



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ & ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
& ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ



ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ
ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΤΗΝ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΗ
ΤΟΥΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υποβληθείσα στο
Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων
του
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Υπό

ΠΟΛΥΧΡΟΝΗ Δ. ΣΤΙΒΑΚΤΑΚΗ



Για την απόκτηση του Τίτλου του
Διδάκτορα του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΑΓΡΙΝΙΟ 2008



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000304404



ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΤΗΝ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΗ ΤΟΥΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

Υπό

ΠΟΛΥΧΡΟΝΗ Δ. ΣΤΙΒΑΚΤΑΚΗ

Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Βιολογίας
Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων
Σχολή Διαχείρισης Φυσικών Πόρων & Επιχειρήσεων
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Ματθόπουλος Δημήτρης

Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ματθόπουλος Δημήτρης

Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μπούρτζης Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Δεληγιαννάκης Ιωάννης

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Βλαστός Δημήτρης

Λέκτορας, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ματθόπουλος Δημήτρης	Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Αλαχιώτης Σταμάτης	Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών
Βαμβακόπουλος Νικόλαος	Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Αλμπάνης Τριαντάφυλλος	Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Μπούρτζης Κωνσταντίνος	Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Δεληγιαννάκης Ιωάννης	Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Σύρρου Μαρίκα	Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



Στους αγαπημένους μου γονείς
Καίτη και Δημοσθένη



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Εφαρμοσμένης Βιολογίας του τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του κ. Δ. Ματθόπουλο Καθηγητή του τμήματος ΔΠΦΠ.

Δεν είναι τυχαία η επιλογή του θέματος της διατριβής μου. Κατάγομαι από αγροτική περιοχή του νομού Ηρακλείου, με ενδιαφέρουν λοιπόν θέματα που άπτονται της σωστής καλλιέργειας/εκμετάλλευσης της γης. Η επιβάρυνση του περιβάλλοντος από όλους μας υπήρξε ένα ακόμη κίνητρο για την επιλογή του συγκεκριμένου θέματος. Πεποίθησή μου ότι η σωστή, προσεκτική, εμπεριστατωμένη γνώση/ενημέρωση βοηθά στην αποφυγή ακροτήτων και καταστροφών. Η συνετή και προσεκτική χρήση φυτοφαρμάκων με την καθοδήγηση έμπειρων γεωπόνων θα συμβάλλει οπωσδήποτε στη μεγαλύτερη παραγωγή και στο περιορισμό της ρύπανσης και υπερεκμετάλλευσης του περιβάλλοντος.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δ. Ματθόπουλο Καθηγητή του τμήματος ΔΠΦΠ για την ενθάρρυνση, συμπαράσταση, καθοδήγηση καθ'όλη τη διάρκεια της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Δ. Βλαστό Λέκτορα του τμήματος ΔΠΦΠ, τον κ. Ι. Δεληγιαννάκη Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος ΔΠΦΠ και τον κ. Κ.Μπούρτζη Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος ΔΠΦΠ, που με την επιστημονική τους κατάρτιση βοήθησαν ουσιαστικά στην εκπόνηση της παρούσης μελέτης.

Θερμά ευχαριστώ τους δότες του πειραματικού υλικού της εργασίας, οι οποίοι προσέφεραν ευγενικά αίμα.

Ο Δρ. Χημικός Ε. Γιαννακόπουλο στάθηκε πολύτιμος συνεργάτης στη διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της διατριβής και του οφείλω θερμές ευχαριστίες.



Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την συνάδελφο και φίλη Μ. Κωστελλέτου για την τεχνική υποστήριξη που μου παρείχε κατά την συγγραφή της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ την Διεύθυνση Γεωργίας και τους τοπικούς φορείς του νομού Ηρακλείου για τις πολύτιμες πληροφορίες που μου έδωσαν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το Διοικητικό, Εργαστηριακό και Τεχνικό προσωπικό της σχολής για κάθε είδους βοήθεια που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησης μου στο τμήμα.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
A ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1 ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	8
1.1 ENTOMOKTONA	8
1.1.1 ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΑ ENTOMOKTONA	8
1.1.2 ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ENTOMOKTONA	10
1.1.3 ΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ ENTOMOKTONA	11
1.2 ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ	12
1.2.1 ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ ΤΡΙΑΖΙΝΗΣ	12
1.2.2 ΑΛΛΑ ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ	13
1.2.3 ΦΑΙΝΟΞΥ- ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ	13
1.3 ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ	14
1.4 ΣΤΟΧΟΙ	14
1.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	16
1.5.1 METHIDATHION	16
1.5.2 IMIDACLOPRID	18
2 ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	20
3 ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ	23
3.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ	23
3.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΧΑΛΑΣΙΝΗΣ – Β (CBMN)	29
3.3 ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ	33
3.4 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΔΙΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	34
3.5 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ	36
3.6 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ	37
3.7 ΔΕΙΚΤΗΣ ΔΙΠΛΑΣΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	40
4 ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΕΤΡΙΑ	43
4.1 ΒΟΛΤΑΜΕΤΡΙΑ ΤΕΤΡΑΓΩΝΙΚΟΥ ΠΑΛΜΟΥ	47
4.2 ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	48
4.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗ ΚΑΘΟΔΙΚΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	61
5 ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ ΣΕ ΠΟΛΥΧΡΩΜΑΤΙΚΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΤΡΩΚΤΙΚΩΝ	65
5.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ ΣΕ ΠΟΛΥΧΡΩΜΑΤΙΚΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΤΡΩΚΤΙΚΩΝ	68
B ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	69
1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	69
1.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ	69
1.2 ΥΛΙΚΑ	70
1.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	70
1.4 ΜΕΘΟΔΟΣ	71
2 ΤΕΧΝΙΚΗ PCES	73
3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΚΑΘΟΔΙΚΗΣ ΒΟΛΤΑΜΑΤΡΙΑΣ ΜΕ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	74



3.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ	74
4 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΑΓΡΟΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ <i>IN VIVO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΕΤΗΙΔΑΘΗΙΟΝ	75
4.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ	75
5 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΘΟΔΙΚΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗΣ ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗΣ ΒΟΛΤΑΜΕΤΡΙΑΣ	75
5.1 ΡΥΘΜΙΣΗ pH	82
5.2 ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΕΡΚΑΘΑΡΟΥ ΝΕΡΟΥ	82
5.3 ΖΥΓΟΣ – ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΟΣ – ΜΙΚΡΟΠΙΠΠΕΤΕΣ	83
5.4 ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	83
5.5 ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΩΝ	84
5.5.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ KNO_3	84
5.5.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ Briton – Robinson	85
6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	85
Γ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	86
1 ΕΠΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ	86
1.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΗΙΔΑΘΗΙΟΝ	86
1.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ IMIDACLOPRID	99
2 ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΑΝΩ ΣΤΗΝ ΑΙΩΡΟΥΜΕΝΗ ΣΤΑΓΟΝΑ – ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΥ ΤΟΥ HMDE	105
2.1 ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΗΙΔΑΘΗΙΟΝ	106
2.1.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH	107
2.1.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ	109
2.2 ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΤΟΥ IMIDACLOPRID	111
2.2.1 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΟΛΑΡΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ AD – CSV ΤΟΥ IMIDACLOPRID	112
2.2.2 ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ	117
2.3 ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΤΟΥ IMIDACLOPRID ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ	124
3 <i>IN VIVO</i> ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	125
3.1 <i>IN VIVO</i> ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΑΓΡΟΤΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ	126
3.2 <i>IN VIVO</i> ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ IMIDACLOPRID	131
Δ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	135
Ε ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	146
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	148



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως στις αγροτικές καλλιέργειες, επιβαρύνοντας σε μεγάλο βαθμό το περιβάλλον. Αποτελούν σημαντικούς περιβαλλοντικούς ρυπαντές, στους οποίους εκτίθεται καθημερινά ο άνθρωπος με συνεχώς αυξανόμενο ρυθμό. Ο οργανισμός του ανθρώπου εκτίθεται στα φυτοφάρμακα είτε μέσω της επαγγελματικής του ενασχόλησης ως καλλιεργητής, κατά τη διάρκεια ψεκασμών, είτε ως καταναλωτής, μέσω των υπολειμμάτων που παραμένουν σε τρόφιμα, καπνό, αέρα, έδαφος, νερό, φυτά και ζώα.

Σκοπός της διατριβής είναι η μελέτη της βιολογικής δράσης φυτοφαρμάκων σε συνδυασμό με τη φυσικοχημική τους συμπεριφορά. Ειδικότερα επιδιώκεται να διερευνηθεί αν η γενοτοξική δράση τους καθορίζεται από τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και κατ' επέκταση από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον γίνεται προσπάθεια να μελετηθεί η πιθανή συνέργεια όλων των παραπάνω με *in vitro* μελέτες προσδιορισμού της δράσης των στο γενετικό υλικό του ανθρώπου.

Επιλέχτηκαν δύο φυτοφάρμακα ευρείας χρήσης, το Methidathion και το Imidacloprid. Το Methidathion είναι οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο, που δρα ως ανταγωνιστής της χολινεστεράσης. Το Imidacloprid είναι χλωρο-νικοτινικό εντομοκτόνο ευρέως φάσματος, το οποίο δρα ως ανταγωνιστής της ακετυλοχολίνης και ανήκει στα νικοτινοειδή, μια νέα κατηγορία φυτοφαρμάκων.

Για την εκτίμηση της γενοτοξικής δράσης των παραπάνω φυτοφαρμάκων επιλέχθηκε η τεχνική των μικροπυρήνων (Micronucleus Assay) σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα *in vitro* με τη χρήση κυτταροχλασίνης-B. Για τη μελέτη της φυσικοχημικής συμπεριφοράς καθώς και της παρουσίας τους στον εσωκυττάριο ή εξωκυττάριο χώρο εφαρμόστηκε η τεχνική της καθοδικής βολταμετρίας με προσυγκέντρωση (Cathodic Stripping Voltammetry). Στο επόμενο στάδιο της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε *in vivo* μελέτη σε ομάδα αγροτών



του νομού Ηρακλείου που χρησιμοποιούσαν μεταξύ άλλων φυτοφαρμάκων και το Methidathion. Συγχρόνως μελετήθηκε *in vivo* η δράση του Imidacloprid σε επίμυες.

- Αναλυτικότερα, τα αποτελέσματα των πειραμάτων για το Methidathion έδειξαν ότι ο περιβαλλοντικός παράγοντας pH, επηρεάζει καταλυτικά τη δομή του, ενισχύοντας την επικινδυνότητά του.

Τα *in vitro* πειράματα προσδιορισμού της γενοτοξικής δράσης του Imidacloprid με την τεχνική των μικροπυρήνων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων σε συνδυασμό με την τεχνική της καθοδικής βολταμετρίας με προσυγκέντρωση, παρουσία και απουσία KNO_3 , έδειξαν μεταβολή της φυσικοχημικής συμπεριφοράς του φυτοφαρμάκου εξαιτίας της παρουσίας του KNO_3 . Ο παράγοντας που επηρεάζει τη δράση του Imidacloprid είναι το φορτίο του μορίου το οποίο το κρατά προσκολλημένο στη μεμβράνη του λεμφοκυττάρου και δεν το αφήνει να εισχωρήσει στο εσωτερικό. Παρουσία KNO_3 , το φορτίο εξουδετερώνεται και η δραστική ουσία εισχωρεί ελεύθερα στο εσωτερικό του κυττάρου. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έχουν εξαχθεί σημαντικά συμπεράσματα για την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων στην επικινδυνότητα των φυτοφαρμάκων. Ειδικότερα, τα παραπάνω πειράματα έδειξαν ότι η παρουσία μιας ακίνδυνης και άφθονης στη φύση ένωσης, όπως το KNO_3 μπορεί να αλλάξει δραματικά τον τρόπο δράσης ενός φυτοφαρμάκου όπως το Imidacloprid και να το μετατρέψει από φιλικό προς τον άνθρωπο σε αρκετά επικίνδυνο. Επίσης, από την μελέτη της θερμοδυναμικής συμπεριφοράς του Imidacloprid με την χρήση της καθοδικής βολταμετρίας με προσυγκέντρωση, προέκυψε ότι το συγκεκριμένο φυτοφάρμακο παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες γεγονός που το καθιστά πιο επικίνδυνο για τους ποικιλόθερμους οργανισμούς (έντομα) και λιγότερο για τους ομοιόθερμους (θηλαστικά). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι για τις μετρήσεις σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα με την τεχνική της καθοδικής βολταμετρίας με προσυγκέντρωση το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε διαμορφώθηκε από την εργαστηριακή μας ομάδα.



Η εργασία αυτή συνεισφέρει στην αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης των δύο αυτών φυτοφαρμάκων. Τα αποτελέσματα αυτά που προέκυψαν τόσο από βιολογικά όσο και φυσικοχημικά δεδομένα δείχνουν ότι η διεπιστημονική προσέγγιση μπορεί να δώσει χρήσιμες απαντήσεις σε ζητήματα περιβαλλοντικού ενδιαφέροντος.



A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Περιβάλλον είναι όλα τα εξωτερικά ερεθίσματα που προέρχονται από το σύνολο των έμβιων (ζωντανοί οργανισμοί και σχέσεις μεταξύ τους) και των μη έμβιων στοιχείων (ανόργανες, οργανικές ενώσεις, φυσικά φαινόμενα) που επιδρούν σε έναν οργανισμό και επηρεάζουν την ανάπτυξή του. Ένας διαχωρισμός που προκύπτει στις οργανωμένες ανθρώπινες κοινωνίες είναι μεταξύ φυσικού και τεχνητού περιβάλλοντος. Φυσικό περιβάλλον μπορεί να θεωρηθεί το σύνολο των οργανισμών του πλανήτη (φυτικοί, ζωικοί, μύκητες, ιοί κ.ά.), τα ανόργανα στοιχεία και ενώσεις, οι οργανικές ενώσεις, οι φυσικοί παράγοντες (ηλιακή ακτινοβολία, άνεμοι κ.λπ.), καθώς και οι σχέσεις και οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ όλων αυτών. Τεχνητό περιβάλλον είναι τα προϊόντα των ανθρώπινων δραστηριοτήτων, τα αποτελέσματα της κοινωνικής οργάνωσης, της τεχνολογίας και όλων των μέσων που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος.

Ο άνθρωπος δέχεται ερεθίσματα από το περιβάλλον και ανταλλάσσει ύλη και ενέργεια. Ο Ιπποκράτης είπε ότι «το περιβάλλον ρυθμίζει την υγεία του ανθρώπου και διαμορφώνει εκείνα τα στοιχεία που κάνουν έναν άνθρωπο να διαφέρει από τον άλλο και ένα έθνος να διαφέρει από το άλλο». Στη σύγχρονη εποχή ο ρόλος του περιβάλλοντος στη ζωή και την ανάπτυξη των ανθρώπων όχι μόνο δεν απορρίφθηκε, αλλά ενισχύεται από επιστήμες, όπως η βιολογία και η ψυχολογία.

Ο άνθρωπος ως ομοιοστατικός οργανισμός, δηλαδή ένας οργανισμός που εμφανίζει την τάση τόσο για σταθερότητα των διαφόρων φυσιολογικών συνθηκών και στοιχείων (θερμοκρασία, σύνθεση αίματος) όσο και για αποκατάσταση της σταθερότητας σε περίπτωση μεταβολής της. Έτσι, μπορεί να επιζήσει σε συγκεκριμένες μεταβολές του περιβάλλοντος, στο εύρος των οποίων μπορούν να λειτουργούν οι απαραίτητες για τη ζωή φυσικοχημικές διεργασίες, με τρόπο μάλιστα που να μη διαταράσσεται η φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού, δηλαδή η υγεία του. Εάν το περιβάλλον είναι ευνοϊκό, η επίδρασή του στην ανθρώπινη υγεία είναι θετική, ενώ σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες η επίδραση αυτή είναι αρνητική. Η ρύπανση του περιβάλλοντος,



δηλαδή η παρουσία ουσιών ή ενέργειας που δεν είναι δυνατόν να αφομοιωθούν ή να εξουδετερωθούν με φυσικούς τρόπους έχει άμεση συνάρτηση με την ανθρώπινη υγεία.

- Όταν ο άνθρωπος εμφανίστηκε για πρώτη φορά, ουσιαστικά κάλυπτε τις ανάγκες του για τροφή με καρπούς που υπήρχαν στη φύση. Με το πέρασμα χιλιάδων χρόνων και μαθαίνοντας από τη φύση, άρχισε, με την αγροτική επανάσταση 10000 χρόνια πριν να την καλλιεργεί βελτιώνοντας την αποδοτικότητα ορισμένων προϊόντων. Όμως, όσο αυξανόταν ο πληθυσμός της Γης, αλλά εξελισσόταν και η κοινωνία και συνακόλουθα τόσο αυξανόταν και η ζήτηση της τροφής που τελικά οδήγησε σε καλλιέργειες με εντατικούς ρυθμούς. Η αντικατάσταση των οικόσιτων ζώων από μηχανήματα στην καλλιέργεια της γης, η κατασκευή και η αυτοματοποίηση αρδευτικών συστημάτων, καθώς και η δημιουργία βελτιωτικών της παραγωγής, αλλά και φυτοπροστατευτικών, είναι ορισμένες από τις καινοτομίες που συνέβαλαν στη βελτίωση της ποιότητας και αποδοτικότητας των καλλιεργειών και στη μείωση του χρόνου παραγωγής.

Ειδικότερα τα φυτοπροστατευτικά φυτοφάρμακα, ανθρωπογενούς προέλευσης χημικές ενώσεις, αποτέλεσαν μία από της σπουδαιότερες ανακαλύψεις του ανθρώπου στην προσπάθεια αύξησης της παραγωγής τροφίμων δια μέσου της καταπολέμησης επιβλαβών παραγόντων, φυτικών δηλαδή και ζωικών παρασίτων. Η προστασία που παρείχαν στις καλλιέργειες έναντι των διαφόρων παρασίτων έδωσε πρωτοφανή ώθηση στην αύξηση της παραγωγής. Πέρα όμως από την ευεργετική τους δράση, με την πάροδο του χρόνου διαπιστώθηκε ότι τα φυτοφάρμακα έχουν και σημαντικές παράπλευρες αρνητικές επιπτώσεις τόσο στον ανθρώπινο οργανισμό όσο και σε άλλους οργανισμούς.

Τα φυτοφάρμακα αναπτύχθηκαν τα τελευταία εξήντα περίπου χρόνια. Το 1939 ο Ελβετός Muller ανακαλύπτει το DDT [1], ενώ το 1946 τα εργαστήρια της εταιρίας φαρμάκων BAYER κατασκευάζουν το παραθείο. Από τα πρώτα χρόνια της ανακάλυψής τους, λόγω της συμβολής τους στην προστασία της αγροτικής παραγωγής, γεννήθηκαν πολλές ελπίδες για τη λύση του προβλήματος της τροφής που αντιμετώπιζε η ανθρωπότητα με την πληθυσμιακή ανάπτυξη.



Ταυτόχρονα, η προσφορά τους ήταν μεγάλη στην προστασία της δημόσιας υγείας με την καταπολέμηση εντόμων, που μετέφεραν διάφορες ασθένειες στον άνθρωπο, ανοίγοντας νέους ορίζοντες στη βελτίωση της ποιότητας της ανθρώπινης ζωής.

- Η ελεγχόμενη χρήση των φυτοφαρμάκων στη σύγχρονη γεωργία είναι αναγκαία για την αγροτική παραγωγή. Τα φυτοφάρμακα όταν χρησιμοποιούνται στη σωστή αναλογία και με την καθοδήγηση ειδικών γεωπόνων, συμβάλλουν στην αύξηση της αγροτικής παραγωγής και στη βελτίωση της ποιότητας των αγροτικών προϊόντων. Η σωστή καθοδήγηση και εφαρμογή τους στις καλλιέργειες περιορίζει: α) τους βλαβερούς οργανισμούς που εμποδίζουν την ανάπτυξη των φυτών ή τους μικροοργανισμούς που μολύνουν τα προϊόντα και καταστρέφουν πολλές φορές ολόκληρη την παραγωγή και β) τους ενδεχόμενους κινδύνους για την υγεία των καλλιεργητών και των καταναλωτών. Η χρήση τους επιτρέπει στους γεωργούς να δουλεύουν λιγότερο και μάλιστα με μεγαλύτερη απόδοση.

Τα φυτοφάρμακα κατέχουν σημαντικό ρόλο στη γεωργία, όμως ο περιορισμός των αρνητικών συνεπειών τους απαιτεί συστηματικό έλεγχο των υπολειμμάτων τους στα αγροτικά προϊόντα, τρόφιμα, έδαφος και νερό [2,3,4,5,6]. Ο κύριος σκοπός της δημιουργίας τέτοιων χημικών είναι η καταστροφή των παρασίτων και η αύξηση της παραγωγικότητας. Τα υπολείμματα που βρίσκονται στα αγροτικά προϊόντα, στο πόσιμο νερό και γενικά στο περιβάλλον, δημιούργησαν αρκετές ανησυχίες στο κοινό τα τελευταία χρόνια [7,8]. Η παρουσία νέων χημικών ενώσεων στη φύση μπορεί να προκαλέσει αμέτρητες αρνητικές επιπτώσεις στον άνθρωπο, όπως βιοχημικές δυσλειτουργίες ή γενετικές αστάθειες [9,10].

Τα φυτοφάρμακα ανήκουν σε μία ετερογενή ομάδα χημικών ουσιών και αποτελούν σημαντικούς περιβαλλοντικούς ρυπαντές. Χρησιμοποιούνται κατά κόρον στη γεωργία παγκοσμίως, ενώ η χρήση τους τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί υπέρμετρα. Στην Ευρώπη περισσότεροι από 3.000.000 τόνοι φυτοφαρμάκων ελευθερώνονται στο περιβάλλον ετησίως. Η διαδεδομένη χρήση



τους, η παραμονή τους καθώς και η συσσώρευσή τους στο περιβάλλον, έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν παράγοντες καρκινογένεσης και μεταλλαξιγένεσης [12].

Ατυχήματα δηλητηριάσεων με φυτοφάρμακα λόγω κακής χρήσης, φύλαξης ή ακόμη και άγνοιας δύνανται να επιφέρουν το θάνατο ή να προκαλέσουν ανεπανόρθωτες βλάβες στην υγεία. Οι μακροχρόνιες όμως αρνητικές συνέπειες που προκαλούνται στην υγεία μας από τη χρήση τους είναι περισσότερες και οι πλέον ανησυχητικές, αφού αφορούν το σύνολο της ανθρωπότητας. Τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων διοχετεύονται μέσα από την τροφική αλυσίδα στον ανθρώπινο οργανισμό με τη λήψη φυτικών τροφών ή ζωικών προϊόντων. Οι κυριότερες επιπτώσεις που προκαλούνται στον ανθρώπινο οργανισμό είναι προβλήματα στο νευρικό και αναπνευστικό σύστημα, βλάβες στο ήπαρ και στα νεφρά, αναπαραγωγικά προβλήματα, διάφορες αλλεργίες και τέλος πρόκληση καρκίνου διαφόρων μορφών.

Πολύ σημαντικές είναι επίσης οι αρνητικές συνέπειες που προκαλούνται στο φυσικό περιβάλλον το οποίο επηρεάζεται και αλλοιώνεται σε μεγάλο βαθμό, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ισορροπία του. Οι επιβλαβείς ουσίες που περιέχονται στα φυτοφάρμακα επηρεάζουν και καταστρέφουν τη χλωρίδα και την πανίδα της περιοχής όπου γίνεται χρήση τους. Πληθυσμοί ζώων και εντόμων (όχι μόνο των βλαβερών αλλά και ωφέλιμων) επηρεάζονται αρνητικά διαταράσσοντας τη φυσική ισορροπία. Πολλοί φυτικοί οργανισμοί απορροφούν αυτές τις ουσίες, οι οποίες με το χρόνο συσσωρεύονται, με άγνωστες μέχρι σήμερα επιπτώσεις. Ο ψεκασμός με φυτοφάρμακα, ιδιαίτερα όταν γίνεται από τον αέρα με ειδικά αεροπλάνα ή από το έδαφος με σύγχρονα πιεστικά συστήματα, ρυπαίνει και την ατμόσφαιρα λόγω της ενδεχόμενης κατακράτησής τους σε αιωρούμενα σωματίδια.



1. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

- Τις τελευταίες δεκαετίες η ευρεία χρήση των φυτοφαρμάκων, τα οποία αποτελούν πλέον μια σημαντική κατηγορία περιβαλλοντικών ρυπαντών, έχει άμεση επίπτωση στην υγεία του ανθρώπου. Ο άνθρωπος εκτίθεται καθημερινά
- σε αυτά μέσω της επαγγελματικής χρήσης δια της αναπνοής ή της επαφής με το δέρμα κατά την παρασκευή και τον ψεκασμό ή της επαφής με ψεκασμένους καρπούς [11,12].

Τα φυτοφάρμακα είναι χημικές ενώσεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται αφενός μεν για την προστασία του ανθρώπου από έντομα-φορείς ασθενειών αφετέρου δε για την προστασία των καλλιεργειών του από τη δράση εντόμων, ζιζανίων, μυκήτων, νηματωδών, ακάρεων και τρωκτικών ή άλλων επιβλαβών παραγόντων. Όλα τα φυτοφάρμακα εμφανίζουν μια κοινή ιδιότητα: παρεμποδίζουν/αναστέλλουν μια ζωτική μεταβολική διαδικασία του οργανισμού στον οποίο δρουν τοξικά. Γενικά, η διάκριση των φυτοφαρμάκων βάσει του οργανισμού - στόχου τους τα κατατάσσει σε εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και μυκητοκτόνα. Επίσης, χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τα μη-συστημικά και τα συστημικά. Τα μη-συστημικά φυτοφάρμακα (φυτοφάρμακα επαφής) δε μεταφέρονται μέσω κυκλοφοριακού συστήματος του φυτού σε αντίθεση με τα συστημικά [13].

Επίσης, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η τοξικότητα μιας ουσίας εκφράζεται σε τιμές θανατηφόρας δόσης του 50% του οργανισμού στόχου (Lethal Dose-50, LD_{50}). Ο όρος αυτός δίνει την ποσότητα της ουσίας, η οποία προκαλεί το θάνατο του 50% ενός πληθυσμού πειραματόζωων. Η τιμή LD_{50} δίνεται συνήθως σε ppm ή σε mg/kg βάρους πειραματόζωου. Ευνόητο είναι ότι, όσο μικρότερη είναι η LD_{50} , τόσο πιο τοξική είναι η χημική ουσία.



1.1 ENTOMOKTONA

1.1.1 ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΑ ENTOMOKTONA

Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις αποτελούν την παλαιότερη και πιο σημαντική ομάδα εντομοκτόνων. Είναι συνθετικά παρασκευαζόμενες οργανικές χημικές ενώσεις με κυκλική δομή στην οποία άτομα υδρογόνου έχουν αντικατασταθεί με χλώριο. Είναι πολύ διαδεδομένα στο περιβάλλον και αυτό οφείλεται σε δυο λόγους:

- 1) για δύο τουλάχιστο δεκαετίες (1950-1970), η κατανάλωση τους ήταν μεγαλύτερη από τη συνολική κατανάλωση όλων των άλλων ειδών φυτοφαρμάκων,
- 2) οι περισσότερες από τις ενώσεις αυτές δεν είναι βιοαποικοδομήσιμες και δεν αποσυντίθενται σε απλούστερες ακίνδυνες ενώσεις [14].

Οι ψεκασμοί με χλωριωμένα φυτοφάρμακα δημιουργούν σοβαρό πρόβλημα στο περιβάλλον καθώς συσσωρεύονται σε αυτό. Οι ενώσεις αυτές προσροφώνται ισχυρά τόσο στο έδαφος όσο και στα αιωρούμενα σωματίδια της ατμόσφαιρας. Ένα μέρος από τα εντομοκτόνα, που είναι προσροφημένα σε αιωρούμενα σωματίδια της ατμόσφαιρας, μεταφέρονται στο έδαφος με τις βροχοπτώσεις. Από το έδαφος με την κατείδυση του νερού σε χαμηλότερα στρώματα του υπεδάφους μεταφέρονται σε υπόγειους υδατικούς αποδέκτες. Ένα ποσοστό των εντομοκτόνων με την επενέργεια των ρεόντων υδάτων από τις βροχές μεταφέρονται στα επιφανειακά ύδατα. Οι ανωτέρω δύο διαδικασίες έχουν σαν αποτέλεσμα να συσσωρεύονται τα εντομοκτόνα στους υδατικούς αποδέκτες, επιφανειακές και υπόγειες και να αποτελούν παράγοντα υποβάθμισης των υδάτων, με παρενέργειες στην υγεία των ζωντανών οργανισμών. Όλες αυτές οι ενώσεις είναι ελάχιστα διαλυτές στο νερό και μάλιστα η διαλυτότητα τους ελαττώνεται με την αύξηση της αλατότητας των νερών. Παρά τη μικρή διαλυτότητα των οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων στο νερό, μεγάλα ποσά των ουσιών αυτών δεσμεύονται στην επιφάνεια οργανικής σωματιδιακής ύλης που αιωρείται στο νερό ή βρίσκονται σε ιζήματα στο βυθό των ποταμών και



λιμνών. Τα χλωριωμένα φυτοφάρμακα στα φυσικά νερά είναι, γενικά, ανθεκτικά σε υδρόλυση και οξείδωση. Προσροφώνται στα ιζήματα των πυθμένων, όπου υφίστανται μικροβιακή επίδραση και μετατρέπονται σε διάφορους μεταβολίτες. Η ταχύτητα αυτής της βιοαποικοδόμησης είναι πάρα πολύ βραδεία (η ημιπερίοδος ζωής κυμαίνεται από 9 μέχρι 116 χρόνια), με αποτέλεσμα τα ιζήματα να λειτουργούν ως μέσα αποθήκευσης αυτών των ενώσεων. Από αυτές τις πηγές, οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις εισέρχονται στους οργανισμούς, ζωικούς και φυτικούς, που ζουν στα φυσικά νερά [15,16].

Η προσρόφηση όλων των χλωριωμένων φυτοφαρμάκων στα υδρόβια φυτά είναι ταχεία. Η ημιπερίοδος ζωής τους στους ιστούς ποικίλλει ανάλογα με το είδος του φυτού. Μια εξίσου σημαντική με τη συσσώρευση παράμετρος είναι η τοξικότητα των ενώσεων αυτών. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα χλωριωμένα φυτοφάρμακα εκδηλώνουν την τοξική τους δράση στους διάφορους οργανισμούς δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Πάντως, πιστεύεται ότι, επειδή οι ενώσεις αυτές είναι λιποδιαλυτές, διαλύονται στις νευρικές ίνες και παρεμποδίζουν τη μεταφορά ιόντων προς ή από την ίνα. Η παρεμπόδιση αυτή προκαλεί ρίγη, σπασμούς και τελικά το θάνατο. Όλα γενικώς τα χλωριωμένα παρασιτοκτόνα έχουν αποδειχθεί ή θεωρούνται καρκινογόνα, ενώ για πολλά από αυτά διαπιστώθηκε εμβρυοτοξική και τερατογόνος δράση σε διάφορα πειραματόζωα. Άλλωστε, λόγω της βιομεγέθυνσης, πολλές οργανοχλωριωμένες ενώσεις καταλήγουν στους ζώντες οργανισμούς σε συγκεντρώσεις που είναι τάξεις μεγέθους μεγαλύτερες από αυτές που είναι στην πραγματικότητα διαλυμένες στο νερό. Εξαιτίας αυτού του φαινομένου, οι συγκεντρώσεις των ενώσεων αυτών σε πολλά είδη έχουν φθάσει σε επικίνδυνα επίπεδα, ώστε πολλά οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα να έχουν αποσυρθεί [17,18,19].

1.1.2 ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα αποικοδομούνται γρήγορα. Από αυτή την άποψη παρουσιάζουν ένα πλεονέκτημα ως προς τα οργανοχλωριωμένα. Παρόλα αυτά, έχουν γενικά πολύ μεγαλύτερη τοξικότητα για τον άνθρωπο και τα άλλα



θηλαστικά. Πολλά οργανοφωσφορικά εμφανίζουν άμεσο κίνδυνο για την υγεία αυτών που τα χρησιμοποιούν και εκείνων που μπορεί να έρθουν σε επαφή με αυτά. Έκθεση σε αυτά τα χημικά με εισπνοή, κατάποση ή προσρόφηση διαμέσου του δέρματος μπορεί να οδηγήσει σε έντονα προβλήματα υγείας. Όπως οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, τα οργανοφωσφορικά συγκεντρώνονται στους λιπαρούς ιστούς. Μία σημαντική ιδιότητα των οργανοφωσφορικών είναι η ικανότητά τους να αποσυντίθενται σε μερικές ημέρες ή εβδομάδες και έτσι σπάνια εντοπίζονται στην τροφική αλυσίδα [20,21].

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα περιέχουν ένα κεντρικό πεντασθενές άτομο φωσφόρου (P) στο οποίο μπορεί να συνδέονται:

- α. ένα άτομο οξυγόνου ή θείου διπλά ενωμένο με το άτομο του P (π.χ. dichlorvos)
- β. δύο μεθόξυ- ή αιθόξυ- ομάδες απλώς ενωμένες με το άτομο του P (π.χ. parathion)
- γ. μια μακρύτερη, πιο πολύπλοκη ομάδα R απλώς ενωμένη με το φωσφόρο διαμέσου ενός ατόμου οξυγόνου ή θείου (π.χ. malathion).

Τα περισσότερα οργανοφωσφορικά αποσυντίθενται σχετικά γρήγορα στο περιβάλλον προς μη τοξικές ουσίες όπως φωσφορικό οξύ και αλκοόλες. Είναι λιγότερο σταθερά σε αλκαλικές συνθήκες κι έχουν μικρό βαθμό βιοσυσσώρευσης. Στον ανθρώπινο οργανισμό, τα οργανοφωσφορικά απορροφώνται γρήγορα από τους πνεύμονες, το δέρμα και τη γαστρεντερική οδό, μεταφέρονται στο αίμα και τους ιστούς και αναστέλλουν το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η λειτουργία του νευρικού συστήματος [22,23].

1.1.3 ΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ ENTOMOKTONA

Πρωτοπαρουσιάστηκαν το 1951 και είναι παράγωγα του καρβαμιδικού οξέος. Ο τρόπος δράσης τους παρομοιάζει με αυτόν των οργανοφωσφορικών (αν και η



δράση του φωσφόρου εδώ είναι ασθενέστερη από του άνθρακα), είναι δηλαδή χολινεργικός (αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση). Έχουν μικρή περίοδο παραμονής στο περιβάλλον και δεν παρουσιάζουν μακροχρόνια παραμονή και βιοσυσσώρευση. Παρουσιάζουν όμως οξύτατη τοξική δράση και είναι απαραίτητη η τήρηση μέτρων προφύλαξης από τους χρήστες για την αποφυγή άμεσων προβλημάτων υγείας. Χαρακτηριστικά καρβαμιδικά εντομοκτόνα είναι τα carbofuran, carbaryl, aldicarb, baygon κ.α. [24,25].

1.2 ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ

Τα ζιζανιοκτόνα είναι χημικές ενώσεις που καταστρέφουν φυτικά ζιζάνια. Συνήθως εφαρμόζονται για να εξοντώσουν αγριόχορτα χωρίς να προκαλέσουν βλάβη στην επιθυμητή καλλιέργεια. Τα ζιζανιοκτόνα χρησιμοποιούνται επίσης για να εξαλείψουν τα ανεπιθύμητα φυτά από τις παρυφές των δρόμων, τις σιδηροδρομικές γραμμές και γραμμές μεταφοράς ηλεκτρικής ενέργειας και μερικές φορές ως αποφυλλωτικά σε μεγάλες περιοχές. Στο πρώτο μισό του εικοστού αιώνα διάφορες ανόργανες ενώσεις, κυρίως αρσενικούχο νάτριο, χλωρικό νάτριο και θειικός χαλκός, χρησιμοποιήθηκαν για την εξόντωση ζιζανίων. Τελικά, οργανικά παράγωγα του αρσενικού αντικατέστησαν τις ανόργανες ενώσεις του καθόσον αποδείχτηκαν ότι είναι λιγότερο τοξικές στα θηλαστικά. Ανόργανα και οργανομεταλλικά ζιζανιοκτόνα έχουν γενικά αποσυρθεί εξαιτίας της μακρόχρονης παραμονής τους στο έδαφος. Σήμερα κυριαρχούν στην αγορά πλήρως τα οργανικά ζιζανιοκτόνα. Η χρήση τους βασίζεται στην επιλεκτική τους δράση. Έτσι μπορεί να είναι πολύ τοξικά για μια ομάδα φυτών και να μην προκαλούν ζημιά σε άλλα φυτά [26,27]. Διακρίνονται στα ζιζανιοκτόνα τριαζίνης, οργανικά ζιζανιοκτόνα, φαινοξυ - ζιζανιοκτόνα.

1.2.1 ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ ΤΡΙΑΖΙΝΗΣ

Μια μοντέρνα τάξη ζιζανιοκτόνων είναι οι τριαζίνες, οι οποίες έχουν συμμετρική, αρωματική δομή. Το πρώτο ζιζανιοκτόνο της ομάδας, η σιμαζίνη (simazine),



παρασκευάστηκε το 1855. Η πιο γνωστή τριαζίνη όμως είναι η ατραζίνη, η οποία πρωτοεμφανίστηκε το 1958 και χρησιμοποιήθηκε σε τεράστιες ποσότητες για την καταστροφή των αγριόχορτων σε καλλιέργειες καλαμποκιού. Είναι σταθερή ένωση, αμετάβλητη στο φως, και εφαρμόζεται σε καλλιεργήσιμα εδάφη σε αναλογίες λίγων γραμμαρίων ανά στρέμμα με σκοπό την εξόντωση των αγριόχορτων. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις έχει χρησιμοποιηθεί για την αποψίλωση περιοχών, π.χ. για τη δημιουργία χώρων στάθμευσης. Βιοχημικά λειτουργεί ως ζιζανιοκτόνο με την αναστολή της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης. Η ατραζίνη είναι μέτρια διαλυτή στο νερό (30 μέρη στο εκατομμύριο, parts per million, ppm). Στα νερά, που στραγγίζονται από αγροτικές περιοχές στις οποίες χρησιμοποιείται, η συγκέντρωσή της τυπικά βρέθηκε ότι είναι μερικά μέρη ανά δισεκατομμύριο (parts per billion – ppb -). Η ατραζίνη είναι πολύ τοξική ένωση ($LD_{50} = 1.87 \text{ mg/Kg}$ σε ποντίκια). Επιπροσθέτως, μερικές προκαταρκτικές έρευνες, σχετικά με την υγεία αγροτών και άλλων ατόμων που εκτέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις ατραζίνης, δείχνουν υψηλές συχνότητες καρκίνου και αυξημένο ποσοστό γενετικών ανωμαλιών [28].

1.2.2 ΑΛΛΑ ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ

Σε μερικές περιοχές όπου καλλιεργείται εκτεταμένα η σόγια και το καλαμπόκι, η ατραζίνη παραχώρησε τη θέση της ως ζιζανιοκτόνο στο μετολαχλώρ (metolachlor) που είναι ένα παράγωγο του χλωροοξικού οξέος, στο οποίο η ομάδα -OH αντικαθίσταται από μια αμινομάδα. Το μετολαχλώρ (metolachlor) αποσυντίθεται στο περιβάλλον με τη δράση του ηλιακού φωτός και του νερού.

Ένα άλλο γνωστό ζιζανιοκτόνο είναι το παρακουάτ (paraquat). Η κατάληξη -quat στο όνομα του επισημαίνει ότι στη δομή του περιέχει τεταρτοταγές άτομο αζώτου. Τέτοια ιονικά άζωτα κάνουν την ουσία διαλυτή στο νερό. Το παρακουάτ (paraquat) είναι ένα ζιζανιοκτόνο που χρησιμοποιείται την άνοιξη για να εξολοθρεύει ζιζάνια από το χωράφι πριν φυτρώσουν [29].



1.2.3 ΦΑΙΝΟΞΥ - ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ

Αυτοί οι εξολοθρευτές ζιζανίων χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στα τέλη του δεύτερου παγκοσμίου πολέμου. Χαρακτηριστικά τέτοια ζιζανιοκτόνα είναι το 2,4-D που χρησιμοποιείται για την εξόντωση των πλατύφυλλων ζιζανίων σε πρασιές, κήπους, γήπεδα του γκολφ και σε αγρούς και το 2,4,5-T που είναι αποτελεσματικό στον καθαρισμό θάμνων, για παράδειγμα στις άκρες των δρόμων και στους διαδρόμους της γραμμής μεταφοράς ηλεκτρικού ρεύματος. Τεράστιες ποσότητες από 2,4-D χρησιμοποιούνται στις αναπτυγμένες χώρες για τον έλεγχο των ζιζανίων τόσο στη γεωργία όσο και σε οικιακές χρήσεις. Σε μερικές περιοχές, η συνεχής χρήση του έχει δημιουργήσει προβλήματα εξαιτίας των πιθανών επιδράσεων του στην υγεία των ανθρώπων [30].

1.3 ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

Είναι φυτοπροστατευτικές ουσίες για την καταπολέμηση διαφόρων ειδών μυκήτων (ασκομυκητες, βασιδιομύκητες κ.α.). Οι μύκητες αναπτύσσονται όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές (θερμοκρασία – υγρασία) και προκαλούν βλάβες σε διάφορα μέρη του φυτού με αποτέλεσμα, μείωση της παραγωγής, υποβάθμιση της ποιότητας και σε αρκετές περιπτώσεις την ολική καταστροφή της καλλιέργειας.

Στην πλειοψηφία τους, τα μυκητοκτόνα δεν είναι τόσο σταθερά όσα τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα. Η σταθερότητά τους στο έδαφος εξαρτάται τόσο από τη χημική τους σύσταση, όσο και από το έδαφος και τις γενικές κλιματικές συνθήκες. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής τους κυμαίνεται από 3 έως 1059 ημέρες [31].



1.4 ΣΤΟΧΟΙ

- Είναι γνωστό ότι σχεδόν το σύνολο των φυτοφαρμάκων, αλλά και των διαφόρων χημικών ενώσεων που παρασκευάζονται από τον άνθρωπο για διάφορες εφαρμογές και χρήσεις, μπορεί να έχουν παρενέργειες ως προς την υγεία του ανθρώπου, αλλά και των οργανισμών γενικότερα.

Το περιβάλλον, αποτελεί ένα μεγάλο φυσικό εργαστήριο όπου λαμβάνουν χώρα πολυποίκιλες αντιδράσεις και αλληλεπιδράσεις των επιμέρους στοιχείων που το συνιστούν, ορισμένες από τις οποίες δεν είμαστε σε θέση να τις κατανοήσουμε στην ολότητά τους, ενώ άλλες μας είναι εντελώς άγνωστες. Η εισαγωγή επιπλέον χημικών ουσιών στο περιβάλλον από τον άνθρωπο αυξάνει ακόμη περισσότερο την πολυπλοκότητα των παρατηρούμενων αντιδράσεων και αλληλεπιδράσεων. Αν για παράδειγμα μια ουσία δεν προσληφθεί άμεσα από έναν οργανισμό, αλλά καταλήξει σε αυτόν αφού έχει αλληλεπιδράσει και διαφοροποιηθεί με τους υφιστάμενους περιβαλλοντικούς παράγοντες, το πιθανότερο είναι τα χαρακτηριστικά της να έχουν αλλοιωθεί δραματικά με αποτέλεσμα να έχει και διαφορετικές επιδράσεις, πολλές φορές μη αναμενόμενες. Αυτό σημαίνει ότι αυτή θα έχει και διαφορετικά αποτελέσματα από τα αναμενόμενα. Συνεπώς τα πειράματα που πραγματοποιούνται στα εργαστήρια, ουσιαστικά, έχουν σκοπό την δημιουργία αξιόπιστων μοντέλων που να προσομοιάζουν ικανοποιητικά τις συνθήκες του περιβάλλοντος.

Στην περίπτωση των φυτοφαρμάκων οι περισσότερες μελέτες εξετάζουν την δραστικότητά τους μεμονωμένα χωρίς να λαμβάνουν υπόψη τις πιθανές επιδράσεις σε αυτά άλλων παραγόντων ή παραμέτρων. Οι περιπτώσεις αλληλεπίδρασης μεταξύ βιοτικής και αβιοτικής συνιστώσας του περιβάλλοντος δείχνουν ότι για την πλήρη κατανόηση των φαινομένων θα έπρεπε, οι μεταβολές που μελετώνται να μην εξετάζονται μεμονωμένα, αλλά συνδυαστικά. Στο πλαίσιο αυτό κρίνεται σκόπιμο να εξεταστούν οι πιθανές αλληλεπιδράσεις χημικών ενώσεων και περιβαλλοντικών παραγόντων καθώς και το αν και πώς επηρεάζουν τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και ενδεχομένως διαφοροποιούν



τη δραστικότητα τους και τις επιπτώσεις τους στους διάφορους οργανισμούς και στον άνθρωπο.

- Η μελέτη της βιολογικής δράσης φυτοφαρμάκων σε συνδυασμό με την φυσικοχημική τους συμπεριφορά αποτελεί το στόχο της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Ειδικότερα επιδιώκεται να διερευνηθεί ο ρόλος των περιβαλλοντικών παραγόντων και συνθηκών στην κατεύθυνση που διαφοροποιούν τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και επηρεάζουν την γενετοξική δράση τους.

Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε μία διερευνητική *in vivo* μελέτη που σκοπό είχε την εκτίμηση της γενετοξικής δράσης φυτοφαρμάκων σε άτομα που είχαν εκτεθεί σε αυτά μέσω της επαγγελματικής τους ενασχόλησης. Τα άτομα που μελετήθηκαν χρησιμοποιούσαν στα πλαίσια της γεωργικής τους δραστηριότητας διάφορα μίγματα φυτοφαρμάκων. Επειδή χρησιμοποιούσαν μίγματα φυτοφαρμάκων δεν ήταν εφικτό να διακρίνουμε τη συμμετοχή του κάθε φυτοφαρμάκου στις παρατηρήσεις μας, να διερευνήσουμε τις πιθανές αλληλεπιδράσεις με περιβαλλοντικούς παράγοντες καθώς και αν αυτές καθόριζαν διαφοροποιήσεις στη φυσικοχημική τους συμπεριφορά και ενδεχομένως στη γενετοξικότητά τους. Για να μελετήσουμε τα παραπάνω επιλέξαμε δύο φυτοφάρμακα και προσδιορίσαμε τη γενετοξική συμπεριφορά τους τόσο σε *in vitro* πειράματα χρησιμοποιώντας περιφερικό αίμα ανθρώπου, όσο και σε *in vivo* πειράματα σε μυελό των οστών αρουραίων. Σε ένα άλλο στάδιο μελετήσαμε το πώς συνδυάζονται οι αλλαγές των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων με την γενετοξική δράση τους.

1.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

Για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής επιλέχθηκαν δύο φυτοφάρμακα για να μελετηθεί η γενετοξική τους δράση, καθώς και η φυσικοχημική τους συμπεριφορά και η παρουσία τους στον εσωκυττάριο ή εξωκυττάριο χώρο. Τα φυτοφάρμακα που επιλέχθηκαν ήταν το Methidathion, για το οποίο είναι γνωστή η γενετοξικότητά του, και το Imidacloprid, το οποίο

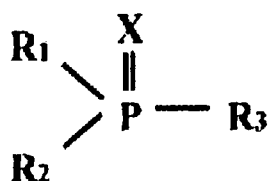


στη βιβλιογραφία έχει κατηγοριοποιηθεί ως μη γενotoξικό, τα οποία και παρουσιάζονται αναλυτικότερα παρακάτω.

1.5.1 METHIDATHION

Το Methidathion είναι ένα μη συστημικό οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο που χρησιμοποιείται από το 1966 για τον έλεγχο μυζητικών και μασητικών εντόμων και αραχνών σε πολλές καλλιέργειες. Κατατάσσεται από την EPA (US Environmental Protection Agency) στην κατηγορία τοξικότητας I (υψηλή τοξικότητα) και χαρακτηρίζεται ως φυτοφάρμακο περιορισμένης χρήσης (Restricted Use Pesticide, RUP) [169].

Η τιμή του LD₅₀ για το Methidathion κυμαίνεται μεταξύ 25 και 48 mg/kg σε αρουραίους καθώς και μεταξύ 25 και 70 mg/kg σε ποντίκια [34]. Το Methidathion και τα παράγωγά του χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα παρά τη τοξικότητά του [32]. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της μικρής παραμονής του στο περιβάλλον και της μεγάλης αποτελεσματικότητάς του. Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις αναπτύχθηκαν κατά την διάρκεια του δευτέρου παγκοσμίου πολέμου όπου χρησιμοποιήθηκαν σαν χημικά όπλα, αλλά σήμερα χρησιμοποιούνται σαν φυτοφάρμακα. Οι ενώσεις αυτές έχουν συνήθως τη δομή που παρουσιάζεται στο Σχήμα 1 [33].



Σχήμα 1. Γενικός τύπος οργανοφωσφορικών ενώσεων. Όπου R₁ και R₂ είναι συνήθως μέθοξυ- και αίθοξυ- ομάδες που προσδένονται στο φώσφορο, ενώ η R₃ ομάδα προσδένεται συνήθως μέσω ενός ατόμου οξυγόνου ή θείου και ονομάζεται «αποχωρούσα» ομάδα, επειδή είναι το κομμάτι εκείνο το οποίο συνήθως αποδεσμεύεται της ένωσης κατά το μεταβολισμό της [33].

Οι τύποι των οργανοφωσφορικών ενώσεων είναι οι εξής: (α) φωσφορικά, (β) θειοφωσφορικά και (γ) διθειοφωσφορικά, ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων θείου που προσδένονται στο άτομο του φωσφόρου. Οι θειοφωσφορικές ενώσεις



μετασχηματίζονται στα ανάλογα με οξυγόνο (οxon) μέσω ενζύμων του ήπατος, τα οποία αποτελούν αναστολείς της χολινεστεράσης [34].

Τα εντομοκτόνα αυτά αποτελούν την πιο διαδεδομένη και χρήσιμη ομάδα. Παρά τη χρησιμότητά τους στον έλεγχο των αγροτικών παρασίτων, η αλόγιστη χρήση τους έχει οδηγήσει σε μεγάλο αριθμό δηλητηριάσεων σε είδη που δεν αποτελούν στόχο [35]. Κάθε χρόνο αναφέρονται εκατομμύρια περιπτώσεις δηλητηριάσεων στον άνθρωπο, η πλειοψηφία των οποίων επισυμβαίνει σε χώρες του «Τρίτου Κόσμου» [36]. Το Methidathion αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και χρησιμοποιείται ευρέως σε προγράμματα αγροτικού ελέγχου, καθώς και σε προγράμματα ελέγχου δημόσιας υγείας [37].

1.5.2 IMIDACLOPRID

Το Imidacloprid [1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine] αποτελεί τον πρώτο εκπρόσωπο μιας νέας ομάδας φυτοφαρμάκων, που εμφανίστηκαν για πρώτη φορά πριν από 10 περίπου χρόνια και είναι γνωστά ως, νικοτινοειδή. Τα φυτοφάρμακα αυτά δρουν σαν αναστολείς των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης [38], οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη μεταφορά των νευρικών μηνυμάτων. Το Imidacloprid εμφανίζει υψηλή τοξικότητα στα έντομα σε αντίθεση με τα θηλαστικά [39,40]. Η εκλεκτικότητά του αυτή αποδίδεται στην μικρότερη τάση που έχει ώστε να προσδένεται στους υποδοχείς της ακετυλοχολίνης των θηλαστικών, σε σχέση με τους αντίστοιχους των εντόμων [41]. Αυτό οφείλεται στους διαφορετικούς τύπους στους χώρους πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης [42,43,44,45]. Παρόλα αυτά κάποιοι μεταβολίτες του Imidacloprid, όπως ο δινίτρο-μεταβολίτης (DN-IMI) και το νιτρομεθυλιωμένο ανάλογό του (CH-IMI), θεωρούνται επικίνδυνοι και για τα θηλαστικά [39,41]. Για την ακρίβεια οι μεταβολίτες αυτοί αλληλεπιδρούν με τους χώρους πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης με Kd (σταθερά πρόσδεσης) παρόμοια με αυτή της νικοτίνης [39,44,45].



Σήμερα το Imidacloprid χρησιμοποιείται ευρέως. Η συνεχής αυτή αύξηση της χρήσης του, η οποία πολλές φορές είναι αλόγιστη, έχει οδηγήσει σε μακρόχρονη παραμονή [46,47,48] και συσσώρευση του στο έδαφος [47,49,50,51], καθώς και στην ρύπανση του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα [52,53].

Εξαιτίας της συστημικής φύσης του, υπολείμματα τόσο του Imidacloprid όσο και των μεταβολιτών του ανιχνεύονται συχνά σε φρούτα και λαχανικά [54]. Το Imidacloprid έχει επίσης ανιχνευτεί σε εδαφικά δείγματα [2], σε δείγματα από συκώτι πουλιών [3], σε αγροχημικά [4,5] και σε δείγματα νερού [6,7]. Πειράματα σε μέλισσες, έδειξαν ότι το Imidacloprid και οι μεταβολίτες του μπορεί να εμφανίσουν 3000-10000 φορές μεγαλύτερη τοξικότητα μετά από χρόνια έκθεση σε σχέση με την άμεση έκθεση [55]. Συνεπώς, δεν θα πρέπει να χαρακτηρίζεται ως μη-τοξικό για τα θηλαστικά, αφού δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως η χρόνια δράση του. Μέχρι σήμερα το Imidacloprid θεωρείται ως ένα φυτοφάρμακο γενικής χρήσης (General Use Pesticide, GUP) και κατατάσσεται από την EPA στις κατηγορίες τοξικότητας II και III (μικρής - μέτριας τοξικότητας) [56].



2. ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

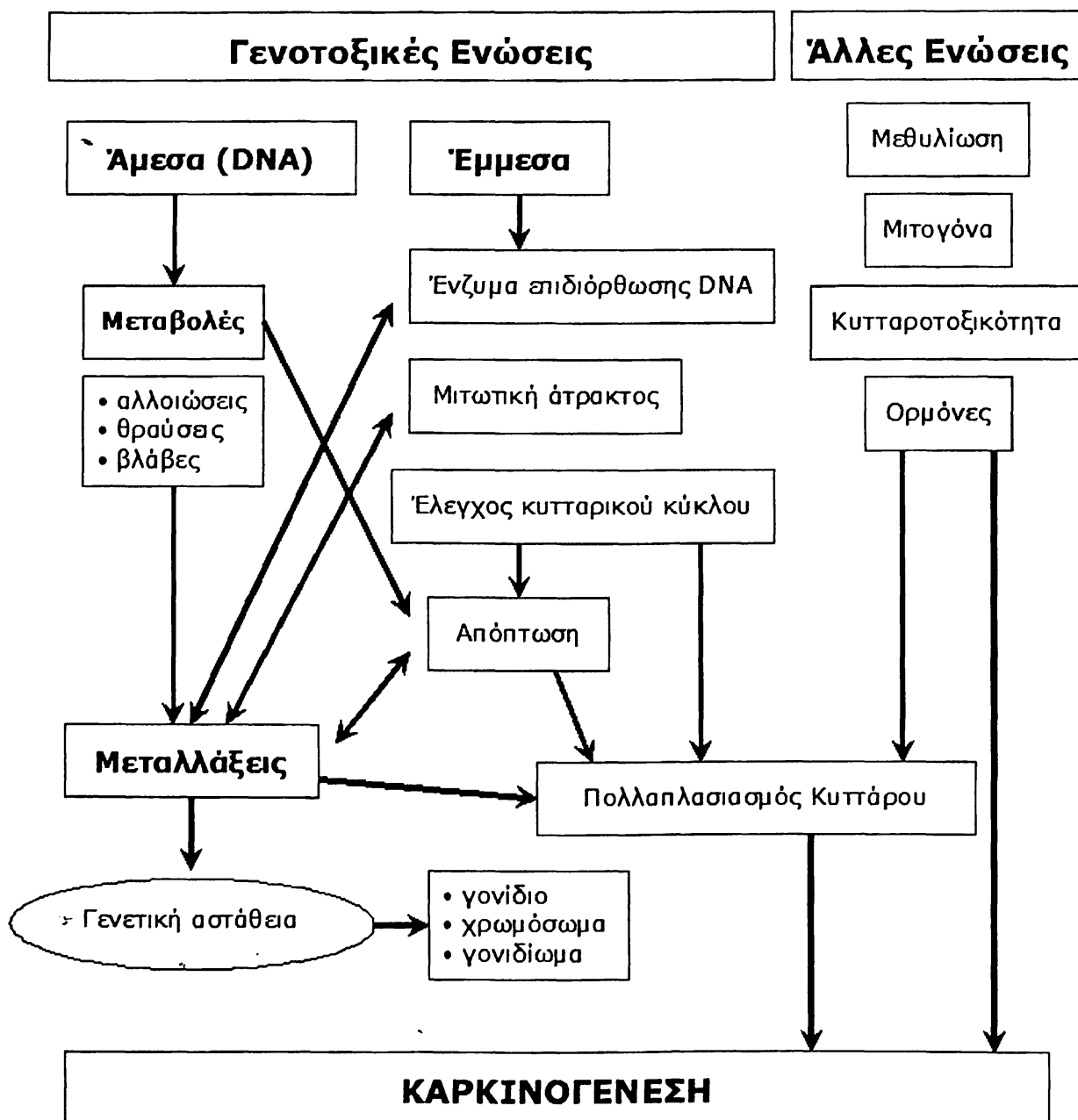
Όπως προαναφέραμε, τα φυτοφάρμακα είχαν ως αρχικό σκοπό την αύξηση της παραγωγής των γεωργικών προϊόντων, καταπολεμώντας τους βλαβερούς προς αυτά οργανισμούς. Η αλόγιστη χρήση τους όμως μετέτρεψε τα φυτοφάρμακα από εργαλείο της γεωργικής παραγωγής σε έναν από τους κυριότερους ρυπαντές του περιβάλλοντος. Στο κεφάλαιο αυτό θα εξετάσουμε αναλυτικά τις δυσμενείς επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων στον άνθρωπο και σε άλλους οργανισμούς.

Η γενοτοξική δράση μιας εν δυνάμει μεταλλαξιγόνου ένωσης εξαρτάται άμεσα από το στόχο της τελευταίας στο κύτταρο. Κάποια χημικά θα πρέπει πρώτα να μεταβολιστούν για να αποκτήσουν μεταλλαξιγόνες ιδιότητες. Οι μεταλλαξιγόνες ενώσεις μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στο γενετικό υλικό, στοχεύοντας απευθείας στο DNA ή/και έμμεσα μέσω πρόσδεσής τους σε πρωτεΐνες που ευθύνονται για τη διατήρηση της ορθής πληροφορίας του γενετικού υλικού (Εικόνα 1) [57]. Για παράδειγμα, η ιοντίζουσα ακτινοβολία έχει άμεση δράση στο DNA αυξάνοντας τα θραύσματα τόσο στην μονή (Single Strand Breaks, SSBs), όσο και στη διπλή έλικα του DNA (Double Strand Breaks, DSBs). Η έμμεση δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας εμφανίζεται όταν ένα πρωτόνιο αλληλεπιδράσει με ένα μόριο νερού προκαλώντας υδρόλυση και δημιουργία ελευθέρων ριζών, οι οποίες με τη σειρά τους επενεργούν επί του DNA και των πρωτεϊνών [58,59] (Εικόνα 2, βλέπε και σχόλια επί της λεζάντας).

Ενώσεις όπως οι nocodazole και carbendazim [60,61,62], που προκαλούν κακή λειτουργία της τουμπουλίνης, προκαλούν βλάβες στη μιτωτική άτρακτο με συνέπεια κακό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση [63]. Αν και οι γνώσεις μας για την δομή των χρωμοσωμάτων δεν είναι ολοκληρωμένες, η έρευνα έχει δείξει ότι οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες αποτελούν άμεσο αποτέλεσμα της βλάβης του DNA, για παράδειγμα, χρωμοσωματικά θραύσματα μπορεί να προκύψουν από μη επιδιόρθωση θραύσεων στη διπλή έλικα του DNA [64]. Η αλληλεπίδραση μεταξύ μεταλλαξιγόνων παραγόντων και κυττάρου μπορεί να οδηγήσει σε διαφόρων ειδών βλάβες στο γενετικό υλικό. Τέτοιες



μπορεί να είναι, σημειακές χημικές αλλοιώσεις στο DNA (DNA adducts), αλκαλίωση σε ευαίσθητων σε αλκάλια περιοχών του DNA (alkalilabile sites), θραύσεις στην αλυσίδα (strand breaks) και σημειακές αλλαγές ή ευρύτερες αλλαγές γονιδίων (gene mutations) έως δομικές αλλαγές (chromosome mutations) ή αλλαγή στον αριθμό των χρωμοσωμάτων (genome mutations).

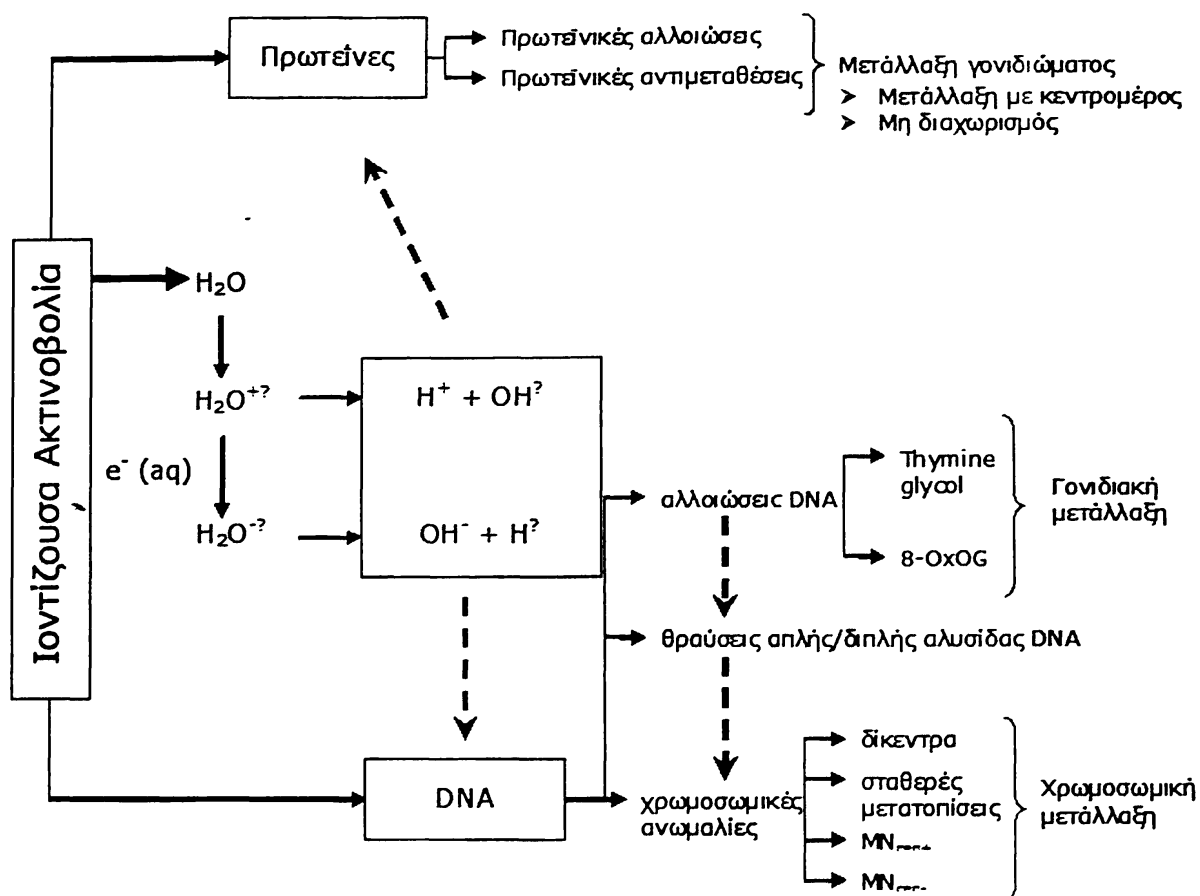


Εικόνα 1. Μηχανισμός δράσης γενοτοξικών παραγόντων.

Οι μεταλλαξιγόνοι παράγοντες μπορούν να δρουν γενοτοξικά και καρκινογενετικά, είτε έχοντας ως στόχο το ίδιο το DNA, είτε δημιουργώντας δεσμούς με πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την διατήρηση της σωστής πληροφορίας του γενετικού υλικού (π.χ. τουμπουλίνες, ένζυμα επιδιόρθωσης DNA, πρωτεΐνες που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο κτλ.). Οι μη γενοτοξικές ενώσεις μπορούν να προκαλέσουν καρκινογένεση αυξάνοντας το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων (π.χ. μιτογόνα), αλλάζοντας τη μεθυλίωση του DNA, ή προκαλώντας κυτταροτοξικότητα. Μια καρκινογόνος ένωση μπορεί να επηρεάσει τον κυτταρικό κύκλο, άμεσα και έμμεσα, προκαλώντας κυτταροτοξικότητα. Απόπτωση προκαλούν αρκετοί τύποι γενοτοξικών παραγόντων. Η εκτεταμένη καταστροφή των κυττάρων μέσω της απόπτωσης, μπορεί να προκαλέσει αλλαγή στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ούτως ώστε να μη λειτουργήσουν οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί. Συνεπώς, η καρκινογένεση είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ της μετάλλαξης, των επιγενετικών αλλαγών, του κυτταρικού κύκλου και του θανάτου του κυττάρου [απόδοση από R. Mateuca et al., 2006].

Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι οι χρωμοσωματικές απώλειες και ο μη σωστός διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων αποτελούν σημαντικές διεργασίες τόσο σε καρκινικές καταστάσεις όσο και στη γήρανση του κυττάρου. Οι τελευταίες αυτές αλλαγές πιθανόν να προέρχονται από βλάβες στην άτρακτο, στο κεντρομέρος ή σε κακή συμπύκνωση του χρωμοσώματος πριν τη μετάφαση [65,66,67]. Όλες οι ανωτέρω αλλοιώσεις είναι δυνατόν να επιδιορθωθούν, να απαλειφθούν μέσω της απόπτωσης, ή να παραμείνουν. Τελικά η πορεία του κυττάρου ορίζεται από την τύχη που θα έχουν οι διάφορες βλάβες που προκύπτουν [62].





Εικόνα 2. Μηχανισμός δράσης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία δρα πάνω στο DNA προκαλώντας του αλλοιώσεις, θραύσματα στην αλυσίδα του DNA και χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Chromosome type Aberration, CSAs). Η δράση στις πρωτεΐνες οδηγεί σε δημιουργία πρωτεϊνικών αλλοιώσεων και ανημεταθέσεων, οι οποίες, αν δεν επιδιορθωθούν, θα αυξήσουν τις μεταλλάξεις. Η Ραδιόλυση του H_2O από την ιοντίζουσα ακτινοβολία (έμμεση μεταλλαξιογόνος δράση) έχει ως αποτέλεσμα την αποβολή ενός ηλεκτρονίου (e^-) και το σχηματισμό ενός ιονισμένου μορίου νερού ($H_2O^{+·}$). Η παγίδευση του e^- από τα πολικά μόρια του νερού δημιουργεί ένα πολύ ενεργό ένυδρο ηλεκτρόνιο (e^-_{aq}). Αυτό με τη σειρά του δημιουργεί αρνητικά φορτισμένα ιόντα ($H_2O^{-·}$). Τα $H_2O^{+·}$ και $H_2O^{-·}$ είναι ασταθή και αντιδρούν μεταξύ τους για να προκύψει ένα σταθερό ιόν και μια ελεύθερη ρίζα. Με MN_{cen+} συμβολίζονται οι μικροπυρήνες που περιλαμβάνουν το κεντρομέρος και προκύπτουν από απώλεια χρωμοσώματος, ενώ με MN_{cen-} συμβολίζονται οι μικροπυρήνες που προκύπτουν από χρωμοσωμικά θραύσματα και δεν περιλαμβάνουν το κεντρομέρος [απόδοση από R. Mateuca et al., 2006].

3. ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ

Για την εξέταση της ενδεχόμενης γενετικής βλάβης που προκαλούν διάφοροι παράγοντες, μεταξύ των οποίων και τα φυτοφάρμακα, στο γενετικό υλικό του ανθρώπου έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές. Οι πιο διαδεδομένες είναι η ανάλυση ανταλλαγών μεταξύ αδερφών χρωματίδων (Sister Chromatid



Exchange, SCE), η ανάλυση χρωμοσωματικών βλαβών (Chromosomal Aberrations, CA), η ανίχνευση DNA κομητών (Comet Assay) και η τεχνική των μικροπυρήνων (Micronucleus Assay, MN) [68,69,70,71,72,73].

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής επιλέχθηκε η τεχνική των μικροπυρήνων. Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής, σε σχέση με τις υπόλοιπες, αναφέρονται παρακάτω. Τα σημαντικότερα είναι:

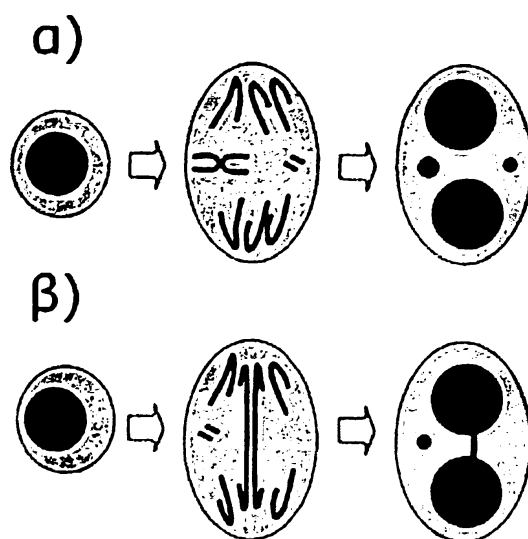
- α) η σχετικά εύκολη διαδικασία καταμέτρησης των βλαβών
- β) η μεγαλύτερη ακρίβεια στη στατιστική ανάλυση καθώς καταμετρώνται περισσότερα κύτταρα σε σχέση με την τεχνική της ανάλυσης μεταφάσεων [74].

3.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ

Στις κλασικές μεθόδους κυτταρογενετικής, τα χρωμοσώματα μελετώνται απευθείας και καταμετρώνται οι ανωμαλίες σε μεταφάσεις [75]. Η μέθοδος αυτή είναι από τις πιο λεπτομερείς. Η πολυπλοκότητα και η δυσκολία της καταμέτρησης σε μεταφάσεις, καθώς επίσης και οι βλάβες οι οποίες μπορούν να προκύψουν κατά την διάρκεια της προετοιμασίας για την τεχνική, μας οδήγησε στην αναζήτηση μιας απλούστερης μεθόδου καταμέτρησης χρωμοσωματικών βλαβών. Οι Schmid [76] και Heddle [77] πρότειναν ότι ένας απλούστερος τρόπος εκτίμησης χρωμοσωματικών βλαβών είναι η καταμέτρηση μικροπυρήνων (MN) σε κυτταρικούς πληθυσμούς όπως ο μυελός των οστών. Η τεχνική των μικροπυρήνων στο μυελό των οστών και σε ερυθροκύτταρα του περιφερικού αίματος αποτελεί σήμερα μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές σε *in vivo* μελέτες. Αρκετά πρωτόκολλα έχουν παράλληλα αναπτυχθεί για την αξιοποίηση της τεχνικής των μικροπυρήνων και σε άλλα εμπύρνηνα κύτταρα. Οι μικροπυρήνες εμφανίζονται σε διαιρούμενα κύτταρα και περιέχουν χρωμοσωματικά θραύσματα (άκεντρα χρωμοσωμικά τμήματα), ή/και ολόκληρα χρωμοσώματα τα οποία δεν κατάφεραν να μεταφερθούν στους πόλους κατά τη



μίτωση. Κατά την τελόφαση, δημιουργείται ένας πυρηνικός φάκελος γύρω από τα θραύσματα και τα χρωμοσώματα αυτά, ο οποίος στη συνέχεια αποκτά παρόμοια μορφολογία με τον πυρήνα με τη διαφορά ότι είναι μικρότερος, εξ ου και ο όρος μικροπυρήνας (Εικόνα 3α). Για το λόγο αυτό, οι μικροπυρήνες αποτελούν αξιόπιστο δείκτη τόσο για τις χρωμοσωματικές απώλειες όσο και για τα χρωμοσωματικά θραύσματα. Επειδή οι μικροπυρήνες καταμετρώνται σε κύτταρα που έχουν πραγματοποιήσει έναν κυτταρικό κύκλο, είναι εύκολο να εντοπιστούν σε ένα διπύρρηνο κύτταρο [78,79].



Εικόνα 3. Διαδικασία δημιουργίας μικροπυρήνων.

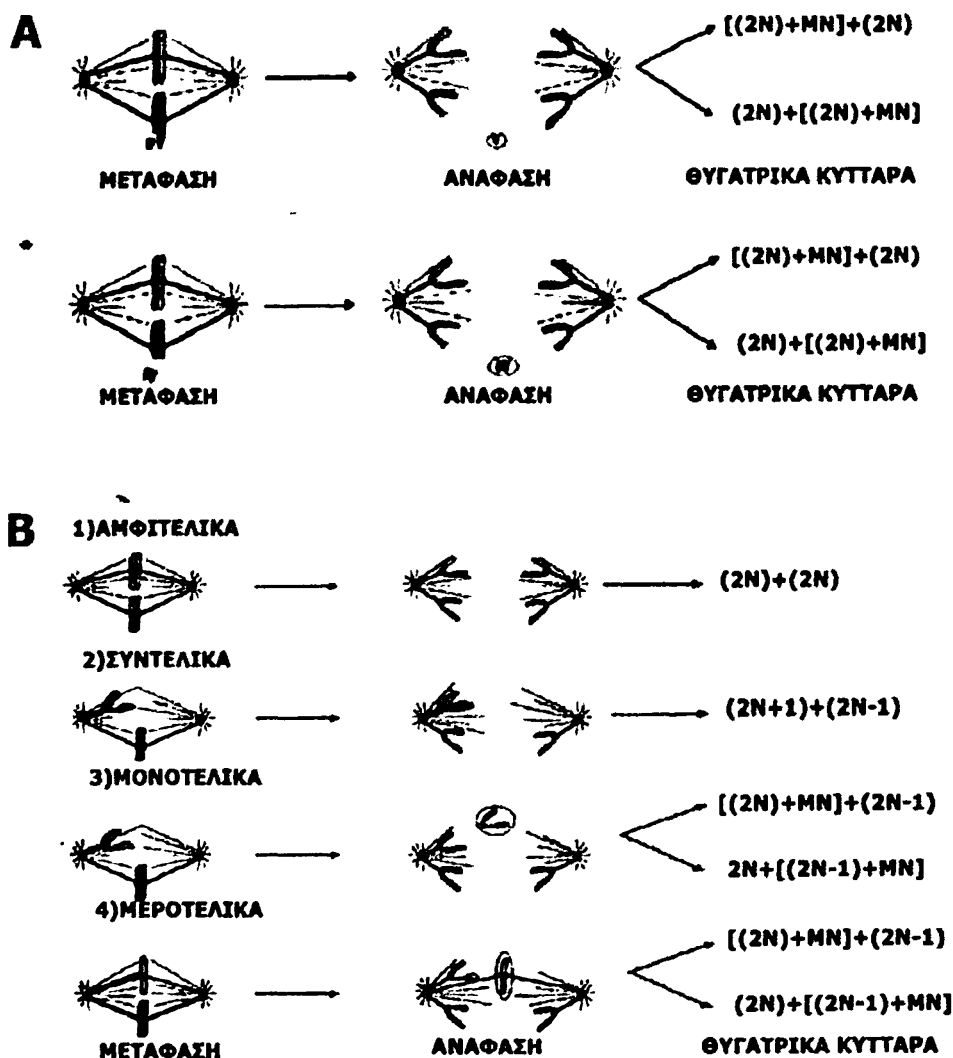
(α) Η δημιουργία του μικροπυρήνα από ολόκληρα χρωμοσώματα και χρωμοσωματικά θραύσματα κατά την ανάφαση (β) Η δημιουργία πυρηνοπλασματικής γέφυρας από ένα δίκεντρο χρωμόσωμα του οποίου τα κεντρομέρη μεταβαίνουν στους δύο πόλους του κυττάρου. Επίσης, παρουσιάζεται ένας μικροπυρήνας που προκύπτει από ένα άκεντρο χρωμοσωματικό θραύσμα. Το παράδειγμα αναφέρεται σε ένα υποθετικό κύτταρο το οποίο αποτελείται από δύο μόνο χρωμοσωματικά ζεύγη.

Κάποιες φορές, παρατηρούνται πυρηνοπλασματικές γέφυρες μεταξύ των πυρήνων των διπύρρηνων κυττάρων. Αυτές προκύπτουν από κάποιο δίκεντρο χρωμόσωμα του οποίου τα δύο κεντρομέρη διαχωρίζονται στους δύο απέναντι πόλους και το γενετικό υλικό που υπάρχει ανάμεσα καλύπτεται με πυρηνική μεμβράνη (Εικόνα 3β). Έτσι η πυρηνοπλασματική γέφυρα μπορεί να αποτελέσει ένα ακόμα δείκτη για την εκτίμηση γενετικών βλαβών ταυτόχρονα με την καταμέτρηση των μικροπυρήνων.

Η μη σωστή επιδιόρθωση δύο χρωμοσωμικών θραυσμάτων μπορεί να οδηγήσει σε μια ασύμμετρη χρωμοσωμική ανακατανομή, δηλαδή σε ένα δίκεντρο χρωμόσωμα και σε ένα άκεντρο τμήμα. Είναι προφανές από τα παραπάνω, ότι οι μικροπυρήνες εμφανίζονται μόνο σε διαιρούμενα ευκαρυωτικά κύτταρα. Με άλλα λόγια, η τεχνική δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κύτταρα που δεν διαιρούνται ή που η κινητική της διαίρεσής τους δεν είναι πλήρως κατανοητή. Συγχρόνως, εξαιτίας της αβεβαιότητας για την τύχη των μικροπυρήνων σε κύτταρα που έχουν ολοκληρώσει περισσότερους από έναν κυτταρικό κύκλο, είναι αναγκαία η αναγνώριση κυττάρων που έχουν ολοκληρώσει μόνο έναν κύκλο. Θα πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη ότι τα κύτταρα διαιρούνται με διαφορετικό ρυθμό κάτω από *in vivo* και *in vitro* συνθήκες και ο οποίος εξαρτάται από διάφορες φυσικές και γενετικές συνθήκες καθώς και από τα θρεπτικά που υπάρχουν στο μικροπεριβάλλον τους. Αρκετές μέθοδοι έχουν προταθεί για την εκτίμηση της εμφάνισης των μικροπυρήνων. Η πιο συνήθης είναι αυτή με τη χρήση της κυτταροχλασίνης -B [Cyt-B] (Cytokinesis Block Micronuclei, CBMN) εξαιτίας της απλότητάς της [78,79,80].

Οι μικροπυρήνες που περιέχουν ολόκληρα χρωμοσώματα προκύπτουν, ως επί το πλείστον, από δυσλειτουργία του μηχανισμού διαχωρισμού του γενετικού υλικού του κυττάρου, κατά τη μίτωση, που μπορεί να προέρχεται από: α) ανωμαλίες των γονιδίων που ελέγχουν το κυτταρικό κύκλο, β) βλάβη στη μιτωτική άτρακτο, στον κινητοχώρο ή σε άλλα τμήματα της μιτωτικής συσκευής, γ) βλάβη σε χρωμοσωμικές υπομονάδες, μηχανικές θραύσεις [81] και δ) υπομεθυλίωση του DNA [82]. Μικροπυρήνες μπορεί επίσης να δημιουργηθούν μέσω γονιδιακής επαύξησης με τον κυκλικό σχηματισμό γεφυρών – θραύσης – ένωσης (breakage-fusion-bridge, BFB) όταν το επανασυνδεόμενο DNA επιλεκτικά εντοπίζεται σε ιδιαίτερα σημεία στην περιφερική περιοχή του πυρήνα και απομακρύνονται μέσω πυρηνικής εκβλάστησης (nuclear budding, NBUD) κατά την S φάση του κυτταρικού κύκλου [83]. Στην Εικόνα 4 παρουσιάζονται οι πιθανοί τρόποι σχηματισμού των μικροπυρήνων [83,84].

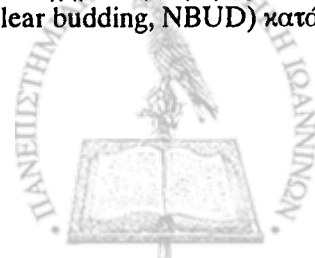


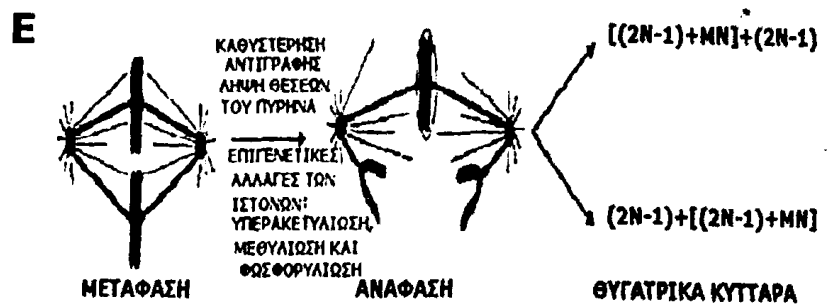
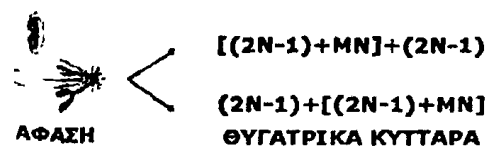
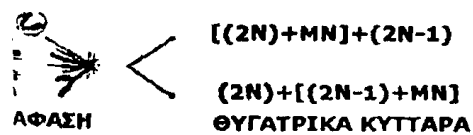
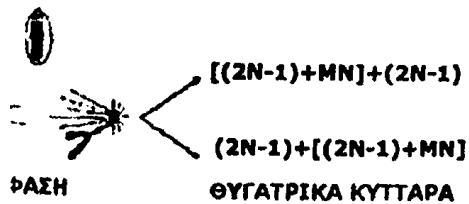
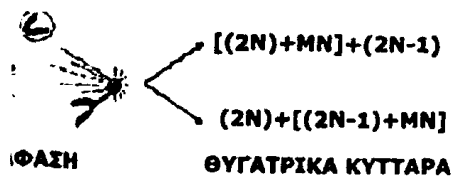


Εικόνα 4. Μηχανισμοί σχηματισμού Μικροπυρήνων.

Οι MN σχηματίζονται κυρίως από:

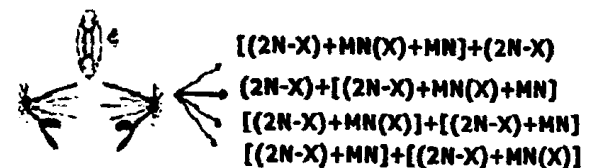
- Α) 1 άκεντρο χρωμοσωμικά θραύσματα που προκύπτουν από θραύσεις του DNA
- 2 ολόκληρα χρωμοσώματα που καθυστερούν στην ανάφαση εξαιτίας της κακής πρόσδεσης στα ινίδια τομπουλίνης του κιν
- Β) αποπολυμερισμό της τομπουλίνης
- Γ) βλάβη του κεντρομερικού DNA, των πρωτεϊνών του κινητοχώρου
- Δ) καθυστερημένος διπλασιασμός και επιγενετικές αλλαγές των ιστονών
- Ε) εμφάνιση πυρηνοπλασματικών γεφυρών
- ΣΤ.1) και ΣΤ.2) Όταν δεν πραγματοποιείται σωστή επιδιόρθωση σε δύο χρωμοσωμικά θραύσματα ΣΤ.1) μπορεί να δη
- Εναλλακτικά, ένα δίκεντρο χρωμόσωμα μπορεί να προκύψει από σύντηξη τελομερών ΣΤ.2). Τα κεντρομερή του δίκεντ
- μεταξύ των δυο θυγατρικών πυρήνων. Στην πρώτη περίπτωση ΣΤ.1), τόσο το χρωμοσωμικό θραύσμα όσο και το
- πυρηνοπλασματικής γέφυρας (NPB) ΣΤ.1) και ΣΤ.2).
- Μικροπυρήνες μπορεί επίσης να δημιουργηθούν μέσω γονιδιακής επαύξεσης με τον κυκλικό σχηματισμό γεφυρών - θρα
- περιφερειακή περιοχή του πυρήνα και απομακρύνονται μέσω πυρηνικής εκβλάστησης (nuclear budding, NBUD) κατά τη





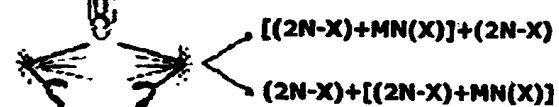
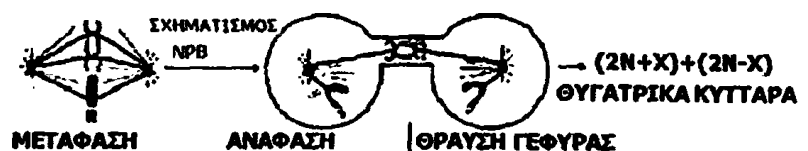
ΣΤ1

ΚΑΚΗ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΚΑΙ/Η ΘΡΑΥΞΗ ΓΕΦΥΡΑΣ



ΣΤ2

ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΘΡΑΥΞΗ ΓΕΦΥΡΑΣ



ητοχώρου

Μιουργηθεί μια ασύμμετρη αναδιάταξη στο χρωμόσωμα δημιουργώντας ένα δίκεντρο χρωμόσωμα και ένα χρωμοσωμικό θραύσμα. Τον χρωμοσώματος διατάσσονται στους δύο πόλους του κυττάρου στην ανάφαση δημιουργώντας πυρηνολασματική γέφυρα (NPB). Το δίκεντρο χρωμόσωμα θα σχηματίσουν MN. Και στις δύο περιπτώσεις μικροπυρήνας μπορεί να προκύψει από θραύση της

ύσης - ένωσης (breakage-fusion-bridge, BFB) όταν το επανασυνδεόμενο DNA επιλεκτικά εντοπίζεται σε συγκεκριμένα σημεία στη S φάση του κυτταρικού κύκλου (απόδοση από R. Mateuca et al., 2006).



Η πορεία των μικροπυρήνων στο κύτταρο δεν έχει κατανοηθεί ακόμη πλήρως, αλλά περιλαμβάνει τις εξής περιπτώσεις:

- απαλοιφή των κυττάρων με μικροπυρήνα μέσω της απόπτωσης [62]
- αποβολή από το κύτταρο (όταν το DNA που περιέχει ο μικροπυρήνας δεν είναι λειτουργικό) [85]
- ενσωμάτωση ξανά στον πυρήνα (όταν το χρωμόσωμα του μικροπυρήνα δεν μπορεί να διαχωριστεί από αυτό του πυρήνα και υπάρχει περίπτωση να ανακτήσει κανονικά βιολογική δράση) [85]
- διατήρησή του στο κυτταρόπλασμα σαν ξεχωριστό μόρφωμα (όταν ο μικροπυρήνας μπορεί να πολλαπλασιάζεται ανεξάρτητα) [85].

3.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΧΑΛΑΣΙΝΗΣ – Β (CBMN)

Η μεθοδολογία της καταμέτρησης των MN στηρίζεται στην αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης. Η κυτταρική διαίρεση προάγεται από τη σύμπραξη ινιδίων ακτίνης και μυοσίνης που δημιουργούν δακτύλιο περίσφιξης γύρω από την περιοχή της ισημερινής πλάκας. Η αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης επιτυγχάνεται με την αποδιοργάνωση του δακτυλίου αυτού από την κυτταροχλασίνη – Β που είναι αναστολέας του πολυμερισμού της ακτίνης [86]. Η χρήση της κυτταροχλασίνης -Β, επιτρέπει την συλλογή (προώθηση) όλων των κυττάρων στη διπύρηνη φάση ανεξαρτήτως του συγχρονισμού και του ποσοστού διαίρεσης των κυττάρων. Στη συνέχεια, εφόσον υπάρχουν μικροπυρήνες, καταμετρώνται μόνο σε διπύρηνα κύτταρα καθιστώντας έτσι εφικτή τη σύγκριση μεταξύ κυτταρικών πληθυσμών που μπορεί να διαφέρουν ως προς την κίνητική της διαίρεσης.

Η τεχνική αρχικά χρησιμοποιήθηκε σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων [78,79], αλλά σήμερα χρησιμοποιείται εξίσου σε κυτταρικές



σειρές όπως είναι κύτταρα όγκων καθώς και σε κύτταρα του μυελού των οστών [87,88]. Επιπλέον, νέες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί οι οποίες επιτρέπουν:

- α) τη διάκριση μεταξύ των μικροπυρήνων που περιέχουν ολόκληρο χρωμόσωμα και αυτών που περιέχουν ολόκληρα χρωμοσωμικά θραύσματα [89,90,91,92,93,94],
- β) τη μετατροπή των περιοχών αποτίμησης – επιδιόρθωσης προς MN κατά τη διάρκεια ενός κυτταρικού κύκλου [95],
- γ) τη χρήση μοριακών ανιχνευτών για να διακρίνουμε τα γεγονότα του μη διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων σε διπύρρηνα κύτταρα [96,97,98],
- (δ) την καταγραφή νεκρών και αποπτωτικών κυττάρων [99,100]. Πρόσφατα προτάθηκε να αντικατασταθεί η ανάλυση μεταφάσεων με την τεχνική των μικροπυρήνων στη γενετοξική ανάλυση νέων χημικών [101].

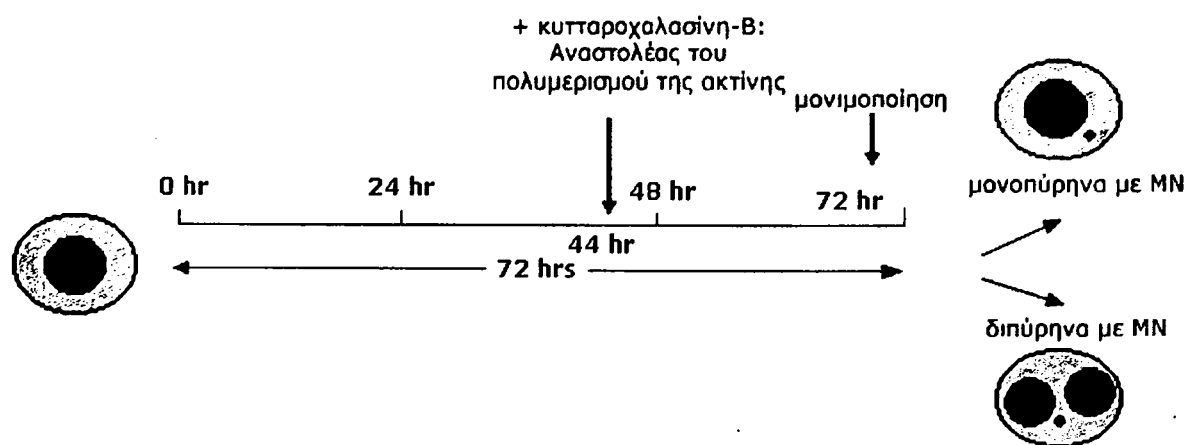
Η τεχνική της εκτίμησης των MN με τη χρήση της κυτταροχαλασίνης-B περιγράφεται στη συνέχεια.

Η καταμέτρηση των μικροπυρήνων αποτελεί μια σχετικά εύκολη διεργασία, που μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διάφορους τύπους κυττάρων όπως είναι τα λεμφοκύτταρα, οι ινοβλάστες και τα επιθηλιακά κύτταρα. Οι μικροπυρήνες που παρατηρούνται στα επιθηλιακά κύτταρα δεν σχηματίζονται όταν τα κύτταρα βρίσκονται στο επιθήλιο, αλλά όταν τοποθετούνται σε βασικό υπόστρωμα. Αν και οι μικροπυρήνες μπορεί να υπάρχουν και σε κύτταρα *in vivo* η τεχνική απαιτεί *ex vivo* πυρηνική διαίρεση. Για τον λόγο αυτόν οι Fenech και Morley [79] ανέπτυξαν την ευρύτατα διαδεδομένη σήμερα τεχνική της εκτίμησης των μικροπυρήνων με τη χρήση της κυτταροχαλασίνης - B.

Η παρουσία κυτταροχαλασίνης-B, σε μια *ex vivo* ή *in vitro* καλλιέργεια λεμφοκυττάρων, που προστίθεται σε αυτήν 44 ώρες μετά την έναρξη της, μας δίνει τη δυνατότητα του διαχωρισμού μεταξύ μονοπύρηνων κυττάρων, που δεν έχουν διαιρεθεί, και διπύρηνων, τα οποία έχουν περάσει μία πυρηνική διαίρεση κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Στην πραγματικότητα, υπό αυτές τις συνθήκες, το ποσοστό των μονοπύρηνων, κυττάρων που περιέχουν MN,

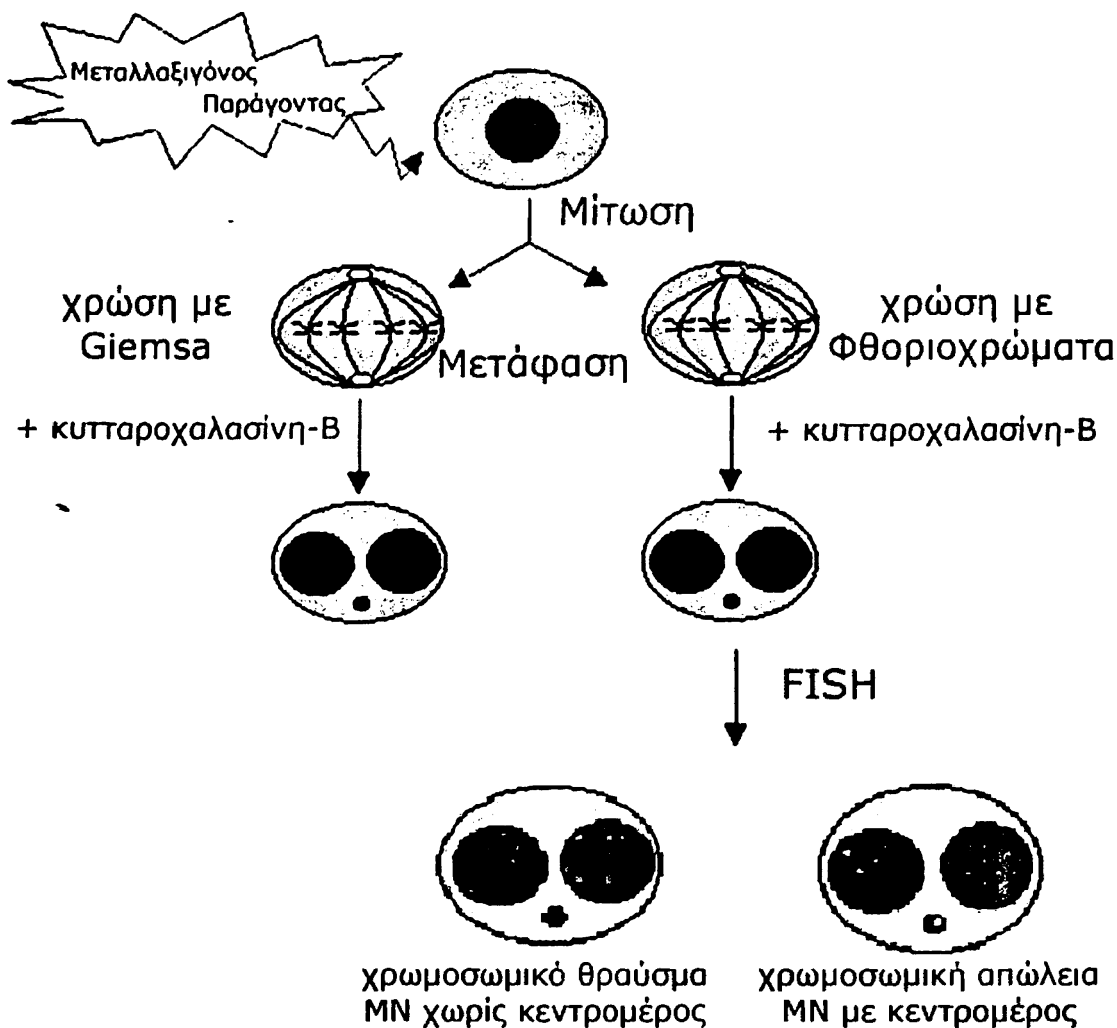


αποτελεί δείκτη των μεταλλάξεων που έχουν συμβεί *in vivo*, ενώ το ποσοστό των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα, αντικατοπτρίζει το βαθμό των βλαβών που εμφανίστηκαν πριν την καλλιέργεια και κατά το πρώτο *in vitro* μιτωτικό κύκλο (Εικόνα 5). Περαιτέρω, έχει βρεθεί σε περιπτώσεις που έχουμε παρουσία αναστολέων της πυρηνικής ατράκτου, τα κύτταρα μπορεί να δημιουργήσουν τετραπλοϊδίες με ή χωρίς μικροπυρήνα [102]. Για το λόγο αυτό συνιστάται και η καταμέτρηση των μονοπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα [103]. Τα κριτήρια καταμέτρησης των μικροπυρήνων αναπτύχθηκαν και εξελίσσονται από το Human MicroNucleus International Collaborative Project (HUMN) (<http://www.humn.org>).



Εικόνα 5. Η τεχνική των μικροπυρήνων με την χρήση κυτταροχαλασίνης - B *in vitro* (απόδοση από R. Mateuca et al., 2006).

Ο συνδυασμός της τεχνικής των μικροπυρήνων με την *in situ* υβριδοποίηση με φθοριοχρώματα (FISH) με πανκεντρομερικούς ανιχνευτές μας δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού των μικροπυρήνων που περιέχουν χρωμοσωμικά θραύσματα, από αυτούς που περιέχουν άθιχτα χρωμοσώματα (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Συνδυασμός της τεχνικής των μικροπυρήνων με FISH. Η χρήση της FISH με πανκεντρομερικούς ανιχνευτές μας δίνει την δυνατότητα να διαχωρίσουμε τα χρωμοσωμικά θραύσματα (clastogen) από τις χρωμοσωμικές απώλειες (aneugen) (απόδοση από R. Mateuca et al., 2006).

Η τεχνική συνήθως εφαρμόζεται σε λεμφοκύτταρα του ανθρώπινου περιφερικού αίματος, αλλά μπορεί να εφαρμοστεί και σε πολλές άλλες κυτταρικές σειρές. Τα λεμφοκύτταρα καλλιεργούνται παρουσία φυτοαιμαγλουτινίνης (PHA), ουσίας που διεγείρει τον πολλαπλασιασμό τους. Σαράντα τέσσερις ώρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας προστίθεται η κυτταροχαλασίνη - B. Η χρήση αυτού του αναστολέα του πολυμερισμού της ακτίνης σταματάει την κυτταρική διαίρεση, καθιστώντας δυνατή την διάκριση μεταξύ διπύρηνων κυττάρων (κύτταρα που έχουν διαιρεθεί μία φορά στην καλλιέργεια) και μονοπύρηνων



(κύτταρα που δεν έχουν διαιρεθεί ή στα οποία δεν έδρασε η Cyt - B). Εβδομήντα δύο ώρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας (28 ώρες από την προσθήκη της Cyt - B) τα κύτταρα, διογκώνονται με υποτονικό διάλυμα, μονιμοποιούνται, μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και βάφονται [63].

3.3. ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ

Βασική αρχή για την παρατήρηση και καταμέτρηση των αλλοιώσεων που είναι δυνατόν να μελετηθούν με την CBMN είναι η ασφαλής και ανεπηρέαστη από προσωπικούς παράγοντες καταγραφή των δεδομένων. Για το λόγο αυτόν τα μικροσκοπικά παρασκευάσματα κωδικοποιούνται πριν από την οποιαδήποτε ανάλυση. Τα κωδικοποιημένα παρασκευάσματα, παρατηρούνται σε φωτονικό μικροσκόπιο με μεγέθυνση 1000 X. Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα, θα πρέπει να καταμετρώνται τουλάχιστον 1000 διπύρηνια και 2000 συνολικά κύτταρα για τον υπολογισμό διαφόρων δεικτών. Επίσης, για κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα θα πρέπει να καταγράφονται τα εξής:

1. Ο αριθμός των μικροπυρήνων σε 1000 διπύρηνια κύτταρα (BN).
2. Η κατανομή των διπύρηνων με κανέναν, έναν ή έως και 3 μικροπυρήνες.
3. Το ποσοστό των διπύρηνων με μικροπυρήνα σε σύνολο 1000 διπύρηνων.
4. Το ποσοστό των μονοπύρηνων, διπύρηνων, τριπύρηνων και τετραπύρηνων κυττάρων σε σύνολο 2000 κυττάρων. Από το ποσοστό αυτό προκύπτει ο δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων, ένας δείκτης που αναφέρεται λεπτομερώς παρακάτω.

Για τον ασφαλέστερο υπολογισμό του ποσοστού των MN είναι προτιμότερο να μη συνυπολογιστούν κύτταρα για την κατάσταση των οποίων δεν είμαστε απόλυτα βέβαιοι.



Τα βασικά χαρακτηριστικά ενός φύλλου καταμέτρησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 [104].

Πίνακας 1. Πληροφορίες που πρέπει να καταγράφονται σε ένα φύλλο μέτρησης για την τεχνική CBMN.	
1	Ο κωδικός αριθμός του κάθε παρασκευάσματος
2	Ο αριθμός των διπύρηνων που καταμετρήθηκαν
3	Η κατανομή των διπύρηνων με 0, 1, 2, 3 μικροπυρήνες
4	Ο συνολικός αριθμός των μικροπυρήνων σε διπύρηνα κύτταρα
5	Το ποσοστό των μικροπυρήνων σε 1000 διπύρηνα κύτταρα
6	Το ποσοστό των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα σε 1000 διπύρηνα
7	Το ποσοστό των μονοπύρηνων, διπύρηνων, τριπύρηνων και τετραπύρηνων κυττάρων σε 2000 κύτταρα
8	Ο δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων (Cytokinesis Block Proliferation Index, CBPI)

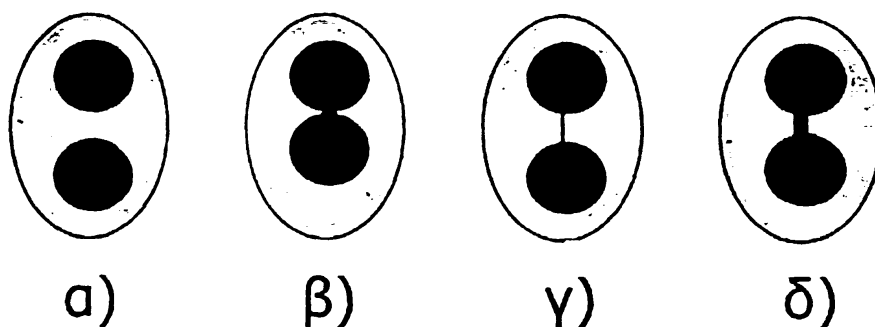
3.4 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΔΙΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1. Τα κύτταρα πρέπει να έχουν δύο πυρήνες.
2. Οι δύο πυρήνες του διπύρηνου κυττάρου θα πρέπει να έχουν ξεκάθαρα όρια και να βρίσκονται μέσα στο ίδιο κυτταρόπλασμα.
3. Οι δύο πυρήνες θα πρέπει να έχουν περίπου το ίδιο μέγεθος και παρόμοια χρώση.
4. Οι δύο πυρήνες μπορούν να ενώνονται μεταξύ τους με πυρηνοπλασματική γέφυρα η οποία δε θα πρέπει να ξεπερνάει σε μήκος το 1/4 της διαμέτρου του πυρήνα.



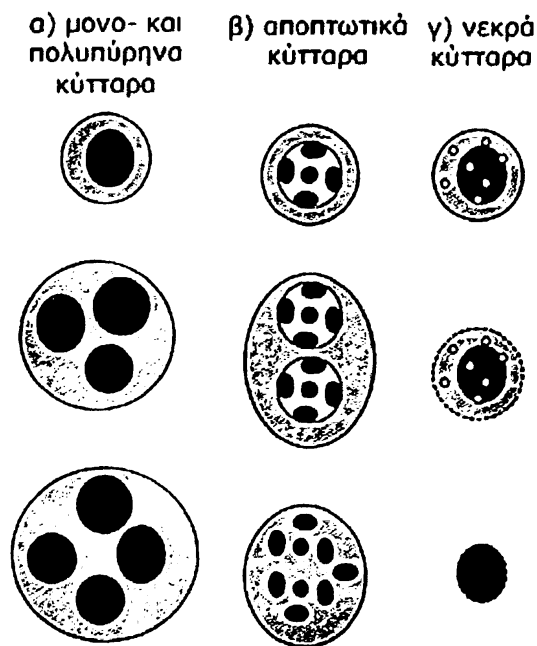
5. Οι δύο πυρήνες μπορούν να εφάπτονται μεταξύ τους αλλά όχι να αλληλεπικαλύπτονται. Ένα κύτταρο με επικαλυπτόμενους πυρήνες μπορεί να καταμετρηθεί μόνο εφόσον υπάρχουν ξεκάθαρα όρια και για τους δύο πυρήνες.
6. Τα όρια του κυτταροπλάσματος του κυττάρου θα πρέπει να είναι ξεκάθαρα σε σχέση με τα γειτονικά του κύτταρα [104].

Παραδείγματα διπύρηνων κυττάρων που καταμετρούνται παρουσιάζονται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7. Κριτήρια επιλογής διπύρηνων κυττάρων της τεχνικής CBMN. (α) Ιδανικό διπύρηνο κύτταρο, (β) Διπύρηνο κύτταρο με εφαιπτόμενους πυρήνες, (γ) Διπύρηνο κύτταρο με λεπτή πυρηνοπλασματική γέφυρα, (δ) Διπύρηνο κύτταρο με μεγαλύτερη πυρηνοπλασματική γέφυρα (απόδοση από M. Fenech et al., 2003).

Στην Εικόνα 8 παρουσιάζονται τα είδη των κυττάρων που μπορούν να παρατηρηθούν σε ένα τυπικό παρασκεύασμα της τεχνικής των μικροπυρήνων με χρήση κυτταροχαλασίνης – Β και δεν πρέπει να καταμετρώνται οι τυχόν μικροπυρήνες που υπάρχουν σε αυτά.



Εικόνα 8. Διάφοροι τύποι κυττάρων που μπορούν να παρατηρηθούν σε ένα παρασκεύασμα CBMN. Στα κύτταρα αυτά δεν πρέπει να καταμετρώνται οι τυχόν μικροπυρήνες που εμφανίζονται σε: (α) μονοπύρηνα, τριπύρηνα, τετραπύρηνα κύτταρα, (β) μονοπύρηνα και διπύρηνα κύτταρα σε πρώιμα και προχωρημένα στάδια απόπτωσης, (γ) κύτταρα σε διάφορα στάδια νέκρωσης (απόδοση από M. Fenech et al., 2003).

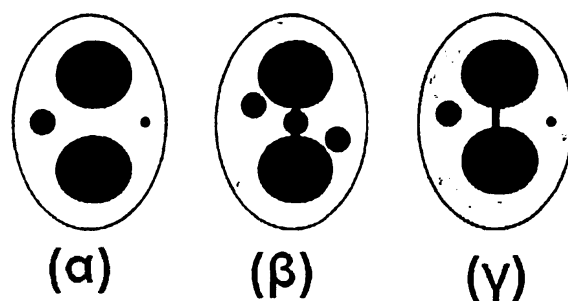
3.5 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ

Οι μικροπυρήνες μορφολογικά είναι παρόμοιοι με τον πυρήνα αλλά έχουν μικρότερο μέγεθος. Τα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται παρακάτω:

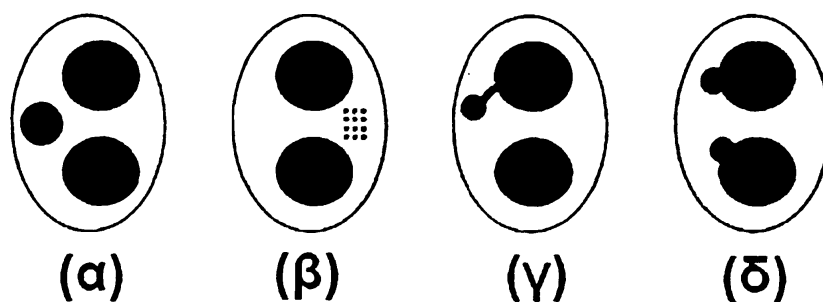
1. Η διάμετρος του μικροπυρήνα κυμαίνεται μεταξύ 1/16 και 1/3 του κυρίως πυρήνα
2. Οι μικροπυρήνες δεν παρουσιάζουν διαθλαστικότητα και έτσι μπορούν να διαχωριστούν από τυχόν λεκέδες από συσσωματώματα χρωστικής
3. Οι μικροπυρήνες δεν ενώνονται με τον πυρήνα
4. Οι μικροπυρήνες μπορεί να βρίσκονται σε επαφή με τον πυρήνα, αλλά θα πρέπει να έχουν σαφή όρια

5. Οι μικροπυρήνες συνήθως έχουν την ίδια απόχρωση με τους πυρήνες [104].

Παραδείγματα μικροπυρήνων παρουσιάζονται στην Εικόνα 9. Ενώ, στην Εικόνα 10 παρουσιάζονται μορφώματα που μοιάζουν με μικροπυρήνες, αλλά δε θα πρέπει να καταμετρώνται ως τέτοιοι.



Εικόνα 9. Τυπικές εικόνες και μεγέθη μικροπυρήνων σε διπύρρηνα κύτταρα: (α) κύτταρο με δύο μικροπυρήνες, ο ένας έχει διάμετρο $1/3$ και ο άλλος $1/9$ του πυρήνα, (β) μικροπυρήνες που εφάπτονται, αλλά δεν επικαλύπτουν τους πυρήνες, (γ) διπύρρηνο κύτταρο με δύο μικροπυρήνες και μία πυρηνοπλασματική γέφυρα (απόδοση από M. Fenech et al., 2003).



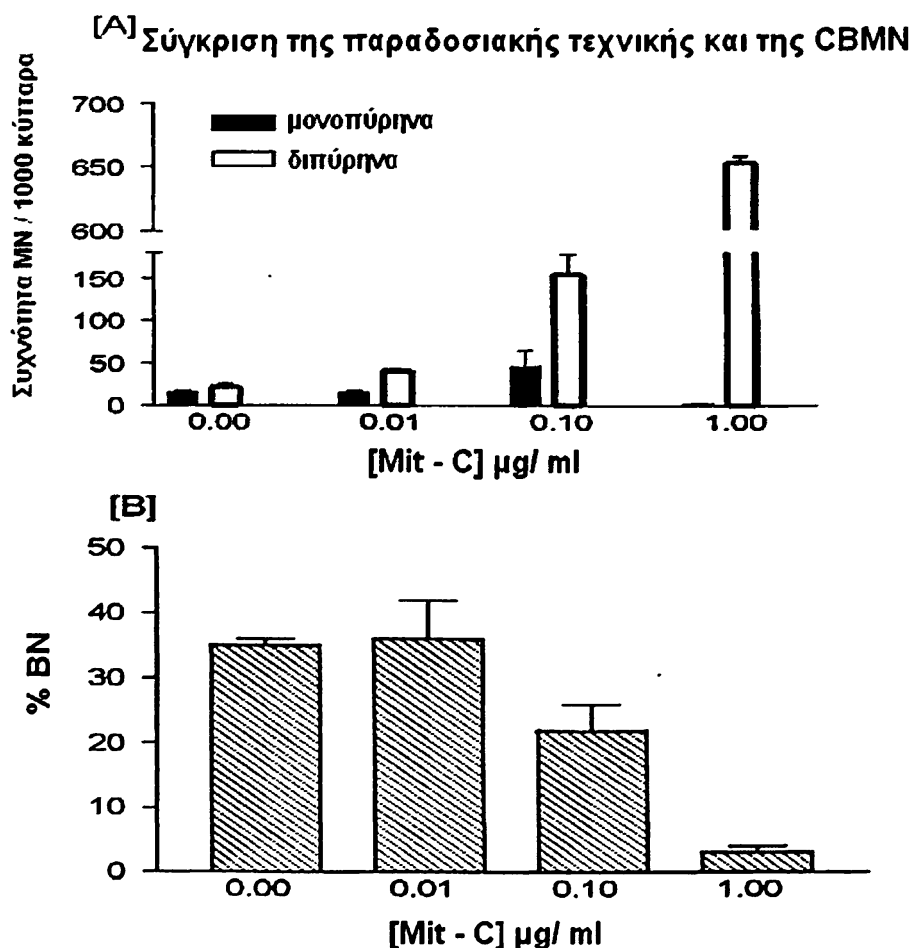
Εικόνα 10. Μορφώματα που παρουσιάζονται σε διπύρρηνα κύτταρα που μοιάζουν με μικροπυρήνες, αλλά δε θα πρέπει να καταμετρώνται. (α) Τριπύρρηνο κύτταρο του οποίου ο ένας πυρήνας είναι μικρότερος από τους άλλους δύο, αλλά η διάμετρός του είναι μεγαλύτερη από $1/3$ συγκριτικά με τους άλλους δύο, (β) έντονη χρώση μίας συγκεκριμένης περιοχής του κυτταροπλάσματος, (γ) υλικό που έχει αποβληθεί από τον πυρήνα και ενώνεται με αυτόν με μία μικρή πυρηνοπλασματική γέφυρα, (δ) μορφώματα που είναι ξεκάθαρα ενωμένα με τον πυρήνα (απόδοση από M. Fenech et al., 2003).

3.6 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ

Αρχικά, θεωρήθηκε ότι θα μπορούσαμε να διαχωρίσουμε τα κύτταρα ανάλογα με τη φάση στην οποία βρίσκονται καταμετρώντας το ποσοστό των διαιρούμενων κυττάρων με χρήση σταθοκινητικών τεχνικών (πχ. της ουσίας Βρωμοδεοξουριδίνης, BrdU) [57,105]. Το πρόβλημα όμως με τις τεχνικές με χρώση DNA, είναι η αβεβαιότητα στο διαχωρισμό ενός μεσοφασικού κυττάρου που έχει ολοκληρώσει μία πυρηνική διαίρεση από ένα μεσοφασικό κύτταρο που έχει ολοκληρώσει περισσότερες διαιρέσεις, ή ακόμα από ένα μεσοφασικό κύτταρο που βρίσκεται στη G_2 φάση και δεν έχει ακόμα διαιρεθεί ο πυρήνας του. Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι ίδιες ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη χρώση μπορούν να επάγουν βλάβες στο γενετικό υλικό [57]. Οι σταθοκινητικές τεχνικές, απαιτούν παράλληλες καλλιέργειες για τον καθορισμό των κινητικών παραμέτρων. Μια αβεβαιότητα της διαδικασίας αυτής είναι η αδυναμία καλού διαχωρισμού των κυττάρων εκείνων που δεν έχουν συμπληρώσει μια πυρηνική διαίρεση από εκείνα που μόλις έχουν συμπληρώσει μια. Πειραματικά δεδομένα εμφανίζουν ότι το ιδανικό στάδιο για καταμέτρηση μικροπυρήνων είναι το διπύρρηνο στάδιο της τελόφασης [57,106]. Τα κύτταρα, στο στάδιο αυτό, διακρίνονται εύκολα εξαιτίας των δύο πυρήνων που έχουν. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι έχουν υποστεί μία πυρηνική διαίρεση, συνεπώς είναι ικανά να εμφανίσουν μικροπυρήνα. Το επόμενο βήμα υπήρξε να βρεθεί ο μηχανισμός εκείνος που θα μπορούσε να σταματήσει τα κύτταρα στο στάδιο αυτό. Αυτό έγινε εφικτό προσθέτοντας απλά κυτταροχαλασίνη – B στην καλλιέργεια πριν το πρώτο μιτωτικό κύμα μετά την επαγωγή της γενετικής βλάβης [57,58,61]. Τα κύτταρα που έχουν ολοκληρώσει μία πυρηνική διαίρεση εμφανίζονται σαν διπύρρηνα κύτταρα, γιατί η κυτταροχαλασίνη – B αποτρέπει την κυτταρική διαίρεση, αλλά επιτρέπει την πυρηνική [107]. Από τότε που χρησιμοποιήθηκε η κυτταροχαλασίνη – B, η τεχνική των μικροπυρήνων έγινε μία καθιερωμένη μέθοδος στην τοξικολογία. Τα πλεονεκτήματα στην καταμέτρηση των μικροπυρήνων με την τεχνική CBMN σε σχέση με την παλαιότερη τεχνική παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 1.



Η CBMN δεν αποτέλεσε απλά εξέλιξη της τεχνικής των μικροπυρήνων, αλλά έδωσε τη δυνατότητα να μελετηθούν και άλλες παράμετροι της γενοτοξικότητας και της διαίρεσης των κυττάρων [59]. Στην πρώτη μορφή της τεχνικής των μικροπυρήνων, όλα τα κύτταρα εξετάζονταν για εμφάνιση μικροπυρήνων, ανεξάρτητα από το στάδιο πυρηνικής διαίρεσης στο οποίο βρίσκονταν. Επόμενο ήταν, η συχνότητα των μικροπυρήνων που καταγράφονταν να μην αποτελεί



Διάγραμμα 1. (Α) Σύγκριση της συχνότητας των μικροπυρήνων σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα υπό την επίδραση της Μιτομυκίνης-*C* (Mitomycin-*C*, Mit-*C*) με την παλαιότερη μέθοδο των μικροπυρήνων ■ και την CBMN □ . (Β) Ποσοστό των διπύρηνων κυττάρων που καταμετρήθηκαν με την CBMN συναρτήσει της συγκέντρωσης της Mit-*C* (απόδοση από M. Fenech et al., 2003).

απόλυτο δείκτη χρωμοσωμικής βλάβης αλλά να είναι πολύ χαμηλότερη από την απόλυτη τιμή και αυτό γιατί ακόμα και η τεχνική με τον καλύτερο συγχρονισμό, δεν εξασφαλίζει τον ταυτόχρονο διπλασιασμό όλων των κυττάρων. Σε αντίθεση



η CBMN, επιτρέπει την καταγραφή των μικροπυρήνων μόνο σε κύτταρα που έχουν ολοκληρώσει μία πυρηνική διαίρεση. Ο ρυθμός με τον οποίο διπλασιάζονται τα κύτταρα καθώς και το ποσοστό των κυττάρων που ολοκληρώνουν μία πυρηνική διαίρεση, ποικίλει ανάλογα με τη συγκέντρωση του χημικού που προσθέτουμε στην καλλιέργεια. Επίσης, η συχνότητα των μικροπυρήνων ανά κύτταρο στα διπύρηνα κύτταρα, είναι διπλάσια από αυτή που θα παρατηρούσαμε στα θυγατρικά κύτταρα αν τα αφήναμε, να ολοκληρώσουν και την κυτταρική διαίρεση. Αυτό σημαίνει, ότι κάποιος θα έπρεπε να καταμετρήσει τουλάχιστον διπλάσιο αριθμό μονοπύρηνων κυττάρων με την παλαιότερη τεχνική των μικροπυρήνων για να έχει τα ίδια αποτελέσματα με την CBMN [108].

3.7 ΔΕΙΚΤΗΣ ΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (Cytokinesis Block Proliferation Index, CBPI)

Ένα άλλο πλεονέκτημα της CBMN, είναι ο προσδιορισμός της κυτταρικής διαίρεσης σε έναν κυτταρικό πληθυσμό. Αυτό επιτυγχάνεται, καταμετρώντας απλά, τα μονοπύρηνα, διπύρηνα και πολυπύρηνα (περισσότερους από δύο πυρήνες) κύτταρα, από τη στιγμή που προσθέτουμε την κυτταροχλασίνη -B. Ο δείκτης CBPI (γνωστός και ως Nuclear Division Index, NDI) υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο του Eastmond και Tucker [109] (Εξίσωση 1):

$$CBPI = [M_1 + 2M_2 + 3(M_3 + M_4)] / N \quad (1)$$

Όπου, M_1 έως M_4 είναι ο αριθμός των κυττάρων με 1 έως 4 πυρήνες αντίστοιχα σε σύνολο 2000 κυττάρων, που συμβολίζεται με N .

Η καταγραφή του δείκτη CBPI, μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τις επιδράσεις διάφορων περιβαλλοντικών παραγόντων. Μπορούμε να βρούμε μόρια που διεγείρουν τα κύτταρα προς διπλασιασμό, καθώς επίσης και να αντιμετωπίσουμε καταστάσεις ανοσοανεπάρκειας μετρώντας το μιτωτικό δείκτη των λεμφοκυττάρων. Όλα τα παραπάνω, μπορούμε να τα



πραγματοποιήσουμε στα ίδια παρασκευάσματα στα οποία καταμετρώνται οι μικροπυρήνες [59].

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της τεχνικής των μικροπυρήνων, συγκρινόμενη με την ανάλυση μεταφάσεων είναι η ικανότητά της να διακρίνει χρωμοσωμικές απώλειες. Με την τεχνική της ανάλυσης μεταφάσεων ορισμένες φορές δεν είναι εύκολο να εντοπίσουμε χρωμοσωμική απώλεια, διότι η απουσία ενός χρωμοσώματος μπορεί να οφείλεται στη διασπορά μέσα στο παρασκεύασμα. Κάτι ανάλογο δεν συμβαίνει στην τεχνική των μικροπυρήνων, διότι η χρωμοσωμική απώλεια έχει τη μορφή μικροπυρήνα. Η αναγνώριση ενός ολόκληρου χρωμοσώματος στον μικροπυρήνα μπορεί να επιτευχθεί είτε με χρήση αντισωμάτων του κινητοχώρου, είτε με τη χρήση πανκεντρομερικών ανιχνευτών [110,111,112].

Ένα άλλο δεδομένο που μπορεί να μας καταδείξει η τεχνική CBMN είναι το ενδεχόμενο γήρανσης κυττάρων, γενετικής αστάθειας, καθώς και ατομικής ευπάθειας. Έρευνες έχουν επισημάνει ότι παράγοντες που επηρεάζουν τον αριθμό των MN είναι τόσο η ηλικία, όσο και το φύλο ανθρώπων που δεν έχουν εκτεθεί μέσω της επαγγελματικής τους δραστηριότητας σε τοξικές ουσίες [113,114,115]. Η αναγνώριση του κεντρομερικού DNA και των πρωτεϊνών του κινητοχώρου που βρίσκονται στους μικροπυρήνες έδειξαν ότι η αύξηση των μικροπυρήνων συναρτήσει της ηλικίας δίνει κυρίως μικροπυρήνες που περιέχουν ολόκληρα χρωμοσώματα και συνήθως αυτά είναι το **X** και το **Y**. Ανάλογο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και συναρτήσει του φύλου με το **X** χρωμόσωμα να παρουσιάζεται πιο «ευάλωτο» στην δημιουργία μικροπυρήνων [116,117,82].

Η μεγάλη συχνότητα δημιουργίας μικροπυρήνων από το **X** χρωμόσωμα των θηλικών ατόμων δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Εκτιμάται όμως, ότι οφείλεται στο μη ενεργό **X** χρωμόσωμα των ατόμων αυτών, το οποίο φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη «ευαισθησία» με την πάροδο του χρόνου, σε σχέση με το ενεργό ομόλογο του, ή τα υπόλοιπα χρωμοσώματα, όπως έδειξαν πειράματα σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων από νεογέννητα, μεσήλικα και μεγαλύτερης



ηλικίας θηλικά άτομα [117]. Οι Hando *et al.* [118] και Nath *et al.* [119] αναφέρουν ότι ελαττώματα στον κινητοχώρο ή στο κεντρομέρος μπορεί να προκαλέσουν απώλεια του μη ενεργού X χρωμοσώματος. Για παράδειγμα έχει αποδειχτεί ότι το μη ενεργό X χρωμόσωμα παρουσιάζει πρόωρο διπλασιασμό του κεντρομέρους συχνότερα από το ομόλογο του [120]. Παρόλα αυτά υπάρχουν αρκετές έρευνες στις οποίες δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά στην επαγωγή μικροπυρήνων μεταξύ των δύο ομόλογων X χρωμοσωμάτων [115]. Έτσι εξηγείται και το γεγονός του υψηλού ποσοστού επαγωγής μικροπυρήνων από το μοναδικό X χρωμόσωμα που έχουν τα αρσενικά άτομα [121]. Για το φαινόμενο αυτό μπορεί να είναι ακόμη υπεύθυνες και βλάβες στον κινητοχώρο [118,122].

Πρόσφατες μελέτες των Neri *et al.* [123] καταδεικνύουν σημαντική συσχέτιση της επαγωγής των μικροπυρήνων με την ηλικία, σε παιδιά ηλικίας μεταξύ 0 – 18 ετών με σημαντικά χαμηλότερο αριθμό μικροπυρήνων στα νεογέννητα.

Άλλοι παράγοντες, που μπορούν να επηρεάσουν την συχνότητα των μικροπυρήνων, είναι επίκτητες μεταλλάξεις σε γονίδια που είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση βλαβών του DNA.



4. ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΕΤΡΙΑ

Για τη μελέτη της δράσης των φυτοφαρμάκων, καθώς επίσης και για την ανίχνευσή τους σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της καθοδικής προσροφητικής βολταμετρίας με προσυγκέντρωση (Cathodic Adsorptive Stripping Voltammetry, Ad-CSV). Η τεχνική αυτή, ως βολταμετρική μέθοδος, ανήκει στον κλάδο της πολαρογραφίας.

Πρόκειται για μια ηλεκτροανλυτική πολαρογραφική τεχνική στην οποία το ρεύμα στο ηλεκτρόδιο εργασίας μετράται ως συνάρτηση του δυναμικού του ηλεκτροδίου $i = i(E)$. Ως ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμοποιείται το ηλεκτρόδιο της κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (Hanging Mercury Drop Electrode, HMDE). Το δυναμικό του ηλεκτροδίου αναγκάζει τα μόρια ή τα ιόντα που προσροφήθηκαν να αναχθούν ή να οξειδωθούν πάνω στην επιφάνειά του. Το δυναμικό αυτό είναι μια ελεγχόμενη παράμετρος και μπορεί να εφαρμοστεί με πολλούς συστηματικούς τρόπους σε σχέση με το χρόνο, όπως [124,125]:

- γραμμικό
- παλμικό
- εναλλασσόμενο
- κλιμακωτό

Η διεργασία που συμβαίνει πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας, περιγράφεται γενικά από τον παρακάτω μηχανισμό (αντίδραση 1):



Όπου: **Ox** η οξειδωμένη μορφή, **Red** η αναχθείσα μορφή, **e** τα ηλεκτρόνια, **n** η στοιχειομετρία των μεταφερόμενων ηλεκτρονίων από τη μια μορφή στην άλλη.

Στους 25 °C η σχέση μεταξύ του δυναμικού που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας και της συγκέντρωσης της οξειδωμένης και της αναχθείσας μορφής αποδίδεται από την εξίσωση Nernst (2):



$$E = E^{\circ} + \left(\frac{0.059}{n} \right) \log \left(\frac{C_{ox}}{C_{red}} \right) \quad (\text{Volt}) \quad (2)$$

όπου: C_{ox} η συγκέντρωση της οξειδωμένης μορφής, C_{red} η συγκέντρωση της αναχθείσας μορφής, E° είναι το κανονικό δυναμικό στους 25 °C και E το δυναμικό της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης και n είναι η στοιχειομετρία των μεταφερόμενων ηλεκτρονίων από την μια μορφή στην άλλη.

Οι ηλεκτροδραστικές ενώσεις, που προσροφώνται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με διάχυση, δημιουργούν ένα ρεύμα το οποίο προέρχεται από τη μεταβολή της οξειδωτικής τους κατάστασης (ρεύμα Faraday) και περιγράφεται από την εξίσωση Cottrell (3):

$$i = nFA \left(\frac{D}{\pi t} \right)^{\frac{1}{2}} C \quad (3)$$

όπου: i το ρεύμα διάχυσης (Ampere) που διαρρέει το σύστημα σε χρόνο t (sec) από την έναρξη του πειράματος, n ο αριθμός ηλεκτρονίων της ηλεκτροδιακής δράσης, F η σταθερά Faraday, A η επιφάνεια του ηλεκτροδίου (cm^2), D ο συντελεστής διάχυσης (cm^2/s) και C η συγκέντρωση των ηλεκτροδραστικών ενώσεων στο διάλυμα (M)

Αν σαν ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμοποιηθεί το σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (Hanging Mercury Drop Electrode - HDME), τότε η τεχνική ονομάζεται Πολαρογραφία. Η τεχνική αυτή επινοήθηκε από τον Heyrovsky το 1922 (βραβείο Nobel το 1959).

Συγκρίνοντας την πολαρογραφία με άλλες ενόργανες τεχνικές τα κύρια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.



Πίνακας 2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της πολaroγραφίας.	
Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Χαμηλό όριο ανίχνευσης π.χ. $<10^{-8}M$	Εύκολη οξείδωση του Hg
Προσδιορισμός ενεργότητας ιόντος και όχι συγκέντρωσης.	Χαμηλή εκλεκτικότητα έναντι άλλων οπτικών τεχνικών
Οι μετρήσεις δεν είναι καταστροφικές για το δείγμα.	Η πόλωση εξαρτάται από την ιονική ισχύ και το pH του διαλύματος
Συνεχής ανανέωση της επιφάνειας του Hg	Η μέτρηση επηρεάζεται από την παρουσία του διαλυμένου οξυγόνου

Το δυναμικό στο οποίο το ρεύμα είναι ίσο με το μισό του οριακού καλείται δυναμικό ημίσεως κύματος, $E_{1/2}$ (Εικόνα 11). Για μια αντιστρεπτή ηλεκτροδιακή αντίδραση το δυναμικό ημίσεως κύματος ($E_{1/2}$) σχετίζεται με το κανονικό δυναμικό E^0 στους 25 °C με την εξίσωση (4):

$$E_{1/2} = E^0 + \frac{0.059}{n} \log \left(\frac{D_r}{D_o} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

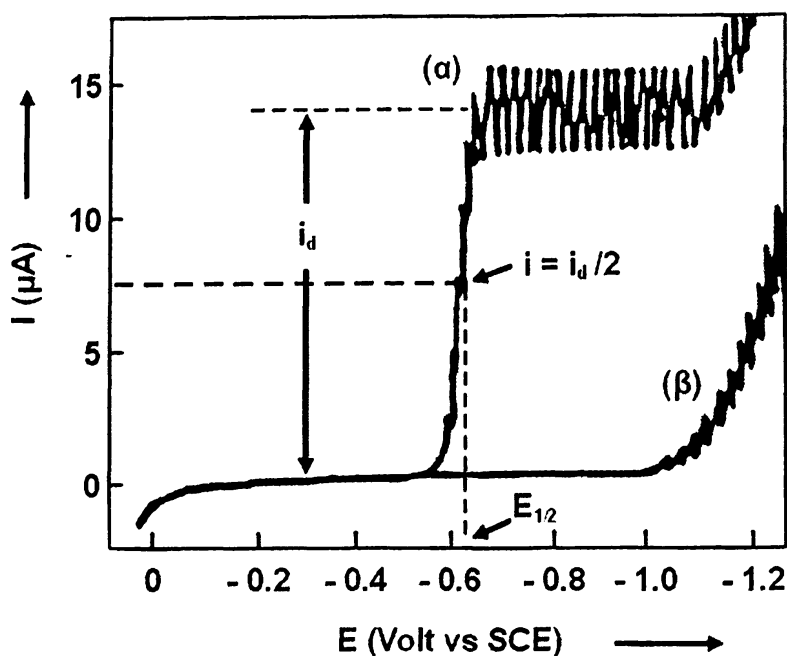
όπου: D_r και D_o είναι οι συντελεστές διάχυσης της αναγμένης και της οξειδωμένης μορφής αντίστοιχα.

Το οριακό ρεύμα διάχυσης i_d στους 25 °C είναι ευθέως ανάλογο με τη συγκέντρωση των ηλεκτροδραστικών ενώσεων σύμφωνα με την εξίσωση του Ilkovic (5):

$$i_d = 708 n F D^{\frac{1}{2}} m^{\frac{2}{3}} t^{\frac{1}{6}} C \quad (5)$$

όπου: i_d το οριακό ρεύμα διάχυσης (μA), n ο αριθμός ηλεκτρονίων που παίρνουν μέρος στην αντίδραση, D ο συντελεστής διάχυσης (cm^2/s), C η συγκέντρωση (mM), m η ταχύτητα ροής του υδραργύρου (mg/s) και t ο ρυθμός πτώσης της σταγόνας υδραργύρου (s)





Εικόνα 11. Πολαρογράφημα αναγωγής α) ιόντων Cd^{2+} σε 1M HCl και β) ηλεκτρολύτη 1M HCl

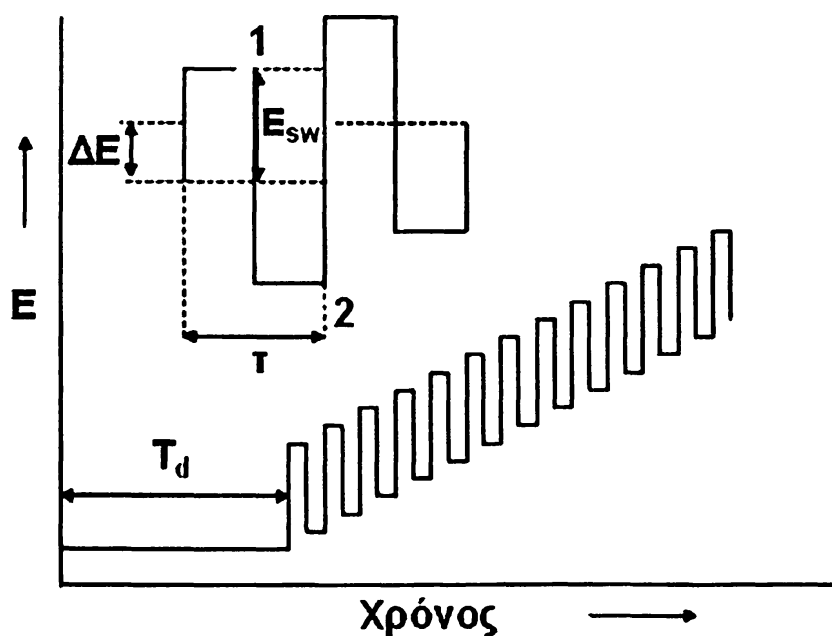
Για ένα αντιστρεπτό σύστημα ταχείας μεταφοράς ηλεκτρονίου, η σχέση μεταξύ του εφαρμοζόμενου δυναμικού και του ρεύματος περιγράφεται απ' τη σχέση (6):

$$E = E_{1/2} + \left(\frac{0.059}{n} \right) \log \frac{(i_d - i)}{i} \quad (6)$$

Για χαμηλές συγκεντρώσεις ηλεκτροδραστικών ενώσεων, μικρότερες από 10 μM , το ρεύμα φόρτισης είναι δυνατόν να γίνει μεγαλύτερο από το αναλυτικό φαρανταιϊκό ρεύμα και η μέτρηση γίνεται αδύνατη. Έτσι, για χαμηλές περιοχές συγκεντρώσεων η βολταμετρία τετραγωνικού παλμού είναι προτιμότερη από άλλες ηλεκτροαναλυτικές μεθόδους. Η βολταμετρία τετραγωνικού παλμού αποτελεί είδος της παλμικής βολταμετρίας. Άλλα είδη παλμικής βολταμετρίας είναι: (α) Κανονική Παλμική Βολταμετρία και (β) Διαφορική Παλμική Βολταμετρία (DPV) [126].

4.1 ΒΟΛΤΑΜΕΤΡΙΑ ΤΕΤΡΑΓΩΝΙΚΟΥ ΠΑΛΜΟΥ (SQUARE WAVE VOLTAMMETRY-SWV)

Η βολταμετρία τετραγωνικού παλμού (SWV) είναι μια διαφορική τεχνική μεγάλου εύρους στην οποία ένας παλμός, που αποτελείται από ένα συμμετρικό τετραγωνικό κύμα, εφαρμόζεται ταυτόχρονα με ένα δυναμικό με μορφή «σκάλας» στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Το ρεύμα καταγράφεται δύο φορές κατά τη διάρκεια κάθε τετραγωνικού κυκλικού παλμού, μια φορά στο τέλος του πρώτου παλμού (1) και μια φορά στο τέλος του αντίστροφου παλμού (2) (Εικόνα 12). Δεδομένου ότι η διαμόρφωση κατά πλάτος του τετραγωνικού παλμού είναι πολύ μεγάλη, οι αντίστροφοι παλμοί προκαλούν την αντίστροφη αντίδραση του προϊόντος (δηλαδή αυτή που προκλήθηκε από τον προηγούμενο παλμό). Η διαφορά μεταξύ των δύο τιμών του ρεύματος i_1 και i_2 , είναι η τιμή του μετρούμενου ρεύματος i .



Εικόνα 12. Μορφή των παλμών της SWV, πλάτος (E_{sw}), ύψος του βήματος (ΔE), περίοδος τετραγωνικών παλμών (τ), χρόνος καθυστέρησης (T_d), μέτρηση του ρεύματος θέσεις (1) και (2)

Η μορφή της καμπύλης που προκύπτει είναι συμμετρική και η τιμή του ρεύματος i είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση. Η πολύ καλή ευαισθησία προκύπτει από το γεγονός ότι το ρεύμα i είναι μεγαλύτερο από το i_1 και i_2 (αφού είναι η

διαφορά μεταξύ αυτών). Αυτό σε συνδυασμό με την αποτελεσματική συμπίεση του ρεύματος του υποστρώματος, μπορούν να δώσουν πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης κοντά στο 10^{-8}M . Η διαφορά των δύο τεχνικών DPV και SWV έγκειται στο ότι στην DPV το δυναμικό αποτελείται από μια σειρά παλμών που προστίθενται σε ένα γραμμικά αυξανόμενο δυναμικό (ramp), ενώ στην SWV το δυναμικό αποτελείται από μια σειρά παλμών που προστίθενται σε ένα βαθμηδόν αυξανόμενο δυναμικό (staircase). Η σύγκριση μεταξύ των σημάτων της βολταμετρίας τετραγωνικού παλμού (SWV) και του διαφορικού παλμού (DPV) σε αντιστρεπτές και μη περιπτώσεις, δείχνει ότι τα σήματα της SWV είναι από 3.3 μέχρι 4 φορές μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα σήματα της βολταμετρίας διαφορικού παλμού.

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της (SWV) είναι η ταχύτητά της. Ο αποτελεσματικός ρυθμός ανίχνευσης (scan rate) δίδεται από την σχέση (7):

$$f \times \Delta E_s \quad (7)$$

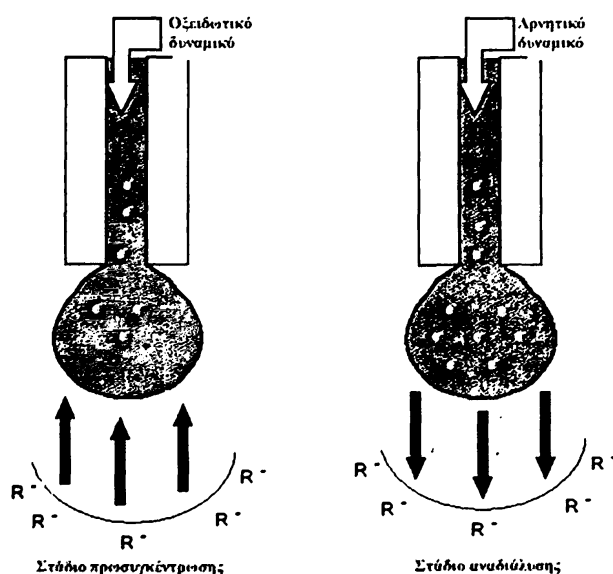
όπου: f η συχνότητα του τετραγωνικού παλμού (σε Hz) και ο όρος ΔE_s το ύψος του βήματος. Οι συχνότητες από 1 – 100 κύκλους ανά δευτερόλεπτο, επιτρέπουν πολύ γρήγορους ρυθμούς ανίχνευσης. Για παράδειγμα, αν $\Delta E_s = 10\text{ mV}$ και $f = 50\text{ Hz}$ τότε ο ρυθμός ανίχνευσης είναι 0.5 V/s . Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ο χρόνος της ανάλυσης να μειώνεται δραματικά. Ένα ολοκληρωμένο βολταμογράφημα μπορεί να καταγραφθεί σε λίγα δευτερόλεπτα, ενώ ένα αντίστοιχο της βολταμετρίας διαφορικού παλμού χρειάζεται 2–3 λεπτά. Λόγω του γρήγορου ρυθμού ανίχνευσης, μία ολοκληρωμένη μέτρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με μία μόνο σταγόνα υδραργύρου. Για το λόγο αυτό, μία τέτοια διαδικασία ολοκληρώνεται με λίγες σταγόνες (σε σχέση με άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούν διαφορετικούς παλμούς). Χάρη της ταχύτητας ανίχνευσης της βολταμετρίας τετραγωνικού παλμού, μπορούν να γίνουν και πειράματα κινητικής.



4.2 ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (STRIPPING ANALYSIS)

Για να βελτιώσουμε την ποσοτική και ποιοτική ανίχνευση της τεχνικής χρησιμοποιούμε την αναδυαλυτική ανάλυση (Εικόνα 13).

Η αναδιαλυτική ανάλυση είναι μία εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική για την μέτρηση μικροποσοτήτων ηλεκτροενεργών μετάλλων ή οργανικών ενώσεων. Η αξιοσημείωτη ευαισθησία της οφείλεται στο συνδυασμό ενός αποτελεσματικού βήματος προσυγκέντρωσης με μία αναβαθμισμένη διαδικασία μετρήσεως με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένας εξαιρετικά ευνοϊκός λόγος σήματος ως προς θόρυβο (S/N).



Εικόνα 13. Στάδιο προσυγκέντρωσης και αναδιάλυσης του μετάλλου στο ηλεκτρόδιο HMDE

Η προσυγκέντρωση είναι μια διαδικασία που μπορεί να παρομοιαστεί με ηλεκτροχημική εκχύλιση κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Κατ' αυτήν το σύμπλοκο, ο συνδυασμός του υδραργύρου και της οργανικής ένωσης ($Hg-R$), περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση της ένωσης που μελετάται από αυτή την οποία έχει όταν βρίσκεται στο υδατικό διάλυμα. Η συγκέντρωση της ένωσης στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εξαρτάται από τις συνθήκες της ηλεκτρόλυσης (όπως π.χ. ο χρόνος συσσώρευσης, το δυναμικό απόθεσης, ο χρόνος ανάπτυξης της σταγόνας). Ο βολταμετρικός προσδιορισμός γίνεται στη συνέχεια στο

“ηλεκτρόδιο-Hg”. Αν υποτεθεί ότι σχεδιάζεται το διάγραμμα ρεύματος/δυναμικού καθοδικά (από θετικά σε αρνητικότερα δυναμικά), σε δεδομένες συνθήκες ηλεκτρόλυσης, το ύψος της κορυφής του ρεύματος είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης της ένωσης στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και με την συγκέντρωση της ένωσης στο διάλυμα.

Η διαδικασία του προσδιορισμού της συγκέντρωσης της ένωσης χαρακτηρίζεται ως αντίστροφη της προσυγκέντρωσης γιατί γενικά λαμβάνει χώρα προς την αντίθετη κατεύθυνση από αυτήν η οποία χρησιμοποιήθηκε κατά τον ηλεκτροχημικό εμπλουτισμό ή την ηλεκτρολυτική απόθεση.

Ουσιαστικά, η αναδιαλυτική ανάλυση είναι μία τεχνική δύο βημάτων:

Βήμα 1^ο: προσυγκέντρωση (συσσώρευση) ενός μικρού τμήματος των ιόντων του διαλύματος στο ηλεκτρόδιο του υδραργύρου και

Βήμα 2^ο: αναδιάλυση δηλαδή το βήμα της μέτρησης, το οποίο περιέχει την αναδιάλυση του εναποτεθειμένου συστατικού.

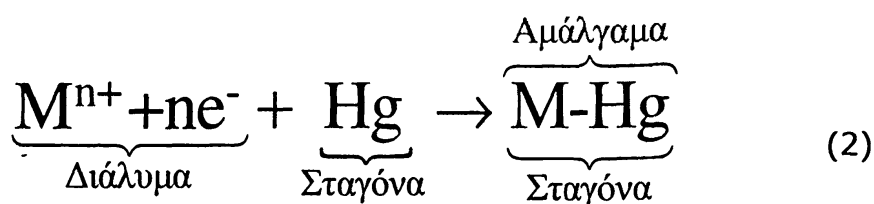
Ανάλογα με τη φορά σάρωσης του δυναμικού διακρίνουμε τα ακόλουθα είδη αναδιαλυτικής βολταμετρίας:

α) Ανοδική αναδιαλυτική βολταμετρία (Anodic Stripping Voltammetry-ASV)

Στην απλούστερη περίπτωση, η ηλεκτρολυτική απόθεση συντελείται από την αναγωγή του κατιόντος στη μεταλλική μορφή, η οποία για παράδειγμα είναι δυνατόν να είναι διαλυτή σε ένα στατικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου εξαιτίας σχηματισμού αμαλγάματος. Το δυναμικό απόθεσης για τα μεταλλικά ιόντα που ανάγονται δύσκολα είναι κατά 0.3 - 0.5 V πιο αρνητικό από το δυναμικό οξειδοαναγωγής του μετάλλου. Τα μεταλλικά ιόντα προσυγκεντρώνονται στη σταγόνα του μεταλλικού υδραργύρου μέσω διάχυσης, ανάγονται και συγκεντρώνονται ως αμαλγάματα Hg-M.



Η αντίδραση που χαρακτηρίζει το μηχανισμό αυτό μπορεί να οριστεί ως (2):



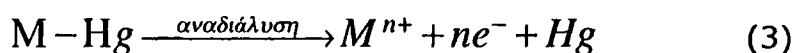
Η διάρκεια του βήματος της απόθεσης επιλέγεται βάσει της συγκέντρωσης των μεταλλικών ιόντων. Για παράδειγμα, για συγκεντρώσεις στην περιοχή των 10^{-7} M ο χρόνος απόθεσης (t_p) είναι μικρότερος από 0.5 min, ενώ για συγκεντρώσεις των 10^{-10} M είναι $t_p \sim 20$ min. Η συγκέντρωση του μετάλλου στο αμάλγαμα, C_{Hg} , δίνεται από το νόμο του Faraday, εξίσωση (8):

$$C_{Hg} = \frac{i_1 t_d}{n F V_{Hg}} \quad (8)$$

όπου: i_1 το ρεύμα απόθεσης του μετάλλου, t_d η διάρκεια της περιόδου απόθεσης και V_{Hg} ο όγκος της σταγόνας του υδραργύρου.

Το ρεύμα i_1 είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των μεταλλικών ιόντων στην επιφάνεια της σταγόνας. Η συνολική ποσότητα των ιόντων του μετάλλου στην σταγόνα είναι ένα μικρό κλάσμα της συνολικής ποσότητας του μετάλλου στο διάλυμα.

Μετά το τέλος του χρόνου απόθεσης, η ανάδευση σταματά και το δυναμικό αρχίζει να ανεβαίνει (γραμμικά ή με μια πιο ευαίσθητη τεχνική όπως SWV ή DPV, σε μορφή παλμών). Κατά τη διάρκεια της αύξησης του δυναμικού τα μέταλλα του αμαλγάματος οξειδώνονται και φεύγοντας από την σταγόνα Hg παράγεται ρεύμα σύμφωνα με τον ακόλουθο μηχανισμό που περιγράφεται από την αντίδραση (3):



Η καταγραφή του ρεύματος ηλεκτρονίων ne^{-} συναρτήσει του δυναμικού E δίνει το αναλυτικό ρεύμα.

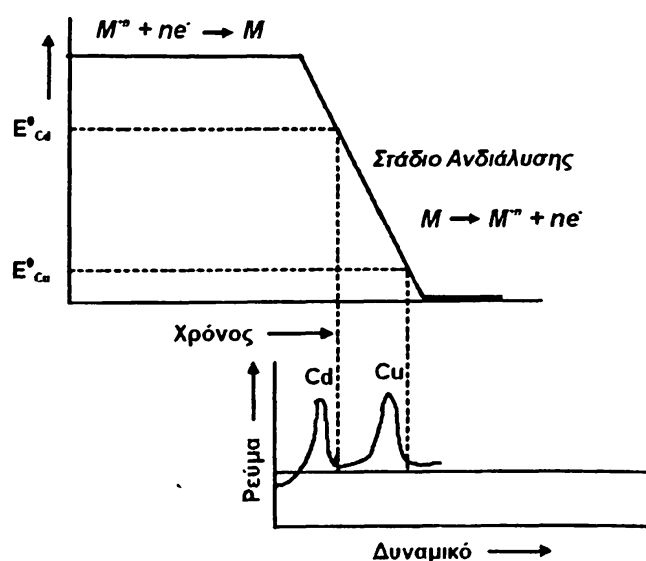


Το στάδιο της προσυγκέντρωσης, το στάδιο της απόπλυσης, καθώς και το βολταμογράφημα της μέτρησης με τα δυναμικά εμφάνισης των σημάτων των μετάλλων απεικονίζονται στην Εικόνα 14. Το ύψος της καμπύλης του βολταμογραφήματος, που αντιστοιχεί στη μέγιστη τιμή του ρεύματος είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση του μετάλλου στη σταγόνα του μεταλλικού υδραργύρου. Το δυναμικό στο οποίο εμφανίζεται η καμπύλη χρησιμεύει στην αναγνώριση (ταυτοποίηση) των μεταλλικών ιόντων του δείγματος.

Το ύψος της κορυφής (που αντιστοιχεί στο ρεύμα που παράγεται από την οξείδωση των μετάλλων) εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, τόσο του βήματος της προσυγκέντρωσης όσο και του βήματος της απόπλυσης, όπως επίσης και από τα χαρακτηριστικά του μεταλλικού ιόντος και της γεωμετρίας του ηλεκτροδίου. Για παράδειγμα, σε στατικό ηλεκτρόδιο σταγόνας υδραργύρου (HMDE), το ρεύμα εκφράζεται από την εξίσωση (9):

$$i_p = 2.7210^5 n^{3/2} A D^{1/2} \nu^{1/2} C_{Hg} \quad (9)$$

όπου: n τα ηλεκτρόνια, ν ο ρυθμός σάρωσης του δυναμικού (scan rate), A το εμβαδόν της σταγόνας, D ο συντελεστής διάχυσης και C_{Hg} η συγκέντρωση του υδραργύρου.



Εικόνα 14. Ανοδική βολταμετρία με προσυγκέντρωση. (Επάνω) το στάδιο προσυγκέντρωσης και αναδιάλυσης, (κάτω) το παραγόμενο βολταμογράφημα

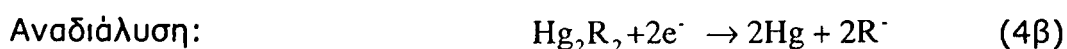
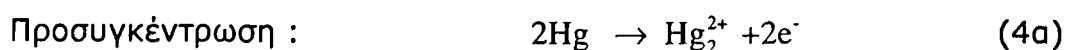
Ανακεφαλαιώνοντας τονίζεται ότι η ASV-τεχνική μπορεί να μετρήσει μόρια και άτομα, αν πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

- να μπορούν να υποστούν οξειδαναγωγή στην περιοχή 0-1.2 Volts και
- να μπορούν να διαχυθούν στον μεταλλικό υδράργυρο δηλαδή να μπορεί να σχηματιστεί αμάλγαμα.

β) Καθοδική Αναδιαλυτική Βολταμετρία (Cathodic Stripping Voltammetry-CSV)

Η καθοδική αναδιαλυτική βολταμετρία χρησιμοποιείται κυρίως στον προσδιορισμό οργανικών ενώσεων οι οποίες περιέχουν θειούχες (π.χ θειόλες) και αζωτούχες ομάδες, ενώ παράλληλα χρησιμοποιείται και στον προσδιορισμό ανόργανων ιόντων όπως για παράδειγμα αλογονοϊόντων, ιόντων σεληνίου, θειούχων, οξυανιόντων και μετάλλων μέσω της χρήσης κάποιου συμπλεκτικού μέσου.

Συνήθως ως ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμοποιείται ηλεκτρόδιο υδραργύρου το οποίο χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό αλογονούχων καθώς και θειούχων ιόντων. Οι σχετικές αντιδράσεις στο ηλεκτρόδιο του υδραργύρου είναι οι ακόλουθες (4):



όπου: R^- το προσδιοριζόμενο ανιόν και Hg_2R_2 η δυσδιάλυτη ένωση η οποία σχηματίστηκε στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου [127].

Η ευαισθησία εξαρτάται από την κινητική σχηματισμού της ένωσης η οποία αποτέθηκε, το συντελεστή διάχυσης του αντιδρώντος ιόντος στη λεπτή στοιβάδα που σχηματίστηκε καθώς και την πυκνότητας της λεπτής στοιβάδας. Η ευαισθησία εξαρτάται επίσης από την ταχύτητα διάστασης της δυσδιάλυτης ένωσης κατά την διάρκεια της αναδιάλυσης. Για την αντιμετώπιση προβλημάτων



σαν και αυτό και για να υπάρχει π.χ. υψηλότερη ευαισθησία, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ηλεκτρόδια με μεγάλες επιφάνειες. Η παρουσία υδραργύρου στο δειγματολήπτη, όταν χρησιμοποιείται ταινία υδραργύρου ή σταγόνα υδραργύρου, μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερες τιμές ρεύματος και σε λανθασμένα αποτελέσματα λόγω του σχηματισμού αδιάλυτων ενώσεων υδραργύρου στο διάλυμα.

Επειδή η τεχνική περιλαμβάνει σχηματισμό υμενίων στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων, είναι σύνηθες φαινόμενο στις καμπύλες βαθμονόμησης (calibration curves), στην καθοδική διαδικασία, η εμφάνιση μη-γραμμικότητας στις υψηλές συγκεντρώσεις (δηλαδή κορεσμός επιφάνειας). Εντούτοις, οι καμπύλες αυτές σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι γραμμικές και επαναλήψιμες. Για τον ίδιο λόγο, όταν αναλύονται μίγματα ενεργών ενώσεων, μια από τις ενώσεις παρεμποδίζει συχνά την άλλη, με συνέπεια να μειώνεται το μέγιστο ρεύμα ή/και να μετατοπίζεται το δυναμικό. Οι καθοδικές αναδιαλυτικές διαδικασίες έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς σε ευαίσθητες μετρήσεις πολλών οργανικών ενώσεων και η τεχνική έχει προσελκύσει αρκετή προσοχή. Για την επίτευξη των επαναλήψιμων καθοδικών αναδιαλυτικών αποτελεσμάτων, συνιστάται η χρήση:

- υδραργύρου υψηλής καθαρότητας
- ενισχυτικού ηλεκτρολύτη (supporting electrolyte),
- αφαίρεση του οξυγόνου και διαχωρισμός του βοηθητικού ηλεκτροδίου (auxiliary electrode) από το δείγμα.

Ο Brainina [128] αναλύει διεξοδικά τη θεωρία και τις εφαρμογές της καθοδικής αναδιαλυτικής βολταμετρίας για τον προσδιορισμό ανιόντων. Επίσης μελετά θεωρητικά την ιδιαίτερη περίπτωση της μη-αντιστρεπτής διαλυτοποίησης της λεπτής στοιβάδας, αφού κατά την διάρκεια της ηλεκτροδιάλυσης μιας ένωσης, η οποία εντοπίζεται στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια, τα μεταλλοϊόντα τα οποία ανάγονται, έρχονται σε επαφή με την ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Η περίπτωση



αυτή μπορεί να θεωρηθεί μαθηματικά ανάλογη με την ηλεκτροδιάλυση του ηλεκτροδιακού υλικού.

Το ρεύμα κορυφής για τη μη-αντιστρεπτή ηλεκτροδιάλυση μιας ένωσης από την ηλεκτροδιακή επιφάνεια δίνεται από την εξίσωση (10):

$$i_p = 0.37 \alpha n F V \frac{C_{\text{Hg}_2\text{A}_2}}{RT} \quad (10)$$

όπου: V η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού, $C_{\text{Hg}_2\text{A}_2}$ η συγκέντρωση της δυσδιάλυτης ένωσης στην επιφάνεια του υδραργύρου, α ο συντελεστής μεταφοράς ενώ τα σύμβολα: n , F , R , T , έχουν τη συνήθη τους σημασία.

γ) Προσροφητική Αναδιαλυτική Βολταμετρία (Adsorptive Anodic Stripping Voltammetry -AdSV)

Η ανάπτυξη της προσροφητικής βολταμετρίας βασίζεται στην αυθόρμητη τάση των ουσιών που αντιδρούν να προσροφώνται ελαττώνοντας την ελεύθερη ενέργεια Gibbs ($\Delta G < 0$).

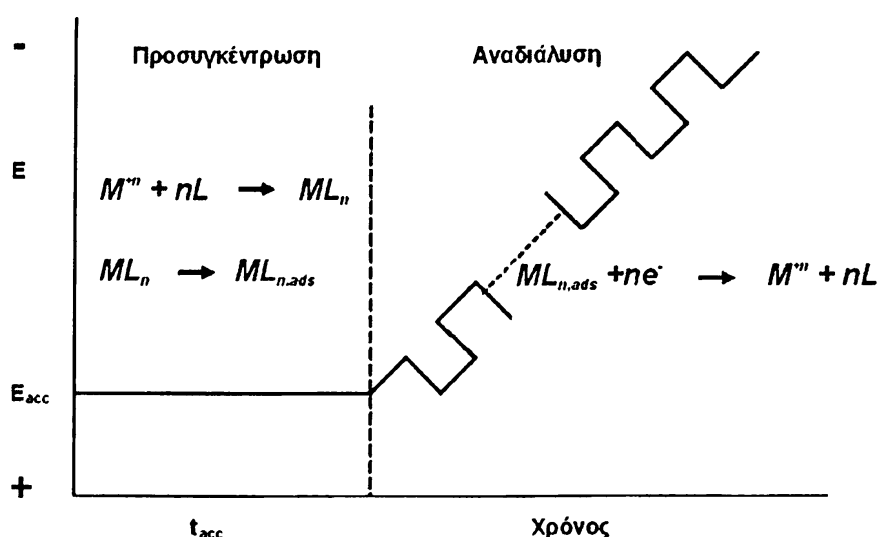
Το φαινόμενο της προσρόφησης αναπτύχθηκε αρχικά ως ένα πρόβλημα και αποδόθηκαν σ' αυτό πολλά ανεξήγητα φαινόμενα, όπως για παράδειγμα η αύξηση του ρεύματος, η μετατόπιση του δυναμικού $E_{1/2}$ κ.ά. Επισταμένες έρευνες έδειξαν ότι η προσρόφηση η οποία παρατηρείται κατά τις πολαρογραφικές μελέτες πολλών οργανικών και ανόργανων μορίων ή ιόντων μπορεί να προσφέρει πολλά αναλυτικά πλεονεκτήματα όπως π.χ. την χημική διαφοροποίηση μιας ουσίας που συμπλοκοποιείται με ένα υποκαταστάτη (speciation).

Η διαφορά της προσροφητικής βολταμετρίας από την ανοδική και καθοδική αναδιαλυτική βολταμετρία βρίσκεται στο στάδιο της προσυγκέντρωσης (Εικόνα 15). Το σύμπλοκο του μετάλλου-(κυρίως ιόντα μεταβατικών στοιχείων)-υποκαταστάτη προσυγκεντρώνεται στη διαφασική επιφάνεια ηλεκτροδίου-διαλύματος [129], σε αντίθεση με την διάχυση M^{2+} στην ASV βολταμετρία.



Η αυξημένη κατά 5 έως 10 φορές ευαισθησία αποδίδεται στην παρουσία περίσσειας ηλεκτροενεργών συστατικών στην επιφάνεια του σταγονικού ηλεκτροδίου.

Η προσυγκέντρωση βασίζεται εξ ολοκλήρου στη διαφασική συσσώρευση και δεν περιλαμβάνει καμιά φαρανταϊκή δράση. Η προσροφητική βολταμετρία εκτός από την αυξανόμενη σπουδαιότητα της ως αναλυτική τεχνική, χρησιμεύει και για τη διευκρίνιση των διαφασικών και οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων των τασιενεργών ουσιών.



Εικόνα 15. Βήμα προσυγκέντρωσης και αναδιάλυσης της AdSV ενός ιόντος M^{n+} παρουσία ενός υποκαταστάτη-L.

Στην ηλεκτροχημεία, προσρόφηση σημαίνει “προσκόλληση” των μορίων ή των ιόντων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η διεπιφάνεια μεταξύ ηλεκτροδίου και διαλύματος εμφανίζει ιδιότητες οι οποίες διαφέρουν απ’ αυτές του διαλύματος ή του ηλεκτροδίου. Η τάση της διεπιφάνειας να έλκει και να συγκρατήσει τα αντιδρώντα είναι μια από τις πιο σημαντικές ιδιότητες.

Η προσρόφηση της διαλυμένης ουσίας είναι μια διαδικασία αντικατάστασης κατά την οποία τα μόρια του διαλύτη αντικαθίστανται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου από μόρια ή ιόντα της διαλυμένης ουσίας. Η τελευταία δεν αντικαθιστά πάντα εξ ολοκλήρου τα μόρια του διαλύτη. Το μέγεθος της προσρόφησης εξαρτάται από :

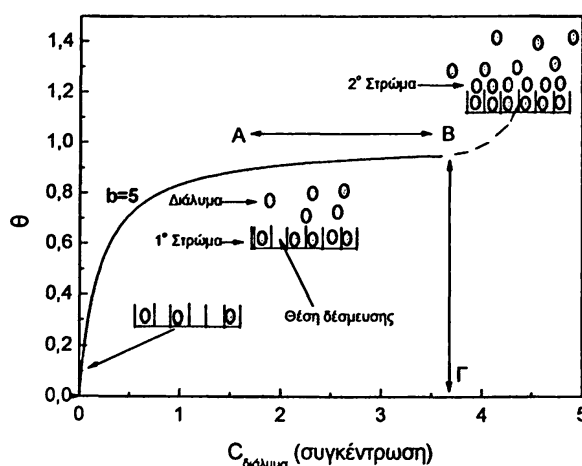
- το μοριακό βάρος της ουσίας,
- τον ενισχυτικό ηλεκτρολύτη ο οποίος συχνά συνδέεται με την επιλεκτικότητα και την ευαισθησία της μέτρησης,
- τη διαλυτότητα του αντιδρώντος σε δεδομένο διαλύτη, αφού μικρότερη διαλυτότητα οδηγεί σε ισχυρότερη προσρόφηση,
- την ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ του ιόντος και του φορτισμένου ηλεκτροδίου, δυνάμεις διπόλου-πεδίου, δράση μεταξύ της ηλεκτροδιακής διπλοστοιβάδας και των χαρακτηριστικών ομάδων των οργανικών αντιδρώντων και
- τη χημειορόφηση συγκεκριμένων ομάδων στις επιφάνειες των μεταλλικών ηλεκτροδίων όπως π.χ. θειολών.

Το ρεύμα είναι ευθέως ανάλογο της συγκέντρωσης της προσροφημένης ουσίας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και αυτή με την σειρά της ανάλογη της συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας στο διάλυμα. Η κατανόηση αυτής της σχέσης είναι δυνατή από την ισόθερμη προσρόφηση. Οι ισόθερμες είναι σχέσεις ισορροπίας μεταξύ συγκέντρωσης της ουσίας στην επιφάνεια, στην οποία έχει προσροφηθεί η ουσία, και της συγκέντρωσής της στο διάλυμα. Οι πιο γνωστές ισόθερμες με θερμοδυναμική βάση, που περιγράφουν την προσρόφηση σε επιφάνειες ηλεκτροδίων είναι:

- τύπου-L (Langmuir) για μονοστρωματική προσρόφηση χωρίς πλευρικές αλληλεπιδράσεις (Διάγραμμα 2). Στην ισόθερμη αυτού του τύπου οι θέσεις δέσμευσης είναι σχετικά λίγες, πλατιά κατανεμημένες πάνω στο επιφανειακό υπόστρωμα, με υδρόφοβο χαρακτήρα ώστε να μην είναι ανταγωνιστικές από μόρια διαλύτη. Τα προσροφημένα μόρια διακρίνονται για το μικρό έως καθόλου πολικό τους χαρακτήρα, ώστε να μην αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και ανταγωνιστικά για την ίδια θέση δέσμευσης. Κάθε θέση δέσμευσης καταλαμβάνεται από ένα μόνο μόριο και η θερμότητα προσρόφησης είναι η ίδια για όλα τα κέντρα ανεξάρτητα από το βαθμό επικάλυψης.

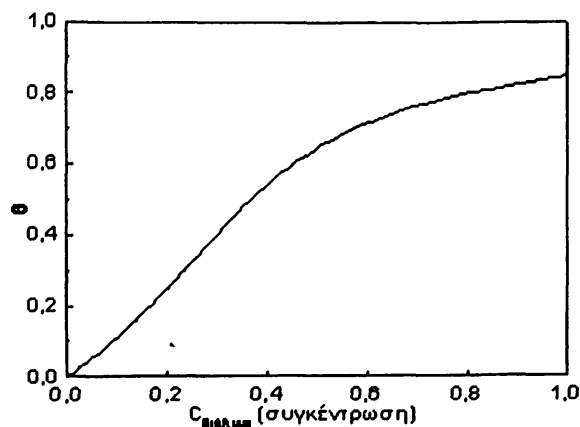


Ο προσανατολισμός των μορίων ως προς την επιφάνεια εξαρτάται από την γεωμετρία του μορίου και τη θέση της λειτουργικής ομάδας του π.χ. επίπεδα αρωματικά μόρια νιτροφαινόλων ανάλογα με τη θέση της νιτροομάδας στο αρωματικό δακτύλιο προσανατολίζουν άλλοτε τον αρωματικό πυρήνα τους παράλληλα προς την επιφάνεια πρόσδεσης και άλλοτε κάθετα [130], ενώ τρισδιάστατα μόρια διευθετούνται με τον άξονά τους παράλληλα προς την επιφάνεια δέσμευσης.



Διάγραμμα 2. Η κάλυψη των επιφανειακών θέσεων δέσμευσης από μόρια κατά το πρότυπο Langmuir, με $b=5$ [126].

- τύπου-S (Frumkin) για μονοστρωματική προσρόφηση με πλευρικές αλληλεπιδράσεις (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3. Ισόθερμη Frumkin.

Κατά την προσρόφηση των ουσιών στη διφασική επιφάνεια ηλεκτροδίου εργασίας/διαλύματος, ο σχηματισμός της προσροφημένης στοιβάδας ελέγχεται από την ταχύτητα:

- της διάχυσης των ουσιών από το διάλυμα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου καθώς και
- της προσρόφησής τους από την επιφάνεια του διαλύματος η οποία βρίσκεται σε άμεση επαφή με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Η δεύτερη διαδικασία ελέγχεται από τη διάχυση των ουσιών στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Ο Kano *et al.* [131] έδωσαν μια εξίσωση για το ρεύμα κορυφής i_p της αναγωγής της αδριαμικίνης (adriamycin) στο ηλεκτρόδιο αιωρούμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE), υποθέτοντας ότι ισχύει προσρόφηση η οποία ελέγχεται από διάχυση και το ρεύμα κορυφής είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση της ένωσης στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου Γ (εξίσωση 11).

$$i_p = kA\Gamma = kAC \left[\left(\frac{D}{r} \right) t_{ac} + 2 \left(\frac{D}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}} t_{ac}^{\frac{1}{2}} \right] \quad (11)$$

όπου: k η σταθερά αναλογίας, A η επιφάνεια του ηλεκτροδίου, C η συγκέντρωση της ένωσης στο διάλυμα, r η ακτίνα της σταγόνας του υδραργύρου και t_{ac} ο χρόνος προσρόφησης. Για τις μεγάλες τιμές των C και/ή t_{ac} , η τιμή του i_p πλησιάζει την οριακή τιμή $i_p^{\max}$ (σχέση 12):

$$\text{Για } C \gg 1, \quad t_{ac} \rightarrow \infty \quad \text{είναι:} \quad i_p^{\max} = kA\Gamma_m \quad (12)$$

όπου: Γ_m η συγκέντρωση σε πλήρη κάλυψη στην κατάσταση κορεσμού της επιφάνειας του ηλεκτροδίου.

Ο Koryta [132] έδειξε ότι $\Gamma_m = 7,36 \cdot 10^{-4} C D^{1/2} t_m^{1/2}$ όπου t_m είναι ο χρόνος ο οποίος απαιτείται για την πλήρη κάλυψη της επιφάνειας εξίσωση (20) του ηλεκτροδίου, Γ_m η μέγιστη κάλυψη επιφάνειας σε mol/cm² και C η συγκέντρωση του διαλύματος σε mol/cm³.



Τα δυναμικά των ανοδικών κορυφών, στην περίπτωση της βολταμετρίας δίνονται από την εξίσωση (13):

$$E_p = E_{1/2} + \frac{0.059}{n} \quad (13)$$

Οι εφαρμογές της προσροφητικής βολταμετρίας στον προσδιορισμό οργανικών ενώσεων [131,133], βαρέων μετάλλων και ανιόντων την καθιστούν ιδιαίτερα ελκυστική. Η υψηλή της ευαισθησία επιτυγχάνεται στο στάδιο της προσυγκέντρωσης χωρίς να είναι απαραίτητη προηγουμένως κάποια διαδικασία απομόνωσης του συστατικού το οποίο πρόκειται να προσδιοριστεί π.χ με εκχύλιση, γεγονός που ελαττώνει τον απαιτούμενο χρόνο ανάλυσης και την πιθανότητα επιβάρυνσης του δείγματος, ενώ επιτρέπει και την αυτοματοποίησή της.

4.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗ ΚΑΘΟΔΙΚΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (Ad-CSV SWV).

Παράγοντες που επηρεάζουν την αναδιαλυτική βολταμετρική ανάλυση είναι οι παρακάτω:

α) Ο φέρων (βοηθητικός) ηλεκτρολύτης

Ο φέρων ηλεκτρολύτης πρέπει να έχει τη μέγιστη δυνατή καθαρότητα, ενώ η συγκέντρωσή του πρέπει να είναι η κατάλληλη για την επίτευξη συγκεκριμένου βαθμού αγωγιμότητας. Πολλές φορές στο διάλυμα υπάρχουν μικρές ή μεγάλες ποσότητες αλάτων, οι οποίες μπορεί να προέρχονται είτε από την ένωση που εξετάζουμε, είτε από εξουδετέρωση κατά τη διαδικασία ρύθμισης του pH. Στην ιχνοανάλυση υπάρχει πάντα μια βέλτιστη συγκέντρωση αλάτων, η οποία αν ξεπεραστεί, ελαττώνεται η ευαισθησία του προσδιορισμού.

β) Το διαλυμένο O₂

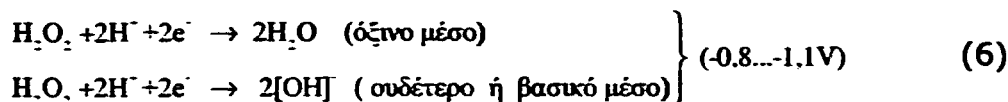
Το διαλυμένο οξυγόνο ανάγεται σε δυο στάδια [134]:



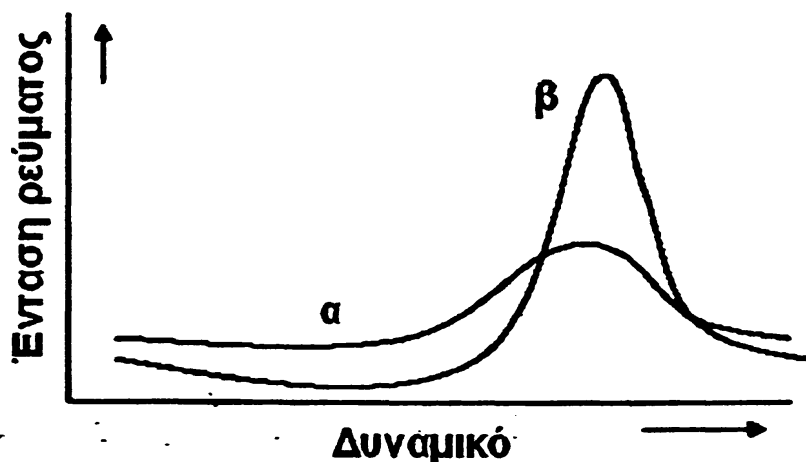
Στάδιο 1^ο (αντίδραση 5)



Στάδιο 2^ο (αντίδραση 6)



Όταν η απομάκρυνση του οξυγόνου είναι ανεπαρκής, τότε σύμφωνα με τις δύο παραπάνω αντιδράσεις, παράγονται ρεύματα τα οποία αυξάνουν το σήμα υποβάθρου (Εικόνα 16)



Εικόνα 16. Η μορφή του πολαρογραφήματος (α) πριν και (β) μετά την αφαίρεση του οξυγόνου από το διάλυμα της μέτρησης

Το οξυγόνο πρέπει να απομακρύνεται από το δείγμα πριν το στάδιο της απόθεσης καθώς ο σχηματισμός των υδροξυλιόντων σε ουδέτερα διαλύματα ή σε διαλύματα στα οποία δεν υπάρχει ρυθμιστικό σύστημα οδηγεί σε καταβύθιση υδροξειδίων, και στην ελάττωση του ρεύματος αναδιάλυσης καθώς και στην παραμόρφωση των βολταμογραφημάτων κατά την διάρκεια του προσδιορισμού. Η απομάκρυνση γίνεται μέσω ενός καθαρού μη-ηλεκτροενεργού αερίου υπό μορφή φυσαλίδων π.χ. άζωτο με καθαρότητα 99.999%.

γ) Επίδραση του pH

Τα υδρογονοκατιόντα (H^+) υπεισέρχονται στην αναγωγή των περισσοτέρων οργανικών ενώσεων. Η αναγωγή προϋποθέτει προσθήκη ηλεκτρονίων, σε ουδέτερο μόριο, έτσι ώστε να σχηματιστεί η αναγμένη μορφή, οπότε και απαιτείται ίσος αριθμός υδρογονοκατιόντων προκειμένου να διατηρηθεί η ουδετερότητα (αντίδραση 7).



Η συγκέντρωση των υδρογονοκατιόντων υπεισέρχεται στην εξίσωση του Nernst, η οποία για την παραπάνω αντίδραση γίνεται (14):

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{C_{ox} [C_{H^+}]^n}{C_{red}} \right) \quad (14)$$

Έτσι γίνεται φανερό ότι το δυναμικό εξαρτάται από τη συγκέντρωση των υδρογονοκατιόντων, δηλαδή από το pH του διαλύματος.

δ) Επίδραση της συμπλοκοποίησης [135]

Αν το προϊόν της ηλεκτρόλυσης σχηματίζει σταθερότερο σύμπλοκο (no-labile complex) [136], η ηλεκτρόλυση διευκολύνεται, ενώ το αντίθετο συμβαίνει όταν σχηματίζει ασταθέστερο σύμπλοκο (labile complex). Η διάκριση ενός σήματος σε labile ή no-labile, πειραματικά επιτυγχάνεται από την μορφή του διαγράμματος του ρεύματος κορυφής συναρτήσει του βήματος του παλμού (i_p vs t_p), μέσω της παλμικής βολταμετρίας τετραγωνικού παλμού SWV [136]. Αν η συνάρτηση $t_p = f(t_{step})$ είναι γραμμική, τότε έχουμε σχηματισμό σταθερού συμπλόκου, ενώ σε αντίθετη περίπτωση έχουμε σχηματισμό ασταθούς συμπλόκου.

Έχει αποδειχθεί ότι συμπλεκτικά μέσα μετατοπίζουν ή και μεταβάλλουν τα πολαρογραφικά κύματα. Το γεγονός αυτό είναι εξαιρετικής σημασίας στη βολταμετρική ανάλυση, γιατί είναι δυνατόν με την προσθήκη κατάλληλου συμπλεκτικού μέσου να καταστεί μια μέθοδος εκλεκτική [126].



ε) Επίδραση του δυναμικού απόθεσης και του χρόνου συσσώρευσης και σχηματισμού της σταγόνας

Το δυναμικό του HMDE κατά το στάδιο της προσυγκέντρωσης καθορίζει το καθαρό ηλεκτρικό φορτίο στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η επιλογή του κατάλληλου δυναμικού απόθεσης είναι ουσιαστική για τον ακριβή βολταμετρικό προσδιορισμό ενός συστατικού. Αυτό το δυναμικό συνήθως επιλέγεται να είναι μερικές εκατοντάδες mV μακρύτερα από το δυναμικό ημίσεως κύματος του προσδιοριζόμενου συστατικού, γιατί το οριακό ρεύμα γίνεται μέγιστο στο πλατό του πολaroγραφικού κύματος δηλαδή περίπου 50 -100 mV υψηλότερα.

Κατά το στάδιο της απόθεσης το προσδιοριζόμενο συστατικό προσυγκεντρώνεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, οπότε όπως είναι προφανές μεγάλοι χρόνοι απόθεσης οδηγούν σε αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου, δεν συνιστώνται όμως, γιατί οδηγούν σε απώλεια της αναλογικότητας μεταξύ του τελικού σήματος και της συγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου συστατικού. Ο χρόνος απόθεσης είναι προτιμότερο να ρυθμίζεται έτσι ώστε μόνο το 2% του συστατικού που προσδιορίζεται να προσροφάται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Κατά το στάδιο της προσυγκέντρωσης, η οποία μπορεί να παρομοιαστεί με ηλεκτρολυτική εκχύλιση, μεταξύ της υδατικής και της μεταλλικής (Hg) φάσεως, όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος σχηματισμού της σταγόνας τόσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος της μεταλλικής φάσεως με συνέπεια όλο και μεγαλύτερη συγκέντρωση ουσίας υπό μορφή αμαλγάματος να συσσωρεύεται μέσα σ' αυτόν κάτω από κατάλληλες πειραματικές συνθήκες. Αν v είναι η ταχύτητα εκροής του υδραργύρου διαμέσου του τριχοειδούς σωλήνα και d η πυκνότητα του υδραργύρου, τότε η μάζα της σταγόνας σε χρόνο t από την έναρξη του σχηματισμού της θα είναι (εξίσωση 15):

$$vt = \frac{3}{4} \pi r_0^3 d \quad (15)$$

ενώ η ακτίνα r_0 και η επιφάνεια της σταγόνας A , θα είναι (εξίσωση 16):



$$r_0 = \left(\frac{3\nu t}{4\pi d} \right)^{\frac{1}{3}} \Rightarrow A = 4\pi \left(\frac{3\nu t}{4\pi d} \right)^{\frac{2}{3}} \quad (16)$$

Από την εξίσωση αυτή γνωρίζοντας τον χρόνο ροής t και ότι η πυκνότητα του μεταλλικού Hg είναι: 13.6 g/cm^3 βρίσκουμε την ακτίνα και το εμβαδό της σταγόνας του υδραργύρου.

5. ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ ΣΕ ΠΟΛΥΧΡΩΜΑΤΙΚΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΤΡΩΚΤΙΚΩΝ.

Σε προηγούμενο κεφάλαιο αναλύθηκε η τεχνική των μικροπυρήνων με χρήση κυτταροχαλασίνης-B, σε καλλιέργεια ανθρώπινων λεμφοκυττάρων. Εκτός από τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος του ανθρώπου, η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλες κυτταρικές σειρές. Μια τέτοια κυτταρική σειρά είναι τα πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα του μυελού των οστών των αρουραίων [137,138,139,140]. Οι υπό έλεγχο ουσίες εφαρμόζονται σε νεαρά άτομα και τελικά ο μυελός των οστών επιστρώνεται σε αντικειμενοφόρους πλάκες για μικροσκοπική παρατήρηση. Αυτή η διαδικασία που προτάθηκε από τον W. Schmid το 1971 παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, σε σχέση με τη ανάλυση μεταφασικών χρωμοσωμάτων.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι μικροπυρήνες είναι μορφώματα που περιέχουν χρωμοσωμικά θραύσματα ή/και ολόκληρα χρωμοσώματα. Εμφανίζονται μόνο σε διαιρούμενα κύτταρα και στην προκειμένη περίπτωση, κατά το στάδιο της ερυθροποίησης στους ερυθροβλάστες. Κατά την εξέλιξή τους, τα ερυθροκύτταρα αποβάλλουν τον πυρήνα τους, στο στάδιο των ερυθροβλαστών, ωστόσο περιέχουν ριβοσωμικό RNA και καλούνται πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα (Polychromatic Erythrocytes, PCEs). Κατά τη χρώση τους διαφοροποιούνται από τα ώριμα νορμοχρωματικά ερυθροκύτταρα (Normochromatic Erythrocytes, NCEs) τα οποία δεν περιέχουν ριβοσώματα. Οι μικροπυρήνες είναι δυνατόν να εμφανιστούν τόσο στα PCEs όσο και στα NCEs, όμως καταμετρώνται μόνο στα πρώτα καθώς η εμφάνισή τους οφείλεται αποκλειστικά στη δράση του χημικού που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας [141].

Στο μυελό των οστών των αρουραίων, η αποβολή του πυρήνα των ερυθροβλαστών πραγματοποιείται περίπου 6 ώρες μετά από την τελική μίτωση. Το στάδιο των PCEs που ακολουθεί διαρκεί 12 έως 24 ώρες στο μυελό των οστών και στη συνέχεια ανάλογο χρόνο στο περιφερικό αίμα, όπου τα PCEs ωριμάζουν σε NCEs. Επειδή η ερυθροποίηση είναι μια συνεχής διαδικασία,



υπάρχει μία διαρκής μεταβολή των κυττάρων από ερυθροβλάστες σε NCEs με ενδιάμεσο στάδιο αυτό των PCEs. Η διάρκεια ζωής των NCEs στο κυκλοφορικό σύστημα των αρουραίων είναι περίπου ένας μήνας.

Συχνά οι μικροπυρήνες που έχουν σχηματιστεί δεν αποβάλλονται από τους ερυθροβλάστες μαζί με τον κυρίως πυρήνα και έτσι μπορούν να διακριθούν εύκολα στα απύρηνα πλέον PCEs. Καθώς τα PCEs είναι νεοσχηματιζόμενα κύτταρα, οι μικροπυρήνες που υπάρχουν σε αυτά μπορούν να αποδοθούν στο χημικό που χρησιμοποιήθηκε στους τελευταίους κυτταρικούς κύκλους. Υπάρχει ένα διάστημα περίπου 6 ωρών (ή περισσότερων αν υπάρχει καθυστέρηση στον κυτταρικό κύκλο) το οποίο μεσολαβεί μεταξύ της έκθεσης του αρουραίου και της αρχικής εμφάνισης των μικροπυρήνων, που προκύπτουν από την έκθεση στο χημικό, στα PCEs του μυελού των οστών. Η περίοδος αυτή περιλαμβάνει το χρόνο που χρειάζεται για να μεταβολιστεί το χημικό και στη συνέχεια να μεταφερθεί στους ερυθροβλάστες, καθώς επίσης και ο χρόνος για την αποβολή του πυρήνα από τους ευθροβλάστες. Στις επόμενες 12 έως 24 ώρες, στο μυελό των οστών, εισέρχονται στο στάδιο των PCEs κύτταρα τα οποία έχουν εκτεθεί στην υπό μελέτη ουσία πριν από τον κυτταρικό τους διπλασιασμό ενώ αντίστοιχα, τα PCEs που υπήρχαν κατά την έκθεση μεταφέρονται στο κυκλοφορικό σύστημα για να μετατραπούν σε NCEs. Από εκεί και πέρα οι μικροπυρήνες που έχουν σχηματιστεί στα PCEs χάνονται καθώς αυτά μετασχηματίζονται σε NCEs. Ο βαθμός στον οποίο θα συνεχίσουν να παράγονται μικροπυρήνες εξαρτάται από το χημικό που εξετάζεται (τρόπος δράσης, κινητική) ή/και από τις αλλοιώσεις του DNA καθώς και από τους μηχανισμούς αποκατάστασης [142]. 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 μεγαλύτερη συχνότητα μικροπυρήνων δεν μπορεί να προβλεφθεί. Στις περισσότερες



περιπτώσεις η κορυφή θα εμφανιστεί κάπου μεταξύ 24 και 60 ωρών μετά την έκθεση.

Στους αρουραίους, PCEs με μικροπυρήνες, εμφανίζονται στο περιφερικό αίμα 24 ώρες μετά τη αρχική τους εμφάνιση στο μυελό των οστών [143]. Με τον τρόπο αυτό, η τεχνική των μικροπυρήνων μπορεί να εφαρμοστεί για την εξέταση της δράσης μιας ουσίας χρησιμοποιώντας PCEs τόσο από το περιφερικό αίμα όσο και από των μυελό των οστών. Εξαιτίας της μεγάλης διαφοράς στη διάρκεια ζωής των NCEs σε σχέση με τα PCEs, τα αποτελέσματα της επίδρασης ενός ισχυρού χημικού στον πληθυσμό των NCEs εξομαλύνεται από τον πληθυσμό των κυττάρων που υπήρχαν στο περιφερικό αίμα πριν την εφαρμογή του. Στα περισσότερα είδη, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, τα ερυθροκύτταρα που περιέχουν μικροπυρήνα απομακρύνονται από το περιφερικό αίμα από τον σπλήνα, αλλά αυτό δεν συμβαίνει για κάποιες ποικιλίες τρωκτικών [144]. Μετά από χρόνια έκθεση εμφανίστηκαν μεγάλες συχνότητες NCEs με μικροπυρήνα στο περιφερικό αίμα των ποικιλιών αυτών [145].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μικροπυρήνες δεν μπορούν να εμφανιστούν σε μη διαιρούμενα κύτταρα. Στην περίπτωση που κάποιο χημικό αναστέλλει ισχυρά τη μίτωση του μυελού των οστών, θα σχηματιστούν πολύ λίγα PCEs και έτσι η καταμέτρηση αυτών γίνεται πολύ χρονοβόρα. Επιπροσθέτως, τα PCEs αυτά, μπορεί να είναι άτυπα, να προέρχονται δηλαδή από μία ομάδα ανθεκτικών κυττάρων ή να εκπροσωπούν κάποια PCEs τα οποία αργούν να ωριμάσουν αλλά είχαν πραγματοποιήσει την τελευταία τους μίτωση πριν την έκθεσή τους στο χημικό. Είναι εμφανές από τα παραπάνω ότι το ποσοστό PCEs προς NCEs στο μυελό των οστών, αποτελεί δείκτη για την τοξικότητα στο μυελό των οστών. Όταν λοιπόν, ο αριθμός των ερυθροβλαστών που μετατρέπονται σε PCEs μειωθεί από την επίδραση ενός χημικού, θα μειωθεί ανάλογα και το παραπάνω ποσοστό. Σε περιπτώσεις όμως, που υπάρχει ισχυρή τοξικότητα από την επίδραση ενός χημικού δημιουργούνται προβλήματα στην τεχνική καθώς η καταμέτρηση των PCEs γίνεται πολύ αργή εξαιτίας της μικρής συχνότητας των PCEs στα παρασκευάσματα.



5.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ ΣΕ ΠΟΛΥΧΡΩΜΑΤΙΚΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΤΡΩΚΤΙΚΩΝ.

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. Σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να εμφανιστούν PCEs με περισσότερους από έναν μικροπυρήνες, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις όπου το σχήμα των μικροπυρήνων έχει τη μορφή έλλειψης. Σε περιπτώσεις όπου εμφανίζονται μορφώματα που ομοιάζουν με μικροπυρήνες, αλλά δεν φέρουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά, δεν καταμετρώνται [146].



B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες βασικές τεχνικές:

1. Καλλιέργεια ανθρώπινων λεμφοκυττάρων για τον *in vitro* έλεγχο της γενοτοξικότητας των φυτοφαρμάκων Methidathion και Imidacloprid και την *in vivo* δράση του Methidathion στον άνθρωπο. Με την ίδια τεχνική μελετήθηκε η δράση των φυτοφαρμάκων με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την βολταμετρία. Επιπλέον υλικά μετά από καλλιέργεια 72 ωρών χρησιμοποιήθηκαν για βολταμετρικές παρατηρήσεις.
2. Η τεχνική των PCEs σε αρουραίους για τον υπολογισμό της δράσης του Imidacloprid στους αρουραίους.
3. Τεχνική της αναδιαλυτικής βολταμετρίας με προσυγκέντρωση για την μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των Methidathion και Imidacloprid.

Οι παραπάνω τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της δράσης των Methidathion και Imidacloprid αναλύονται εκτενώς παρακάτω:

1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

1.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Όλα τα σκεύη και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων ήταν αποστειρωμένα προκειμένου να αποφευχθούν μολύνσεις. Οι φλάσκες καλλιέργειας, οι σωλήνες φυγοκέντρου και οι πιπέτες παρελήφθησαν αποστειρωμένες από τις εταιρίες παραγωγής τους. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή μητρικών διαλυμάτων τοποθετούνταν σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια με πυρίμαχο πώμα και αποστειρωνόταν σε αυτόκαυστο κλίβανο σε υγρό περιβάλλον (2 atm, 120 °C για



15 λεπτά). Οι λαβίδες, τα ψαλίδια, το αλουμινόχαρτο καθώς και οποιοδήποτε άλλο μεταλλικό σκεύος που χρησιμοποιήθηκε κατά την προετοιμασία της καλλιέργειας αποστειρωνόταν σε ξηρό κλίβανο (30 λεπτά στους 200 °C). Όλοι οι χειρισμοί γίνονταν σε εστία με αποστειρωμένη νηματική ροή αέρα (Laminar Flow Cabinet, MDH).

Οι αιμοληψίες έγιναν με αποστειρωμένες σύριγγες μιας χρήσης. Προς αποφυγή πήξης του αίματος, αυτό μεταφερόταν αμέσως σε αποστειρωμένο φιαλίδιο που περιείχε ηπαρίνη και διατηρείτο στο ψυγείο μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Οι καλλιέργειες των λεμφοκυττάρων επωάζονταν σε κλίβανο υγρής ατμόσφαιρας περιεκτικότητας 5% CO₂ και σταθερής θερμοκρασίας 37 °C (Forma Scientific, CO₂ Water Jacketed Incubator).

1.2 ΥΛΙΚΑ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια λεμφοκυττάρων είναι τα εξής:

- Hamm's (Gibco BRL 31550-015). Χρησιμοποιείται ως θρεπτικό μέσο και περιέχει ανόργανα άλατα, αμινοξέα, βιταμίνες και άλλα απαραίτητα συστατικά (γλυκόζη, υποξανθίνη, θυμιδίνη κλπ) για την ανάπτυξη των κυττάρων.
- Ορός εμβρύου βοός (Gibco BRL 10106-151).
- Φυτοαιματογλουτινίνη (PHA, Gibco, 10576-015). Ουσία που διεγείρει τα κύτταρα ώστε να αρχίσουν να πολλαπλασιάζονται.
- Ως πηγή λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε φλεβικό αίμα από υγιή άτομα ηλικίας 21 έως 27 ετών.



1.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Υποτονικό διάλυμα

Hamm's: ddH₂O σε αναλογία 1:1

- Μονιμοποιητικό διάλυμα

Μεθανόλη:Οξικό σε αναλογία 5:1

- Sorrensen buffer

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH₂SO₄: 9.08 gr KH₂SO₄ σε 1 L απεσταγμένο νερό (83.7 mM)

Μονόξινο φωσφορικό νάτριο, Na₂HSO₄: 11.88 gr Na₂HSO₄ σε 1 L απεσταγμένο νερό (66.7 mM)

Na₂HSO₄:KH₂SO₄ σε αναλογία 1:1 και pH = 6.8

- Χρωστική Giemsa

15% Giemsa (Merck 1.09204.0500) σε διάλυμα Sorrensen

1.4 ΜΕΘΟΔΟΣ

Η μέθοδος καλλιέργειας των λεμφοκυττάρων και η προετοιμασία των παρασκευασμάτων για εντοπισμό μικροπυρήνων γίνεται σύμφωνα με την τεχνική CBMN. Σαράντα τέσσερις ώρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας προσθέτουμε κυτταροχαλασίνη-B (Sigma C-6762) σε συγκέντρωση 3 μg/ml για την αναστολή της κυτταροκινησίας με συνέπεια τη δημιουργία διπύρηνων κυττάρων στα οποία θα γίνει η καταμέτρηση των μικροπυρήνων. Η συχνότητα εμφάνισης των μικροπυρήνων υπολογίζεται ανά 1000 διπύρηνα, ενώ η αναγνώριση των μικροπυρήνων γίνεται σύμφωνα με τα κριτήρια του Fenech (2003).

Η διαδικασία που ακολουθούμε για την καλλιέργεια είναι η εξής:

- 1) Η καλλιέργεια των λεμφοκυττάρων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Moorhead *et al.* 1960. Σε κάθε φλάσκα καλλιέργειας τοποθετούμε 6.5 ml Hamm's, 1.5 ml ορό εμβρύου βοός, 0.2 ml φυτοαιματογλουτινίνη (PHA) και 0.5 ml φλεβικού αίματος. Στη συνέχεια τοποθετούμε τις φλάσκες σε επωαστικό κλίβανο με παροχή CO₂ 5% και σε θερμοκρασία 37° C για 72 ώρες.
- 2) Στις 41 ώρες μεταφέρουμε τις φλάσκες καλλιέργειας από το θάλαμο επώασης στο Laminar Flow Cabinet όπου προσθέτουμε στην καλλιέργεια το χημικό που θέλουμε να εξετάσουμε (Methidathion, Imidacloprid) στην επιθυμητή συγκέντρωση για κάθε φλάσκα καλλιέργειας. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής, επανατοποθετούμε τις καλλιέργειες στον επωαστικό θάλαμο.
- 3) Στις 44 ώρες προσθέτουμε στις φλάσκες κυτταροχλασίνη-B (μέσα στο Laminar Flow Cabinet) και τις επανατοποθετούμε στον επωαστικό θάλαμο για άλλες 28 ώρες.

Στο σημείο αυτό έχει ολοκληρωθεί η καλλιέργεια των λεμφοκυττάρων και τα βήματα που περιγράφονται στη συνέχεια σκοπό έχουν την απομόνωση των λεμφοκυττάρων από το ολικό αίμα σύμφωνα με τη μέθοδο Rothfels and Siminovitch 1958:

- 1) Στις 72 ώρες από την έναρξη των καλλιεργειών μεταφέρουμε το αίμα από τις φλάσκες σε σωλήνες φυγοκέντρου και φυγοκεντρούμε στις 1500 στροφές για 10 λεπτά. Έπειτα αφαιρούμε το υπερκείμενο (περίπου 7 ml). Στη συνέχεια προσθέτουμε 3 ml υποτονικό (Hamm's:ddH₂O σε αναλογία 1:1) και μετά την πάροδο δύο λεπτών προσθέτουμε περίπου 6 ml μονιμοποιητικό (Μεθανόλη:Οξικό σε αναλογία 5:1) με ελαφρά ανάδευση πάνω στον αναδευτήρα (vortex). Κατόπιν φυγοκεντρούμε στις 1200 στροφές για 10 λεπτά, αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε πάλι μονιμοποιητικό. Επαναλαμβάνουμε την διαδικασία αυτή άλλες δύο φορές ώστε να μείνει στο τέλος ελάχιστη ποσότητα για την επίστρωση των κυττάρων σε αντικειμενοφόρους πλάκες.



- 2) Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα ρίχνουμε 1-2 σταγόνες κυτταρικού αιωρήματος.
- 3) Αφού τα δείγματα στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου χρωματίζονται τα παρασκευάσματα με 15% Giemsa σε Sorrensen buffer ($\text{Na}_2\text{HSO}_4:\text{KH}_2\text{SO}_4$ σε αναλογία 1:1) για 15-17 λεπτά.

2. ΤΕΧΝΙΚΗ PCEs

Αρουραίοι ηλικίας 8 εβδομάδων χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της *in vivo* δράσης του Imidacloprid. Η χορήγηση των υπό μελέτη συγκεντρώσεων του φυτοφαρμάκου διαλυμένου σε νερό έγινε με κατάλληλη οισοφαγική σύριγγα. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την χορήγηση του φυτοφαρμάκου τα ζώα θανατώνονταν με ατμόσφαιρα CO_2 σύμφωνα με τους κανονισμούς βιοηθικής και δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Σε μικρό χρονικό διάστημα από τη θανάτωση απομονώθηκαν τα μηριαία οστά και καθαρίστηκαν από υπολείμματα μυϊκού ιστού με τη βοήθεια αποστειρωμένων ανατομικών οργάνων. Με αποστειρωμένο ψαλίδι αποκόπηκε η επίφυση του μηριαίου οστού και με φυγοκέντρηση σε errendorff μικροφυγόκεντρο συλλέχθηκε ο μυελός των οστών σε σωληνάρια που περιείχαν 1 ml ορό εμβρύου βοός. Έπειτα από αναδιάλυση σε 5 ml ορό εμβρύου βοός με πιπέτα Pasteur έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1000 στροφές. Στη συνέχεια, μετά την αφαίρεση του μεγαλύτερου μέρους από το υπερκείμενο πραγματοποιήθηκε επίστρωση του αιωρήματος του μυελού των οστών σε αντικειμενοφόρους πλάκες οι οποίες αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Η μονιμοποίηση των παρασκευασμάτων έγινε σε μεθανόλη για 15 λεπτά. Η διαδικασία χρώσης τους ακολούθησε τα εξής στάδια

- I. σε May - Grunwald (Fluka 63590) για 3 λεπτά,
- II. σε May - Grunwald:Phosphate buffer solution pH 7.4 σε αναλογία 1:1 για 2 λεπτά και



III. σε 5% Giemsa σε Phosphate buffer pH 7.4 σε αναλογία 1:1 για 15 λεπτά σύμφωνα με τους Alaoui – Jamali *et al.*, 1989.

Το τελικό στάδιο περιελάμβανε το κλείσιμο των παρασκευασμάτων με καλυπτρίδα προσθέτοντας DPX (Scharlau Dp 0050). Η παρατήρηση έγινε σε φωτονικό μικροσκόπιο (Leica DMR) με φακό 100X όπου και καταμετρήθηκαν 1000 πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα για τον προσδιορισμό των μικροπυρήνων.

3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΚΑΘΟΔΙΚΗΣ ΒΟΛΤΑΜΕΤΡΙΑΣ ΜΕ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ

3.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Η προετοιμασία για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των φυτοφαρμάκων, με την τεχνική της καθοδικής βολταμετρίας με προσυγκέντρωση, σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων, είναι παρόμοια με αυτήν της καλλιέργειας των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων. Διαφοροποιείται μόνο, στον τρόπο χειρισμού μετά το πέρας της καλλιέργειας.

Μετά από επώαση των λεμφοκυττάρων για 72 ώρες, μεταφέρουμε τα δείγματά μας από τις φλάσκες καλλιέργειας σε φυγοκεντρικούς σωλήνες. Η φυγοκέντρωση πραγματοποιείται για 10 λεπτά σε 1500 στροφές/λεπτό. Το υπερκείμενο συλλέγεται και προστίθεται 100% αιθανόλη σε αναλογία 9:1 (αιθανόλη:δείγμα). Σε 9 ml από το παραπάνω μείγμα προστίθεται 1 ml του κατάλληλου ηλεκτρολύτη ανάλογα με το υπό μελέτη φυτοφάρμακο. Η ποσότητα αυτή στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για τη βολταμετρική μέτρηση του φυτοφαρμάκου που δεν έχει προσροφηθεί από τα κύτταρα. Για το Methidathion ο ηλεκτρολύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το KNO_3 (1 mM σε pH 7.4). Για το Imidacloprid ο ηλεκτρολύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Britton-Robinson (0.4 M σε pH 7.4). Τα διαλύματα των ηλεκτρολυτών αυτών περιγράφονται αναλυτικά στην ενότητα Β. 5.5.



4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΑΓΡΟΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ *IN VIVO* ΜΕΛΕΤΗ

4.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες που περιγράφηκαν προηγουμένως για τις *in vitro* καλλιέργειες λεμφοκυττάρων με τη διαφορά ότι δεν προστέθηκε φυτοφάρμακο καθόσον αποσκοπούσαμε να μελετήσουμε τις ενδεχόμενες παρενέργειες από τη χρήση φυτοφαρμάκων στους αγρότες κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών, συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα ανάλογης ομάδας ατόμων που δεν είχαν εκτεθεί σε φυτοφάρμακα. Οι συνθήκες προετοιμασίας των δειγμάτων και αποτίμησης των αποτελεσμάτων υπήρξαν αυτές που αναφέρθηκαν στην ενότητα Β. 1.4.

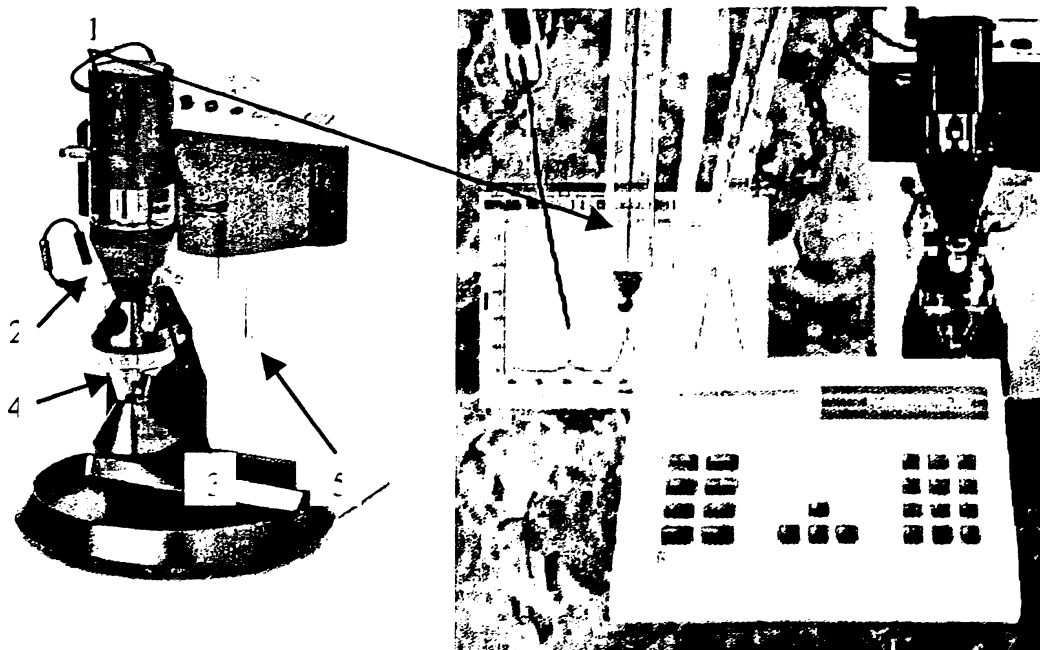
5. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΘΟΔΙΚΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗΣ ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗΣ ΒΟΛΤΑΜΕΤΡΙΑΣ

Για τις βολταμετρικές μετρήσεις χρησιμοποιήσαμε μια πολαρογραφική συσκευή της Radiometer Analytica, μοντέλο TraceLab-MD 150, η οποία περιελάμβανε τα ακόλουθα μέρη:

- ποτενσιοστάτη τριών ηλεκτροδίων,
- γεννήτρια τάσης,
- κυψελίδα εργασίας - δειγματολήπτης (cell),
- ηλεκτρόδια και
- όργανο καταγραφής.



Η συσκευή ήταν συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή (PC-PII) όπου οι παράμετροι των μετρήσεων ρυθμίζονταν μέσω του προγράμματος TraceMaster-MD 150 (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Πολαρογράφος τύπου MDE-150 της Radiometer Analytica όπου: (1) Ηλεκτρόδιο εργασίας, (2) Ηλεκτρόδιο αναφοράς, (3) Βοηθητικό ηλεκτρόδιο, (4) Δειγματολήπτης (Cell), (5) Απασεωτήρες (Bubblers).

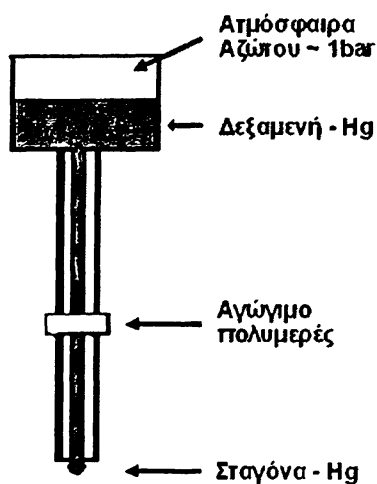
Το παραπάνω σύστημα βρισκόταν σε άπαγωγό απαλλαγμένο από ηλεκτρικές παρεμβάσεις, δονήσεις και μεγάλες διακυμάνσεις της θερμοκρασίας.

Τα μέρη του πολαρογράφου αναλυτικά έχουν ως ακολούθως:

α) Στατικό ηλεκτρόδιο αιωρούμενης σταγόνας υδραργύρου (Hanging Mercury Drop Electrode - HMDE)

Το HMDE είναι ένα από τα δημοφιλέστερα ηλεκτρόδια εργασίας στην αναλυτική ανάλυση. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε στατικό ηλεκτρόδιο - Hg, τύπου MDE-150 της Radiometer Analytica. Ο τύπος αυτός επιτρέπει την εύκολη ανανέωση της σταγόνας υδραργύρου και έχει σχετικά μεγάλη περίοδο απόθεσης. Σε αυτό το ηλεκτρόδιο, ο υδράργυρος μετατοπίζεται από μια δεξαμενή κατά μήκος ενός τριχοειδούς αγγείου (capillary) εσωτερικής

διαμέτρου 70 μm μέσω πίεσης 1 bar αερίου αζώτου (καθαρότητας 99.999%) που εφαρμόζεται στο χώρο της δεξαμενής (Εικόνα 18). Οι σταγόνες σχηματίζονται στη άκρη του τριχοειδούς αγγείου. Η ηλεκτρική επαφή γίνεται

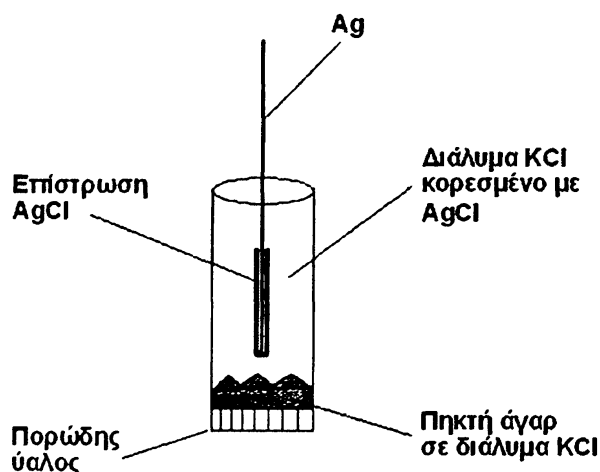


Εικόνα 18. Απλοποιημένη διάταξη του HMDE ως ηλεκτρόδιου εργασίας

μέσω του τριχοειδούς αγγείου. Η σταγόνα απομακρύνεται συνήθως στο τέλος του σταδίου αναδιάλυσης και μια νέα σταγόνα δημιουργείται για το επόμενο πείραμα. Κατ' αυτό τον τρόπο ελαχιστοποιούνται τα σφάλματα που προκύπτουν από κατάλοιπα προηγούμενων πειραμάτων. Τα εσωτερικά τοιχώματα του τριχοειδούς αγγείου πρέπει να καλυφθούν με ένα υδροφοβικό επίστρωμα για να αποτρέψουν την εισχώρηση του διαλύματος μεταξύ του υδραργύρου και του γυάλινου τοιχώματος. Για το λόγο αυτό, το τριχοειδές αγγείο πλένεται πρώτα με 3M διάλυμα HNO_3 , κατόπιν ξεπλένεται με αποσταγμένο νερό και εφαρμόζεται ξηρός αέρας για την απομάκρυνση τυχών υπολειμμάτων και το τριχοειδές αγγείο στεγνώνεται έτσι ώστε η ποσότητα του υδραργύρου να εναποτεθεί σε καθαρό τριχοειδές. Ο αέρας πρέπει να απομακρυνθεί πλήρως από το τριχοειδές αγγείο και από τη δεξαμενή υδραργύρου, καθώς ο παγιδευμένος αέρας δημιουργεί προβλήματα στο μέγεθος της σταγόνας και την πρόωρη πτώση της. Επομένως, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά την προσθήκη του υδραργύρου στη δεξαμενή.

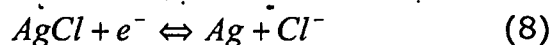
β) Ηλεκτρόδιο αναφοράς (counter/reference electrode)

Το ηλεκτρόδιο αναφοράς ήταν ένα ηλεκτρόδιο Ag/AgCl με διπλή υγρή σύνδεση, (τύπου B18C003 TR020 Ag/AgCl reference electrode) της Radiometer Analytica, το οποίο αποτελείται από σύρμα αργύρου (Ag) ηλεκτρολυτικά επικαλυμμένου με χλωριούχο άργυρο και είναι βυθισμένο μέσα σε 3M διάλυμα KCl κορεσμένο με AgCl (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Τυπική αναπαράσταση ηλεκτροδίου αναφοράς Ag/AgCl

Η αντιστρεπτή ηλεκτροδιακή ημιαντίδραση του ηλεκτροδίου Ag/AgCl και του αντίστοιχου ημιστοιχείου $Ag|AgCl(κορ.), Cl(3M)$ είναι (αντίδραση 8):

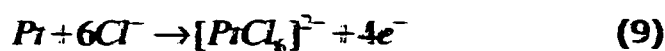


Μέσω του δυναμικού του ηλεκτροδίου αναφοράς ο ποτενσιοστάτης ελέγχει το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας. Το ηλεκτρόδιο αναφοράς πρέπει να τοποθετείται κοντά στο ηλεκτρόδιο εργασίας, ώστε η πτώση τάσης του διαλύματος iR_{sol} να καθίσταται αμελητέα.

γ) Βοηθητικό ηλεκτρόδιο (auxiliary electrode)

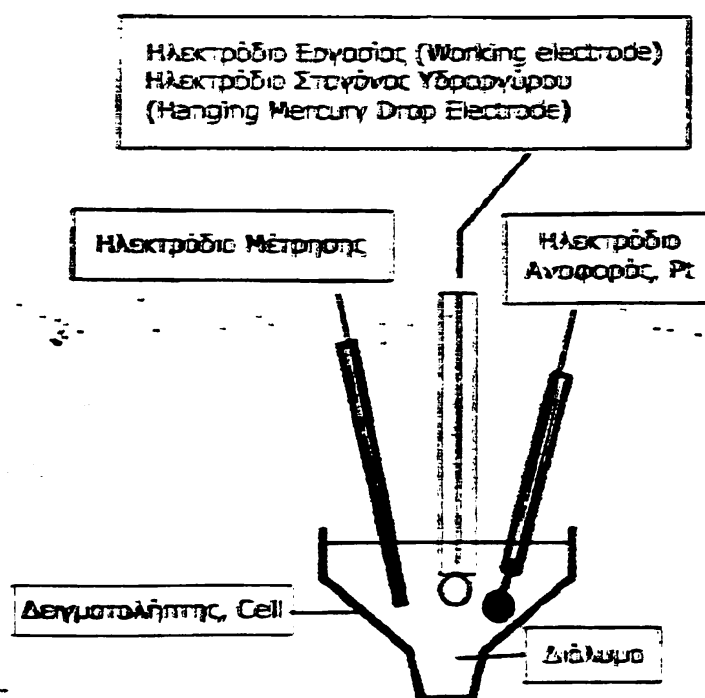
Το βοηθητικό ηλεκτρόδιο αποτελείται από ένα σύρμα λευκόχρυσου Pt (τύπου B18C002 TM020 Platinum electrode) της Radiometer Analytica. Ο λευκόχρυσος είναι ένα αδρανές μέταλλο, μέσω του οποίου εξασφαλίζεται η ηλεκτρική ουδετερότητα του διαλύματος παρέχοντας τα απαραίτητα φορτία κατά την

διάρκεια του βήματος της προσυγκέντρωσης (απόθεσης - συσσώρευσης) της ηλεκτροενεργού ουσίας πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Η χημική εδράνεα του Pt δεν πρέπει να υπερεκτιμάται ιδίως σε περιπτώσεις ηλεκτρόλυσης διαλυμάτων που περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις ιόντων χλωρίου Cl^- όπου η άνοδος Pt μπορεί να υποστεί οξείδωση λόγω της ανοδικής ημιαντίδρασης (9)



δ) Κυψελίδα - δειγματολήπτης (cell)

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε μία ηλεκτροχημική κυψελίδα όγκου 10 -30 ml κατασκευασμένη από βοριοπυριτική ύαλο (borosilicate) (τύπου B22D001) της Radiometer Analytica, μέσα στην οποία τοποθετούνταν το δείγμα (Εικόνα 20).

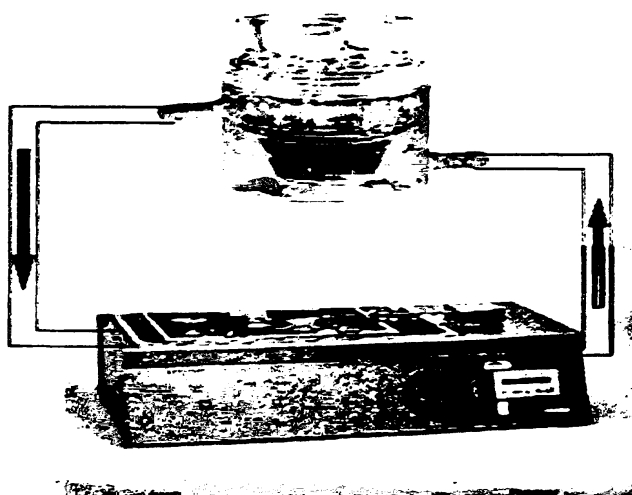


Εικόνα 20. Απλουστευμένη διάταξη μέτρησης του Πολογράφου Radiometer MDE 150

Το υλικό της κυψελίδας είναι τέτοιο ώστε να μειωθούν τα σφάλματα από τη μόλυνση και την προσρόφηση στα τοιχώματά του. Μέσα στην κυψελίδα βυθίζονται τα τρία ηλεκτρόδια αναφοράς, εργασίας και μέτρησης.

ε) Θερμοστατούμενη Κυψελίδα (thermo stated cell)

Για τα θερμοστατούμενα πειράματα (0–40 °C) χρησιμοποιήθηκε θερμοστατούμενη κυψελίδα (τύπου B22D002) της Radiometer Analytica, η οποία ήταν μόνιμα συνδεδεμένη εξωτερικά με θερμοστατούμενο υδατόλουτρο όπως φαίνεται στην Εικόνα 21.



Εικόνα 21. Πειραματική διάταξη θερμοστατούμενων πειραμάτων

Η θερμοκρασία του διαλύματος του ηλεκτροχημικού δειγματολήπτη ρυθμίζονταν με κυκλοφορία του νερού από το θερμοστατούμενο κυκλοφορητή που λειτουργούσε για μια περιοχή θερμοκρασιών 0–50 °C. Η θερμοκρασία του δείγματος ελεγχόταν συνεχώς με ένα ψηφιακό θερμόμετρο που τοποθετήθηκε μέσω ενός ανοίγματος από την άνω κάλυψη του δειγματολήπτη. Σε κάθε ρύθμιση της θερμοκρασίας το σύστημα ισορροπούσε για τουλάχιστον 30 min πριν από τις μετρήσεις. Το πρωτόκολλο αυτό βρέθηκε να παρέχει σταθερές θερμοκρασίες με απόκλιση ± 0.30 °C. Τα εξαρτώμενα από τη θερμοκρασία πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές.

στ) Πειραματικές συνθήκες βολταμετρικών μετρήσεων

Σ' όλες τις αναλυτικές βολταμετρικές μετρήσεις εφαρμόστηκαν οι ακόλουθες πειραματικές συνθήκες:

Η πίεση του αζώτου στην υδραργυρική δεξαμενή διατηρούνταν στο 1bar.

Παράμετροι Κυψελίδας (Cell Parameters)

- Ηλεκτρόδιο = HMDE,
- Ανάδευση (Stirring) = 525 rpm,
- Χρόνος απαέρωσης (Purge time) = 300 sec,
- Χρόνος Ηλεκτρόλυσης (Electrolysis time) = 45 sec.

Στα πειράματα της προσρόφησης των Methidathion και Imidacloprid στην πρότυπη επιφάνεια του HMDE ο εφαρμοζόμενος χρόνος συσσώρευσης (t_{acc}) ήταν:

- i. Methidathion = 10-300 sec
 - ii. Imidacloprid = 10-300 sec,
- Χρόνος αναμονής (Waiting time) = 10 sec,
 - Χρόνος ανάπτυξης σταγόνας υδραργύρου (Hg - drop growth time) = 0.5 sec

Παράμετροι Σήματος (Signal Parameters)

- Οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν στο ηλεκτρόδιο-HMDE ήταν τετραγωνικού παλμού (Square Wave Voltammetry technique, SWV) και οι οποίες διακρίνονται σε:
 1. ASV (αναδιαλυτική ανοδική βολταμετρία)
 2. CSV (αναδιαλυτική καθοδική βολταμετρία)
 3. ad-ASV (αναδιαλυτική προσροφητική ανοδική βολταμετρία)
 4. ad- CSV (αναδιαλυτική προσροφητική καθοδική βολταμετρία)



- Δυναμικό προσυγκέντρωσης (Potential accumulation): Ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη τεχνική εφαρμόζαμε τα ακόλουθα δυναμικά προσυγκέντρωσης:

1. -1100 mV για την ASV και ad-ASV
2. -100 mV για την CSV και ad- CSV

ενώ το δυναμικό σάρωσης (scan rate) ήταν αντίστοιχα:

1. (E-initial -1100 mV / E-final 150 mV)
2. (E-initial -100 mV / E-final -1500 mV)

- Χρόνος Βαθμίδωσης (Step Duration) = 0.04 sec
- Βήμα Βαθμίδωσης (Step amplitude) = 1 mV
- Εύρος Παλμού (Pulse amplitude) +50 mV.
- Εύρος ρεύματος (Current range): Minimum 10 nA / Maximum 10 Mm

Ηλεκτρολύτης: Για τα πειράματα προσρόφησης του Methidathion πάνω στην πρώτη επιφάνεια του HMDE ως φέρων ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε άλας KNO_3 καθαρότητας >99% συγκέντρωσης 1 mM σε pH = 7.4. Στα αντίστοιχα πειράματα της προσρόφησης του Imidacloprid χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Britton-Robinson συγκέντρωσης 10 mM σε pH = 7.4.

5.1 ΡΥΘΜΙΣΗ pH

Για τις μετρήσεις του pH των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρόδιο ύαλου σε πεχάμετρο GLP21 της εταιρείας CRISON.

5.2 ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΕΡΚΑΘΑΡΟΥ ΝΕΡΟΥ (ULTRA PURE)

Το νερό που χρησιμοποιήθηκε σ' όλα τα πειράματα ήταν υπερκαθαρό (ultra pure) και παράγονταν από σύστημα Milli-Q, Academic της Belford, MS, USA.



Η συσκευή διέθετε δύο φίλτρα τύπου: Q-CardC002 και QTUMOOOIX για την συγκράτηση του ανόργανου, οργανικού και βιολογικού φορτίου ενώ η αγωγιμότητα του παραγόμενου νερού ήταν $18 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$.

5.3 ΖΥΓΟΣ- ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΟΣ-ΜΙΚΡΟΠΙΠΕΤΤΕΣ

Οι ζυγίσσεις έγιναν με αναλυτικό ζυγό SBC 22, Scaltec, ακρίβειας $\pm 0.0001 \text{ g}$.

Η φυγοκέντρωση των δειγμάτων έγινε με μια φυγόκεντρο: Zentrifugen/ Hettl-Universal 32R D-78532

Για προσθήκη όγκων μl χρησιμοποιήθηκε μικροπιπέττα Transferpette

5.4 ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

- **Methidathion** (Riedel-de Haen 45572)

Methidathion καθαρότητας $> 99.7\%$ ($50 \mu\text{g/ml}$)

Πίεση αζώτου: 1 bar,

Παράμετροι σήματος (Cell Parameters): Ηλεκτρόδιο (Electrode HMDE), Ανάδευση (Stirring) 525 rpm, Χρόνος απαέρωσης (Purge time) 600 sec, Χρόνος ηλεκτρόλυσης (Electrolysis time) 0-300 sec, Χρόνος αναμονής (Waiting time) 10 sec, Χρόνος ανάπτυξης σταγόνας υδραργύρου (Hg-drop growth time) = 0.7 sec.

Signal Parameters: Technique Square Wave Ad-CSV

E-initial -1060 mV, E-final -1450 mV, Χρόνος Βαθμίδωσης (Step Duration) 0.04 sec, Βήμα Βαθμίδωσης (Step amplitude) 1 mV, Εύρος Παλμού (Pulse amplitude) +50 mV.

Εύρος ρεύματος (Current range): Minimum 10 nA/Maximum 10 Mm

Ηλεκτρολύτης: Ως φέρων ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 1mM KNO_3 pH = 7.4.

- **Imidacloprid** (Riedel-de Haen 36552)



Imidacloprid καθαρότητας > 99.7% (100 μ M)

Πίεση αζώτου: 1 bar,

Παράμετροι Κυψελίδας (Cell Parameters): Ηλεκτρόδιο (Electrode) HMDE, Ανάδευση (Stirring) 525 rpm, Χρόνος Απαέρωσης (Purge time) 600 sec, Χρόνος Ηλεκτρόλυσης (Electrolysis time) 0-300 sec, Χρόνος Αναμονής (Waiting time) 10 sec, Χρόνος ανάπτυξης σταγόνας υδραργύρου (Hg-drop growth time) = 0.7 sec.

Signal Parameters: Technique Square Wave Ad-CSV

E-initial -1060 mV, E-final -1450 mV, Χρόνος Βαθμίδωσης (Step Duration) 0.04 sec, Βήμα Βαθμίδωσης (Step amplitude) 1 mV, Εύρος Παλμού (Pulse amplitude) +50 mV.

Εύρος ρεύματος (Current range): Minimum 10 nA / Maximum 10 Mm

Ηλεκτρολύτης: Ως φέρων ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Britton-Robinson pH = 7.4.

- Μιτομυκίνη C (Mit-C) (Sigma M-0503)

0.5 mg/ml σε ddH₂O.

5.5 ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΩΝ

Το ρυθμιστικό διάλυμα Britton Robinson παρασκευάζεται από την ανάμιξη τριών οξέων: βορικού καθαρότητας >99.8% (H₃BO₃), οξικού καθαρότητας >99.5% (C₂H₄O₂) και ορθοφωσφορικού καθαρότητας >85% (H₃PO₃) σε αναλογία 1:1:1. Πρόκειται για ένα ρυθμιστικό διάλυμα με καλή ρυθμιστική ικανότητα για μια ευρεία περιοχή pH από 2 έως 11. Συγκεκριμένα, η απόκρισή του σε HCl/NaOH είναι ομαλή, περίπου γραμμική και ως εκ τούτου αποτελεί μια καλή επιλογή γενικής χρήσης για ηλεκτροαναλυτικές εφαρμογές.



5.5.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ KNO_3

Για τις μετρήσεις σε πρότυπο διάλυμα Methodation στην τεχνική καθοδικής δολαμερίας με προσυγκέντρωση, ως βοηθητικός ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα KNO_3 10mM. Το μητρικό διάλυμα είχε συγκέντρωση 10mM. Για την παρασκευή του ζυγίσαμε 0.050 gr KNO_3 (καθορότητα >99.8%) σε 50 ml Milli-Q νερό.

5.5.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ Britton- Robinson

Αρχικά δημιουργήσαμε διαλύματα βορικού, οξικού και ορθοφωσφορικού οξέων συγκέντρωσης 1.2M σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Διάλυμα βορικού οξέος: Διαλύθηκαν 14.87 g βορικού οξέος σε 200 ml Milli-Q νερό.
- Διάλυμα οξικού οξέος: Αραιώθηκαν 13.795 ml πυκνού διαλύματος οξικού οξέος (100 % w/w) σε 200 ml νερό Milli-Q.
- Διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος: Αραιώθηκαν 13.795ml πυκνού διαλύματος ορθοφωσφορικού οξέος (85 % v/v) σε 200 ml νερό Milli-Q.

Τέλος, αναμίξαμε τα παραπάνω διαλύματα σε απεργικό κύττω από συνεχή ανάδευση για 45 min στις 200 στροφές ανά λεπτό χωρίς θέρμανση. Έτσι προέκυψε το ρυθμιστικό διάλυμα Britton-Robinson συγκέντρωσης 0.4M. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 7.4 με προσθήκη NaOH.

6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στατιστικά πακέτα:

1. Για την εφαρμογή του κριτηρίου One Way ANOVA χρησιμοποιήθηκε το OriginPro 7.5, OriginLab SRO.
2. Για την εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε το SPSS 15.0, SPSS Inc.
3. Για την εφαρμογή του κριτηρίου-G χρησιμοποιήθηκε το Minitab, Minitab Inc.



Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Χρησιμοποιώντας τις κυτταρογενετικές τεχνικές, καθώς και τις τεχνικές της αναλυτικής χημείας που προαναφέρθηκαν επιδιώξαμε να μελετήσουμε την ενδεχόμενη γενετοξικότητα των φυτοφαρμάκων Methidathion και Imidacloprid και να διελευκάνουμε το μηχανισμό δράσης τους.

1. ΕΠΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν στην επαγωγή μικροπυρήνων υπό την επίδραση των φυτοφαρμάκων Methidathion και Imidacloprid σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vitro*.

Η επαγωγή των μικροπυρήνων μελετήθηκε σε 2000 διπύρηνα κύτταρα, τα οποία μετρήθηκαν σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Επίσης, υπολογίστηκε το ποσοστό (%) των διπύρηνων κυττάρων με 1, 2, 3 μικροπυρήνες καθώς και η μεταβολή του δείκτη διπλασιασμού του κυττάρου (CBPI). Ο δείκτης αυτός εκφράζει το ρυθμό διαίρεσης των κυττάρων, έτσι ώστε να εκτιμηθεί η καθυστέρηση των κυττάρων ως συνέπεια της επίδρασης των συγκεντρώσεων των δύο φυτοφαρμάκων. Ο δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων υπολογίζεται από τον τύπο: $CBPI = [M_1 + 2M_2 + 3(M_3 + M_4)] / N$, όπου M_1 , M_2 , M_3 , M_4 είναι ο αριθμός των κυττάρων με 1, 2, 3, 4 πυρήνες αντίστοιχα και N το σύνολο των κυττάρων που μελετώνται (2000).

1.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ METHIDATHION

Για να μελετηθεί η δράση του Methidathion σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τρεις συγκεντρώσεις (1, 2, 3 $\mu\text{g/ml}$) αφού πρώτα αξιολογήθηκαν δεδομένα από τη σχετική βιβλιογραφία [147,148,149].

Τα πειραματικά αποτελέσματα από τη δράση του δεδομένου φυτοφαρμάκου στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Είναι φανερό ότι σε καμία πειραματική συγκέντρωση του Methidathion δεν εμφανίζεται

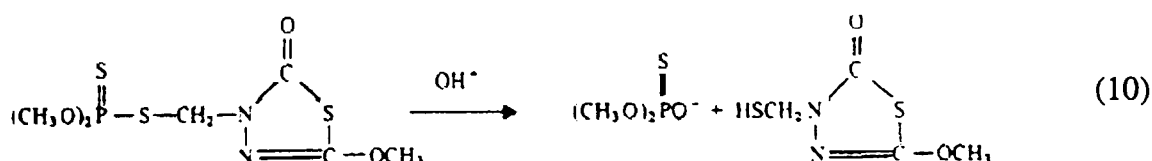


επαγωγή του ποσοστού των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN), καθώς και των μικροπυρήνων (MN) ανά 1000 διπύρηνα κύτταρα (BN) σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες, ενώ είναι σαφώς εμφανής η αντίστοιχη επαγωγή του θετικού μάρτυρα που προέρχεται από 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Μιτομυκίνης C (Mit-C).



Πίνακας 3. Επίδραση του Methidathion σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων σε pH 7.4							
Συγκέντρωση (μg/ml)	BN	BNMN/ 1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα (p)	MN/1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα (p)
0	2000	5.0±0.0	-	-	5.0±0.0	-	-
1	2000	5.0±0.0	0	1	5.0±0.0	0	1
2	2000	5.0±0.0	0	1	5.0±1.0	0	1
3	2000	6.0±0.0	0.188	0.663	6.0±1.0	0.188	0.663
		R=0.775 P _R =0.225			R=0.775 P _R =0.225		
Mit-C (0.5)	2000	78.5±6.5	276.85	0.0001*	84.0±6.0	281.12	0.0001*
*p<0.05							

Είναι γνωστό ότι το Methidathion υφίσταται αλκαλική υδρόλυση σύμφωνα με την αντίδραση (10) [20]. Επίσης είναι γνωστό ότι η οξύτητα του εδάφους ποικίλει ανάλογα με τη σύστασή του αλλά και με την παρουσία σε αυτό διαφόρων χημικών παραγόντων όπως π.χ. λιπασμάτων και άλλων συστατικών



που εναποτίθενται από τις ανθρώπινες δραστηριότητες.

Με βάση αυτά τα δεδομένα διερευνήθηκε το ενδεχόμενο διαφορετικής απόκρισης του Methidathion μετά από αλκαλική υδρόλυση. Η αλκαλική υδρόλυση του Methidathion είναι μη αντιστρεπτή. Διερευνήθηκε η διαθεσιμότητα ή μη των δύο παραγώγων της υδρόλυσής του και διαπιστώθηκε ότι δεν διατίθενται εμπορικά. Ως εκ τούτου ελέγξαμε μη καθαρά δείγματα μετά από αλκαλική υδρόλυση στο εργαστήριο. Μητρικά διαλύματα Methidathion φέρονται σε τιμές pH από 9.5 έως 12, προσθέτοντας NaOH σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πάροδο 10 λεπτών επακολούθησε εξουδετέρωση σε pH 7.4 με την προσθήκη HNO₃ σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [150]. Από τα προκύπτοντα διαλύματα οι ανάλογες ποσότητες προστίθεντο σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων σύμφωνα με την πειραματική πορεία που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος ώστε να μελετηθεί η ενδεχόμενη γενοτοξικότητά τους.

Εν συντομία, 41 ώρες από την έναρξη των καλλιεργειών λεμφοκυττάρων προστίθεντο οι κατάλληλες συγκεντρώσεις του Methidathion μετά από την σχετική υδρολυτική επεξεργασία με NaOH και εξουδετέρωση με HNO₃. Η επίδραση των υδρολυτικών παραγώγων διαρκούσε 31 ώρες. Η αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης προκαλείτο με τη χρήση κυταροχλασίνης - B και διαρκούσε για 28 ώρες. Τα λεμφοκύτταρα στο συνολικό χρόνο των 72 ωρών



καλλιέργειας συλλέγονταν με φυγοκέντρωση, μονιμοποιούνταν με μεθανόλη/οξικό και επιστρώνονταν σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Μετά την ξήρανση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου βάφονταν με Giemsa και μελετούνταν με φακό 100X σε μικροσκόπιο (Leica, DMR).

Τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων αναφορικά με τις τιμές του pH και των συγκεντρώσεων του Methidathion παρουσιάζονται στους πίνακες 4 έως 9. Σε κάθε έναν από τους πίνακες που αντιστοιχούν σε κάθε ξεχωριστή τιμή pH εμφανίζονται τα ακόλουθα δεδομένα: στην πρώτη στήλη οι συγκεντρώσεις του Methidathion που εξετάσαμε καθώς και τα δείγματα του αρνητικού μάρτυρα, στη δεύτερη στήλη ο αριθμός των διπύρηνων κυττάρων (BN) που ελέγχθησαν, στην τρίτη στήλη η συχνότητα των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνες (BNMN) ανά 1000 διπύρηννα κύτταρα $\pm$ το τυπικό σφάλμα, στην τέταρτη και πέμπτη στήλη η τιμή - G και η πιθανότητα η οποία αντιστοιχεί σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05 όπως προκύπτει από την εφαρμογή του κριτηρίου - G για τη συχνότητα των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνες, στην έκτη στήλη η συχνότητα των μικροπυρήνων ανά 1000 διπύρηννα κύτταρα $\pm$ το τυπικό σφάλμα και τέλος στην έβδομη και όγδοη στήλη η τιμή - G και η πιθανότητα η οποία αντιστοιχεί επίπεδο σε σημαντικότητας 0.05 όπως προκύπτει από την εφαρμογή του κριτηρίου - G για την συχνότητα των μικροπυρήνων με προεπεξεργασία του Methidathion σε pH 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5 και 12 αντίστοιχα.

Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι μετά την αλκαλική υδρόλυση του Methidathion έως και το pH 10.5 δεν παρατηρείται επαγωγή διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνες είτε μικροπυρήνων και στις τρεις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (Πίνακες 4-6). Παρατηρώντας τον πίνακα 7 διαπιστώνουμε ότι από τη συγκέντρωση των 3μg/ml αρχίζει να εμφανίζεται οριακή επαγωγή τόσο των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα ($p=0.049$), όσο και των μικροπυρήνων ($p=0.049$). Θα πρέπει να αναφερθεί στο σημείο αυτό ότι μετά



Πίνακας 4. Επίδραση του Methidathion σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων μετά από παραμονή του μητρικού διαλύματος για 10 λεπτά σε pH 9.5 και επόμενη εξουδετέρωση σε pH 7.4								
Συγκέντρωση (μg/ml)	BN	BNMN/1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα	MN/1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα	
0	2000	5.0±0.0	-	-	5.0±0.0	-	-	-
1	2000	5.0±0.0	0	1	5.0±0.0	0	1	1
2	2000	5.0±0.0	0	1	5.5±0.5	0.048	0.825	
3	2000	6.0±0.0	0.188	0.663	6.5±0.5	0.412	0.520	
		R=0.775 P _R =0.225			R=0.913 P _R =0.080			

Πίνακας 5. Επίδραση του Methidathion σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων μετά από παραμονή του μητρικού διαλύματος για 10 λεπτά σε pH 10 και επόμενη εξουδετέρωση σε pH 7.4								
Συγκέντρωση ($\mu\text{g/ ml}$)	BN	BNMN/ 1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα	MN/ 1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα	
0	2000	5.0 $\pm$ 0.0	-	-	5.0 $\pm$ 0.0	-	-	-
1	2000	5.5 $\pm$ 0.5	0.048	0.825	5.5 $\pm$ 0.5	0.048	0.825	0.825
2	2000	6.0 $\pm$ 0.0	0.188	0.663	6.0 $\pm$ 0.0	0.188	0.663	0.663
3	2000	9.0 $\pm$ 1.0	2.596	0.107	9.0 $\pm$ 1.0	2.596	0.107	0.107
		R=0.898 P _R =0.102			R=0.898 P _R =0.102			

Πίνακας 6. Επίδραση του Methidathion σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων μετά από παραμονή του μητρικού διαλύματος για 10 λεπτά σε pH 10.5 και επόμενη εξουδετέρωση σε pH 7.4								
Συγκέντρωση (μg/ ml)	BN	BNMN/ 1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα	MN/ 1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα	
0	2000	5.0±0.0	-	-	5.0±0.0	-	-	
1	2000	5.5±0.5	0.048	0.825	5.5±0.5	0.048	0.825	
2	2000	6.0±0.0	0.714	0.397	8.0±1.0	1.529	0.216	
3	2000	9.0±1.0	2.596	0.107	9.0±0.0	2.596	0.107	
		R=0.898 P _R =0.102			R=0.969 P _R ^{**} =0.031			
** P_R<0.05								

Πίνακας 7. Επίδραση του Methidathion σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων μετά από παραμονή του μητρικού διαλύματος για 10 λεπτά σε pH 11 και επόμενη εξουδετέρωση σε pH 7.4								
Συγκέντρωση η (μg/ ml)	BN	BNMN/ 1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα	MN/ 1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα	
0	2000	5.0±0.0	-	-	5.0±0.0	-	-	-
1	2000	6.0±0.0	0.188	0.663	6.0±0.0	0.188	0.663	
2	2000	8.0±0.0	1.529	0.216	8.0±0.0	1.529	0.216	
3	2000	10.0±0.0	3.888	0.049*	10.0±0.0	3.888	0.049*	
		R=0.990 P _R ^{**} =0.010			R=0.990 P _R ^{**} =0.010			
*P<0.05, P _R ^{**} <0.05								

Πίνακας 8. Επίδραση του Methidathion σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων μετά από παραμονή του μητρικού διαλύματος για 10 λεπτά σε pH 11.5 και επόμενη εξουδετέρωση σε pH 7.4								
Συγκέντρωση (μg/ ml)	BN	BNMN/ 1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα	MN/ 1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα	
0	2000	5.0±0.0	-	-	5.0±0.0	-	-	-
1	2000	6.0±1.0	0.188	0.663	6.0±1.0	0.188	0.663	
2	2000	9.0±0.0	2.596	0.107	10.0±0.0	3.888	0.049*	
3	2000	16.5±0.5	16.532	0.001*	17.0±0.0	17.753	0.001*	
		R=0.939 P _R =0.069			R=0.948 P _R =0.052			
*P<0.005								

Πίνακας 9. Επίδραση του Methidathion σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων μετά από παραμονή, του μητρικού διαλύματος για 10 λεπτά σε pH 12 και επόμενη εξουδετέρωση σε pH 7.4.							
Συγκέντρωση (μg/ ml)	BN	BNMN/ 1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα	MN/ 1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα
0	2000	5.0±0.0	-	-	5.0±0.0	-	-
1	2000	6.5±0.5	0.412	0.520	6.5±0.5	0.412	0.520
2	2000	10.5±0.5	4.611	0.031*	11.5±0.5	6.199	0.012*
3	2000	16.0±0.0	15.342	0.001*	17.5±0.5	19.004	0.001*
		R=0.972 P _R ^{**} =0.028			R=0.972 P _R ^{**} =0.028		
*P<0.05, P _R ^{**} <0.05							

από μισής ώρας αλκαλική υδρόλυση σε pH 10.5 είναι εφικτή η ανάκτηση του 70% του Methidathion, ενώ σε pH 12.8 η ανάκτηση είναι της τάξεως του 30% [150]. Συνεπώς σε pH 11 ενδεχομένως έχουμε μία ενδιάμεση ικανότητα ανάκτησης, οπότε δικαιολογείται η παρατήρηση ότι από το pH 11 και τη συγκέντρωση των 3μg/ml έχουμε την προαναφερθείσα επαγωγή (Πινάκας 7). Από τους πίνακες 8 και 9 διαπιστώνουμε ότι η επαγωγή των MN μετά από αλκαλική υδρόλυση σε pH 11.5 και 12 αντίστοιχα, εμφανίζεται στις συγκεντρώσεις των 2 και 3 μg/ml ($p=0.049$, $p=0.001$ αντίστοιχα για pH 11.5 και $p=0.012$, $p=0.001$ αντίστοιχα για pH 12). Για τα BNMN παρατηρούμε ότι υπάρχει επαγωγή σε pH 11.5 και 12 ($p=0.001$) μόνο για την συγκέντρωση των 3μg/ml, ενώ για την συγκέντρωση των 2 μg/ml εμφανίζεται επαγωγή μόνο μετά από υδρόλυση σε pH 12 ($p=0.031$) (Πίνακες 8 και 9).

Το ποσοστό των διπύρηνων κυττάρων που περιείχε κάθε καλλιέργεια καθώς και η μεταβολή του δείκτη διπλασιασμού των κυττάρων $\pm$ το τυπικό σφάλμα υπό την επίδραση του Methidathion, αρνητικού μάρτυρα καθώς και του θετικού μάρτυρα σε συνθήκες φυσιολογική οξύτητας, pH 7.4, καθώς και μετά από αλκαλική υδρόλυση του Methidathion σε pH 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5 και 12 παρουσιάζονται στους πίνακες 10 έως 16 αντίστοιχα. Στον πίνακα 10 παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ του αρνητικού μάρτυρα και των συγκεντρώσεων του Methidathion, ενώ παρατηρήθηκε έντονη κυτταροτοξική δράση από την επίδραση της Mit-C

Τα δεδομένα των πινάκων 11-16 προσδιορίζουν ότι κάτω από οποιαδήποτε υδρολυτική επεξεργασία του Methidathion δεν έχουμε κυτταροτοξικότητα. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πιστοποιεί την μη κυτταροτοξικότητα (βλέπε τιμές F και p σε κάθε πίνακα μετά από στατιστική ανάλυση με One Way ANOVA των αποτελεσμάτων).



Πίνακας 10. Ποσοστό διπύρηνων κυττάρων και δείκτης CBPI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων σε pH 7.4			
Συγκέντρωση (μg/ml)	Σύνολο κυττάρων	% BN	CBPI
0	4000	62.44 ± 0.71	1.97 ± 0.07
1	4000	60.32 ± 0.48	2.07 ± 0.03
2	4000	62.35 ± 0.82	2.11 ± 0.02
3	4000	59.61 ± 0.92	1.89 ± 0.23
Mit-C (0.5 μg/ml)	4000	-	1.37 ± 0.16

Πίνακας 11. Ποσοστό διπύρηνων κυττάρων και δείκτης CBPI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων μετά την παραμονή του μητρικού διαλύματος για 10 λεπτά σε pH 9.5 και επόμενη εξουδετέρωσή του σε pH 7.4			
Συγκέντρωση (μg/ ml)	Σύνολο κυττάρων	% BN	CBPI
0	4000	56.04 ± 0.62	2.03 ± 0.05
1	4000	59.12 ± 0.56	2.16 ± 0.11
2	4000	58.63 ± 1.15	1.98 ± 0.05
3	4000	62.39 ± 1.35	2.12 ± 0.18

Πίνακας 12. Ποσοστό διπύρηνων κυττάρων και δείκτης CBPI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων μετά την παραμονή του μητρικού διαλύματος για 10 λεπτά σε pH 10 και επόμενη εξουδετέρωσή του σε pH 7.4			
Συγκέντρωση (μg/ ml)	Σύνολο κυττάρων	% BN	CBPI
0	4000	56.04 ± 0.62	2.03 ± 0.05
1	4000	63.03 ± 0.96	1.98 ± 0.03
2	4000	62.03 ± 1.28	2.02 ± 0.14
3	4000	53.69 ± 0.28	2.00 ± 0.07

Πίνακας 13. Ποσοστό διπύρηνων κυττάρων και δείκτης CBPI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων μετά την παραμονή του μητρικού διαλύματος για 10 λεπτά σε pH 10.5 και επόμενη εξουδετέρωσή του σε pH 7.4			
Συγκέντρωση (μg/ ml)	Σύνολο κυττάρων	% BN	CBPI
0	4000	56.04 ± 0.62	2.03 ± 0.05
1	4000	56.20 ± 0.23	2.06 ± 0.05
2	4000	59.72 ± 0.97	2.12 ± 0.03
3	4000	55.48 ± 1.76	2.03 ± 0.12



Πίνακας 14. Ποσοστό διπύρηνων κυττάρων και δείκτης CBPI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων μετά την παραμονή του μητρικού διαλύματος για 10 λεπτά σε pH 11 και επόμενη εξουδετέρωση του σε pH 7.4

Συγκέντρωση (μg/ ml)	Σύνολο κυττάρων	% BN	CBPI
0	4000	56.04 ± 0.62	2.03 ± 0.05
1	4000	52.14 ± 0.48	2.23 ± 0.08
2	4000	63.47 ± 0.62	2.16 ± 0.17
3	4000	52.78 ± 1.48	1.94 ± 0.02

Πίνακας 15. Ποσοστό διπύρηνων κυττάρων και δείκτης CBPI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων μετά την παραμονή του μητρικού διαλύματος για 10 λεπτό σε pH 11.5 και επόμενη εξουδετέρωση του σε pH 7.4

Συγκέντρωση (μg/ ml)	Σύνολο κυττάρων	% BN	CBPI
0	4000	56.04 ± 0.62	2.03 ± 0.05
1	4000	65.36 ± 1.36	2.05 ± 0.02
2	4000	61.23 ± 1.42	2.13 ± 0.09
3	4000	56.46 ± 1.26	1.99 ± 0.09

Πίνακας 16. Ποσοστό διπύρηνων κυττάρων και δείκτης CBPI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων μετά την παραμονή του μητρικού διαλύματος για 10 λεπτά σε pH 12 και επόμενη εξουδετέρωση του σε pH 7.4

Συγκέντρωση (μg/ ml)	Σύνολο κυττάρων	% BN	CBPI
0	4000	56.04 ± 0.62	2.03 ± 0.05
1	4000	67.58 ± 1.15	2.20 ± 0.07
2	4000	57.87 ± 1.26	2.06 ± 0.06
3	4000	59.23 ± 0.58	2.09 ± 0.22

1.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ IMIDACLOPRID

Για τη μελέτη της δράσης του Imidacloprid ελέγχθηκαν τρεις συγκεντρώσεις (10, 20, 30 μM) κατόπιν αξιολόγησης της σχετικής βιβλιογραφίας [151,152,153]. Τα αποτελέσματα της επίδρασης του Imidacloprid σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων στις τρεις αυτές συγκεντρώσεις καθώς και τα αποτελέσματα του αρνητικού μάρτυρα παρουσιάζονται στον



Πίνακα 17. Είναι εμφανές ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα, καθώς και στη συχνότητα των μικροπυρήνων μεταξύ του αρνητικού μάρτυρα και των ελεγχθέντων συγκεντρώσεων. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με αποτελέσματα από άλλες έρευνες [195,196]. Η έλλειψη γενοτοξικής δράσης καθώς και η ύπαρξη φορτίου στο μόριο του Imidacloprod, μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ενδεχομένως το αρνητικό φορτίο του Imidacloprid (πιο αρνητικό από αυτό των μεμβρανών των κυττάρων) [202] να ευθύνεται για τη μη είσοδο του συγκεκριμένου φυτοφαρμάκου στο εσωτερικό του κυττάρου. Το ενδεχόμενο αυτό επιδιώξαμε να το μελετήσουμε. Η πλέον λογική σκέψη ήταν να προσπαθήσουμε να εξουδετερώσουμε το φορτίο του Imidacloprid. Για να επιτύχουμε την εξουδετέρωση αυτή χρησιμοποιήσαμε το άλας KNO_3 . Αυτό μας δίνει τη δυνατότητα να μελετήσουμε τη δράση του Imidacloprid απαλλαγμένου από το φορτίο του. Η εξουδετέρωση του φορτίου πραγματοποιείται από το KNO_3 καθώς είναι γνωστό ότι τα άλατα σε διαλύματα διίστανται, προσφέροντας έτσι το φορτίο που απαιτείται. Επίσης θα πρέπει να σημειωθεί ότι η επιλογή του συγκεκριμένου άλατος έγινε για δύο λόγους: (α) γιατί αποτελεί ένα άλας που απαντάται πολύ συχνά στη φύση και μεταφέρεται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω των λαχανικών [154], επομένως μπορεί να θεωρηθεί ως περιβαλλοντικός παράγοντας και (β) διότι το μόριο του είναι σχετικά μικρό και ενδεχομένως να μη δημιουργεί προβλήματα με το μπλοκάρισμα των πόρων της κυτταρικής μεμβράνης. Συνεπώς, στην καλλιέργεια των λεμφοκυττάρων προσθέσαμε KNO_3 σε συγκεντρώσεις 0, 5, 10, 15, 20 μM παρουσία του Imidacloprid για να ελέγξουμε την ενδεχόμενη επαγωγή των μικροπυρήνων. Μελετήθηκε επίσης, η συχνότητα των μικροπυρήνων σε αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες, καθώς και υπό την επίδραση KNO_3 απουσία Imidacloprid σε συγκεντρώσεις 2, 10, 20 μM .

Τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων αναφορικά με τις συγκεντρώσεις του KNO_3 παρουσία και απουσία Imidacloprid παρουσιάζονται στους πίνακες 18 και 19. Στον Πίνακα 18 εμφανίζεται στην πρώτη στήλη οι συγκεντρώσεις του KNO_3 που εξετάσαμε καθώς και τα δείγματα του αρνητικού μάρτυρα, στη δεύτερη στήλη ο αριθμός των διπύρηνων κυττάρων (BN) που ελέχθησαν, στην τρίτη



στήλη η συχνότητα των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνες (BNMN) ανά 1000 διπύρηνια κύτταρα $\pm$ το τυπικό σφάλμα, στην τέταρτη και πέμπτη στήλη η τιμή - G και η πιθανότητα η οποία αντιστοιχεί σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05 όπως προκύπτει από την εφαρμογή του κριτηρίου - G για τη συχνότητα των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνες, στην έκτη στήλη η συχνότητα των μικροπυρήνων ανά 1000 διπύρηνια κύτταρα $\pm$ το τυπικό σφάλμα και τέλος στην έβδομη και όγδοη στήλη η τιμή-G και η πιθανότητα η οποία αντιστοιχεί σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05 όπως προκύπτει από την εφαρμογή του κριτηρίου - G για την συχνότητα των μικροπυρήνων.



Πίνακας 17. Επίδραση του Imidacloprid σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων							
Συγκέντρωση (μM)	BN	BNMN/1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα	MN/1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα
0	2000	5.5±0.5	-	-	6.5±0.5	-	-
10	2000	6.0±0.0	0.044	0.833	6.5±0.5	0	1
20	2000	7.0±0.0	0.378	0.538	8.0±1.0	1.001	0.316
30	2000	7.0±1.0	0.378	0.538	8.5±0.5	0.564	0.452
		R=0.947 P _R =0.053			R=0.939 P _R =0.061		

Πίνακας 18. Επίδραση του KNO ₃ σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων							
Συγκέντρωση (μM)	BN	BNMN/1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα	MN/1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα
0	2000	5.5±0.5	-	-	6.5±0.5	-	-
2	2000	5.0±1.0	0.047	0.828	5.0±1.0	0.378	0.538
10	2000	5.0±0.0	0.047	0.828	5.5±0.5	0.163	0.686
20	2000	5.0±0.0	0.047	0.828	6.0±1.0	0.039	0.841
		R=0.587 P _R =0.413			R=0.057 P _R =0.943		

Πίνακας 19. Επίδραση του Imidacloprid παρουσία KNO ₃ σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων								
Συγκέντρωση (μM)		BN	BNMN/ 1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα	MN/ 1000 BN	Τιμή G	Πιθανότητα
Imidacloprid	KNO ₃							
0	0	2000	5.5±0.5	-	-	6.5±0.5	-	-
20	0	2000	7.0±0.0	0.378	0.538	8.0±1.0	1.001	0.316
20	5	2000	10.5±0.5	3.604	0.057	10.5±0.5	3.604	0.057
20	10	2000	10.5±0.5	3.604	0.057	11.0±1.0	4.279	0.038*
20	15	2000	15.0±0.0	11.190	0.001*	15.5±0.5	12.219	0.001*
20	20	2000	15.5±0.5	12.219	0.001*	16.5±0.5	14.376	0.001*
			R=0.959 P _R ^{**} =0.010			R=0.966 P _R ^{**} =0.008		
*P<0.05, P _R ^{**} <0.05								

Στον Πίνακα 19 εμφανίζονται τα ακόλουθα: στην πρώτη στήλη οι συγκεντρώσεις του KNO_3 απουσία και παρουσία του Imidacloprid που εξετάσαμε καθώς και τα δείγματα του αρνητικού μάρτυρα, στη δεύτερη στήλη ο αριθμός των διπύρηνων κυττάρων (BN) που ελέγχθησαν, στην τρίτη στήλη η συχνότητα των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνες (BNMN) ανά 1000 διπύρηνια κύτταρα $\pm$ το τυπικό σφάλμα, στην τέταρτη και πέμπτη στήλη η τιμή-G και η πιθανότητα η οποία αντιστοιχεί σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05 όπως προκύπτει από την εφαρμογή του κριτηρίου - G για τη συχνότητα των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνες, στην έκτη στήλη η συχνότητα των μικροπυρήνων ανά 1000 διπύρηνια κύτταρα $\pm$ το τυπικό σφάλμα και τέλος στην έβδομη και όγδοη στήλη η τιμή-G και η πιθανότητα η οποία αντιστοιχεί σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05 όπως προκύπτει από την εφαρμογή του κριτηρίου-G για την συχνότητα των μικροπυρήνων. Όπως είναι εμφανές υπάρχει επαγωγή μικροπυρήνων για συγκεντρώσεις KNO_3 μεγαλύτερες από 10 μM ($P=0.038$, 0.001 και 0.01 αντίστοιχα) ενώ υπάρχει αυξημένη συχνότητα διπύρηνων με μικροπυρήνια για τις συγκεντρώσεις 15 και 20 μM ($P=0.001$).

Το ποσοστό των διπύρηνων κυττάρων που περιείχε κάθε καλλιέργεια, καθώς και η μεταβολή του δείκτη του διπλασιασμού των κυττάρων $\pm$ το τυπικό σφάλμα παρουσιάζονται στους πίνακες 20 και 21.

Πίνακας 20. Ποσοστό διπύρηνων κυττάρων και CBPI μετά από επίδραση KNO_3			
Συγκέντρωση (μM)	Σύνολο κυττάρων	% BN	CBPI
0	4000	76.45 $\pm$ 0.65	2.08 $\pm$ 0.17
2	4000	77.40 $\pm$ 0.70	2.21 $\pm$ 0.03
10	4000	78.75 $\pm$ 1.15	2.21 $\pm$ 0.08
20	4000	73.90 $\pm$ 0.20	2.19 $\pm$ 0.07



Πίνακας 21. Ποσοστό διπύρηνων κυττάρων και CBPI μετά από επίδραση του Imidacloprid παρουσία KNO_3				
	Συγκέντρωση (μM)	Σύνολο κυττάρων	% BN	CBPI
Imidacloprid	KNO_3			
0	0	4000	74.95 ± 2.45	1.99 ± 0.09
20	0	4000	68.40 ± 5.50	2.03 ± 0.08
20	5	4000	69.55 ± 1.25	2.02 ± 0.03
20	10	4000	70.65 ± 3.85	1.99 ± 0.06
20	15	4000	67.45 ± 0.75	1.97 ± 0.03
20	20	4000	75.75 ± 0.25	2.11 ± 0.01

2. ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΑΝΩ ΣΤΗΝ ΑΙΩΡΟΥΜΕΝΗ ΣΤΑΓΟΝΑ-ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΥ (Hg) ΤΟΥ HMDE

Η αιωρούμενη σταγόνα υδραργύρου, ως ηλεκτροδιακή επιφάνεια του HMDE, έχει χρησιμοποιηθεί πολλές φορές ως πρότυπη επιφάνεια για τη φυσικοχημική μελέτη των φαινομένων της προσρόφησης κυρίως υδρόφοβων μορίων, όπως για παράδειγμα αλειφατικών λιπαρών οξέων [155], του tri-n-butyl phosphate [156] και για την χασοτική (fractal) μελέτη των ιδιοτήτων της προσρόφησης του λινολαϊκού οξέος [157].

Η αλληλεπίδραση μορίων που περιέχουν άτομα θείου ή/και ηλεκτρόενέργες λειτουργικές ομάδες όπως για παράδειγμα η νιτροομάδα ($-\text{NO}_2$), με την σταγόνα- Hg έχει συγκεντρώσει τη συνεχή προσοχή των επιστημόνων κατά τη διάρκεια των τελευταίων 50 ετών. Οι πρωτοποριακές εργασίες των Kolthoff και Stricks [158] έχουν συμβάλει στην θεμελιώδη κατανόηση της φυσικοχημείας της αλληλεπίδρασης κυστείνης (cysteine) [158], κυστίνης (cystine) [159] με την υδραργυρική επιφάνεια. Προσφάτως το HMDE χρησιμοποιήθηκε και ως πρότυπη επιφάνεια για να κατανοηθεί θερμοδυναμικά η επιφανειακή ενεργότητα της κυτταρικής μεμβράνης στην προσρόφηση του αντιβιοτικού φαρμάκου Mitomycin-C [160].

Οι κύριοι στόχοι των πειραμάτων ήταν:



- α) να κατανοηθεί η θερμοδυναμική της προσρόφησης των οργανικών μορίων (φυτοφαρμάκων) από την υδραργυρική ηλεκτροδιακή επιφάνεια του HMDE, υπολογίζοντας τις τιμές της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, της ενθαλπίας και της εντροπίας του συστήματος,
- β) να μελετηθεί ο φυσικοχημικός μηχανισμός της αλληλεπίδρασης των λειτουργικών ομάδων με την πρότυπη επιφάνεια του HMDE σε φυσιολογικό pH και
- γ) να δοθεί μια περιεκτική βάση που να συσχετίζει τις φυσικοχημικές παραμέτρους με τις επιφανειακές αντιδράσεις των υπό μελέτη οργανικών μορίων που λαμβάνουν χώρα πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια.

Συμπερασματικά τα ανωτέρω βήματα στοχεύουν στο να κατανοήσουμε τον μηχανισμό με τον οποίο τα φυτοφάρμακα Methidathion και Imidacloprid προσροφώνται στην επιφάνεια της υδραργυρικής σταγόνας. Ο μηχανισμός αυτός ενδεχομένως να ανταποκρίνεται στις συνθήκες με τις οποίες τα δύο αυτά φυτοφάρμακα προσροφώνται στην κυτταρική μεμβράνη, γεγονός που αποτελεί το πρώτο βήμα στην ενδεχόμενη γενετοξική δράση τους.

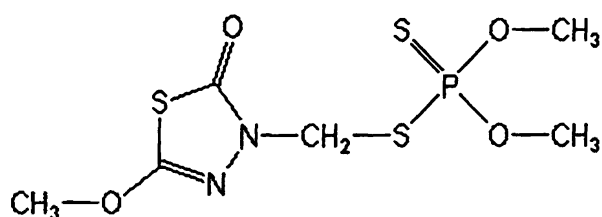
2.1 ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΤΟΥ METHIDATHION

Στην παρούσα ενότητα μελετήθηκαν οι διεργασίες προσρόφησης του Methidathion (Εικόνα 22) πάνω στην επιφάνεια της αιωρούμενης σταγόνας Hg.

Η εξέταση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του μορίου σε συνδυασμό με τη χημεία σε πρότυπα διαλύματα θα μας οδηγήσει σε ολοκληρωμένο σχήμα αντιδράσεων μέσω του οποίου θα είναι δυνατή η κατανόηση των επιφανειακών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια αιωρούμενης σταγόνας Hg.

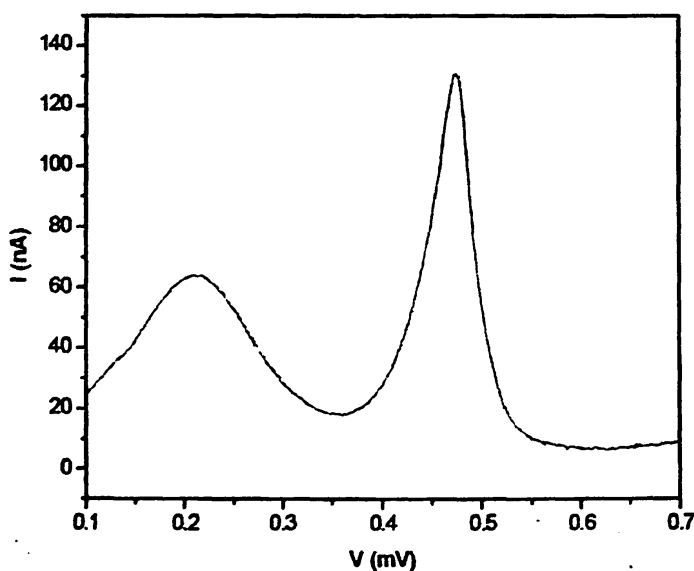
Το καθοδικό πολαρογράφημα (Ad-CSV) του Methidathion για συγκέντρωση 8 $\mu\text{g/ml}$ σε pH 7.4 και θερμοκρασία 21 °C παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5. Συγκεκριμένα, το σήμα χαρακτηρίζεται από 2 κύριες κορυφές με $E_{1/2} = -480 \text{ mV}$ και -200 mV αντίστοιχα σε pH 7.4.





Εικόνα 22. Συντακτικός τύπος του Methidathion

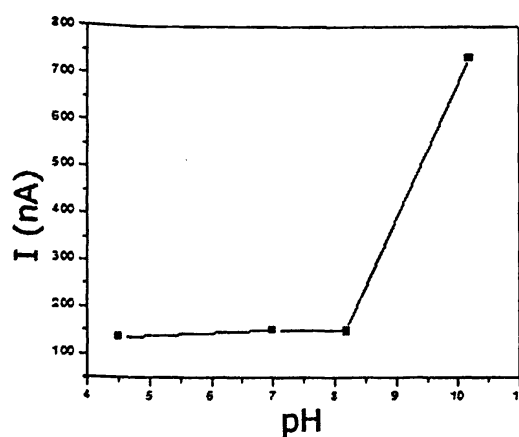
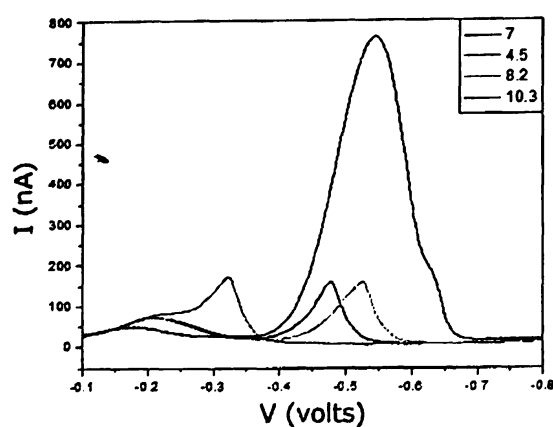
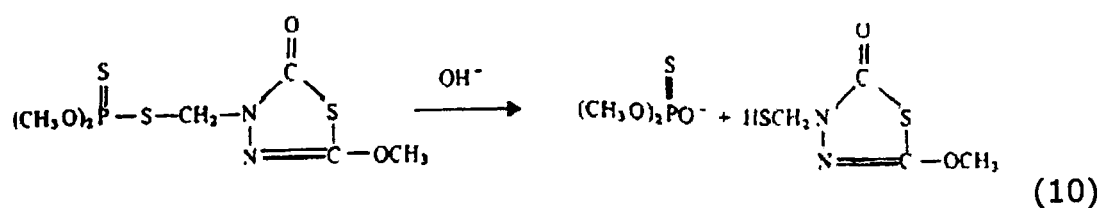
Στη συνέχεια, αναλύεται η επίδραση διαφόρων ηλεκτροχημικών, φυσικοχημικών παραμέτρων στο σήμα ad – CSV του Methidathion.



Διάγραμμα 5. SW ad – CSV πολαρογράφημα του Methidathion σε συγκέντρωση 8 $\mu\text{g/ml}$, pH 7.4 και θερμοκρασία 21 $^{\circ}\text{C}$.

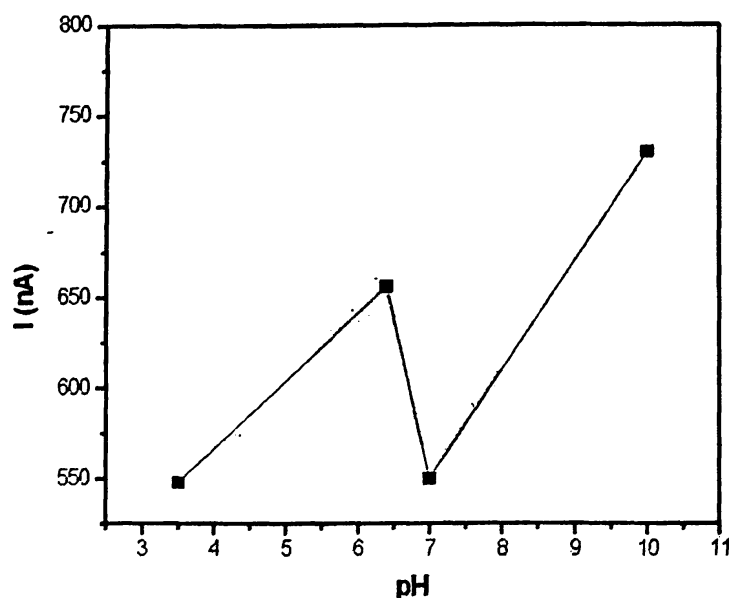
2.1.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH

Η εξάρτηση του σήματος του Methidathion από το pH του διαλύματος εμφανίζεται στο διάγραμμα 6. Σύμφωνα με το διάγραμμα, για χαμηλές τιμές pH ($\text{pH} < 10$) δεν υπάρχει διαφοροποίηση του διαλύματος στην παλινδρόμηση του pH από 7 σε 4.5 και ξανά σε 8.2. Σύμφωνα με τον Eto [20], το Methidathion σε υψηλά pH υδρολύεται ακολουθώντας την αντίδραση (10).



Διάγραμμα 6. Εξάρτηση του σήματος του Methidathion από το pH σε συγκέντρωση 8 $\mu\text{g/ml}$ και θερμοκρασία 21 $^{\circ}\text{C}$.

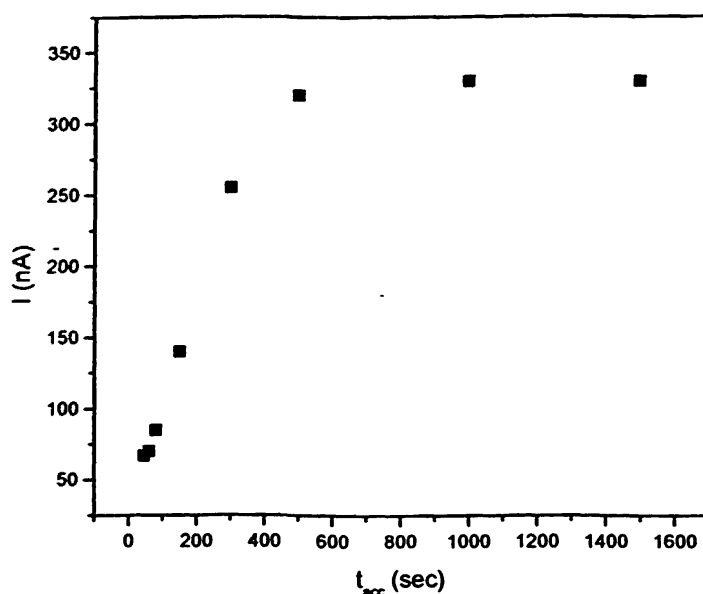
Από τα πειραματικά δεδομένα, συμπεραίνεται ότι το μόριο που προκύπτει κατά την υδρόλυση είναι αρκετά πιο ηλεκτροενεργό από το μόριο του Methidathion (Διάγραμμα 7). Η διαδικασία αυτή είναι μη αντιστρεπτή και μετά την υδρόλυση το σήμα δεν επηρεάζεται από το pH του διαλύματος. Τέλος, το δυναμικό δεν διαφοροποιείται, γεγονός που έχει παρατηρηθεί και σε άλλα φυτοφάρμακα που φέρουν λειτουργικές ομάδες $-\text{S}$ όπως το Thiram και Ziram [161].



Διάγραμμα 7. Εξάρτηση του σήματος του Methidathion για $\text{pH} > 10$ σε συγκέντρωση 8 $\mu\text{g/ml}$ και θερμοκρασία 21 $^{\circ}\text{C}$

2.1.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΡΟΝΟΥ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ

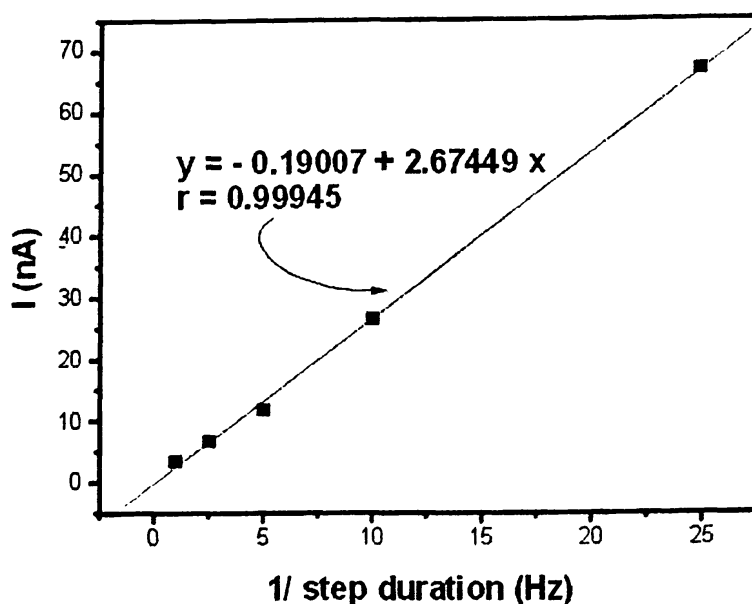
Στους 21 $^{\circ}\text{C}$ μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου συσσώρευσης (t_{acc}) πάνω στο μέγεθος του σήματος του Methidathion με, t_{acc} να λαμβάνει τιμές μεταξύ 0 έως 300 sec. Σύμφωνα με την διάγραμμα 8 για χρόνο μεγαλύτερο των 500 sec επέρχεται κορεσμός. Το ρεύμα κορυφής με την αύξηση του t_{acc} αυξάνεται γραμμικά έως ένα οριζόντιο επίπεδο που καθορίζει το ρεύμα κορεσμού (I_{sat}) για κάθε μελετώμενη συγκέντρωση (διάγραμμα 8). Το ρεύμα κορεσμού ποικίλλει ανάλογα με την συγκέντρωση του Methidathion.



Διάγραμμα 8. Επίδραση του χρόνου συσσώρευσης στο ρεύμα κορυφής για 8 $\mu\text{g/ml}$, θερμοκρασία 21 $^{\circ}\text{C}$ και $\text{pH} = 7.4$.

Ανακεφαλαιώνοντας, με βάση τα παραπάνω πειράματα, φαίνεται ότι η πλήρης κάλυψη της σταγόνας Hg απαιτεί χρόνους συσσώρευσης $t_{acc} > 500 \text{ sec}$, ώστε να επέλθει ισορροπία και μονοστρωματική κάλυψη της σταγόνας Hg.

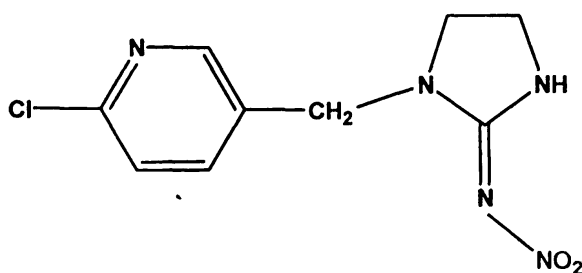
Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το Methidathion συμπλοκοποιείται με την υδραργυρική ηλεκτροδιακή επιφάνεια του HMDE με υψηλή συγγένεια. Ένδειξη αυτής της ισχυρής συμπλοκοποίησης αποτελεί ο σχηματισμός ενός σταθερού συμπλόκου (no - labile) [162], που πιστοποιείται από τη γραμμική σχέση που διατηρεί το ρεύμα κορυφής συναρτήσει της συχνότητας του εφαρμοζόμενου παλμού (Διάγραμμα 9).



Διάγραμμα 9. Επίδραση της συχνότητας του εφαρμοζόμενου παλμού πάνω στο ρεύμα κορυφής του Methidathion σε συγκέντρωση 8 $\mu\text{g/ml}$, θερμοκρασία 21 $^{\circ}\text{C}$ και $\text{pH} = 7.4$.

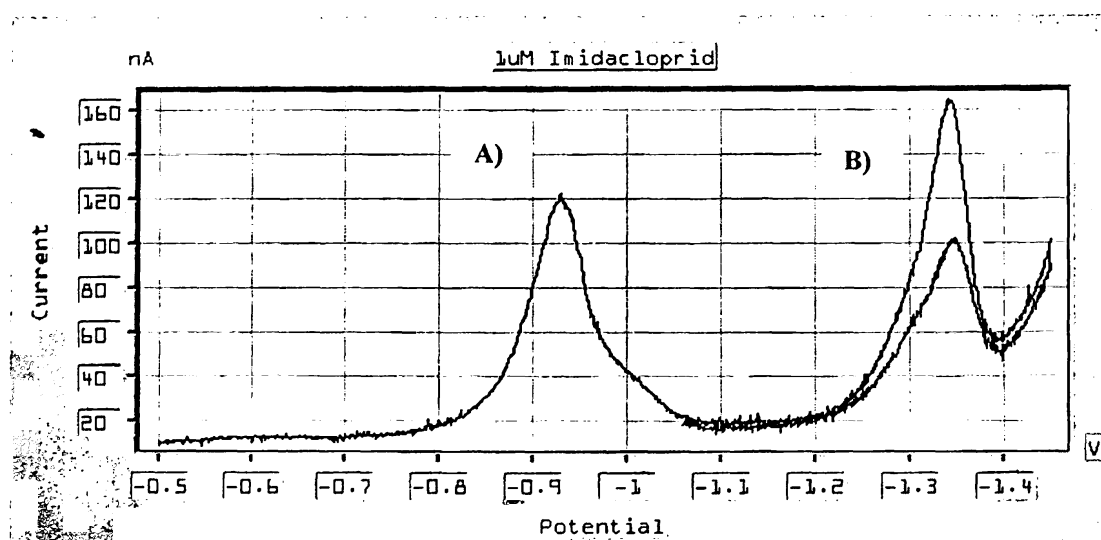
2.2 ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΤΟΥ IMIDACLOPRID

Το πολαρογράφημα της προσροφητικής καθοδικής βολταμμετρίας τετραγωνικού παλμού (SWad-CSV) του Imidacloprid (Εικόνα 23) φέρει δύο κορυφές σύμφωνα με το διάγραμμα 10, για ένα εύρος pH από 2.5 έως 10. Τα δυναμικά ημίσεως κύματος $E_{1/2}$ για την κορυφή-A είναι: $E_{1/2} = -930 \text{ mV}$, ενώ για την κορυφή-B είναι: $E_{1/2} = -1350 \text{ mV}$ (ως προς Ag/AgCl) [163]. Οι κορυφές αυτές έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία [163,164] και αποδίδονται στην αναγωγή της νιτροομάδας σε υδροξυλαμίνη (κορυφή-A) και σε αμίνη (κορυφή-B) όπως αναλύεται και παρακάτω.



Εικόνα 23. Συντακτικός τύπος του Imidacloprid

Συγκρίνοντας το παραγόμενο πολαρογράφημα με αυτό που περιγράφεται βιβλιογραφικά [163], μέσω της κορυφής με δυναμικό $E_{1/2} = -930$ mV και χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες μέτρησης, διαπιστώσαμε μια αύξηση της ευαισθησίας της μέτρησης μειώνοντας το όριο ανίχνευσης του Imidacloprid από το 250 nA/1 μ M σε 1200 nA/1 μ M [163], γεγονός που αποδίδεται κατά κύριο λόγο στον νέου τύπου χρησιμοποιούμενο πολαρογράφο POL50.



Διάγραμμα 10. SWV Πολαρογράφημα 1 μ M Imidacloprid σε θερμοκρασία 20 °C με ηλεκτρολύτη 10mM Britton-Robinson pH= 7.4. Πειραματικές συνθήκες: stirring 525rpm, $E_{acc} = -500$ mV για την κορυφή-A και B, $E_{acc} = -1060$ mV για την κορυφή-B και Electr. time=45sec

2.2.1 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΟΛΑΡΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ AD-CSV ΤΟΥ IMIDACLOPRID

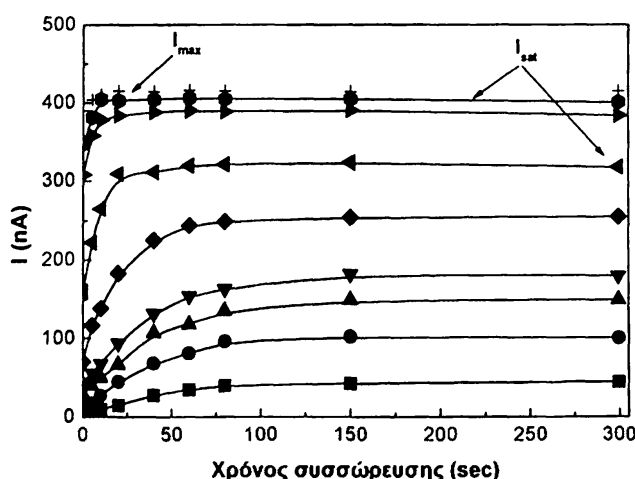
Για να μελετήσουμε τη φυσικοχημική συμπεριφορά του Imidacloprid και κατά συνέπεια να προσδιορίσουμε τον πιθανό μηχανισμό με τον οποίο προσροφάται από την κυτταρική μεμβράνη ελέγξαμε τις παρακάτω συνθήκες:

α) Επίδραση του χρόνου συσσώρευσης στο ρεύμα κορυφής

Σε θερμοκρασία $T = 283$ °K (10 °C) μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου συσσώρευσης στο μέγιστο ρεύμα της κορυφής-B (Διάγραμμα 11) για διάφορες συγκεντρώσεις του Imidacloprid. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 11 το ρεύμα I



της κορυφής-B αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου προσυγκέντρωσης t_{acc} έως ένα οριζόντιο επίπεδο το οποίο και καθορίζει το ρεύμα κορεσμού (I_{sat}) για κάθε μελετώμενη συγκέντρωση. Το μέγιστο ρεύμα κορεσμού (I_{sat}) ποικίλλει ανάλογα με τη συγκέντρωση του Imidacloprid. Σε συγκέντρωση υψηλότερη από 8 μM παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των ρευμάτων κορεσμού αρχίζουν να ταυτίζονται, γεγονός που αποτελεί ένδειξη πλήρους κάλυψης της ηλεκτροδιακής επιφάνειας, με αποτέλεσμα η τιμή του ρεύματος κορεσμού, που αντιστοιχεί σε αυτές τις συγκεντρώσεις (I_{sat}), να προσεγγίζει την μέγιστη τιμή του ρεύματος κορυφής (I_{MAX}).

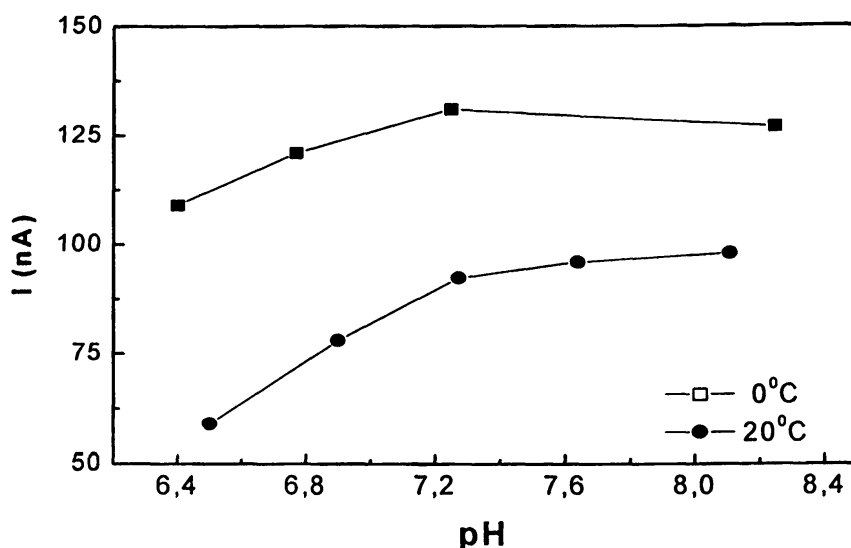


Διάγραμμα 11. Επίδραση του χρόνου συσσώρευσης πάνω στο ρεύμα της δεύτερης κορυφής σε 10 °C για συγκεντρώσεις του Imidacloprid ■0.25 μM , ●0.5 μM , ▲0.755 μM , ▼1 μM , ◆2 μM , ◀4 μM , ▶8 μM , ●10 μM και +12 μM .

β) Επίδραση του pH και της θερμοκρασίας στο ρεύμα κορυφής

Οι εντάσεις των κορυφών-A και -B είναι ευαίσθητες στη θερμοκρασία. Αυτό όπως συζητείται λεπτομερώς στη συνέχεια, οφείλεται στην εξάρτηση της προσρόφησης του Imidacloprid στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια του HMDE από τη θερμοκρασία. Ωστόσο ο λόγος των εντάσεων της κορυφής-B σε διάφορες τιμές pH για δύο διαφορετικές θερμοκρασίες παραμένει σταθερός (Διάγραμμα 12). Αναλυτικά, σύμφωνα με το διάγραμμα 12 με την αύξηση του pH έως την τιμή $\text{pH}=7.2$ το ρεύμα της κορυφής-B αυξάνεται, ενώ για τιμές $\text{pH}>7.2$ το ρεύμα της

κορυφής-B σταθεροποιείται ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία εκτέλεσης του πειράματος.

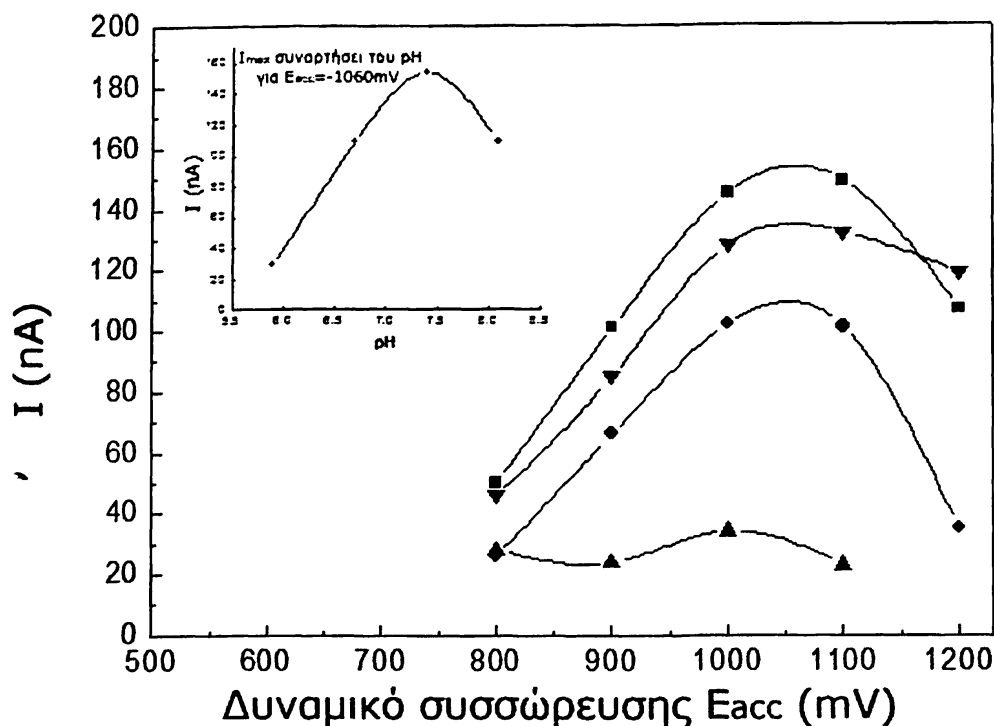


Διάγραμμα 12. Πολαρογραφική συμπεριφορά της κορυφής-B του Imidacloprid σε συνάρτηση του pH για δύο διαφορετικές θερμοκρασίες: (■) 0 °C και (●) 20 °C

γ) Επίδραση του δυναμικού συσσώρευσης στο ρεύμα κορυφής

Στο διάγραμμα 13 παρουσιάζεται η επίδραση του δυναμικού συσσώρευσης (E_{ACC}) στο ρεύμα της κορυφής-B σε σχέση με το pH του διαλύματος.

Για όλες τις τιμές του pH του διαλύματος από 2.5 έως 10, διαπιστώνεται ότι ο λόγος των εντάσεων των κορυφών-A και -B παραμένει σταθερός. Αναλυτικά, το μέγιστο ρεύμα της κορυφής-A αυξάνεται μέχρι τιμή δυναμικού συσσώρευσης $E_{ACC} = -500\text{mV}$, ενώ μετά από αυτήν την τιμή μειώνεται. Στην περίπτωση της κορυφής-B υπάρχει μια παρόμοια συμπεριφορά, αλλά η μέγιστη τιμή της έντασης του ρεύματος εμφανίζεται για δυναμικό προσυγκέντρωσης $E_{ACC} = -1060\text{mV}$, ενώ η μέγιστη τιμή της έντασης του ρεύματος για την περίπτωση της κορυφής-B βρέθηκε για τιμή $\text{pH} = 7.4$ σύμφωνα με το ένθετο σχήμα της διαγράμματος 13.



Διάγραμμα 13. Επίδραση του δυναμικού συσσώρευσης E_{ACC} και του pH πάνω στη δεύτερη κορυφή, κορυφή-B, σε $T=288\text{ }^{\circ}\text{K}$ ($15\text{ }^{\circ}\text{C}$). Συγκέντρωση Imidacloprid $0.5\mu\text{M}$ και τιμές pH: ▲ 5.9, ● 6.7, ■ 7.4 και ▼ 8.1. Ένθετο διάγραμμα: επίδραση pH στο $I_{\max}$ της κορυφή-B για $E_{acc}=-1060\text{ mV}$.

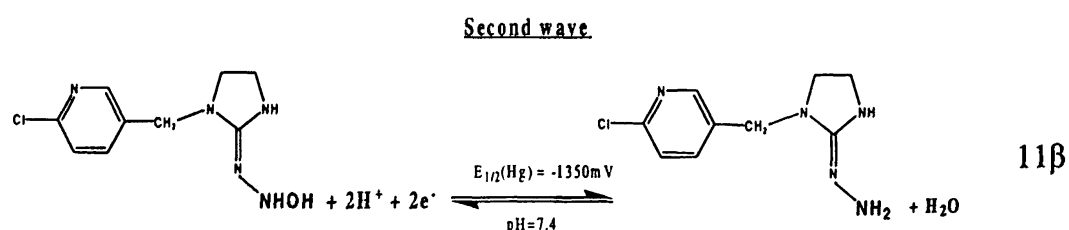
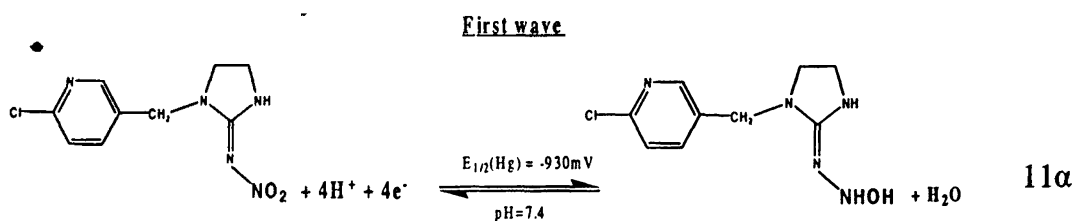
Τα παραπάνω συμφωνούν βιβλιογραφικά με την παρατήρηση των Guiberteau *et al.* [164], ότι η μέγιστη τιμή έντασης ρεύματος των κορυφών-A και-B εμφανίζεται σε περιοχή pH από 7 έως 10, με την κορυφή-A να έχει υψηλότερη μέγιστη τιμή έντασης ρεύματος από την κορυφή-B.

Για την καλύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς των σημάτων του διαγράμματος 10 πρέπει πρώτα να συζητήσουμε τη χημεία του Imidacloprid σε διάλυμα από κοινού με τις σχετικές αντιδράσεις επιφάνειας, που λαμβάνουν χώρα πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια κατά τη διαδικασία της προσρόφησης του στο HMDE.

δ) Επιφανειακές αντιδράσεις του Imidacloprid με την πρότυπη επιφάνεια-Hg. Μηχανισμός πρόσδεσης.

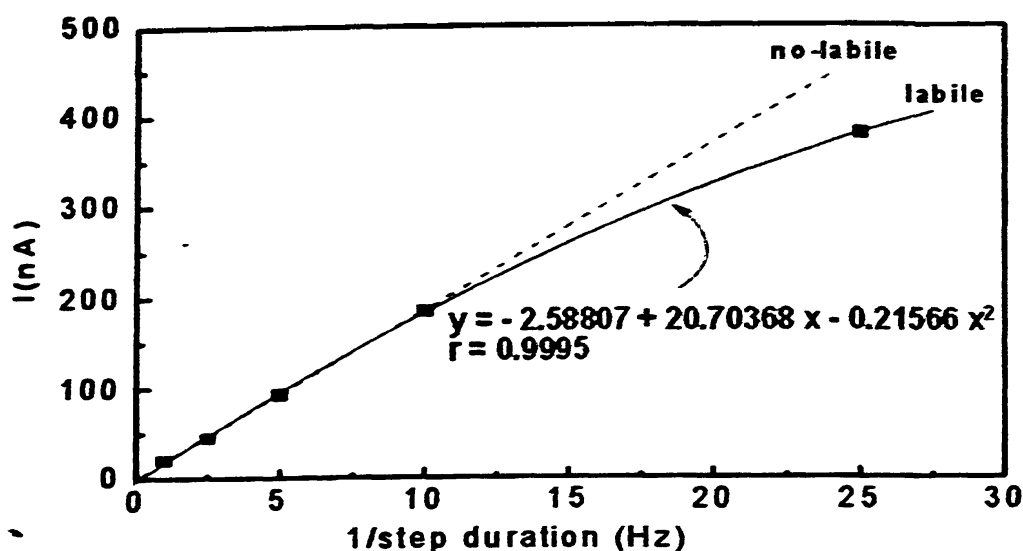
Από την στιγμή που προσροφηθεί το μόριο του Imidacloprid δια μέσου της νιτροομάδας (Imid-NO_2^-) στην επιφάνεια, η ηλεκτροδιακή επιφάνεια-Hg δρα

καταλυτικά προκαλώντας αναγωγή της λειτουργικής νιτροομάδας του Imidacloprid μέσω δύο βημάτων, προς υδροξυλαμίνη (1^ο βήμα) και στη συνέχεια προς αμίνη (2^ο βήμα) [163,165,166] σύμφωνα με τις παρακάτω αναγωγικές ημιαντιδράσεις (11α, β):



Έτσι σε pH=7.4, η κορυφή-A του πολαρογραφήματος του διαγράμματος 7 με δυναμικό ημίσεως κύματος: $E_{1/2} = -930\text{mV}$ οφείλεται στη αναγωγή της νιτροομάδας (Imid-NO₂⁻) προς υδροξυλο-αμινομάδα (Imid-NHOH), ενώ η κορυφή-B με δυναμικό ημίσεως κύματος: $E_{1/2} = -1350\text{mV}$ οφείλεται στη αναγωγή της παραγόμενης υδροξυλο-αμινομάδας (hydroxylamine) προς αμίνη (Imid-NH₂) όπως φαίνεται στις ημιαντιδράσεις 11α και 11β [163,165,166].

Στο διάγραμμα 14 παρουσιάζεται η μεταβολή της έντασης της κορυφής-B σε συνάρτηση με την συχνότητα χ του εφαρμοζόμενου παλμού. Αρχικά είναι γραμμική αλλά για παλμό μεγαλύτερο από 10Hz αποκλίνει αυτής [167]. Η γραμμική εξάρτηση από την $\sqrt{\chi}$ είναι ένδειξη δημιουργίας ασταθούς συμπλόκου (labile) με τα άτομα υδραργύρου της πρότυπης ηλεκτροδιακής επιφάνειας-Hg [167]: $I \sim C\sqrt{\chi}$



Διάγραμμα 14. Το ρεύμα της κορυφής $E_{1/2} = -930$ mV συναρτήσει του scan-rate για $1\mu\text{M}$ Imidacloprid. Η απόκλιση από γραμμικότητα υποδηλώνει αντιστρεψιμότητα επιφανειακής αντίδρασής όπου: ■ πειραματικά σημεία, (---) η θεωρητική καμπύλη

Συνεπώς ο παραπάνω ηλεκτροδιακός μηχανισμός πρόσδεσης του Imidacloprid στο HMDE περιγράφεται από την ακόλουθη αντιστρεπτή αντίδραση (12):

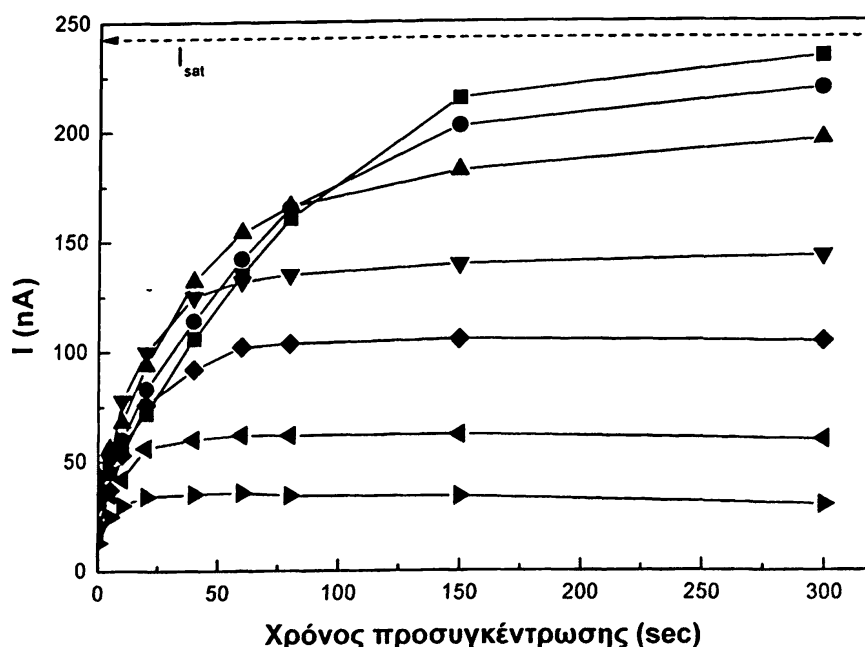


2.2.2 ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ

α) Ισόθερμες προσρόφησης

Για να καθορίσουμε τον ρόλο της θερμοκρασίας στην προσρόφηση, μελετήσαμε την προσρόφηση $1\mu\text{M}$ Imidacloprid για σταθερό χρόνο προσυγκέντρωσης t_{acc} , και για ένα θερμοκρασιακό εύρος από 0 έως 30°C (Διάγραμμα 15).

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 15 το μέγιστο ρεύμα κορεσμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Συγκεκριμένα σε θερμοκρασία περίπου 0°C είναι 220 nA ενώ σε θερμοκρασία 20°C είναι 95 nA. Σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 30°C φαίνεται να μην προσροφάται καθόλου. Το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η προσρόφηση του Imidacloprid στην πρότυπη επιφάνεια της σταγόνας-Hg του HMDE δεν ευνοείται από τη θερμοκρασία.



Διάγραμμα 15. Επίδραση της χρόνου προσυγκέντρωσης στο ρεύμα κορυφής 1μM Imidacloprid σε διαφορετικές θερμοκρασίες: ■ 0 °C, ● 5 °C, ▲ 10 °C, ▼ 15 °C, ◆ 20 °C, ◄ 25 °C και ► 30 °C.

Σύμφωνα και με άλλες περιπτώσεις [160,168], τα αποτελέσματα της προσρόφησης του Imidacloprid στην πρότυπη επιφάνεια της σταγόνας-Hg του HMDE μπορούν να περιγραφούν μακροσκοπικά από την ισόθερμη τύπου Langmuir (17):

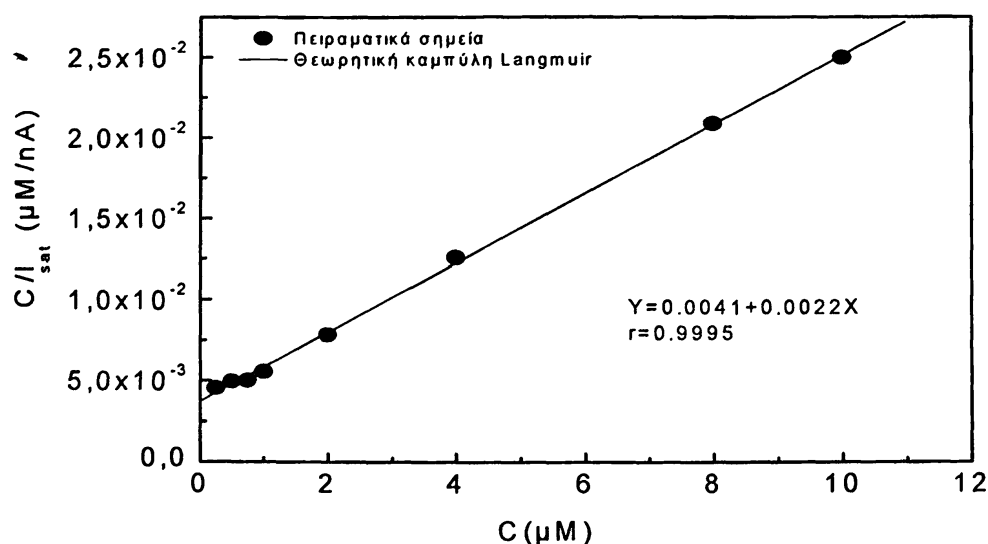
$$\theta = \frac{B_{ADS} \cdot C}{1 + B_{ADS} \cdot C} \quad (17)$$

όπου: θ είναι το κλάσμα κάλυψης της επιφάνειας, C η συγκέντρωση της προσροφημένης ουσίας στο διάλυμα και $B_{ADS}(M^{-1})$ είναι η σταθερά ισορροπίας, που εξαρτάται από τη θερμοκρασία και απεικονίζει τη συγγένεια των μορίων της προσροφημένης ουσίας για τις περιοχές προσρόφησης.

Αν για κάθε συγκέντρωση του Imidacloprid, το θ οριστεί ως $\theta = I_{sat}/I_{MAX}$, τότε λαμβάνουμε τη γραμμική μορφή της ισόθερμης Langmuir (18):

$$\frac{C}{I_{sat}} = \frac{1}{B_{ADS} \cdot I_{MAX}} + \frac{C}{I_{MAX}} \quad (18)$$

Εάν ισχύει για το σύστημα η ισόθερμη Langmuir, τότε η γραφική παράσταση του C/I_{sat} ως συνάρτηση της συγκέντρωσης C της ουσίας στο διάλυμα πρέπει να είναι γραμμική με συντελεστή συσχέτισης $r \rightarrow 1$, και οι παράμετροι I_{MAX} και B_{ADS} μπορούν να υπολογιστούν από την κλίση και το σταθερό όρο της γραμμικής συνάρτησης αντίστοιχα (Διάγραμμα 16).



Διάγραμμα 16. Ισόθερμη προσρόφησης του imidacloprid πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια του HMDE σε pH=7.4 και θερμοκρασία 10 °C

Για παράδειγμα, σε θερμοκρασία 10 °C, από την κλίση της C/I_{sat} έναντι της συγκέντρωσης C , το μέγιστο ρεύμα I_{MAX} βρέθηκε να είναι 454 nA σε καλή συμφωνία με την πειραματικά αποκτηθείσα τιμή (414 nA), ενώ η παράμετρος B_{ADS} υπολογίστηκε από τον σταθερό όρο του και η τιμή του βρέθηκε ίση με $5.34 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$

Στον Πίνακα 22 και σε διάφορες θερμοκρασίες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την προσαρμοστικότητα της εξίσωσης Langmuir στα πειραματικά δεδομένα, απ' όπου φαίνεται ότι η σχέση του C/I_{sat} με την συγκέντρωση C της ουσίας στο διάλυμα είναι γραμμική με έναν μέσο συντελεστή συσχέτισης $r = 0.9995$.

Ανακεφαλαιώνοντας, η ισόθερμη Langmuir μπορεί να περιγράψει επιτυχώς την προσρόφηση, όπως επιβεβαιώνεται μέσω των τιμών των συντελεστών συσχέτισης, οι οποίοι επιβεβαιώνουν την γραμμική εξάρτηση του C/I_{sat} από την συγκέντρωση C της ουσίας στο διάλυμα για όλο το μελετώμενο θερμοκρασιακό εύρος.

Πίνακας 22. Σταθερά Langmuir και Ελεύθερη ενέργεια Gibbs σε συνάρτηση με την θερμοκρασία, για την προσρόφηση του Imidacloprid στο HMDE

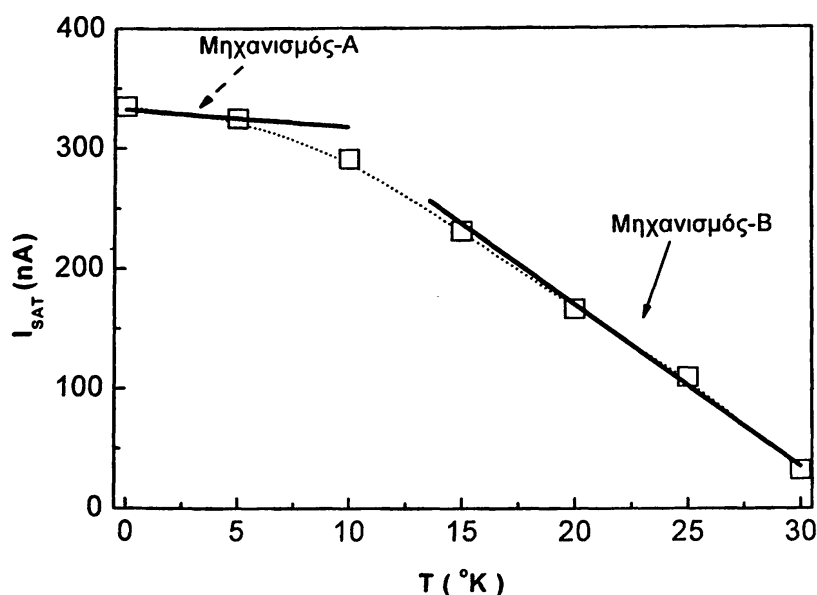
T (K)	$B_{ADS} \times 10^5 (M^{-1})$	$\Delta G_{ADS} (kJ mol^{-1})$	r
273	10.07	-40.49	0.9989
278	7.36	-40.51	0.9996
283	5.34	-40.48	0.9995
288	3.27	-40.02	0.9987
293	2.12	-39.66	0.9978
298	1.34	-39.20	0.9969
303	0.83	-38.65	0.9991

Η κατανομή των μέγιστων ρευμάτων κορεσμού συναρτήσει της θερμοκρασίας (Διάγραμμα 17) φανερώνει δύο διαφορετικούς μηχανισμούς πρόσδεσης του Imidacloprid με την ηλεκτροδιακή επιφάνεια της αιωρούμενης σταγόνας-Hg του HMDE, που για λόγους απλούστευσης θα τους ονομάσουμε μηχανισμό-A και -B.

Αναλυτικά έχουμε:

- Ο μηχανισμός A: περιγράφει την προσρόφηση σε χαμηλές θερμοκρασίες $t < 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ όπου φαίνεται να επηρεάζεται λίγο από τη θερμοκρασία, ενώ αντίθετα
- Ο μηχανισμός B: περιγράφει την προσρόφηση σε υψηλές θερμοκρασίες $t > 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ όπου φαίνεται να επηρεάζεται έντονα από την θερμοκρασία.





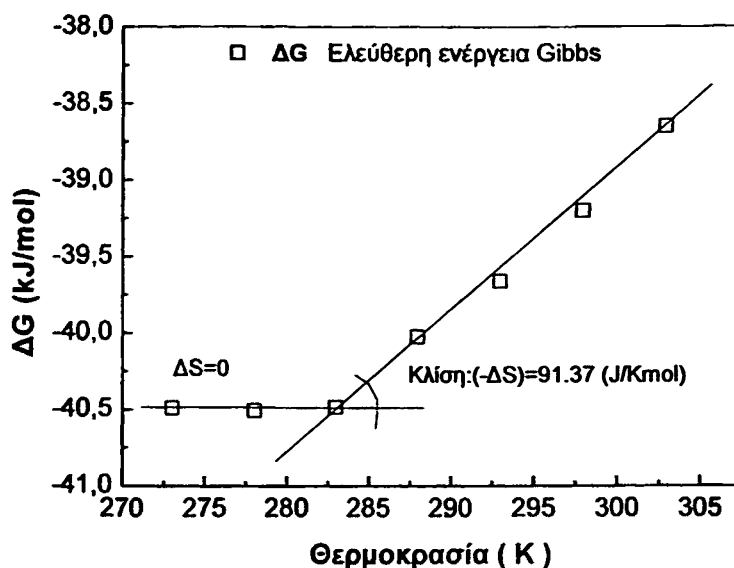
Διάγραμμα 17. Η εξάρτηση του ρεύματος κορεσμού από την θερμοκρασία για διάλυμα 4μM Imidacloprid.

Η παράμετρος B_{ADS} σχετίζεται με την ελεύθερη ενέργεια Gibbs μέσω της παρακάτω εξίσωσης (19):

$$\Delta G_{ADS} = -RT \ln([S] \cdot B_{ADS}) \quad (19)$$

όπου: R (J/ mol* K) είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων, T ($^{\circ}K$) η θερμοκρασία, ΔG_{ADS} (J/mol* K) η ελεύθερη ενέργεια Gibbs της προσρόφησης και $[S]=55.5$ (mol/L) η συγκέντρωση του διαλύτη στο υδατικό διάλυμα.

Με τη βοήθεια της εξίσωσης (19), η ελεύθερη ενέργεια Gibbs της προσρόφησης του Imidacloprid σε pH=7.4 υπολογίστηκε για διάφορες θερμοκρασίες (Πίνακας 22). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται διαγραμματικά και στο διάγραμμα 18.



Διάγραμμα 18. Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs του συστήματος συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 18 η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs του συστήματος είναι γραμμική: $Y = -40.4857$ από 0 έως 10°C και $Y = -66.3839 + 0.09137X$ με $r = 0.9997$ από 10 °C έως 30 °C αντίστοιχα. Έτσι επιβεβαιώνονται οι δύο προηγούμενοι μηχανισμοί πρόσδεσης του μορίου με την ηλεκτροδιακή επιφάνεια του HMDE.

Οι τιμές της εντροπίας και ενθαλπίας της προσρόφησης συναρτήσει της θερμοκρασίας υπολογίζονται από τις ακόλουθες εξισώσεις 20 και 21:

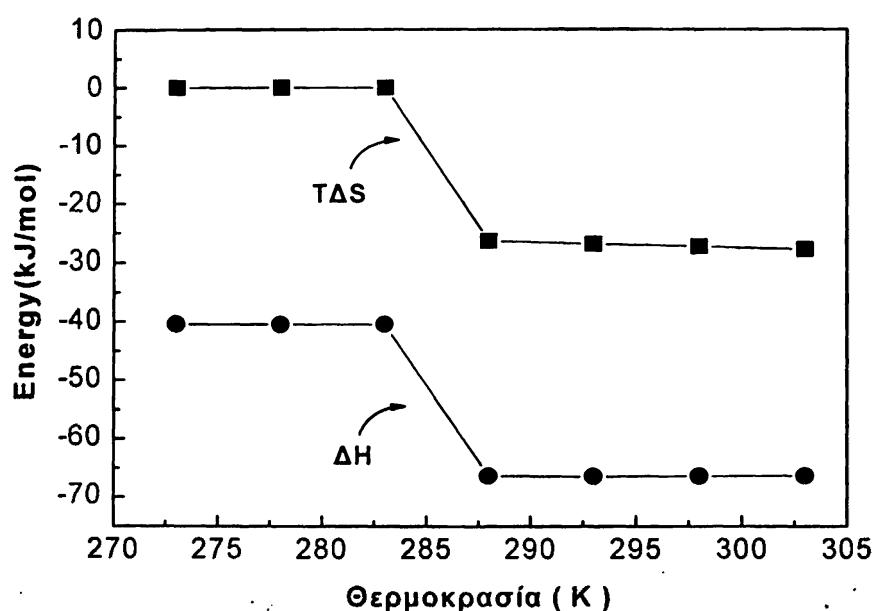
$$\Delta S_{ADS} = -\frac{\partial \Delta G_{ADS}}{\partial T} \quad (20)$$

$$\Delta G_{ADS} = \Delta H_{ADS} - T\Delta S_{ADS} \quad (21)$$

Στο διάγραμμα 16 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που περιγράφονται στο Πίνακα 23, δηλαδή η ΔS_{ADS} , $T \Delta S_{ADS}$ και ΔH_{ADS} .

Πίνακας 23. Εντροπία και Ενθαλπία προσρόφησης του Imidacloprid στο HMDE σε συνάρτηση με την θερμοκρασία

T (K)	ΔS_{ADS} (J/K* mol)	T ΔS_{ADS} (kJ/mol)	ΔH_{ADS} (kJ/mol)
273	0	0	-40.49
278	0	0	-40.51
283	0	0	-40.48
288	-91.37	-26.32	-13.71
293	-91.37	-26.77	-12.89
298	-91.37	-27.23	-11.97
303	-91.37	-27.68	-10.97



Διάγραμμα 19. Η εξάρτηση της (■) Ελεύθερης ενέργειας Gibbs της (●) Εντροπικής (TΔS) και (▲) Ενθαλπικής (ΔH) ενέργειας του συστήματος από την θερμοκρασία.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 19 η μεταβολή της εντροπίας και της ενθαλπίας συναρτήσει της θερμοκρασίας είναι σταθερή από 0 έως 10 °C και από 20 έως 30 °C, γεγονός που ενισχύει την προηγούμενη υπόθεση. Επίσης από τις τιμές που διατηρούν η εντροπία και η ενθαλπία συμπεραίνουμε ότι όλη η διαδικασία της προσρόφησης γίνεται αυθόρμητα ($\Delta G < 0$) και κατευθύνεται από τον ενθαλπικό όρο ($\Delta H < 0$) αφού ο εντροπικός όρος TΔS είναι μόνιμα αρνητικός.

Επίσης η απότομη μετάβαση των ενεργειακών μεγεθών που λαμβάνει χώρα για θερμοκρασία από 10 °C έως 20 °C πιθανόν να οφείλεται σε αλλαγή της διευθέτησης του μορίου προς την ηλεκτροδιακή επιφάνεια.

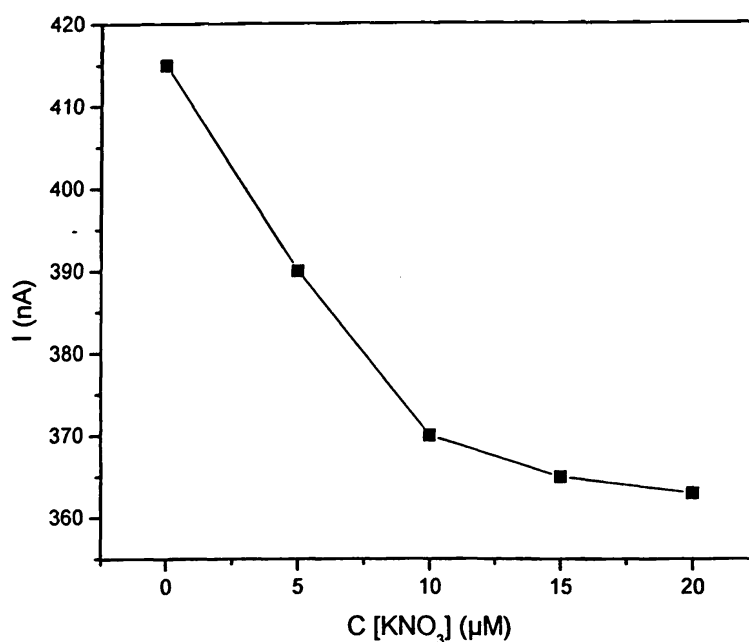
Βιολογικά έχει επιβεβαιωθεί η ισχυρή τοξική δράση του Imidacloprid στα έντομα (ψυχρόαιμοι οργανισμοί), ενώ σε υψηλές θερμοκρασίες ενδεχομένως δεν παρουσιάζει γενοτοξική δράση, για παράδειγμα στον ανθρώπινο οργανισμό (θερμόαιμοι οργανισμοί $\theta > 35$ °C), όπως επιβεβαιώνεται μέσω της τεχνικής των μικροπυρήνων.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η προσρόφηση του Imidacloprid στην ενεργή υδραργυρική επιφάνεια αποδίδεται στην φορτισμένη νιτροομάδα, ενώ δεν διευκρινίζεται πλήρως η συγγένεια του υδρόφοβου χαρακτήρα του μορίου με τον υδράργυρο.

2.3 ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΤΟΥ IMIDACLOPRID ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ

Στην ενότητα αυτή μελετήθηκε η προσρόφηση του Imidacloprid στις κυτταρικές μεμβράνες των λεμφοκυττάρων. Μετά από καλλιέργεια λεμφοκυττάρων για 72 ώρες υπό την επίδραση 20 μ M Imidacloprid παρουσία και απουσία του KNO_3 , τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και αφού συλλέχθηκε το υπερκείμενο προστέθηκε σε αυτό αιθανόλη σε αναλογία αιθανόλης:δείγματος 9:1. Στη συνέχεια προστέθηκε ηλεκτρολύτης BR σε τελική συγκέντρωση 10 mM και τα δείγματα μετρήθηκαν με την τεχνική ad-CSV. Οι μετρήσεις παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 20.





Διάγραμμα 20. Προσρόφηση 20 μM Imidacloprid σε σχέση με τη συγκέντρωση του KNO₃ σε καλλιέργεια ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

Η συγκέντρωση του Imidacloprid που καταμετράται στο διάλυμα είναι η συγκέντρωση η οποία δεν έχει προσροφηθεί από τα κύτταρα της καλλιέργειας. Από το διάγραμμα είναι εμφανές ότι η μη προσροφημένη ποσότητα του Imidacloprid από τα κύτταρα μειώνεται συνεχώς καθώς αυξάνει η συγκέντρωση του KNO₃. Τα δεδομένα αυτά αποτελούν ενδείξεις ότι το Imidacloprid κάτω από αυτές τις συνθήκες προσροφάται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και ενδεχομένως να εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα με οποιεσδήποτε μετέπειτα συνέπειες. Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1.2 παρουσία KNO₃ έχουμε εμφανή αύξηση του ποσοστού των μικροπυρήνων στα διπύρηνα κύτταρα υπό την επίδραση του Imidacloprid.

3. *IN VIVO* ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

Στην ενότητα αυτή εξετάστηκε η ενδεχόμενη γενotoξική δράση φυτοφαρμάκων σε *in vivo* συνθήκες. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό ήταν η τεχνική της ανίχνευσης μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα

μυελού των οστών αρσενικών αρουραίων και η τεχνική των μικροπυρήνων σε καλλιέργεια ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vivo*.

3.1 *IN VIVO* ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΑΓΡΟΤΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

Στην ενότητα αυτή μελετάται η επίδραση φυτοφαρμάκων σε καλλιέργεια ανθρώπινων λεμφοκυττάρων σε περιφερικό αίμα αγροτών οι οποίοι έρχονται σε επαφή με συγκεκριμένα φυτοφάρμακα μέσω της επαγγελματικής τους ενασχόλησης. Η ομάδα των αγροτών που ελέγχθηκε προέρχεται από την περιοχή της Μεσσαράς του νομού Ηρακλείου Κρήτης. Οι κύριες ενασχολήσεις των συγκεκριμένων αγροτών είναι η ελαιοκαλλιέργεια και η αμπελουργία. Κατά την ενασχόλησή τους αυτή οι αγρότες εκτίθενται για διάφορες περιόδους σε διαφορετικά είδη φυτοφαρμάκων. Έτσι δεν ήταν εφικτό να βρεθούν αγρότες που χρησιμοποιούσαν αποκλειστικά το Methidathion στις καλλιέργειές τους, ενώ ο αριθμός των αγροτών που χρησιμοποιούσε το Methidathion σε συνδυασμό με άλλα φυτοφάρμακα δεν ήταν επαρκής για να στοιχειοθετηθεί ένα στατιστικά - σημαντικό δείγμα. Για το λόγο αυτό, επιλέξαμε να μελετήσουμε την πιθανή γενοτοξική δράση σε ομάδα αγροτών που χρησιμοποιούν διαφορετικά μείγματα φυτοφαρμάκων σε ορισμένα από τα οποία υπάρχει και το Methidathion. Τα χαρακτηριστικά των ομάδων που εξετάστηκαν (αρνητικοί μάρτυρες και αγρότες) παρουσιάζονται στον Πίνακα 24.

Πίνακας 24. Χαρακτηριστικά των ομάδων που ελέγχθηκαν.			
	Αρνητικός Μάρτυρας	Αγρότες	
Αριθμός ατόμων	11	11	
Ηλικία	42.18 ± 4.21	46.45 ± 3.38	$F = 0.62$ $*p = 0.44$
Εύρος ηλικίας	23-67	25-60	
Έτη έκθεσης	-	26.45 ± 3.38	
Αριθμός μη καπνιστών	6	6	
Αριθμός καπνιστών	5	5	
Αριθμός τσιγάρων/μέρα	31.40 ± 6.48	24.00 ± 2.45	$F = 1.14$ $*p = 0.31$
# Μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα $*p > 0.05$			



Συγκρίνοντας τα χαρακτηριστικά των αρνητικών μαρτύρων και των αγρότων με το στατιστικό πακέτο One Way ANOVA παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Η πλειοψηφία των φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιείται από τους αγρότες που εξετάσαμε ανήκουν στις ομάδες των οργανοφωσφορικών και των πυρεθροειδών. Στον Πίνακα 25 εμφανίζονται τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται από κάθε αγρότη, ενώ ο Πίνακας 26 παρουσιάζει την ταξινόμηση των φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται σε εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα και ζιζανιοκτόνα. Συγχρόνως, στον Πίνακα 26 δίνονται πληροφορίες για την συχνότητα χρήσης των φυτοφαρμάκων αυτών, καθώς και η ταξινόμησή τους όσον αφορά την τοξικότητα και την καρκινογόνο δράση τους σύμφωνα με την EPA [169,170,171].

Πίνακας 25. Φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται (+) από κάθε αγρότη της ομάδας που εξετάστηκε.											
Φυτοφάρμακα	Αγρότες										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Abamectin					+						
Cypermethrin			+				+			+	+
Deltamethrin					+						
Dimethoate		+		+							
Fenthion		+		+							
Methamidophos					+						
Methidathion	+			+							
Parathion	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Benomyl					+						
Bordeaux mixture						+		+			
Copper sulphate									+		
Fenbuconazole					+						
Dinocap					+						
Metalaxyl								+	+		
Penconazole	+			+							
Glyphosate		+		+		+					
Paraquat	+		+	+			+			+	+

Πίνακας 26. Φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται από τους αγρότες με ένδειξη της συχνότητας χρήσης τους (%).

Τύπος	Προϊόν	Ομάδα	Χρήση	Συχνότητα Χρήσης (%)	Κατάταξη κατά US EPA		Md	Cd
					(T)	(C)		
Insecticides	Abamectin	Antibiotic	GUP	9.1	IV	E	-	-
	Cypermethrin	Pyrethroid	RUP	36.4	II-III	C	-	Inc
	Deltamethrin	Pyrethroid	NA	9.1	II	NA	-	-
	Dimethoate	Organophosphorus	GUP	18.2	II	C	-/+	Inc
	Fenthion	Organophosphorus	RUP	18.2	II	E	-/+	-/+
	Methamidophos	Organophosphorus	RUP	9.1	I	E	-/+	-
	Methidathion	Organophosphorus	RUP	18.2	I	C	-/+	-/+
	Parathion	Organophosphorus	RUP	100.0	NA	C	-/+	-
Fungicides	Benomyl	Benzimidazole	GUP	9.1	IV	C	-/+	-/+
	Bordeaux mixt.	Copper fungicides	GUP	18.2	I	NA	NA	NA
	Copper sulphate	Copper fungicide	GUP	9.1	I	NA	-/+	Inc
	Fenbuconazole	Conazole fungicide	NA	9.1	NA	C	-	-/+
	Dinocap	Dinitrophenol	GUP	9.1	III	E	-/+	-
	Metalaxyl	Benzeoid	GUP	18.2	III	E	-/+	Inc
	Penconazole	Triazole	NA	18.2	III	NA	-	-
Herbicides	Glyphosate	Organophosphorus	GUP	27.3	II	E	-	-
	Paraquat	Byridylic	RUP	54.5	I	E	+	Inc

Κατάταξη τοξικότητας κατά EPA (T): I: ισχυρά τοξικό, II: σχετικά τοξικό, III: ελαφρά τοξικό, IV: σχεδόν μη τοξικό.

Κατάταξη καρκινογένεσης κατά EPA (C): C: πιθανώς καρκινογόνο, E: πιθανώς μη καρκινογόνο.

RUP: φυτοφάρμακο περιορισμένης χρήσης, GUP: φυτοφάρμακο γενικής χρήσης. Md: μεταλλαξιγένεση, Cd: καρκινογένεση. NA: Μη διαθέσιμο, Inc: ατελέσφορο

-: αρνητική επίδραση, +: θετική επίδραση.

Δείγματα αίματος ελήφθησαν από υγιή ενήλικα άτομα, καλλιεργήθηκαν τα λεμφοκύτταρα και αναλύθηκαν. Στον Πίνακα 27 απεικονίζονται οι τιμές των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα και των μικροπυρήνων ανά 1000 διπύρηννα κύτταρα, καθώς οι τιμές του δείκτη διπλασιασμού των κυττάρων (CBPI) για κάθε έναν από τους αρνητικούς μάρτυρες.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση της καλλιέργειας λεμφοκυττάρων από υγιείς αγρότες παρουσιάζονται στον Πίνακα 28. Αναλυτικότερα, στον πίνακα εμφανίζονται οι τιμές των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα και των μικροπυρήνων ανά 1000 διπύρηννα κύτταρα καθώς και ο δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων



Πίνακας 27. Συχνότητες διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN) και μικροπυρήνων (MN) μετά από χρώση με Giemsa σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων αρνητικών μαρτύρων. **A** καπνιστές, **B** μη καπνιστές.

	Δότες	BNMN	MN	CBPI
A	1	7	7	1.73
	2	3	3	1.66
	3	3	3	1.60
	4	6	6	1.72
	5	12	12	1.50
Σύνολο A		31	31	-
Μέσες τιμές συχνοτήτων (%) ± τυπικό σφάλμα		6.20 ± 1.66	6.20 ± 1.66	1.64 ± 0.04
B	6	3	3	1.62
	7	7	7	1.58
	8	4	4	1.72
	9	10	10	1.65
	10	7	7	1.65
	11	6	6	1.58
Σύνολο B		37	37	-
Μέσες τιμές συχνοτήτων (%) ± τυπικό σφάλμα		6.20 ± 1.01	6.20 ± 1.01	1.63 ± 0.02
Σύνολο A+B		68*	68*	-
Μέσες τιμές συχνοτήτων (%) ± τυπικό σφάλμα		6.20 ± 0.88	6.20 ± 0.88	1.64 ± 0.02
BNMN: διπύρηνια κύτταρα με μικροπυρήνα, MN: μικροπυρήνες, CBPI: Δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων. *: Σύνολο καταμετρημένων κυττάρων 11000.				

Πίνακας 28. Συχνότητες διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα (BNMN) και μικροπυρήνων (MN) μετά από χρώση με Giemsa σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων αγροτών. **A** καπνιστές, **B** μη καπνιστές.

	Δότες	BNMN	MN	CBPI
A	1	7	7	2.17
	2	8	9	2.03
	3	13	14	2.32
	4	5	8	2.26
	5	4	5	2.16
Σύνολο A		37	43	-
Μέσες τιμές συχνοτήτων (%) ± τυπικό σφάλμα		7.40 ± 1.56	8.60 ± 1.50	2.19 ± 0.05
B	6	7	7	2.13
	7	12	12	2.28
	8	10	11	2.19
	9	8	8	2.19



	10	7	8	2.01
	11	7	7	2.01
Σύνολο Β		51	53	-
Μέσες τιμές συχνοτήτων (%) ± τυπικό σφάλμα		8.50 ± 0.85	8.83 ± 0.87	2.14 ± 0.04
Σύνολο Α+Β		88*	96*	-
Μέσες τιμές συχνοτήτων (%) ± τυπικό σφάλμα		8.00 ± 0.82	8.73 ± 0.79	2.16 ± 0.03
BNMN: διπύρρηνα κύτταρα με μικροπυρήνα, MN: μικροπυρήνες, CBPI: Δείκτης διπλασιασμού των κυττάρων. *: Σύνολο καταμετρημένων κυττάρων 11000.				

Η συνολική στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για τις ομάδες που εξετάσαρε παρουσιάζεται στον Πίνακα 29. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μεταξύ αρνητικών μαρτύρων και αγροτών. Η σύγκριση έγινε τόσο στο σύνολο των δειγμάτων όσο και σε δύο επιμέρους υποομάδες καπνιστών και μη καπνιστών. Μεταξύ των καπνιστών δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα των BNMN και των MN. Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα και για τους μη καπνιστές. Στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρξε στην επαγωγή μικροπυρήνων μεταξύ αρνητικών μαρτύρων και αγροτών όταν μελετήθηκαν σαν σύνολο. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα διπύρρηνα κύτταρα με μικροπυρήνα.

Πίνακας 29. Σύγκριση των μέσων τιμών των συχνοτήτων των διπύρρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα και των μικροπυρήνων (%) ± το τυπικό σφάλμα μετά από χρώση με Giemsa σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων αρνητικών μαρτύρων και αγροτών.

	BNMN	MN
Αρνητικοί μάρτυρες/καπνιστές	6.20 ± 1.66	6.20 ± 1.66
Αγρότες/καπνιστές	7.40 ± 1.56	8.60 ± 1.50
	F=0.28, p=0.61	F=1.15, p=0.31
Αρνητικοί μάρτυρες/μη καπνιστές	6.20 ± 1.01	6.20 ± 1.01
Αγρότες/μη καπνιστές	8.50 ± 0.85	8.83 ± 0.87
	F=3.12, p=0.11	F=3.98, p=0.07
Σύνολο αρνητικών μαρτύρων	6.20 ± 0.88	6.20 ± 0.88
Σύνολο αγροτών	8.00 ± 0.82	8.73 ± 0.79
	F=2.28, p=0.15	F=4.63, p=0.04*
*p<0.05		



3.2 *IN VIVO* ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ IMIDACLOPRID

Στους Πίνακες 30 έως 35 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο ανίχνευσης μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρσενικών αρουραίων μετά από *in vivo* επίδραση με Imidacloprid. Στις εξεταζόμενες ομάδες χορηγήθηκαν τα διάφορα διαλύματα με οισοφαγική σύριγγα. Οι αρνητικοί μάρτυρες δέχτηκαν φυσιολογικό ορό, ενώ οι ομάδες ελέγχου τέθηκαν υπό την επίδραση 100 mg/kg Imidacloprid σε συνδυασμό 50 mg/kg KNO₃, 200 mg/kg Imidacloprid σε συνδυασμό 100 mg/kg KNO₃, 100 mg/kg Imidacloprid σε συνδυασμό 100 mg/kg KNO₃, 200 mg/kg Imidacloprid σε συνδυασμό 200 mg/kg KNO₃ και 300 mg/kg Imidacloprid σε συνδυασμό 300 mg/kg KNO₃. Αναλυτικότερα, στην πρώτη και δεύτερη στήλη των πινάκων παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις του Imidacloprid (mg/kg) και KNO₃ (mg/kg) αντίστοιχα, στην τρίτη στήλη το βάρος του πειραματόζωου, στη τέταρτη στήλη το ποσοστό των PCEs (%) σε σύνολο 200 NCEs και PCEs και στην πέμπτη στήλη η συχνότητα (‰) των μικροπυρήνων σε σύνολο 1000 PCEs.

Πίνακας 30. Αποτελέσματα PCEs και MNPCEs σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων *in vivo* (ομάδα αρνητικών μαρτύρων).

Imidacloprid (mg/kg)	KNO ₃ (mg/kg)	Βάρος Ζώου (g)	PCEs (%)	MNPCEs (‰)
0	0	59	73	2
0	0	61	72.5	1.5
0	0	67	60	4
0	0	232	37	1
0	0	238	33.5	4

Πίνακας 31. Αποτελέσματα PCEs και MNPCEs σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων *in vivo* (επίδραση 100 mg/kg Imidacloprid σε συνδυασμό 50 mg/kg KNO₃).

Imidacloprid (mg/kg)	KNO ₃ (mg/kg)	Βάρος Ζώου (g)	Αναλογία PCEs (%)	Συχνότητα MNPCEs (‰)
100	50	200	56	4
100	50	203	53	4
100	50	200	53	3
100	50	200	51	5
100	50	198	53	7

Πίνακας 32. Αποτελέσματα PCEs και MNPCEs σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων *in vivo* (επίδραση 200 mg/kg Imidacloprid σε συνδυασμό 100 mg/kg KNO₃).

Imidacloprid (mg/kg)	KNO ₃ (mg/kg)	Βάρος Ζώου (g)	Αναλογία PCEs (%)	Συχνότητα MNPCEs (‰)
200	100	200	63	4
200	100	200	54	4
200	100	200	54	5
200	100	200	56	5
200	100	200	53	5

Πίνακας 33. Αποτελέσματα PCEs και MNPCEs σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων *in vivo* (επίδραση 100 mg/kg Imidacloprid σε συνδυασμό 100 mg/kg KNO₃).

Imidacloprid (mg/kg)	KNO ₃ (mg/kg)	Βάρος Ζώου (g)	Αναλογία PCEs (%)	Συχνότητα MNPCEs (‰)
100	100	86	51	2
100	100	87	49	2
100	100	83	43	2
100	100	80	45	2
100	100	87	43	1

Πίνακας 34. Αποτελέσματα PCEs και MNPCEs σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων *in vivo* (επίδραση 200 mg/kg Imidacloprid σε συνδυασμό 200 mg/kg KNO₃).

Imidacloprid (mg/kg)	KNO ₃ (mg/kg)	Βάρος Ζώου (g)	Αναλογία PCEs (%)	Συχνότητα MNPCEs (‰)
200	200	73.5	41	3
200	200	75	56	3
200	200	79.5	52	2
200	200	76	61	1
200	200	73	57	2



Πίνακας 35. Αποτελέσματα PCEs και MNPCEs σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων *in vivo* (επίδραση 300 mg/kg Imidacloprid σε συνδυασμό 300 mg/kg KNO₃)

Imidacloprid (mg/kg)	KNO ₃ (mg/kg)	Βάρος Ζώου (g)	Αναλογία PCEs (%)	Συχνότητα MNPCEs (‰)
300	300	70	55	2
300	300	71	51	2
300	300	73	53	4
300	300	71	40	0
300	300	72.5	52	2

Στον Πίνακα 36 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα μετά την *in vivo* επίδραση του Imidacloprid και του KNO₃ σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρσενικών αρουραίων. Όπως φαίνεται στον πίνακα υπάρχει επαγωγή μικροκυρήνων μόνο στη συγκέντρωση των 200 µg/ml σε αναλογία Imidacloprid:KNO₃ 2:1, αλλά δεν εμφανίζεται σε καμία άλλη συγκέντρωση.

Πίνακας 36. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων μετά τη επίδραση του Imidacloprid και του KNO ₃ σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρσενικών αρουραίων <i>in vivo</i> .						
Ουσία	Συγκέντρωση (mg/kg)	Αριθμός ζώων που εξετάστηκε	Συνολικά PCEs που εξετάστηκαν	(%) PCE's MF ± se	MNPCE's MF(‰) ± se	Πιθανότητα (one-way ANOVA test)
-	0	5	10000	55.2 ± 8.49	2.5 ± 0.63	-
Imid+KNO ₃	100 + 50	5	10000	53.2 ± 0.80	4.6 ± 0.68	P=0.053 F=5.127
Imid+KNO ₃	200 + 100	5	10000	56 ± 1.82	4.6 ± 0.24*	P=0.014 F=9.586
Imid+KNO ₃	100 + 100	5	10000	46.2 ± 1.62	1.8 ± 0.20	P=0.322 F=1.114
Imid+KNO ₃	200 + 200	5	10000	53.4 ± 3.42	2.2 ± 0.37	P=0.693 F=0.166
Imid+KNO ₃	300 + 300	5	10000	50.2 ± 2.63	2.0 ± 0.63	P=0.591 F=0.313
*P<0.05						

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη της κυτταρογενετικής δράσης διαφόρων φυτοφαρμάκων, είτε *in vitro* είτε *in vivo*, αποτελεί ένα από τα στάδια της διαδικασίας αξιολόγησης του κινδύνου που μπορεί να προκαλέσει η χρήση τους στον άνθρωπο. Μεταξύ άλλων τεχνικών για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως οι τεχνικές της επαγωγής μικροπυρήνων σε καλλιέργεια ανθρώπινων λεμφοκυττάρων και της επαγωγής μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα του μυελού των οστών τρωκτικών. Η μελέτη της φυσικοχημικής συμπεριφοράς των φυτοφαρμάκων, καθώς και η ανίχνευσή τους σε ιστούς του ανθρώπου ή άλλα βιοδραστικά διαλύματα, με τεχνικές όπως η καθοδική βολταμετρία με προσυγκέντρωση, μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για την κατανόηση της δράσης των ουσιών αυτών τόσο στον ανθρώπινο οργανισμό, όσο και σε άλλους ζωικούς οργανισμούς.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν δύο πολύ διαδεδομένα εντομοκτόνα, το Methidathion και το Imidacloprid, τα οποία χρησιμοποιούνται σε μεγάλο φάσμα καλλιεργειών. Το Methidathion είναι ένα μη συστηματικό οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο που χρησιμοποιείται από το 1966 για τον έλεγχο μυζητικών και μασητικών εντόμων καθώς και αραχνών σε πολλές καλλιέργειες. Κατατάσσεται από την EPA στην κατηγορία τοξικότητας I (υψηλή τοξικότητα) και χαρακτηρίζεται ως φυτοφάρμακο περιορισμένης χρήσης (Restricted Use Pesticide, RUP). Το Imidacloprid αποτελεί τον πρώτο εκπρόσωπο μιας νέας ομάδας φυτοφαρμάκων, που εμφανίστηκαν για πρώτη φορά πριν από 10 περίπου χρόνια και είναι γνωστά ως νικοτινοειδή. Το Imidacloprid εμφανίζει υψηλή τοξικότητα στα έντομα σε αντίθεση με τα θηλαστικά [39,40]. Η εκλεκτικότητα αυτή που εμφανίζει, αποδίδεται στην μικρότερη τάση του να προσδένεται στους υποδοχείς της ακετυλοχολίνης των θηλαστικών, σε σχέση με τους αντίστοιχους των εντόμων [41]. Αυτό οφείλεται στους διαφορετικούς τύπους υποδοχέων στις θέσεις πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης [42,43,44,45]. Τα δύο αυτά φυτοφάρμακα δρουν σαν



αναστολείς των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης [38], η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά των νευρικών μηνυμάτων.

Η κυτταρογενετική δράση του Methidathion μελετήθηκε σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων, περιφερικού αίματος από υγιείς δότες, *in vitro* χρησιμοποιώντας την τεχνική των μικροπυρήνων. Η επιλογή των συγκεκριμένων κυττάρων (λεμφοκύτταρα) έγινε καθώς αποτελούν τον πιο συχνά χρησιμοποιούμενο τύπο κυττάρων για τη μέθοδο που εφαρμόστηκε [172]. Επειδή είναι γνωστό ότι τα λεμφοκύτταρα αποτελούνται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν διαφοροποίηση μεταξύ των ατόμων αλλά και στο ίδιο το άτομο, οι αιμοληψίες για την *in vitro* μελέτη πραγματοποιούνταν από δότες παρόμοιας ηλικίας ούτως ώστε να εξαχθούν αντικειμενικότερα συμπεράσματα.

Προσδιορίστηκαν οι συχνότητες των μικροπυρήνων σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος υγιών ανθρώπων, υπό την επίδραση του Methidathion (σε συγκεντρώσεις 1.0, 2.0, 3.0 $\mu\text{g/ml}$). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν κατέδειξαν αυξημένες συχνότητες μικροπυρήνων σε καμία από τις τρεις συγκεντρώσεις. Τα ευρήματά μας αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για το Methidathion [148,149].

Στή συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της βολταμετρίας με προσυγκέντρωση για να μελετηθούν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του Methidathion. Σκοπός ήταν να κατανοηθεί καλύτερα ο τρόπος δράσης του, ενώ η ίδια τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του συγκεκριμένου φυτοφαρμάκου στο θρεπτικό υλικό καλλιεργειών περιφερικού αίματος ανθρώπου οι οποίες είχαν υποστεί την επίδραση του Methidathion για 72 ώρες. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται ευρέως για την διερεύνηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών διαφόρων ενώσεων και φυτοφαρμάκων [4,124,125,126,128,129,131,133,135,136,157,160]. Επίσης έχουν αναφερθεί έρευνες για την ανίχνευση διαφόρων ουσιών σε περιφερικό αίμα ανθρώπου με τη χρήση της βολταμετρίας [133,135]. Η δομή του μορίου του Methidathion επηρεάζεται από την οξύτητα του διαλύματος και σε αλκαλικό pH το μόριο



υδρολύεται προς δύο νέα μόρια σύμφωνα με την αντίδραση 10 [20]. Η ενδεχόμενη γενοτοξικότητα των προϊόντων της υδρόλυσης δεν είχε μελετηθεί μέχρι σήμερα. Το κενό αυτό έρχεται να καλύψει η παρούσα μελέτη κατά την οποία

πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ανθρώπου, αλλάζοντας κάθε φορά το pH του αρχικού διαλύματος του Methidathion. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι το pH της καλλιέργειας παρέμενε σταθερό (pH=7.4) καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας και μεταβολή του pH είχαμε μόνο στο αρχικό διάλυμα (stock) το οποίο όμως ρυθμιζονταν ξανά σε φυσιολογικές τιμές πριν την προσθήκη του στην καλλιέργεια. Η συχνότητα των μικροπυρήνων εμφανίστηκε να επηρεάζεται άμεσα από τις τιμές του pH. Αναλυτικότερα, για τιμές pH>11 παρουσιάζεται έντονη επαγωγή μικροπυρήνων. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει καμία έρευνα που να αναφέρει παρόμοια διαδικασία και γενικότερα κατά την χρήση τεχνικών για τον έλεγχο της γενοτοξικής δράσης μίας ουσίας οι τιμές του pH ελέγχονται μόνο κατά την διάρκεια της καλλιέργειας των εκάστοτε κυττάρων.

Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν με την τεχνική της καθοδικής βολταμετρίας με προσυγκέντρωση σε καλλιέργεια ολικού αίματος ανθρώπου, έδωσαν μηδενικές τιμές για τη συγκέντρωση του Methidathion σε όλες τις τιμές του pH. Δεδομένου ότι μετά το πέρας της καλλιέργειας, στο διάλυμα θα βρίσκεται μόνο εκείνο το ποσοστό που δεν θα είχε προσροφηθεί από τα κύτταρα, μπορεί να υπολογιστεί το ποσοστό που εισέρχεται σε αυτά. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο διάλυμα ενδεχομένως να υπάρχει και το ποσοστό εκείνο του Methidathion το οποίο έχει προσκολληθεί με ασθενείς δεσμούς πάνω στην κυτταρική μεμβράνη αλλά δεν έχει εισέλθει σε αυτή. Από τις τιμές, οι οποίες είναι μηδενικές και για το λόγο αυτό δεν παρουσιάστηκαν στα αποτελέσματα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το ποσοστό προσρόφησης στα κύτταρα ξεπερνά το 95% ανεξαρτήτως της τιμής του pH. Το γεγονός αυτό, υποδεικνύει ότι η αλλαγή του μορίου του Methidathion υπό την επίδραση του pH δεν δημιουργεί απλώς κάποια μόρια τα οποία να μπορούν να διαπεράσουν ευκολότερα την



κυτταρική μεμβράνη, αλλά δημιουργούνται μόρια τα οποία είναι αρκετά πιο γενοτοξικά από την μητρική ουσία, δηλαδή του Methidathion έναντι των παραγώγων του. Καλό είναι να επισημανθεί ότι κατά την εφαρμογή των φυτοφαρμάκων κανείς δεν μπορεί να μας εγγυηθεί ότι στο φυσικό περιβάλλον υπάρχουν πάντα ιδανικές συνθήκες, οπότε ένα φυτοφάρμακο δρα αποκλειστικά στον οργανισμό στόχο, αλλά αντ' αυτού πάντα υπάρχει κάποιος περιβαλλοντικός παράγοντας που είναι δυνατόν να προκαλέσει τις όποιες αλλοιώσεις. Δεδομένου αυτού του γεγονότος η μελέτη τυχαίων ή μη περιβαλλοντικών παραγόντων σε συνδυασμό με τη γενοτοξικότητα των φυτοφαρμάκων είναι επιβεβλημένη. Τα αποτελέσματα της μελέτης της δράσης του pH επί της γενοτοξικότητας του Methidathion επιβεβαιώνει την αλλοίωση της ενδεχόμενης δράσης των φυτοφαρμάκων από περιβαλλοντικούς παράγοντες, π.χ. αλλαγή οξύτητας.

Για την *in vivo* μελέτη, της ενδεχόμενης γενοτοξικής δράσης φυτοφαρμάκων, μελετήθηκε ομάδα αγροτικού πληθυσμού που έρχεται σε επαφή με φυτοφάρμακα μέσω επαγγελματικής δραστηριότητας, από την περιοχή της Μεσσαράς του Ν. Ηρακλείου Κρήτης (11 άτομα). Οι αγρότες χρησιμοποιούσαν μίγματα φυτοφαρμάκων στις διάφορες καλλιέργειές τους. Τα αποτελέσματα από αυτά τα άτομα συγκρίθηκαν με ομάδα μαρτύρων (άτομα που όπως είχαν δηλώσει δεν είχαν έλθει σε επαφή με φυτοφάρμακα) από την ίδια περιοχή.

Είναι κοινά αποδεκτό ότι τα φυτοφάρμακα αποτελούν την κυριότερη αιτία δηλητηριάσεων στις αναπτυσσόμενες χώρες καθόσον έχουν αναφερθεί τρία εκατομμύρια περιπτώσεις δηλητηρίασης από φυτοφάρμακα. Κάθε χρόνο αναφέρονται περισσότερες από διακόσιες χιλιάδες θανατηφόρες περιπτώσεις από κακή χρήση φυτοφαρμάκων [173]. Χαρακτηριστικά θα πρέπει να σημειωθεί ότι και στην Κρήτη έχουν αναφερθεί περιπτώσεις δηλητηριάσεων από φυτοφάρμακα [174,175,176].

Παρόλο ότι έχουμε επαρκείς πληροφορίες για την οξεία τοξικότητα των περισσότερων από αυτά τα χημικά, η γνώση μας είναι περιορισμένη για τις μακροχρόνιες επιπτώσεις τους στην υγεία του ανθρώπου. Ο Διεθνής



Οργανισμός για την Έρευνα του Καρκίνου (International Agency for Cancer Research, IARC) έχει επισημάνει ότι πολλά φυτοφάρμακα και παρεμφερείς ενώσεις ενδεχομένως να είναι υπεύθυνα για καρκινογενέσεις. Μετά από έρευνα σε πειραματόζωα, 45 φυτοφάρμακα έχουν ταξινομηθεί σαν καρκινογόνα. Επίσης, αρκετά χημικά όπως τα φαίνοξυ ζιζανιοκτόνα και αρκετά οργανοφωσφορικά έχουν συσχετιστεί με καρκινογένεση στον άνθρωπο [177]. Σύμφωνα με στοιχεία από πρόσφατες έρευνες, μεταξύ ομάδων γυναικών από την Κρήτη που είχαν εκτεθεί σε συγκεκριμένα φυτοφάρμακα, αποδείχθηκε ότι οι συγκεκριμένες έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να εμφανίσουν ινομώματα, υπερπλασίες, σκληρωτική αδένωση, ινομυοπλασματικές ασθένειες, παθήσεις της κύστεως και μαστίτιδες σε σχέση με γυναίκες από την ίδια περιοχή που δεν είχαν έρθει σε επαφή με φυτοφάρμακα. Εν τούτοις δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο ποσοστό εμφάνισης λιπομάτων και κακοήθων όγκων. Παρόλα αυτά συγκρινόμενες οι ομάδες αυτές με το γυναικείο πληθυσμό της Κρήτης ενδεχομένως να έχουν περισσότερες πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού [178]. Σε άλλη έρευνα όμως, σε γυναικείο πληθυσμό της Κρήτης, δεν εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο ενδεχόμενο εμφάνισης καρκίνου του μαστού μεταξύ ομάδων που έρχονται σε επαφή με φυτοφάρμακα μέσω της εργασίας τους και αρνητικών μαρτύρων [179].

Η έκθεση σε μείγματα φυτοφαρμάκων αποτελεί το γενικό κανόνα για τους αγροτικούς πληθυσμούς. Οι αγρότες συνήθως, χρησιμοποιούν μεγάλες ποσότητες διαφορετικών φυτοφαρμάκων μεταξύ των οποίων υπάρχουν και αρκετά ήδη αποδεδειγμένα γενοτοξικά. Οι κυτταρογενετικές έρευνες σε αγρότες καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος πληθυσμού που καλλιεργεί διαφορετικά προϊόντα και σε διαφορετικά περιβάλλοντα [180]. Στην περίπτωση που μελετήσαμε εμείς, *in vivo* μελέτη σε αγροτικό πληθυσμό του νομού Ηρακλείου, δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο στη συχνότητα των μικροπυρήνων και των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα όσο και στο δείκτη διπλασιασμού των κυττάρων μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών για την ομάδα των αρνητικών μαρτύρων. Τα συγκεκριμένα ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με πρόσφατη δημοσιευμένη έρευνα που εξέταζε τις επιπτώσεις του καπνίσματος στην



εμφάνιση μικροπυρήνων σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα [181]. Συγχρόνως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο στη συχνότητα των μικροπυρήνων και των διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνα όσο και στο δείκτη διπλασιασμού των κυττάρων μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών για την ομάδα των αγροτών. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με παλαιότερες έρευνες [182,183,184]. Η παρατηρούμενη μείωση του δείκτη διπλασιασμού των κυττάρων μεταξύ των αρνητικών μαρτύρων και των αγροτών μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική ανταπόκριση των λεμφοκυττάρων των δύο ομάδων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Από τη στατιστική ανάλυση μεταξύ των αρνητικών μαρτύρων και των αγροτών καθώς, και μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών παρατηρήσαμε ότι: μεταξύ των καπνιστών δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα των BNMN και των MN. Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα και για τους μη καπνιστές. Στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρξε στην επαγωγή μικροπυρήνων μεταξύ αρνητικών μαρτύρων και αγροτών, χρηστών φυτοφαρμάκων, όταν μελετήθηκαν σαν σύνολο. Όμως, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα διπύρηνα κύτταρα με μικροπυρήνα. Παρόλα αυτά, έρευνες σε αγροτικούς πληθυσμούς της Ιταλίας, της Σερβίας και της Ελλάδας για την εμφάνιση μικροπυρήνων έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αρνητικών μαρτύρων και των αγροτών, τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με την παρούσα έρευνα [182,185,186].

Για την κυτταρογενετική μελέτη του Imidacloprid χρησιμοποιήθηκε η τεχνική των μικροπυρήνων σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ανθρώπου *in vitro*, καθώς και *in vivo* στο μυελό των οστών αρουραίων με την τεχνική των μικροπυρήνων σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα του μυελού των οστών. Για τις καλλιέργειες των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε περιφερικό αίμα από υγιείς δότες, ενώ για τη δεύτερη τεχνική χρησιμοποιήθηκαν αρουραίοι Wistar που προμηθευτήκαμε από το εργαστήριο εκτροφής θηλαστικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.



Το Imidacloprid, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί ένα νέο εντομοκτόνο και ανήκει στη χημική ομάδα των νεονικοτινοειδών. Θεωρείται ελαφρά τοξικό και έχει LD₅₀ 450 μg/kg σε αρσενικούς αρουραίους ενώ η αντίστοιχη τιμή για τα ποντίκια είναι 150 μg/kg [187]. Η αποδόμηση του Imidacloprid έχει μελετηθεί τόσο στο έδαφος, όσο και στα φυτά και τα θηλαστικά [188,189,190,191,192]. Το Imidacloprid στον άνθρωπο μεταβολίζεται από το κυτόχρωμα P450 προς ολεφίνη και προς γουανιδίνη [188]. Συγχρόνως έχει βρεθεί ότι το 70–80% αποβάλλεται μέσω των ούρων, ενώ το 20–30% μέσω των κοπράνων [193]. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι έχει υπολογιστεί πως οι συγκεντρώσεις του Imidacloprid κατά τους ψεκασμούς κυμαίνονται μεταξύ 100–350 mg/L [194]. Ως ανταγωνιστής του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, το Imidacloprid παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα σε θερμόαιμα θηλαστικά [195]. Μετά από εκτεταμένες έρευνες, δεν διαπιστώθηκε γενοτοξική δράση του συγκεκριμένου φυτοφαρμάκου τόσο *in vivo* και *in vitro* σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ανθρώπου, όσο και σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα του μυελού των οστών αρουραίων *in vivo* [196]. Παρόλα αυτά έχουν αναφερθεί περιπτώσεις γενοτοξικής βλάβης του Imidacloprid. Οι Feng *et al.* χρησιμοποιώντας τρεις τεχνικές ελέγχου (Comet, MN, SCE), παρατήρησαν γενοτοξική βλάβη σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος υπό την επίδραση του Imidacloprid [197]. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από τους Shah *et al.* με τη χρήση ³²P-postlabeling για τον εντοπισμό αλλοιώσεων στο DNA (DNA adducts) προέκυψε ότι μετά τον ενζυμικό μεταβολισμό του Imidacloprid από το S9 ηπατικό ένζυμο των αρουραίων εμφανίζονται αλλοιώσεις του DNA [151]. Επίσης, οι Karabay *et al.* παρατήρησαν αυξημένη επαγωγή στις χρωμοσωμικές ανωμαλίες και στις συχνότητες των μικροπυρήνων που επάγονται στο μυελό των οστών αρουραίων υπό την επίδραση του Imidacloprid, τόσο όταν εφαρμόζεται μεμονομένα όσο και σε συνδυασμό με το οργανοφωσφορικό φυτοφάρμακο Methamidophos [198]

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την καλλιέργεια λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος ανθρώπου *in vitro* υπό την επίδραση του Imidacloprid δεν εμφάνισαν επαγωγή μικροπυρήνων σε καμία από τις τρεις συγκεντρώσεις που



ελέχθησαν. Παρατηρώντας τη δομή του μορίου προέκυψε ότι πιθανότατα το αρνητικό φορτίο που έχει το Imidacloprid να εμποδίζει την είσοδό του στο εσωτερικό του κυττάρου, αποτρέποντας έτσι τη δημιουργία βλαβών στο γενετικό υλικό. Με βάση αυτό το δεδομένο μελετήσαμε την ενδεχόμενη εξουδετέρωση του φορτίου του Imidacloprid και τη συνακόλουθη δραστικότητα τού. Έτσι, σχεδιάστηκαν πειράματα για να εξετασθεί η ενδεχόμενη εξουδετέρωση του φορτίου του Imidacloprid από κάποιο περιβαλλοντικό παράγοντα. Οι παρατηρήσεις μας έδειξαν ότι ο παράγοντας αυτός θα μπορούσε να είναι το KNO_3 .

Το KNO_3 είναι ένα άλας το οποίο απαντάται σε αφθονία στη φύση και κυρίως στα φυλλώδη λαχανικά [199]. Έχει βρεθεί ότι έχει ευεργετική δράση στις καρδιαγγειακές παθήσεις [200]. Συνεπώς είναι εμφανές ότι το KNO_3 είναι μία ακίνδυνη ένωση. Παρόλα αυτά ενδεχομένως να παίζει σημαντικό ρόλο στον τρόπο με τον οποίο να επιδρούν διάφοροι περιβαλλοντικά δυσμενείς παράγοντες στον ανθρώπινο οργανισμό.

Η προσθήκη του KNO_3 σε διάφορες συγκεντρώσεις σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων δεν έδωσε επαγωγή μικροπυρήνων. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την έλλειψη γενοτοξικής δράσης του KNO_3 . Δε συμβαίνει όμως το ίδιο και για τη συνεργιστική του δράση με το Imidacloprid. Όμως, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου, παρουσιάζεται μία συνεχής αύξηση στις συχνότητες των μικροπυρήνων στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος ανθρώπου σε σχέση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις KNO_3 . Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα αρνητικά αποτελέσματα στην επαγωγή των μικροπυρήνων όταν οι δύο αυτές ενώσεις χορηγούνται μεμονωμένες μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι μικροπυρήνες ενδεχομένως να μην επάγονται από τη δράση του KNO_3 , αλλά από τη συνεργιστική δράση του Imidacloprid με το KNO_3 . Η δράση αυτή πιθανότατα να οφείλεται στην εξουδετέρωση του αρνητικού φορτίου του Imidacloprid. Όταν το Imidacloprid χορηγείται μεμονωμένα το αρνητικό του φορτίο δεν του επιτρέπει να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου εξαιτίας του θετικού φορτίου που βρίσκεται στην



κυτταρική μεμβράνη (θετικότερο του Imidacloprid). Η παρουσία του KNO_3 στην καλλιέργεια κατά πάσα πιθανότητα εξουδετερώνει το φορτίο του Imidacloprid καθιστώντας το πλέον ικανό να διαπεράσει την κυτταροπλασματική μεμβράνη, με αποτέλεσμα να προκαλεί βλάβες στο γενετικό υλικό .

Το παραπάνω συμπέρασμα επιβεβαιώθηκε και από τις πειραματικές μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε ολικό αίμα μετά από καλλιέργεια υπό την επίδραση Imidacloprid παρουσία και απουσία KNO_3 με την τεχνική της καθοδικής βολταμετρίας με προσυγκέντρωση. Χαρακτηριστικά στο διάγραμμα 20 εμφανίζεται μειούμενη η ανιχνεύσιμη ποσότητα Imidacloprid στα διάλυμα καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του KNO_3 . Από την παρατήρηση αυτή προκύπτει ότι το KNO_3 «βοηθάει» το Imidacloprid να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου και στη συνέχεια το Imidacloprid προκαλεί βλάβες στο γενετικό υλικό . Αξίζει να σημειωθεί ότι, η συγκέντρωση του KNO_3 που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα είναι μικρότερη από τη συγκέντρωση που έχει βρεθεί στον ανθρώπινο οργανισμό [200,201].

Δεδομένης της αυξημένης τοξικότητας του Imidacloprid στα έντομα, σε αντιδιαστολή με αυτήν που ήδη έχει μελετηθεί στον άνθρωπο υπάρχει ενδεχόμενο η θερμοκρασία να παίζει κάποιο ρόλο στο μηχανισμό με τον οποίο δρα στις δύο αυτές ομάδες οργανισμών. Ένας σημαντικός παράγοντας που ενδεχομένως να παίζει ρόλο στις δύο αυτές ομάδες είναι και η θερμοκρασία κάτω από την οποία δραστηριοποιούνται. Είναι γνωστό ότι τα έντομα είναι ψυχρόαιμοι οργανισμοί σε αντίθεση με τα θηλαστικά που είναι θερμόαιμοι. Με το δεδομένο αυτό ένας άλλος περιβαλλοντικός παράγοντας που μελετήσαμε είναι και η θερμοκρασία ως προς τη δραστηριότητα του Imidacloprid. Στο σημείο όμως αυτό εμφανίζεται το εξής πρόβλημα: δεν είναι δυνατόν να προχωρήσουμε σε οποιαδήποτε καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών αλλάζοντας τα όρια της θερμοκρασίας τους κατά το δοκούν. Για το λόγο αυτό θα έπρεπε να βρούμε ένα σύστημα που να προσομοιάζει όσο γίνεται καλύτερα τις κυτταρικές μεμβράνες.

Είναι γνωστό ότι τα δυναμικά που ασκούνται στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια του υδραργύρου είναι παρόμοια με τα δυναμικά που υπάρχουν στις κυτταρικές



μεμβράνες [202]. Επίσης, η υδροφοβικότητα του υδραργύρου η οποία είναι παρόμοια με αυτή της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και το εφαρμοζόμενο δυναμικό συσσώρευσης στο HMDE το οποίο είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με το δυναμικό ηρεμίας της κυτταρική επιφάνειας το οποίο κυμαίνεται από 90 mV έως -70 mV, μας έδωσε τη δυνατότητα να προσομοιάσουμε τη σταγόνα του υδραργύρου με την επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης [202]. Έτσι, είχαμε τη δυνατότητα να ελέγξουμε την προσρόφηση του Imidacloprid πάνω στη σταγόνα του υδραργύρου σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 17 υπάρχουν δύο μηχανισμοί προσρόφησης. Σε χαμηλές θερμοκρασίες ($T < 10\text{ }^{\circ}\text{C}$) ευνοείται η προσρόφηση του Imidacloprid πάνω στην σταγόνα του Hg και κατ' επέκταση στην κυτταρική μεμβράνη σε σχέση με τις υψηλότερες καθιστώντας τους ποικιλόθερμους οργανισμούς (έντομα) πιο «ευάλωτους» συγκρινόμενους με τους ομοιόθερμους (θηλαστικά).

Η ύπαρξη των δύο παραπάνω αναφερόμενων μηχανισμών προσρόφησης του Imidacloprid από την ηλεκτροδιακή επιφάνεια βρίσκεται σε συμφωνία με την γενοτοξική του δράση. Ένδειξη αυτής της βιολογικής διαφοροποίησης του Imidacloprid συναρτήσει της θερμοκρασίας αποτελεί η αύξηση της εντροπίας του συστήματος με την αύξηση της θερμοκρασίας. Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα βιολογικά αποτελέσματα που επιφέρει η δράση του Imidacloprid σε κυτταρικό επίπεδο.

Επιπλέον, για να διαπιστώσουμε κατά πόσο οι παρατηρήσεις μας από την Ad-CSV και τις *in vitro* καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων ανταποκρίνονται σε πραγματικές *in vivo* συνθήκες χρησιμοποιήσαμε αρουραίους στους οποίους μελετήσαμε τη συνεργιστική γενοτοξική δράση του Imidacloprid και του KNO_3 . Ένα καλό σύστημα για *in vivo* πειράματα είναι και η μελέτη αλλοιώσεων που ενδεχομένως να εμφανίζονται στα πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών. Επαγωγή μικροπυρήνων υπάρχει μόνο στη συγκέντρωση των 200 $\mu\text{g/ml}$ σε αναλογία Imidacloprid: KNO_3 2:1, αλλά δεν εμφανίζεται σε καμία άλλη συγκέντρωση. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την πολυπλοκότητα του μεταβολικού συστήματος των θηλαστικών καθώς επίσης και από την πολύπλοκη



ενζυμική δράση που πραγματοποιείται στους οργανισμούς αυτούς. Είναι εμφανές ότι για να εξαχθούν ασφαλέστερα συμπεράσματα θα πρέπει να σχεδιαστούν νέα πειράματα, που θα αποτελέσουν τη βάση μελλοντικής ερευνητικής δουλειάς, τα οποία θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τους όλους αυτούς τους παράγοντες. Τα πειράματα αυτά όμως δεν αποτελούν στόχο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, σκοπός της οποίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης ορισμένων περιβαλλοντικών παραγόντων όπως το pH και KNO_3 , στη γενοτοξική δράση δύο συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων.



Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά όπως αποδείχτηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή, τα φυτοφάρμακα δεν αποτελούν δομές που δρουν απομονωμένα και ανεξάρτητα στο περιβάλλον, αντίθετα βρίσκονται σε διαρκή αλληλεπίδραση με αυτό, αλλά και με τους οργανισμούς στόχους και μη.

Εν συντομία τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από την παρούσα εργασία είναι:

- Το Methidathion παρουσιάζει σχετικά μικρή γενοτοξική δράση στον άνθρωπο.
- Η επίδραση του pH στο μόριο του Methidathion προκαλεί την υδρόλυση του προς δύο νέα μόρια τα οποία εμφανίζουν αρκετά ισχυρότερη γενοτοξική δράση σε σχέση με το αρχικό μόριο σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.
- Η γενοτοξική δράση των φυτοφαρμάκων επιβεβαιώθηκε και σε *in vivo* συνθήκες σε αγροτικό πληθυσμό.
- Η υδρόλυση του Methidathion επιβεβαιώθηκε με την τεχνική ad-CSV όπου εμφανίστηκε μία νέα αρκετά πιο ηλεκτροενεργή ομάδα μετά την διάσπαση του Methidathion.
- Το Imidacloprid αποτελεί ένα φυτοφάρμακο που θεωρείται από τα πλέον φιλικά προς τον άνθρωπο. Η χορήγηση του μεμονωμένα σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων δεν κατέδειξε γενοτοξική δράση.
- Το KNO_3 αποτελεί μια ένωση η οποία απαντάται σε αφθονία στη φύση. Δεν παρουσιάζει γενοτοξική δράση, ενώ αντίθετα έχει ευεργετική δράση σε καρδιαγγειακές παθήσεις.
- Η συνεργιστική δράση του KNO_3 με το Imidacloprid καθιστά το τελευταίο άκρως γενοτοξικό. Η δράση του αυτή ενδεχομένως να οφείλεται στην εξουδετέρωση του φορτίου του από το KNO_3 και εισχώρηση του στον εσωκυττάριο χώρο.



- Η είσοδο του Imidacloprid στο εσωτερικό του κυττάρου επιβεβαιώθηκε με την χρήση της ad-CSV.
- Η προσομοίωση της κυτταρικής επιφάνειας από τη σταγόνα του υδραργύρου φανέρωσε την ύπαρξη δύο μηχανισμών προσρόφησης του Imidacloprid συναρτήσει της θερμοκρασίας.
- Δεν εμφανίστηκε γενotoξική δράση του Imidacloprid σε πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα μυελού των οστών αρουραίων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. K. Mellanby, (1970), *Pesticides and pollution*, Collins, London, p.111.
2. S. Baskaran, R.S. Kookana, and R. Naidu, (1997), Determination of the insecticide imidacloprid in water and soil using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 787: 271-275.
3. P.J. Berny, F. Buronfosse, B. Videmann, and T. Buronfosse, (1999), Evaluation of the toxicity of imidacloprid in wild birds. A new High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) method for the analysis of liver and crop samples in suspected poisoning cases, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 22: 1547-1559.
4. A. Navalon, R. El-Khattabi, A. Gonzales-Casado, and J.L. Vilchez, (1999), Differential-pulse polarographic determination of the insecticide imidacloprid in commercial formulations, *Microchim. Acta* 130: 261-265.
5. J.L. Macke, (1998), *J. AOAC Int.* 81: 344.
6. J.L. Vilchez, R. El-Khattabi, R. Blanc, and A. Navalon, (1998), Photochemical-fluorimetric method for the determination of the insecticide imidacloprid in water samples, *Anal. Chim. Acta* 371: 247-253.
7. D. Hanson, (1998), *Chem. Eng. News* 4: 38.
8. B. Hileman, (1998), *Chem. Eng. News* 18: 24.
9. T. Tsutsui, H. Maizumi, J.C. Barrett, (1984), Colcemid-induced neoplastic transformation and aneuploidy in Syrian hamster embryo cells, *Carcinogenesis* 5: 89-93.
10. H.J. Evans, Neoplasia and cytogenetic abnormalities, in: V.L. Dellarco, P.E. Voytek, A. Hollaender (Eds.), *Aneuploidy Etiology and Mechanisms*, Plenum Press, New York, 1985, pp. 165-178.
11. T. Αλμπάνης, (1996) «Φυτοφάρμακα: χρήση, επιπτώσεις και νομοθεσία», Ε.Θεοδωρίδη.
12. D. Vlastos, P. Stivaktakis and D.P. Matthopoulos (2006), Pesticide exposure and genotoxicity correlations within a Greek-farmer's group, *intern. J. Environ. Anal. Chem.* 86: 215-223.



-
13. R.J. Cremllyn, (1991), Agrochemicals preparation and mode of action, Wiley & Sons, Inc, England, p.1.
 14. F. Moriarty (Ed.), (1975), Organochlorine insecticides, Academic Press, London & New York.
 15. G.S. Hartley and I.J. Graham-Bryce, (1980), Physical principles of pesticide behavior, Vol. 2, Academic Press, London & New York.
 16. J.R. Plimmer, (1975), Volatility in herbicides-chemistry, degradation and mode of action (Eds. P.C. Kearney and D.D. Kaufmann), Vol. 1, Dekker, New York.
 17. S. Rose, (1970), The chemistry of life, Penguin Books.
 18. R.D. O'Bryan, (1970), Biochemical toxicology of insecticide (Eds. R.D. O'Bryan & I. Yamamoto), Academic Press, New York.
 19. F. Matsuma and C.R.H. Murti, (1982), The biodegradation of pesticides, Plenum Press, London & New York.
 20. M. Eto, (1974), Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry, CRC Press, Cleveland, Ohio.
 21. D.H. Hutson and T.R. Roberts, (Eds.), (1987), Progress in pesticide biochemistry and toxicology, Vol. 5, Wiley, Chichester.
 22. R.D. O'Bryan, (1973), Insect biochemistry and physiology, (Ed. C.F. Wilkinson), Plenum, New York.
 23. T.R. Fukuto and J.J. Sims, (1971), Pesticides in the environment, (Ed. R. White-Stevens), Dekker, New York.
 24. H. Martin and D. Woodcock, (1983), The scientific principles of crop protection, 7th edn, Arnold, London.
 25. K.A. Hassall, (1982), The chemistry of pesticides, Macmillan, London.
 26. E. Salisbury, (1961), Weeds and aliens, The new naturalist, No 43, Collins, London.
 27. M.B. Green, G.S. Hartley and T.F. West, (1987), Chemicals for crop improvement and pest management, 3rd edn, Pergamon Press, Oxford.



-
28. The UK pesticide guide, (1988), British crop protection council publications, Binfield.
29. G.N. Matolcsy and V. Andriská, (1988), Pesticide chemistry, Elsevier, Amsterdam.
30. J.B. Pillmoor and J.K. Gaunt, (1981), The behavior and mode action of the phenoxyacetic acids in plants, In progress in pesticide biochemistry and toxicology (Eds. D.H. Huston and T.R. Roberts), Vol. 1, Wiley, Chichester, p. 147.
31. H.D. Sisler, (1982), The biodegradation of agricultural fungicides, In Biodegradation of pesticides (Eds. F. Matsumura and C.R.K. Murti), Plenum Press, London.
32. W.M. Draper and J.C. Stree, (1981), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 26: 530.
33. E. Vilanova, M.A. Sogorb, (1999), The role of phosphotriesterases in the detoxication of organophosphorus compounds. *Crit Rev Toxicol* 29: 21–57.
34. S. Ukai, N. Kakuta In: Pharmaceutical Society of Japan, editor. Standard Methods of Chemical Analysis in Poisoning—With Commentary; 4th publication. Tokyo: Nanzandou Co.; 1992. p. 331–48
35. M.K. Chung, J.C. Kim, S.S. Han, (2002), Developmental toxicity of Xupyrzofos, a new organophosphorus insecticide, in rats, *Food Chem. Toxicol.* 40: 723–729.
36. R. Tinoco, D. Halperin, (1998), Poverty, production, and health: inhibition of erythrocyte cholinesterase via occupational exposure to organo-phosphate insecticides in Chiapas, Mexico, *Arch. Environ. Health* 53: 29–35.
37. O. Sulak, I. Altuntas, N. Karahan, B. Yildirim, O. Akturk, H. R. Yilmaz, N. Delibas, (2005), Nephrotoxicity in rats induced by organophosphate insecticide methidathion and ameliorating effects of vitamins E and C, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 83: 21–28
38. M. Tomizawa, I. Yamamoto, (1993), Structure-activity relationships of nicotinoids and imidacloprid analogs, *J. Pestic. Sci.* 18: 91–98.



-
39. L.S. Chao, J.E. Casida, (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.
40. M. Tomizawa, D.L. Lee, J.E. Casida, (2000), Neonicotinoid insecticides: molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors, *J. Agric. Food Chem.* 48: 6016–6024.
41. M.Y. Liu, J.E. Casida, (1993), High affinity binding of [3H]-imidacloprid in the insect acetylcholine receptor, *Pestic. Biochem. Physiol.* 46: 40–46.
42. S.J. Lansdell, N.S. Millar, (2000), The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, alpha-bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity, *Neuropharmacology* 39: 671–679.
43. A. Okazawa, Y. Nakagawa, M. Akamatsu, T. Ueno, K. Nishimura, (2000), Comparison of the binding activities of chloronicotiny insecticides toward the nicotinic acetylcholine receptors from rats and houseflies, *J. Pestic. Sci.* 25: 40–43.
44. M. Tomizawa, J.E. Casida, (1999), Minor structural changes in nicotinoid insecticides confer differential subtype selectivity for mammalian nicotinic acetylcholine receptors, *Br. J. Pharmacol.* 127: 115–122.
45. M. Tomizawa, J.E. Casida, (2000), Imidacloprid, thiacloprid, and their imine derivatives up-regulate the alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptor in M10 cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169: 114–120.
46. P. Kalpana, V.T. Gajbhiye, N.P. Agnihotri, (2002), Persistence and leaching of imidacloprid in soil, *Ann. Plant Port. Sci.* 10: 176–178.
47. M.A. Sarkar, S. Roy, R.K. Kole, A. howdhury, (2001), Persistence and metabolism of imidacloprid in different soils of West Bengal, *Pest Manag. Sci.* 57: 598–602.
48. F. Westwood, K.M. Bean, A.M. Dewar, R.H. Bromilow, K. Chamberlain, (1998), Movement and persistence of [C-14]imidacloprid in sugarbeet plants following application to pelleted sugar-beet seed, *Pestic. Sci.* 52: 97–103.



-
49. E. Hellpointer, (1998), Lysimeter study of imidacloprid after seed treatment of sugar beet in two crop rotations, A.C.S. Symp. Ser. 699: 40–51.
50. M. Oi, (1999), Time-dependent sorption of imidacloprid in two different soils. J. Agric. Food Chem. 47: 327–332.
51. Jr.R.S. Oliveira, W.C. Koskinen, N.R. Werdin, P.Y. Yen, (2000), Sorption of imidacloprid and its metabolites on tropical soils, J. Environ. Sci. Health, Part B 35: 39–49
52. F. Flores-Cespedes, E. Gonzales-Pradas, M. Fernandez-Perez, M. Vilafranca-Sanchez, M. Socias-Viciano, M.D. Urena-Amate, (2002), Effects of dissolved organic carbon on sorption and mobility of imidacloprid in soil, J. Environ. Qual. 31: 880–888.
53. E. Gonzalez-Pradas, F. Flores-Cespedes, M.D. Urena-Amate, M. Fernandez-Perez, J. Garratt, R. Wilkins, (2000), Leaching and persistence of imidacloprid and diuron in a citrus crop in Valencia, Fresenius Environ. Bull. 9: 638–645.
54. A.R. Fernandez-Alba, A. Tejedor, A. Aguera, M. Contreras, J. Garrido, (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.
55. S. Suchail, D. Guez, L.P. Belzunces, (2001), Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*, Environ. Toxicol. Chem. 20: 2482–2486.
56. EPA, Office of Pesticide Programs, Pesticide Fact Sheet: Imidacloprid, Washington, DC, 1994.
57. M. Kirsch-Volders, A. Vanhauwaert, U. Eichenlaub-Ritter, I. Decordier, (2003), Indirect mechanisms of genotoxicity, Toxicol. Lett. 140–141: 63–74.
58. A.H.W. Nias: An Introduction to Radiobiology, second ed., Wiley, Chichester, England, 1998, p. 4.
59. S. Dowd, E. Tilson: Practical Radiation Protection and Applied Radiotherapy, Saunders, Philadelphia PA, USA, 1999, pp. 118–120.



-
60. A. Elhajouji, P. Van Hummelen, M. Kirsch-Volders, (1995), Indications for a threshold of chemically-induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* 26: 292-304.
61. A. Elhajouji, F. Tibaldi, M. Kirsch-Volders, (1997), Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes, *Mutagenesis* 12, 133-140.
62. I. Decordier, L. Dillen, E. Cundari, M. Kirsch-Volders, (2002), Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules, *Mutagenesis* 17: 337-344.
63. M. Kirsch-Volders, A. Vanhauwaert, M. De Boeck, I. Decordier, (2002), Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations, *Mutat. Res.* 504: 137-148.
64. J.R.K. Savage, (1993), Update on target theory as applied to chromosomal aberrations, *Env. Mol. Mutagen.* 22: 198-207.
65. H.J. Evans, (1990), *Cytogenet.: Overview. Prog. Clin. Biol. Res.* 340B: 301-323.
66. V.L. Dellarco, K.H. Mavournin, R.R. Tice, (1985), Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions, *Environ. Mutagen.* 7: 405-424.
67. M. Guttenbach, M. Schmid, (1994), Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures, *Exp. Cell Res.* 211: 127-132.
68. C. Bolognesi, (2003), Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies, *Mutat. Res.* 543: 251-272.
69. F.N. Dulout, M.C. Pastori, O.A. Olivero, M. Gonzalez Cid, D. Loria, E. Matos, N. Sobel, E.C. de Bujan, N. Albiano, (1985), Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides, *Mutat. Res.* 143: 237-244.



-
70. F.N. Dulout, J.S. Lòpez Camelo, H.N. Guradze, (1992), Analysis of sister chromatid exchanges (SCE) in human population studies, *Rev. Brazil. Genet.* 15: 169-182.
71. M. De Ferrari, M. Artuso, S. Bonassi, S. Bonatti, Z. Cavalieri, D. Pescatore, E. Marchini, V. Pisano, A. Abbondandolo, (1991), Cytogenetic biomonitoring of an Italian population exposed to pesticides: chromosome aberration and sister chromatid exchange analysis in peripheral blood lymphocytes, *Mutat. Res.* 260: 105-113.
72. E. Carbonell, A. Valbuena, N. Xamena, A. Creus, R. Marcos, (1995), Temporary variations in chromosomal aberrations in a group of agricultural workers exposed to pesticides, *Mutat. Res.* 344: 127-134.
73. C. Bolognesi, M. Parrini, F. Merlo, S. Bonassi, (1993), Frequency of micronuclei in lymphocytes from a group of floriculturists exposed to pesticides, *J. Toxicol. Environ. Health* 40: 405-411.
74. M. Fenech, N. Holland, W.P. Chang, E. Zeiger, S. Bonassi, (1999), The HUman MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, *Mutation Research* 428: 271-283.
75. A.T. Natarajan, G., (1982), Obe, Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays, in: J.A. Heddle (Ed.), *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*, Academic Press, New York, pp. 171-213.
76. W. Schmid, (1975), The micronucleus test, *Mutat. Res.* 31: 9-15.
77. J.A. Heddle, (1973), A rapid in vivo test for chromosome damage, *Mutat. Res.* 18: 187-192.
78. M. Fenech, A.A. Morley, (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios* 43: 233-246.
79. M. Fenech, A.A. Morley, (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.* 147: 29-36.



80. M. Fenech, A.A. Morley, (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low-dose x-irradiation, *Mutat. Res.* 161: 193–198.

81. R.J. Albertini, D. Anderson, G.R. Douglas, L. Hagmar, K. Hemminki, F. Merlo, A.T. Natarajan, H. Norppa, D.E. Shuker, R. Tice, M.D. Waters, A. Aitio, (2000), IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety, *Mutat. Res.* 463: 111–172.

82. M. Fenech, P. Baghurst, W. Luderer, J. Turner, S. Record, M. Ceppi, S. Bonassi, (2005), Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia, *Carcinogenesis* 26: 991–999.

83. M. Fenech, (2002), Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer, *Drug Discov. Today* 7: 1128–1137.

84. D. Cimini, F. Degrossi, (2005), Aneuploidy: a matter of bad connections, *Trends Cell Biol.* 15: 442–451.

85. N.T. Leach, C. Jackson-Cook, (2004), Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei?, *Mutat. Res.* 554: 89–94.

86. S.B. Carter, (1967), Effects of cytochalasins on mammalian cells, *Nature* 213: 261–264.

87. S. Masunaga, K. Ono, M. Abe, (1991), A method for the selective measurement of the radiosensitivity of quiescent cells in solid tumours—combination of immunofluorescence staining to BrdU and micronucleus assay, *Radiat. Res.* 125: 243–247.

88. Y. Odagiri, K. Takemoto, M. Fenech, (1994), Micronucleus induction in cytokinesis-blocked mouse bone-marrow cells in vitro following in vivo



exposure to X-irradiation and cyclophosphamide, *Env. Mol. Mutagen.* 24: 61-67.

89. F. Degrossi, C. Tanzarella, (1988), Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy, *Mutat. Res.* 203: 339-345.

90. E.J. Thompson, P. Perry, (1988), The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploidy, *Mutagenesis* 3: 415-418.

91. Z. Farooqi, F. Darroudi, A.T. Natarajan, (1993), Use of fluorescence in situ hybridisation for the detection of aneuploids in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis* 8: 329-334.

92. J.C. Hando, J. Nath, J.D. Tucker, (1994), Sex chromosomes, micronuclei and aging in women, *Chromosoma* 103: 186-192.

93. E.M. Parry, L. Henderson, J.M. Mackay, (1995), Guidelines for testing of chemicals. Procedures for the detection of chemically induced aneuploidy: recommendations of a UK Environmental Mutagen Society working group, *Mutagenesis* 10 (1): 1-14.

94. A. Elhajouji, P. Van Hummellen, M. Kirsch-Volders, (1995), Indications for a threshold of chemically induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* 26: 292-304.

95. M. Fenech, S. Neville, (1992), Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes, *Env. Mol. Mutagen.* 19 (1): 27-36.

96. A. Zijno, F. Marcon, P. Leopardi, R. Crebelli, (1994), Simultaneous detection of X-chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked human lymphocytes by in situ hybridisation with a centromeric DNA probe; implications for the human lymphocyte in vitro micronucleus assay using cytochalasin-B, *Mutagenesis* 9 (3): 225-232.

97. A. Elhajouji, F. Tibaldi, M. Kirsch-Volders, (1997), Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes, *Mutagenesis* 12: 133-140.



-
98. M. Schuler, D.S. Rupa, D.A. Eastmond, (1997), A critical evaluation of centromeric labelling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage in vitro, *Mutat. Res.* 392: 81-95.
99. M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, E. Cundari, P. Van Hummelen, (1997), The in vitro micronucleus test: a multi-end-point assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction, *Mutat. Res.* 392: 19-30.
100. M. Fenech, J. Crott, J. Turner, S. Brown, (1999), Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide, *Mutagenesis* 14 (6): 605-612.
101. M. Kirsch-Volders (Ed.), The CB in vitro Micronucleus Assay in Human Lymphocytes, Special Issue, *Mutat. Res.* 392 (1997), Special Issue (1,2).
102. A. Elhajouji, M. Cunha, M. Kirsch-Volders, (1998), Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay, *Mutagenesis* 13: 193-198.
103. M. Kirsch-Volders, M. Fenech, (2001), Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes, *Mutagenesis* 16: 51-58.
104. M. Fenech, (2000), The in vitro micronucleus technique, *Mutat. Res.* 455: 81-95.
105. M. Pincu, D. Bass, A. Norman, (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutat. Res.* 139: 61-65.
106. M. Fenech, A.A. Morley, (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.* 147: 29-36.
107. S.B. Carter, (1967), Effects of cytochalasins on mammalian cells, *Nature* 213: 261-264.



-
108. M. Fenech, (1991) Optimization of micronucleus assay for biological dosimetry: B. L. Gledhill, F. Maouro (Eds.), *New Horizons in biological dosimetry*, Wiley-Liss, 373-386.
109. D.A. Eastmond, J.D. Tucker, (1989), Identification of aneuploidy- inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an anti-kinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.* 13: 34-43.
110. M. Fenech, A.A. Morley, (1989), Kinetochore detection in micronuclei: An alternative method for measuring chromosome loss, *Mutagen* 4 (2): 98-104.
111. A.M. Lynch, J.M. Parry, (1993), The cytochalasin -B micronucleus/kinetochore assay in vitro: studies with 10 suspected aneugens, *mutation Res.* 287 (1): 71-87.
112. E.M. Parry, L. Henderson, J.M. Mackay, (1995), Guidelines for testing of chemicals. Procedures for the detection of chemically induced aneuploidy: recommendations of a UK Environmental Mutagen Society working group, *Mutagenesis* 10 (1): 1-14.
113. L. Hagmar, A. Brogger, I.-L. Hansteen, S. Heim, B. Högstedt, L. Knudsen, B. Lambert, K. Linnainmaa, F. Mitelman, I. Nordenson, C. Reuterwall, S. Salomaa, S. Skerfving, M. Sorsa, (1994), Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.* 54: 2919-2922.
114. S. Bonassi, M. Fenech, C. Lando, Y.-P. Lin, M. Ceppi, W.P. Chang, N. Holland, M. Kirsch-Volders, E. Zeiger, S. Ban, R. Barale, M.P. Bigatti, C. Bolognesi, C. Jia, M. Di Giorgio, L.R. Ferguson, A. Fucic, O.G. Lima, P. Hrelia, A.P. Krishnaja, T.K. Lee, L. Migliore, L. Mikhalevich, E. Mirkova, P. Mosesso, W.U. Müller, Y. Odagiri, M.R. Scarffi, E. Szabova, I. Vorobtsova, (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.



-
115. M. Fenech, S. Neville, J. Rinaldi, (1994), Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes, *Mutat. Res.* 313: 203–207.
116. J. Surralles, P. Jeppesen, H. Morrison, A.T. Natarajan, Analysis of loss of inactive X chromosomes in interphase cells, *Am. J. Hum. Genet.* 59 (1996) 1091–1096.
117. J. Surralles, M.P. Hande, R. Marcos, P.M. Lansdorp, (1999), Accelerated telomere shortening in the human inactive X chromosome, *Am. J. Hum. Genet.* 65: 1617–1622.
118. J. Hando, J. Nath, J. Tucker, (1994), Sex chromosomes, micronuclei and aging in women, *Chromosoma* 103: 186–192.
119. J. Nath, J. Tucker, J. Hando, (1995), Y chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores and aging in men, *Chromosoma* 103: 725–731.
120. P. Fitzgerald, Premature centromere division of the X chromosome, in: A. Sandberg (Ed.), *Cytogenetics of the Mammalian X Chromosome. Part B. X Chromosome Anomalies and Their Clinical Manifestations*, Liss, New York, 1983, pp. 171–184.
121. J.C. Hando, J.D. Tucker, M. Davenport, J. Tepperberg, J. Nath, (1997), X chromosome inactivation and micronuclei in normal and Turner individuals, *Hum. Genet.* 5-6: 624–628.
122. J. Tucker, J. Nath, J. Hando, (1996), Activation status of the X chromosome in human micronucleated lymphocytes, *Hum. Genet.* 97: 471–475.
123. M. Neri, M. Ceppi, L. Knudsen, D.F. Merlo, R. Barale, R. Puntoni, S. Bonassi, (2005), Baseline micronuclei frequency in children: estimates from meta- and pooled analyses, *Environ. Health Perspect.* 113: 1226–1229.
124. Μ. Πανέλη, Ανάπτυξη μεθόδου βολταμμετρικού προσδιορισμού νικελίου και κοβαλτίου σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα», Διδακτορική Διατριβή, Θεσσαλονίκη, (1993).



-
125. Σ. Γηρούση, Μελέτη και ανάπτυξη μεθόδου βολταμμετρικού προσδιορισμού βιοστοιχείων (χαλκού-μολυβδαινίου), Διδακτορική, Διατριβή, Θεσσαλονίκη, (1996).
126. Ε. Γιαννακόπουλος, Φυσικοχημική μελέτη αλληλεπιδράσεων οργανικών ρύπων και βαρέων μετάλλων στη διεπιφάνεια υγρού - στερεού, Εκδ. Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Αγρίνιο (2007)
127. M. Zelig, M. Lourie, (2003), *Journal of Electroanalytical Chemistry* 541: 67-76.
128. Kh.Z. Brainina, (1971), *Film stripping voltammetry*, *Talanta* 18: 513-520.
129. M. Paneli, A. Voulgaropoulos, (1993), *Applications of adsorptive stripping voltammetry in the determination of trace and ultratrace metals*, *Electroanalysis* 5: 355-373.
130. J. Lyklema, (1995), *Fundamentals of Interface and Colloid Science, Vol.II Solid-Liquid Interfaces*, Academic, London, p.2.68-2.69.
131. K. Kano, T. Konse, N. Nishimura, T. Kubota, (1984), *Electrochemical Properties of Adriamycin Adsorbed on a Mercury Electrode Surface* *Bull. Chem. Soc. Japan* 57: 2383-2390.
132. J. Koryta, (1953), *Coll.Czech.Chem.Comm.* 18: 206.
133. J. Wang, *Stripping Analysis* VCH (1985).
134. C.P. Schuhhess., (1986), *Backtitration Technique for Proton Isotherm Modeling of Oxide Surfaces*, Sparks, D.L. *Soil. Sci.Soc. Am. J.* 50: 1406.
135. E. Vydra, *Electrochemical Stripping Analysis*, Sohn Wiley and Sons Inc, New York, 1976, p.179.
136. M. Lovric, S. Komorsky-Lovric and R.W. Murray, (1998), *Adsorption effects in square-wave voltammetry of totally irreversible redox reactions* *Electrochimica Acta* 33 (6): 739-744.
137. W. Schmid, *Chemical Mutagens: Principles and Methods For Their Detection*. Vol. 4, Plenum, New York, pp 31 – 53 (1976) A. Hollaender (Ed).



-
138. D. Jenssen and C. Ramel, (1978), Factors affecting the induction of micronuclei at low doses of X-rays, MMS and dimethylnitrosamine in mouse erythroblasts, *Mutation Res* 58: 51-65.
139. J.W. Hart and B. Hartley-Asp, (1983), Induction of micronuclei in the mouse : Revised timing of the final stage of erythropoiesis, *Mutation Res* 120: 127-132.
140. M.F. Salamone and J.A. Heddle, (1983), *Chemical Mutagens: Principles and Methods For Their Detection*. Vol. 8, Plenum, New York, pp 31 – 53 A. Hollaender (Ed).
141. A. Celik, B. Mazmanci, Y. Camlica, A. Askin and U. Comelekoglou, (2003), Cytogenetic effects of lamda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow. *Mutation Res*. 539: 91-97.
142. R.R. Tice, G.L. Erexson, M.D. Shelby, (1990) The induction of micronucleated polychromatic erythrocytes in mice using single and multiple treatments, *Mutation Research* 234: 187-193
143. J.T. MacGregor, C.M. Wehr and D.H. Gould, (1980),Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test, *Environ. Mutagen.* 2: 509-514.
144. R. Schlegel and J.T. MacGregor, (1982), The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice *Mutation Res* 104: 367-369.
145. R. Schlegel and J.T. MacGregor, (1983), A rapid for cumulative chromosomal damage in mice : Accumulation of circulating micronucleated erythrocytes, *Mutation Res* 113: 481-487.
146. W. Schmid, (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.* 31: 9-15.
147. K.J. Min, C.G. Cha and W. Popendorf, (2005), Determination of urinary metabolites of phosalone, Methidathion and IBP after oral administration and dermal application to rats, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74: 809-816.
148. M. Lodovici, C. Casalini, C. Briani and P. Dolara, (1997), Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures, *Toxicology* 117:55-60.



149. S. Kevekordes, T. Gebel, K. Pav, R. Edenharder and H. Dunkelberg, (1996), Genotoxicity of selected pesticides in the mouse bone-marrow micronucleus test and in sister-chromatid exchange test with human lymphocytes in vitro, *Toxicology Letters* 89: 35-42.
150. K. Vorkamp, E. Kellner, J. Taube, K.D. Möller and R. Herrmann, (2002), Fate of Methidathion residues in biological waste during anaerobic digestion, *Chemosphere*, 48: 287-297.
151. R.G. Shah, J. Lagueux, S. Kapur, P. Levallois, P. Ayotte, M. Tremblay, J. Zee and G.G. Poirier, (1997), Determination of genotoxicity of the metabolites of the pesticides Guthion, Sencor, Loxor, Reglone, Daconil and Admire by ^{32}P -postlabeling, *Molecular and Cellular Biochemistry* 169: 177-184.
152. H. Obana, M. Okihashi, K. Akutsu, Y. Kitagawa and S. Hori, (2002), Determination of Acetamiprid, Imidacloprid and Nitenpyram residues in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography with diode-array detection, *J. agric. Food Chem.*, 50: 4464-4467.
153. S. Feng, Z. Kong, X. Wang, P. Peng and E.Y. Zeng, (2005), Assessing the genotoxicity of Imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 61: 239-246.
154. G. Richardson, S.L. Hicks, S. O'Byrne, M.T. Frost, K. Moore, N. Benjamin and G.M. McKnight, (2002), The ingestion of inorganic nitrate increases gastric S-nitrosothiol levels and inhibits platelet function in humans, *Nitric Oxide* 7: 24-29.
155. H.J. Ulrich, W. Stumm, (1988), Adsorption of aliphatic fatty acids on aquatic interfaces. Comparison between two model surfaces: the mercury electrode and δ - Al_2O_3 colloids, *Environ. Sci. Technol.* 22: 37-41.
156. R. Dogić, D. Krznarić, (2003), Adsorption of Tri-n-Butyl Phosphate (TBP) from NaClO_4 Aqueous Solution on Hg Electrode, *Electroanalysis* 15: 312-318.



-
157. D. Risović, B. Gašparović, B. Čosivić, (2001), Fractal and Voltammetric Study of Linoleic Acid Adsorption at the Mercury/Electrolyte Solution Interface, *Langmuir* 17: 1088-1095.
158. W. Stricks, I.M. Kollthoff, (1953), Reactions between Mercuric Mercury and Cysteine and Glutathione. Apparent Dissociation Constants, Heats and Entropies of Formation of Various Forms of Mercuric Mercapto-Cysteine and - Glutathione, *J. Am. Chem. Soc.* 75: 5673-5681.
159. I.M. Kolthoff, W. Stricks, N. Tanaka, (1955), The Polarographic Prewaves of Cystine (RSSR) and Dithidiglycolic Acid (TSST) and the Oxidation Potentials of the Systems RSSR-RSH and TSST-TSH, *J. Am. Chem. Soc.* 77: 4739-4742.
160. P. Pérez, C. Teijeiro, D. Marin, (2002), Study on the Adsorption Properties of the Drug Mitomycin C by Stripping Voltammetry, *Langmuir* 18: 1760-1763.
161. J.J. Procopio, M.T.S. Escibano, L.H. Hernandez, *Fresenius J. Anal. Chem.*, (1988), 311, 27-29.
162. A. Webber, M. Shah, and J. Osteryoung, (1983), Electrochemical reduction and determination of cimetidine at nanomolar to micromolar levels of concentration *Analytica Chimica Acta* 154: 105-119
163. A. Navalon, R. El-Khattabi, A. Gonzalez-Casado, J.L. Vilchez, (1999), Differential-pulse polarographic determination of the insecticide imidacloprid in commercial formulations, *Microchim. Acta.* 130: 261-265.
164. A. Guiberteau, T. Galeano, N. Mora, P. Parrilla, F. Salinas, (2001), Study and determination of the pesticide Imidacloprid by square wave adsorptive stripping voltammetry, *Talanta.* 53: 943-949.
165. N. Ruiz-de-Erenchun, Z. Gomez-de-Balugera, M.A. Giocolea, R.J. Barrio, (1997), Determination of imidacloprid and its major metabolite in soils by liquid chromatography with pulsed reductive amperometric detection, *Anal. Chim. Acta.* 349: 199-206.
166. H. Banadikova, R. Kalvoda, (1984), Adsorptive Stripping Voltammetry of Some Triazine- and Nitro Group-Containing Pesticides, *Anal. Lett* 17: 1519.



-
167. A. Webber, M. Shah and J. Osteryoung, (1983), Electrochemical reduction and determination of cimetidine at nanomolar to micromolar levels of concentration, *Analytica Chimica Acta* 154: 105-119.
168. L.R. Snyder, (1963), Adsorption from solution. I. fused aromatic hydrocarbons on alumina, *J.Phys. Chem.* 67: 234-240.
169. <http://www.epa.gov/pesticides/>
170. <http://www.extoxnet.orst.edu/>
171. <http://www.inchem.org/documents/>
172. J.D. Tucker and R.J. Preston, (1996), Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment, *Mutation Res.* 365: 147-159.
173. M. Eddleston, L. Karalliede, N. Buckley, R. Fernando, G. Hutchinson, G. Isbiter, F. Konradsen, D. Murray, J.P. Piola, N. Senanayake, R. Sheriff, S. Singh, S.B. Siwach, L. Smit, (2002), Pesticide poisoning in the developing world—a minimum pesticides list, *Lancet*, 360, 1163-1167.
174. A.M. Tsatsakis, P. Aguridakis, M.N. Michalodimitrakis, A.K. Tsakalov, A.K. Alegakis, E. Koumantakis, G. Troulakis, *Vet. Human Toxicol.*, 38, 101-107 (1996).
175. A.M. Tsatsakis, K. Perakis, E. Koumantakis, *Vet. Human Toxicol.*, 38, 113-117 (1996).
176. A.M. Tsatsakis, A.K. Tsakalov, M.N. Michalodimitrakis, *Sci. Justice*, 36, 41-45 (1996).
177. IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, vol. 1-82, (1971-2002).
178. G. Dolapsakis, I.G. Vlachonokolis, C. Varveris, A.M. Tsatsakis, (2001), Mammographic findings and occupational exposure to pesticides currently in use on Crete *Eur. J. Cancer* 37: 1531-1536.
179. I. Dialyna, G. Tzanakakis, G. Dolapsakis, A. Tsatsakis, (2004), A tetranucleotide repeat polymorphism in the *CYP19* gene and breast cancer



susceptibility in a Greek population exposed and not exposed to pesticides, *Toxicol. Lett.* 151: 267-271.

180. C. Bolognesi, (2003), Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies, *Mutat. Res.* 543: 251-272.

181. S. Bonassi, M. Neri, C. Lando, M. Ceppi, Y-P. Lin, W.P. Chang, N. Holland, M. Kirsch-Volders, E. Zeiger, M. Fenech, (2003), Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project, *Mutat. Res.* 543: 155-166.

182. D. Vlastos, G. Demisia, D. Matthopoulos, (2004), *Intern. Environ. Anal. Chem.* 84 (1-3): 183-191.

183. H. Norppa, S. Luomahaara, H. Heikanen, S. Roth, M. Sorsa, L. Renzi, C. Lindholm, (1993), *Environ. Health Perspect.* 101(3): 139-143.

184. G. C.-M. Falck, A. Hirvonen, R. Scarpato, S. Saarikoski, L. Migliore, H. Norppa, (1999), *Mutat. Res.* 441: 225-237.

185. R. Pasquini, G. Scassellati – Sforzolini, G. Angeli, C. Fatigoni, S. Monarca, L. Beneventi, A. M. DiGiulio, F. A. Baueleo, (1996), *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 15(1): 29-39.

186. G. Joksic, A. Vidakovic, V. Spasojevic – Tisma, (1997), *Environ. Res.* 75: 113-118.

187. C.D.S. Tomlin (Ed.), (1997), *The pesticide Manual*, 11th ed., British Crop Protection Council, Surrey, UK. 706-708.

188. D.A. Schulz-Jander and J.E. Casida, (2002), Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction, *Toxicol. Lett.* 132: 65-70.

189. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr07.htm>

190. J. Rouchard, et al., (1996), Imidacloprid insecticide soil metabolism in sugar beet fields crops, *Bull. Environ. Contam.* 56: 29-36.

191. S. Suchail, L. Debrauwer and L.P. Belzunees, (2004), Metabolism of Imidacloprid in *Apis mellifera*, *Pest. Manag. Sci.* 60: 291-296.

192. C. Cox, (2001), Imidacloprid, *J. Pest Reform* 21: 15-21.



-
193. A.C. Moffat, M.D. Osselton and B. Widdop (Eds.), *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals Body Fluids and Post - Mortem Material*, Pharmaceutical Press. Vol. 2 London, UK. (2004) 1128-1129.
194. J.Z. Sun, J.C. Fang, Z.W. Du and L.R. Xia, (1995), Imidacloprid a super - efficacious, all - purpose and assimilable insecticide, *Plant Protection* 21: 44-45.
195. A. Elbert, R. Nauen and W. Leicht, (1998), Imidacloprid, a novel chloronicotinyl insecticide: biological activity and agricultural importance, In: I. Ishaaya and D. Degheele (Eds.), *insecticides with Novel Modes of Action*, Springer, Berlin, Germany 50-73.
196. G. Damsia, D. Vlastos, M. Goumenou and D.P. Matthopoulos, (2007), Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone - marrow, *Mutat. Res.* 634: 32-39.
197. S. Feng, Z. Kong, X. Wang, P. Peng and E.Y. Zeng, (2005), Assessing the genotoxicity of Imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests, *Ecotox. and Env. Safety* 61: 239-246.
198. N.U. Karabay nad M.G.Oguz, (2005), Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos, *Genet. Mol. Res.* 4:653-662
199. J. Siciliano, S. Krulick, E.G. Heisler, J.H. Schwartz and J.W. White Jr., (1975), Nitrate and nitrite content of some fresh and processed market vegetables, *J. Agric. Food Chem.* 23: 461-464.
200. G. Richardson, S.L. Hicks, S. O' Byrne, M.T. Frost, K. Moore, N. Benjamin and G.M. McKnight, (2002), The ingestion of inorganic nitrate increases gastric S - nitrosothiol levels and inhibits platelet function in humans, *Nitric Oxide* 7: 24-29.
201. D. Tsikas, (2002), Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids, *Free Radic. Res.* 39: 797-815.



202. Ο. Γκίμπα-Τζιαμπίρη, (2000), Φυσιολογία του ανθρώπου, Ζυγός, Θεσσαλονίκη τόμος – Α, σελ.61.

