώ το DNA φθορίζει κιτρινο-πράσινο. Έτσι, τα ανώριμα ερυθροκύτταρα, που περιέχουν RNA στο κυτταρόπλασμά τους, μπορούν εύκολα να διακριθούν από τα ώριμα ερυθροκύτταρα, που δεν φθορίζουν, αφού δεν περιέχουν καθόλου RNA. Οι μικροπυρήνες είναι τα μόνα στοιχεία που περιέχουν DNA στα ερυθροκύτταρα των θηλαστικών και φθορίζουν κιτρινο-πράσινοι. Επομένως μπορούν εύκολα να ταυτοποιηθούν και να διακριθούν από τα μορφώματα που μοιάζουν με μικροπυρήνες και φθορίζουν κόκκινα (**Εικόνα 2.3.5**).

2.3.6. Πλεονεκτήματα της *in vivo* τεχνικής των μικροπυρήνων

Η καθιέρωση της *in vivo* τεχνικής των μικροπυρήνων οφείλεται στα παρακάτω πλεονεκτήματα (Heddle et al., 1983):

- Οι μικροπυρήνες είναι δυνατόν να παρατηρηθούν καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και ο αριθμός των κυττάρων που μπορεί να καταμετρηθεί είναι ουσιαστικά απεριόριστος.
- Ο μικροπυρήνας μπορεί σχετικά εύκολα να αναγνωριστεί και δεν υπάρχει η ανάγκη σχηματισμού καρυστούπου.
- Η τυχαία επαγωγή των μικροπυρήνων είναι μικρή και σχεδόν ενιαία μεταξύ των ειδών.
- Ο χρόνος λήψης του δείγματος είναι λιγότερο κρίσιμος αφού οι μικροπυρήνες που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης παραμένουν τουλάχιστον μέχρι και την επόμενη μεσόφαση.
- Είναι απλή και γρήγορη μέθοδος συγκρινόμενη με άλλες κυτταρογενετικές μεθόδους, όπως η ανάλυση μεταφάσεων.

Επιπλέον, το γεγονός ότι ο μικροπυρήνας είναι η μόνη δομή που περιέχει DNA στα κύτταρα που αναλύονται με την τεχνική αυτή, επέτρεψε την ανάπτυξη μεθόδων αυτοματοποίησης των μετρήσεων με ανάλυση εικόνας

(image analysis) και κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry), απλοποιώντας ακόμα περισσότερο την τεχνική και αυξάνοντας τη στατιστική ισχύ της (Heddle et al., 2011).

2.3.7. Αυτοματοποίηση των μετρήσεων

Η σχετικά μικρή συχνότητα εμφάνισης μικροπυρήνων στα ερυθροκύτταρα καθιστά την καταμέτρησή τους με τις κλασικές μεθόδους μικροσκοπίας μια πολύ κοπιαστική και χρονοβόρα διαδικασία. Γι' αυτό αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι αυτοματοποίησης των μετρήσεων που βασίζονται κυρίως, όπως προαναφέρθηκε, στις τεχνικές της ανάλυσης εικόνας (image analysis) και της κυτταρομετρίας ροής (Flow cytometry).

Με την τεχνική της ανάλυσης εικόνας, κύτταρα του μυελού των οστών ή του περιφερικού αίματος επιστρώνονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και βάφονται με κατάλληλες χρωστικές. Μια πιο καθαρή εικόνα, απαλλαγμένη από εμπύρηννα κύτταρα και θραύσματα του μυελού των οστών, μπορεί να επιτευχθεί με φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας πριν την επίστρωση, όπως προτάθηκε από τους Romagna & Staniforth (1989). Στη συνέχεια η εικόνα των παρασκευασμάτων προβάλλεται σε υπολογιστή μέσω μιας ενσωματωμένης βιντεοκάμερας. Τα κύτταρα ταυτοποιούνται και καταμετρώνται σύμφωνα με αλγόριθμους που συνυπολογίζουν παραμέτρους όπως το χρώμα, το μέγεθος και το σχήμα τους. Ένα τέτοιο σύστημα ανάλυσης είναι ικανό να καταμετρήσει 1000 ερυθροκύτταρα μέσα σε λιγότερο από 20 λεπτά (Hayashi et al., 2000).

Αντίθετα με τις μικροσκοπικές μεθόδους, η κυτταρομετρία ροής καταμετρά κύτταρα που βρίσκονται μέσα σε υδατικό αιώρημα. Ένα μονοκύτταρο αιώρημα εξέρχεται από τριχοειδές ακροφύσιο και διέρχεται διαμέσου εστιασμένης δέσμης Laser. Η σκέδαση του φωτός καθώς και φθορίζοντα σήματα προσλαμβάνονται από φωτοπολλαπλασιαστές και αποθηκεύονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή συνδεδεμένο σε σειρά. Στις αρχικές εφαρμογές της μεθόδου δεν ήταν εφικτή η διάκριση μεταξύ πρώιμων και ώριμων ερυθροκυττάρων. Μια σημαντική πρόοδος σε αυτό τον τομέα έγινε όταν οι Grawé et al. (1992) πρότειναν μια μέθοδο που βασίζονταν στη χρήση μιας

διπλής χρώσης (Hoechst/thiazole orange) και μπορούσε να διακρίνει τους μικροπυρήνες στον πληθυσμό των πρώιμων ερυθροκυττάρων. Ωστόσο η μέθοδος αυτή απαιτούσε τη χρήση ενός κυτταρομέτρου ροής διπλής δέσμης, που αποτελεί περίπλοκο και δυσεύρετο εξοπλισμό. Η λύση σε αυτό το πρόβλημα δόθηκε από τους Dertinger et al. (1996) που πρότειναν μια απλή και αξιόπιστη μέθοδο κυτταρομετρίας ροής μονής δέσμης που βασίζονταν στη χρώση με ιωδιούχο προπίδιο και αντι-CD71 συνδεδεμένο με φθοριούχο ισοθειοκυάνιο (anti-CD71-Fluorescein Isothiocyanate Conjugated staining, FITC). Με τη μέθοδο αυτή είναι εφικτή η διάκριση μεταξύ των τεσσάρων πληθυσμών ερυθροκυττάρων: πρώιμων και ώριμων, με μικροπυρήνα και χωρίς μικροπυρήνα (Hayashi et al., 2000; Dertinger et al., 2011).

Το πλεονέκτημα της κυτταρομετρίας ροής έναντι της ανάλυσης εικόνας είναι οι πολύ υψηλές ταχύτητες ανάλυσης που μπορεί να πετύχει: μπορεί να αναλύσει δεκάδες χιλιάδες πρώιμα και εκατοντάδες χιλιάδες ώριμα ερυθροκύτταρα μέσα σε λίγα λεπτά (Hayashi et al., 2000). Επιπλέον, επιτρέπει στους ερευνητές να εκτιμήσουν αν οι επαγόμενοι μικροπυρήνες είναι το αποτέλεσμα της δράσης θραυσματογόνων ή ανευπλοειδογόνων παραγόντων. Αυτό το συμπέρασμα μπορεί να εξαχθεί με βάση την ένταση φθορισμού των ερυθροκυττάρων που περιέχουν μικροπυρήνες, που εξαρτάται από την ποσότητα του περιεχόμενου DNA. Τέλος, η εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής επιτρέπει μια πιο αποτελεσματική μελέτη της δόσο-εξαρτώμενης σχέσης μεταξύ των δόσεων χορήγησης του εξεταζόμενου παράγοντα και της συχνότητας των μικροπυρήνων. Εφόσον μπορεί να αυξηθεί απεριόριστα ο αριθμός των αναλυόμενων κυττάρων ανά πειραματόζωο, γίνεται πλέον πρακτικό και εύκολο να αυξηθεί και ο αριθμός των μελετώμενων δόσεων χορήγησης (Dertinger et al., 2011).

Κατά τις εργασίες του 4^{ου} διεθνούς συνεδρίου με θέμα τις Διαδικασίες Ελέγχου Γενοτοξικότητας (International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, IWGTP) επικυρώθηκε επίσημα η χρήση των παραπάνω μεθόδων αυτοματοποίησης των μετρήσεων κατά τη διεξαγωγή μελετών με την *in vivo* τεχνική των μικροπυρήνων (Hayashi et al., 2007).

2.3.8. Ανίχνευση του περιεχομένου των μικροπυρήνων

Οι μικροπυρήνες, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα, μπορεί να σχηματιστούν από άκεντρα χρωμοσωματικά θραύσματα ή από ολόκληρα χρωμοσώματα που καθυστερούν στην ανάφαση. Οι τελευταίοι είναι δυνατόν να αναγνωριστούν από το μεγάλο μέγεθός τους (Yamamoto & Kikuchi, 1980), με τη βοήθεια της τεχνικής C-banding (Verschaeve et al., 1988) ή μετρώντας το περιεχόμενο τους σε DNA (Vanderkerken et al., 1989). Ωστόσο, επειδή οι μέθοδοι αυτοί δεν ήταν πολύ αξιόπιστες, αναπτύχθηκαν δυο μοριακές κυτταρογενετικές μέθοδοι που ανιχνεύουν την παρουσία κεντρομερικών περιοχών στους μικροπυρήνες διακρίνοντας έτσι αν η προέλευσή τους είναι θραυσματογόνος ή ανευπλοειδογόνος: η ανοσοχημική μέθοδος CREST και η τεχνική της *in situ* υβριδοποίησης με φθοριοχρώματα (Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH) (Hayashi et al., 2000). Η αρχή αυτών των δυο μεθόδων έχει ήδη αναλυθεί στην ενότητα της *in vitro* τεχνικής των μικροπυρήνων.

Η εφαρμογή της μεθόδου CREST στην τεχνική των μικροπυρήνων με μυελό των οστών τρωκτικών περιγράφεται λεπτομερώς από τους Miller & Adler (1990).

Μια μεθοδολογία για την εφαρμογή της τεχνικής FISH με κεντρομερικούς DNA ανιχνευτές, που μπορεί να εφαρμοστεί σε όλους τους τύπους κυττάρων που περιέχουν μικροπυρήνες, περιγράφεται από τους Pinkel et al. (1986).

Στα παρασκευάσματα αρνητικών μαρτύρων, το ποσοστό των σημειωμένων μικροπυρήνων που περιέχουν την κεντρομερική περιοχή είναι περίπου 50%. Το 70% σχεδόν των μικροπυρήνων που επάγονται από επιβεβαιωμένους ανευπλοειδογόνους παράγοντες (όπως η κολχικίνη και η βιμπλαστίνη) είναι σημειωμένοι, ενώ από τους μικροπυρήνες που επάγονται από θραυσματογόνους παράγοντες (όπως είναι η υδροκινόνη και η μιτομυκίνη C), μόλις ένα ποσοστό 5 με 15% εμφανίζονται με σήμα. Προκειμένου να χαρακτηριστεί ως ανευπλοειδογόνος ή θραυσματογόνος η δράση κάποιου χημικού παράγοντα, ενδείκνυται να χρησιμοποιείται ως δείκτης αναφοράς ο αριθμός των πολυχρωματικών ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνα ανά 1000 πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα που περιέχουν την κεντρομερική περιοχή.

Το κύριο μειονέκτημα της τεχνικής FISH που έχει αναφερθεί προς το παρόν, είναι ότι δεν μπορεί να ξεχωρίσει τα πρώιμα από τα ώριμα ερυθροκύτταρα (Hayashi et al., 2000).

Το συμπέρασμα στο οποίο κατέληξε η ομάδα εργασίας πάνω στην *in vivo* τεχνική των μικροπυρήνων (CSGMT) είναι ότι οι τεχνικές CREST και FISH θεωρούνται αξιόπιστες για την ανίχνευση της ανευπλοειδογόνου δράσης χημικών παραγόντων, αρκεί να εξασφαλίζεται ότι συλλέγονται τα κατάλληλα προς ανάλυση δείγματα (Hayashi et al., 2000).

2.3.9. Σημασία και εφαρμογές της *in vivo* τεχνικής των μικροπυρήνων

Ο αριθμός των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί με την εφαρμογή της *in vivo* τεχνικής των μικροπυρήνων για την εκτίμηση της γενotoξικής δράσης διαφόρων χημικών παραγόντων, είναι πάρα πολύ μεγάλος. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι μόνο κατά το διάστημα των ετών 1980 με 1987, έχουν δημοσιευτεί αποτελέσματα μελετών που αφορούν την εξέταση 414 παραγόντων, τα οποία συγκεντρώθηκαν και εκτιμήθηκαν στα πλαίσια ενός προγράμματος (Gene-Tox Program) του Οργανισμού Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (Mavournin et al., 1990).

Μια σημαντική μελέτη που έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην καθιέρωση της τεχνικής ως γενικής τοξικολογικής δοκιμασίας ελέγχου (general toxicology test), και διεξήχθη από την ομάδα CSGMT/MMS, αφορούσε τον έλεγχο 15 πρότυπων μεταλλαξιγόνων παραγόντων οι οποίοι χορηγήθηκαν στοματικά σε αρουραίους, σε επαναλαμβανόμενες δόσεις, για 28 μέρες. 13 από τους παραπάνω παράγοντες έδωσαν θετικά αποτελέσματα μέσα στο εκτιμώμενο εύρος χορήγησης της δόσης της γενικής τοξικολογικής δοκιμασίας ελέγχου (Hamada et al., 2001). Η ίδια ομάδα εργασίας μελέτησε επίσης, με την *in vivo* τεχνική των μικροπυρήνων, πάνω από 100 χημικές ουσίες που εκτιμήθηκαν από τον Διεθνή Οργανισμό για την Έρευνα πάνω στον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer, IARC) ως καρκινογόνες (Group A), πιθανώς καρκινογόνες (Group B) και δυνητικά καρκινογόνες (Group C) για τον άνθρωπο. Τα ποσοστά των θετικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την εφαρμογή της τεχνικής των μικροπυρήνων ήταν 90%,

65% και 60% για την ομάδα A, την ομάδα B και την ομάδα C αντίστοιχα (Morita et al., 1997).

Η χρήση της *in vivo* τεχνικής των μικροπυρήνων με ερυθροκύτταρα τρωκτικών για τη διεξαγωγή τοξικολογικών μελετών έχει πλέον επικυρωθεί από διεθνείς οργανισμούς και εφαρμόζεται τόσο σε ερευνητικό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο θέσπισης διεθνών κανονισμών, οδηγιών και νομοθετικών ρυθμίσεων για τη διασφάλιση της υγείας (US EPA, 1998; US FDA/CFSAN, 2000). Αποτελεί την πρώτη επιλογή, ανάμεσα σε άλλες *in vivo* τεχνικές, για τον περαιτέρω έλεγχο γενοτοξικότητας όταν έχουν προκύψει θετικά αποτελέσματα από μια *in vitro* δοκιμασία ελέγχου (Morita et al., 2011). Για το σκοπό αυτό έχουν εκδοθεί οδηγίες που ανακεφαλαιώνουν τα προτεινόμενα από τις επιστημονικές ομάδες εργασίας πρωτόκολλα μεθοδολογίας, τα οποία είναι διεθνώς αποδεκτά και εναρμονισμένα (OECD, 1997; vLex United States, 2011).

Η *in vivo* τεχνική των μικροπυρήνων είναι δυνατόν να εφαρμοστεί και σε άλλους ιστούς των τρωκτικών, εκτός από το μυελό των οστών και το περιφερικό αίμα. Αυτό κρίνεται απαραίτητο, για παράδειγμα, όταν ερευνάται η δράση κάποιου θραυσματογόνου παράγοντα που δεν φτάνει τους αιμοποιητικούς ιστούς επειδή ο ίδιος ή κάποιοι ενεργοί μεταβολίτες του είναι ασταθείς ή έχουν πολύ μικρή διάρκεια ζωής (Hayashi et al., 2000). Έτσι, έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα για την εφαρμογή της τεχνικής σε εξειδικευμένους ιστούς-στόχους (Hayashi et al., 2000; Morita et al., 2011) όπως είναι:

- Το συκώτι: Επειδή αποτελεί το πιο ενεργό όργανο για το μεταβολισμό φαρμάκων και οι παράγοντες που σχηματίζουν ασταθείς μεταβολίτες, αναμένεται να είναι πιο ενεργοί σε αυτόν τον ιστό. Διάφοροι καρκινογόνοι παράγοντες που έδωσαν αρνητικά ή ασθενή θετικά αποτελέσματα με την εφαρμογή της τεχνικής σε ερυθροκύτταρα, αποδείχτηκαν γενοτοξικοί για τα ηπατοκύτταρα.
- Το εντερικό επιθήλιο: Αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους ιστούς καρκινογένεσης στον άνθρωπο και είναι κατάλληλο για την εκτίμηση κινδύνων που προέρχονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες που

εισέρχονται στο ανθρώπινο σώμα μέσω της τροφικής αλυσίδας, όπως: φυτοφάρμακα, συστατικά τροφίμων, φάρμακα.

- Το δέρμα: Είναι κατάλληλο για την ανίχνευση της *in vivo* φωτογενετοξικότητας που συνδέεται με την έκθεση στον ήλιο ή σε χημικούς παράγοντες όπως καλλυντικά ή φάρμακα που έρχονται σε επαφή με το δέρμα.
- Ο σπλήνας, που αποτελεί κι αυτός ιστό ερυθροποίησης στα ποντίκια.
- Οι πνεύμονες: Είναι κατάλληλοι για την εκτίμηση της έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες που εισέρχονται μέσω της αναπνευστικής οδού.
- Το στομάχι: Είναι σημαντικό γιατί αποτελεί σε πολλές περιπτώσεις το πρώτο σημείο του σώματος που έρχεται σε άμεση επαφή με χημικούς παράγοντες.
- Η ουροδόχος κύστη: Είναι ένας ιστός εκτεθειμένος σε υδατοδιαλυτούς χημικούς παράγοντες που εκκρίνονται μέσω των ούρων, όπως για παράδειγμα οι ογκογόνες ουσίες της τάξης των ναφθυλαμινών, των βενζιδινών ή των αμινοδιφαινυλίων.
- Τα εμβρυϊκά κύτταρα: Είναι κατάλληλα για την ανίχνευση γενετοξικής δράσης παραγόντων που επιδρούν μέσω του πλακούντα. Πιστεύεται ότι παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA, μπορούν μέσω του πλακούντα, να επάγουν επίσης εμβρυοτοξικότητα, εγγενείς δυσμορφίες, όγκους μετά τη γέννηση, κληρονομήσιμες μεταλλάξεις στα γαμετικά κύτταρα και άλλες αρνητικές επιπτώσεις κατά την ανάπτυξη. Συνήθως χρησιμοποιούνται κύτταρα από το συκώτι ή το αίμα των εμβρύων ή από το αίμα των νεογέννητων.
- Τα σπερματικά κύτταρα: Είναι κατάλληλα για την ανίχνευση βλαβών που έχουν συμβεί στα γαμετικά κύτταρα και κατ' επέκταση για την εκτίμηση πιθανών αρνητικών επιπτώσεων στις επόμενες γενιές κυττάρων.
- Το στοματικό επιθήλιο και
- Η κοιλική κοιλότητα

Τα αποτελέσματα δημοσιευμένων μελετών που έχουν κάνει χρήση των παραπάνω ιστών, συγκρινόμενα με τα αποτελέσματα αντίστοιχων μελετών

που έχουν χρησιμοποιήσει ερυθροκύτταρα, αναφέρονται από τους Hayashi et al. (2000 & 2007), καθώς και από τους Morita et al. (2011).

Με την εισαγωγή της κυτταρομετρίας ροής και της δειγματοληψίας περιφερικού αίματος στην εφαρμογή της τεχνικής, έγινε πλέον αποδεκτή και αποτελεσματική για τον έλεγχο των γενετικών βλαβών και σε άλλα είδη, εκτός των αρουραίων και των ποντικών, όπως είναι ο σκύλος (Harper et al., 2007), τα πρωτεύοντα θηλαστικά (Hotchkiss et al., 2008) και κυρίως ο άνθρωπος (Abramsson-Zetterberg et al., 2000; Offer et al., 2005; Dertinger et al., 2007). Προσφέροντας μια ποσοτική εκτίμηση των *in vivo* κινδύνων που συνδέονται με την έκθεση σε πιθανούς γενοτοξικούς παράγοντες, η εφαρμογή της τεχνικής υπόσχεται σημαντική πρόοδο στην προσπάθεια εκτίμησης των παραγόντων που επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία και ασφάλεια (Heddle et al., 2011).

3. Ανταλλαγές αδελφών χρωματίδων

Οι ανταλλαγές αδελφών χρωματίδων (Sister Chromatid Exchanges, SCEs) είναι αμοιβαίες ανταλλαγές τμημάτων DNA σε ομόλογες θέσεις μεταξύ των αδελφών χρωματίδων ενός διπλασιαζόμενου χρωμοσώματος. Πρόκειται για ένα φυσικό φαινόμενο που συμβαίνει αποκλειστικά κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του χρωμοσωματικού DNA και πραγματοποιείται μέσω θραύσεων των αλυσίδων του DNA και επανένωσής τους. Έχει προταθεί ότι αποτελούν ένα πιθανό μηχανισμό των κυττάρων να αντιμετωπίσουν τις βλάβες που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της αντιγραφής και δεν επιδιορθώνονται. Έτσι, αυξημένες θραύσεις στις αλυσίδες του DNA αναμένεται να οδηγήσουν σε αυξημένα επίπεδα ανταλλαγών (Das, 1988).

Η αποδεδειγμένη ικανότητα διαφόρων χημικών παραγόντων να επάγουν αυξημένες συχνότητες ανταλλαγών προκαλώντας βλάβες στο γενετικό υλικό, καθώς και η δυνατότητα παρατήρησης και καταμέτρησης των ανταλλαγών σε καλλιεργημένα κύτταρα, έχουν αναγάγει την ανίχνευση ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων σε μια από τις σημαντικότερες μεθόδους για τη μελέτη γενοτοξικότητας (Albertini et al., 2000).

3.1. Μέθοδοι παρατήρησης των ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων

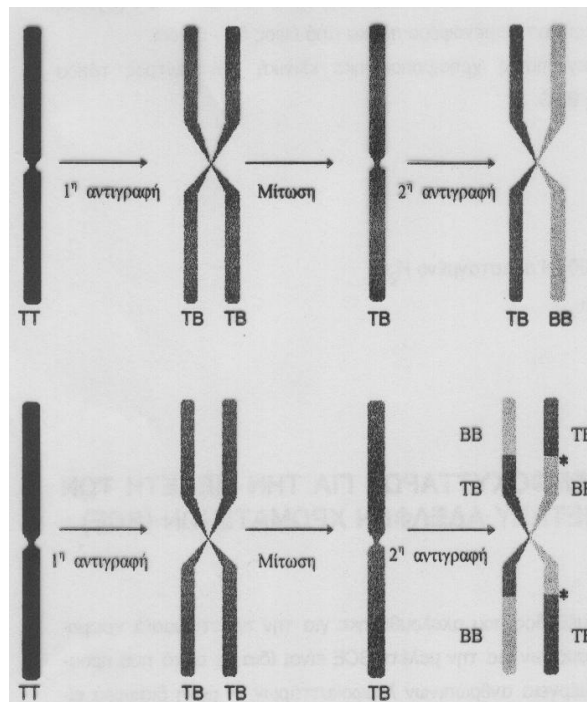
Κάθε κύτταρο που διαιρείται, ανάμεσα σε δυο διαδοχικές μιτώσεις, περνάει από μια ενδιάμεση φάση (μεσόφαση), η οποία περιλαμβάνει τρεις επιμέρους φάσεις: τη φάση G1, που προηγείται της σύνθεσης του DNA, τη φάση S, όπου γίνεται η σύνθεση του DNA, και τη φάση G2, που έπεται της σύνθεσης του DNA (Howard & Pelc, 1951). Κατά τη διάρκεια της φάσης S, κάθε τμήμα DNA διπλασιάζεται και παραμένει ενωμένο με το αντίγραφό του στο κεντρομέρος, σχηματίζοντας έτσι τις δυο αδελφές χρωματίδες ενός χρωμοσώματος. Οι αδελφές χρωματίδες είναι δυνατόν να παρατηρηθούν προς το τέλος της πρόφασης ή στην αρχή της μετάφασης της μίτωσης, πριν αποχωριστούν στα θυγατρικά κύτταρα (Wilson & Thompson, 2007). Οι ανταλλαγές μεταξύ των αδελφών χρωματίδων συμβαίνουν, όπως

προαναφέρθηκε, κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του γενετικού υλικού και μπορούν να παρατηρηθούν σε μεταφασικά κύτταρα που έχουν διανύσει δυο κύκλους αντιγραφής, μετά από κατάλληλη σήμανση και χρώση, ώστε οι δυο αδελφές χρωματίδες να φαίνονται διαφορετικά βαμμένες (OECD, 1986).

Η πρώτη ένδειξη σχηματισμού ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων προήλθε το 1938 από μελέτες της Mc Clintock πάνω στη γενετική συμπεριφορά των δακτυλιωτών χρωμοσωμάτων στο καλαμπόκι. Μετά από περίπου 20 χρόνια, ο Taylor (1957), παρατήρησε για πρώτη φορά ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων χρησιμοποιώντας την τεχνική της αυτοραδιογραφίας σε συνδυασμό με ραδιενεργό σήμανση του DNA με τριτιωμένη θυμιδίνη σε χρωμοσώματα ακροριζίων της *Vicia faba*. Η μέθοδος αυτή όμως παρείχε μικρή διακριτική ικανότητα. Αργότερα, μια απλή, μη-ραδιενεργός, αλλά πιο αποτελεσματική τεχνική χρώσης, ανακαλύφθηκε από τον Latt (1973), ο οποίος χρησιμοποίησε τη βρωμοδεοξουριδίνη (5'-bromodeoxyuridine, BrdU), μια χημική ουσία ανάλογη της θυμίνης, σε συνδυασμό με τη φθορίζουσα χρωστική Hoechst 33258, για να διαφοροποιήσει χρωματικά τις αδελφές χρωματίδες και να αποκαλύψει τις ανταλλαγές μεταξύ τους. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου ήταν ότι ο διαφορετικός φθορισμός των αδελφών χρωματίδων εξασθενούσε γρήγορα. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, οι Perry και Wolff (1974), ανέπτυξαν μια τροποποιημένη μέθοδο, την Fluorescence plus Giemsa (FPG method), η οποία περιλαμβάνει ένα συνδυασμό φθορίζουσών χρωστικών με τη χρωστική Giemsa. Αυτός επιτυγχάνεται με καλλιέργεια των κυττάρων παρουσία BrdU, χρώση των παρασκευασμάτων με Hoechst 33258, έκθεση αυτών στο φως, επώαση σε διάλυμα αλάτων σε θερμοκρασία 60° C και τέλος χρώση με Giemsa. Η μέθοδος αυτή έγινε δημοφιλής γιατί η αντίθεση μεταξύ των αδελφών χρωματίδων ήταν πολύ καλή και τα παρασκευάσματα μπορούσαν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η βρωμοδεοξουριδίνη ενσωματώνεται στις αλυσίδες του DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής και, επειδή η αντιγραφή είναι ημισυντηρητική, η ενσωμάτωση γίνεται στο θυγατρικό κλώνο κάθε δίκλωνου μορίου. Μετά από ένα δεύτερο κύκλο αντιγραφής παρουσία BrdU, η μια χρωματίδα κάθε μεταφασικού χρωμοσώματος είναι μονο-υποκατεστημένη με BrdU, ενώ η

αδελφή της χρωματίδα είναι διπλο-υποκατεστημένη. Η BrdU έχει την ιδιότητα να «ξεθωριάζει» τις φθορίζουσες χρωστικές, έτσι ώστε οι μονο-υποκατεστημένες χρωματίδες να φθορίζουν πιο έντονα μετά από χρώση, ενώ οι διπλο-υποκατεστημένες χρωματίδες εμφανίζουν αχνό φθορισμό, επιτρέποντας έτσι να γίνουν ορατές οι ανταλλαγές (Das, 1988; Wilson & Thompson, 2007). (**Εικόνα 3.1.1**).

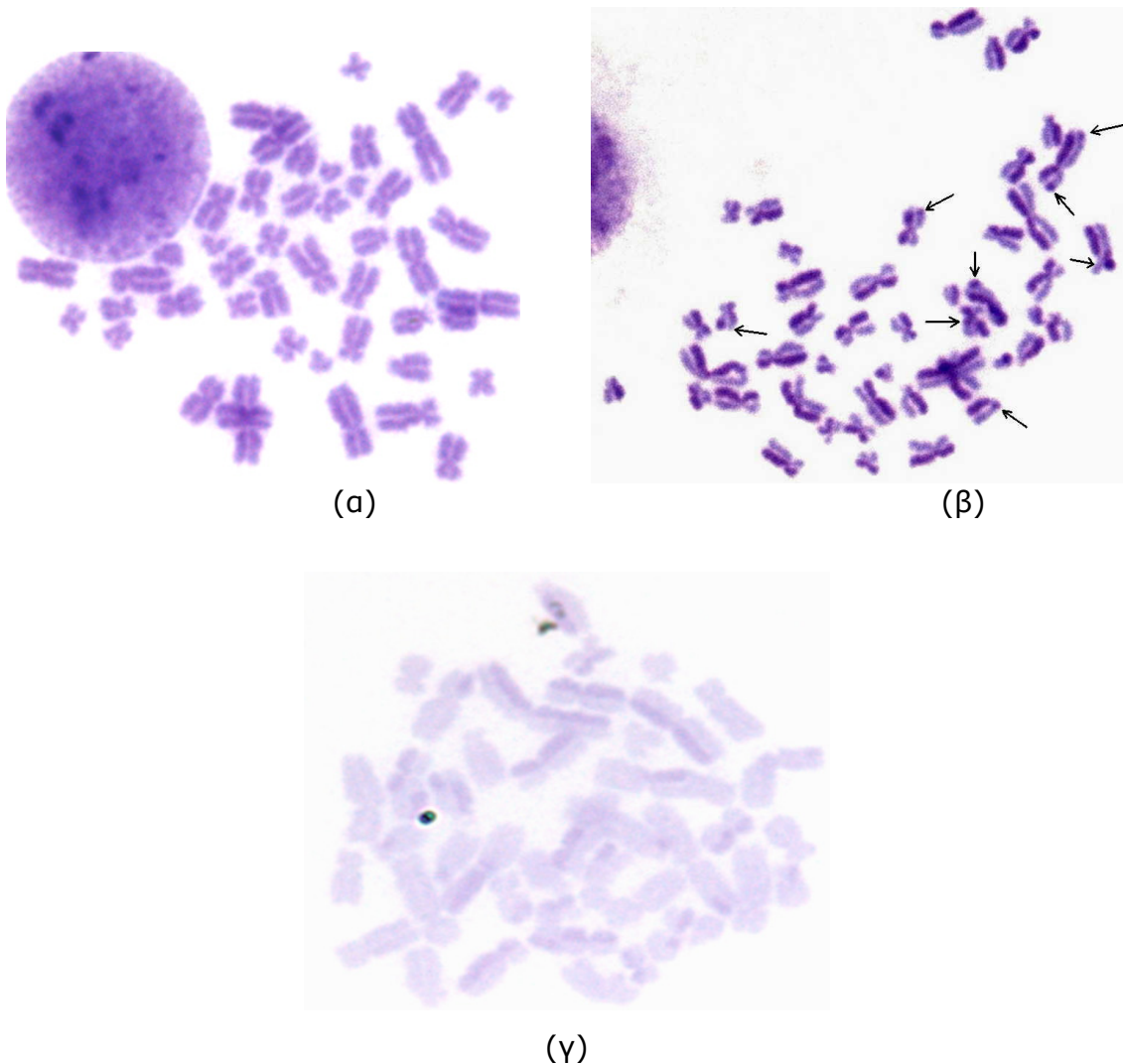


Εικόνα 3.1.1. Διαγραμματική απεικόνιση της διαφορετικής ενσωμάτωσης της BrdU μεταξύ των αδελφών χρωματίδων καθώς και πιθανών ανταλλαγών μεταξύ τους. Με TT απεικονίζεται η χρωματίδα που έχει και στις δυο αλυσίδες της Θυμίνη, με TB η χρωματίδα που είναι μονο-υποκατεστημένη με BrdU, ενώ με BB η χρωματίδα που είναι διπλο-υποκατεστημένη με BrdU (Mange & Mange, 1990).

Το μοναδικό μειονέκτημα της BrdU είναι ότι η ίδια επάγει ανταλλαγές όταν χρησιμοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Σε χαμηλές όμως συγκεντρώσεις, τα επίπεδα των ανταλλαγών παραμένουν σταθερά. Γι' αυτό είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί η ελάχιστη δυνατή απαιτούμενη συγκέντρωση της ουσίας για κάθε είδος και κάθε σύστημα μελέτης (Das, 1988).

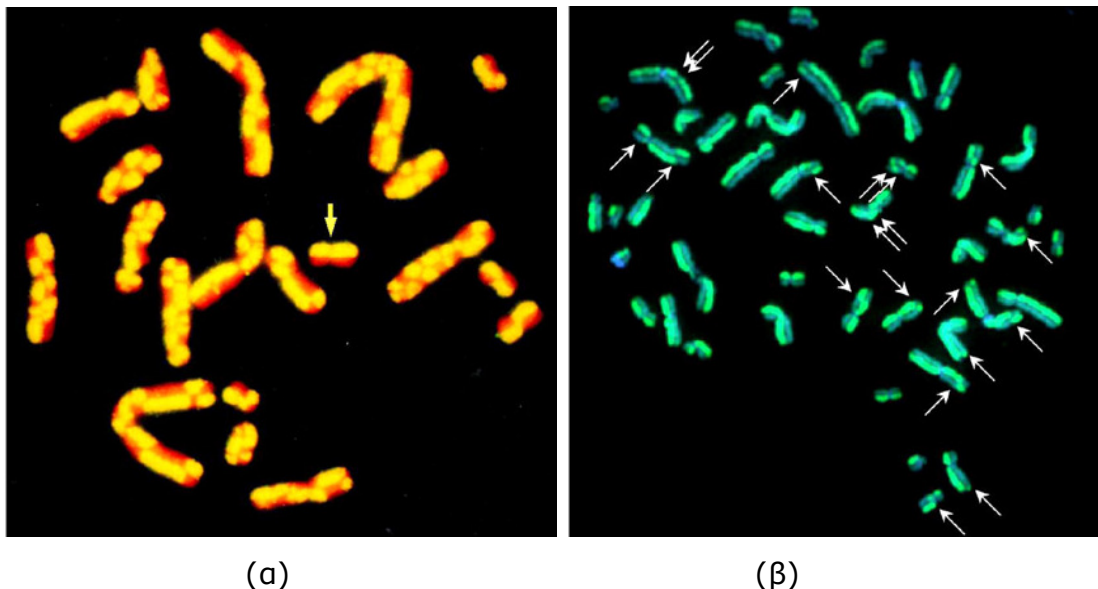
Μετά την εφαρμογή της χρώσης Giemsa, κύτταρα που έχουν διανύσει έναν κύκλο αντιγραφής παρουσία BrdU εμφανίζουν χρωμοσώματα με ομοιόμορφη, έντονη χρώση και αναγνωρίζονται ως M_1 διαίρεσης κύτταρα. Κύτταρα που έχουν διανύσει δυο κύκλους αντιγραφής παρουσία BrdU

εμφανίζουν χρωμοσώματα με τη μια χρωματίδα έντονα βαμμένη και την άλλη αχνά βαμμένη και αναγνωρίζονται ως M_2 διαίρεσης κύτταρα. Τέλος, κύτταρα που έχουν διανύσει τρεις ή περισσότερους κύκλους αντιγραφής παρουσία BrdU εμφανίζουν χρωμοσώματα και με τις δυο χρωματίδες αχνά βαμμένες και αναγνωρίζονται ως M_3 διαίρεσης κύτταρα. Η καταμέτρηση των ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων για τον υπολογισμό της συχνότητάς τους γίνεται σε M_2 μεταφασικά κύτταρα (**Εικόνα 3.1.2**). Η καθυστέρηση των κυτταρικών διαιρέσεων που προκαλείται από διάφορες χημικές ουσίες μπορεί να εκτιμηθεί από τη μεταβολή στη σχετική αναλογία των μεταφάσεων M_1 , M_2 και M_3 σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Tice et al., 1976).



Εικόνα 3.1.2. Φωτογραφίες μεταφάσεων M_1 (α), M_2 (β) και M_3 (γ) με χρήση της μεθόδου Fluorescence plus Giemsa. Ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων διακρίνονται στη φωτογραφία (β) με βέλη (Γ. Ντέμσια, Χ. Μόσχου).

Μια εναλλακτική μέθοδος της χρώσης FPG, η οποία απαιτεί την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, χρησιμοποιεί ένα αντίσωμα που προσδένεται στις υποκατεστημένες με BrdU αλυσίδες DNA, μετά την αποδιάταξη. Η χρώση στη συνέχεια με ιωδιούχο προπίδιο (κόκκινο χρώμα στην **εικόνα 3.1.3.α**) ή με τη φθορίζουσα χρωστική DAPI (μπλε χρώμα στην **εικόνα 3.1.3.β**) επιτρέπει την εύκολη διάκριση ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι απαιτούνται χαμηλά επίπεδα υποκατάστασης με BrdU, ελαχιστοποιώντας κατ' αυτόν τον τρόπο τις επαγόμενες ανταλλαγές από την BrdU (Pinkel et al., 1985).



Εικόνα 3.1.3. (α) Εξαιρετικά αυξημένα επίπεδα ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων σε μεταφασικά κύτταρα ινδικών χοιριδίων CHO, βαμμένα με ιωδιούχο προπίδιο. Το βέλος δείχνει το μοναδικό χρωμόσωμα που δεν εμφανίζει φαινόμενα ανταλλαγής. **(β)** Χρωμοσώματα ανθρώπινων ινοβλαστών βαμμένα με χρώση DAPI. Τα βέλη δείχνουν σημεία ανταλλαγών (Wilson & Thompson, 2007).

3.2. Μηχανισμοί δημιουργίας ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων

Είναι αποδεδειγμένο ότι για να δημιουργηθούν ανταλλαγές αδελφών χρωματίδων, απαραίτητη προϋπόθεση είναι να περάσει το κύτταρο από τη φάση S της σύνθεσης του DNA (Wolff et al., 1974; Kato, 1974) και ότι τα φαινόμενα ανταλλαγής παρατηρούνται στο σημείο της διχάλας αντιγραφής

(Kato, 1980; Cortés et al., 1993; Rodriguez-Reyes & Morales-Ramirez, 2003).

Παλαιότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι η δημιουργία ανταλλαγών οφείλεται στην επιβράδυνση ή τη διακοπή της αντιγραφής εξαιτίας της δράσης παραγόντων που προκαλούν δίκλωνα ρήγματα στο DNA (double strand breaks, DSBs). Η επιβράδυνση αυτή επηρεάζει και την αντιγραφή γειτονικών μονάδων, έτσι ώστε το DNA που βρίσκεται στα όρια γειτονικών μονάδων αντιγραφής να παραμένει μη-διπλασιασμένο για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αυτό αυξάνει την πιθανότητα δημιουργίας δίκλωνων ρηγμάτων όταν έχει ολοκληρωθεί η αντιγραφή στη μια μονάδα αντιγραφής, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ανταλλαγής μεταξύ των θυγατρικών κλώνων του διπλασιασμένου τμήματος του DNA με τους πατρικούς κλώνους του μη-διπλασιασμένου τμήματος της γειτονικής μονάδας αντιγραφής (Painter, 1980).

Στο μηχανισμό δημιουργίας ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων, εμπλέκονται και οι DNA τοποϊσομεράσες. Τα ένζυμα αυτά έχουν την ικανότητα να δημιουργούν δίκλωνα ρήγματα στο DNA και να τα επανασυνδέουν, έτσι ώστε να ξετυλίγουν τους υπερελικωμένους νεοσυντιθέμενους κλώνους (Cleaver, 1981; Pommier et al., 1985; Dillehay et al., 1989).

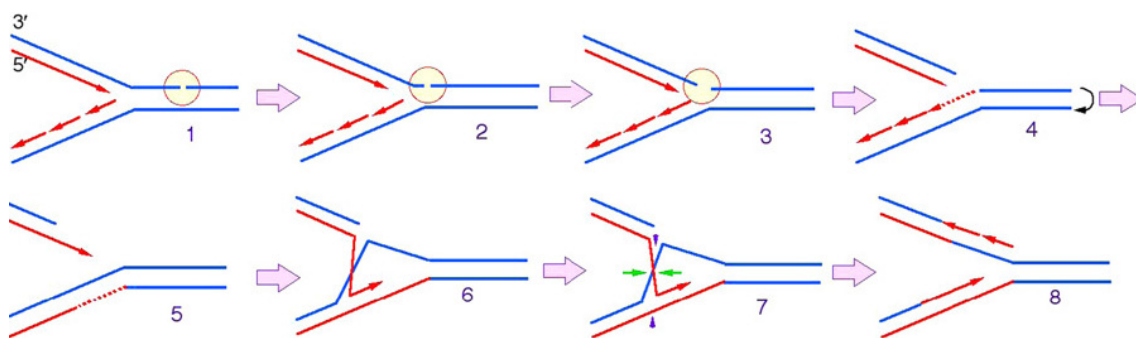
Σύμφωνα με τον Cleaver (1981), η δημιουργία της ανταλλαγής ξεκινά πίσω από τη διχάλα αντιγραφής και οφείλεται σε σφάλματα που δημιουργούνται κατά το ξετύλιγμα των θυγατρικών μορίων από την τοποϊσομεράση II. Όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος της μονάδας αντιγραφής, τόσο πιο απαιτητική και δύσκολη είναι η δράση της τοποϊσομεράσης για το ξετύλιγμα και τόσο περισσότερο αυξάνεται η πιθανότητα σφαλμάτων που θα οδηγήσουν στη δημιουργία ανταλλαγών.

Σύμφωνα με τους Pommier et al. (1985), η δημιουργία ανταλλαγών οφείλεται σε παράγοντες που παρεμβάλλονται μεταξύ των δυο κλώνων του DNA (intercalating agents) και παγιδεύουν τα σύμπλοκα της τοποϊσομεράσης II με το DNA, επάγοντας μ' αυτόν τον τρόπο δίκλωνα ρήγματα. Μετά την απομάκρυνση του χημικού παράγοντα, τα ρήγματα είναι δυνατόν να επουλωθούν με λάθος τρόπο, ανταλλάσσοντας τμήματα των

νεοσυντιθέμενων αλυσίδων DNA και καταλήγοντας έτσι στη δημιουργία ανταλλαγής μεταξύ των αδελφών χρωματίδων.

Τέλος, οι Dillehay et al. (1989), εξετάζοντας όλα τα μοντέλα που είχαν προταθεί μέχρι τότε για το μηχανισμό δημιουργίας ανταλλαγών, υποστηρίζουν ότι το καθένα από αυτά μπορεί να συσχετιστεί με τη λειτουργία των τοποϊσομερασών, δηλαδή την ιδιότητά τους να δημιουργούν σύμπλοκα με το DNA και να ξετυλίγουν τους κλώνους.

Πιο πρόσφατες μελέτες εμπλέκουν τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου στο μηχανισμό δημιουργίας ανταλλαγών. Συγκεκριμένα, τα περισσότερα μοντέλα που έχουν προταθεί, υποστηρίζουν ότι τα πρωταρχικά γεγονότα που επάγουν ανταλλαγές είναι μονόκλωνα ρήγματα (single strand breaks, SSBs) στις αλυσίδες του DNA σε περιοχές όπου συμβαίνει αντιγραφή. Μετά το σπάσιμο της διχάλας αντιγραφής στο σημείο του μονόκλωνου ρήγματος, ακολουθεί ο σχηματισμός ενός δίκλωνου ρήγματος, το οποίο τελικά υπόκειται στη δράση κάποιου επιδιορθωτικού μηχανισμού (Wilson & Thompson, 2007). Το κύτταρο διαθέτει μηχανισμούς επιδιόρθωσης των δίκλωνων ρηγμάτων στο DNA, οι οποίοι διακρίνονται κυρίως σε 2 τύπους: την μη-ομόλογη σύνδεση των άκρων (Non-Homologous End Joining, NHEJ) και τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Homologous Recombination, HR). Ο πρώτος μηχανισμός λειτουργεί κυρίως κατά τη G1 φάση και επιδιορθώνει με μικρότερη πιστότητα, ενώ ο δεύτερος λειτουργεί κατά το τέλος της S φάσης ή κατά τη G2 φάση και χρησιμοποιεί ένα ομόλογο χρωμόσωμα ή μια αδελφή χρωματίδα ως καλούπι για την ακριβή επιδιόρθωση ενός ρήγματος (Natarajan, 2002). Παρόλο που έχουν προταθεί κάποια μοντέλα σύμφωνα με τα οποία ο επιδιορθωτικός μηχανισμός NHEJ ενέχεται στην πρόκληση ανταλλαγών, έχει αποδειχτεί ότι οι ανταλλαγές προκαλούνται κυρίως μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού (Sonoda et al., 1999; Wilson & Thompson, 2007). Η στιγμή της αντιγραφής του DNA θεωρείται η πιο κατάλληλη για να παρατηρηθούν ανταλλαγές επειδή οι ομόλογες δίκλωνες αλυσίδες βρίσκονται κοντά και μπορεί εύκολα να συμβεί κάποιο γεγονός ομόλογου ανασυνδυασμού (Rodriguez-Reyes & Morales-Ramirez, 2003). Ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό περιγράφεται στην **εικόνα 3.2**:



Εικόνα 3.2. Μηχανισμός δημιουργίας ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Wilson & Thompson, 2007).

Όταν σε μια από τις πατρικές αλυσίδες του DNA υπάρχει ένα σπάσιμο ή ένα κενό σε μια διχάλα αντιγραφής (βήμα 1 & 2), η διχάλα αντιγραφής λύεται (βήμα 3). Γεγονότα επιδιόρθωσης της σύνθεσης συμβαίνουν στο κενό της συμπληρωματικής, ακέραιης, πατρικής αλυσίδας του DNA (βήμα 4). Η συνέχιση της σύνθεσης απέναντι από τη σπασμένη πατρική αλυσίδα του DNA θα δημιουργήσει ένα μονόκλωνο ελεύθερο 3' άκρο (βήμα 5), το οποίο είναι δυνατόν να ζευγαρώσει με τη συμπληρωματική πατρική αλυσίδα σε μια περιοχή που είναι μερικώς αποδιαταγμένη (βήμα 6), καταλήγοντας έτσι στο σχηματισμό μιας διακλάδωσης Holliday (Holliday, 1964). Λύση της διακλάδωσης Holliday κατά την κατεύθυνση που δείχνουν τα πράσινα βέλη (βήμα 7) θα οδηγήσει στο σχηματισμό μιας ανταλλαγής (Wilson & Thompson, 2007).

Οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του κυττάρου μπορούν να επιδιορθώνουν αποτελεσματικά τις βλάβες που επάγονται στο DNA από διάφορους χημικούς παράγοντες. Υπάρχει όμως περίπτωση, κάποιοι μεταλλαξιγόνοι παράγοντες να εμποδίζουν τις διαδικασίες επιδιόρθωσης, παρεμβαλλόμενοι σε κάποιο από τα στάδια επιδιόρθωσης ή επηρεάζοντας τα ένζυμα που εμπλέκονται σ' αυτές. Όταν αυτό συμβεί στη φάση της αντιγραφής του DNA, προκαλούνται χρωματιδικά θραύσματα και αυξημένες ανταλλαγές αδελφών χρωματίδων (Natarajan, 2002). Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη σύνθεση πρωτεϊνών, όπως είναι οι XRCC1 (X-ray Repair Cross-Complementing 1), PARP-1 (Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1) και DNA LIG3, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση των μονόκλωνων ρηγμάτων του DNA,

συνδέονται με αυξημένες συχνότητες ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη σύνθεση πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τον ομόλογο ανασυνδυασμό συνδέονται επίσης με αλλαγές στη συχνότητα των ανταλλαγών. Για παράδειγμα, η ελαττωματική ελικάση BLM, η οποία έχει βρεθεί σε κύτταρα ασθενών με το αυτοσωμικό σύνδρομο Bloom (Bloom Syndrome, BS), οδηγεί σε μεγάλη αύξηση της συχνότητας των ανταλλαγών. Αντίθετα, κύτταρα με μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη σύνθεση της πρωτεΐνης Rad51 δεν είναι ικανά να πραγματοποιήσουν ομόλογο ανασυνδυασμό και παρουσιάζουν χαμηλότερες συχνότητες ανταλλαγών (Wilson & Thompson, 2007). Αυξημένη επαγωγή ανταλλαγών παρουσιάζουν και τα κύτταρα που φέρουν μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη σύνθεση της πρωτεΐνης MGMT (MethylGuanine-MethylTransferase), η οποία είναι υπεύθυνη για την επιδιόρθωση μεθυλιώσεων που επάγονται στο DNA από παράγοντες όπως η MNU (N-Methyl-N-Nitrosourea) και η MNNG (N-Methyl-N'-Nitro-N- Nitrosoguanidine) (Kaina, 2004).

Ένας εναλλακτικός τρόπος που διαθέτει το κύτταρο για να συνεχίζει τη διαδικασία της αντιγραφής, όταν αυτή διακόπτεται από κάποιο ρήγμα στην αλυσίδα του DNA, είναι να παρακάμπτει το ρήγμα, χωρίς να το επιδιορθώνει, με ένα μηχανισμό που ονομάζεται μετα-θραυσματική σύνθεση (Translesion Synthesis, TS). Κατά τη διαδικασία αυτή, εξειδικευμένες DNA πολυμεράσες, όπως η Rev1 και η Polζ, αναλαμβάνουν την αντιγραφή στη θέση των κανονικών DNA πολυμερασών γιατί μπορούν πιο εύκολα να τοποθετούν βάσεις απέναντι από περιοχές με ρήγματα στο DNA. Η πιστότητα όμως της αντιγραφής με τις πολυμεράσες αυτές είναι χαμηλότερη (Waters et al., 2009). Έχει βρεθεί ότι μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις πολυμεράσες μειώνουν την ικανότητα μετα-θραυσματικής σύνθεσης των κυττάρων, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα κενά αντιγραφής ή να λύονται περισσότερες διχάλες αντιγραφής, γεγονότα που ενισχύουν το μηχανισμό του ομόλογου ανασυνδυασμού και καταλήγουν έτσι σε αυξημένα επίπεδα ανταλλαγών (Wilson & Thompson, 2007).

3.3. Παράγοντες που προκαλούν ανταλλαγές αδελφών χρωματίδων

Ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων μπορεί να συμβούν αυθόρμητα, ως ένα φυσικό φαινόμενο που σχετίζεται με την αντιγραφή του DNA. Ένας αριθμός 3-4 ανταλλαγών ανά κυτταρικό κύκλο, σε συνθήκες ελάχιστης ενσωμάτωσης BrdU, θεωρείται φυσιολογικό να παρατηρηθεί (Wilson & Thompson, 2007).

Μεγαλύτερος αριθμός ανταλλαγών όμως είναι δυνατόν να προκληθεί από μια πληθώρα μεταλλαξιγόνων ή καρκινογόνων παραγόντων. Έχει αποδειχτεί ότι πολλοί παράγοντες οι οποίοι οδηγούν σε μεταλλάξεις ή χρωμοσωματικές ανωμαλίες, επάγουν επίσης ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων (Perry & Evans, 1975). Μάλιστα, αυξημένες συχνότητες ανταλλαγών μπορεί να παρατηρηθούν από τη δράση κάποιων παραγόντων σε πολύ χαμηλότερες δόσεις από αυτές που απαιτούνται για την πρόκληση χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Για παράδειγμα, μελέτες του Latt (1974), καθώς και των Kato & Shimada (1975), έδειξαν ότι η μιτομυκίνη-C επάγει ανταλλαγές σε μια δόση που αποτελεί το 1/10 της απαιτούμενης δόσης για την πρόκληση χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Επίσης, οι Perry & Evans (1975), μελετώντας τη δράση 14 χημικών ενώσεων που ήταν γνωστές ή ύποπτες για μεταλλαξιγόνο δράση σε κύτταρα ινδικών χοιριδίων (CHO), παρατήρησαν ότι η ίδια δόση μεταλλαξιγόνου ουσίας που οδηγούσε σε διπλασιασμό της συχνότητας των ανταλλαγών, προκαλούσε ελάχιστο και οριακά ανιχνεύσιμο αποτέλεσμα στη συχνότητα των χρωμοσωματικών ανωμαλιών.

Ωστόσο, όλοι οι παράγοντες οι οποίοι επάγουν ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων δεν είναι απαραίτητα μεταλλαξιγόνοι, καθώς και το αντίστροφο (Carrano & Thompson, 1982; Natarajan, 2002).

Ο Kato (1977) ταξινόμησε τις χημικές ενώσεις σε τρεις κατηγορίες με κριτήριο την ικανότητά τους να προκαλούν ανταλλαγές και χρωμοσωματικές ανωμαλίες:

- Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν ουσίες που ονομάζονται παράγοντες τύπου X-ray και έχουν δράση ανάλογη της ιονίζουσας ακτινοβολίας. Η αύξηση της συχνότητας των ανταλλαγών που προκαλείται από αυτές τις ουσίες είναι ελάχιστη, παρά την εξαιρετική τους ικανότητα να προκαλούν

χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Παραδείγματα αποτελούν η καφεΐνη και η μπλεομυκίνη.

- Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν ουσίες που ονομάζονται παράγοντες τύπου UV και έχουν δράση ανάλογη της υπεριώδους ακτινοβολίας. Οι ουσίες αυτές αυξάνουν σημαντικά τόσο τη συχνότητα των ανταλλαγών, όσο και τη συχνότητα των χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Σ' αυτή την κατηγορία ανήκουν οι περισσότεροι αλκυλιωτικοί παράγοντες.
- Στην τρίτη κατηγορία ανήκουν οι μεταβολικοί αναστολείς, των οποίων η δράση στο DNA είναι έμμεση, όπως για παράδειγμα η φθοροδεοξουριδίνη, η υδροξουρία, η καμπτοθεκίνη, που εμποδίζουν το μηχανισμό της αντιγραφής.

Οι παράγοντες που θεωρούνται ικανοί να επάγουν ανταλλαγές είναι παράγοντες που προκαλούν συγκεκριμένες βλάβες στο DNA, είτε άμεσα, δρώντας απ' ευθείας πάνω στο DNA, είτε έμμεσα, επηρεάζοντας το μηχανισμό της αντιγραφής του DNA (Takehisa, 1982). Οι κύριες βλάβες που οδηγούν στη δημιουργία ανταλλαγών είναι οι εξής:

- Μονόκλωνα και δίκλωνα ρήγματα στο DNA, τα οποία οδηγούν σε θραύση της διχάλας αντιγραφής και στη συνέχεια επάγουν το μηχανισμό του ομόλογου ανασυνδυασμού για να συνεχιστεί η αντιγραφή. Τέτοια ρήγματα προκαλούνται από παράγοντες που ανήκουν στην τρίτη από τις παραπάνω κατηγορίες ή από την ιονίζουσα ακτινοβολία (Wilson & Thompson, 2007; Natarajan, 2002).
- Χιαστί δεσμοί (crosslinks), οι οποίοι επίσης επάγουν το μηχανισμό του ομόλογου ανασυνδυασμού για να επιδιορθωθούν οι σπασμένες διχάλες αντιγραφής που προκύπτουν (Wilson & Thompson, 2007). Χιαστί δεσμοί προκαλούνται για παράδειγμα από τη μιτομυκίνη C (Painter, 1980) και από την υπεριώδη ακτινοβολία. Η τελευταία προκαλεί, συγκεκριμένα, διμερή πυριμιδίνης (Das, 1988, Natarajan, 2002).
- Αλκυλιώσεις, όπως για παράδειγμα, η μεθυλίωση της βάσης γουανίνης (O^6 -methylguanine) που προκαλείται από την MNU (N-Methyl-N-Nitrosourea) και την MNNG (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine) (Kaina, 2004).

3.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τη συχνότητα των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων

Έχει παρατηρηθεί σε διάφορες μελέτες μεγάλη διακύμανση στη βασική συχνότητα των ανταλλαγών που παρουσιάζονται σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων υγιών ατόμων. Με το δεδομένο ότι αυτό το σύστημα ελέγχου χρησιμοποιείται ευρέως για τη διεξαγωγή πληθυσμιακών μελετών που διερευνούν τις πιθανές βλάβες από την έκθεση σε διάφορους γενοτοξικούς παράγοντες, είναι πολύ σημαντικό να ταυτοποιηθούν και να ποσοτικοποιηθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν τη βασική συχνότητα των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων (Das, 1988). Οι παράγοντες αυτοί σχετίζονται α) με διαφορές στη μεθοδολογία της τεχνικής ή β) με ατομικές διαφορές ανάμεσα στους δότες λεμφοκυττάρων που αφορούν την ηλικία, το φύλο, τον τρόπο ζωής, τη γενετική σύσταση ή την παρουσία ασθενειών.

3.4.1. Παράγοντες που σχετίζονται με τη μεθοδολογία της τεχνικής

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου καθώς και ο τύπος του ορού που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια των λεμφοκυττάρων μπορεί να επιφέρει διαφορές στην κινητική ανάπτυξης των κυττάρων και κατ' επέκταση στη συχνότητα των ανταλλαγών. Έχει βρεθεί ότι ανθρώπινα λεμφοκύτταρα που καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο TC-199 εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα ανταλλαγών από κύτταρα που καλλιεργούνται σε άλλα θρεπτικά μέσα, όπως είναι το Dulbecco's MEM, το RPMI 1640 ή το Ham's F-10 (Das, 1988). Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία ή όχι συγκεκριμένων αμινοξέων στο χρησιμοποιούμενο θρεπτικό υλικό (Takehisa, 1982). Επίσης, υψηλότερες συχνότητες ανταλλαγών παρατηρούνται σε κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία ορού εμβρύου βοός σε σχέση με κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία ανθρώπινου AB ή αυτόλογου ορού, γεγονός που εξηγείται από τη διαφορετική σύσταση του κάθε ορού σε πουρίνες-πυριμιδίνες, που επηρεάζει την ενσωμάτωση της BrdU από τα κύτταρα (Das, 1988).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, άλλος ένας παράγοντας που επηρεάζει τη συχνότητα των ανταλλαγών είναι η συγκέντρωση της BrdU. Γενικά, η συχνότητα των ανταλλαγών αυξάνει με την αύξηση της συγκέντρωσης της BrdU (Natarajan et al., 1986). Η εξαρτώμενη από την BrdU όμως επαγωγή ανταλλαγών επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες όπως είναι η πυκνότητα των κυττάρων στην καλλιέργεια, οι διαφορετικοί υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων και η σύσταση του μέσου καλλιέργειας (Lambert et al., 1982; Das, 1988). Επίσης, εξαιτίας του πολύ ενεργού ατόμου βρωμίου που διαθέτει, η BrdU μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλους παράγοντες, όπως είναι η ιονίζουσα και η υπεριώδης ακτινοβολία και να επάγει ακόμα υψηλότερες συχνότητες ανταλλαγών (Wojcik et al., 2004).

Ο ρυθμός διαίρεσης των κυττάρων επηρεάζει επίσης τη συχνότητα των ανταλλαγών. Κύτταρα που διαιρούνται με γρήγορο ρυθμό παρουσιάζουν χαμηλότερες συχνότητες ανταλλαγών από κύτταρα που διαιρούνται αργά. Στις καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων υπάρχουν τουλάχιστον δυο υποπληθυσμοί κυττάρων με διαφορετικό ρυθμό διαίρεσης. Τα B-λεμφοκύτταρα έχουν υψηλότερο ρυθμό διαίρεσης από τα T-λεμφοκύτταρα και παρουσιάζουν χαμηλότερες συχνότητες ανταλλαγών (Das, 1988).

Τέλος, η συχνότητα των ανταλλαγών επηρεάζεται από τη θερμοκρασία της καλλιέργειας. Τα κύτταρα καλλιεργούνται συνήθως σε θερμοκρασία 37° C. Έχει παρατηρηθεί ότι χαμηλότερες θερμοκρασίες επώασης οδηγούν σε λιγότερες ανταλλαγές, είτε λόγω μείωσης του ρυθμού διαίρεσης των κυττάρων, είτε λόγω μη-ενεργοποίησης των απαραίτητων ενζύμων για το μηχανισμό της αντιγραφής. Αντίθετα, αυξημένες θερμοκρασίες επώασης οδηγούν σε αύξηση των ανταλλαγών (Das, 1988).

3.4.2. Παράγοντες που σχετίζονται με ατομικές διαφορές ανάμεσα στους δότες λεμφοκυττάρων

Η ηλικία αποτελεί έναν από τους κύριους βιολογικούς παράγοντες που επηρεάζουν τις βασικές τιμές συχνότητων των ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων σε υγιείς δότες. Μελέτες των Bolognesi et al. (1997) καθώς και των Barale et al. (1998) δείχνουν ότι οι τιμές συχνότητων των ανταλλαγών,

γενικά, αυξάνουν με την ηλικία, σταθεροποιούνται περίπου στην ηλικιακή τάξη των 40-49 ετών και παρουσιάζουν τη μέγιστη αύξηση άνω των 70 ετών.

Το φύλο επίσης επηρεάζει τις συχνότητες των ανταλλαγών με τα θηλυκά άτομα να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές σε σχέση με τα αρσενικά (Das, 1988; Barale et al., 1998). Μάλιστα έχουν βρεθεί σημαντικά αυξημένες συχνότητες ανταλλαγών σε γυναίκες που βρίσκονται σε συγκεκριμένο στάδιο του εμμήνου κύκλου ή της εγκυμοσύνης, καθώς και σε γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτικά χάπια. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγείται είτε λόγω της αυξημένης σύστασης σε DNA των φυλετικών XX θηλυκών χρωμοσωμάτων, έναντι των αρσενικών XY, είτε λόγω των ορμονικών διαφορών ανάμεσα στα δυο φύλα (Das, 1988).

Από τους παράγοντες που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής, σημαντικότερος είναι το κάπνισμα, το οποίο έχει βρεθεί ότι αυξάνει τις συχνότητες των ανταλλαγών και μάλιστα με μια δόσο-εξαρτώμενη σχέση. Στατιστικά σημαντικά αυξημένες ανταλλαγές βρέθηκαν ακόμα και σε καπνιστές που κάπνιζαν μικρό αριθμό τσιγάρων την ημέρα (1 έως 9) και κυρίως σε θηλυκά άτομα, ενώ σε άτομα που είχαν κόψει το κάπνισμα, παρατηρήθηκαν μειωμένες συχνότητες ανταλλαγών τουλάχιστον ένα χρόνο μετά τη διακοπή του καπνίσματος (Barale et al., 1998).

Τέλος, αυξημένες συχνότητες ανταλλαγών έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με κληρονομικές γενετικές ανωμαλίες που σχετίζονται είτε με την ικανότητα επιδιόρθωσης μεταλλαξιγόνων ή καρκινογόνων βλαβών στο DNA, είτε με τη σωστή λειτουργία του μηχανισμού της αντιγραφής. Τέτοιες περιπτώσεις ασθενειών είναι το σύνδρομο Bloom, που σχετίζεται με βλάβες στο μηχανισμό του ομόλογου ανασυνδυασμού, η ξηροδερμία pigmentosum (xeroderma pigmentosum), που σχετίζεται με αδυναμία επιδιόρθωσης της εκτομής νουκλεοτιδίου, η αταξία τηλαγγιεκτασία (ataxia telangiectasia), που σχετίζεται με αδυναμία επιδιόρθωσης ρηγμάτων στο DNA και η αναιμία Fanconi, που σχετίζεται με αδυναμία επιδιόρθωσης χιαστί δεσμών στο DNA (Evans, 1982).

3.5. Προσδιορισμός της συχνότητας των ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων και ερμηνεία αποτελεσμάτων

Για την αποτελεσματική χρήση της τεχνικής των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων ως δοκιμασία ελέγχου για τον προσδιορισμό της γενοτοξικής δράσης διαφόρων παραγόντων, είναι πολύ σημαντικό να ακολουθείται μια ομοιόμορφη μεθοδολογία από τους διάφορους μελετητές και οι μετρήσεις να γίνονται σύμφωνα με κοινά αποδεκτά κριτήρια. Για το σκοπό αυτό έχουν συνταχθεί οδηγίες από διάφορους διεθνείς οργανισμούς όπως είναι ο Οργανισμός για την Οικονομική Συνεργασία και Ανάπτυξη (OECD, 1986) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, μέσω του Διεθνούς Προγράμματος για την Ασφάλεια των Χημικών (International Programme on Chemical Safety, IPCS) (Albertini et al., 2000).

Σύμφωνα με τις οδηγίες αυτές, για τον προσδιορισμό της συχνότητας των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων πρέπει να αναλύονται 30 έως 50 2^{ης} διαίρεσης (M_2) μεταφασικά κύτταρα ανά καλλιέργεια. Οι μεταφάσεις που επιλέγονται για ανάλυση πρέπει να έχουν 46 χρωμοσώματα με ομοιόμορφο σχέδιο χρώσης, δηλαδή με τη μια χρωματίδα έντονα βαμμένη και την άλλη αχνά βαμμένη. Κάθε εναλλαγή χρώσης μεταξύ των δυο χρωματίδων ενός χρωμοσώματος καταμετρείται ως ανταλλαγή. Όταν όμως η εναλλαγή της χρώσης είναι ακριβώς στο σημείο του κεντρομέρους, πιθανόν να μην πρόκειται για ανταλλαγή, γι' αυτό και δεν καταμετρείται. Για κάθε μετάφαση που αναλύεται καταγράφεται ο αριθμός των ανταλλαγών, ο αριθμός των χρωμοσωμάτων και υπολογίζεται ο μέσος αριθμός ανταλλαγών ανά χρωμόσωμα (Albertini et al., 2000).

Επίσης, υπολογίζοντας τη σχετική αναλογία των M_1 , M_2 και M_3 μεταφασικών κυττάρων, είναι δυνατόν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την κινητική πολλαπλασιασμού των κυττάρων και να προσδιοριστούν πιθανές κυτταροτοξικές επιδράσεις. Αυτό γίνεται με τον υπολογισμό του δείκτη διπλασιασμού (Replication index, RI), ο οποίος δίνεται από τον τύπο: $RI = (M_1 + 2M_2 + 3M_3) / N$, όπου M_1 , M_2 και M_3 κύτταρα που έχουν πραγματοποιήσει μία, δύο και τρεις ή περισσότερες διαιρέσεις αντίστοιχα και

Ν ο συνολικός αριθμός των μεταφάσεων που αναλύονται, που είναι συνήθως 200 (Preston et al., 1987; Albertini et al., 2000).

Ένα πείραμα με την τεχνική των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων θεωρείται ότι έχει θετικό αποτέλεσμα όταν παρατηρείται στατιστικά σημαντικά υψηλότερη συχνότητα ανταλλαγών στα κύτταρα που έχουν δεχτεί την επίδραση του υπό μελέτη παράγοντα σε σχέση με τα κύτταρα-αρνητικούς μάρτυρες. Ένα θετικό αποτέλεσμα ενισχύεται και από μια δοσο-εξαρτώμενη αύξηση στη συχνότητα των ανταλλαγών, όταν μελετώνται διάφορες δόσεις χορήγησης. Το θετικό αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι ο εξεταζόμενος παράγοντας επάγει βλάβες στο DNA ως αποτέλεσμα λαθών που έχουν γίνει κατά τη διάρκεια της αντιγραφής (Albertini et al., 2000).

3.6. Σημασία και εφαρμογές της μεθόδου των ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων

Από το 1975 ήδη, η μέθοδος των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων χαρακτηρίστηκε ως μια πολύ ευαίσθητη και γρήγορη μέθοδος για την ανίχνευση της μεταλλαξιγόνου δράσης χημικών παραγόντων και τον εντοπισμό πιθανών μεταλλαξιγόνων περιβαλλοντικών παραγόντων (Perry & Evans, 1975). Οι Hollstein et al. (1979) συγκρίνανε 24 αντιπροσωπευτικές δοκιμασίες ελέγχου, μεταξύ αυτών και τη μέθοδο SCE, ως προς την ανίχνευση της δράσης 72 καρκινογόνων και μεταλλαξιγόνων παραγόντων και συμπεράνανε ότι η μέθοδος SCE είναι τόσο αποτελεσματική όσο και η δοκιμασία Ames και μάλιστα, σε κάποιες περιπτώσεις, ακόμα πιο ευαίσθητη μέθοδος για τον εντοπισμό καρκινογόνων και μεταλλαξιγόνων παραγόντων. Το πλεονέκτημα της μεθόδου SCE έναντι της δοκιμασίας Ames είναι ότι, επειδή χρησιμοποιεί ευκαρυωτικά κύτταρα, μπορεί με μεγαλύτερη ακρίβεια να προσομοιώσει τι συμβαίνει στο σώμα των θηλαστικών, σε σχέση με τα βακτηριακά κύτταρα. Θεωρείται επίσης πιο ευαίσθητη, πιο γρήγορη και πιο απλή μέθοδος σε σχέση με τη μέθοδο των χρωμοσωματικών ανωμαλιών (Das, 1988). Ωστόσο, επειδή για πολλά χρόνια παρέμενε ασαφής ο μηχανισμός δημιουργίας ανταλλαγών και ήταν αβέβαιη η βιολογική σημασία

της μεθόδου, δεν χρησιμοποιήθηκε ως δοκιμασία ρουτίνας στη γενετική τοξικολογία (Albertini et al., 2000).

Η ανάλυση των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων βρίσκει εφαρμογή τόσο σε *in vitro*, όσο και σε *in vivo* συνθήκες, σε μια ποικιλία κυττάρων και ιστών. Για τη μελέτη της δράσης διαφόρων παραγόντων *in vitro* έχει εφαρμοστεί σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από άνθρωπο, ποντίκια, αρουραίους, κουνέλια, καθώς και σε κύτταρα από φυτά, έντομα, μύδια, ψάρια και έμβρυα από κοτόπουλα (Tucker et al., 1993). Στον άνθρωπο, το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα ελέγχου είναι η ανάλυση των ανταλλαγών σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων και έχει εφαρμοστεί για τον *in vitro* προσδιορισμό της γενοτοξικής δράσης πληθώρας παραγόντων, όπως είναι χημικές ουσίες (Stephanou et al., 1996; Vlastos et al., 2010a), φάρμακα (Abou-Eisha et al., 2004; Stephanou et al., 2004), ορμόνες (Djelić et al., 2006), ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (Testa et al., 2004) κ.α.

Τέλος, η ανάλυση των ανταλλαγών σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων έχει εφαρμοστεί για τον έλεγχο ανθρώπινων πληθυσμών που έχουν εκτεθεί *in vivo* σε διάφορους μεταλλαξιγόνους παράγοντες. Μελέτη ενός πληθυσμού που είχε εκτεθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα στη δράση του οξειδίου του αιθυλενίου, με τη χρήση πολλαπλών δοκιμασιών ελέγχου, έδειξε ότι η μέθοδος των ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων και η μέθοδος των χρωμοσωματικών ανωμαλιών ήταν οι πιο ευαίσθητες ως προς την ανίχνευση της έκθεσης στο συγκεκριμένο παράγοντα (Tates et al., 1991). Πολλές άλλες τέτοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την ανίχνευση του γενετικού κινδύνου που προέρχεται από την έκθεση σε διάφορους παράγοντες λόγω επαγγελματικής ενασχόλησης, όπως για παράδειγμα εργαζόμενων σε βιομηχανία παραγωγής φυτοφαρμάκων (Zeljezic & Garaj-Vrhovac, 2002), επιμεταλλωτών χρωμίου (Benova et al., 2002), εργαζόμενων σε νοσοκομεία, εκτεθειμένων σε αναισθητικά αέρια (Bilban et al., 2005), εργαζόμενων σε αεροδρόμια, εκτεθειμένων σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Cavallo et al., 2006), εργαζόμενων στο χώρο της κινητής τηλεφωνίας, εκτεθειμένων σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (Maes et al., 2006) κ.α.

4. Σκοπός της διατριβής

Τα φυτοφάρμακα, μια ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων, χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη γεωργία για την καταπολέμηση διαφόρων εχθρών των φυτών και αποτελούν σημαντική κατηγορία περιβαλλοντικών ρυπαντών. Ο οργανισμός του ανθρώπου εκτίθεται καθημερινά και σε συνεχώς αυξανόμενο βαθμό, σε σύνθετα μίγματα φυτοφαρμάκων, είτε μέσω της επαγγελματικής του ενασχόλησης ως καλλιεργητής ή εργαζόμενος σε βιομηχανίες παραγωγής φυτοφαρμάκων, είτε ως καταναλωτής, μέσω των υπολειμμάτων που παραμένουν σε τρόφιμα, καπνό, αέρα, έδαφος, νερό, φυτά και ζώα. Η μακροχρόνια έκθεση, ακόμα και σε μικρές δόσεις φυτοφαρμάκων, επιφέρει μακροπρόθεσμα πολλές αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, όπως νευρολογικές διαταραχές, αναπαραγωγικά προβλήματα, προβλήματα ανάπτυξης και καρκίνους διαφόρων μορφών. Με βάση τα παραπάνω, η ολοένα αυξανόμενη έκθεση στα φυτοφάρμακα, είτε είναι επαγγελματική, είτε είναι διατροφική, κάνει επιτακτική την ανάγκη τόσο του προσδιορισμού της πιθανής γενοτοξικής και δυνητικά καρκινογόνου δράσης τους, όσο και της τοξικότητάς τους στον άνθρωπο.

Διάφοροι διεθνείς οργανισμοί είναι υπεύθυνοι για τη διεξαγωγή ερευνών για τον έλεγχο των φυτοφαρμάκων που διατίθενται στην αγορά. Αν λάβουμε υπόψη όμως, ότι το σύνολο των ερευνών πραγματοποιείται *in vitro* ή/και *in vivo* σε πειραματόζωα και αφορά στις περισσότερες των περιπτώσεων ένα κάθε φορά φυτοφάρμακο και όχι συνδυασμούς φυτοφαρμάκων, ίσως δεν μάθουμε ποτέ τις πραγματικές επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων στην υγεία του ανθρώπου. Επιπλέον, τα εμπορικά σκευάσματα περιέχουν αδρανή στοιχεία (διαλυτικά των δραστικών ουσιών κ.α. πρόσθετα) τα οποία δεν συνιστούν φυτοφάρμακα, αλλά πιθανόν να εμφανίζουν αλληλεπιδράσεις με τις δραστικές ουσίες, καθώς και μεταξύ τους, με άγνωστες επιπτώσεις για την υγεία μας. Κατά συνέπεια, οι επιδημιολογικές μελέτες που πραγματοποιούνται σε ανθρώπινους πληθυσμούς οι οποίοι εκτίθενται σε συνδυασμούς φυτοφαρμάκων ίσως να είναι η καλύτερη προσέγγιση, για να δοθεί απάντηση για το αν και πόσο επικίνδυνα είναι τα φυτοφάρμακα.

Κάτω από αυτό το πρίσμα, σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της μεμονωμένης, αλλά και συνεργιστικής γενοτοξικής δράσης δύο φυτοφαρμάκων: του Imidacloprid και του Metalaxyl, σε *in vitro* και *in vivo* συνθήκες. Τα φυτοφάρμακα αυτά επιλέχθηκαν επειδή χρησιμοποιούνται ευρέως στην καλλιέργεια καπνού, που αποτελεί μια από τις κύριες αγροτικές δραστηριότητες στην περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας. Το Imidacloprid είναι εντομοκτόνο ευρέος φάσματος ενώ το Metalaxyl είναι μυκητοκτόνο επίσης ευρέος φάσματος.

Για την εκτίμηση της συνεργιστικής γενοτοξικής δράσης των συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων σε *in vivo* συνθήκες, χρησιμοποιήσαμε ως πειραματικό υλικό, λεμφοκύτταρα καλλιεργητών καπνού της περιοχής της Αιτωλοακαρνανίας, οι οποίοι ψέκαζαν τις καλλιέργειές τους αποκλειστικά με δυο εμπορικά σκευάσματα που περιείχαν τα δυο υπό μελέτη φυτοφάρμακα, και ως βιολογικό δείκτη γενετικής βλάβης, την επαγωγή μικροπυρήνων με τη μέθοδο αναστολής της κυτταροκίνησης με κυτταροχαλασίνη-B (CBMN method). Η γενοτοξική δράση των δύο φυτοφαρμάκων διερευνήθηκε περαιτέρω, μεμονωμένα και σε συνδυασμό, σε *in vitro* συνθήκες, με τη μέθοδο της επαγωγής μικροπυρήνων καθώς και με τη μέθοδο της επαγωγής ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων, σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε άλλη μια δοκιμασία ελέγχου σε *in vivo* συνθήκες, η μέθοδος της επαγωγής μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων, με σκοπό τη διερεύνηση της γενοτοξικής δράσης του Imidacloprid και του Metalaxyl, μεμονωμένα και σε συνδυασμό, σε ένα ενεργό μεταβολικό σύστημα θηλαστικών.



ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5. Μελέτη της γενετοξικής δράσης των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων καλλιεργητών

5.1. Συλλογή δειγμάτων

Κατά τη διεξαγωγή αυτών των πειραμάτων έλαβαν μέρος 11 άρρενες καλλιεργητές και 11 αντίστοιχης ηλικίας υγιείς άρρενες οι οποίοι δεν είχαν επαγγελματική σχέση με καλλιέργειες και αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου των αρνητικών μαρτύρων. Από όλους τους δότες συμπληρώθηκε ερωτηματολόγιο που αφορούσε την υγεία τους, τη λήψη φαρμακευτικής αγωγής και τις προσωπικές τους συνήθειες, όπως το κάπνισμα. Σύμφωνα με τις απαντήσεις τους, κανένας από τους δότες δεν είχε δεχτεί φαρμακευτική αγωγή και δεν είχε κανένα πρόβλημα υγείας τους τελευταίους δυο μήνες πριν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Όλοι οι δότες χωρίστηκαν σε ομάδες καπνιστών και μη-καπνιστών έτσι ώστε να διερευνηθεί η πιθανή επίδραση της συνήθειας του καπνίσματος στην επαγωγή μικροπυρήνων.

Οι δότες-καλλιεργητές χρησιμοποιούσαν όλοι και τα δυο υπό μελέτη φυτοφάρμακα, με τα οποία ψέκαζαν καλλιέργειες καπνού. Όλοι οι καλλιεργητές ψέκαζαν αρκετά στρέμματα, δυο με τρεις φορές μέσα σε διάστημα τριών μηνών και η διάρκεια του ψεκασμού κάθε φορά κυμαίνονταν μεταξύ 4 και 6 ωρών. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η ανίχνευση πιθανής επαγωγής γενετικών βλαβών λόγω της έκθεσης των καλλιεργητών στο συνδυασμό αυτών των δυο φυτοφαρμάκων. Για το λόγο αυτό πάρθηκε αίμα από τους δότες-καλλιεργητές πριν και μετά τον ψεκασμό.

Οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν υπό άσηπτες συνθήκες στη μονάδα αιμοδοσίας του νοσοκομείου Αγρινίου. Η συλλογή του αίματος γινόταν σε ηπαρινισμένα φιαλίδια (Venoject) προς αποφυγή πήξης και φυλασσόταν στους 4° C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

5.2. Καλλιέργεια λεμφοκυττάρων

Το βιολογικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας μελέτης είναι τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Το συγκεκριμένο βιολογικό σύστημα αποτελεί το πιο

συχνά χρησιμοποιούμενο στις διάφορες κυτταρογενετικές τεχνικές, καθώς εμφανίζει μια σειρά από πλεονεκτήματα, όπως είναι τα εξής (Evans, 1984; Tucker & Preston, 1996):

- Το αίμα αποτελεί εύκολη πηγή λήψης μεγάλου αριθμού κυττάρων και μπορεί να λαμβάνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα.
- Τα λεμφοκύτταρα μπορούν να θεωρηθούν ως ένας σχετικά συγχρονισμένος πληθυσμός κυττάρων, αφού τα περισσότερα κύτταρα βρίσκονται στην G₀ φάση του κυτταρικού κύκλου.
- Είναι δυνατή η διέγερση τους από μιτογόνες ουσίες και η παραγωγή μεγάλου αριθμού απογόνων.
- Η απόκριση των λεμφοκυττάρων στον υπό εξέταση παράγοντα *in vitro* δε διαφέρει σημαντικά από αυτήν που συμβαίνει *in vivo*.
- Χαρακτηρίζονται από μικρή συχνότητα τυχαίων χρωμοσωματικών ανωμαλιών.
- Έχουν αναπτυχθεί πολύ καλές τεχνικές για την προετοιμασία παρασκευασμάτων από λεμφοκύτταρα για τη μελέτη χρωμοσωματικών ανωμαλιών και διαφόρων κυτταρογενετικών δεικτών.

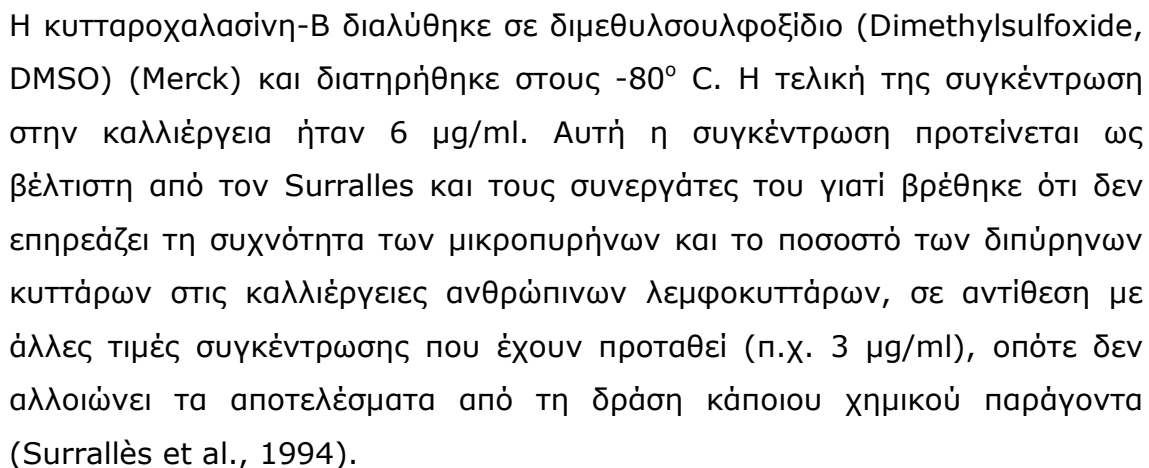
Η έναρξη της καλλιέργειας λαμβάνει χώρα με την προσθήκη όλων των απαραίτητων συστατικών που απαρτίζουν το πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, δηλαδή:

- 0.5 ml φλεβικού αίματος
- 6.5 ml Ham's F-10 θρεπτικό υλικό (Gibco)
- 1.5 ml ορό εμβρύου βοός (Foetal Bovine Serum, FBS) (Gibco)
- 0.2 ml φυτοαιματογλουτινίνη (phytoaematoglutinin, PHA) (Gibco).

Η μιτογόνος ουσία PHA χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Η διάλυσή της πραγματοποιήθηκε μέσα στη συσκευασία της με την προσθήκη 10 ml αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού και διατηρήθηκε στο ψυγείο.

Τα κύτταρα του αίματος καλλιεργήθηκαν μέσα σε φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας 25cm² (Corning), για 72 ώρες, στους 37° C σε επωαστικό κλίβανο (Forma scientific Inc.) με παροχή 5% CO₂.

Για την αναστολή της κυτταροκίνησης, 44 ώρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας, που αντιστοιχεί στο τέλος περίπου του 1^{ου} κυτταρικού κύκλου (φάση G₂) προστέθηκε σε κάθε φλάσκα διάλυμα κυτταροχλασίνης-B (cytochalasin-B, Cyt-B) (Sigma). Το χρονοδιάγραμμα της καλλιέργειας των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων με την εφαρμογή της μεθόδου αναστολής της κυτταροκίνησης έχει ως εξής:



- 103 -

3/4 της ώρας στους 180° C . Τα αναλώσιμα είδη (tips, erpendorfs) και τα μπουκάλια με νερό αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο κλίβανο (Hellenic Labware S.A.) σε υγρό περιβάλλον (2 atm στους 120° C για 15 λεπτά). Επίσης όλοι οι χειρισμοί και η προσθήκη των υλικών έγιναν σε εστία με αποστειρωμένο ρεύμα αέρος (Laminar Flow Cabinet, Astec microflow) που διαθέτει επίσης ειδική λάμπα ακτινοβολίας UV για την αποστείρωση του χώρου πριν τη χρήση.

5.3. Προετοιμασία παρασκευασμάτων

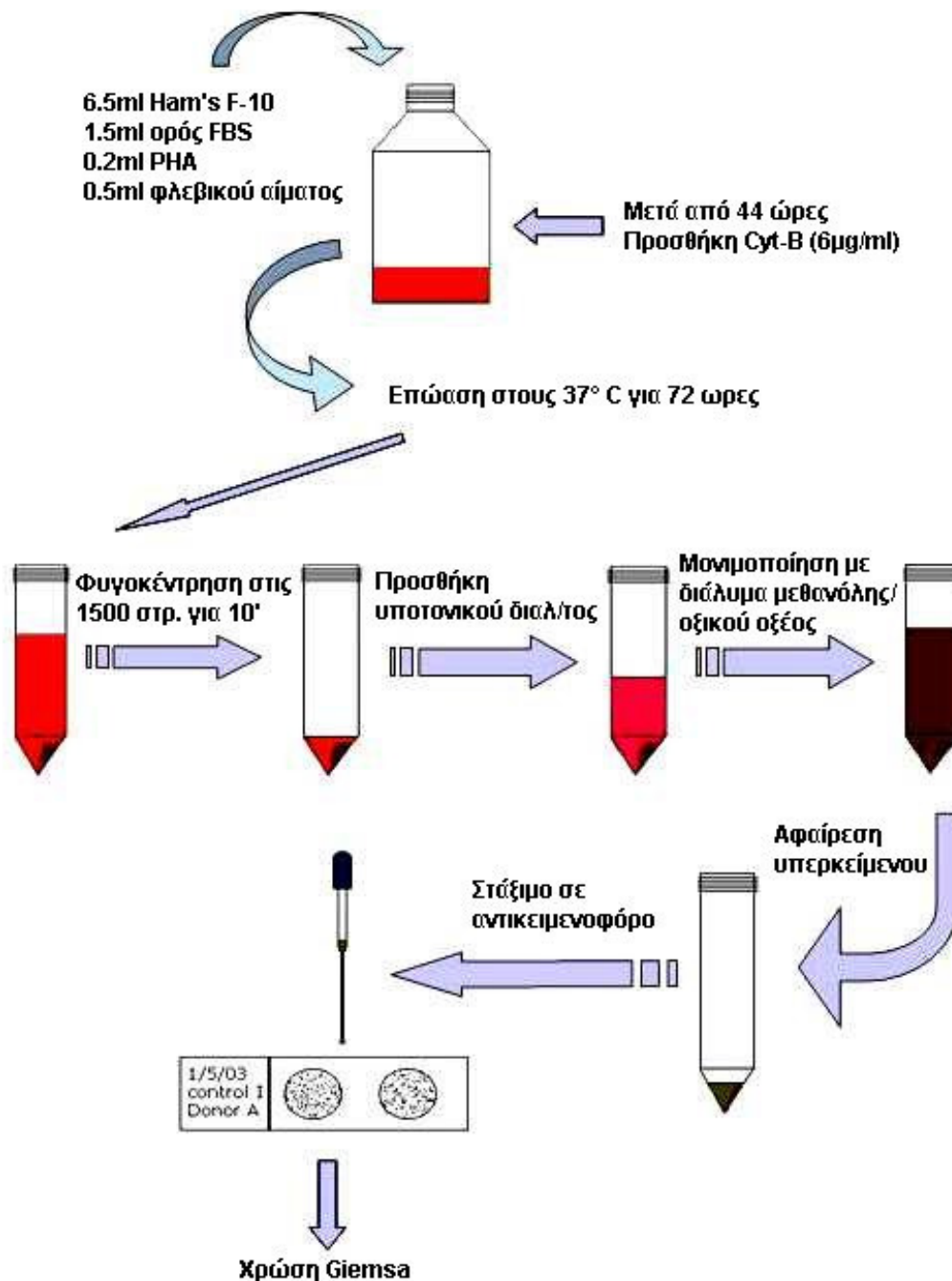
Μετά το τέλος της καλλιέργειας, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε φυγοκεντρικούς σωλήνες (Corning). Ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης των λεμφοκυττάρων και λήψης παρασκευασμάτων για την ανίχνευση μικροπυρήνων σε διπύρρηνα κύτταρα, η οποία βασίζεται στις μεθοδολογίες που αναφέρονται στις εργασίες των Rothfels & Siminovitch (1958), των Van Hummelen & Kirsch-Volders (1990), των Surrallès et al. (1992) και των Paparaulou et al. (2001), και περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά.
- Αφαίρεση υπερκείμενου
- Προσθήκη περίπου 4 ml φρέσκου υποτονικού διαλύματος με ταυτόχρονη ελαφρά ανάδευση σε Vortex και παραμονή των σωλήνων σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά. Το υποτονικό διάλυμα παρασκευάζεται με ανάμειξη Ham's F-10 υγρού (Gibco) και αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού σε αναλογία 1:1 και προστίθεται για να προκαλέσει την αιμόλυση των ερυθροκυττάρων και τη διόγκωση των λεμφοκυττάρων.
- 1^η προσθήκη 3ml περίπου φρέσκου μονιμοποιητικού διαλύματος με ταυτόχρονη στιγμιαία ανάδευση. Το μονιμοποιητικό διάλυμα παρασκευάζεται με ανάμειξη μεθανόλης (Riedel) και οξικού οξέος (Riedel) σε αναλογία 5:1.
- Φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές/λεπτό για 7 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκείμενου
- 2^η προσθήκη μονιμοποιητικού που ακολουθείται από φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές/λεπτό για 7 λεπτά και αφαίρεση υπερκείμενου

- 3^η προσθήκη μονιμοποιητικού που ακολουθείται από φυγοκέντρωση στις 1200 στροφές/λεπτό για 7 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκείμενου αφήνοντας μικρή ποσότητα μονιμοποιητικού και ανάδευση με πιπέττα Pasteur
- Στάξιμο 1 ή 2 σταγόνων από το υλικό σε καθαρές και στεγνές αντικειμενοφόρους πλάκες με πιπέττα Pasteur, με επαφή, ώστε να παραμείνει άθικτο το κυτταρόπλασμα.
- Τα παρασκευάσματα αφού στεγνώσουν στον αέρα, βάφονται με χρώση Giemsa (Merck) 10% σε απεσταγμένο νερό, για 15 λεπτά περίπου.
- Ξέβγαλμα με απεσταγμένο νερό και στέγνωμα στον αέρα
- Προσθήκη DPX mounting medium (Scharlau) και κλείσιμο με καλυπτρίδα.

Μετά τη διαδικασία αυτή τα παρασκευάσματα είναι έτοιμα για μικροσκοπική παρατήρηση η οποία έγινε σε μικροσκόπιο Olympus CH20BIMF.

Όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας, από την καλλιέργεια των λεμφοκυττάρων έως την ετοιμασία των παρασκευασμάτων, παρουσιάζονται σχηματικά στην **εικόνα 5.3**.



Εικόνα 5.3. Σχηματική παράσταση της καλλιέργειας και της διαδικασίας απομόνωσης των λεμφοκυττάρων και λήψης παρασκευασμάτων για την ανίχνευση μικροπυρήνων σε διπύρρηνα κύτταρα (Γ. Ντέμσια).

5.4. Μετρήσεις – Στατιστική ανάλυση

Σε κάθε παρασκεύασμα μετρήθηκαν τουλάχιστον 1000 διπύρηνια κύτταρα (BNMN) και εξετάστηκαν για την παρουσία μικροπυρήνων (MN) σύμφωνα με κριτήρια που αναφέρονται στις μελέτες των Fenech et al. (2003) και Fenech (2007).

Επίσης, σε κάθε παρασκεύασμα μετρήθηκαν συνολικά 2000 κύτταρα για τον υπολογισμό του Δείκτη Διπλασιασμού των Κυττάρων (Cytokinesis Block Proliferation Index, CBPI) που σχετίζεται με τη διαδικασία πολλαπλασιασμού των κυττάρων και είναι ενδεικτικός πιθανών κυτταροτοξικών επιδράσεων. Ο δείκτης αυτός δίνεται από τον τύπο: $CBPI = M_1 + 2M_2 + 3(M_3 + M_4) / N$, όπου M_1 , M_2 , M_3 και M_4 είναι ο αριθμός κυττάρων με έναν, δυο, τρεις και τέσσερις πυρήνες αντίστοιχα και N είναι ο συνολικός αριθμός κυττάρων (Surrallès et al., 1995; Lorge et al., 2008).

Οι μικροπυρήνες εξετάζονται και ως προς το μέγεθός τους, το οποίο είναι ενδεικτικό του τρόπου δράσης των μελετούμενων δραστικών ουσιών, δηλαδή αν προκαλούν θραύσεις χρωμοσωμάτων ή αν επηρεάζουν τη λειτουργία της μιτωτικής ατράκτου προκαλώντας έτσι καθυστέρηση των χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση και αποτυχία αυτών να συνδεθούν με τη μιτωτική συσκευή. Διακρίνονται σε μικρού μεγέθους (small), μεσαίου μεγέθους (medium) και μεγάλου μεγέθους (large) μικροπυρήνες συγκρινόμενοι με το μέγεθος του κυρίως πυρήνα. Ένας small μικροπυρήνας (με διάμετρο $\leq 1/10$ της διαμέτρου του κυρίως πυρήνα) πιθανόν να περιέχει άκεντρα θραύσματα χρωμοσωμάτων, ενώ ένας large μικροπυρήνας (με διάμετρο $\cong 1/3$ της διαμέτρου του κυρίως πυρήνα) έχει περισσότερες πιθανότητες να περιέχει ολόκληρα χρωμοσώματα. Ένας medium μικροπυρήνας έχει διάμετρο μεταξύ $1/9$ και $1/3$ της διαμέτρου του κυρίως πυρήνα (Yamamoto and Kikuchi, 1980; Högstedt et al., 1988; Vanderkerken et al., 1989; Papapoulou et al., 2001; Hashimoto et al., 2010).

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA), για την εξαγωγή των μέσων τιμών $\pm$ το τυπικό σφάλμα. Για τη

σύγκριση των μέσων τιμών συχνοτήτων MN και BNMN, καθώς και των μέσων τιμών του δείκτη CBPI, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση One-Way ANOVA.

6. Μελέτη της γενοτοξικής δράσης των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl σε *in vitro* συνθήκες, σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων

6.1. Χημικά

Για την *in vitro* μελέτη των δύο φυτοφαρμάκων που έχουν επιλεγεί χρησιμοποιήθηκαν τα τεχνικά τους σκευάσματα: Imidacloprid (Riedel) και Metalaxyl (Riedel) τα οποία διαλύθηκαν σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Για την επιλογή των συγκεντρώσεων και την παρασκευή των διαλυμάτων λήφθηκε υπόψη η διαλυτότητα του κάθε χημικού στο νερό : 610 µg/ml για το Imidacloprid (NPIC, 2010) και 7100 µg/ml για το Metalaxyl (Kidd & James, 1991). Επίσης, αξιοποιήθηκαν δεδομένα από τη σχετική βιβλιογραφία (Hrelia et al., 1996; Zang et al., 2000; Feng et al., 2005).

6.2. *In vitro* επαγωγή μικροπυρήνων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων με τη μέθοδο της κυτταροχαλασίνης-B μετά από επίδραση των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl

6.2.1. Συλλογή δειγμάτων

Για την καλλιέργεια λεμφοκυττάρων πήραμε αίμα από δύο υγιείς δότες, μη-καπνιστές, ηλικίας 20-25 ετών, οι οποίοι δεν είχαν καμία προηγούμενη επαφή με φυτοφάρμακα. Οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν υπό άσηπτες συνθήκες στη μονάδα αιμοδοσίας του νοσοκομείου Αγρινίου. Η συλλογή του αίματος γινόταν σε ηπαρινισμένα φιαλίδια (Venoject) προς αποφυγή πήξης και φυλασσόταν στους 4° C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

6.2.2. Καλλιέργεια λεμφοκυττάρων

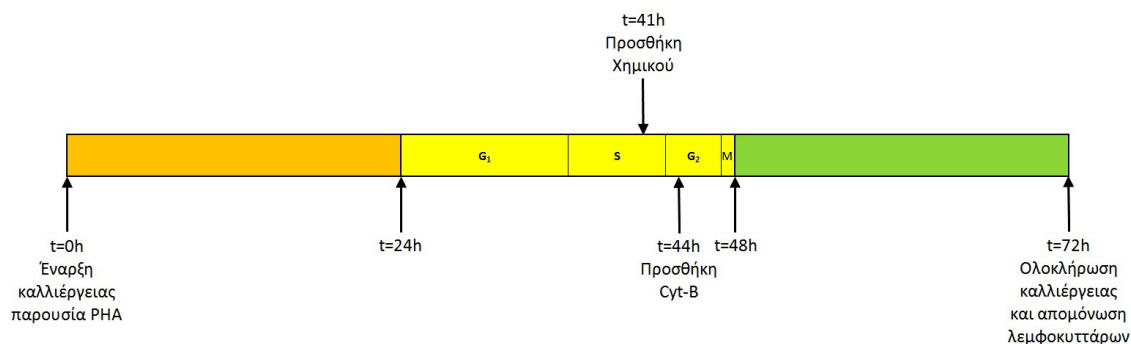
Τα υλικά και η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την καλλιέργεια είναι ίδια με αυτά που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο πείραμα με τη διαφορά ότι σε κάθε καλλιέργεια προσθέσαμε 0.3ml φυτοαιμαγλουτινίνη αντί για 0.2ml. Επίσης, 41 ώρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες διαλυμάτων των φυτοφαρμάκων Imidacloprid (Riedel) και Metalaxyl (Riedel), μεμονωμένα και σε συνδυασμό, ώστε να επιτευχθούν στις καλλιέργειες οι παρακάτω συγκεντρώσεις:

- 0.1, 1, 5, 10, 50 και 100 $\mu\text{g/ml}$ για τη μεμονωμένη δράση κάθε φυτοφάρμακου.
- 10, 25, 50, 100 και 200 $\mu\text{g/ml}$ για τη συνδυασμένη δράση των δύο φυτοφαρμάκων.

Η προσθήκη του φυτοφάρμακου γίνεται 3 ώρες πριν την προσθήκη της κυτταροχαλασίνης, έτσι ώστε η κυτταροπλασματική διαίρεση να παρεμποδιστεί παρουσία του χημικού παράγοντα.

Στις καλλιέργειες – θετικούς μάρτυρες, 41 ώρες μετά την έναρξη, προστέθηκε διάλυμα μιτομυκίνης (Mitomycin C, Mit.C) (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (Abou-Eisha et al., 2004).

Το χρονοδιάγραμμα της καλλιέργειας των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων για την ανίχνευση της *in vitro* γενοτοξικής δράσης των μελετώμενων φυτοφαρμάκων με την εφαρμογή της μεθόδου αναστολής της κυτταροκίνησης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Η προσθήκη του χημικού, 41 ώρες από την έναρξη της καλλιέργειας, αντιστοιχεί στη μετάπτωση από τη φάση S του κυτταρικού κύκλου στη φάση G_2 .



6.2.3. Προετοιμασία παρασκευασμάτων

Για τη συλλογή των κυττάρων, την επίστρωση και τη χρώση των παρασκευασμάτων ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε και στο προηγούμενο πείραμα.

6.2.4. Μετρήσεις – Στατιστική ανάλυση

Οι μετρήσεις σε κάθε παρασκεύασμα καθώς και η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγιναν όπως προαναφέρθηκε στο προηγούμενο πείραμα.

6.3. *In vitro* επαγωγή ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από επίδραση των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl

6.3.1. Συλλογή δειγμάτων

Για την καλλιέργεια λεμφοκυττάρων πήραμε αίμα από έναν υγιή δότη με τον τρόπο που αναφέρθηκε στα προηγούμενα πειράματα.

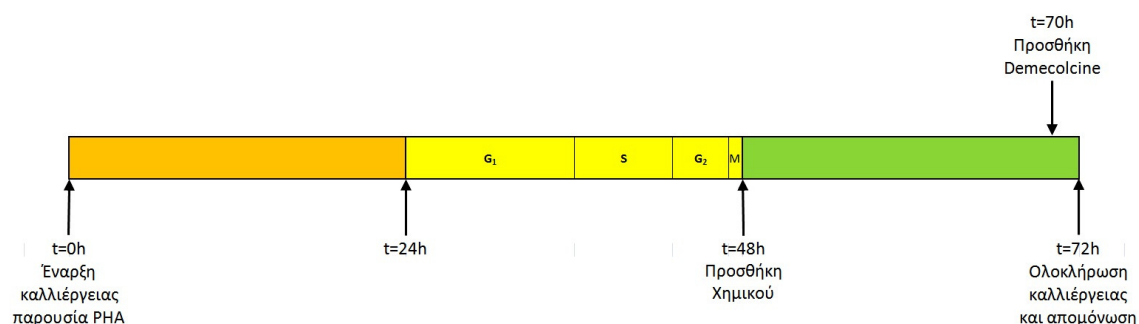
6.3.2. Καλλιέργεια λεμφοκυττάρων

Η μέθοδος της καλλιέργειας είναι η ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε για την τεχνική των μικροπυρήνων με τις εξής διαφοροποιήσεις:

- Προσθέσαμε στο καλλιεργητικό μέσο 5-βρωμοδεοξουριδίνη (bromodeoxyuridine, 5-BrdU) (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 7.5 µg/ml. Οι φλάσκες καλλιέργειας καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο γιατί το φως της μέρας προκαλεί φωτόλυση του υποκατεστημένου με BrdU DNA με επακόλουθο την αύξηση της συχνότητας των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων.
- 48 ώρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας προστέθηκαν τα χημικά για την επίτευξη των ίδιων συγκεντρώσεων μεμονωμένα και σε συνδυασμό.
- Προσθέσαμε Demecolcine (Biochrom) σε τελική συγκέντρωση 0.3 µg/ml δύο ώρες πριν το τέλος της καλλιέργειας (Vlastos et al., 1998).

- Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε Mit-C (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 0.1 $\mu\text{g/ml}$ (Abou-Eisha et al., 2004).

Το χρονοδιάγραμμα της καλλιέργειας των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων για την ανίχνευση της *in vitro* γενοτοξικής δράσης των μελετώμενων φυτοφαρμάκων με την εφαρμογή της μεθόδου των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



6.3.3. Προετοιμασία παρασκευασμάτων

Για την απομόνωση των λεμφοκυττάρων και τη λήψη χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Moorhead et al. (1960) με μικρές διαφοροποιήσεις, το οποίο περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- φυγοκέντρηση στις 1800 στροφές για 10 λεπτά και αφαίρεση υπερκείμενου
- προσθήκη 8 ml υποτονικού διαλύματος με ελαφρά ανάδευση στο vortex
- επώαση στους 37°C για 20 λεπτά
- φυγοκέντρηση στις 1800 στροφές για 10 λεπτά και αφαίρεση υπερκείμενου
- κρατάμε το ίζημα με μικρή ποσότητα υποτονικού διαλύματος και προσθέτουμε μονιμοποιητικό διάλυμα με συνεχή ανάδευση στο vortex προσέχοντας να μη δημιουργηθούν συσσωματώματα
- 30 λεπτά στο ψυγείο

- φυγοκέντρωση στις 1800 στροφές για 10 λεπτά και αφαίρεση υπερκείμενου
- 2^η προσθήκη μονιμοποιητικού διαλύματος με ελαφρά ανάδευση στο vortex
- 15 λεπτά στο ψυγείο
- φυγοκέντρωση στις 1800 στροφές για 10 λεπτά και αφαίρεση υπερκείμενου
- 3^η προσθήκη μονιμοποιητικού διαλύματος με ελαφρά ανάδευση στο vortex
- φυγοκέντρωση στις 1800 στροφές για 10 λεπτά και αφαίρεση υπερκείμενου εκτός από μια μικρή ποσότητα μονιμοποιητικού (~0,5ml) και ήπια ανάδευση με πιπέττα Pasteur
- Επίστρωση: με πιπέττα Pasteur, 1-2 σταγόνες εναιωρήματος σε καθαρή και παγωμένη αντικειμενοφόρο από ύψος 50-60 cm
- μετά την επίστρωση τα χρωμοσωματικά παρασκευάσματα παραμένουν χωρίς καμιά επέμβαση για 3-5 μέρες, ώστε να επέλθει γήρανση των κυττάρων.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παραπάνω διαδικασία ήταν τα εξής:

Υποτονικό : KCl 0,075 M (Biochrom)

Μονιμοποιητικό: Μεθανόλη (Riedel) / οξικό οξύ (Riedel) 3:1

Ακολούθησε χρώση σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Perry & Wolff (1974) η οποία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Βάψιμο με τη φθορίζουσα χρωστική Hoechst 33258 για 15 λεπτά. Τα δοχεία χρώσης καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί η χρωστική είναι ευαίσθητη στο φως.
- Ξέπλυμα 3 φορές με απεσταγμένο νερό και στέγνωμα
- Τα παρασκευάσματα τοποθετούνται σε πλαστικά διαφανή δοχεία με διάλυμα Sorensen buffer σε αρκετή ποσότητα ώστε να καλύπτονται και παραμένουν για 30 λεπτά εκτεθειμένα σε UV ακτινοβολία.
- Τα παρασκευάσματα τοποθετούνται σε δ/μα 2×SSC σε υδατόλουτρο, στους 60° C για 30 λεπτά.

- Ξέπλυμα 3 φορές με απεσταγμένο νερό
- Χρώση με διάλυμα Giemsa 3% για 12-15 λεπτά
- Ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό και στέγνωμα
- προσθήκη DPX και κλείσιμο με καλυπτρίδα.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παραπάνω διαδικασία ήταν τα εξής:

- Sorensen's buffer, pH 6.8 (KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 1:1)
- Δ/μα KH_2PO_4 (Riedel): 9.08 gr + 1lt H_2O
- Δ/μα Na_2HPO_4 (Merck): 11.88 gr + 1lt H_2O
- 2 x SSC : 0.3 M NaCl (Riedel)/ 0.03 M κιτρικό νάτριο $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck):
17.535gr NaCl + 8.823gr $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ + 1lt H_2O
- Giemsa (Fluka) 3% σε Sorensen's buffer
- Διάλυμα Hoechst 33258 (Sigma) 0.5 mg/ 5ml H_2O

Μετά τη διαδικασία αυτή τα παρασκευάσματα είναι έτοιμα για μικροσκοπική παρατήρηση η οποία έγινε σε μικροσκόπιο Leica DMR.

6.3.4. Μετρήσεις – Στατιστική ανάλυση

Για τον υπολογισμό της συχνότητας των ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων (SCEs) μετρήθηκαν 50 M_2 μεταφάσεις για κάθε πειραματικό σημείο ελέγχου. Επίσης, για κάθε πειραματικό σημείο ελέγχου μετρήθηκαν συνολικά 200 μεταφάσεις για τον υπολογισμό του δείκτη διπλασιασμού (Replication Index, RI) που σχετίζεται με τη διαδικασία πολλαπλασιασμού των κυττάρων και είναι ενδεικτικός πιθανών κυτταροτοξικών επιδράσεων (Preston et al., 1987; Albertini et al., 2000).

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA), για την εξαγωγή των μέσων τιμών $\pm$ το τυπικό σφάλμα. Για τη σύγκριση των μέσων τιμών των συχνοτήτων των SCEs, χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Student's t-test.

7. Μελέτη της γενοτοξικής δράσης των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl σε *in vivo* συνθήκες, σε πειραματόζωα

7.1. Προετοιμασία πειραματόζωων

Για την πραγματοποίηση αυτών των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 55 αρσενικοί αρουραίοι φυλής Wistar, ηλικίας 45 ημερών, τους οποίους προμηθευτήκαμε από το εκτροφείο πειραματόζωων του Ινστιτούτου Pasteur στην Αθήνα. Χωρίστηκαν σε ομάδες των 5 ζώων. Οι μέσες συχνότητες των βαρών μέσα σε κάθε ομάδα δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, συγκρινόμενες με το Student's t-test. Τα ζώα διαβίωναν μέσα σε κλουβιά από ανοξείδωτο πλέγμα, υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, αερισμού και φωτισμού και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.

Στα ζώα χορηγήθηκαν τα δύο φυτοφάρμακα μεμονωμένα, αλλά και σε συνδυασμό. Ο τρόπος χορήγησης ήταν στοματικός με κατάλληλες βελόνες οισοφαγικού καθετηριασμού (Harvard). Παρασκευάστηκαν ομοιογενή διαλύματα των σκευασμάτων σε επιθυμητές συγκεντρώσεις ώστε να πετύχουμε 3 δόσεις χορήγησης:

- 100, 200, 300 mg/kg σωματικού βάρους για το Imidacloprid (Riedel) που αντιστοιχούν στο 22, 45 και 67% της αναφερόμενης στη βιβλιογραφία θανατηφόρου δόσης - 50% (LD_{50} = 450 mg/kg) (NPIC, 2010).
- 75, 150, 300 mg/kg σωματικού βάρους για το Metalaxyl (Riedel) που αντιστοιχούν στο 11, 22 και 45% της αναφερόμενης στη βιβλιογραφία θανατηφόρου δόσης - 50% (LD_{50} = 669 mg/kg) (EXTOXNET, 1996).
- 150, 200, 400 mg/kg σωματικού βάρους για το μίγμα με ανάμειξη των δύο σκευασμάτων σε αναλογία 1:1.

Στους θετικούς μάρτυρες χορηγήθηκε διάλυμα κυκλοφωσφαμιδίου (cyclophosphamide, CP) (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 20 mg/kg σωματικού βάρους (US FDA/CFSAN, 2000).

Στους αρνητικούς μάρτυρες δεν πραγματοποιήθηκε χορήγηση καθώς στα διαλύματα των υπό μελέτη χημικών χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το νερό.

7.2. Προετοιμασία παρασκευασμάτων

Τα πειραματόζωα αναισθητοποιούνταν μέσα σε ειδικά διαμορφωμένη διάταξη με παροχή CO₂, 24 ώρες μετά τη χορήγηση, και θανατώνονταν με εξάρθρωση του νωτιαίου μυελού, τηρώντας πάντα τους κανόνες επιστημονικής και επαγγελματικής δεοντολογίας του Εκτροφείου Πειραματόζωων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αμέσως μετά ακολουθούσε η λήψη του μυελού του μηριαίου οστού για την εφαρμογή της μεθόδου των μικροπυρήνων, όπως περιγράφεται από τον Schmid (1975) με μικρές παραλλαγές. Ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Λήψη του μυελού και από τα δυο μηριαία οστά κάθε ζώου μέσα σε φιαλίδιο erpenforf με 2 ml ορού (Foetal Bovine Serum, FBS) (Gibco).
- Φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 30 λεπτά
- Επαναδιάλυση του ιζήματος με ορό όγκου περίπου ίσου με τον όγκο του ιζήματος.
- Επίστρωση σε καθαρές και στεγνές αντικειμενοφόρους πλάκες και στέγνωμα στον αέρα.
- Μονιμοποίηση με μεθανόλη (Riedel) για 5 λεπτά
- Βάψιμο με συνδυασμό των χρωστικών MayGrünwald (Fluka) και Giemsa (Fluka). Για την επίτευξη της χρώσης αυτής τα παρασκευάσματα εμβαπτίζονταν διαδοχικά σε μη-αραιωμένο διάλυμα MayGrünwald για 3 λεπτά, σε διάλυμα MayGrünwald – Buffer Phosphate (KH₂PO₄ + Na₂HPO₄) 1:1 για 2 λεπτά, σε Buffer Phosphate για να ξεπλυθεί η περίσσεια χρωστικής και τέλος, σε διάλυμα Giemsa - Buffer Phosphate 1:5 για 20 λεπτά.
- Ξέπλυμα με απιονισμένο νερό
- Ξέπλυμα με ξυλένιο για 5 λεπτά
- Κλείσιμο με DPX mounting medium (Scharlau) και καλυπτρίδα.

7.3. Μετρήσεις – Στατιστική ανάλυση

Τα παρασκευάσματα εξετάστηκαν σε φωτονικό μικροσκόπιο (Olympus CH20BIMF) σε μεγέθυνση 10×100. Για κάθε ζώο και για κάθε συγκέντρωση

μετρήθηκαν τουλάχιστον 2000 πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα (Polychromatic Erythrocytes, PCEs) και εξετάστηκαν για την παρουσία μικροκυρήνων. Επίσης, για κάθε ζώο και για κάθε συγκέντρωση μετρήθηκαν συνολικά 200 ερυθροκύτταρα, ανώριμα (PCEs) και ώριμα (Normochromatic Erythrocytes, NCEs), για τον υπολογισμό της συχνότητας των PCEs (Mavournin et al., 1990; Gollapudi et al., 1995; Hayashi et al., 2000).

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA), για την εξαγωγή των μέσων τιμών $\pm$ το τυπικό σφάλμα. Για τη σύγκριση των μέσων τιμών συχνότητων των PCEs με μικροκυρήνα, των μέσων τιμών του ποσοστού των PCEs, καθώς και των μέσων τιμών των βαρών των ζώων χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Student's t-test.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8. Μελέτη της γενοτοξικής δράσης των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων καλλιεργητών

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η πιθανή γενοτοξική δράση των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl. Τα δυο συγκεκριμένα φυτοφάρμακα επιλέχθηκαν γιατί εκτός των άλλων εφαρμογών τους σε πληθώρα καλλιεργειών χρησιμοποιούνται ευρέως στην καλλιέργεια καπνού, που αποτελεί μια από τις κύριες αγροτικές δραστηριότητες στην περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας, όπου πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη. Οι καλλιεργητές που ψεκάζουν με τα συγκεκριμένα φυτοφάρμακα βρίσκονται σε άμεσο κίνδυνο, λόγω της απευθείας έκθεσής τους σε αυτά, και με το δεδομένο ότι συχνά, δεν χρησιμοποιούν κατάλληλο προστατευτικό εξοπλισμό. Τα συγκεκριμένα φυτοφάρμακα έχουν εξεταστεί ως προς τη γενοτοξική τους δράση, αλλά η πλειοψηφία των μελετών έχουν γίνει με πειραματόζωα σε *in vivo* συνθήκες (Feng et al., 2004; Karabay & Oguz, 2005), ή χρησιμοποιώντας αίμα υγιών ατόμων ως πειραματικό υλικό, σε *in vitro* συνθήκες (Perocco et al., 1995; Hrelia et al., 1996; Feng et al., 2005; Costa et al., 2009; Stivaktakis et al., 2010). Επιπλέον, το καθένα από τα δυο φυτοφάρμακα έχει μελετηθεί μεμονωμένα. Στην παρούσα μελέτη, σε μια πρώτη φάση, έγινε μια προσπάθεια να διερευνηθεί η *in vivo* επίδραση των δυο φυτοφαρμάκων σε συνδυασμό, χρησιμοποιώντας ως δότες καλλιεργητές καπνού της περιοχής της Αιτωλοακαρνανίας, οι οποίοι ψέκαζαν τις καλλιέργειές τους αποκλειστικά με δυο εμπορικά σκευάσματα που περιείχαν τα δυο υπό μελέτη φυτοφάρμακα, σε διάφορες περιόδους κατά τη διάρκεια του έτους. Χρησιμοποιήθηκε ως πειραματικό υλικό, περιφερικό αίμα των καλλιεργητών αυτών πριν και μετά την περίοδο ψεκασμού και ως δοκιμασία ελέγχου, η τεχνική των μικροπυρήνων με αναστολή της κυτταροκίνησης με κυτταροχαλασίνη-B (CBMN method).

Η επαγωγή μικροπυρήνων στα λεμφοκύτταρα των καλλιεργητών συγκρίθηκε με την τυχαία επαγωγή μικροπυρήνων στα λεμφοκύτταρα μιας ισάριθμης ομάδας υγιών δοτών, μη καλλιεργητών, που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί

μάρτυρες. Τα άτομα που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη διαχωρίστηκαν σε ομάδες καπνιστών και μη-καπνιστών. Τα χαρακτηριστικά των ατόμων που εξετάστηκαν (αρνητικοί μάρτυρες και καλλιεργητές) παρουσιάζονται στον **πίνακα 8.1**.

Πίνακας 8.1. Χαρακτηριστικά των δοτών			
	Αρνητικοί μάρτυρες	Καλλιεργητές	Στατιστική ανάλυση
Αριθμός ατόμων	11	11	
Ηλικία	38.18±4.05 [#]	43.82±3.76 [#]	$F=1.04$ $p=0.32^*$
Εύρος ηλικίας	22-58	23-60	
Χρόνια έκθεσης	-	23.64±4.13 [#]	
Συνήθεια καπνίσματος			
Αριθμός μη-καπνιστών	5	5	
Αριθμός καπνιστών	6	6	
Αριθμός τσιγάρων/μέρα	27.5±5.44 [#]	40±8.94 [#]	$F=1.43$ $p=0.26^*$
[#] Μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, [*] $p>0.05$ (One-Way ANOVA test)			

Εξετάστηκαν συνολικά 11 καλλιεργητές, από τους οποίους οι 5 ήταν μη-καπνιστές και οι 6 καπνιστές. Από τους αρνητικούς μάρτυρες, επίσης οι 5 ήταν μη-καπνιστές και οι 6 καπνιστές. Η ηλικία των καλλιεργητών ήταν κατά μέσο όρο 43.82±3.76 έτη, ενώ η ηλικία των αρνητικών μαρτύρων ήταν κατά μέσο όρο 38.18±4.05 έτη. Οι καπνιστές καλλιεργητές κάπνιζαν κατά μέσο όρο 40±8.94 τσιγάρα την ημέρα, ενώ οι καπνιστές αρνητικοί μάρτυρες κάπνιζαν κατά μέσο όρο 27.5±5.44 τσιγάρα την ημέρα. Τα χρόνια επαγγελματικής ενασχόλησης των καλλιεργητών και κατά συνέπεια και τα χρόνια έκθεσής τους στα εν λόγω φυτοφάρμακα, ήταν κατά μέσο όρο 23.64±4.13. Συγκρίνοντας τα επιμέρους χαρακτηριστικά των αρνητικών μαρτύρων και των καλλιεργητών με την ανάλυση One-Way ANOVA, παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Στον **πίνακα 8.2** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης που αφορούν τους αρνητικούς μάρτυρες. Πιο συγκεκριμένα παρουσιάζονται οι συχνότητες των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN – 3^η στήλη) και των μικροπυρήνων (MN – 4^η στήλη) ανά 1000 διπύρηνια κύτταρα, καθώς

και οι τιμές του δείκτη διπλασιασμού των κυττάρων (CBPI – 5^η στήλη) για κάθε έναν από τους αρνητικούς μάρτυρες, οι οποίοι είναι χωρισμένοι σε δύο ομάδες: καπνιστές (Α) και μη-καπνιστές (Β). Στην τελευταία γραμμή του πίνακα αναφέρονται οι συνολικές τιμές BNMN και MN σε σύνολο 11000 διπύρηνων κυττάρων που καταμετρήθηκαν. Ο δείκτης CBPI υπολογίστηκε για την ανίχνευση πιθανών διαφορών στην κινητική ανάπτυξης των λεμφοκυττάρων οι οποίες συνδέονται με κυτταροτοξικές επιδράσεις. Ο υπολογισμός του έγινε σε σύνολο 2000 κυττάρων σύμφωνα με τον τύπο: $CBPI = M_1 + 2M_2 + 3(M_3 + M_4) / N$, όπου M_1 , M_2 , M_3 και M_4 είναι ο αριθμός κυττάρων με έναν, δυο, τρεις και τέσσερις πυρήνες αντίστοιχα και N είναι ο συνολικός αριθμός κυττάρων που μετρήθηκαν (Surrallès et al., 1995; Lorge et al., 2008).

Στον **πίνακα 8.3** παρουσιάζονται οι μέσες τιμές συχνοτήτων (‰) των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN – 2^η στήλη) και οι μέσες τιμές συχνοτήτων (‰) των μικροπυρήνων (MN – 3^η στήλη), στις καλλιέργειες λεμφοκυττάρων καπνιστών και μη-καπνιστών αρνητικών μαρτύρων. Σχετικά με τη συνήθεια του καπνίσματος, μεταξύ των αρνητικών μαρτύρων, οι καπνιστές δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές από τους μη-καπνιστές, ούτε ως προς την επαγωγή BNMN ($F=0.41$, $p=0.54$), ούτε ως προς την επαγωγή MN ($F=0.06$, $p=0.81$). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με όσα έχουν αναφερθεί από την ομάδα μελέτης του προγράμματος HUMN για την επίδραση του καπνίσματος στη συχνότητα των μικροπυρήνων σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (Bonassi et al., 2003).

Η στατιστική ανάλυση (One-Way ANOVA test) των τιμών του CBPI (4^η στήλη) δεν έδειξε σημαντικές διαφορές ($F=0.64$, $p=0.45$) μεταξύ καπνιστών (1.66 ± 0.13) και μη-καπνιστών (1.78 ± 0.06) αρνητικών μαρτύρων. Κατά συνέπεια, η συνήθεια του καπνίσματος δεν φαίνεται να έχει κάποια κυτταροτοξική επίδραση στα λεμφοκύτταρα των αρνητικών μαρτύρων.

Πίνακας 8.2. Συχνότητες διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN) και μικροπυρήνων (MN), σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων αρνητικών μαρτύρων. (**A:** καπνιστές, **B:** μη-καπνιστές)

	Δότες	BNMN	MN	CBPI
A	1	14	15	1.87
	2	9	11	1.47
	3	5	7	1.22
	4	6	6	1.70
	5	8	8	2.11
	6	10	12	1.57
Σύνολο A		52	59	-
B	7	14	15	1.67
	8	14	15	1.75
	9	7	7	1.99
	10	7	7	1.70
	11	8	8	1.77
Σύνολο B		50	52	-
Σύνολο A+B		102*	111*	-

BNMN: διπύρηννα κύτταρα με μικροπυρήνα, MN: μικροπυρήνες, CBPI: δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων, *σύνολο BNMN και MN σε 11000 διπύρηννα κύτταρα (BN) που καταμετρήθηκαν συνολικά.

Πίνακας 8.3. Μέσες τιμές συχνοτήτων (%) διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN) και μικροπυρήνων (MN), σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων καπνιστών και μη-καπνιστών αρνητικών μαρτύρων.

	BNMN M.O.±τ.σ.	MN M.O.±τ.σ.	CBPI M.O.±τ.σ.
Καπνιστές	8.67 ± 1.31	9.83 ± 1.40	1.66 ± 0.13
Μη- καπνιστές	10.00 ± 1.64	10.40 ± 1.89	1.78 ± 0.06
	<i>F</i> =0.41, <i>p</i> =0.54	<i>F</i> =0.06, <i>p</i> =0.81	<i>F</i> =0.64, <i>p</i> =0.45

BNMN: διπύρηννα κύτταρα με μικροπυρήνα, MN: μικροπυρήνες, CBPI: δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων, M.O.± τ.σ.: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα

Στον **πίνακα 8.4** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης που αφορούν τους δότες-καλλιεργητές. Πιο συγκεκριμένα παρουσιάζονται οι συχνότητες των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN) και των μικροπυρήνων (MN) ανά 1000 διπύρηνια κύτταρα, καθώς και οι τιμές του δείκτη διπλασιασμού των κυττάρων (CBPI) για κάθε έναν από τους δότες-καλλιεργητές, οι οποίοι είναι χωρισμένοι σε καπνιστές (Α) και μη-καπνιστές (Β), πριν και μετά τον ψεκασμό. Στην προ-τελευταία γραμμή του πίνακα αναφέρονται οι συνολικές τιμές BNMN και MN σε σύνολο 11000 διπύρηνων κυττάρων που καταμετρήθηκαν. Στην τελευταία γραμμή του πίνακα αναφέρονται οι μέσες τιμές συχνοτήτων των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα, οι μέσες τιμές συχνοτήτων των μικροπυρήνων και οι μέσες τιμές του CBPI, στο σύνολο των καλλιεργητών, πριν και μετά τον ψεκασμό.

Παρατηρείται μια μικρή αύξηση στον αριθμό τόσο των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα, όσο και των μικροπυρήνων, μετά τον ψεκασμό. Η ασυνέχεια που παρατηρείται στις τιμές του 2^{ου} και του 6^{ου} δότη μπορεί να αποδοθεί στην ποικιλοότητα των συνθηκών ψεκασμού, όπως για παράδειγμα η συνολική ψεκαζόμενη έκταση ή η χρήση προστατευτικού εξοπλισμού. Η στατιστική ανάλυση των τιμών (One-Way ANOVA test) δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην επαγωγή μικροπυρήνων ($F=2.39$, $p=0.14$) πριν (13.82 ± 1.71) και μετά (18.00 ± 2.10) τον ψεκασμό, ούτε στην επαγωγή διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα ($F=2.67$, $p=0.18$) πριν (12.82 ± 1.61) και μετά (17.00 ± 1.99) τον ψεκασμό.

Τα αποτελέσματά μας αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών πάνω στην επαγωγή μικροπυρήνων σε Ισπανούς και Ούγγρους καλλιεργητές, εκτεθειμένους λόγω επαγγελματικής ενασχόλησης σε σύνθετο μίγμα φυτοφαρμάκων, στις οποίες δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην περίοδο υψηλής έκθεσης (άνοιξη-καλοκαίρι) και στην περίοδο χαμηλής έκθεσης (φθινόπωρο-χειμώνας), ή ανάμεσα σε μέτρια εκτεθειμένους και βαριά εκτεθειμένους καλλιεργητές (Pastor et al., 2002a & 2002b).

Η στατιστική ανάλυση (One-Way ANOVA test) των τιμών του CBPI δεν έδειξε κάποια κυτταροτοξική επίδραση των μελετώμενων φυτοφαρμάκων στα λεμφοκύτταρα των καλλιεργητών. Επίσης, δεν έδειξε κάποια επίδραση λόγω

Πίνακας 8.4. Συχνότητες διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN) και μικροπυρήνων (MN), σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων καλλιεργητών πριν και μετά τον ψεκασμό. (A : καπνιστές, B : μη-καπνιστές)									
	Δότες	BNMN		MN		CBPI			
		Πριν	Μετά	Πριν	Μετά	Πριν	Μετά		
A	1	11	16	12	16	1.82	2.17		
	2	20	13	23	13	1.99	2.02		
	3	7	15	7	16	1.76	2.12		
	4	13	34	14	36	2.05	2.00		
	5	8	18	8	18	2.07	2.12		
	6	21	15	21	19	2.11	1.92		
Σύνολο A		80	111	85	118	-	-		
B	7	5	9	7	10	1.65	1.41		
	8	19	23	21	24	2.25	1.56		
	9	14	16	14	17	1.28	1.92		
	10	12	13	12	14	1.65	2.00		
	11	11	15	13	15	1.70	2.05		
Σύνολο B		61	76	67	80	-	-		
Σύνολο A+B		141*	187*	152*	198*	-	-		
M.O.±τ.σ.		12.82±1.61	17.00±1.99	13.82±1.71	18.00±2.10	1.85±0.08	1.94±0.07		

BNMN: διπύρηνια κύτταρα με μικροπυρήνα, MN: μικροπυρήνες, CBPI: δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων, M.O.± τ.σ.: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα *σύνολο BNMN και MN σε 11000 διπύρηνια κύτταρα (BN) που καταμετρήθηκαν συνολικά.

της έκθεσης στα φυτοφάρμακα, αφού δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές ($F=0.62$, $p=0.44$) πριν (1.85 ± 0.08) και μετά (1.94 ± 0.07) τον ψεκασμό. Ωστόσο, οι διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στις μελετώμενες ομάδες μπορεί να οφείλονται στον ποικίλο βαθμό έκθεσης κατά τη διάρκεια του ψεκασμού. Επειδή οι ψεκασμοί δεν πραγματοποιούνται κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, είναι δύσκολο να εκτιμηθεί ο βαθμός της *in vivo* έκθεσης στα φυτοφάρμακα κατά τη διάρκειά τους.

Για να προσδιοριστεί η συμβολή της παραμέτρου του καπνίσματος στην επαγωγή μικροπυρήνων από τα φυτοφάρμακα, οι δότες-καλλιεργητές χωρίστηκαν σε ομάδες καπνιστών και μη-καπνιστών και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (One-Way ANOVA test) φαίνεται στον **πίνακα 8.5**. Πιο αναλυτικά, παρουσιάζονται οι μέσες τιμές συχνοτήτων (‰) των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN – 2^η και 3^η στήλη) και οι μέσες τιμές συχνοτήτων (‰) των μικροπυρήνων (MN – 4^η και 5^η στήλη), στις καλλιέργειες λεμφοκυττάρων καπνιστών και μη-καπνιστών καλλιεργητών, πριν και μετά τον ψεκασμό. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των καπνιστών τόσο στην επαγωγή μικροπυρήνων ($F=1.62$, $p=0.23$) πριν (14.17 ± 2.70) και μετά (19.67 ± 3.37) τον ψεκασμό, όσο και στην επαγωγή διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα ($F=1.67$, $p=0.23$) πριν (13.33 ± 2.43) και μετά (18.50 ± 3.17) τον ψεκασμό. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και μεταξύ των μη-καπνιστών τόσο στην επαγωγή μικροπυρήνων ($F=0.65$, $p=0.44$) πριν (13.40 ± 2.25) και μετά (16.00 ± 2.30) τον ψεκασμό, όσο και στην επαγωγή διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα ($F=0.87$, $p=0.38$) πριν (12.20 ± 2.27) και μετά (15.20 ± 2.29) τον ψεκασμό. Τέλος, συγκρίνοντας τις μέσες συχνότητες μεταξύ καπνιστών και των μη-καπνιστών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ούτε στην επαγωγή μικροπυρήνων πριν ($F=0.05$, $p=0.84$) και μετά ($F=0.74$, $p=0.41$) τον ψεκασμό, ούτε στην επαγωγή διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα πριν ($F=0.11$, $p=0.74$) και μετά ($F=0.66$, $p=0.44$) τον ψεκασμό. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που αναφέρουν ότι δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας των μικροπυρήνων και του καπνίσματος (Norppa et al., 1993; Falck et al., 1999; Bonassi et al., 2003).

Πίνακας 8.5. Μέσες τιμές συχνοτήτων (‰) διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN) και μικροπυρήνων (MN), σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων καπνιστών και μη-καπνιστών καλλιεργητών, πριν και μετά τον ψεκασμό.

	BNMN Μ.Ο.±τ.σ.		MN Μ.Ο.±τ.σ.	
	Πριν	Μετά	Πριν	Μετά
Καπνιστές	13.33±2.43	18.50±3.17	14.17±2.70	19.67±3.37
Μη- καπνιστές	12.20±2.27	15.20±2.29	13.40±2.25	16.00±2.30
	$F=0.11,$ $p=0.74$	$F=0.66,$ $p=0.44$	$F=0.05,$ $p=0.84$	$F=0.74,$ $p=0.41$

BNMN: διπύρηνια κύτταρα με μικροπυρήνα, MN: μικροπυρήνες, Μ.Ο.± τ.σ.: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα

Προκειμένου να διερευνηθεί αν η επαγωγή μικροπυρήνων οφείλεται σε θραυσματογόνο ή σε ανευπλοειδογόνο δράση των φυτοφαρμάκων, οι καταμετρημένοι μικροπυρήνες ταξινομήθηκαν με βάση το μέγεθός τους και έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μικροπυρήνες μικρού μεγέθους (Small, S) παρουσιάζουν μεγαλύτερη πιθανότητα να περιέχουν άκεντρα χρωμοσωματικά θραύσματα, υποδηλώνοντας θραυσματογόνο δράση, ενώ οι μικροπυρήνες μεγάλου μεγέθους (Large, L) παρουσιάζουν μεγαλύτερη πιθανότητα να περιέχουν ολόκληρα χρωμοσώματα, υποδηλώνοντας ανευπλοειδογόνο δράση (Yamamoto and Kikuchi, 1980; Högstädt et al., 1988; Vanderkerken et al., 1989; Papapoulou et al., 2001; Hashimoto et al., 2010). Στον **πίνακα 8.6** παρουσιάζονται οι συχνότητες των μικροπυρήνων, ταξινομημένων με βάση το μέγεθός τους σε μικρούς (S), μεσαίους (Medium, M) και μεγάλους μικροπυρήνες (L), για κάθε έναν από τους δότες-καλλιεργητές, καπνιστές (A) και μη-καπνιστές (B), πριν και μετά τον ψεκασμό. Στην τελευταία γραμμή του πίνακα αναφέρονται οι συνολικές τιμές BNMN και MN σε σύνολο 11000 διπύρηνων κυττάρων που καταμετρήθηκαν.

Παρατηρείται μια μικρή αύξηση στις συνολικές τιμές των μικρών (75-84), των μεσαίων (50-79) και των μεγάλων (27-35) μικροπυρήνων μετά τον ψεκασμό. Δεν παρατηρήθηκαν όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε στις συχνότητες των μικρών ($F=0.22$, $p=0.64$), ούτε στις συχνότητες των μεσαίων ($F=3.15$, $p=0.09$), ούτε στις συχνότητες των μεγάλων ($F=0.71$, $p=0.41$) μικροπυρήνων, πριν και μετά τον ψεκασμό.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και ξεχωριστά στις ομάδες των καπνιστών (**πίνακας 8.6.A**) και των μη-καπνιστών (**πίνακας 8.6.B**). Στην ομάδα των καπνιστών παρατηρείται μια μικρή αύξηση στις συνολικές τιμές των μικρών (45-52), των μεσαίων (28-49) και των μεγάλων (12-17) μικροπυρήνων μετά τον ψεκασμό. Δεν παρατηρήθηκαν όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε στις συχνότητες των μικρών ($F=0.22$, $p=0.65$), ούτε στις συχνότητες των μεσαίων ($F=1.82$, $p=0.21$), ούτε στις συχνότητες των μεγάλων ($F=0.84$, $p=0.38$) μικροπυρήνων, πριν και μετά τον ψεκασμό. Παρομοίως, στην ομάδα των μη-καπνιστών παρατηρείται μια μικρή αύξηση στις συνολικές τιμές των μικρών (30-32), των μεσαίων (22-30) και των μεγάλων (15-18) μικροπυρήνων μετά τον ψεκασμό. Πάλι όμως δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε στις συχνότητες των μικρών ($F=0.02$, $p=0.88$), ούτε στις συχνότητες των μεσαίων ($F=1.88$, $p=0.21$), ούτε στις συχνότητες των μεγάλων ($F=0.14$, $p=0.72$) μικροπυρήνων, πριν και μετά τον ψεκασμό.

Στον **πίνακα 8.7** παρουσιάζονται οι μέσες τιμές συχνοτήτων (‰) των μικρών μικροπυρήνων (S- 2^η και 3^η στήλη), οι μέσες τιμές συχνοτήτων (‰) των μεσαίων μικροπυρήνων (M- 4^η και 5^η στήλη), και οι μέσες τιμές συχνοτήτων (‰) των μεγάλων μικροπυρήνων (L- 6^η και 7^η στήλη), στις καλλιέργειες λεμφοκυττάρων καπνιστών και μη-καπνιστών καλλιεργητών, πριν και μετά τον ψεκασμό. Συγκρίνοντας τις μέσες συχνότητες, αναφορικά με την κατανομή του μεγέθους των μικροπυρήνων, των καπνιστών και των μη-καπνιστών, παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές για κανένα μέγεθος μικροπυρήνων, ούτε πριν, ούτε μετά τον ψεκασμό.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν δίνουν κάποια σαφή ένδειξη θραυσματογόνου και/ή ανευπλοειδογόνου δράσης που να σχετίζεται με την έκθεση των καλλιεργητών στα υπό μελέτη φυτοφάρμακα.

Πίνακας 8.6. Συχνότητες μικροπυρήνων ταξινομημένων με βάση το μέγεθος, σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων καλλιεργητών πριν και μετά τον ψεκασμό. (**A:** καπνιστές, **B:** μη-καπνιστές)

	Δότες	S		M		L	
		Πριν	Μετά	Πριν	Μετά	Πριν	Μετά
A	1	4	8	6	4	2	4
	2	18	9	3	3	2	1
	3	4	6	1	10	2	0
	4	4	13	6	18	4	5
	5	5	8	2	7	1	3
	6	10	8	10	7	1	4
Σύνολο A		45	52	28	49	12	17
B	7	5	3	2	5	0	2
	8	7	16	8	8	6	0
	9	6	4	5	6	3	7
	10	5	3	3	5	4	6
	11	7	6	4	6	2	3
Σύνολο B		30	32	22	30	15	18
Σύνολο A+B		75*	84*	50*	79*	27*	35*

S: μικροί, M: μεσαίοι και L: μεγάλοι μικροπυρήνες, *σύνολο S, M και L MN σε 11000 διπύρρηνα κύτταρα (BN) που καταμετρήθηκαν συνολικά.

Πίνακας 8.7. Μέσες τιμές συχνοτήτων (%) μικροπυρήνων ταξινομημένων με βάση το μέγεθος, σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων καπνιστών και μη-καπνιστών καλλιεργητών, πριν και μετά τον ψεκασμό.

	S Μ.Ο.±τ.σ.		M Μ.Ο.±τ.σ.		L Μ.Ο.±τ.σ.	
	Πριν	Μετά	Πριν	Μετά	Πριν	Μετά
Καπνιστές	7.50±2.31	8.67±0.95	4.67±1.36	8.17±2.21	2.00±0.45	2.83±0.79
Μη-καπνιστές	6.00±0.45	6.40±2.46	4.40±1.03	6.00±0.55	3.00±1.00	3.60±1.29
	F=0.34 p=0.58	F=0.85 p=0.38	F=0.02 p=0.88	F=0.75 p=0.41	F=0.94 p=0.36	F=0.28 p=0.61

S: μικροί, M: μεσαίοι και L: μεγάλοι μικροπυρήνες, Μ.Ο.± τ.σ.: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα

Στον **πίνακα 8.8** παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (One-Way ANOVA test) των τιμών των παραπάνω πινάκων. Συγκρίναμε τη μέση συχνότητα των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN) καθώς και των μικροπυρήνων (MN) μεταξύ: α) αρνητικών μαρτύρων καπνιστών και καλλιεργητών καπνιστών (πριν και μετά τον ψεκασμό) β) αρνητικών μαρτύρων μη-καπνιστών και καλλιεργητών μη-καπνιστών (πριν και μετά τον ψεκασμό) και γ) συνολικών αρνητικών μαρτύρων και συνολικών καλλιεργητών (πριν και μετά τον ψεκασμό).

Στην ομάδα των καπνιστών, παρατηρείται αύξηση στη συχνότητα των BNMN (13.33 ± 2.43) και των MN (14.17 ± 2.70) των καλλιεργητών πριν τον ψεκασμό σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες (8.67 ± 1.31 και 9.83 ± 1.40 αντίστοιχα), η οποία αύξηση είναι ακόμα μεγαλύτερη στη συχνότητα των BNMN (18.50 ± 3.17) και των MN (19.67 ± 3.37) των καλλιεργητών μετά τον ψεκασμό. Επίσης, στην ομάδα των μη-καπνιστών, παρατηρούνται αυξημένες συχνότητες BNMN (12.20 ± 2.27) και MN (13.40 ± 2.25) στους καλλιεργητές πριν τον ψεκασμό σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες (10.00 ± 1.64 και 10.40 ± 1.89 αντίστοιχα) και ακόμα πιο αυξημένες συχνότητες BNMN (15.20 ± 2.29) και MN (16.00 ± 2.30) στους καλλιεργητές μετά τον ψεκασμό. Το ίδιο ισχύει και στο σύνολο των εξεταζόμενων ατόμων: στο σύνολο των καλλιεργητών πριν τον ψεκασμό παρατηρείται αύξηση στη συχνότητα των BNMN (12.82 ± 1.61) και των MN (13.82 ± 1.71) σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες (9.27 ± 1.00 και 10.09 ± 1.89 αντίστοιχα). Η αύξηση αυτή είναι ακόμα μεγαλύτερη στη συχνότητα των BNMN (17.00 ± 1.99) και των MN (18.00 ± 2.10) στο σύνολο των καλλιεργητών μετά τον ψεκασμό.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι στην ομάδα των καπνιστών, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο στις τιμές BNMN ($F=8.22$, $p=0.02$) όσο και στις τιμές MN ($F=7.25$, $p=0.02$) μεταξύ αρνητικών μαρτύρων και καλλιεργητών μετά τον ψεκασμό. Στην ομάδα των μη-καπνιστών δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τέλος, στο σύνολο καπνιστών και μη-καπνιστών, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο στις τιμές BNMN ($F=12.03$, $p=0.002$), όσο και στις τιμές MN ($F=11.19$, $p=0.003$) μεταξύ αρνητικών μαρτύρων και καλλιεργητών μετά τον ψεκασμό.

Τα παραπάνω ευρήματα μας υποδεικνύουν ότι η επαγγελματική έκθεση των καλλιεργητών στα συγκεκριμένα φυτοφάρμακα επάγει γενοτοξικές επιδράσεις στο γενετικό υλικό των λεμφοκυττάρων τους.

Πίνακας 8.8. Σύγκριση των μέσων τιμών των συχνοτήτων (% ₀₀) των διπύρηνων κυττάρων με μικροκυρήνα (BNMN) και των μικροκυρήνων (MN), σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων καπνιστών και μη-καπνιστών, αρνητικών μαρτύρων και καλλιεργητών πριν και μετά τον ψεκασμό.		
	BNMN Μ.Ο.±τ.σ.	MN Μ.Ο.±τ.σ.
Αρνητικοί μάρτυρες / καπνιστές	8.67±1.31	9.83±1.40
Καλλιεργητές / καπνιστές (πριν) *	13.33±2.43	14.17±2.70
Καλλιεργητές / καπνιστές (μετά) **	18.50±3.17	19.67±3.37
	*F=2.86, p=0.12 **F=8.22, p=0.02 ¹	*F=2.03, p=0.18 **F=7.25, p=0.02 ¹
Αρνητικοί μάρτυρες / μη-καπνιστές	10.00±1.64	10.40±1.89
Καλλιεργητές / μη-καπνιστές (πριν) *	12.20±2.27	13.40±2.25
Καλλιεργητές / μη-καπνιστές (μετά) **	15.20±2.29	16.00±2.30
	*F=0.29, p=0.60 **F=3.40, p=0.10	*F=1.04, p=0.34 **F=3.54, p=0.10
Σύνολο αρνητικών μαρτύρων	9.27±1.00	10.09±1.89
Σύνολο καλλιεργητών (πριν) *	12.82±1.61	13.82±1.71
Σύνολο καλλιεργητών (μετά) **	17.00±1.99	18.00±2.10
	*F=3.51, p=0.08 **F=12.03, p=0.002 ²	*F=3.38, p=0.08 **F=11.19, p=0.003 ²
BNMN: διπύρηνα κύτταρα με μικροκυρήνα, MN: μικροκυρήνες, Μ.Ο.± τ.σ.: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, ¹ p<0.05, ² p<0.01 (One-Way ANOVA test)		

9. Μελέτη της γενotoξικής δράσης των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl σε *in vitro* συνθήκες, σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τόσο το Imidacloprid, όσο και το Metalaxyl, δεν παρουσιάζουν ενδείξεις καρκινογόνου δράσης στον άνθρωπο (EPA, 1994 & 2009). Ωστόσο, οι εκτιμήσεις αυτές, όπως και για όλα τα φυτοφάρμακα που εξετάζονται, βασίζονται σε μελέτες που εξετάζουν το κάθε φυτοφάρμακο μεμονωμένα, χωρίς να λαμβάνουν υπόψη πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, όταν αυτά επιδρούν σε συνδυασμό. Γενικά, μικρός σχετικά αριθμός *in vitro* και *in vivo* μελετών εξετάζουν πιθανές γενotoξικές επιδράσεις συνδυασμού φυτοφαρμάκων (Dolara et al., 1992; Kligerman et al., 1993; Dolara et al., 1993; Bianchi-Santamaria et al., 1997; Goumenou & Machera, 2004).

Με το δεδομένο ότι τα δυο συγκεκριμένα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται συνήθως σε συνδυασμό, ιδιαίτερα στις καλλιέργειες καπνού, κρίθηκε σκόπιμο, κατά την παρούσα μελέτη, να διερευνηθεί σε *in vitro* συνθήκες, εκτός από την επίδραση της κάθε ουσίας ξεχωριστά, η επίδραση μίγματος των δυο ουσιών, σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων, σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκαν δυο τεχνικές: η τεχνική των μικροπυρήνων με αναστολή της κυτταροκίνησης με κυτταροχλασίνη-B και η τεχνική των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων, που αποτελούν αξιόπιστους δείκτες γενετικής βλάβης.

9.1 *In vitro* επαγωγή μικροπυρήνων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων με τη μέθοδο της κυτταροχλασίνης-B μετά από επίδραση των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της *in vitro* επαγωγής μικροπυρήνων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων με τη μέθοδο αναστολής της κυτταροκίνησης με κυτταροχλασίνη-B. Η

εκτίμηση της γενετικής δράσης πραγματοποιήθηκε στα λεμφοκύτταρα δυο υγιών δοτών, σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.1, 1, 5, 10, 50 και 100 $\mu\text{g/ml}$) για το κάθε φυτοφάρμακο ξεχωριστά και σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις (10, 25, 50, 100 και 200 $\mu\text{g/ml}$) για το μίγμα των δυο φυτοφαρμάκων.

Στους **πίνακες 9.1.1** και **9.1.2** που αντιστοιχούν στον 1^ο και 2^ο δότη αντίστοιχα, παρουσιάζονται οι συχνότητες των μικροπυρήνων (MN) καθώς και των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN) που επάγονται *in vitro* από την επίδραση διαβαθμισμένων συγκεντρώσεων Imidacloprid. Στους **πίνακες 9.1.3** και **9.1.4** που αντιστοιχούν στον 1^ο και 2^ο δότη αντίστοιχα, παρουσιάζονται οι συχνότητες των μικροπυρήνων (MN) καθώς και των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN) που επάγονται *in vitro* από την επίδραση διαβαθμισμένων συγκεντρώσεων Metalaxyl. Τέλος, στους **πίνακες 9.1.5** και **9.1.6** που αντιστοιχούν στον 1^ο και 2^ο δότη αντίστοιχα, παρουσιάζονται οι συχνότητες των μικροπυρήνων (MN) καθώς και των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN) που επάγονται *in vitro* από την επίδραση διαβαθμισμένων συγκεντρώσεων μίγματος Imidacloprid και Metalaxyl. Πιο αναλυτικά, παρουσιάζονται, στην 1^η στήλη, οι συγκεντρώσεις που εξετάσαμε, στη 2^η στήλη, ο αριθμός των διπύρηνων κυττάρων που ελέγχθηκαν, στην 3^η στήλη η συχνότητα των μικροπυρήνων, στην 4^η στήλη η συχνότητα των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα και στην 5^η στήλη η διακύμανση του δείκτη διπλασιασμού των κυττάρων (Cytokinesis Block Proliferation Index, CBPI). Επίσης, σε όλους τους παραπάνω πίνακες παρουσιάζονται οι συχνότητες των μικροπυρήνων καθώς και των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα που επάγονται *in vitro* από την επίδραση της ουσίας μιτομυκίνη C (Mit-C) που χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας.

Όπως φαίνεται από τους παραπάνω πίνακες δεν παρατηρούνται αυξημένες τιμές MN και BNMN σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες, ούτε από την επίδραση του Imidacloprid, ούτε από την επίδραση του Metalaxyl, ούτε από την επίδραση του μίγματός τους, με εξαίρεση κάποιες μεμονωμένες συγκεντρώσεις, π.χ. οι συγκεντρώσεις 100 και 200 $\mu\text{g/ml}$ του μίγματος για τον 1^ο δότη. Αντίθετα, είναι σαφώς αυξημένη η επαγωγή MN και BNMN από

τη μιτομυκίνη που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, και για τους δυο δότες.

Πίνακας 9.1.1. Συχνότητες μικροπυρήνων (MN) και διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN), σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από <i>in vitro</i> επίδραση με Imidacloprid και με μιτομυκίνη-C.				
Συγκέντρωση (μg/ml)	Σύνολο BN κυττάρων	MN	BNMN	CBPI
1^{ος} δότης				
0	1000	5	5	1.47
0.1	1000	4	4	1.62
1	1000	4	4	1.62
5	1000	6	5	1.68
10	1000	3	3	1.55
50	1000	5	5	1.48
100	1000	7	5	1.96
Mit-C (θετικός μάρτυρας)				
0.5	1000	90	85	1.12
BN: διπύρηνια κύτταρα, BNMN: διπύρηνια κύτταρα με μικροπυρήνες, MN: μικροπυρήνες, CBPI: δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων				

Πίνακας 9.1.2. Συχνότητες μικροπυρήνων (MN) και διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN), σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από <i>in vitro</i> επίδραση με Imidacloprid και με μιτομυκίνη-C.				
Συγκέντρωση (μg/ml)	Σύνολο BN κυττάρων	MN	BNMN	CBPI
2^{ος} δότης				
0	1000	4	4	2.01
0.1	1000	6	6	2.07
1	1000	5	5	1.46
5	1000	4	4	1.50
10	1000	7	7	1.60
50	1000	8	7	1.74
100	1000	6	6	1.40
Mit-C (θετικός μάρτυρας)				
0.5	1000	110	89	1.43
BN: διπύρηνια κύτταρα, BNMN: διπύρηνια κύτταρα με μικροπυρήνες, MN: μικροπυρήνες, CBPI: δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων				

Πίνακας 9.1.3. Συχνότητες μικροπυρήνων (MN) και διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN), σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από *in vitro* επίδραση με Metalaxyl και με μιτομυκίνη-C.

Συγκέντρωση (μg/ml)	Σύνολο BN κυττάρων	MN	BNMN	CBPI
1^{ος} δότης				
0	1000	4	4	1.81
0.1	1000	6	5	1.70
1	1000	5	5	1.82
5	1000	3	3	1.76
10	1000	5	5	1.80
50	1000	5	5	2.05
100	1000	3	3	2.01
Mit-C (θετικός μάρτυρας)				
0.5	1000	90	85	1.12
BN: διπύρηνια κύτταρα, BNMN: διπύρηνια κύτταρα με μικροπυρήνες, MN: μικροπυρήνες, CBPI: δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων				

Πίνακας 9.1.4. Συχνότητες μικροπυρήνων (MN) και διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN), σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από *in vitro* επίδραση με Metalaxyl και με μιτομυκίνη-C.

Συγκέντρωση (μg/ml)	Σύνολο BN κυττάρων	MN	BNMN	CBPI
2^{ος} δότης				
0	1000	4	4	2.00
0.1	1000	4	4	1.82
1	1000	4	4	1.67
5	1000	6	6	1.68
10	1000	8	7	1.40
50	1000	5	5	1.35
100	1000	6	6	1.48
Mit-C (θετικός μάρτυρας)				
0.5	1000	110	89	1.43
BN: διπύρηνια κύτταρα, BNMN: διπύρηνια κύτταρα με μικροπυρήνες, MN: μικροπυρήνες, CBPI: δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων				

Πίνακας 9.1.5. Συχνότητες μικροπυρήνων (MN) και διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN), σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από *in vitro* επίδραση με Imidacloprid και Metalaxyl σε συνδυασμό και με μιτομυκίνη-C.

Συγκέντρωση (μg/ml)	Σύνολο BN κυττάρων	MN	BNMN	CBPI
1^{ος} δότης				
0	1000	2	2	2.20
5+5	1000	2	2	2.17
12.5+12.5	1000	2	2	2.25
25+25	1000	4	4	2.29
50+50	1000	8	8	2.18
100+100	1000	10	9	2.05
Mit-C (θετικός μάρτυρας)				
0.5	1000	90	85	1.12
BN: διπύρηνια κύτταρα, BNMN: διπύρηνια κύτταρα με μικροπυρήνες, MN: μικροπυρήνες, CBPI: δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων				

Πίνακας 9.1.6. Συχνότητες μικροπυρήνων (MN) και διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN), σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από *in vitro* επίδραση με Imidacloprid και Metalaxyl σε συνδυασμό και με μιτομυκίνη-C.

Συγκέντρωση (μg/ml)	Σύνολο BN κυττάρων	MN	BNMN	CBPI
2^{ος} δότης				
0	1000	4	4	1.55
5+5	1000	3	3	1.51
12.5+12.5	1000	3	3	1.42
25+25	1000	5	5	1.39
50+50	1000	5	5	1.40
100+100	1000	6	6	1.28
Mit-C (θετικός μάρτυρας)				
0.5	1000	110	89	1.43
BN: διπύρηνια κύτταρα, BNMN: διπύρηνια κύτταρα με μικροπυρήνες, MN: μικροπυρήνες, CBPI: δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων				

Η στατιστική επεξεργασία των τιμών των συχνοτήτων των BNMN, MN και CBPI έγινε με το One-Way ANOVA test και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους **πίνακες 9.1.7, 9.1.8 και 9.1.9** για το Imidacloprid, το Metalaxyl και το μίγμα τους, αντίστοιχα. Πιο αναλυτικά, παρουσιάζονται, στην 1^η στήλη, οι συγκεντρώσεις που εξετάσαμε, στη 2^η στήλη, ο αριθμός των διπύρηνων κυττάρων που ελέγχθηκαν, στην 3^η στήλη, οι μέσες συχνότητες των μικροπυρήνων ανά 1000 διπύρηνια κύτταρα, στην 4^η στήλη, οι τιμές F και p , όπως προκύπτουν από την εφαρμογή της ανάλυσης One-Way ANOVA για τη συχνότητα των μικροπυρήνων, στην 5^η στήλη, οι μέσες συχνότητες των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνια ανά 1000 διπύρηνια κύτταρα, στην 6^η στήλη οι τιμές F και p , όπως προκύπτουν από την εφαρμογή της ανάλυσης One-Way ANOVA για τη συχνότητα των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνια, στην 7^η στήλη ο μέσος όρος των τιμών του δείκτη διπλασιασμού των κυττάρων (Cytokinesis Block Proliferation Index, CBPI) και στην 8^η στήλη, οι τιμές F και p , όπως προκύπτουν από την εφαρμογή της ανάλυσης One-Way ANOVA για το δείκτη CBPI. Επίσης, στους παραπάνω πίνακες παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση των μέσων τιμών συχνοτήτων των μικροπυρήνων και των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνια που επάγονται *in vitro* από την επίδραση του θετικού μάρτυρα (Mit-C).

Πίνακας 9.1.7. Μέσες συχνότητες μικροκυρήνων (MN) και διπύρηνων κυττάρων με μικροκυρήνα (BNMN), σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από <i>in vitro</i> επίδραση με Imidacloprid και με μιτομυκίνη-C.							
Συγκέντρωση (μg/ml)	Σύνολο BN κυττάρων	MN M.O.±τ.σ.	Στατιστική ανάλυση	BNMN M.O.±τ.σ.	Στατιστική ανάλυση	CBPI M.O.±τ.σ.	Στατιστική ανάλυση
0	2000	4.5±0.5 ¹	F=- p=-	4.5±0.5 ¹	F=- p=-	1.74±0.27	F=- p=-
0.1	2000	5.0±1.0	F=0.2 p=0.70	5.0±1.0	F=0.2 p=0.70	1.85±0.23	F=0.90 p=0.79
1	2000	4.5±0.5	F=0 p=1	4.5±0.5	F=0 p=1	1.54±0.08	F=0.50 p=0.55
5	2000	5.0±1.0	F=0.2 p=0.70	4.5±0.5	F=0.2 p=0.70	1.59±0.09	F=0.28 p=0.65
10	2000	5.0±2.0	F=0.06 p=0.83	5.0±2.0	F=0.06 p=0.83	1.58±0.03	F=0.37 p=0.60
50	2000	6.5±1.5	F=1.6 p=0.33	6.0±1.0	F=1.8 p=0.31	1.61±0.13	F=0.19 p=0.71
100	2000	6.5±0.5	F=8 p=0.11	5.5±0.5	F=0.33 p=0.67	1.68±0.28	F=0.02 p=0.89
Mit-C (θετικός μάρτυρας)							
0.5	2000	100.0±10.0 ^α	F=90.98 p=0.011	87.0±2.0 ^β	F=1601.47 p=0.0006	1.28±0.16	F=2.23 p=0.27
BN: διπύρηνα κύτταρα, BNMN: διπύρηνα κύτταρα με μικροκυρήνες, MN: μικροκυρήνες, CBPI: δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων, M.O.± τ.σ.: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, ^α p<0.05 ¹ , ^β p<0.001 ¹ (One-Way ANOVA test)							

Πίνακας 9.1.8. Μέσες συχνότητες μικροκυρήνων (MN) και διπύρηνων κυττάρων με μικροκυρήνα (BNMN), σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από *in vitro* επίδραση με Metalaxyl και με μιτομυκίνη-C.

Συγκέντρωση (μg/ml)	Σύνολο BN κυττάρων	MN M.O.±τ.σ.	Στατιστική ανάλυση	BNMN M.O.±τ.σ.	Στατιστική ανάλυση	CBPI M.O.±τ.σ.	Στατιστική ανάλυση
0	2000	4.0±0.0 ¹	F=- p=-	4.0±0.0 ¹	F=- p=-	1.91±0.09	F=- p=-
0.1	2000	5.0±1.0	F=1 p=0.42	4.5±0.5	F=1 p=0.42	1.76±0.06	F=1.67 p=0.33
1	2000	4.5±0.5	F=1 p=0.42	4.5±0.5	F=1 p=0.42	1.75±0.08	F=1.75 p=0.32
5	2000	4.5±1.5	F=0.11 p=0.77	4.5±1.5	F=0.11 p=0.77	1.72±0.04	F=3.22 p=0.21
10	2000	6.5±1.5	F=2.78 p=0.24	6.0±1.0	F=4 p=0.18	1.60±0.20	F=1.90 p=0.30
50	2000	5.0±0.0 ^a	F=0 p=0	5.0±0.0 ^a	F=0 p=0	1.70±0.35	F=0.32 p=0.63
100	2000	4.5±1.5	F=0.11 p=0.77	4.5±1.5	F=0.11 p=0.77	1.75±0.27	F=0.32 p=0.63
Mit-C (θετικός μάρτυρας)							
0.5	2000	100.0±10.0 ^β	F=92.16 p=0.011	87.0±2.0 ^γ	F=1722.25 p=0.0006	1.28±0.16	F=12.01 p=0.07

BN: διπύρηνια κύτταρα, BNMN: διπύρηνια κύτταρα με μικροκυρήνες, MN: μικροκυρήνες, CBPI: δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων, M.O.± τ.σ.: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, ^a $p<0.05$, ^β $p<0.05$, ^γ $p<0.001$ (One-Way ANOVA test)

Πίνακας 9.1.9. Μέσες συχνότητες μικροκυρήνων (MN) και διπύρηνων κυττάρων με μικροκυρήνα (BNMN), σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από <i>in vitro</i> επίδραση με Imidacloprid και Metalaxyl σε συνδυασμό και με μιτομυκίνη-C.							
Συγκέντρωση (μg/ml)	Σύνολο BN κυττάρων	MN M.O.±τ.σ.	Στατιστική ανάλυση	BNMN M.O.±τ.σ.	Στατιστική ανάλυση	CBPI M.O.±τ.σ.	Στατιστική ανάλυση
Imidacloprid + Metalaxyl							
0	2000	3.0±1.0 ¹	F=- p=-	3.0±1.0 ¹	F=- p=-	1.88±0.33	F=- p=-
5+5	2000	2.5±0.5	F=0.2 p=0.70	2.5±0.5	F=0.2 p=0.70	1.84±0.33	F=0.01 p=0.95
12.5+12.5	2000	2.5±0.5	F=0.2 p=0.70	2.5±0.5	F=0.2 p=0.70	1.84±0.42	F=0.01 p=0.95
25+25	2000	4.5±0.5	F=1.8 p=0.31	4.5±0.5	F=1.8 p=0.31	1.84±0.45	F=0.003 p=0.96
50+50	2000	6.5±1.5	F=3.77 p=0.19	6.5±1.5	F=3.77 p=0.19	1.79±0.39	F=0.03 p=0.88
100+100	2000	8.0±2.0	F=5 p=0.15	7.5±1.5	F=6.23 p=0.13	1.67±0.39	F=0.17 p=0.72
Mit-C (θετικός μάρτυρας)							
0.5	2000	100.0±10.0 ^α	F=93.16 p=0.011	87.0±2.0 ^β	F=1411.2 p=0.0007	1.28±0.16	F=2.78 p=0.24
BN: διπύρηνια κύτταρα, BNMN: διπύρηνια κύτταρα με μικροκυρήνες, MN: μικροκυρήνες, CBPI: δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων, M.O.± τ.σ.: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, ^α p<0.05 ¹ , ^β p<0.001 ¹ (One-Way ANOVA test)							

Όπως φαίνεται στους 3 παραπάνω πίνακες, κανένα από τα 2 φυτοφάρμακα, είτε μετά από μεμονωμένη, είτε μετά από συνδυασμένη επίδραση, δεν επάγει στατιστικά σημαντική αύξηση στη συχνότητα των MN και των BNMN εκτός από τη συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/ml}$ του Metalaxyl, όπου τόσο η συχνότητα των MN (5.0 ± 0.0), όσο και η συχνότητα των BNMN (5.0 ± 0.0) διαφέρουν στατιστικά σημαντικά, συγκρινόμενες με τις τιμές του αρνητικού μάρτυρα (4.0 ± 0.0).

Στην περίπτωση του μίγματος παρατηρείται διπλάσια αύξηση στη συχνότητα των MN (6.5 ± 1.5) και των BNMN (6.5 ± 1.5) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (3.0 ± 1.0), στη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/ml}$ και υπερδιπλάσια αύξηση στη συχνότητα των MN (8.0 ± 2.0) και των BNMN (7.5 ± 1.5) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (3.0 ± 1.0), στη συγκέντρωση των 200 $\mu\text{g/ml}$. Ωστόσο, η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Τα παραπάνω ευρήματα δεν δίνουν κάποια ένδειξη γενοτοξικής δράσης από την *in vitro* επίδραση των 2 συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων, είτε μεμονωμένα, είτε σε συνδυασμό.

Η τιμή του CBPI σε αρκετές εξεταζόμενες συγκεντρώσεις και στους τρεις πίνακες, εμφανίζει μια μικρή μείωση σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, γεγονός που συνδέεται με πιθανή κυτταροτοξική επίδραση των μελετώμενων φυτοφαρμάκων στις καλλιέργειες των λεμφοκυττάρων. Η παρατήρηση αυτή όμως δεν επιβεβαιώνεται στατιστικά.

Στην περίπτωση του θετικού μάρτυρα (μιτομυκίνη-C), οι συχνότητες των μικροπυρήνων (100.0 ± 10.0) και των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (87.0 ± 2.0) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τους αρνητικούς μάρτυρες, ευρήματα που συμφωνούν με αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα (Abou-Eisha et al., 2004).

Στον **πίνακα 9.1.10** παρουσιάζεται η κατανομή των συνολικών μικροπυρήνων ως προς το μέγεθός τους (μικρό-S, μεσαίο-M και μεγάλο-L) ανά συγκέντρωση Imidacloprid, Metalaxyl, του μίγματός τους και του θετικού μάρτυρα, στις καλλιέργειες λεμφοκυττάρων και των δυο δοτών. Πιο αναλυτικά, παρουσιάζονται, στην 1^η στήλη, οι συγκεντρώσεις που εξετάσαμε, στη 2^η στήλη, ο αριθμός των μικρών (small, S) μικροπυρήνων που μετρήθηκαν και το ποσοστό τους, στην 3^η στήλη, ο αριθμός των μεσαίων (medium, M) μικροπυρήνων που μετρήθηκαν και το ποσοστό τους και στην 4^η στήλη, ο αριθμός των μεγάλων (large, L) μικροπυρήνων που μετρήθηκαν και το ποσοστό τους.

Παρατηρείται ότι η κατανομή του μεγέθους των μικροπυρήνων ποικίλλει. Αναλυτικά, για το Imidacloprid, μεγαλύτερα ποσοστά εμφανίζουν οι μεσαίου μεγέθους μικροπυρήνες, σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Μάλιστα, τα ποσοστά αυτά είναι αρκετά αυξημένα (80% στη συγκέντρωση των 5 $\mu\text{g/ml}$, 66.67% στη συγκέντρωση του 1 $\mu\text{g/ml}$), σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα (44.44%). Αυξημένα ποσοστά μεγάλου μεγέθους μικροπυρήνων παρατηρούνται στις συγκεντρώσεις; 1 $\mu\text{g/ml}$ (22.22%) και 10 $\mu\text{g/ml}$ (20%). Για το Metalaxyl, μεγαλύτερα ποσοστά εμφανίζουν οι μικρού μεγέθους μικροπυρήνες, σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, εκτός τις 2 υψηλότερες (50 & 100 $\mu\text{g/ml}$). Αυξημένα ποσοστά μεγάλου μεγέθους μικροπυρήνων παρατηρούνται στις συγκεντρώσεις; 1 $\mu\text{g/ml}$ (11.11%) και 10 $\mu\text{g/ml}$ (15.38%). Όσον αφορά στο μίγμα Imidacloprid και Metalaxyl, μεγαλύτερα ποσοστά εμφανίζουν οι μεσαίου μεγέθους μικροπυρήνες, σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Μάλιστα, τα ποσοστά αυτά είναι αρκετά αυξημένα (80% στις συγκεντρώσεις των 10 & 25 $\mu\text{g/ml}$, 84.62% στη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/ml}$), σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα (33.33%). Τέλος, αυξημένα ποσοστά μεγάλου μεγέθους μικροπυρήνων παρατηρούνται στις συγκεντρώσεις; 25 $\mu\text{g/ml}$ (20%), 50 $\mu\text{g/ml}$ (22.22%) και 200 $\mu\text{g/ml}$ (25%). Τα αποτελέσματα της κατανομής αυτής υποδεικνύουν ότι τα δυο φυτοφάρμακα δε φαίνεται να επηρεάζουν την κατανομή του μεγέθους των μικροπυρήνων, ούτε μεμονωμένα, ούτε σε συνδυασμό.

Πίνακας 9.1.10. Κατανομή μεγέθους μικροπυρήνων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από *in vitro* επίδραση με Imidacloprid και Metalaxyl, μεμονωμένα και σε συνδυασμό, και με μιτομυκίνη-C.

Συγκέντρωση (μg/ml)	S(%)	M(%)	L(%)
Imidacloprid			
0	5 (55.56)	4 (44.44)	0
0.1	4 (40)	6 (60)	0
1	1 (11.11)	6 (66.67)	2 (22.22)
5	2 (20)	8 (80)	0
10	3 (30)	5 (50)	2 (20)
50	4 (30.77)	8 (61.54)	1 (7.69)
100	6 (46.15)	7 (53.85)	0
Metalaxyl			
0	4 (50)	4 (50)	0
0.1	6 (60)	4 (40)	0
1	5 (55.56)	3 (33.33)	1 (11.11)
5	6 (66.67)	3 (33.33)	0
10	7 (53.85)	4 (30.77)	2 (15.38)
50	2 (20)	8 (80)	0
100	1 (11.11)	8 (88.89)	0
Imidacloprid + Metalaxyl			
0	4 (66.67)	2 (33.33)	0
5+5	1(20)	4 (80)	0
12.5+12.5	0	4 (80)	1 (20)
25+25	3 (33.33)	4 (44.44)	2 (22.22)
50+50	1 (7.69)	11 (84.62)	1 (7.69)
100+100	4 (25)	8 (50)	4 (25)
Mit-C (θετικός μάρτυρας)			
0.5	33 (16.5)	147 (73.5)	20 (10)
S: μικροί, M: μεσαίοι και L: μεγάλοι μικροπυρήνες			

9.2 *In vitro* επαγωγή ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από επίδραση των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της *in vitro* επαγωγής ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων. Η εκτίμηση της γενετικής δράσης πραγματοποιήθηκε στα λεμφοκύτταρα ενός υγιούς δότη, σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.1, 1, 5, 10, 50 και 100 µg/ml) για το κάθε φυτοφάρμακο ξεχωριστά και σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις (10, 25, 50, 100 και 200 µg/ml) για το μίγμα των δυο φυτοφαρμάκων. Ελέγχθηκαν 50 μεταφάσεις για κάθε εξεταζόμενη συγκέντρωση και υπολογίστηκε η μέση τιμή των ανταλλαγών ανά μετάφαση. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στατιστικά με το Student's t-test και παρουσιάζονται στους **πίνακες 9.2.1, 9.2.2 και 9.2.3**.

Συγκεκριμένα, στους **πίνακες 9.2.1, 9.2.2 και 9.2.3** παρουσιάζονται οι συχνότητες των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων που επάγονται *in vitro* από την επίδραση διαβαθμισμένων συγκεντρώσεων Imidacloprid, Metalaxyl και του μίγματός τους, αντίστοιχα. Πιο αναλυτικά, παρουσιάζονται, στην 1^η στήλη, οι συγκεντρώσεις που εξετάσαμε, στη 2^η στήλη, ο αριθμός των μεταφάσεων που ελέγχθηκαν, στην 3^η στήλη, το εύρος των ανταλλαγών (μικρότερη και μεγαλύτερη τιμή), στην 4^η στήλη, οι μέσες συχνότητες των ανταλλαγών ανά μετάφαση και στην 5^η στήλη, οι τιμές *t* και *p*, όπως προκύπτουν από την εφαρμογή του στατιστικού ελέγχου t-test για τη συχνότητα των ανταλλαγών. Επίσης, σε όλους τους παραπάνω πίνακες παρουσιάζονται οι συχνότητες των ανταλλαγών που επάγονται *in vitro* από την επίδραση της ουσίας μιτομυκίνη C (Mit-C) που χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας.

Πίνακας 9.2.1. Συχνότητες ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων (SCEs) σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από <i>in vitro</i> επίδραση με Imidacloprid και με μιτομυκίνη-C.				
Συγκέντρωση (μg/ml)	Αριθμός Μεταφάσεων	Εύρος	SCEs M.O.±τ.σ.	Στατιστική ανάλυση
0	50	1-12	6.10±0.39 ¹	$t = -$ $p = -$
0.1	50	3-14	6.62±0.33	$t = -1.02$ $p = 0.31$
1	50	2-17	6.78±0.45	$t = -1.14$ $p = 0.26$
5	50	1-12	5.52±0.34	$t = 1.12$ $p = 0.27$
10	50	2-17	7.22±0.44	$t = -1.90$ $p = 0.06$
50	50	3-7	5.57±0.53	$t = 0$ $p = 1$
100	50	3-17	7.24±0.45	$t = -1.90$ $p = 0.06$
Mit-C (θετικός μάρτυρας)				
0.1	50	8-39	28.18±0.94 ^a	$t = 22.54$ $p < 0.0001$
M.O.± τ.σ.: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, ^a $p < 0.0001$ ¹ (t-test)				

Πίνακας 9.2.2. Συχνότητες ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων (SCEs) σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από <i>in vitro</i> επίδραση με Metalaxyl και με μιτομυκίνη-C.				
Συγκέντρωση (μg/ml)	Αριθμός Μεταφάσεων	Εύρος	SCEs M.O.±τ.σ.	Στατιστική ανάλυση
0	50	2-15	6.94±0.35 ¹	$t = -$ $p = -$
0.1	50	1-16	7.58±0.48	$t = -1.08$ $p = 0.28$
1	50	3-16	7.86±0.43	$t = -1.6$ $p = 0.10$
5	50	3-17	8.14±0.44 ^a	$t = -2.12$ $p = 0.04$
10	50	4-15	8.14±0.43 ^a	$t = -2.15$ $p = 0.03$
50	50	2-16	8.00±0.45	$t = -1.87$ $p = 0.07$
100	50	3-18	8.32±0.40 ^a	$t = -2.59$ $p = 0.01$
Mit-C (θετικός μάρτυρας)				
0.1	50	8-39	28.18±0.94 ^β	$t = 20.48$ $p < 0.0001$
M.O.± τ.σ.: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, ^a $p < 0.05$ ¹ , ^β $p < 0.0001$ ¹ (t-test)				

Πίνακας 9.2.3. Συχνότητες ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων (SCEs) σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από <i>in vitro</i> επίδραση με μίγμα Imidacloprid και Metalaxyl και με μιτομυκίνη-C.				
Συγκέντρωση (μg/ml)	Αριθμός Μεταφάσεων	Εύρος	SCEs M.O.±τ.σ.	Στατιστική ανάλυση
Imidacloprid + Metalaxyl				
0	50	0-10	4.86±0.29 ¹	$t = -$ $p = -$
5+5	50	2-13	5.26±0.32	$t = -0.92$ $p = 0.36$
12.5+12.5	50	1-12	5.20±0.30	$t = -0.81$ $p = 0.42$
25+25	50	1-12	5.20±0.31	$t = -0.80$ $p = 0.42$
50+50	50	1-13	5.86±0.36 ^a	$t = -2.17$ $p = 0.03$
100+100	50	1-10	5.72±0.26 ^a	$t = -2.20$ $p = 0.03$
Mit-C (θετικός μάρτυρας)				
0.1	50	8-39	28.18±0.94 ^β	$t = 23.47$ $p < 0.0001$
M.O.± τ.σ.: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, ^a $p < 0.05$ ¹ , ^β $p < 0.0001$ ¹ (t-test)				

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι το Imidacloprid δεν επηρεάζει τη συχνότητα των ανταλλαγών με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Αντίθετα, το Metalaxyl επάγει στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα των ανταλλαγών σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (6.94±0.35), στις συγκεντρώσεις των 5 μg/ml (8.14±0.44), 10 μg/ml (8.14±0.43) και 100 μg/ml (8.14±0.43), χωρίς όμως η συχνότητα των ανταλλαγών να σχετίζεται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσής του. Επίσης, το μίγμα Imidacloprid και Metalaxyl επάγει στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα των ανταλλαγών σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (4.86±0.29), στις συγκεντρώσεις των 100 μg/ml (5.86±0.36) και 200 μg/ml (5.72±0.26).

Η επαγωγή ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων από τη μιτομυκίνη ως θετικό μάρτυρα (28.18±0.94), παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες και συμφωνεί με αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα (Abou-Eisha et al., 2004).

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν πιθανή γενοτοξική δράση από την *in vitro* επίδραση του Metalaxyl μεμονωμένα καθώς και του μίγματος, αλλά όχι του Imidacloprid.

Για την ανίχνευση πιθανών κυτταροτοξικών επιδράσεων των δύο φυτοφαρμάκων, υπολογίστηκε ο δείκτης διπλασιασμού (Replication Index, RI) και τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στους **πίνακες 9.2.4, 9.2.5 και 9.2.6**. Για κάθε πειραματικό σημείο ελέγχου μετρήθηκαν συνολικά 200 μεταφάσεις για τον υπολογισμό του δείκτη διπλασιασμού, ο οποίος δίνεται από τον τύπο: $RI = (M_1 + 2M_2 + 3M_3) / N$, όπου M_1 , M_2 και M_3 κύτταρα που έχουν πραγματοποιήσει μία, δύο και τρεις ή περισσότερες διαιρέσεις αντίστοιχα και N ο συνολικός αριθμός των μεταφάσεων που αναλύονται (Preston et al., 1987; Albertini et al., 2000). Η τιμή του δείκτη διπλασιασμού (RI) δεν εμφανίζει σε κανέναν από τους τρεις πίνακες σημαντικές δοσοεξαρτώμενες διαφορές σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Η παρατήρηση αυτή δεν υποδεικνύει κάποια καθαρή κυτταροτοξική επίδραση των μελετώμενων φυτοφαρμάκων στις καλλιέργειες λεμφοκυττάρων με το συγκεκριμένο σύστημα ελέγχου.

Πίνακας 9.2.4. Αριθμός μεταφάσεων 1^{ης} (M₁), 2^{ης} (M₂), 3^{ης} και μετέπειτα (M₃) διαιρέσεων και υπολογισμός του δείκτη διπλασιασμού (RI) σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από *in vitro* επίδραση με Imidacloprid και με μιτομυκίνη-C.

Συγκέντρωση (μg/ml)	M ₁	M ₂	M ₃	RI
0	64	77	60	1.98
0.1	97	75	28	1.66
1	46	76	78	2.16
5	55	78	67	2.06
10	86	66	48	1.81
50	43	83	74	2.16
100	106	77	17	1.56
Mit-C (0.1μg/ml)	86	95	19	1.67

RI: δείκτης διπλασιασμού (Replication Index)

Πίνακας 9.2.5. Αριθμός μεταφάσεων 1^{ης} (M₁), 2^{ης} (M₂), 3^{ης} και μετέπειτα (M₃) διαιρέσεων και υπολογισμός του δείκτη διπλασιασμού (RI) σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από *in vitro* επίδραση με Metalaxyl και με μιτομυκίνη-C.

Συγκέντρωση (μg/ml)	M ₁	M ₂	M ₃	RI
0	60	98	42	1.91
0.1	85	101	14	1.65
1	77	109	14	1.69
5	49	93	58	2.05
10	60	82	58	1.99
50	65	104	31	1.83
100	78	102	20	1.71
Mit-C (0.1μg/ml)	86	95	19	1.67

RI: δείκτης διπλασιασμού (Replication Index)

Πίνακας 9.2.6. Αριθμός μεταφάσεων 1^{ης} (M₁), 2^{ης} (M₂), 3^{ης} και μετέπειτα (M₃) διαιρέσεων και υπολογισμός του δείκτη διπλασιασμού (RI) σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων μετά από *in vitro* επίδραση με μίγμα Imidacloprid και Metalaxyl και με μιτομυκίνη-C.

Συγκέντρωση (μg/ml)	M ₁	M ₂	M ₃	RI
0	30	63	107	2.39
5+5	40	50	110	2.35
12.5+12.5	60	87	53	1.97
25+25	50	54	106	2.26
50+50	20	46	134	2.57
100+100	30	61	110	2.39
Mit-C (0.1μg/ml)	86	95	19	1.67

RI: δείκτης διπλασιασμού (Replication Index)

10. Μελέτη της γενετοξικής δράσης των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl σε *in vivo* συνθήκες, σε πειραματόζωα

Σε μια τελευταία φάση στην παρούσα μελέτη, κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η γενετοξική δράση των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl σε ένα ενεργό μεταβολικό σύστημα θηλαστικών όπως είναι αυτό των αρουραίων, έτσι ώστε να συνυπολογιστούν παράμετροι όπως είναι ο *in vivo* μεταβολισμός των μελετώμενων ουσιών, φαρμακοκινητικές παράμετροι και διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της *in vivo* επαγωγής μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων. Το πλεονέκτημα αυτής της δοκιμασίας ελέγχου σε σχέση με την *in vivo* μελέτη σε λεμφοκύτταρα καλλιέργητων εκτεθειμένων στα δυο φυτοφάρμακα είναι οι ελεγχόμενες συνθήκες έκθεσης των πειραματόζωων στα φυτοφάρμακα, εφόσον τους χορηγούνται συγκεκριμένες επιθυμητές δόσεις.

Πιο συγκεκριμένα, στα πειραματόζωα χορηγήθηκε Imidacloprid μεμονωμένα σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (100, 200 και 300 mg/kg σωματικού βάρους), Metalaxyl μεμονωμένα σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (75, 150 και 300 mg/kg σωματικού βάρους) και μίγμα των δυο φυτοφαρμάκων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (150, 200 και 400 mg/kg σωματικού βάρους). Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 55 αρσενικοί αρουραίοι φυλής Wistar, ηλικίας 45 ημερών, οι οποίοι χωρίστηκαν σε 11 ομάδες των 5 ζώων, όπως φαίνεται στον **πίνακα 10.1**. Οι μέσες συχνότητες των βαρών μέσα σε κάθε ομάδα δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκρινόμενες με τους αρνητικούς μάρτυρες, εφαρμόζοντας το Student's t-test.

Πίνακας 10.1.1. Βάρη ζώων (gr)							
Χημικό (mg/kg)	Ζώο No 1	Ζώο No 2	Ζώο No 3	Ζώο No 4	Ζώο No 5	M.O.±T.σ.	Στατιστική ανάλυση
Αρνητικοί μάρτυρες	159	132	131	131	159	142.4±6.78	$t = -$ $p = -$
Θετικοί μάρτυρες (20 mg/kg CP)	155	157	150	153	164	155.8±2.35	$t = -1.87$ $p = 0.10$
Imidacloprid							
100	139	135	128	133	134	133.8±1.77	$t = 1.23$ $p = 0.25$
200	133	129	136	128	109	127.0±4.72	$t = 1.86$ $p = 0.10$
300	130	142	140	134	125	134.2±3.14	$t = 1.10$ $p = 0.30$
Metalaxyl							
75	132	143	142	139	134	138.0±2.17	$t = 0.62$ $p = 0.55$
150	132	121	124	133	137	129.4±2.98	$t = 1.76$ $p = 0.12$
300	130	123	122	153	120	129.6±6.09	$t = 1.40$ $p = 0.20$
Imidacloprid + Metalaxyl							
75+75	150	149	146	143	143	146.2±1.46	$t = -0.55$ $p = 0.60$
100+100	139	138	138	136	135	137.2±0.73	$t = 0.76$ $p = 0.47$
200+200	150	152	147	149	153	150.2±1.07	$t = -1.14$ $p = 0.30$
M.O.± T.σ.: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, CP: κυκλοφωσφαμίδιο (Cyclophosphamide)							

Στον **πίνακα 10.2** παρουσιάζονται οι συχνότητες (‰) των μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών (MNPCEs) ανά ζώο, που επάγονται *in vivo* από την χορήγηση διαβαθμισμένων συγκεντρώσεων Imidacloprid και Metalaxyl, μεμονωμένα και σε συνδυασμό, καθώς και από τη χορήγηση της ουσίας Κυκλοφωσφαμίδιο (Cyclophosphamide, CP) που χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας.

Τόσο το Imidacloprid όσο και το Metalaxyl φαίνεται να επάγουν αυξημένες τιμές MNPCEs σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες, και στα 5 ζώα, μόνο στην υψηλότερη συγκέντρωση (300 mg/kg). Το μίγμα Imidacloprid και Metalaxyl φαίνεται να επάγει αυξημένες τιμές MNPCEs σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (200 και 400 mg/kg), ενώ στη χαμηλότερη συγκέντρωση (150 mg/kg) παρατηρείται αυξημένη τιμή MNPCEs (6) μόνο σε ένα από τα 5 ζώα. Η επαγωγή MNPCEs από το θετικό μάρτυρα είναι σαφώς αυξημένη και στα 5 ζώα.

Στον **πίνακα 10.3** παρουσιάζονται οι συχνότητες των πολυχρωματικών ερυθροκυττάρων σε σύνολο 200 συνολικών ερυθροκυττάρων (PCEs και NCEs), ανά ζώο και ανά εξεταζόμενη συγκέντρωση Imidacloprid, Metalaxyl, του μίγματός τους και του θετικού μάρτυρα. Το ποσοστό των PCEs προς τα NCEs αποτελεί δείκτη για την τοξικότητα στο μυελό των οστών και εμφανίζεται μειωμένο όταν μειώνεται ο αριθμός των ερυθροβλαστών που μετατρέπονται σε PCEs από την επίδραση ενός χημικού (Mavournin et al., 1990). Οι τιμές αυτές, για κάθε ζώο και για κάθε συγκέντρωση, κυμαίνονται περίπου στα ίδια επίπεδα με τους αρνητικούς μάρτυρες, εκτός από τους θετικούς μάρτυρες, που εμφανίζουν σαφώς μειωμένα ποσοστά PCEs.

Στον **πίνακα 10.4** παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα και η στατιστική επεξεργασία των τιμών των παραπάνω πινάκων με το Student's t-test. Πιο αναλυτικά, παρουσιάζονται, στην 1^η στήλη, οι συγκεντρώσεις που εξετάσαμε, στη 2^η στήλη, οι μέσες συχνότητες των μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών (MNPCEs), στην 3^η στήλη, οι τιμές t και p , όπως προκύπτουν από την εφαρμογή του στατιστικού ελέγχου t-test για τη συχνότητα των MNPCEs, στην 4^η στήλη, οι μέσες συχνότητες των PCEs επί των συνολικών ερυθροκυττάρων και στην 5^η

Πίνακας 10.2. Συχνότητες μικροπυρήνων (‰) σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων, μετά από *in vivo* χορήγηση Imidacloprid και Metalaxyl, μεμονωμένα και σε συνδυασμό.

χημικό (mg/kg)	Ζώο No 1	Ζώο No 2	Ζώο No 3	Ζώο No 4	Ζώο No 5
Αρνητικοί μάρτυρες	1	2	1	0	0
Θετικοί μάρτυρες (20 mg/Kg CP)	11	12	32	20	19
Imidacloprid					
100	1	1	1	2	1
200	0	1	1	1	1
300	3	3	4	4	2
Metalaxyl					
75	1	0	4	0	1
150	4	3	1	0	0
300	4	3	3	3	2
Imidacloprid + Metalaxyl					
75+75	2	2	2	6	2
100+100	4	5	3	5	3
200+200	8	1	4	4	3
CP:κυκλοφωσφαμίδιο					

Πίνακας 10.3. Συχνότητες πολυχρωματικών ερυθροκυττάρων (%) στο μυελό των οστών αρουραίων, μετά από *in vivo* χορήγηση Imidacloprid και Metalaxyl, μεμονωμένα και σε συνδυασμό.

χημικό (mg/kg)	Ζώο No 1	Ζώο No 2	Ζώο No 3	Ζώο No 4	Ζώο No 5
Αρνητικοί μάρτυρες	46.90	53.15	51.00	58.80	49.00
Θετικοί μάρτυρες (20 mg/Kg CP)	25.96	21.71	41.60	45.80	38.03
Imidacloprid					
100	59.45	64.84	57.28	58.40	42.20
200	45.18	58.40	51.77	51.42	46.60
300	53.42	39.36	58.52	37.90	40.30
Metalaxyl					
75	56.56	56.93	48.75	56.01	55.55
150	56.93	57.30	47.40	57.18	45.25
300	60.61	46.27	58.36	43.53	48.74
Imidacloprid + Metalaxyl					
75+75	67.00	54.50	59.50	46.00	62.50
100+100	34.00	63.00	71.00	48.50	53.50
200+200	67.50	29.70	60.50	61.50	47.00
CP:κυκλοφωσφαμίδιο					

Πίνακας 10.4. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των μέσων συχνοτήτων μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων (MNPCs), μετά από *in vivo* χορήγηση Imidacloprid και Metalaxyl, μεμονωμένα και σε συνδυασμό.

Συγκέντρωση (mg/kg)	MNPCs (‰) Μ.Ο.±Τ.σ.	Στατιστική ανάλυση	PCEs (%) Μ.Ο.±Τ.σ.	Στατιστική ανάλυση
Αρνητικοί μάρτυρες	0.8±0.37	$t = -$ $p = -$	51.77±2.04	$t = -$ $p = -$
Θετικοί μάρτυρες (20 mg/Kg CP)	18.8±3.76 ^a	$t = -4.76$ $p = 0.001$	34.62±4.62 ^a	$t = 3.40$ $p = 0.009$
Imidacloprid				
100	1.2±0.20	$t = -0.90$ $p = 0.37$	58.43±3.79	$t = -1.08$ $p = 0.31$
200	0.8±0.20	$t = 0.00$ $p = 1.00$	50.67±2.33	$t = 0.35$ $p = 0.73$
300	3.2±0.37 ^a	$t = -4.54$ $p = 0.001$	45.90±4.21	$t = 1.26$ $p = 0.24$
Metalaxyl				
75	1.2±0.73	$t = -0.49$ $p = 0.64$	54.76±1.52	$t = 1.17$ $p = 0.27$
150	1.6±0.81	$t = -0.89$ $p = 0.39$	52.81±2.67	$t = -0.31$ $p = 0.76$
300	3.0±0.32 ^a	$t = -4.49$ $p = 0.002$	51.50±3.38	$t = 0.07$ $p = 0.94$
Imidacloprid + Metalaxyl				
75+75	2.8±0.80	$t = -2.26$ $p = 0.05$	57.90±3.60	$t = -1.48$ $p = 0.18$
100+100	4.0±0.45 ^β	$t = -5.49$ $p = 0.0006$	54.00±6.33	$t = -0.33$ $p = 0.74$
200+200	4.0±1.14 ^γ	$t = -2.67$ $p = 0.03$	53.24±6.77	$t = -0.21$ $p = 0.84$
Μ.Ο.± Τ.σ.: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, MNPCs: πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα με μικροπυρήνα, PCEs: πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα, CP: κυκλοφωσφαμίδιο (Cyclophosphamide), ^a $p < 0.01$, ^β $p < 0.001$, ^γ $p < 0.05$ (t-test)				

στήλη, οι τιμές t και p , όπως προκύπτουν από την εφαρμογή του στατιστικού ελέγχου Student's t-test για τη συχνότητα των PCEs.

Από τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες (0.8 ± 0.37) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (300 mg/kg) του Imidacloprid (3.2 ± 0.37) και του Metalaxyl (3.0 ± 0.32), όταν χορηγούνται μεμονωμένα, καθώς και στις 2 υψηλότερες συγκεντρώσεις του μίγματος (4.0 ± 0.45 στα 200 mg/kg και 4.0 ± 1.14 στα 400 mg/kg).

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν γενotoξική επίδραση και των 2 φυτοφαρμάκων μεμονωμένα, αλλά και του μίγματος τους, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις, όταν χορηγούνται σε ένα ενεργό μεταβολικό σύστημα όπως είναι αυτό των αρουραίων.

Η αναλογία των PCEs, που χρησιμοποιείται ως κυτταροτοξικός δείκτης, δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες, για κανένα ζώο και καμία συγκέντρωση, γεγονός που δεν υποδεικνύει κάποια ξεκάθαρη κυτταροτοξική επίδραση των μελετώμενων φυτοφαρμάκων στα ερυθροκύτταρα των πειραματόζων, όπως διαπιστώσαμε και στις προηγούμενες ενότητες, για τις καλλιέργειες λεμφοκυττάρων.

Η επαγωγή μικροπυρήνων από το κυκλοφωσφαμίδιο ως θετικό μάρτυρα (18.8 ± 3.76) παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες (0.8 ± 0.37) και συμφωνεί με αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα (US FDA/CFSAN, 2000), πιστοποιώντας έτσι, την ορθότητα της πειραματικής διαδικασίας και τη σωστή απόκριση των πειραματόζων στη χορηγούμενη αγωγή.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο όρος «γενοτοξικότητα» αναφέρεται στην ικανότητα ορισμένων ουσιών να προκαλούν βλάβες, άμεσα ή έμμεσα, στο γενετικό υλικό και/ή σε κυτταρικές δομές και ενζυμικά συστήματα που σχετίζονται με τη διατήρηση και την έκφραση της γενετικής πληροφορίας, όπως είναι η μιτωτική συσκευή, οι τοποϊσομεράσες, οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί και οι DNA-πολυμεράσες.

Η εκτίμηση της γενοτοξικής δράσης διαφόρων χημικών παραγόντων όπως φυτοφαρμάκων, φαρμακευτικών προϊόντων, συστατικών τροφίμων και βιομηχανικών χημικών, αποτελεί ένα πολύ σημαντικό στάδιο της διαδικασίας αξιολόγησης του κινδύνου που μπορεί να προκαλέσει η χρήση τους στον άνθρωπο. Για να καλυφθεί όλο το φάσμα των γενετικών βλαβών που μπορεί να συμβούν, χρησιμοποιείται συνήθως ένας συνδυασμός δοκιμασιών ελέγχου (τεχνικών) τόσο σε *in vitro*, όσο και σε *in vivo* συνθήκες. Αυτές οι δοκιμασίες ελέγχου στοχεύουν στην ανίχνευση 3 βασικών μηχανισμών γενετικής βλάβης: γονιδιακών μεταλλάξεων, δομικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών και αριθμητικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών (ανεupλοειδίας) (Eastmond et al., 2009). Μεταξύ άλλων, για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως οι τεχνικές της επαγωγής μικροπυρήνων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων, της επαγωγής ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων και της επαγωγής μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων.

Αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν και κατά την παρούσα διατριβή για την ανίχνευση της γενοτοξικής δράσης των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl σε *in vitro* και *in vivo* συνθήκες. Τα δυο συγκεκριμένα φυτοφάρμακα επιλέχτηκαν γιατί εκτός των άλλων εφαρμογών τους σε πληθώρα καλλιεργειών, χρησιμοποιούνται ευρέως, και μάλιστα σε συνδυασμό, στην καλλιέργεια καπνού, που αποτελεί παραδοσιακά μια από τις κύριες αγροτικές δραστηριότητες στην περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας, όπου πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη.

Το Imidacloprid (1-(6-chloro-3-pyridinylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine) είναι ένα νέο εντομοκτόνο ευρέος φάσματος και ανήκει στην ομάδα των νεονικοτινοειδών. Χρησιμοποιείται στο σπόρο, στο έδαφος ή στα φύλλα διαφόρων καλλιεργειών όπως τον καπνό, το ρύζι, τα δημητριακά, τις πατάτες, κ.α. (Tomlin, 2006). Δρα ως ανταγωνιστής της ακετυλοχολίνης, παρεμποδίζοντας έτσι τη λειτουργία του νευρικού συστήματος και είναι τοξικό κυρίως έναντι των εντόμων, και πολύ λιγότερο έναντι των θηλαστικών, εξαιτίας της μικρότερης τάσης που έχει να προσδένεται στους υποδοχείς της ακετυλοχολίνης των θηλαστικών (Liu & Casida, 1993; Chao & Casida, 1997; Tomizawa & Casida, 1999). Σύμφωνα με τον Οργανισμό Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (Environmental Protection Agency, EPA) ταξινομείται ως φυτοφάρμακο μικρής και μέτριας τοξικότητας, χωρίς αποδεδειγμένη καρκινογόνο δράση για τον άνθρωπο (EPA, 2009). Ωστόσο, έχουν βρεθεί στη βιβλιογραφία αρκετές μελέτες με θετικά αποτελέσματα ως προς τη γενετοξική δράση του Imidacloprid σε μια ποικιλία οργανισμών όπως ασπόνδυλα (Zang et al., 2000), αμφίβια (Feng et al., 2004), αλλά και θηλαστικά (Shah et al., 1997; Karabay & Oguz, 2005).

Το Metalaxyl (N- (2,6-dimethylphenyl)-N- (methoxyacetyl)-alaninate) είναι ένα συστημικό βενζενοϊδές μυκητοκτόνο. Χρησιμοποιείται ευρέως για τον έλεγχο ασθενειών στα φυτά που οφείλονται σε ωομύκητες. Χρησιμοποιείται για παράδειγμα στον καπνό, στην πατάτα, στο λυκίσκο, στο αμπέλι και στις φράουλες. Έχει χαρακτηριστεί από τον Οργανισμό Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (Environmental Protection Agency, EPA) ως ελαφρώς τοξικό και ως χημικό που δεν παρουσιάζει ενδείξεις καρκινογένεσης στους ανθρώπους (EPA, 1994). Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι προκαλεί επαγωγή χρωμοσωματικών θραύσεων *in vitro*, τόσο στο γενετικό υλικό ανθρώπινων λεμφοκυττάρων (Hrelia et al., 1996), όσο και σε κύτταρα ωοθηκών κινεζικών hamster (Murli & Ivett, 1986). Επιπλέον, το Metalaxyl έχει ενοχοποιηθεί για ενεργοποίηση καρκινογενετικών μηχανισμών (Perocco et al., 1995; Hrelia et al., 1995; Paolini et al., 1996) και για ενίσχυση της γενετοξικότητας άλλων χημικών παραγόντων με τους οποίους χορηγείται σε συνδυασμό (Waters et al., 1982; Garrett et al., 1986; Hrelia et al., 1996).

Τα φυτοφάρμακα, γενικά, αποτελούν σημαντικούς περιβαλλοντικούς ρυπαντές, στους οποίους εκτίθεται καθημερινά ο άνθρωπος σε συνεχώς αυξανόμενο βαθμό. Ειδικότερα οι καλλιεργητές, εκτίθενται στα φυτοφάρμακα είτε μέσω της αναπνευστικής οδού, είτε μέσω του δέρματος, κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας των φυτοφαρμάκων που πρόκειται να ψεκαστούν καθώς και κατά τη διάρκεια του ψεκασμού. Είναι πολύ δύσκολο να εκτιμηθεί ο βαθμός έκθεσης των καλλιεργητών στις δραστικές ουσίες των φυτοφαρμάκων εξαιτίας της δυσκολίας ελέγχου των συνθηκών έκθεσης (Lucero et al., 2000). Επιπλέον, οι καλλιεργητές εκτίθενται, ως επί το πλείστον, σε μίγματα φυτοφαρμάκων, τα οποία πιθανόν να παρουσιάζουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Αλληλεπιδράσεις είναι επίσης πιθανό να υπάρξουν και με τα πρόσθετα συστατικά που περιέχονται στα εμπορικά σκευάσματα των φυτοφαρμάκων. Όπως υποστηρίζουν οι Eaton & Klaassen (1996), η συνδυαστική δράση ενός μίγματος χημικών ουσιών μπορεί να επιφέρει διαφορετικά αποτελέσματα από τη μεμονωμένη δράση της κάθε ουσίας, εξαιτίας προσθετικών, συνεργιστικών ή ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα συστατικά μιγμάτων φυτοφαρμάκων και οι πιθανές επιπτώσεις τους στη γενοτοξικότητα, δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς. Μόνο η εξέταση 3 πιθανών αλληλεπιδράσεων στα 500 πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα θα απαιτούσε 20.700.000 πειράματα, γεγονός ανέφικτο σωματικά, χρονικά, αλλά και οικονομικά (Miller, 2004).

Στη διεθνή βιβλιογραφία, αποτελεί γενική διαπίστωση ότι η έκθεση σε σύνθετα μίγματα φυτοφαρμάκων συσχετίζεται με αύξηση της παρατηρούμενης γενετικής βλάβης, σε αντιδιαστολή με την έκθεση σε μεμονωμένα φυτοφάρμακα. Η Bolognesi (2003), κάνοντας μια ανασκόπηση μελετών που αφορούν ανθρώπινους πληθυσμούς εκτεθειμένους σε φυτοφάρμακα λόγω επαγγελματικής ενασχόλησης, επισημαίνει μια δόσο-εξαρτώμενη σχέση μεταξύ της έκθεσης σε μίγματα φυτοφαρμάκων και της παρατηρούμενης γενετικής βλάβης, η οποία αυξάνει καθώς αυξάνει η διάρκεια ή ο βαθμός της έκθεσης. Σε μια παρόμοια ανασκόπηση των Bull et al. (2006), σε 17 από τις 24 μελέτες που εξετάστηκαν συνολικά, αναφέρονται θετικά αποτελέσματα σχετικά με την επαγωγή γενετικών

βλαβών σε εργαζόμενους εκτεθειμένους σε μίγματα φυτοφαρμάκων. Σε πρόσφατη αντίστοιχη ανασκόπηση, οι Bolognesi et al. (2011), παρατήρησαν ότι εργάτες που απασχολούνται σε πολλές διαφορετικές καλλιέργειες και ψεκάζουν με ένα σύνθετο μίγμα φυτοφαρμάκων, παρουσιάζουν αύξηση χρωμοσωματικών βλαβών, σε αντίθεση με εργάτες που ψεκάζουν με ένα ή με λίγα φυτοφάρμακα και που δουλεύουν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες.

Στην παρούσα διατριβή, επιλέξαμε να διερευνήσουμε την πιθανή μεμονωμένη και συνεργιστική γενοτοξική δράση των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl σε *in vitro* και *in vivo* συνθήκες.

Για τα συγκεκριμένα φυτοφάρμακα υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα όταν ερευνάται η γενετική δράση τους. Αφενός έχουν χαρακτηριστεί ως σχετικά αβλαβή για τον άνθρωπο, με δεδομένο ότι δεν υπάρχουν στοιχεία που να τα συνδέουν με καρκινογενετικές διεργασίες (EPA, 1994 & 2009), αφετέρου διάφορες μελέτες παρουσιάζουν αποτελέσματα που τους αποδίδουν γενοτοξική δράση όταν εξετάζονται μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με άλλους χημικούς παράγοντες (Waters et al., 1982; Garrett et al., 1986; Hrelia et al., 1995; Hrelia et al., 1996; Feng et al., 2005; Costa et al., 2009; Stivaktakis et al., 2010).

Η συνεργιστική δράση των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl δεν έχει μελετηθεί. Η μεμονωμένη γενοτοξική τους δράση σε μικρές συγκεντρώσεις με τα συστήματα ελέγχου που εφαρμόσαμε έχει μελετηθεί περιορισμένα και τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Επιλέξαμε να μελετήσουμε μεταξύ άλλων, και πολύ μικρές συγκεντρώσεις (π.χ. 0.1 µg/ml) για να είναι πιο ρεαλιστική η προσέγγιση των επιπτώσεων τους στο ανθρώπινο γενετικό υλικό, με δεδομένο ότι η πραγματική έκθεση στα φυτοφάρμακα αφορά μικρές συγκεντρώσεις ενώ συνήθως στη βιβλιογραφία αναφέρονται μελέτες όπου οι συγκεντρώσεις που εξετάζονται είναι κατά πολύ μεγαλύτερες.

Σε μια πρώτη φάση, επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε τη συνεργιστική δράση των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl σε *in vivo* συνθήκες, χρησιμοποιώντας ως δότες καλλιεργητές καπνού της περιοχής της

Αιτωλοακαρνανίας, οι οποίοι ψέκαζαν τις καλλιέργειές τους αποκλειστικά με δυο εμπορικά σκευάσματα που περιείχαν τα δυο υπό μελέτη φυτοφάρμακα, σε διάφορες περιόδους κατά τη διάρκεια του έτους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική των μικροπυρήνων με αναστολή της κυτταροκίνησης με κυτταροχαλασίνη-B (Cytokinesis block micronucleus method, CBMN method).

Η τεχνική των μικροπυρήνων αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για τη διερεύνηση της γενετοξικής δράσης διαφόρων χημικών ενώσεων. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως, σε μια πληθώρα επιδημιολογικών μελετών, για την εκτίμηση του γενετικού κινδύνου που προέρχεται από την έκθεση σε φυτοφάρμακα (Bolognesi et al., 2011).

Ο σχηματισμός των μικροπυρήνων οφείλεται σε βλάβες στο DNA, στα χρωμοσώματα ή σε πρωτεΐνες που άμεσα ή έμμεσα εμπλέκονται στον ορθό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Έτσι, οι μικροπυρήνες περιέχουν είτε θραύσματα χρωμοσωμάτων, είτε άθικτα χρωμοσώματα και αναγνωρίζονται σε θυγατρικά κύτταρα ως δομές που ξεχωρίζουν από τον κυρίως πυρήνα, υποδηλώνοντας την παρουσία γενετικής βλάβης (Fenech, 1993).

Εμείς επιχειρήσαμε να ανιχνεύσουμε γενετική βλάβη συγκρίνοντας τη συχνότητα των μικροπυρήνων σε λεμφοκύτταρα καλλιεργητών με τη συχνότητα των μικροπυρήνων σε λεμφοκύτταρα μιας ισάριθμης ομάδας υγιών δοτών, μη καλλιεργητών, που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Επίσης, για να διαπιστώσουμε αν η έκθεση στα συγκεκριμένα φυτοφάρμακα κατά τη διάρκεια του ψεκασμού επιφέρει άμεσα γενετοξικά αποτελέσματα, συγκρίναμε τη συχνότητα των μικροπυρήνων στα λεμφοκύτταρα των καλλιεργητών πριν ψεκάσουν με τη συχνότητα των μικροπυρήνων στα λεμφοκύτταρα των ίδιων καλλιεργητών αμέσως μετά από μια περίοδο ψεκασμού. Ταυτόχρονα, για να αποκλείσουμε την ενδεχόμενη επίδραση παραμέτρων όπως είναι το φύλο, η ηλικία και το κάπνισμα, στην επαγωγή μικροπυρήνων από τα φυτοφάρμακα, επιλέξαμε δότες που ήταν όλοι άρρενες, με ηλικίες που δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, και τους χωρίσαμε σε ομάδες καπνιστών και μη-καπνιστών, τις οποίες μελετήσαμε ξεχωριστά.

Σχετικά με τη συνήθεια του καπνίσματος, μεταξύ των αρνητικών μαρτύρων, οι καπνιστές δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές από τους μη-καπνιστές, ούτε ως προς την επαγωγή μικροπυρήνων, ούτε ως προς την επαγωγή διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε και μεταξύ των καλλιεργητών: συγκρίνοντας τις μέσες συχνότητες μικροπυρήνων και διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα των καπνιστών και των μη-καπνιστών καλλιεργητών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ούτε στην επαγωγή μικροπυρήνων πριν και μετά τον ψεκασμό, ούτε στην επαγωγή διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα πριν και μετά τον ψεκασμό. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που αναφέρουν ότι δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας των μικροπυρήνων και του καπνίσματος (Norppa et al., 1993; Falck et al., 1999; Bonassi et al., 2003; Vlastos et al., 2006).

Συγκρίνοντας τις συχνότητες των μικροπυρήνων στα λεμφοκύτταρα των καλλιεργητών πριν και μετά τον ψεκασμό, παρατηρήθηκε, στην πλειοψηφία των δοτών, μια μικρή αύξηση, στον αριθμό τόσο των μικροπυρήνων, όσο και των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα, μετά τον ψεκασμό. Τα δεδομένα αυτά επεξεργάστηκαν στατιστικά (One-Way ANOVA test), αλλά δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ούτε στην επαγωγή μικροπυρήνων, ούτε στην επαγωγή διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα πριν και μετά τον ψεκασμό.

Τα αποτελέσματά μας αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών πάνω στην επαγωγή μικροπυρήνων σε Ούγγρους και Ισπανούς καλλιεργητές, εκτεθειμένους λόγω επαγγελματικής ενασχόλησης σε σύνθετο μίγμα φυτοφαρμάκων, στις οποίες δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην περίοδο υψηλής έκθεσης (άνοιξη-καλοκαίρι) και στην περίοδο χαμηλής έκθεσης (φθινόπωρο-χειμώνας), ή ανάμεσα σε μέτρια εκτεθειμένους και βαριά εκτεθειμένους καλλιεργητές (Pastor et al., 2002a & 2002b). Αντίθετα, κάποιες έρευνες αναφέρουν στατιστικά σημαντική αύξηση της παρατηρούμενης γενετικής βλάβης από την έναρξη έως το τέλος της περιόδου ψεκασμού. Ενδεικτικά αναφέρεται η μελέτη των Joksić et al. (1997), κατά την οποία παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της

συχνότητας των μικροπυρήνων ένα μήνα μετά τον ψεκασμό, σε σύγκριση με την περίοδο πριν τον ψεκασμό.

Συγκρίνοντας τη συχνότητα των μικροπυρήνων μεταξύ αρνητικών μαρτύρων και καλλιεργητών, πριν και μετά τον ψεκασμό, και εξετάζοντας τις ομάδες των καπνιστών, των μη-καπνιστών και των συνολικών δοτών ξεχωριστά, καταλήξαμε στα εξής ευρήματα: στην περίπτωση των μη-καπνιστών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ αρνητικών μαρτύρων και καλλιεργητών πριν τον ψεκασμό, ούτε μεταξύ αρνητικών μαρτύρων και καλλιεργητών μετά τον ψεκασμό. Στην περίπτωση των καπνιστών όμως, καθώς και στο σύνολο των ατόμων που εξετάστηκαν, οι καλλιεργητές μετά τον ψεκασμό παρουσίασαν αυξημένη επαγωγή μικροπυρήνων και διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα, με στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με τους αρνητικούς μάρτυρες. Τα ευρήματά μας αυτά υποδεικνύουν ότι η επαγγελματική έκθεση των καλλιεργητών στο συνδυασμό των συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων επάγει γενοτοξικές επιδράσεις στο γενετικό υλικό των λεμφοκυττάρων τους και ενισχύουν την υπόθεση ότι η επαγωγή αυτή οφείλεται στη συνεργιστική δράση των δύο μελετώμενων ουσιών. Επιπλέον, με δεδομένο ότι η στατιστικά σημαντική αύξηση στη συχνότητα των μικροπυρήνων παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση των καπνιστών καλλιεργητών και όχι στην περίπτωση των μη-καπνιστών, συμπεραίνουμε πως είναι πιθανό η συνήθεια του καπνίσματος να λειτουργεί συνεργιστικά με την έκθεση στα εξεταζόμενα φυτοφάρμακα.

Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα παρόμοιων μελετών που αφορούν αγροτικούς πληθυσμούς, τόσο στην Ελλάδα, όσο και σε διάφορες χώρες ανά τον κόσμο, εκτεθειμένους επαγγελματικά σε μίγματα φυτοφαρμάκων. Στις μελέτες αυτές, τα χρησιμοποιούμενα μίγματα είναι κατά κύριο λόγο, σύνθετα μίγματα που περιλαμβάνουν ποικιλία φυτοφαρμάκων: κάποια με αποδεδειγμένη γενοτοξική δράση, αλλά και κάποια που θεωρούνται ότι δεν έχουν γενοτοξική δράση.

Συγκεκριμένα, στην Ελλάδα, σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από ερευνητική ομάδα του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στο Ν. Αιτωλοακαρνανίας,

μεταγενέστερα της παρούσας μελέτης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επαγωγή γενετικής βλάβης, με την τεχνική των μικροπυρήνων, στα λεμφοκύτταρα μιας ομάδας 24 αγροτών που εκτίθονταν σε ποικίλους συνδυασμούς φυτοφαρμάκων σε διαφορετικά διαστήματα καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου. Η ανάλυση των συγκεκριμένων γενετικών βλαβών έδειξε ότι η έκθεση στο συγκεκριμένο συνδυασμό φυτοφαρμάκων προκαλεί θραύσεις, αλλά και απώλεια γενετικού υλικού των ελεγχόμενων κυττάρων (Βλαστός και συνεργάτες, 2008).

Η ίδια ερευνητική ομάδα χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα ελέγχου, μελέτησε την πιθανή επαγωγή γενετικής βλάβης σε ομάδα αγροτών από τη Μεσσαρά της Κρήτης, που εκτέθηκαν επαγγελματικά σε διαφορετικούς συνδυασμούς 17 φυτοφαρμάκων και φυτοπροστατευτικών ουσιών, σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου από την ίδια περιοχή. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά της γενετικής βλάβης σε επίπεδο μικροπυρήνων μεταξύ των αγροτών και της ομάδας ελέγχου (Vlastos et al., 2006).

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε από το Τμήμα Γενικής Βιολογίας και Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης εξέτασε τις επιπτώσεις στο γενετικό υλικό 56 αγροτών, ψεκαστών φυτοφαρμάκων σε θερμοκήπια, αλλά και σε αγρούς, στην περιοχή της Ιωνίας στη Θεσσαλονίκη. Η μελέτη έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση των χρωμοσωματικών βλαβών στο γενετικό υλικό των αγροτών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα βλαβών στο γενετικό υλικό των αγροτών που εργάζονταν σε θερμοκήπια συγκριτικά με τους αγρότες που ψέκαζαν σε ανοικτούς αγρούς. Επίσης διαπιστώθηκε, συγκριτικά με προγενέστερη μελέτη του ίδιου εργαστηρίου, αυξημένη συχνότητα χρωμοσωματικών βλαβών στους αγρότες που εργάζονται σε θερμοκήπια τα οποία γειτνιάζουν με τη βιομηχανική ζώνη της Ιωνίας, συγκριτικά με αγρότες που εργάζονται σε μη βιομηχανική περιοχή. Οι ερευνητές αποδίδουν τις επιπλέον γενετικές βλάβες στη συνδυασμένη δράση φυτοφαρμάκων και βιομηχανικών ρύπων (Kourakis et al., 1996).

Στατιστικά σημαντική επαγωγή γενετικής βλάβης με τη μορφή μικροπυρήνων καθώς και χρωμοσωματικών ανωμαλιών, παρατηρήθηκε και σε μια ομάδα

αγροτών στη Σερβία που ψέκαζαν καλλιέργειες αμπελιού με ένα σύνθετο μίγμα φυτοφαρμάκων (Joksić et al., 1997).

Επίσης, σε μια ομάδα αγροτών της κεντρικής Ιταλίας, που ψέκαζαν τις καλλιέργειές τους με μίγμα εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων και παρασιτοκτόνων για πάνω από 18 χρόνια, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην επαγωγή μικροπυρήνων μεταξύ των αγροτών και των αρνητικών μαρτύρων (Pasquini et al., 1996).

Ενδεικτικά, αξίζει να αναφερθούν άλλες δυο μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με ανθοκόμους, στο Μεξικό η μία και στην Ιταλία η άλλη, εκτεθειμένους σε σύνθετο μίγμα φυτοφαρμάκων, στο οποίο συμπεριλαμβάνονταν και το Metalaxyl. Και στις δυο αυτές έρευνες παρατηρήθηκαν σημαντικά αυξημένες συχνότητες μικροπυρήνων στα κύτταρα των εκτεθειμένων ατόμων, σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες (Falck et al., 1999; Gómez-Arroyo et al., 2000).

Ωστόσο, υπάρχουν στη βιβλιογραφία μελέτες με αρνητικά αποτελέσματα σε σχέση με την επαγωγή γενετικής βλάβης από την επαγγελματική έκθεση σε μίγματα φυτοφαρμάκων. Ενδεικτικά αναφέρονται δυο μελέτες Ελλήνων και Ισπανών ερευνητών οι οποίες πραγματοποιήθηκαν ανεξάρτητα στην ίδια ομάδα αγροτών θερμοκηπιακών καλλιεργειών, στην περιοχή Νέας Μάκρης Αττικής, χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικές δοκιμασίες ελέγχου: την τεχνική των μικροπυρήνων και την τεχνική Comet Assay. Καμία από τις δυο έρευνες δεν έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της γενετικής βλάβης στα κύτταρα των αγροτών σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου (Pastor et al., 2001; Piperakis et al., 2003). Αρνητικά αποτελέσματα αναφέρουν επίσης οι Lebailly et al. (2003) και οι Bolognesi et al. (2004), παρόλο που στο μίγμα των φυτοφαρμάκων στο οποίο εκτίθενται οι μελετώμενοι πληθυσμοί, περιλαμβάνονται δύο φυτοφάρμακα με αποδεδειγμένες μεταλλαξιγόνες ιδιότητες: το carbendazim και το benomyl.

Η αντιφατικότητα που παρατηρείται ανάμεσα στα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών μπορεί να εξηγηθεί από την ύπαρξη μιας μεγάλης ποικιλομορφίας στις συνθήκες έκθεσης, όπως είναι ο αριθμός και το είδος των διαφορετικών σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται, η ποσότητα του κάθε φυτοφαρμάκου που εφαρμόζεται, η έκταση της περιοχής εφαρμογής, οι

περιβαλλοντικές συνθήκες κάτω από τις οποίες γίνεται η εφαρμογή, η διάρκεια και η συχνότητα εφαρμογής, καθώς και η χρήση ή μη κατάλληλου προστατευτικού εξοπλισμού. Όλοι αυτοί οι παράγοντες καθιστούν πολύ δύσκολη την ποσοτική εκτίμηση της έκθεσης και είναι αδύνατον να παρουσιάζουν ομοιογένεια ανάμεσα στις διάφορες μελέτες, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει ασφαλής σύγκριση των αποτελεσμάτων τους. Επιπλέον, παράγοντες όπως είναι το μέγεθος του δείγματος, ο αριθμός και η χρονική στιγμή των δειγματοληψιών σε σχέση με τη χρονική στιγμή της έκθεσης στα φυτοφάρμακα, παρουσιάζουν επίσης ανομοιογένεια ανάμεσα στις διάφορες μελέτες και δυσχεραίνουν ακόμα περισσότερο τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Άλλη μια παράμετρος που μπορεί να εξηγήσει τη διαφορετική απόκριση του γενετικού υλικού των διαφόρων ομάδων πληθυσμού στην έκθεση στα φυτοφάρμακα είναι οι ενδοπληθυσμιακές διαφορές στη γενετική σύσταση που σχετίζονται με την ικανότητα ενεργοποίησης ή αποτοξίνωσης γενοτοξικών παραγόντων και επιδιόρθωσης του DNA. Για παράδειγμα, πολυμορφισμοί των γονιδίων *CYP* και *PON* που κωδικοποιούν ένζυμα αποτοξίνωσης ξеноβιοτικών ουσιών, μπορεί να επηρεάσουν τη συχνότητα των μικροπυρήνων σε άτομα εκτεθειμένα σε μίγματα φυτοφαρμάκων (Bolognesi, 2003; Bolognesi et al., 2011).

Σε κάθε περίπτωση όμως, η πλειοψηφία των μελετών που διερευνούν την επαγωγή γενετικής βλάβης από την επαγγελματική έκθεση σε μίγματα φυτοφαρμάκων, ιδιαίτερα των καλλιεργητών εκείνων που ψεκάζουν, καταλήγει σε θετικά αποτελέσματα: η Bolognesi (2003) αναφέρει ότι 33 από τις 55 μελέτες που εξέτασε συνολικά, παρουσιάζουν θετική επαγωγή γενετικής βλάβης, η οποία εμφανίζει αύξηση από 1.02 έως 15.8 φορές συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ενώ οι Bull et al. (2006) αναφέρουν θετικά αποτελέσματα σε 17 από 24 μελέτες, με ένα εύρος αύξησης της θετικής επαγωγής από 1 έως 5 φορές.

Αξιίζει να σημειωθεί, αναφορικά με τα αποτελέσματα από αυτή την ενότητα της μελέτης μας, ότι στατιστικά σημαντικές διαφορές στην επαγωγή μικροπυρήνων διαπιστώθηκαν μεταξύ των καλλιεργητών μετά τον ψεκασμό και των αρνητικών μαρτύρων, αλλά όχι μεταξύ των καλλιεργητών πριν και μετά τον ψεκασμό. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η παρατηρούμενη

γενετική βλάβη δεν είναι το αποτέλεσμα της οξείας έκθεσης στα φυτοφάρμακα κατά τη διάρκεια ενός ψεκασμού, αλλά της επαναλαμβανόμενης έκθεσης στη διάρκεια όλων των χρόνων της επαγγελματικής ενασχόλησης των καλλιεργητών. Η υπόθεση αυτή συμφωνεί με τη διαπίστωση της Bolognesi (2003) ότι η χρόνια έκθεση σε χαμηλές δόσεις σύνθετων μιγμάτων φυτοφαρμάκων, επάγει αθροιστικά κυτταρογενετικά αποτελέσματα.

Η Bolognesi (2003) επισημαίνει επίσης ότι η χρόνια έκθεση σε μίγματα φυτοφαρμάκων συσχετίζεται με θραυσματογόνο επίδραση στο γενετικό υλικό των εκτεθειμένων ατόμων. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και η ερευνητική ομάδα του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, αναλύοντας την κατανομή μεγέθους των επαγόμενων μικροπυρήνων σε μια ομάδα αγροτών από τη Μεσσαρά της Κρήτης, από την επαγγελματική έκθεση σε συνδυασμό 17 φυτοφαρμάκων. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αγροτών και της ομάδας ελέγχου, σε σχέση με τη συχνότητα των μικρού μεγέθους μικροπυρήνων μόνο, γεγονός που υποδεικνύει θραυσματογόνο δράση του μελετώμενου παράγοντα (Vlastos et al., 2006). Στην παρούσα μελέτη όμως, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, για κανένα μέγεθος μικροπυρήνων πριν και μετά τον ψεκασμό, οπότε δεν μπορέσαμε να εξάγουμε συμπεράσματα για την θραυσματογόνο ή ανευπλοειδογόνο δράση των μελετώμενων φυτοφαρμάκων.

Σε μια δεύτερη φάση, κατά την παρούσα διατριβή, διερευνήθηκε η δυνατότητα των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl να επάγουν γενοτοξικότητα σε *in vitro* συνθήκες, μεμονωμένα, αλλά και σε συνδυασμό, χρησιμοποιώντας ως κυτταρογενετικούς δείκτες την επαγωγή μικροπυρήνων και την επαγωγή ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων. Ως βιολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος, τα οποία αποτελούν τον πιο συχνά χρησιμοποιούμενο τύπο κυττάρων στις παραπάνω κυτταρογενετικές τεχνικές (Tucker & Preston, 1996). Οι ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων, όπως και οι μικροπυρήνες, αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους κυτταρογενετικούς δείκτες για τη

μελέτη γενοτοξικότητας, καθώς δημιουργούνται ως αποτέλεσμα θραύσεων στις αλυσίδες του DNA, κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του γενετικού υλικού (Albertini et al., 2000).

Όσον αφορά στη μεμονωμένη δράση του κάθε φυτοφαρμάκου, οι Feng et al. (2005), αναφέρουν στατιστικά σημαντική επαγωγή μικροπυρήνων και ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, μετά από *in vitro* επίδραση με Imidacloprid, σε συγκεντρώση 0.1 και 0.5 $\mu\text{g/ml}$, που προστέθηκε 24 ώρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας.

Στην παρούσα μελέτη, σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις του Imidacloprid, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τους αρνητικούς μάρτυρες, ούτε στην επαγωγή μικροπυρήνων, ούτε στην επαγωγή ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων. Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα πιθανόν να εξηγούνται από τις σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται στις συχνότητες των μικροπυρήνων και των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων των αρνητικών μαρτύρων, ανάμεσα στις δυο μελέτες.

Τα αποτελέσματά μας όμως συμφωνούν με αντίστοιχα αποτελέσματα πρόσφατων ερευνών των Stivaktakis et al. (2010), οι οποίοι, στα πλαίσια μιας συνδυαστικής βιολογικής και φυσικοχημικής μελέτης, δεν παρατήρησαν στατιστικά σημαντική επαγωγή μικροπυρήνων από την *in vitro* επίδραση του Imidacloprid σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Οι τελευταίοι μελετητές ωστόσο, αναφέρουν *in vitro* γενοτοξική δράση του φυτοφαρμάκου σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα όταν επιδρά σε συνδυασμό με νιτρικό κάλιο (KNO_3).

Επίσης, πρόσφατη μελέτη των Costa et al. (2009) αναφέρει ότι το Imidacloprid σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες των 20 μM , δεν επάγει γενοτοξικότητα σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα *in vitro*, με ή χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση (ένζυμο S9). Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 20 μM ωστόσο, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στη συχνότητα των μικροπυρήνων σε μεταβολικά ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα. Σ' αυτή την περίπτωση όμως, δεν είναι ξεκάθαρο αν το θετικό αποτέλεσμα οφείλεται στο ίδιο το Imidacloprid ή στους μεταβολίτες του.

Σχετικά με το Metalaxyl, οι Hrelia et al. (1996) αναφέρουν ότι *in vitro* επίδραση του Metalaxyl σε υψηλές συγκεντρώσεις (300-1000 $\mu\text{g/ml}$) είχε ως

αποτέλεσμα σημαντική δόσο-εξαρτώμενη αύξηση των χρωμοσωματικών βλαβών σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Επίσης, χρωμοσωματικές θραύσεις ανιχνεύθηκαν σε κύτταρα ωοθηκών κινεζικών hamster (Chinese hamster ovary, CHO cells) μετά από *in vitro* χορήγηση 1200 µg/ml Metalaxyl, χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση (Murli & Ivett, 1986).

Στην παρούσα μελέτη, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις Metalaxyl, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα των μικροπυρήνων σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες. Παρατηρήθηκαν όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων, χωρίς ωστόσο να υπάρχει δόσο-εξαρτώμενη αύξηση. Τα δυο παραπάνω ευρήματα για το Metalaxyl δεν μας επιτρέπουν να πούμε με βεβαιότητα ότι παρουσιάζει *in vitro* γενοτοξική δράση.

Το γεγονός αυτό δεν έρχεται σε αντίθεση με μια γενικότερη διαπίστωση που απορρέει για το Metalaxyl από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, ότι δεν παρουσιάζει σημαντική *in vitro* γενοτοξική δράση το ίδιο, αλλά ενεργοποιεί καρκινογενετικούς μηχανισμούς (Perocco et al., 1995; Hrelia et al., 1995; Paolini et al., 1996) και ενισχύει τη γενοτοξικότητα άλλων χημικών παραγόντων με τους οποίους χορηγείται σε συνδυασμό (Waters et al., 1982; Garrett et al., 1986; Hrelia et al., 1996).

Όσον αφορά στην *in vitro* επίδραση του μίγματος των δύο φυτοφαρμάκων, στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες, σημειώθηκαν κατά την ανάλυση των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις, αλλά όχι κατά την ανάλυση των μικροπυρήνων. Και σ' αυτή την περίπτωση όμως, δεν παρατηρήθηκε δόσο-εξαρτώμενη αύξηση της συχνότητας των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων.

Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν οι Dolara et al. (1992), μελετώντας την επίδραση ενός μίγματος 4 διαφορετικών φυτοφαρμάκων: παρατήρησαν σημαντική επαγωγή ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων από την *in vitro* επίδραση του μίγματος, ενώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όταν εξέτασαν το κάθε φυτοφάρμακο μεμονωμένα. Παρατήρησαν ωστόσο, γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση του μίγματος και στη συχνότητα των ανταλλαγών.

Αντίθετα, οι Bianchi-Santamaria et al. (1997), εξετάζοντας σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων με την εφαρμογή της τεχνικής των μικροπυρήνων, την *in vitro* επίδραση ενός μίγματος φυτοφαρμάκων τα οποία μεμονωμένα παρουσίαζαν ήδη ελαφριά γενοτοξική δράση, δεν παρατήρησαν αύξηση της επαγόμενης γενοτοξικότητας, λόγω της επίδρασης του μίγματος. Αξιολογώντας τα αποτελέσματα της *in vitro* μελέτης μας, το Imidacloprid δεν εμφανίζει γενοτοξική δράση σε καμία από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, και σε κανένα από τα δύο συστήματα ελέγχου που εφαρμόστηκαν. Το Metalaxyl και το μίγμα των δύο φυτοφαρμάκων όμως, παρουσιάζουν διαφορετική απόκριση στα δύο εφαρμοζόμενα συστήματα ελέγχου: παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική γενοτοξική δράση όταν εξετάζονται με τη μέθοδο των ανταλλαγών, αλλά όχι όταν εξετάζονται με τη μέθοδο των μικροπυρήνων.

Τα ευρήματα αυτά πιθανόν να υποδεικνύουν μεγαλύτερη ευαισθησία της μεθόδου των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων, έναντι της μεθόδου των μικροπυρήνων στην ανίχνευση γενετικών βλαβών που οφείλονται στην επίδραση των συγκεκριμένων χημικών παραγόντων στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Σε παρόμοιο συμπέρασμα καταλήγουν μελέτες των Latt (1974), Kato & Shimada (1975) και Perry & Evans (1975), οι οποίοι παρατήρησαν ότι αυξημένες συχνότητες ανταλλαγών επάγονται από τη δράση κάποιων χημικών παραγόντων σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις από αυτές που απαιτούνται για την πρόκληση χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα δεν μας οδηγούν σε ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με τη γενοτοξική δράση του Imidacloprid και του Metalaxyl, όταν επιδρούν *in vitro* σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση ως προς τη γενετική δράση των μελετώμενων φυτοφαρμάκων, ανάμεσα στα αποτελέσματα των *in vivo* πειραμάτων επαγγελματικής έκθεσης και *in vitro* μελετών μας, αποτέλεσαν το έναυσμα για τη χρησιμοποίηση άλλης μιας δοκιμασίας ελέγχου, σε *in vivo* συνθήκες: της επαγωγής μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων. Η τεχνική αυτή, όπως και η τεχνική των

μικροπυρήνων με αναστολή της κυτταροκίνησης με κυτταροχλασίνη-B, είναι ικανή να ανιχνεύσει παράγοντες που προκαλούν βλάβες είτε στα χρωμοσώματα, επάγοντας έτσι μικροπυρήνες που περιέχουν χρωμοσωματικά θραύσματα, είτε στη μιτωτική συσκευή, επάγοντας έτσι μικροπυρήνες που περιέχουν ολόκληρα χρωμοσώματα (US FDA/CFSAN, 2000).

Με την τεχνική αυτή, επιπλέον, συνυπολογίζονται παράμετροι όπως είναι ο *in vivo* μεταβολισμός των μελετώμενων ουσιών, φαρμακοκινητικές παράμετροι και διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA, οι οποίες ενδείκνυται να λαμβάνονται υπόψη κατά τη διεξαγωγή μελετών προσδιορισμού της γενετοξικής δράσης διαφόρων χημικών παραγόντων. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο μεταβολίτης 2-imidazolidone του Imidacloprid (γνωστός και ως αιθυλενουρία), σε συνδυασμό με νιτρικά, επάγει όγκους και προκαλεί γενετικές βλάβες σε αρουραίους μετά από στοματική χορήγηση (Sander & Buerkle, 1971 in Cox, 2001). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες των Stapleton et al. (2008) και των Vlastos et al. (2010b) αναφέρουν ότι ένα προϊόν της διάσπασης των μεταβολιτών του Imidacloprid, η 2-χλωροπυριδίνη (2-Chloropyridine, 2-CPY), εμφανίζει γενετοξική δράση στη συγκέντρωση των 100 µg/ml, μετά την εφαρμογή της τεχνικής των μικροπυρήνων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων, ενώ παράλληλα παράγει γενετοξικά δραστικά υποπροϊόντα όταν υφίσταται φωτολυτική διάσπαση.

Στην *in vivo* μελέτη μας, κατά την μεμονωμένη επίδραση των δύο φυτοφαρμάκων, δεν παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα συγκριτικά με τους αρνητικούς μάρτυρες, μέχρι τη συγκέντρωση των 200 mg/kg σωματικού βάρους (σ.β). Στα 300 mg/kg σ.β. όμως, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επαγωγή μικροπυρήνων, συγκριτικά με τους αρνητικούς μάρτυρες, τόσο από το Imidacloprid, όσο και από το Metalaxyl.

Οι Zang et al. (2000) αναφέρουν ότι δεν υπήρξε επαγωγή μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα ποντικών από την επίδραση Imidacloprid, μέχρι τη συγκέντρωση των 100 mg/kg σ.β.

Επίσης, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 75, 150 και 300 mg/kg σ.β. Metalaxyl δεν άλλαξε στατιστικά σημαντικά τη συχνότητα των μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα αρσενικών CD1 ποντικών, ούτε έδωσε

κάποια ένδειξη κυτταροτοξικότητας συγκριτικά με τους μάρτυρες (Hrelia et al., 1996).

Μετά από τη χορήγηση του μίγματος των δύο φυτοφαρμάκων στα πειραματόζωα, παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τους αρνητικούς μάρτυρες, στην επαγωγή μικροπυρήνων στις δύο υψηλότερες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (200 και 400 mg/kg σ.β.).

Τα αποτελέσματα της παραπάνω *in vivo* μελέτης υποδεικνύουν γενotoξική επίδραση των μελετώμενων φυτοφαρμάκων, τόσο όταν χορηγούνται μεμονωμένα, όσο και όταν χορηγούνται σε συνδυασμό σε πειραματόζωα, στις υψηλότερες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις.

Ανάλογη μελέτη, με τη εφαρμογή της ίδιας δοκιμασίας ελέγχου, έχουν πραγματοποιήσει οι Goumenou & Machera (2004) για τη διερεύνηση της γενotoξικής δράσης δύο φυτοφαρμάκων (Paraquat και Linuron), μεμονωμένα και σε συνδυασμό. Τα αποτελέσματα της μελέτης δεν έδειξαν επαγωγή γενotoξικότητας από τη συνδυαστική επίδραση των δύο αυτών φυτοφαρμάκων στα πειραματόζωα.

Πρέπει να σημειωθεί ότι και στις 3 ενότητες της παρούσας μελέτης, διερευνήθηκε το ενδεχόμενο να παρουσιάζουν τα μελετώμενα φυτοφάρμακα κυτταροτοξικές επιδράσεις, είτε μεμονωμένα, είτε σε συνδυασμό. Αυτό επιτεύχθηκε υπολογίζοντας τους κατάλληλους δείκτες για κάθε δοκιμασία ελέγχου: τον δείκτη CBPI για την τεχνική των μικροπυρήνων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων, το δείκτη RI για την τεχνική των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων και το ποσοστό (%) των PCEs για την τεχνική των μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων. Για κανέναν από τους παραπάνω δείκτες και σε κανένα πειραματικό σημείο ελέγχου δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τον αντίστοιχο κάθε φορά μάρτυρα, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα εξεταζόμενα φυτοφάρμακα στις πειραματικές συνθήκες που μελετήθηκαν δεν εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με αντίστοιχα ευρήματα στη βιβλιογραφία για την κυτταροτοξικότητα των δύο συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων (Hrelia et al., 1996; Stivaktakis et al., 2010).

Συνολικά, παρατηρούμε μια διαφορετική απόκριση σε ότι αφορά την επαγωγή γενοτοξικής δράσης από τα δύο φυτοφάρμακα, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, τόσο ανάμεσα στα διάφορα συστήματα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν, όσο και ανάμεσα στις διάφορες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Ανάλογη διαφορετική απόκριση παρατηρείται σε διάφορες μελέτες που εξετάζουν τη γενοτοξικότητα των συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων.

Είναι πολλοί οι παράγοντες που πρέπει να συνεξεταστούν προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα και να δοθεί μια ξεκάθαρη θετική ή αρνητική απάντηση στο ερώτημα αν το Imidacloprid και/ή το Metalaxyl εμφανίζουν γενοτοξική δράση στο ανθρώπινο γενετικό υλικό, καθώς και από ποιες συγκεντρώσεις γίνονται επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία. Έχει ήδη αναφερθεί ο ρόλος του γενετικού πολυμορφισμού στον άνθρωπο, που μπορεί να επηρεάσει το ρυθμό ενεργοποίησης ή αποτοξικοποίησης του κάθε παράγοντα που επιδρά στο γενετικό υλικό.

Σε *in vitro* μελέτες, είναι απαραίτητο να διερευνηθεί κατά πόσο οι εξεταζόμενοι παράγοντες διεισδύουν στα κύτταρα και φτάνουν στο γενετικό υλικό για να εκδηλώσουν τη γενοτοξική τους δράση. Ανάλογα με την στερεοχημική δομή του εξεταζόμενου κάθε φορά παράγοντα, είναι πιθανή η σύναψη μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων, όπως είναι οι δεσμοί υδρογόνου με διάφορα συστατικά του ορού του αίματος, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται ο ρυθμός βιομεταφοράς, κατανομής και απορρόφησης του (Skoutelis et al., 2011). Αξίζει να αναφερθεί η μελέτη των Stivaktakis et al. (2010) οι οποίοι υποστηρίζουν ότι η δυνατότητα του Imidacloprid να εισέρχεται στο εσωτερικό των λεμφοκυττάρων και να αλληλεπιδρά με το γενετικό υλικό εμποδίζεται από το αρνητικό του φορτίο, το οποίο είναι δυνατόν να εξουδετερωθεί από την παρουσία νιτρικού καλίου (KNO_3) στην καλλιέργεια των λεμφοκυττάρων.

Σε *in vivo* μελέτες με πειραματόζωα η δυσκολία έγκειται στο να διερευνηθεί αν και με τι ρυθμό ο εξεταζόμενος παράγοντας φτάνει στον ιστό στόχο. Για να δοθούν απαντήσεις στα παραπάνω ερωτήματα είναι απαραίτητο να διαλευκανθούν, με τη βοήθεια φαρμακοκινητικών αναλύσεων, τα μεταβολικά μονοπάτια και οι μηχανισμοί μεταφοράς που ακολουθούν οι συγκεκριμένοι

χημικοί παράγοντες από τη στιγμή που εισέρχονται στον οργανισμό μέχρι να φτάσουν στα κύτταρα-στόχους (Thompson et al., 2008).

Επιπλέον, για την πληρέστερη διερεύνηση της γενετοξικής δράσης των μελετώμενων φυτοφαρμάκων θα ήταν χρήσιμο να προσδιοριστούν ποσοτικά τόσο οι ίδιοι χημικοί παράγοντες, όσο και οι μεταβολίτες τους σε βιολογικά υγρά ή στο περιβάλλον εκτεθειμένων ατόμων, όπως είναι το αίμα, τα ούρα και ο εισπνεόμενος αέρας. Σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης και προσυγκέντρωσης όπως είναι η υγρή-στερεή εκχύλιση (solid-phase extraction, SPE), η υγρή-στερεή μικροεκχύλιση (solid-phase microextraction, SPME) (Krämer Alkalde et al., 2004; Amorim & Cardeal, 2007), καθώς και εξελιγμένες αναλυτικές τεχνικές, όπως είναι η αέριος χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS), η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) (Manini et al., 2004), και ειδικά η δίδυμη φασματομετρία μάζας (tandem mass spectrometry, MS-MS) (Sabatini et al., 2008), μπορούν να ανιχνεύσουν με μοναδική επιλεκτικότητα και ευαισθησία ακόμα και ίχνη των μελετώμενων ουσιών και των μεταβολιτών τους στα διάφορα βιολογικά υλικά.

Ο συνδυασμός κυτταρογενετικών τεχνικών σαν αυτές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρούσα μελέτη, με αναλυτικές χημικές, βιοχημικές και μοριακές τεχνικές θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση μελλοντικής ερευνητικής δουλειάς για την περαιτέρω διερεύνηση της γενετοξικότητας των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl. Μια τέτοιου είδους προσέγγιση θα μπορούσε να δώσει πληρέστερες απαντήσεις στο ζήτημα του γενετικού κινδύνου που απορρέει από την έκθεση στα συγκεκριμένα φυτοφάρμακα, είτε μεμονωμένα, είτε σε συνδυασμό.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα συμπεράσματα στα οποία καταλήγουμε κατά την παρούσα μελέτη είναι τα εξής:

- Η επαγγελματική έκθεση των καλλιεργητών στο συνδυασμό των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl επάγει αυξημένες συχνότητες μικροπυρήνων και διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα,

οι οποίες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τις αντίστοιχες της εξεταζόμενης ομάδας των μαρτύρων.

- Η συνήθεια του καπνίσματος δεν επάγει διαφορές στις συχνότητες των μικροπυρήνων σε καμία από τις δύο εξεταζόμενες ομάδες, τόσο των μαρτύρων (καπνιστών-μη καπνιστών) όσο και των καλλιεργητών (καπνιστών-μη καπνιστών).
- Η συνήθεια του καπνίσματος είναι πιθανό να λειτουργεί συνεργιστικά με την έκθεση στα εξεταζόμενα φυτοφάρμακα στην περίπτωση των καπνιστών καλλιεργητών, με δεδομένο ότι παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συχνότητες των μικροπυρήνων μεταξύ των μαρτύρων καπνιστών και των καλλιεργητών καπνιστών μετά τον ψεκασμό.
- Το Imidacloprid και το Metalaxyl, όταν εξετάζονται ξεχωριστά σε *in vitro* συνθήκες παρουσιάζουν διαφορετική απόκριση. Το Imidacloprid δεν επάγει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε κανένα από τα δύο συστήματα ελέγχου που εφαρμόστηκαν (μικροπυρήνες, ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων). Το Metalaxyl δεν επάγει στατιστικά σημαντικές διαφορές στην συχνότητα των μικροπυρήνων συγκριτικά με τον μάρτυρα, ενώ επάγει στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων συγκριτικά με τον μάρτυρα στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις των 5, 10 και 100 µg/ml.
- Το Imidacloprid και το Metalaxyl, όταν εξετάζονται ξεχωριστά σε *in vivo* συνθήκες, επάγουν στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας των μικροπυρήνων συγκριτικά με τον μάρτυρα μόνο στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (300 mg/kg σωματικού βάρους).
- Το Imidacloprid και το Metalaxyl, όταν εξετάζονται σε συνδυασμό σε *in vitro* συνθήκες, επάγουν στατιστικά σημαντικές διαφορές

συγκριτικά με τον μάρτυρα, μόνο στη συχνότητα των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων, στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις των 100 και 200 $\mu\text{g/ml}$.

- Το Imidacloprid και το Metalaxyl, όταν εξετάζονται σε συνδυασμό σε *in vivo* συνθήκες, επάγουν στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας των μικροπυρήνων συγκριτικά με τον μάρτυρα στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις των 200 και 400 mg/kg σωματικού βάρους.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ - SUMMARY

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυτοφάρμακα, μια ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων, χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη γεωργία για την καταπολέμηση διαφόρων εχθρών των φυτών και αποτελούν σημαντική κατηγορία περιβαλλοντικών ρυπαντών. Ο οργανισμός του ανθρώπου εκτίθεται καθημερινά και σε συνεχώς αυξανόμενο βαθμό, σε σύνθετα μίγματα φυτοφαρμάκων, είτε μέσω της επαγγελματικής του ενασχόλησης, είτε ως καταναλωτής, με ποικίλες αρνητικές συνέπειες για την υγεία του, είτε άμεσες, είτε μακροπρόθεσμες. Πολλά φυτοφάρμακα έχουν χαρακτηριστεί ως ιδιαίτερα τοξικά για τον άνθρωπο και άλλα ως πιθανά ή δυνητικά καρκινογόνα. Για τα περισσότερα από αυτά έχουν πραγματοποιηθεί εκτενείς μελέτες και έχουν εκδοθεί επίσημες οδηγίες από διεθνείς φορείς για την επικινδυνότητά τους ή μη. Οι αλληλεπιδράσεις όμως ανάμεσα στα συστατικά σύνθετων μιγμάτων φυτοφαρμάκων και οι πιθανές επιπτώσεις τους στη γενοτοξικότητά τους, δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε σε *in vitro* και *in vivo* συνθήκες, η γενοτοξική δράση των φυτοφαρμάκων Imidacloprid και Metalaxyl, μεμονωμένα, αλλά και σε συνδυασμό. Τα δύο αυτά φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως στην καλλιέργεια καπνού, που αποτελεί μια από τις κύριες αγροτικές δραστηριότητες στην περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας. Το Imidacloprid είναι εντομοκτόνο ευρέος φάσματος που ανήκει στην ομάδα των νεονικοτινοειδών, και το Metalaxyl είναι ένα συστηματικό βενζενοϊδές μυκητοκτόνο. Ως δοκιμασίες ελέγχου για τον προσδιορισμό της γενοτοξικότητας των συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της επαγωγής μικροπυρήνων και της επαγωγής ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων, σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων, καθώς και της επαγωγής μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων.

Τα αποτελέσματα που πήραμε από την ανάλυση των μικροπυρήνων στα λεμφοκύτταρα 11 καλλιεργητών καπνού, πριν και μετά τον ψεκασμό με τα εν λόγω φυτοφάρμακα, και από τη σύγκρισή τους με την τυχαία επαγωγή

μικροπυρήνων στα λεμφοκύτταρα 11 αρνητικών μαρτύρων, ήταν τα εξής: Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα των μικροπυρήνων των καλλιεργητών πριν και μετά τον ψεκασμό. Η σύγκριση μεταξύ καπνιστών και μη-καπνιστών αρνητικών μαρτύρων αλλά και καλλιεργητών δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Βρέθηκαν όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα των μικροπυρήνων ανάμεσα στους καλλιεργητές μετά τον ψεκασμό και τους αρνητικούς μάρτυρες.

Η ανάλυση των μικροπυρήνων σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων μετά από *in vitro* επίδραση με τα δυο φυτοφάρμακα, μεμονωμένα και σε συνδυασμό, δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες. Η ανάλυση των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές σχετικά με τους αρνητικούς μάρτυρες για το Metalaxyl μεμονωμένα, στις συγκεντρώσεις των 5, 10 και 100 µg/ml και για το μίγμα Imidacloprid /Metalaxyl στις συγκεντρώσεις των 100 και 200 µg/ml. Τέλος, κατά την ανάλυση των μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μετά από μεμονωμένη χορήγηση 300 mg/kg σωματικού βάρους Imidacloprid και Metalaxyl, καθώς και μετά από χορήγηση 200 & 400 mg/kg σωματικού βάρους του μίγματος.

Summary

Pesticides, a heterogeneous category of chemicals specifically designed for the protection of plants from pests, are widely used in agriculture, constituting an important group of environmental pollutants. Human is daily exposed to complex mixtures of pesticides, in a continuously increasing degree, either occupationally or incidentally, with different direct or indirect health side-effects. Many pesticides have been identified as extremely toxic to humans, while others as possible or potent carcinogens. Extensive studies have been conducted for most of them and official guidelines regarding their potential hazard have been established by international organisations. However, the possible interactions between compounds of complex mixtures of pesticides have not been extensively studied.

In the present thesis we investigated the *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of two pesticides: Imidacloprid and Metalaxyl, separately and in combination. These two pesticides are widely used in tobacco cultures which is one of the main farming activities in the Aitolokarnania area of Western Greece. Imidacloprid is a broad-spectrum insecticide belonging to the group of neonicotinoids, and Metalaxyl is a systemic benzenoid fungicide. For the evaluation of the genotoxicity of the selected pesticides we used the following cytogenetic end-points: the micronucleus (MN) formation and sister-chromatid exchange (SCE) induction in human lymphocytes and the micronucleus induction in polychromatic erythrocytes (PCEs) of the rat bone-marrow.

The results obtained from the analysis of micronuclei in the lymphocytes of 11 farmers, before and after spraying the specific pesticides, and from their comparison with the spontaneous induction of micronuclei in the lymphocytes of 11 negative controls, showed that there are no statistically significant differences in the micronuclei frequencies of our studied groups before and after spraying. Analysis on the basis of smokers versus non-smokers, for negative controls, as well as for farmers, did not show statistically significant differences. Analysis between control and exposed

farmers revealed a significant difference after the exposure to these pesticides.

The results of the MN analysis in lymphocyte cultures treated *in vitro* with the two pesticides, either separately or as a mixture, did not significantly differ from those in the controls. The results of the SCE analysis showed a statistically significant increase in SCE frequency resulting from treatments with Metalaxyl at 5, 10 and 100 µg/ml and with the combination of Imidacloprid and Metalaxyl at 100 and 200 µg/ml. Finally, the *in vivo* micronucleus assay with rat bone-marrow polychromatic erythrocytes showed a statistically significant effect upon separate treatments with Imidacloprid and Metalaxyl at doses of 300 mg/kg b.w. or upon combined treatment with 200 and 400 mg/kg b.w.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aardema M.J., Snyder R.D., Spicer C., Divi K., Morita T., Mauthe R.J., Gibson D.P., Soelter S., Curry P.T., Thybaud V., Lorenzon G., Marzin D., Lorge E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. **Mutat. Res.** 607: 61-87.
- Abou-Eisha A. (2006). Evaluation of cytogenetic and DNA damage induced by the antibacterial drug, trimethoprim. **Toxicol. In Vitro** 20(5):601-607.
- Abou-Eisha A., Marcos R., Creus A. (2004). Genotoxicity studies on the antimicrobial drug sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes. **Mutat. Res.** 564: 51-56.
- Abramsson-Zetterberg L., Zetterberg G., Bergqvist M., Grawé J. (2000). Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in transferrin-positive immature peripheral blood reticulocytes. **Environ. Mol. Mutagen.** 36: 22-31.
- Agarwal R. (2008). Severe neuropsychiatric manifestations and rhabdomyolysis in a patient with Imidacloprid poisoning. **Am. J. Emerg. Med.** 25: 844-856.
- Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A.T., Norppa H., Shuker D.E., Tice R., Waters M.D., Aitio A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. **Mutat. Res.** 463(2): 111-172.
- Alsayed H., Pascal-Lorber S., Nallanthigal C., Debrauwer L., Laurent F. (2008). Transfer of the insecticide Imidacloprid from soil to tomato plants. **Environ. Chem. Lett.** 6: 229-234.
- Amorim L.C.A., de L.Cardeal Z. (2007). Another way is to measure their respective metabolites in blood or urine samples. Quantitative analysis of benzene, toluene, and xylenes in urine by means of headspace solid-phase microextraction. **J. Chromatogr. B** 853: 1-9.
- Andrianopoulos C., Stephanou G., Demopoulos N.A. (2006). Genotoxicity of hydrochlorothiazide in cultured human lymphocytes. I. Evaluation of chromosome delay and chromosome breakage. **Environ. Mol. Mutagen.** 47(3):169-78.
- Andrianopoulos C., Stephanou G., Politi E., Demopoulos N.A. (2000). Evaluation and characterization of micronuclei induced by the

- antitumour agent ASE [3 β -hydroxy-13 α -amino-13,17-seco-5 α -androstan-17- α -13,17-lactam-*p*-bis(2-chloroethyl)amino phenylacetate] in human lymphocyte cultures. **Mutagenesis** 15(3): 215-221.
- Bakou K., Stephanou G., Andrianopoulos C., Demopoulos N.A. (2002). Spontaneous and spindle poison-induced micronuclei and chromosome non-disjunction in cytokinesis-blocked lymphocytes from two age groups of women. **Mutagenesis** 17(3): 233-239.
- Barale R., Chelotti L., Davini T., Del Ry S., Andreassi M.G., Ballardini M., Bulleri M., He J., Baldacci S., Di Pede F., Gemignani F., Landi S. (1998). Sister Chromatid Exchange and Micronucleus Frequency in Human Lymphocytes of 1650 Subjects in an Italian Population: II. Contribution of Sex, Age and Lifestyle. **Environ. Mol. Mutagen.** 31: 228-242.
- Beck L.S., DeWard J., Kitchen D.N. et al. (1981). Six Month Chronic Oral Toxicity Study with CGA-48988 Technical in Beagle Dogs: Project No. 1545. (Unpublished study received Apr 15, 1981 under 100-607; prepared by Elars Bioresearch Laboratories, Inc., submitted by Ciba-Geigy Corp., Greensboro, N.C.; CDL: 070016-A)
- Becker H., Vogel W., Terrier C. (1988a). Embryotoxicity study (including teratogenicity) with NTN 33893 technical in the rat. Unpublished Report no. R 4582, 1988, submitted to WHO by Bayer AG, Mannheim, Germany. INCHEM Toxicological Evaluations: Imidacloprid; International Programme on Chemical Safety, World Health Organization: Geneva, Switzerland.
- Becker H., Vogel W., Terrier C. (1988b). Embryotoxicity study (including teratogenicity) with NTN 33893 technical in the rabbit. Unpublished Report no. R 4583, 1988, submitted to WHO by Bayer AG, Mannheim, Germany. INCHEM Toxicological Evaluations: Imidacloprid; International Programme on Chemical Safety, World Health Organization: Geneva, Switzerland.
- Becker P., Scherthan H., Zanki H. (1990). Use of a centromere-specific DNA probe (p82H) in nonisotopic *in situ* hybridisation for classification of micronuclei. **Gene Chromosome Canc.** 2(1): 59-62.
- Benova D., Hadjidekova V., Hristova R., Nikolova T., Boulanova M., Georgieva I., Grigorova M., Popov T., Panev T., Georgieva R., Natarajan A.T., Darroudi F., Nilsson R. (2002). Cytogenetic effects of hexavalent chromium in Bulgarian chromium platers. **Mutat. Res.** 514: 29-38.
- Bianchi-Santamaria A., Gobbi M., Cembran M., Arnaboldi A. (1997). Human lymphocyte micronucleus genotoxicity test with mixtures of

- phytochemicals in environmental concentrations. **Mutat. Res.** 388: 27–32.
- Bilban M., Jakopin C.B., Ogrinc D. (2005). Cytogenetic tests performed on operating room personnel (the use of anaesthetic gases). **Int. Arch. Occ. Env. Hea.** 78: 60-64.
- Bingham S. (2007). Pesticides in rivers and groundwater. Environment Agency, UK. Available online at: <http://www.environment-agency.gov.uk/>
- Blair A., Freeman L.B. (2009). Epidemiologic studies of cancer in agricultural populations: observations and future directions. **J. Agromedicine** 14: 125-131.
- Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutat. Res.** 543:251-272.
- Bolognesi C., Abbondandolo A., Barale R., Casalone R., Dalprà L., De Ferrari M., Degrassi F., Forni A., Lamberti L., Lando C., Migliore L., Padovani P., Pasquini R., Puntoni R., Sbrana I., Stella M., Bonassi S.(1997). Age-related Increase of Baseline Frequencies of Sister Chromatid Exchanges, Chromosome Aberrations, and Micronuclei in Human Lymphocytes. **Cancer Epidem. Biomar. Prev.** 6: 249-256.
- Bolognesi C., Creus A., Ostrosky-Wegman P., Marcos R. (2011). Micronuclei and pesticide exposure. (Review) **Mutagenesis** 26(1): 19-26.
- Bolognesi C., Landini E., Perrone E., Roggieri P. (2004). Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. **Mutat. Res.** 557: 109–117.
- Bonassi S., El-Zein R., Bolognesi C., Fenech M. (2011). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. **Mutagenesis** 26(1): 93-100.
- Bonassi S., Fenech M., Lando C., Lin Y.-P., Ceppi M., Chang W.P., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E., Ban S., Barale R., Bigatti M.P., Bolognesi C., Jia C., Di Giorgio M., Ferguson L.R., Fucic A., Lima O.G., Hrelia P., Krishnaja A.P., Lee T.-K., Migliore L., Mikhalevich L., Mirkova E., Mosesso P., Müller W.-U., Odagiri Y., Scarffi M.R., Szabova E., Vorobtsova I., Vral A., Zijno A. (2001). Human MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. **Environ. Mol. Mutagen.** 37: 31–45.

- Bonassi S., Neri M., Lando C., Ceppi M., Lin Y.-P., Chang W.P., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E., Fenech M., and the HUMN collaborative group. (2003). Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. **Mutat. Res.** 543: 155-166.
- Bonassi S., Ugolini D., Kirsch-Volders M., Strömberg U., Vermeulen R., Tucker J.D. (2005). Human Population Studies With Cytogenetic Biomarkers: Review of the Literature and Future Prospectives. **Environ. Mol. Mutagen.** 45:258-270.
- Brunet J. L., Maresca M., Fantini J., Belzunces L. P. (2004). Human intestinal absorption of imidacloprid with Caco-2 cells as enterocyte model. **Toxicol. Appl. Pharm.** 194: 1-9.
- Bull S., Fletcher K., Boobis A.R., Battershill J.M. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. **Mutagenesis** 21(2): 93-103.
- Calvert G.M., Plate D.K., Das R., Rosales R., Shafey O., Thomsen C., Male D., Beckman J., Arvizu E., Lackovic M. (2004). Acute occupational pesticide-related illness in the US, 1998-1999: surveillance findings from the SENSOR-pesticides program. **Am. J. Ind. Med.** 45: 14-23.
- Carrano A.V., Thompson L.H. (1982). Sister chromatid exchange and single-gene mutat.. Chap.4: 59-86. In: Sister chromatid exchange. Ed Wolff S., Wiley J. & Sons, New York.
- Carter S.B. (1967). Effects of cytochalasins on mammalian cells, **Nature** 213: 261-264.
- Cavallo D., Ursini C.L., Carelli G., Iavicoli I., Ciervo A., Perniconi B., Rondinone B., Gismondi M., Iavicoli S. (2006). Occupational exposure in airport personnel: Characterization and evaluation of genotoxic and oxidative effects. **Toxicology** 223: 26-35.
- Chao L.S., Casida J.E. (1997). Interaction of imidacloprid metabolites and analogs with the nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity. **Pestic. Biochem. Physiol.** 58: 77-88.
- Charizopoulos E., Papadoppoulou-Mourkidou E, (1999). Occurrence of pesticides in rain of the Axios River Basin, Greece. **Environ. Sci. Technol.** 33 (14): 2363-2368.
- Cimini D., Degrassi F. (2005). Aneuploidy: a matter of bad connections. **Trends Cell Biol.** 15(8): 442-451.
- City of Ottawa. Available online at:
www.flora.org/healthyottawa/HRSSCHOsubmissionOct05.doc
(accessed 20.05.08).

- Clare G., Lorenzon G., Akhurst L.C., Marzin D., van Delft J., Montero R., Botta A., Bertens A., Cinelli S., Thybaud V., Lorge E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. **Mutat. Res.** 607: 37-60.
- Cleaver J.E. (1981). Correlations between sister-chromatid exchange frequencies and replicon sizes. A model for the mechanism of SCE production. **Exp. Cell Res.** 136: 27-30.
- Cortés F., Piñero J., Ortiz T. (1993). Importance of replication fork progression for the induction of chromosome damage and SCE by inhibitors of DNA topoisomerases. **Mutat. Res.** 303: 71-76.
- Corvi R., Albertini S., Hartung T., Hoffmann S., Maurici D., Pfuhler S, van Benthem J., Vanparys P. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). **Mutagenesis.** 23: 271-283.
- Costa C., Silvari V., Melchini A., Catania S., Heffron J.J., Trovato A., De Pasquale R. (2009) Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. **Mutat. Res.** 672: 40-44.
- Costello S., Cockburn M., Bronstein J., Zhang X., Ritz B. (2009). Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. **Am. J. Epidemiol.** 169: 919-926.
- Countryman K., Heddle J. (1976). The production of micronuclei from chromosomal aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutat. Res.** 41: 321-332.
- Cox C. (2001). Insecticide Factsheet. Imidacloprid. **J. Pest. Reform.** Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides (NCAP). 21(1): 15-21.
- Cox L., Koskinen W.C., Yen P.Y. (1997). Sorption-desorption of imidacloprid and its metabolites in soil. **J. Agric. Food Chem.** 45: 1468-1472.
- D' Amour K.A., Casida J.E. (1999). Desnitroimidacloprid and nicotine binding site in rat recombinant alpha 4 beta 2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. **Pestic. Biochem. Physiol.** 64: 55-61.
- Das B.C. (1988). Factors that influence formation of sister chromatid exchanges in human blood lymphocytes. **CRC Crit. Rev. Toxicol.** 19(1): 43-86.
- Dearfield K.L., McCarroll N.E., Protzel A., Stack H.F., Jackson M.A., Waters M.D. (1999). A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. II. Mutagenicity and carcinogenicity of selected

- chloroacetanilides and related compounds. **Mutat. Res.** 443: 183–221.
- Dearfield K.L., Stack H.F., Quest J.A., Whiting R.J., Waters M.D. (1993). A survey of EPA/OPP and open literature data on selected pesticide chemicals tested for mutagenicity. I. Introduction and first ten chemicals. **Mutat. Res.** 297: 197–233.
- Dertinger S.D., Bishop M.E., McNamee J.P., Hayashi M., Suzuki T., Asano N., Nakajima M., Saito J., Moore M.M., Torous D.K., MacGregor J.T. (2006) Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring. **Toxicol. Sci.** 94(1): 83–91.
- Dertinger S.D., Miller R.K., Brewer K., Smudzin T., Torous D.K., Roberts D.J., Avlasevich S.L., Bryce S.M., Sugunan S., Chen Y. (2007). Automated human blood micronucleated reticulocyte measurements for rapid assessment of chromosomal damage. **Mutat. Res.** 626: 111–119.
- Dertinger S.D., Torous D.K., Tometsko K. (1996). Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. **Mutat. Res.** 371: 283–292.
- Dertinger S.D., Torous D.K., Hayashi M., MacGregor J.T. (2011) Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage. **Mutagenesis.** 26(1): 139–145.
- Dhillon A.S., Tarbutton G.L., Levin J.L., Plotkin G.M., Lowry L.K., Nalbone J.T., Shepherd S. (2008). Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in East Texas. **J. Agromedicine** 13: 37–48.
- Dhillon V.S., Thomas P., Iarmarcovai G., Kirsch-Volders M., Bonassi S., Fenech M. (2011). Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. (Review) **Mutagenesis** 26(1): 33–42.
- Dillehay L.E., Jacobson-Kram D., Williams J.R. (1989). DNA topoisomerases and models of sister-chromatid exchange. **Mutat. Res.** 215: 15–23.
- Djelić N., Spremo-Potparević B., Bajić V., Djelić D. (2006). Sister chromatid exchange and micronuclei in human peripheral blood lymphocytes treated with thyroxine *in vitro*. **Mutat. Res.** 604: 1–7.
- Dolara P., Salvadori M., Capobianco T., Torricelli F. (1992). Sister chromatid exchanges in human lymphocytes induced by dimethoate, omethoate, deltamethrin, benomyl and their mixture. **Mutat. Res.** 283: 113–118.

- Dolara P., Vezzani A., Caderni G., Coppi C., Torricelli F. (1993). Genetic toxicity of a mixture of fifteen pesticides commonly found in the Italian diet. **Cell Biol. Toxicol.** 9: 333-343.
- Dosunmu R., Wu J., Basha M.R., Zawia N.H. (2007). Environmental and dietary risk factors in Alzheimer's disease. **Expert Rev. Neurother.** 7: 887-900.
- Eastmond D.A., Hartwig A., Anderson D., Anwar W.A., Cimino M.C., Dobrev I., Douglas G.R., Nohmi T., Phillips D.H., Vickers C. (2009). Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. **Mutagenesis** 24 (4): 341-349.
- Eastmond D.A., Tucker J.D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. **Environ. Mol. Mutagen.** 13(1): 34-43.
- Eaton D.L., Klaassen C.D. (1996). Principles of toxicology. In Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 5th Ed.; Klaassen C.D. Ed.; McGraw-Hill: U.S.A., 13-35.
- ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November, 2006. Available online at: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- Eddleston M., Karalliede L., Buckley N., Fernando R., Hutchinson G., Isbiter G., Konradsen F., Murray D., Piola J.C., Senanayake N., Sheriff R., Singh S., Siwach S.B., Smit L. (2002). Pesticide poisoning in the developing world, a minimum pesticides list. **Lancet** 360:1163-1167.
- Efthimiou M., Andrianopoulos C., Stephanou G., Demopoulos N.A., Nikolaropoulos S.S. (2007). Aneugenic potential of the nitrogen mustard analogues melphalan, chlorambucil and p-N,N-bis(2-chloroethyl)aminophenylacetic acid in cell cultures *in vitro*. **Mutat. Res.** 617:125-37.
- Elhajouji A., Lukamowicz M., Cammerer Z., Kirsch-Volders M. (2011). Potential thresholds for genotoxic effects by micronucleus scoring. **Mutagenesis**. 26(1): 199-204.
- EPA. (2009). Pesticides: Registration review, Imidacloprid, Available online at: www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/imidacloprid/
- EPA. (1994). R.E.D. FACTS, Metalaxyl. Available online at: www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/0081fact.pdf

- EPA. (2010). Pesticides: Health and safety. Available online at:
<http://www.epa.gov/pesticides/health/public.htm>
- ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Available online at:
<http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- EUR-Lex. (1978). Council Directive 79/117/EEC of 21 December 1978 prohibiting the placing on the market and use of plant protection products containing certain active substances. Available online at:
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31979L0117:EN:HTML>
- EurekAlert (2009). New 'green' pesticides are first to exploit plant defenses in battle of the fungi. Available online at:
http://www.eurekalert.org/pub_releases/2009-03/acs-np030909.php
- Eurostat, The Statistical Office of the European Communities. (2009). Total volume of pesticides sold in the Member States. Available online at:
<http://epp.eurostat.ec.europa.eu/tgm/table.do?tab=table&init=1&pluqin=1&language=en&pcode=tag00084> (accessed: August 2009).
- Evans H.J. (1982). Sister chromatid exchanges and disease states in man. Chap.7: 183-228. In: Sister chromatid exchange. Ed Wolff S., Wiley J. & Sons, New York.
- Evans H.J. (1984). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of the chromosome aberrations in mutagen tests. In: Handbook of Mutagenecity test procedures. Eds. Kibey B.J., Legator M., Nichols W. & Ramel C. Elsevier, 2nd ed.
- Evans H.J., Neary G.J., Williamson F.S. (1959). The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays in *Vicia faba* roots and the effects of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. **Int. J. Radiat. Biol.** 1: 216-229.
- EXTOXNET (1996). Pesticide Information Profiles. Metalaxyl. Available online at: <http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/metalaxy.htm> (accessed 12/10/2006).
- Falck G. C., Hirvonen A., Scarpato R., Saarikoski S., Migliore L., Norppa H. (1999). Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. **Mutat. Res.** 441(2): 225-237.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2002). International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides Available online at:

<http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPP/Pesticid/Code/Download/code.pdf>.

- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1983) Pesticide Residues in Food : Evaluations, FAO Plant Production and Protection Paper 61. Geneva, Switzerland. Available online at: http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/95_eva/metala.pdf
- Farooqi Z., Darroudi F., Natarajan A.T. (1993). Use of fluorescence *in situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. **Mutagenesis** 8: 329-334.
- Fenech M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutat. Res.** 285: 35-44.
- Fenech M. (1997). The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutat. Res.** 392: 11-18.
- Fenech M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. **Mutat. Res.** 455 (1-2): 81-95.
- Fenech M. (2003). Nutritional treatment of genome instability: a paradigm shift in disease prevention and in the setting of recommended dietary allowances. **Nutr. Res. Rev.** 16: 109-122.
- Fenech M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols** 2(5):1084-1104.
- Fenech M. (2010). The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. **Health phys.** 98: 234-243.
- Fenech M., Bonassi S. (2011). The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. (Review) **Mutagenesis** 26(1): 43-49.
- Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutat. Res.** 534: 65-75.
- Fenech M., Holland N., Zeiger E., Chang W.P., Burgaz S., Thomas P., Bolognesi C., Knasmueller S., Kirsch-Volders M., Bonassi S. (2011a). The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells-past, present and future. **Mutagenesis** 26(1): 239-245.

- Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A.T., Surralles J., Crott J.W., Parry J., Norppa H., Eastmond D.A., Tucker J.D., Thomas P. (2011b). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**. 26(1): 125-132.
- Fenech M., Morley A.A. (1985a). Measurement of micronuclei in lymphocytes, **Mutat. Res.** 147: 29-36.
- Fenech M., Morley A.A. (1985b). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. **Cytobios**. 43: 233-246.
- Feng S., Kong Z., Wang X., Peng P., Zeng E.Y. (2005). Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes *in vitro* with comet assay and cytogenetic tests. **Ecotox. Environ. Safe**. 61: 239-246.
- Feng S., Kong Z., Wang X., Zhao L., Peng P. (2004). Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. **Chemosphere** 56: 457-463.
- Fernandez-Alba A.R., Tejedor A., Agüera A., Contreras M., Garrido J. (2000). Determination of Imidacloprid and Benzimidazole residues in fruits and vegetables by liquid chromatography- mass spectrometry after ethyl acetate multiresidue extraction. **J. AOAC Int.** 83: 748-755.
- Flores-Céspedes F., Gonzales-Pradas E., Fernandez-Perez M., Vilafranca-Sanchez M., Socias-Viciano M., Urena-Amate M.D. (2002). Effects of dissolved organic carbon on sorption and mobility of Imidacloprid in soil. **J. Environ. Qual.** 31: 880-888.
- Fontana L., Lasfargues G., Ughetto S., Rogier S., Masdieu E., Lafaure M., Aublet-Cuvelier B., Catilina P. (2001). The micronucleus assay in human exfoliated urothelial cells: application in a genotoxicity study of workers exposed to a mineral jelly containing sodium nitrite and N-phenyl-1-naphthylamine. **Mutagenesis** 16(5): 449-452.
- Fossen M. (2006). Environmental Fate of Imidacloprid; Department of Pesticide Regulation, Environmental Monitoring: Sacramento, CA. Available on line at:
<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/Imidclprdfate2.pdf>
- Fox J.E. (2005). Non-Traditional Targets of Endocrine Disrupting Chemicals: The Roots of Hormone Signaling. **Integr. Comp. Biol.** 45 (1): 179-188.
- Freedman B. (1995). Classification of Pesticides by Their Use and Chemical Characteristics. In: Environmental Ecology, The Impacts of Pollution

- and Other Stresses on Ecosystem Structure and Function, Academic press, 186-189.
- Garrett N.E., Stack H.F., Waters M.D. (1986). Evaluation of the genetic activity profiles of 65 pesticides. **Mutat. Res.** 168: 301-325.
- Gilliom R.J., Barbash J.E., Crawford G.G., Hamilton P.A., Martin J.D., Nakagaki N., Nowell L.H., Scott J.C., Stackelberg P.E., Thelin G.P., Wolock D.M. (2007). The Quality of our nation's waters: Pesticides in the nation's streams and ground water, 1992-2001. Chapter 1, Page 4. US Geological Survey. Available online at: <http://pubs.usgs.gov/circ/2005/1291/>
- Gollapudi B., McFadden L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutat. Res.** 347: 97-99.
- Gómez-Arroyo S., Diaz-Sanchez Y., Meneses-Perez M.A., Villalobos- Pietrini R., De Leon-Rodriguez J. (2000). Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. **Mutat. Res.** 466: 117-124.
- Gonzalez-Arias C.A. (2010). Patrón de uso y venta de plaguicidas en Nayarit, México. **Rev. Intern. Contam. Amb.** 3: 26.
- Gonzalez-Pradas E., Flores-Cespedes F., Urena-Amate M.D., Fernandez-Perez M., Garratt J., Wilkins R. (2000). Leaching and persistence of Imidacloprid and Diuron in a citrus crop in Valencia. **Fresen. Environ. Bull.** 9: 638-645.
- Goumenou M., Machera K. (2004). Mixture of Paraquat and Linuron formulations examined for genotoxicity in Wistar rats by the *in vivo* micronucleus test - evaluation by different statistical tests. **J. Environ. Sc. Health B39(1)**: 75-87.
- Grawé J., Zetteberg G., Amnéus H. (1992). Flow-cytometric enumeration of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. **Cytometry** 13: 750-758.
- Hamada S., Sutou S., Morita T., Wakata A., Asanami S., Hosoya S., Ozawa S., Kondo K., Nakajima M., Shimada H., Osawa K., Kondo Y., Asano N., Sato S-I., Tamura H., Yajima N., Marshall R., Moore C., Blakey D.H., Weaver J.L., Torus D.K., Proudlock R., Ito S., Namiki C., Hayashi M. (2001). Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day-treatment protocol: summary of the 13th collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS. **Environ. Mol. Mutagen.** 37: 93-110.
- Hamboeck H. (1977) Distribution, degradation and excretion of CGA 48988 in the rat. Unpublished report No. 18/77, dated 6 April 1977, from

- Ciba-Geigy Ltd, Basel, Switzerland. Submitted to WHO by Syngenta Crop Protection AG, Basel, Switzerland.
- Hamboeck H. (1978) Metabolism of CGA 48988 in the rat. Unpublished report No. 26/78, dated 12 May 1978, from Ciba-Geigy Ltd, Basel, Switzerland. Submitted to WHO by Syngenta Crop Protection AG, Basel, Switzerland.
- Hamboeck H. (1981) Sex dependency of CGA 48988 metabolism in rats. Unpublished report No. 33/81, dated 23 November 1981 from Ciba-Geigy Ltd, Basel, Switzerland. Submitted to WHO by Syngenta Crop Protection AG, Basel, Switzerland.
- Hanke W., Jurewicz J. (2004). The risk of adverse reproductive and developmental disorders due to occupational pesticide exposure: an overview of current epidemiological evidence. **Int. J. Occup. Med. Environ. Health** 17: 223-243.
- Harper S.B., Dertinger S.D., Bishop M.E., Lynch A.M., Lorenzo M., Saylor M., MacGregor J.T. (2007). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes III. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the beagle dog. **Toxicol. Sci.** 100: 406-414.
- Hashimoto K., Nakajima Y., Matsumura S., Chatani F. (2010). An *in vitro* micronucleus assay with size-classified micronucleus counting to discriminate aneugens from clastogens. **Toxicol. in vitro** 24(1): 208-216.
- Hatzi V.I., Terzoudi G.I., Paraskevopoulou C., Makropoulos V., Matthopoulos D.P., Pantelias G.E. (2006). The use of premature chromosome condensation to study in interphase cells the influence of environmental factors on human genetic material. **TheScientificWorldJOURNAL** 6:1174-1190.
- Hayashi M., MacGregor J.T., Gatehouse D.G., Adler I.D., Blakey D.H., Dertinger S.D., Krishna G., Morita T., Russo A., Sutou S. (2000). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring. **Environ. Mol. Mutagen.** 35: 234-252.
- Hayashi M., MacGregor J.T., Gatehouse D.G., Blakey D.H., Dertinger S.D., Abramsson-Zetterberg L., Krishna G., Morita T., Russo A., Asano N., Suzuki H., Ohyamal W., Gibson D. (2007). *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. **Mutat. Res.** 627: 10-30.

- Hayashi M., Sofuni T., Ishidate M.Jr. (1983). An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutat. Res.** 120: 241-247.
- Hayashi M., Tice R.R., MacGregor J.T., Anderson D., Blakey D.H., Kirsch-Volders M., Oleson F.B.Jr., Pacchierotti F., Romagna F., Shimada H., Sutou S., Vannier B. (1994). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutat. Res.** 312: 293-304.
- Heddle J.A. (1973). A rapid *in vivo* test for chromosome damage, **Mutat. Res.** 18(2): 187-190.
- Heddle J.A., Fenech M., Hayashi M., MacGregor J.T. (2011). Reflections on the development of micronucleus assays. **Mutagenesis.** 26(1): 3-10.
- Heddle J.A., Hite M., Kirkhart B., Mavournin K., MacGregor J.T., Newell G.W., Salamone M.F. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat. Res.** 123: 61-118.
- Hennig U.G., Rudd N.L., Hoar D.I. (1988). Kinetochore immunofluorescence in micronuclei: a rapid method for the *in situ* detection of aneuploidy and chromosome breakage in human fibroblasts. **Mutat. Res.** 203(6): 405-414.
- Högstedt B., Bratt I., Holmén A., Hagmar L., Skerfving S. (1988). Frequency and size distribution of micronuclei in lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin and pokeweed mitogen in workers exposed to piperazine. **Hereditas** 109: 139-142.
- Högstedt B. (1984). Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man. **Mutat. Res.** 130(1): 63-72.
- Holliday R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. **Genet. Res.** 5: 282-304.
- Hollstein M., McCann J., Angelosanto F.A., Nichols W.W. (1979). Short-term tests for carcinogens and mutagens. **Mutat. Res.** 65(3): 133-226.
- Hotchkiss C.E., Bishop M.E., Dertinger S.D., Slikker W. Jr, Moore M.M., MacGregor J.T. (2008). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes IV: an index of chromosomal damage in the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Toxicol. Sci.** 102: 352-358.
- Hovda L. R., Hooser S. B. (2002). Toxicology of newer pesticides for use in dogs and cats. **Vet. Clin. Small Anim.** 32: 455-467.

- Howard A., Pelc S.R. (1951). Synthesis of nucleoprotein in bean root cells. **Nature** 167: 599.
- Howell W.H. (1890-91). The life-history of the formed elements of the blood, especially the red blood corpuscles. **J. Morphol.**, New York 4: 57-116.
- Hrelia P., Maffei F., Fimognari C., Vigagni F., Cantelli-Forti G. (1996). Cytogenetic effects of Metalaxyl on human and animal chromosomes. **Mutat. Res.** 369: 81-86.
- Hrelia P., Maffei F., Vigagni F., Mesirca R., Paolini M., Pozzetti L., Cantelli-Forti G. (1995). Genetic and biochemical markers as predictors of carcinogenic effects of pesticides. **Pharmacol. Toxicol.** 76: 18.
- Huang N., Lin S., Chou C., Hung Y., Chung H., Huang S. (2006). Fatal ventricular fibrillation in a patient with acute Imidacloprid poisoning. **Am. J. Emerg. Med.** 24 (7): 883-885.
- HUMN: The International Collaborative Project on Micronucleus Frequency in Human Populations. (2010). Available online at: <http://ehs.sph.berkeley.edu/holland/humn/>
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. (2010) Available online at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/>
- Iarmarcovai G., Bonassi S., Botta A., Baan R.A., Orsière T. (2008). Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. **Mutat. Res.** 658: 215-233.
- INCHEM. (2002). Metalaxyl evaluations, Pesticide residues in food Sponsored jointly by FAO-WHO. Available online at: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmprmono/2002pr09.htm>
- Johnson R.T., Rao P.N. (1970). Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. **Nature** 226: 717-722.
- Joksić G., Vidaković A., Spasojević – Tišma V. (1997). Cytogenetic monitoring of pesticide sprayers. **Environ. Res.** 75: 113-118.
- Jolly J.M.J. (1905). Sur la formation des globules rouges des mammifères. **Comptes rendus de la Société de Biologie**, Paris 58: 528-531.
- Kaina B. (2004). Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go. **Cytogenet. Genome Res.** 2004: 77-86

- Karabay N.U., Oguz M.G., (2005). Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, Imidacloprid and Methamidophos. **Genet. Mol. Res.** 4: 653-662.
- Kato H. (1974). Possible role of DNA synthesis in formation of sister chromatid exchanges. **Nature** 252: 739-741.
- Kato H. (1977). Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BUdR-labeling method. **Int. Rev. Cytol.** 49: 55-97.
- Kato H. (1980). Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. **Cancer Genet. Cytogenet.** 2: 69-77.
- Kato H., Shimada H. (1975). Sister chromatid exchanges induced by mitomycin-C: a new method of detecting DNA damage at chromosomal level. **Mutat. Res.** 28: 459-464.
- Kellogg R.L., Nehring R., Grube A., Goss D.W., Plotkin S. (2000). Environmental indicators of pesticide leaching and runoff from farm fields. United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service. Available online at: <http://www.nrcs.usda.gov/>
- Kevekordes S., Gebel T., Pav K., Edenharder R., Dunkelberg H. (1996). Genotoxicity of selected pesticides in the bone marrow micronucleus test and in the sister-chromatid exchange test with human lymphocytes *in vitro* **Toxicol. Lett.** 89: 35-42.
- Kidd H., James D.R. (Eds.). The Agrochemicals Handbook, 3rd ed., Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK. (1991).
- Kirkland D.J., Hayashi M., Jacobson-Kram D., Kasper P., MacGregor J.T., Müller L., Unog. Y. (2007). Summary of major conclusions from the 4th IWGT, San Francisco, 9-10 September, 2005. **Mutat. Res.** 627: 5-9.
- Kirsch-Volders M. (1997a). (Ed.), The CB *in vitro* micronucleus assay in human lymphocytes. **Mutat. Res.** 392.
- Kirsch-Volders M. (1997b). Towards a validation of the micronucleus test. **Mutat. Res.** 392: 1-4.
- Kirsch-Volders M., Elhajouji A., Cundari E., Van Hummelen P. (1997). The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. **Mutat. Res.** 392: 19-30.
- Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate M.Jr, Lorge E., Norppa H., Surrallès J., von der Hude W., Wakata A. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. **Environ. Mol. Mutagen.** 35: 167-172.

- Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate Jr.M., Lorge E., Norppa H., Surrallès J., von der Hude W., Wakata A. (2003). Report from the *In vitro* Micronucleus Assay Working Group. **Mutat. Res.** 540: 153-163.
- Kligerman A.D., Chapin R.E., Erexson G.L., Germolec D.R., Kwanyuen P., Yang R.S.H. (1993). Analyses of cytogenetic damage in rodents following exposure to simulated groundwater contaminated with pesticides and a fertilizer. **Mutat. Res.** 300: 125-134.
- Kouloumenta A., Stephanou G., Demopoulos N.A., Nikolaropoulos S.S (2005). Genetic effects caused by potent antileukemic steroidal esters of chlorambucil's active metabolite. **Anticancer Drugs** 16: 67-75.
- Kourakis A., Mouratidou M., Barbouti A., Dimikiotou M. (1996). Cytogenetic effects of occupational exposure in the peripheral blood lymphocytes of pesticide sprayers. **Carcinogenesis** 17: 99-101.
- Krämer Alkalde T., do Carmo Ruaro Peralba M., Alcaraz Zini C., Bastos Caramão E. (2004). Modern extraction and preconcentration techniques such as headspace, solid phase extraction (SPE) and solid phase microextraction (SPME) followed by hyphenated analytical techniques such as gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **J. Chromatogr. A** 1027: 37-40.
- Lambert B., Lindblad A., Holmberg K., Francesconi D. (1982). The use of sister chromatid exchange to monitor human populations for exposure to toxicologically harmful agents. Chap.6: 149-182. In: Sister chromatid exchange. Ed Wolff S., Wiley J. & Sons, New York.
- Latt S.A. (1973). Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 70: 3395-3399.
- Latt S.A. (1974). Sister chromatid exchanges. Indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by Mitomycin-C. **Proc. Natl. Acad. Sci.USA** 71: 3162-3166.
- Lauria L., Settimi L., Spinelli A., Figà-Talamanca I. (2006). Exposure to pesticides and time to pregnancy among female greenhouse workers. **Reprod. Toxicol.** 22: 425-430.
- Lebailly P., Devaux A., Pottier D. et al. (2003). Urine mutagenicity and lymphocyte DNA damage in fruit growers occupationally exposed to the fungicide captan. **Occup. Environ. Med.** 60: 910-917.
- Littlefield L.G., Saver A.M., Frome E.L. (1989). Comparisons of dose-response parameters for radiation induced acentric fragments and

- micronuclei observed in cytokinesis-arrested lymphocytes. **Mutagenesis** 4: 265-270.
- Liu H.X., Song J., Zhang S., Qu L., Zhao Y., Wu Y., Liu H.M. (2005). Analysis of residues of Imidacloprid in tobacco by high- performance liquid chromatography with liquid-liquid partition cleanup. **Pest. Manag. Sci.** 61: 511-514.
- Liu M.Y., Casida J.E. (1993). High affinity binding of [3H]-imidacloprid in the insect acetylcholine receptor. **Pestic. Biochem. Physiol.** 46: 40-46.
- Liu W., Zheng W., Ma Y., Liu K. (2006). Sorption and Degradation of Imidacloprid in Soil and Water. **J. Environ. Sci. Health B** 41: 623-634.
- Lorge E., Thybaud V., Aardema M.J., Oliver J., Wakata A., Lorenzon G., Marzin D. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. **Mutat. Res.** 607: 13-36.
- Lovell D.P., Anderson D., Albanese R., Amphlett G.E., Clare G., Ferguson R., Richold M., Papworth D.G., Savage J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.
- Lucero L., Pastor S., Suarez S., Durban R., Gomez C., Parron T., Creus A., Marcos R. (2000). Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. **Mutat. Res.** 464: 255-262.
- Lynch A.M., Parry J.M. (1993). The cytochalasin-B micronucleus/kinetochore assay *in vitro* studies with 10 suspected aneugens. **Mutat. Res.** 287(1): 71-86.
- MacGregor J.T., Bishop M.E., McNamee J.P., Hayashi M., Asano N., Wakata A., Nakajima M., Saito J., Aidoo A., Moore M.M., Dertinger S.D. (2006). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat. **Toxicol. Sci.** 94(1): 92-107.
- MacGregor J.T., Heddle J.A., Margolin B.H., Salamone M.F., Tice R.R., Wild D. (1987). Guidelines for the conduct of micronucleus in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutat. Res.** 189: 103.
- MacGregor J.T., Wehr C.M., Henika P.R., Shelby M.E. (1990). The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State

- Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. **Fund. Appl. Toxicol.** 14: 513-522.
- MacGregor J.T., Wehr C.M., Langlois R.G. (1983). A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y. **Mutat. Res.** 120: 269-275.
- Maes A., Van Gorp U., Verschaeve L. (2006). Cytogenetic investigation of subjects professionally exposed to radiofrequency radiation. **Mutagenesis** 21(2): 139-142.
- Malik S.I., Terzoudi G.I., Pantelias G.E. (2004). SCE analysis in G2 lymphocyte prematurely condensed chromosomes after exposure to atrazine: the non-dose-dependent increase in homologous recombinational events does not support its genotoxic mode of action. **Cytogenet. Genome Res.** 104:315-319.
- Mange A.P., Mange J.E. (1990). Genetics: Human aspects, 2nd ed. Sinauer Associates Inc. Publs., Sunderland, Massachusetts, USA.
- Manini P., Andreoli R., Niessen W.M.A. (2004). Liquid chromatography-mass spectrometry in occupational toxicology: A novel approach to the study of biotransformation of industrial chemicals. **J. Chromatogr. A** 1058: 21-37.
- Mateuca R., Lombaert N., Aka P.V., Decordier I., Kirsch-Volders M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie** 88: 1515-1531.
- Mavournin K.H., Blakey D.H., Cimino M.C., Salamone M.F., Heddle J.A. (1990). The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat. Res.** 239: 29-80.
- McClintock B. (1938). The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of aberrant mitotic behavior of ring shaped chromosomes. **Genetics** 23: 315-376.
- Migliore L., Bocciardi R., Macri C., Lo Jacono F. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridisation with a centromeric probe. **Mutat. Res.** 319(3): 205-213.
- Miller B.M., Adler I.-D. (1990). Application of Antikinetochore Antibody Staining (CREST Staining) to Micronuclei in Erythrocytes Induced *In Vivo*. **Mutagenesis** 5: 411-415.
- Miller T. GJr. (2004). Περιβαλλοντικές Επιστήμες. Αθήνα: Εκδόσεις ΙΩΝ.

- Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B. (2004) (Eds.) Clarke' s Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals Body Fluids and Post – Mortem Material. **Pharmaceutical Press**, London, UK. Vol. 2: 1128–1129.
- Moore L.E., Titenko-Holland N., Quintana P.J., Smith M.T. (1993). Novel biomarkers of genetic damage in humans: use of fluorescence *in situ* hybridization to detect aneuploidy and micronuclei in exfoliated cells. **J. Toxicol. Environ. Health** 40: 349-357.
- Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J., Battips D.M., Hungerford D.A. (1960). Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell Res.** 20: 613-616.
- Morita T, MacGregor J.T., Hayashi M. (2011). Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow. **Mutagenesis.** 26(1): 223-230.
- Morita T., Asano N., Awogi T., Sasaki Y.F., Sato S., Shimada H., Sutou S., Suzuki T., Wakata A., Sofuni T., Hayashi M. (1997) Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Groups 1, 2A, and 2B). The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS_MMS. **Mutat. Res.** 389(1): 3–122.
- Moroi Y., Peebles C., Fritzler M.J., Steigerwald J, Tan E.M. (1980). Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 77: 1627-1631.
- Mukherjee I., Gopal M. (2000). Environmental behaviour and translocation of Imidacloprid in eggplant, cabbage, and mustard. **Pest. Manag. Sci.** 56: 932-936.
- Murgia E., Maggini V., Barale R., Rossi A.M. (2007). Micronuclei, genetic polymorphisms and cardiovascular disease mortality in a nested case-control in Italy. **Mutat. Res.** 621: 113-118.
- Murli H., Ivett J. (1986). Clastogenic evaluation of Metalaxyl technical, CGA-48988 Tech. In an *in vitro* cytogenetic assay measuring chromosomal aberration frequencies in Chinese hamster ovary CHO cells. Final report: Project No. 20990 1986, Unpubl. study by Hazleton Biotechnologies, submitted to OPP by Ciba-Geigy, MRID No. 00160038 reviewed in HED Doc. 005372.
- Naidu K.A. (1989). Inhibition of monoamine oxidase by the fungicide Metalaxyl. **J. Toxicol. Environ. Health** 27: 395–398.
- Naidu K.A., Radhakrishnamurty R. (1988). Metalaxyl-induced bradycardia in rats mediated by alpha-adrenoreceptors. **J. Toxicol. Environ. Health** 23: 495–498.

- Naidu K.A., Radhakrishnamurthy R. (1989). Effect of Metalaxyl on heart rate in rats: Role of alpha 1-adrenoreceptors. **J. Toxicol. Environ. Health** 26: 203–207.
- Natarajan A.T. (2002). Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutat. Res.** 504: 3–16.
- Natarajan A.T., Rotteveel A.H., van Pieterse J., Schliermann M.G. (1986). Influence of incorporated 5-bromodeoxyuridine on the frequencies of spontaneous and induced sister chromatid exchanges, detected by immunological methods. **Mutat. Res.** 163: 51–55.
- Neri M., Ceppi M., Knudsen L., Merlo D.F., Barale R., Puntoni R., Bonassi S. (2005). Baseline micronuclei frequency in children: estimates from meta- and pooled analyses. **Environ. Health Perspect.** 113: 1226–1229.
- NIOSH, National Institute for Occupational Safety and Health (2004). Worker Health Chartbook 2004, chapter 2: poisoning. Available online at: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2004-146/ch2/ch2-9.asp.htm>
- NIOSH, National Institute for Occupational Safety and Health (2010). SENSOR Pesticide Illness & Injury Surveillance Program. Available online at: www.cdc.gov/niosh/topics/pesticides/
- Norppa H., Falck G. (2003). What do human micronuclei contain? **Mutagenesis** 18(3): 221–233.
- Norppa H., Luomahaara S., Heikanen H., Roth S., Sorsa M., Renzi L., Lindholm C. (1993). Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens. **Environ. Health Perspect.** 101(3): 139–143.
- NPIC, Imidacloprid, technical fact sheet (April 2010). Available online at: <http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.pdf> (accessed November, 2010).
- OECD (1986). Genetic toxicology: *In vitro* Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells, Test Guideline No. 479, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris, France. Available online at: www.oecd.org/env/testguidelines
- OECD (1997). Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, Test Guideline No. 474, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris, France. Available online at: www.oecd.org/env/testguidelines
- OECD (2010). *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test, Test Guideline No. 487, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris, France. Available online at: www.oecd.org/env/testguidelines

- Offer T., Ho E., Traber M.G., Bruno R.S., Kuypers F.A., Ames B.N. (2005). A simple assay for frequency of chromosome breaks and loss (micronuclei) by flow cytometry of human reticulocytes. **FASEB. J.** 19: 485-487.
- Oliver J., Meunier J.-R., Awogi T., Elhajouji A., Ouldelhkim M.-C., Bichet N., Thybaud V., Lorenzon G., Marzin D., Lorge E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. **Mutat. Res.** 607: 125-152.
- Ostling O., Johanson K. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 123:291-298.
- Painter R.B. (1980). A replication model for sister-chromatid exchange. **Mutat. Res.** 70: 337-341.
- Pantelias G.E., Maillie H.D. (1983). A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol. **Somatic Cell Genet.** 9:533-547.
- Paolini M., Mesirca R., Pozzetti L., Sapone A., Cantelli-Forti G. (1996). Biomarkers of effect in evaluating Metalaxyl cocarcinogenesis. Selective induction of murine CYP 3A isoform. **Mutat. Res.** 361: 157-164.
- Papapoulou P., Vlastos D., Stephanou G., Demopoulos N.A. (2001). Linuron cytogenetic activity on human lymphocytes treated *in vitro*. Evaluation of clastogenic and aneugenic potential using cytokinesis block micronucleus assay in combination with fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Fresen. Environ. Bull.** 10: 431-437
- Pasquini R., Scassellati – Sforzolini G., Angeli G., Fatigoni C., Monarca S., Beneventi L., DiGiulio A.M., Baueleo F.A. (1996). Cytogenetic biomonitoring of pesticide-exposed farmers in central Italy **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.** 15(1): 29-39.
- Pastor S., Creus A., Xamena N., Siffel C., Marcos R. (2002a). Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: Results of a Hungarian population study using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. **Environ. Mol. Mutagen.** 40(2): 101-109.
- Pastor S., Gutiérrez S., Creus A., Xamena N., Piperakis S., Marcos R. (2001). Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. **Mutagenesis** 16: 539-545.
- Pastor S., Lucero L., Gutierrez S., Durban R., Gomez C., Parron T., Creus A., Marcos R. (2002b). A follow-up study on micronucleus frequency

- in Spanish agricultural workers exposed to pesticides. **Mutagenesis** 17(1): 79-82.
- Perocco P., Colacci A., Bonora B., Grilli S. (1995). *In vitro* transforming effect of the fungicides Metalaxyl and Zineb. **Teratogen. Carcinogen. Mutagen.** 15: 73-80.
- Perry P., Evans H.J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. **Nature** 258: 121-125.
- Perry P., Wolff S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. **Nature.** 251: 156-158.
- Pesticide Action Network (2005a) Pesticide Database: Acute toxicity. (Last updated: April 2005). Available online at: http://www.pesticideinfo.org/Docs/ref_toxicity2.html
- Pesticide Action Network (2005b) Pesticide Database: Carcinogenicity. (Last updated: April 2005). Available online at: http://www.pesticideinfo.org/Docs/ref_toxicity3.html
- Pesticide Action Network (2005c) Pesticide Database: Chemical classification. (Last updated: April 2005). Available online at: http://www.pesticideinfo.org/Docs/ref_general3.html
- Pesticide Action Network (2005d) Pesticide Ecotoxicity. (Last updated: April 2005). Available online at: http://www.pesticideinfo.org/Search_Ecotoxicity.jsp
- Petrozzi L., Lucetti C., Scarpato R., Gambaccini G., Trippi F., Bernardini S., Del Dotto P., Migliore L., Bonuccelli U. (2002). Cytogenetic alterations in lymphocytes of Alzheimer's disease and Parkinson's disease patients. **Neurol. Sci.** 23(Suppl.2): S97-S98.
- Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis.** 15(4): 289-302.
- Pinkel D., Straume T., Gray J.W. (1986). Cytogenetic Analysis Using Quantitative, High-Sensitivity Fluorescence Hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83: 2934-2938.
- Pinkel D., Thompson L.H., Gray J.W., Vanderlaan M. (1985). Measurement of sister chromatid exchanges at very low bromodeoxyuridine substitution levels using a monoclonal antibody in Chinese hamster ovary cells. **Cancer Res.** 45: 5795-5798.
- Piperakis S.M. (2009). Comet assay: A brief history. **Cell Biol. Toxicol.** 25:1-3.

- Piperakis S.M., Kontogianni K., Karanastasi G., Iakovidou-Kritsi Z., Cebulska-Wasilewska A., Piperakis M.M. (2009). Investigation of the genotoxic effect of pesticides on greenhouse workers' lymphocytes. **Environ. Mol. Mutagen.** 50:121-126.
- Piperakis S.M., Petrakou E., Tsilimigaki S., Sagnou M., Monogiudis E., Haniotakis G., Karkaseli H., Sarikaki E. (2003). Biomonitoring with the comet assay of Greek greenhouse workers exposed to pesticides. **Environ. Mol. Mutagen.** 41: 104-110.
- Pommier Y., Zwelling L.A., Kao-Shan C.-S., Whang-Peng J., O.Bradley M. (1985). Correlations between intercalator-induced DNA strand breaks and sister chromatid exchanges, mutats, and cytotoxicity in chinese hamster cells. **Cancer Res.** 45: 3143-3149.
- Preston R.J., San Sebastian J.R., Mc Fee A.F. (1987). The *in vitro* human lymphocyte assay for assessing clastogenicity of chemical agents. **Mutat. Res.** 189: 175-183.
- Proença P., Teixeira H., Castanheira F., Pinheiro J., Monsanto P. V., Marques E. P., Vieira D. N. (2005). Two fatal intoxication cases with imidacloprid: LC/MS analysis. **Forensic Sci. Int.** 153(1): 75-80.
- Racke K.D., Skidmore M.W., Hamilton D.J., Unsworth J.B., Miyamoto J., Cohen S.Z. (1997). Pesticide fate in tropical soils: technical report. **Pure Appl. Chem.** 69: 1349-1371.
- Ramalho A., Sunjevaric I., Natarajan A.T. (1988). Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: comparison of two methods. **Mutat. Res.** 207: 141-146.
- Richold M., Ashby J., Bootman J., Chandley A., Gatehouse D.G., Henderson L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J.Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- Ritter SR. (2009). Pinpointing Trends In Pesticide Use In 1939. **Chemical & Engineering News**. Vol.87(07). Available online at: <http://pubs.acs.org/cen/coverstory/87/8707cover1a.html>
- Rodríguez-Reyes R., Morales-Ramírez P. (2003). Sister chromatid exchange induction and the course of DNA duplication, two mechanisms of sister chromatid exchange induction by ENU and the role of BrdU. **Mutagenesis** 18(1):.65-72.
- Romagna F., Staniforth C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. **Mutat. Res.** 213: 91-104.

- Rothfels K.H., Siminovitch L. (1958). An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown *in vitro*. **Stain tech.** 33: 73-77.
- Sabatini L., Barbieri A., Indiveri P., Mattioli S., Saverio Violante F. (2008). Validation of an HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of phenylmercapturic acid, benzylmercapturic acid and o-methylbenzyl mercapturic acid in urine as biomarkers of exposure to benzene, toluene and xylenes. **J. Chromatogr. B** 863: 115-122.
- Sander J., Buerkle G. (1971). Induction of malignant tumors in rats by oral administration of 2-imidazolidinone and nitrite. **Z. Krebsforsch** 75(4): 301-304. (Abstract.)
- Santibáñez M., Bolumar F., García A.M. (2007). Occupational risk factors in Alzheimer's disease: a review assessing the quality of published epidemiological studies. **Occup. Environ. Med.** 64: 723-732.
- Sarkar M.A., Roy S., Chowdhury A. (2001). Persistence and metabolism of Imidacloprid in different soils of west Bengal. **Pest. Manag. Sci.** 57: 598-602.
- Schmid W. (1973). Chemical mutagen testing on *in vivo* somatic mammalian cells. **Agents actions** 3(2): 77-85.
- Schmid W. (1975). The micronucleus test. **Mutat. Res.** 31: 9-15.
- Schulz-Jander D. A., Casida J. E. (2002). Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. **Toxicol. Lett.** 132: 65-70.
- Shah R. G., Lagueux J., Kapur S., Levallois P., Ayotte P., Tremblay M., Zee J., Poirier G. G. (1997). Determination of genotoxicity of the metabolites of the pesticides Guthion, Sencor, Lorox, Reglone, Daconil and Admire by P-32-postlabeling. **Mol. Cell Biochem.** 169 (1-2): 177-184.
- Shaw I.C., Chadwick J. (1998). Principles of Environmental Toxicology. London: Taylor and Francis Ltd.
- Sheets L.P. (2002). The Neonicotinoid Insecticides. Handbook of Neurotoxicology; Massaro E.J., Ed.; Humana Press: Totowa NJ, Vol. 1, Chapter 6, pp 79-87.
- Skoutelis C.G., Vlastos D., Kortsinidou M.C., Theodoridis Y.T., Papadaki M.I. (2011). Induction of micronuclei by 2-hydroxypyridine in water and elimination of solution genotoxicity by UVC (254 nm) photolysis. **J. Hazard. Mater.** (in press).

- Sonoda E., Sasaki M.S., Morrison C., Yamaguchi-Iwai Y., Takata M., Takeda S. (1999). Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. **Mol. Cell Biol.** 19: 5166–5169.
- Stapleton R.D., Vlastos D., Skoutelis C.G., Papadaki M. (2008). Photolytic and photocatalytic diminution and preliminary genotoxicity studies of 2-chloropyridine. **J. Adv. Oxid. Technol.** 11: 486–500.
- Stephanou G., Andrianopoulos C., Tyrakis M., Konti M., Demopoulos N.A., Tsambaos D. (2004). *In vitro* antigenotoxic potential of acitretin in human lymphocytes treated with the antineoplastic alkylating agent ASE (NSC-71964). **Toxicol. in Vitro** 18: 609-616.
- Stephanou G., Andrianopoulos C., Vlastos D., Demopoulos N.A., Russo A. (1997). Induction of micronuclei and sister chromatide exchange in mouse splenocytes after exposure to the butadiene metabolite 3,4-epoxy-1-butene. **Mutagenesis** 12(6): 425-429.
- Stephanou G., Vlastos D., Vlachodimitropoulos D., Demopoulos N.A. (1996). A comparative study on the effect of MNU on human lymphocyte cultures *in vitro* evaluated by O⁶-mdG formation, micronuclei and Sister chromatid exchanges induction. **Cancer Lett.** 109: 109-114.
- Stivaktakis P., Vlastos D., Giannakopoulos E., Matthopoulos D.P. (2010). Differential Micronuclei Induction in Human Lymphocyte Cultures by Imidacloprid in the Presence of Potassium Nitrate. **TheScientificWorldJOURNAL** 10: 80–89.
- Streffer C., Müller W.U., Kryscio A., Böcker W. (1998). Micronuclei-biological indicator for retrospective dosimetry after exposure to ionizing radiation. **Mutat. Res.** 404: 101-105.
- Suchail S., Guez D., Belzunces L.P. (2001). Discrepancy between Acute and Chronic Toxicity Induced by Imidacloprid and its Metabolites in *Apis mellifera*. **Environ. Toxicol. Chem.** 20 (11): 2482-2486.
- Surallès J., Antoccia A., Creus A., Degrassi F., Peris F., Tanzarella C., Xamena N., Marcos R. (1994). The effect of cytochalasin-B concentration on the frequency of micronuclei induced by four standard mutagens. Results from two laboratories. **Mutagenesis** 9: 347-353.
- Surallès J., Carbonell E., Marcos R., Degrassi F., Antoccia A., Tanzarella C. (1992). A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. **Mutagenesis** 7: 407-410.

- Surallès J., Falck G., Norppa H. (1996). *In vivo* cytogenetic damage revealed by FISH analysis of micronuclei in uncultured human T lymphocytes. **Cytogenet. Cell Genet.** 75: 151-154.
- Surallès J., Xamena N., Creus A., Catalan J., Norppa H., Marcos R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. **Mutat. Res.** 341: 169-184.
- Surallès J., Autio K., Nylund L., Järventaus H., Norppa H., Veidebaum T., Sorsa M., Peltonen K. (1997). Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene exposed workers. **Carcinogenesis** 18: 817-823.
- Sutou S. (1996). Achievements by CSGMT/JEMS-MMS: The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test in the Mammalian Mutagenicity Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan. **Mutat. Res.** 340: 151-174.
- Takehisa S. (1982). Induction of sister chromatid exchanges by chemical agents. Chap.5: 87-147. In: Sister chromatid exchange. Ed Wolff S., Wiley J. & Sons, New York.
- Tates A.D., Grummt T., Tornqvist M., Farmer P.B., van Dam F.J., van Mossel H., Schoemaker H.M., Osterman-Golkar S., Uebel C., Tang Y.S., Zwinderman A.H., Natarajan A.T., Ehrenberg L. (1991). Biological and chemical monitoring of occupational exposure to ethylene oxide. **Mutat. Res.** 250: 483-497.
- Taylor J.H. (1958). Sister chromatid exchanges in tritium labelled chromosomes. **Genetics** 43: 515-529.
- Testa A., Cordelli E., Stronati L., Marino C., Lovisolo G.A., Fresegna A.M., Conti D., Villani P.(2004). Evaluation of genotoxic effect of low level 50 Hz magnetic fields on human blood cells using different cytogenetic assays. **Bioelectromagnetics** 25: 613-619.
- Thomas P., Umegaki K., Fenech M. (2003). Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutagenesis** 18(2): 187-194.
- Thomas P., Wu J., Dhillon V.S., Fenech M. (2011). Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. (Review) **Mutagenesis** 26(1): 69-76.
- Thompson C.M., Sonawane B., Barton H.A., DeWoskin R.S., Lipscomb J.C., Schlosser P., Chiu W.A., Krishnan K. (2008). Approaches for applications of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment. **J. Toxicol. Environ. Health B** 11: 519-547.

- Thomson E.J., Perry P.E. (1988). The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploidy. **Mutagenesis** 3(5): 415-418.
- Tice R., Schneider E., Parry J. (1976). The utilization of bromodeoxyuridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics. **Exp. Cell Res.** 102: 232-236.
- Titenko-Holland N., Windham G., Kolachana P., Reinisch F., Parvatham S., Osorio A.M., Smith M.T. (1997). Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. **Mutat. Res.** 388: 85-95.
- Tometsko A.M., Torous D.K., Dertinger S.D. (1993). Analysis of micronucleated cells by flow cytometry. Achieving high resolution with a malaria model. **Mutat. Res.** 292: 129-135.
- Tomizawa M., Casida J.E. (1999). Minor structural changes in nicotinoid insecticides confer differential subtype selectivity for mammalian nicotinic acetylcholine receptors. **Br. J. Pharmacol.** 127: 115-122.
- Tomizawa M., Casida J.E. (2000). Imidacloprid, thiacloprid, and their imine derivatives up-regulate the alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptor in M10 cells. **Toxicol. Appl. Pharm.** 169: 114-120.
- Tomizawa M., Yamamoto I. (1993). Structure-activity relationships of nicotinoids and imidacloprid analogs. **J. Pestic. Sci.** 18: 91-98.
- Tomlin C. D. S. (2006). The Pesticide Manual, A World Compendium, 14th ed.; British Crop Protection Council: Surry, England, pp 598-599.
- Torous D.K., Dertinger S.D., Hall N.E., Tometsko C.R. (2000). Enumeration of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood: a flow cytometric study. **Mutat. Res.** 465: 91-99.
- Triantafyllidis V., Hela D., Dimopoulos P., Albanis T. (2006). Imidacloprid losses in surface runoff from plots cultivated with tobacco. **Intern. J. Environ. Anal. Chem.** 86 (3-4): 185-194.
- Tucker J.D., Auletta A., Cimino M.C., Dearfield K.L., Jacobson-Kram D., Tice R.R., Carrano A.V. (1993). Sister chromatid exchange: second report of the Gene-Tox program. **Mutat. Res.** 297: 101-180.
- Tucker J.D., Preston R.J., (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. **Mutat. Res.** 365: 147-159.
- UC IPM Online. (2006). What's up, Doc? Maybe less air pollution. Statewide IPM Program, Agriculture and Natural Resources, University of

- California. Available online at:
<http://www.ipm.ucdavis.edu/NEWS/carrot-news.htm>
- US Environmental Protection Agency (US EPA). (1998). Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5395 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (Available online at:
http://www.epa.gov/ocspp/pubs/frs/publications/Test_Guidelines/series870.htm).
- US Food and Drug Administration/Center for Food Safety and Applied Nutrition (US FDA/CFSAN). (2000). Redbook. IV.C.1.d. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. (Available online at:
<<http://vm.cfsan.fda.gov/~redbook/redivc1d.html>>).
- Valverde M., Rojas E. (2009). Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutat. Res.** 681(SI):93-109.
- Van Hummelen P., Kirsch-Volders M. (1990). An improved method for the *in vitro* micronucleus test using human lymphocytes. **Mutagenesis** 5: 203-204.
- Vanderkerken K., Vanparys Ph., Verschaeve L., Kirsch-Volders M. (1989). The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. **Mutagenesis** 4(1): 6-11.
- Verschaeve L., Vanderkerken K., Kirsch-Volders M. (1988). C-banding as a Simple Tool to Discriminate between Micronuclei Induced by Clastogens and Aneugens. **Stain Technol.** 63: 351-354.
- Villarini M., Moretti M., Pasquini R., Scassellati-Sforzolini G., Fatigoni C., Marcarelli M., Monarca S., Rodriguez A.V. (1998). *In vitro* genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage ('comet' assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. **Toxicology** 130: 129-139.
- Vlastos D., Moshou H., Epeoglou K. (2010a). Evaluation of genotoxic effects of semicarbazide on cultured human lymphocytes and rat bone marrow. **Food Chem. Toxicol.** 48: 209-214.
- Vlastos D., Skoutelis C.G., Theodoridis I.T., Stapleton D.R., Papadaki M.I. (2010b). Genotoxicity study of photolytically treated 2-chloropyridine aqueous solutions. **J. Hazard. Mater.** 177: 892-898.
- Vlastos D., Stephanou G. (1998). Effects of cetirizine dihydrochloride on human lymphocytes *in vitro*: micronucleus induction. Evaluation of clastogenic and aneugenic potential using CREST and FISH assays. **Arch. Dermatol. Res.** 290: 312-318.

- Vlastos D., Stephanou G., Demopoulos N.A. (1998). Effects of cetirizine dihydrochloride on human lymphocytes *in vitro*: Evaluation of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.** 11: 104-110.
- Vlastos D., Stivaktakis P., Matthopoulos D.P. (2006) Pesticide exposure and genotoxicity correlations within a Greek farmers' group. **Intern J Environ. Anal. Chem.** 86: 215-223.
- vLex United States (2011). Code of Federal Regulations- Title 40: Protection of Environment. 40 CFR 79.64- *In vivo* micronucleus assay. Available online at: <http://cfr.vlex.com/vid/79-64-vivo-micronucleus-assay-19802350>.
- Wakata A., Matsuoka A., Yamakage K., Yoshida J., Kubo K., Kobayashi K., Senjyu N., Itoh S., Miyajima H., Hamada S., Nishida S., Araki H., Yamamura E., Matsui A., Thybaud V., Lorenzon G., Marzin D., Lorge E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. **Mutat. Res.** 607: 88-124.
- Wakata A., Miyamae Y., Sato S-I., Suzuki T., Morita T., Asano N., Awogi T., Kondo K., Hayashi M. (1998). Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS. **Environ. Mol. Mutagen.** 32: 84-100.
- Waters L.S., Minesinger B.K., Wiltout M.E., D'Souza S., Woodruff R.V., Walker G.C. (2009). Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. **Microb. Mol. Biol. Rev.** 73(1): 134-154.
- Waters M.D., Sandhy S.S., Simmon V.F., Mortelmans K.E., Mitchell A.D., Jorgenson T.A., Jones D.C.L., Valencia R., Garrett N.E. (1982). Study of pesticide genotoxicity, in: R. Fleckand A. Hollaender (Eds.), Genetic Toxicology - An Agricultural Perspective, Plenum, New York, pp. 275-326.
- Watt J.L., Stephen G.S. (1986). Lymphocyte culture for chromosome analysis. In: Rooney D.E. and Czepulkowski B.H. (eds) Human Cytogenetics. A practical approach. Oxford, IRL Press, pp: 39-55.
- Wauchope R.D., Buttler T.M., Hornsby A.G., Augustijn Beckers P.W., Burt J.P. (1992) The SCS/ARS/CES Pesticide properties database for environmental decision-making. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** 123: 1-155.
- West T.F., Campbell G.A. (1946). DDT: the synthetic insecticide. London: Chapman & Hall.

- Westwood F., Bean K.M., Dewar A.M., Bromilow R.H., Chamberlain K. (1998). Movement and Persistence of Imidacloprid in Sugar-Beet Plants Following Application to Pelleted Sugar-Beet Seed. **Pestic. Sci.** 52: 97-103.
- WHO. (2004). Toxicological Evaluations: Imidacloprid; International Programme on Chemical Safety, World Health Organization. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmprmono/2001pr07.htm> (accessed Oct 2008), updated **Fresen. Environ. Bull.** 2004.
- Wilson D.M., Thompson L.H. (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. **Mutat. Res.** 616: 11-23.
- Wisner T. (2004). Novel Insecticides. Clinical Veterinary Toxicology; Plumlee K. H., Ed.; Mosby: St. Louis MO. pp 184-185.
- Wojcik A., Bruckmann E., Obe G. (2004). Insights into the mechanism of sister chromatid exchange formation. **Cytogenet. Genome Res.** 104: 304-309.
- Wolff S., Bodycote J., Painter R.B. (1974). Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by U.V. irradiation at different stages of cell cycle: the necessity for cell to pass through S. **Mutat. Res.** 25: 73-81.
- Yamamoto K.I., Kikuchi Y. (1980). A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. **Mutat. Res.** 71: 127-131.
- Zang Y., Zhong Y., Luo Y., Kong Z.M. (2000). Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. **Environ. Pollut.** 108(2): 271-278.
- Zeljezic D., Garaj-Vrhovac V. (2002). Sister chromatid exchange and proliferative rate index in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. **Chemosphere** 46: 295-303.
- Βλαστός Δ. (1997). Γενετικές επιδράσεις της διυδροχλωρικής σετιριζίνης (Cetirizine dihydrochloride) σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vitro*. Διδακτορική διατριβή.
- Βλαστός Δ., Μόσχου Χ., Χελά Δ. (2008). Μελέτη των γενετικών επιδράσεων της επαγγελματικής έκθεσης αγροτών σε συνδυασμό φυτοφαρμάκων. Πρακτικά 3^{ου} Περιβαλλοντικού Συνεδρίου Μακεδονίας (Εκδότης: Νικολάου Κ.), 14-17 Μαρτίου 2008, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.
- Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. (2009). Available online at: <http://www.minagric.gr/syspest> (accessed: November 2009).



ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Επώνυμο : Ντέμσια
Όνομα : Γεωργία
Ον. Πατρός : Αλέξανδρος
Ημερ. Γέννησης : 06/03/1974
Τόπος γέννησης : Αγρίνιο Αιτωλοακαρνανίας
Οικογ. Κατάσταση: Έγγαμη – 2 παιδιά
Διεύθυνση : Αθ.Διάκου 17, 26500 Παραλία Πατρών
Τηλέφωνο : 2610524706 & 6945 950684
e-mail: gntemsia@cc.uoi.gr

- Εκπαίδευση :**
- 1997-1999: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (Master of Science) με θέμα : «Βιοτεχνολογία Τροφίμων».
Συνδιοργανωτές : Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Πατρών, Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, School of Applied Biological and Chemical Sciences/ University of Ulster/ UK.
 - 1992-1997: Πτυχίο Βιολόγου από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Πατρών.
Βαθμός πτυχίου : 6.8 (Λίαν Καλώς)
 - 1985-1991: 1^ο Γυμνάσιο Αγρινίου & 1^ο Λύκειο Αγρινίου
Απολυτήριο: 19& 2/11
 - 1979-1985: Δημοτικό σχολείο Ecole Azoulay, Marseille, France.
- Επαγγελματική εμπειρία :**
- 01/09/2005 – σήμερα: καθηγήτρια Β' /θμιας εκπαίδευσης ΠΕ04
 - 01/10/99 – 31/08/2005: Υπεύθυνη οργάνωσης και διαχείρισης του εργαστηρίου Βιολογίας στο Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Παν/μίου Ιωαννίνων. (συμβασιούχος ΕΠΕΑΕΚ)
 - 3/1999-7/1999: Συνεργασία με την εταιρεία SERGROUP O.B.E.E./ Εμπορική-Εισαγωγική-Συμβουλευτική στο Αγρίνιο. Εξάσκηση σε θέματα χειρισμού Η/Υ, Ευρωπαϊκών Κοινοτικών Προγραμμάτων, οικονομικά, λογιστικά, πληροφοριακά, management & marketing.
- Διδακτική εμπειρία:**
- 01/09/2005 – σήμερα: καθηγήτρια Βιολογίας σε τάξεις Γυμνασίου και Λυκείου
 - 01/10/99 – 31/08/2005: Εργαστηριακός συνεργάτης στις φοιτητικές εργαστηριακές ασκήσεις Ζωολογίας, Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, Γενετικής, Περιβαλλοντικής Μεταλλαξιγένεσης, Μικροβιολογίας, Βοτανικής και Εντομολογίας του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και

Φυσικών Πόρων του Παν/μίου Ιωαννίνων.

- 1/09/00- 30/06/03: Ωρομίσθια καθηγήτρια βιολόγος στο ιδιωτικό λύκειο «Εκπαιδευτήρια Τσαπακίδη»
- 10/99–6/2000 & 10/2002-6/2003: Εργαστηριακός συνεργάτης για το μάθημα “Βοτανική” & “Εφαρμοσμένη Φυσιολογία Φυτών” στο Τμήμα Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών και Ανθοκομίας του ΤΕΙ Μεσολογγίου.
- 04/10/99-14/02/00: Ωρομίσθιος εκπαιδευτικός στο δημόσιο ΙΕΚ Αγρινίου στο μάθημα «Χρήση Η/Υ» της ειδικότητας «Ειδικός Φοροτεχνικού γραφείου», για 1 διδακτικό εξάμηνο.
- 8/10/98-24/06/99: Ωρομίσθιος εκπαιδευτικός στο 1^ο δημόσιο ΙΕΚ Πάτρας στο μάθημα «Τεχνολογία Τροφίμων και Ποτών» (εργαστήριο) της ειδικότητας «Τεχνικός Βιολογικής και Οικολογικής Γεωργίας», για 2 διδακτικά εξάμηνα.
- 23/02/99-16/06/99: Ωρομίσθιος εκπαιδευτικός στο 2^ο δημόσιο ΙΕΚ Πάτρας στο μάθημα «Μπαρ-Οινολογία» (εργαστήριο) της ειδικότητας «Ειδικός Ξενοδοχειακών Υπηρεσιών και Τροφοδοσίας», για 1 διδακτικό εξάμηνο.
- 1996-1997: Καθηγήτρια γαλλικών σε φροντιστήριο ξένων γλωσσών.

Ερευνητική δραστηριότητα :

- 01/12/2001- 30/11/2002: Συμμετοχή σε ερευνητικό πρόγραμμα της επιτροπής ερευνών του Παν/μίου Ιωαννίνων (Κ.Α. 1227) με τίτλο: Κυτταρογενετική Δράση Φυτοφαρμάκων στον Αγροτικό Πληθυσμό του Νομού Αιτωλ/νίας
- 1998-1999: Εκπόνηση ερευνητικής διατριβής στο Εργαστήριο Τεχνολογίας Τροφίμων, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών, και στο Εργαστήριο Ανάλυσης Τροφίμων, του Τμήματος Γεωργικών Βιομηχανιών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, με θέμα : “ Ζύμωση μύρας χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένα κύτταρα σε απολιγνοποιημένα υποστρώματα κελουλόζης. Ανάλυση των αρωματικών συστατικών με GC-MS”.

Συμμετοχή σε συνέδρια:

- 26-29/09/2002: 2^ο Ευρωπαϊκό Συνέδριο με θέμα: «Φυτοφάρμακα και Συναφείς Οργανικές Ενώσεις στο Περιβάλλον», Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- 07-10/10/2004: 3^ο Ευρωπαϊκό Συνέδριο με θέμα: «Φυτοφάρμακα και Συναφείς Οργανικές Ενώσεις στο Περιβάλλον», Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Ξένες γλώσσες :

- Γαλλικά : Άριστα /Απόκτηση του “Diplôme Supérieur d’ Etudes Françaises” (Sorbonne III) με βαθμό “assez bien” από το Institut Français d’ Athènes (Μάιος 1992).

- Αγγλικά : Άριστα / Απόκτηση του “Certificate of Proficiency in English”, University of Cambridge, με βαθμό “grade C” (Ιούνιος 1993).
- Ιταλικά : Αρκετά καλά / Απόκτηση του “Superiore” (Μάιος 2000)
- Ισπανικά: Αρκετά καλά/ Απόκτηση του “Certificado Inicial de Español” (Αύγουστος 2004)

Άλλες γνώσεις : Χειρισμός Η/Υ σε περιβάλλον Windows (WORD, EXCEL, POWERPOINT, INTERNET EXPLORER & OUTLOOK EXPRESS).

Μέλος οργανώσεων: Μέλος Πανελλήνιας Ένωσης Βιολόγων

Πρωτότυπες ερευνητικές εργασίες δημοσιευμένες σε διεθνή περιοδικά με σύστημα κριτών

- Vlastos D., **G. Demsia**, D. Matthopoulos. (2004)

“Evaluation of Genetic Damage in Tobacco Growing Farmers Occupationally Exposed to a Mixture of Metalaxyl and Imidacloprid ”

International Journal of Environmental Analytical Chemistry, vol.84, No.1-3, p.183-191

- **Demsia G.**, D Vlastos, M. Goumenou, D. Matthopoulos. (2007)

“Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow.”

Mutation Research, vol. 634, p.32–39

- **Demsia G.**, D Vlastos, D. Matthopoulos. (2004)

“Effect of 910 MHz electromagnetic field on rat bone marrow”

TheScientificWorldJOURNAL, vol.4(S2), p.48-54

Ανακοινώσεις δημοσιευμένες σε πρακτικά διεθνών συνεδρίων με κριτές

- Vlastos D., **G. Demsia**, D. Matthopoulos. (2002)

“Pesticide effects on farmers. Evaluation of genetic damage in tobacco culture farmers”

2nd European Conference on Pesticides and Related Organic Micro pollutants in the Environment, 26-29 September, Corfu, Greece.

Proceedings of the 2nd European Conference on Pesticides and Related Organic Micro pollutants in the Environment, p.391, Corfu, Greece.

- Vlastos D., **G. Demsia**, D. Matthopoulos. (2004)

“Potent Genotoxic Effects of Metalaxyl and Imidacloprid in Human Lymphocytes Using the Micronucleus Assay *in vitro*”

3^d European Conference on Pesticides and Related Organic Micro pollutants in the Environment, 7-10 October, Halkidiki, Greece.

Proceedings of the 3^d European Conference on Pesticides and Related Organic Micro pollutants in the Environment, p.417, Halkidiki , Greece.