



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
**Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών**
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΑΝΤΟΣ

**ΧΗΜΙΚΟΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ:
ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ**

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΜΑΡΓΑΡΙΤΟΥ

Χημικός

Διδακτορική Διατριβή

**Αθήνα
Μαΐος 2020**

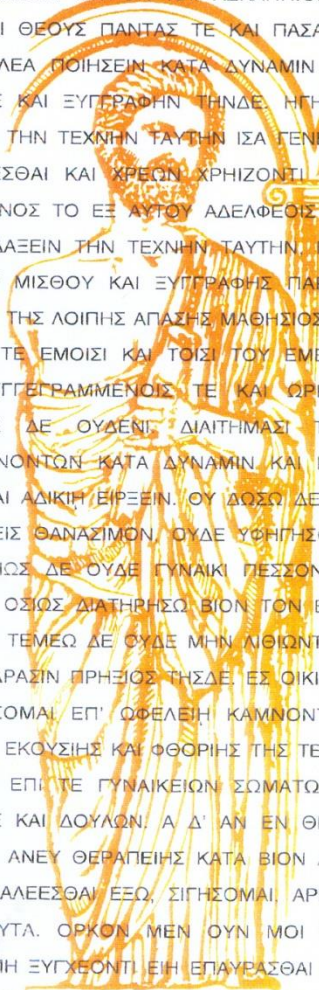
ΕΘΝΙΚΟΝ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ



ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ ΚΕΙΜΕΝΟ



ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΕΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΗΓΗΣΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΊΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΕΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΕΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΨΗΓΗΣΟΜΑΙ ΕΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΣΙΟΣ ΤΗΣΔΕ ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΕΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΕΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Ημερομηνία αίτησης: 06/03/2013

Ημερομηνία ορισμού Ζμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 13/06/2013

Αίτηση αντικατάστασης μέλους της Ζμελούς Επιτροπής: 28/11/2016
25/04/2018

Μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΑΝΤΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑ
(ΕΠΙΒΛΕΠΟΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ)

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΥΡΙΑΚΙΔΗΣ Τ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΑΠΘ

ΙΟΡΔΑΝΗΣ ΜΟΥΡΟΥΖΗΣ ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑ

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 17/06/2013

Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής: 19/05/2020

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Καθηγητής Πέτρος Σφηκάκης

Μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΑΝΤΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΕΚΠΑ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΑΒΑΝΤΖΑΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΕΚΠΑ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΥΡΙΑΚΙΔΗΣ Τ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ - ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΑΠΘ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΦΙΛΙΠΠΟΥ ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΕΚΠΑ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ - ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΜΠ

ΙΟΡΔΑΝΗΣ ΜΟΥΡΟΥΖΗΣ ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΕΚΠΑ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΤΡΑΦΑΛΗΣ ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΕΚΠΑ

Βαθμός διδακτορικής διατριβής

ΑΡΙΣΤΑ

*Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του ΕΚΠΑ
δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τις γνώμες του συγγραφέα
(Νόμος 5343/1932, άρθρο 202, Παράγραφος 2)*

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο: Αικατερίνη Μαργαρίτου
Ημερομηνία & τόπος γέννησης: 19 Δεκεμβρίου 1967, Ζαγκλιβέρι Λαγκαδά
Τηλέφωνο επικοινωνίας: 6974716832
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: Katerina.margaritou@outlook.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2013-σήμερα: Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
1990: Πτυχίο Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Βαθμός 6,9/10)
1985: Απολυτήριο Λυκείου, 23^ο λύκειο Θεσσαλονίκης

ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

2019: Εκπαίδευση στις απαιτήσεις του προτύπου ISO 17025 – Απαιτήσεις για εργαστήρια δοκιμών και διακριβώσεων
2014: Εκπαίδευση στον χειρισμό, ανάπτυξη μεθόδων και συντήρηση ICP-MS (inductively coupled plasma-mass spectroscopy)
1990: Παρακολούθηση σεμιναρίου 300 ωρών «Μικροβιολογία, Ανοσοβιολογία και Γενετική Μηχανική». Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά (πολύ καλά)

ΜΕΛΟΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΩΝ & ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

2014-σήμερα: Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ)
1990-σήμερα: Ένωση Ελλήνων Χημικών

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

2013-σήμερα: «Χημικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες και κυτταρική απάντηση: φαρμακολογική και επιγενετική προσέγγιση», στο πλαίσιο εκπόνησης διδακτορικής διατριβής, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

2017-2020: Εκπαίδευση μεταπτυχιακών φοιτητών σε εργαστηριακές τεχνικές, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2006-σήμερα: Υπεύθυνη αναλυτικού εργαστηρίου, ΕΒΕΤΑΜ ΑΕ Βιομηχανικής Έρευνας, Τεχνολογικής Ανάπτυξης & Εργαστηριακών Δοκιμών, Πιστοποίησης και Ποιότητας (εξειδίκευση στην ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και διενέργεια αναλυτικών τεχνικών σε LC/MSMS, GC/MS, AAS, ICP-MS)

- 2003-2006: ΑΜΠΑΤΖΗΣ ΑΕ, Μονάδα παραγωγής ενδύματος, Υπεύθυνη Ποιότητας
- 1998-2003: ΦΑΡΜΠΕΤΕΞ ΑΕ, Βαφείο-φινιριστήριο υφασμάτων, Προϊσταμένη εργαστηρίου
- 1995-1998: Μ. ΑΜΠΑΤΖΗΣ ΑΒΕΕ, Βαφείο-φινιριστήριο υφασμάτων, χημικός εργαστηρίου
- 1992-1995: ΒΑΦΙΘΕ ΑΕ, Βαφείο-φινιριστήριο υφασμάτων, χημικός εργαστηρίου

ΟΜΙΛΙΕΣ – ΕΙΣΗΓΗΣΕΙΣ ΚΑΤΟΠΙΝ ΠΡΟΣΚΛΗΣΕΩΣ

- 2013-2017: «Τοξικές ουσίες σε είδη καθημερινής χρήσης», Εταιρεία των φίλων του λαού (Λαϊκό Πανεπιστήμιο), Αθήνα

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

Kakolyri M, *Margaritou A*, Tiligada E (2016). Dimethyl sulphoxide modifies growth and senescence and induces the non-revertible petite phenotype in yeast. *FEMS Yeast Res* 16: fow008. doi: 10.1093/femsyr/fow008

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Μαργαρίτου Α, Κακολύρη Μ, Τυλιγάδα Α (2016). Η₁-αντιισταμινικά: ένας αιώνας εξέλιξεων. *Ιατρική Επιθεώρηση Ενόπλων Δυνάμεων* 43: 118-127.

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Μαργαρίτου Α, Τυλιγάδα Α (2014) Δοσοεξαρτώμενη επίδραση του TBT στην ανάπτυξη και επιβίωση των ευκαρυωτικών κυττάρων. *THALATTA: Βιώσιμη θαλάσσια οικονομία*, Σαντορίνη, 4-5.10.2014

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ (POSTER) ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Kakolyri M, *Margaritou A*, Tiligada E (2018). Tributyltin induces dose- and phase of growth-related alterations in eukaryotic cell proliferation and carbohydrate levels. *WCP2018*, Κιότο, Ιαπωνία, PO3-13-34

Kakolyri M, *Margaritou A*, Tiligada E (2014). Dimethyl sulfoxide promotes phenotypic alterations indicative of ageing in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 65ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΕΕΒΜΒ, Θεσσαλονίκη, 28-30.11.2014, P2

Μαργαρίτου Α, Kakolyri M, Kyriakidis DA, Tiligada E (2014) Dosage-related effects of tributyltin on eukaryotic growth and viability. 65ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΕΕΒΜΒ, Θεσσαλονίκη, 28-30.11.2014, P114

ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ

Έμπειρος χρήστης: Επεξεργασία κειμένου, Υπολογιστικά φύλλα, Παρουσιάσεις, Υπηρεσίες διαδικτύου (ηλεκτρονική αλληλογραφία, προγράμματα περιήγησης), Στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics, Αναζήτηση σε επιστημονικές και μη επιστημονικές βάσεις δεδομένων, Μέσα κοινωνικής δικτύωσης (Facebook, ResearchGate, LinkedIn)

*Στόν Παράδεισο ἔχω σημαδέψει ἓνα νησί
Ἀπαράλλαχτο ἐσύ κι ἓνα σπίτι στή θάλασσα*

ΟΔΥΣΣΕΑΣ ΕΛΥΤΗΣ
ΤΟ ΜΟΝΟΓΡΑΜΜΑ
(Παρίσι 1971)

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε αργά στη ζωή μου, προς το τέλος της καριέρας μου, και όχι στην αρχή όπως συνηθίζεται. Ήταν ένα ανεκπλήρωτο όνειρο μου, να βάλω κι εγώ ένα λιθαράκι στην επιστημονική γνώση, μια μικρή συνεισφορά στην επιστήμη και στον άνθρωπο. Αυτό το όνειρο είχε ξεκινήσει πριν πολλά χρόνια, στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ), αλλά οι καταστάσεις δεν άφησαν τότε να ολοκληρωθεί. Όμως, μια τυχαία συνάντηση σε μια κοπή πίτας με ένα μέλος της τότε Συμβουλευτικής μου Επιτροπής ήταν αρκετό για να ξαναφουντώσει μέσα μου αυτή η επιθυμία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, από τα βάθη της ψυχής μου, τον Καθηγητή Βιοχημείας του ΑΠΘ Δημήτριο Κυριακίδη που, σ' εκείνην την κοπή της πίτας, με ώθησε να ολοκληρώσω αυτό που είχα αρχίσει πριν 30 χρόνια, και χωρίς δισταγμό, στάθηκε αρωγός στην προσπάθειά μου ως μέλος της 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να στείλω, εκεί ψηλά όπου βρίσκεται, στον Καθηγητή Νικόλαο Σιταρά, ο οποίος όχι μόνο μου επέτρεψε, ως Διευθυντής του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ όταν ξεκίνησα τη διατριβή, αλλά και με παρότρυνε, ως μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής, να εκπονήσω αυτήν την εργασία. Με το πηγαίο χαμόγελο του και την πάντα θετική του διάθεση ομόρφαινε την απαιτητική δουλειά στο Εργαστήριο τα μακρά απογεύματα και τα Σαββατοκύριακα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον νυν Διευθυντή του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, Καθηγητή Κωνσταντίνο Πάντο, που δέχτηκε να επιβλέψει αυτήν τη μελέτη, καθώς και για την υποστήριξη και τη βοήθειά του σε ό,τι έχω χρειαστεί.

Επίσης, θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας Ιορδάνη Μουρούζη για την παροχή γνώσεων και συμβουλών και για το χρόνο που μου έχει διαθέσει κατά την εκπόνηση αυτής της διατριβής, ως μέλους της Συμβουλευτικής Επιτροπής.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Αικατερίνη Τυλιγάδα για την παραχώρηση του πειραματικού προτύπου και για την ανεκτίμητη και αστείρευτη προσφορά γνώσης και τεχνογνωσίας στη διάρκεια της διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου τη διδάκτορα της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ Μαρία Κακολύρη που όλα αυτά τα χρόνια στεκόταν δίπλα μου στο Εργαστήριο, με στήριζε όταν απελπιζόμουν, με βοήθησε με τις επιστημονικές της γνώσεις και με δίδαξε πολλά.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

[Ca ²⁺] _i	ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca ²⁺
A ₆₂₀	απορρόφηση (Absorbance) στα 620 nm
adh	αλκοολική αφυδρογονάση (alcohol dehydrogenase)
ADP	διφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine DiPhosphate)
AMP	μονοφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine MonoPhosphate)
AMPK	πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από την AMP (AMP-activated protein kinase)
Ath	όξινη τρεαλάση (Acid trehalase)
ATP	τριφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine TriPhosphate)
Bcl	λέμφωμα B κυττάρων (B-cell lymphoma)
cdk	κυκλινοεξαρτώμενη κινάση (cyclin-dependent kinase)
CFU	μονάδες με ικανότητα σχηματισμού αποικιών (Colony Forming Unit)
conc H ₂ SO ₄	πυκνό (concentrated) H ₂ SO ₄
CYP	κυτόχρωμα P ₄₅₀
Cyt c	κυτόχρωμα c (Cytochrome complex)
<i>d.f.</i>	βαθμοί ελευθερίας (degrees of freedom)
d.H ₂ O	απιονισμένο νερό (distilled water)
DBCT	διβουτυλοχλωρομεθυλοκασσίτερος (DiButylChloromethylTin)
DBT	διβουτυλοκασσίτερος (DiButylTin)
DMSO	διμεθυλοσουλφοξείδιο (DiMethylSulfOxide)
DMT	διμεθυλοκασσίτερος (DiMethylTin)
e ⁻	ηλεκτρόνιο
ECHA	European Chemicals Agency
ED	ενδοκρινικός διαταράκτης (Endocrine Disruptor)
eNOS	ενδοθηλιακή συνθάση του NO (endothelial Nitric Oxide Synthase)
ER	υποδοχέας οιστρογόνων (Estrogen Receptor)
ERK	κινάση ρυθμιζόμενη από εξωκυτταρικά μηνύματα (extracellular signal regulated kinase)
F ATPάση	τύπου F (energy-coupling Factor) ATPάση (F ₁ F _o ATP συνθάση)
F ₁	μη ενσωματωμένο στη μεμβράνη τμήμα της ATP συνθάσης
F _o	ενσωματωμένο στη μεμβράνη τμήμα της ATP συνθάσης

Glc-6-P	6-φωσφορική γλυκόζη (glucose 6-phosphate)
glk	γλυκοκινάση (glucokinase)
Gph	φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Glycogen phosphorylase)
HSP	πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας (Heat Shock Protein)
hvk	εξοκινάση (hexokinase)
IC ₅₀	μέση ανασταλτική πυκνότητα (median inhibitory concentration)
ID ₅₀	μέση ανασταλτική δόση (median inhibitory dose)
IMO	διεθνής οργανισμός ναυσιπλοΐας (International Maritime Organisation)
LC ₅₀	μέση θανατηφόρος πυκνότητα (median lethal concentration)
MAPK	πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MB	κυανούν του μεθυλενίου (Methylene Blue)
MDR	αντίσταση σε πολλαπλά φάρμακα (MultiDrug Resistance)
MIC	Ελάχιστη Ανασταλτική Πυκνότητα (MIC, Minimum Inhibitory Concentration, ΕΑΠ)
MMT	μονομεθυλοκασσίτερος (MonoMethylTin)
M _r	Μοριακή μάζα (Molar mass)
MVB	πολυκυστικό σώμα (MultiVesicular Body)
NADPH	αναχθέν φωσφορικό νικοτιναμιδιο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)
NK	κύτταρα «φυσικοί δολοφόνοι» (Natural Killer)
NO	μονοξειδίο του αζώτου (Nitric Oxide)
Nth	ουδέτερη τρεχαλάση (Neutral trehalase)
P	φωσφορικό (phosphate)
pdv	πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση (pyruvate decarboxylase)
Pdr	πρωτεΐνη αντίστασης σε πολλαπλά φάρμακα (Pleiotropic drug resistance)
P-gp	P-γλυκοπρωτεΐνη (P-glycoprotein)
P _i	ανόργανο φωσφορικό ιόν (inorganic phosphate, HPO ₄ ²⁻)
PKA	πρωτεϊνική κινάση Α (Protein Kinase A)
PPAR	υποδοχέας που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστές των υπεροξεισωμάτων (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor)

PPi	ανόργανο πυροφωσφορικό (inorganic PyroPhosphate)
PVC	πολυβινυλοχλωρίδιο (PolyVinyl Chloride)
Q	συνένζυμο Q
RAR	υποδοχέας του ρετινοϊκού οξέος (Retinoic Acid Receptor)
ROS	δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species)
RXR	υποδοχέας X ρετινοειδών (Retinoid X Receptor)
SEM	τυπικό σφάλμα (Standard Error of the Mean)
TBT	τριβουτυλοκασσίτερος (TriButylTin)
TBTO	οξειδίο του δισ(τριβουτυλοκασσίτερου) [bis(tributyltin)oxide]
TCA	τρικαρβοξυλικού οξέος (TriCarboxylic Acid)
TCAc	τριχλωροξικό οξύ (TriChloroAcetic acid)
Td	χρόνος διπλασιασμού (doubling Time)
TET	τριαιθυλοκασσίτερος (TriEthylTin)
TMT	τριμεθυλοκασσίτερος (TriMethylTin)
TNF	παράγοντας νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor)
TOR	στόχος της ραπαμυκίνης (Target Of Rapamycin)
TPhT	τριφαινυλοκασσίτερος (TriPhenylTin)
tps1	συνθάση της 6-φωσφορικής τρεαλόζης (trehalose 6-phosphate synthase)
tps2	φωσφατάση της 6-φωσφορικής τρεαλόζης (trehalose 6-phosphate phosphatase)
UDP	διφωσφορική ουριδίνη (Uridine DiPhosphate)
UDP-G	διφωσφορική ουριδινο-γλυκόζη (Uridine DiPhosphate Glucose)
UTP	τριφωσφορική ουριδίνη (Uridine TriPhosphate)
V ATPάση	κενοτοπιακή H ⁺ ATPάση (Vacuolar proton-translocating ATPase, V ATPase)
V ₀	ενσωματωμένο στη μεμβράνη τμήμα της V ATPάσης
V ₁	μη ενσωματωμένο στη μεμβράνη τμήμα της V ATPάσης
Vps	κενοτοπιακή διαλογή πρωτεϊνών (Vacuolar protein sorting)
YA	στερεό θρεπτικό υλικό (Yeast Agar)
YAG	στερεό θρεπτικό υλικό γλυκερόλης (Yeast Agar Glycerol)
YB	υγρό θρεπτικό υλικό (Yeast Broth)
Yca1p	κασπάση ζύμης (Yeast caspase)

Tre-6-P	6-φωσφορική τρεαλόζη (trehalose 6-phosphate)
ΔρΗ	βαθμίδα pH
ΔΨ	διαφορά μεμβρανικού δυναμικού
δ/α	δεν ανιχνεύεται
Δ/Ε	δεν εφαρμόζεται
ΕΑΠ	Ελάχιστη Ανασταλτική Πυκνότητα (MIC, Minimum Inhibitory Concentration)
ΕΕ	Ευρωπαϊκή Ένωση
ΕΜΠ	Ελάχιστη Μυκητοκτόνος Πυκνότητα (MFC, Minimum Fungicidal Concentration)
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΜΟ	μέσος όρος
Π.Ο.Υ.	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO, World Health Organization)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	IV
ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ	VII
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	IX
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	XVI
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	XIX
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
1.1. Κύρια χαρακτηριστικά του τριβουτυλοκασσίτερου (TBT).....	2
1.1.1 Σχέση δομής-τοξικότητας	5
1.1.2 Μεταβολισμός του TBT	9
1.2. Βιολογικές δράσεις του TBT	10
1.2.1. Ο TBT ως ενδοκρινικός διαταράκτης.....	10
1.2.2. Δράση του TBT στον μεταβολισμό της γλυκόζης	11
1.2.3. Δράση του TBT στα αγγεία.....	13
1.2.4. Δράση του TBT στο ανοσοποιητικό σύστημα.....	14
1.2.5. Φαρμακολογικές δράσεις του TBT	15
1.3. Χαρακτηριστικά του <i>S. cerevisiae</i>	16
1.3.1. Ο <i>S. cerevisiae</i> ως πειραματικό πρότυπο.....	16
1.3.2. Ο κυτταρικός κύκλος του <i>S. cerevisiae</i>	17
1.3.3. Αποικίες Petite	20
1.3.4. Ήπιο και οξύ κυτταρικό stress.....	21
1.3.5. Δομή και λειτουργία των κενωτοπίων.....	22
1.3.6. Μεταβολισμός σακχάρων στον <i>S. cerevisiae</i>	26
1.4. Επίδραση του TBT στον σακχαρομύκητα	33
1.4.1. Αλληλεπίδραση με την F_1F_0 ATP συνθάση.....	33
1.4.2. Αλληλεπίδραση με τη V ATPάση.....	37
1.4.3. Αλληλεπίδραση με την εξοκινάση II	37
1.4.4. Επίδραση στην ανάπτυξη και την επιβίωση	39
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
ΣΚΟΠΟΣ	42
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	43
2.1. ΥΛΙΚΑ.....	43
2.1.1. Στέλεχος του σακχαρομύκητα	43
2.1.2. Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια	43
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	46
2.2.1. Διάλυση του τριβουτυλοκασσίτερου (TBT)	46
2.2.2. Συντήρηση του σακχαρομύκητα	46
2.2.3. Καλλιέργεια του σακχαρομύκητα	47
2.2.4. Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής και ελάχιστης μυκητοκτόνου πυκνότητας.....	47
2.2.5. Χρώση των κυττάρων του σακχαρομύκητα.....	49
2.2.6. Προσδιορισμός της ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης του σακχαρομύκητα	50
2.2.7. Προσδιορισμός της ικανότητας σχηματισμού αποικιών	52
2.2.8. Έλεγχος μεταλλάξεων petite	52
2.2.9. Προσδιορισμός του χρόνου διπλασιασμού του σακχαρομύκητα	53

2.2.10.	Έκθεση του σακχαρομύκητα στον TBT.....	53
2.2.11.	Προσδιορισμός της μέσης ανασταλτικής (ID_{50}) και μέσης θανατηφόρου (LD_{50}) δόσης.....	54
2.2.12.	Προεπάωση με TBT.....	55
2.2.13.	Δειγματοληψία.....	55
2.2.14.	Προσδιορισμός των επιπέδων σακχάρων.....	56
2.3.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	61
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	63
3.1.	Ανάπτυξη, πολλαπλασιασμός και επιβίωση του <i>S. cerevisiae</i> ATCC 2366.....	63
3.2.	Επίδραση του DMSO στις καλλιέργειες του <i>S. cerevisiae</i>	65
3.2.1.	Εφ' άπαξ χορήγηση DMSO.....	65
3.2.2.	Επαναλαμβανόμενη χορήγηση DMSO.....	68
3.3.	Χρόνος διπλασιασμού του <i>S. cerevisiae</i>	70
3.4.	ΕΑΠ και ΕΜΠ του TBT στον <i>S. cerevisiae</i>	72
3.5.	Εφ' άπαξ χορήγηση του TBT στη λανθάνουσα φάση.....	73
3.5.1.	Επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στην ανάπτυξη του σακχαρομύκητα.....	73
3.5.2.	Επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στην επιβίωση του σακχαρομύκητα.....	75
3.5.3.	Επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στον πολλαπλασιασμό του σακχαρομύκητα.....	77
3.5.4.	Εμφάνιση άτυπων κυττάρων υπό την επίδραση TBT.....	79
3.5.5.	Επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στον χρόνο διπλασιασμού του σακχαρομύκητα.....	81
3.5.6.	Ικανότητα σχηματισμού αποικιών και έλεγχος μεταλλάξεων <i>petite</i>	82
3.5.7.	Δοσοεξαρτώμενη επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στον σακχαρομύκητα.....	85
3.5.8.	ID_{50} και ID_{99} κατά τη χορήγηση TBT στη λανθάνουσα φάση.....	90
3.5.9.	LD_{50} και LD_{99} κατά τη χορήγηση TBT στη λανθάνουσα φάση.....	91
3.6.	Εφ' άπαξ χορήγηση του TBT στη λογαριθμική φάση.....	95
3.6.1.	Επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στα χαρακτηριστικά του σακχαρομύκητα.....	95
3.6.2.	Επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στον χρόνο διπλασιασμού του σακχαρομύκητα.....	98
3.6.3.	ID_{50} και ID_{99} κατά τη χορήγηση TBT στη λογαριθμική φάση.....	99
3.6.4.	LD_{50} και LD_{99} κατά τη χορήγηση TBT στη λογαριθμική φάση.....	100
3.7.	Επαναλαμβανόμενη χορήγηση του TBT στην λογαριθμική φάση.....	102
3.7.1.	Συσσωρευτική επίδραση του TBT στη λογαριθμική φάση.....	105
3.7.2.	Οξεία επίδραση του TBT στη λογαριθμική φάση.....	107
3.7.3.	Κυτταρικοί υποπληθυσμοί στη λογαριθμική φάση.....	108
3.7.4.	Κυτταρικοί υποπληθυσμοί στη μεταλογαριθμική φάση.....	110
3.8.	Χορήγηση TBT στη στάσιμη φάση.....	112
3.8.1.	Εφ' άπαξ χορήγηση του TBT στη στάσιμη φάση.....	112
3.8.2.	Επαναλαμβανόμενη χορήγηση του TBT στη στάσιμη φάση.....	112
3.9.	Προεπάωση με υποτοξικές δόσεις TBT.....	117
3.9.1.	Προεπάωση του σακχαρομύκητα επί 3 h.....	117
3.9.2.	Προεπάωση του σακχαρομύκητα επί 72 h.....	119

3.10. Μεταβολικό προφίλ του σακχαρομύκητα	121
3.10.1. Φυσιολογικά επίπεδα σακχάρων στον <i>S. cerevisiae</i>	121
3.10.2. Επίδραση του DMSO στα επίπεδα σακχάρων.....	122
3.10.3. Επίπεδα σακχάρων υπό την επίδραση του TBT.....	124
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	129
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	137
SUMMARY	138
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	139
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	161

Περιεχόμενα Εικόνων

	Σελ.	
Εικόνα 1.1	Χημική δομή του χλωριούχου τριβουτυλοκασσίτερου	2
Εικόνα 1.2	Μεταφορά των οργανοκασσιτερικών ενώσεων στον άνθρωπο	4
Εικόνα 1.3	Χημική δομή ενδεικτικών οργανοκασσιτερικών ενώσεων	6
Εικόνα 1.4	Σχηματική παρουσίαση του κυτταρικού κύκλου του <i>S. cerevisiae</i>	18
Εικόνα 1.5	Μεταβολικές οδοί και δομή των σακχάρων στον <i>S. cerevisiae</i>	29
Εικόνα 1.6	Απλοποιημένο διάγραμμα των κυτταρικών στοιχείων και διεργασιών που αποτελούν στόχο των οργανοκασσιτερικών ενώσεων στον σακχαρομύκητα	35
Εικόνα 2.1	Διαδικασία προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής (ΕΑΠ) και της ελάχιστης μυκητοκτόνου (ΕΜΠ) πυκνότητας	48
Εικόνα 2.2	Προσδιορισμός ανάπτυξης του σακχαρομύκητα με αιματοκυτόμετρο Neubauer	51
Εικόνα 2.3	Αντίδραση της γλυκόζης με την ανθρόνη	56
Εικόνα 2.4	Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης στα δείγματα	60
Εικόνα 3.1	Γραφική απεικόνιση της της καμπύλης ανάπτυξης του <i>S. cerevisiae</i>	64
Εικόνα 3.2	Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης DMSO στην ανάπτυξη του <i>S. cerevisiae</i>	66
Εικόνα 3.3	Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης DMSO στον πολλαπλασιασμό του <i>S. cerevisiae</i>	66
Εικόνα 3.4	Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης DMSO στην επιβίωση του <i>S. cerevisiae</i>	67
Εικόνα 3.5	Συσχέτιση μεταξύ των CFUs και του αριθμού των κυττάρων που μετρήθηκαν μικροσκοπικά στις αντίστοιχες καλλιέργειες	68
Εικόνα 3.6	Επίδραση της επαναλαμβανόμενης χορήγησης DMSO στην ανάπτυξη του <i>S. cerevisiae</i>	69
Εικόνα 3.7	Χρόνος διπλασιασμού (Td) του <i>S. cerevisiae</i> ATCC 2366 κατά την εκθετική φάση της ανάπτυξης	70
Εικόνα 3.8	Ελάχιστη ανασταλτική (ΕΑΠ) και μυκητοκτόνος (ΕΜΠ) πυκνότητα του TBT	72
Εικόνα 3.9	Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στην ανάπτυξη του <i>S. cerevisiae</i>	73
Εικόνα 3.10	Ανάπτυξη του <i>S. cerevisiae</i> μετά από εφ' άπαξ χορήγηση TBT κατά τη λανθάνουσα φάση	74
Εικόνα 3.11	Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στην επιβίωση του <i>S. cerevisiae</i>	76
Εικόνα 3.12	Επιβίωση του <i>S. cerevisiae</i> μετά από εφ' άπαξ χορήγηση TBT στη λανθάνουσα φάση	77

Εικόνα 3.13	Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στον πολλαπλασιασμό του <i>S. cerevisiae</i>	78
Εικόνα 3.14	Πολλαπλασιασμός του <i>S. cerevisiae</i> μετά από εφ' άπαξ χορήγηση TBT στη λανθάνουσα φάση	79
Εικόνα 3.15	Επίδραση στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του <i>S. cerevisiae</i> της εφ' άπαξ χορήγησης TBT στη λανθάνουσα φάση	80
Εικόνα 3.16	Μικροσκοπική εικόνα κυττάρων του σακχαρομύκητα	81
Εικόνα 3.17	Επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στον Td του <i>S. cerevisiae</i>	82
Εικόνα 3.18	Συσχέτιση CFUs και αριθμού κυττάρων σε καλλιέργειες που επώαστηκαν απουσία ή παρουσία TBT	83
Εικόνα 3.19	Ενδεικτική μακροσκοπική εικόνα CFUs του <i>S. cerevisiae</i>	84
Εικόνα 3.20	Ενδεικτική μακροσκοπική εικόνα ανάπτυξης διαφορετικού μεγέθους αποικιών του <i>S. cerevisiae</i> σε YA και YAG	85
Εικόνα 3.21	Δοσοεξαρτώμενη επίδραση του TBT στα χαρακτηριστικά του <i>S. cerevisiae</i>	87
Εικόνα 3.22	Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στην αναλογία των ζωντανών κυτταρικών υποπληθυσμών του <i>S. cerevisiae</i>	88
Εικόνα 3.23	Επίδραση του TBT στα διαιρούμενα ζωντανά κύτταρα του <i>S. cerevisiae</i> σε διάφορες φάσεις της ανάπτυξης	89
Εικόνα 3.24	ID ₅₀ και ID ₉₉ μετά από τη χορήγηση TBT στη λανθάνουσα φάση	91
Εικόνα 3.25	LD ₅₀ και LD ₉₉ μετά από χορήγηση TBT στη λανθάνουσα φάση	92
Εικόνα 3.26	Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στα χαρακτηριστικά του <i>S. cerevisiae</i>	96
Εικόνα 3.27	Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBT κατά λογαριθμική φάση στην αναλογία των ζωντανών κυτταρικών υποπληθυσμών του <i>S. cerevisiae</i>	97
Εικόνα 3.28	Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBT κατά λογαριθμική φάση στα διαιρούμενα και μη διαιρούμενα ζωντανά κύτταρα του <i>S. cerevisiae</i>	98
Εικόνα 3.29	Επίδραση της χορήγησης TBT κατά λογαριθμική φάση στον Td του <i>S. cerevisiae</i>	99
Εικόνα 3.30	ID ₅₀ και ID ₉₉ κατά τη χορήγηση του TBT στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης του <i>S. cerevisiae</i>	100
Εικόνα 3.31	LD ₅₀ και LD ₉₉ κατά τη χορήγηση του TBT στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης του <i>S. cerevisiae</i>	101
Εικόνα 3.32	Επίδραση της εφ' άπαξ και της επαναλαμβανόμενης χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στην ανάπτυξη του <i>S. cerevisiae</i>	102
Εικόνα 3.33	Επίδραση της εφ' άπαξ και της επαναλαμβανόμενης χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στην επιβίωση του <i>S. cerevisiae</i>	104

Εικόνα 3.34	Επίδραση της εφ' άπαξ και της επαναλαμβανόμενης χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στον πολλαπλασιασμό του <i>S. cerevisiae</i>	105
Εικόνα 3.35	Επίδραση της εφ' άπαξ και της επαναλαμβανόμενης χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στην αναλογία διάφορων υποπληθυσμών κυττάρων του <i>S. cerevisiae</i>	107
Εικόνα 3.36	Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBT κατά τη στάσιμη φάση στα χαρακτηριστικά του <i>S. cerevisiae</i>	113
Εικόνα 3.37	Επίδραση της επαναλαμβανόμενης χορήγησης TBT κατά τη στάσιμη φάση στα χαρακτηριστικά του <i>S. cerevisiae</i>	114
Εικόνα 3.38	Επίδραση στα χαρακτηριστικά του <i>S. cerevisiae</i> της επαναλαμβανόμενης χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση σε προεπωασμένες με TBT καλλιέργειες επί 3 h	118
Εικόνα 3.39	Επίδραση της χρόνιας προεπάσης με υποτοξικές δόσεις TBT στα χαρακτηριστικά του <i>S. cerevisiae</i>	120
Εικόνα 3.40	Ενδοκυττάρια επίπεδα σακχάρων κατά την πορεία ανάπτυξης του <i>S. cerevisiae</i>	122
Εικόνα 3.41	Επίδραση του DMSO στα επίπεδα σακχάρων στον <i>S. cerevisiae</i>	123
Εικόνα 3.42	Επίδραση του TBT στα ενδοκυττάρια επίπεδα γλυκόζης στον <i>S. cerevisiae</i>	125
Εικόνα 3.43	Επίδραση του TBT στα ενδοκυττάρια επίπεδα τρεαλόζης στον <i>S. cerevisiae</i>	126
Εικόνα 3.44	Επίδραση του TBT στα ενδοκυττάρια επίπεδα γλυκογόνου στον <i>S. cerevisiae</i>	127

Περιεχόμενα Πινάκων

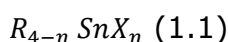
	Σελ.
Πίνακας 1.1 Φυσικές και χημικές ιδιότητες του TBT	3
Πίνακας 2.1 Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια	44
Πίνακας 2.2 Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών	44
Πίνακας 2.3 Θρεπτικά υλικά και διαλύματα	45
Πίνακας 2.4 Δειγματοληψία καλλιέργειας για τη μέτρηση των σακχάρων	58
Πίνακας 3.1 Μεταβολές στην εκατοστιαία αναλογία των κυτταρικών υποπληθυσμών κατά την έκθεση του σακχαρομύκητα στον TBT στην εκθετική φάση της ανάπτυξης.	110

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Κύρια χαρακτηριστικά του τριβουτυλοκασσίτερου (TBT)

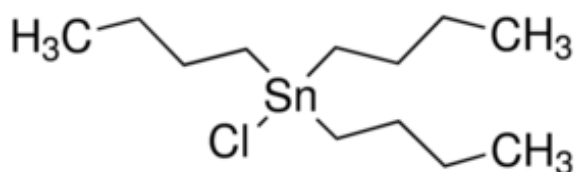
Ο τριβουτυλοκασσίτερος (TBT) ανήκει στις οργανομεταλλικές ενώσεις με κεντρικό μεταλλικό άτομο κασσίτερου, που έχουν τη γενική μορφή (1.1)



όπου $n = 1-3$, R = αλκύλιο ή αρύλιο που συνδέεται με ομοιοπολικό δεσμό με τον κασσίτερο, X = ανιόν (οξυγόνο ή συνηθέστερα αλογόνο).

Στην οικογένεια των οργανοκασσιτερικών (organotin $R_{4-n}SnX_n$) ενώσεων υπάγονται οι μονοοργανοκασσιτερικές ($RSnX_3$), οι δυοοργανοκασσιτερικές (R_2SnX_2), οι τριοργανοκασσιτερικές (R_3SnX) και οι τετραοργανοκασσιτερικές (R_4Sn) ενώσεις (Thoonen *et al.*, 2004)

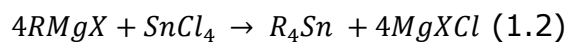
Ο χλωριούχος TBT (Εικόνα 1.1) σχηματίζεται με ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ τριών βουτυλομάδων και του κασσίτερου (Thoonen *et al.*, 2004).



Εικόνα 1.1. Χημική δομή του χλωριούχου τριβουτυλοκασσίτερου.

Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις δεν υπάρχουν ελεύθερες στη φύση εκτός από τις μεθυλοκασσιτερικές, οι οποίες μπορούν να παραχθούν από βιομεθυλίωση (Guard *et al.*, 1981 · Hoch, 2001).

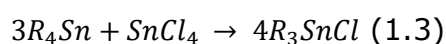
Παρασκευάζονται με αντιδράσεις Grignard, χρησιμοποιώντας κατάλληλο αντιδραστήριο Grignard (RMgX) και τετραχλωριούχο κασσίτερο (Thoonen *et al.*, 2004) (1.2)



όπου R = επιθυμητή αλκυλομάδα, X = αλογόνο (Cl, Br, I)

Η αντίδραση γίνεται σε συμβατό διαλύτη, όπως ο διαιθυλαιθέρας, ο διβουτυλαιθέρας ή το τετραϋδροφουράνιο, με περίσσεια αντιδραστηρίου Grignard ώστε να γίνει πλήρης υποκατάσταση.

Στη συνέχεια το τετραϋποκατεστημένο οργανοκασσιτερικό παράγωγο αντιδρά σύμφωνα με την αντίδραση ανακατανομής Kocheshkon (1.3), η οποία πραγματοποιείται χωρίς διαλύτη σε θερμοκρασία 100-200 °C (Thoonen *et al.*, 2004)



Οι ιδιότητες του TBT παρουσιάζονται στην Πίνακα 1.1. Ο TBT σε υδατικά διαλύματα ιονίζεται με pKa 6.25 (Meador, 2002).

Πίνακας 1.1. Φυσικές και χημικές ιδιότητες του TBT (Pubchem, 2020).

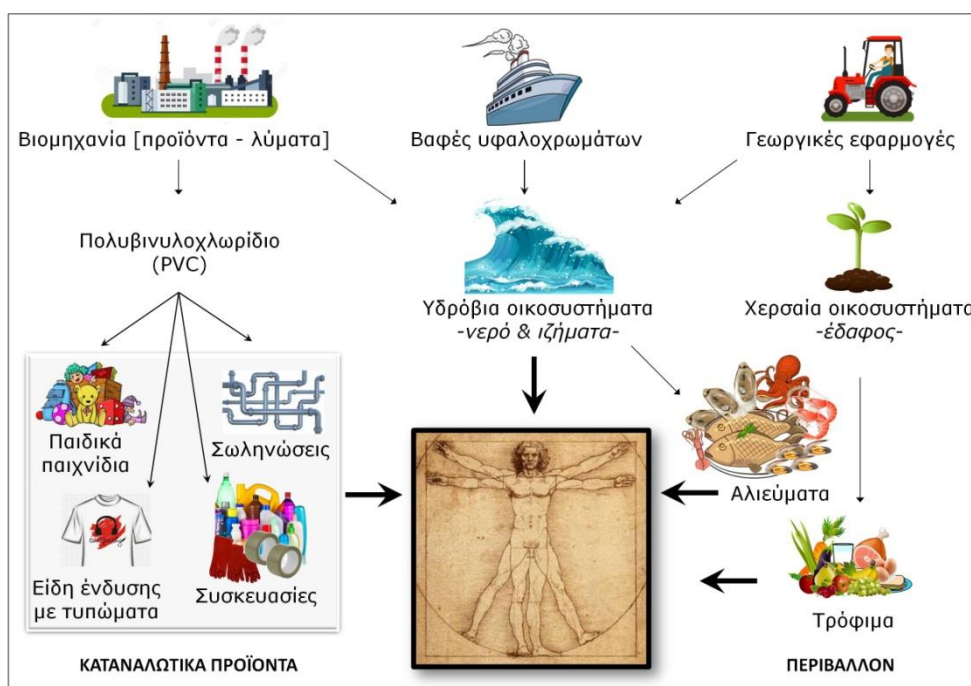
Μοριακό βάρος	325,5 g/mol
Φυσική κατάσταση	Άχρωμο υγρό
Σημείο ζέσεως	171-173 °C/25mm Hg
Διαλυτότητα	Διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες (αλκοόλη, επάνιο, βενζόλιο, τολουόλιο, DMSO) Αδιάλυτο στο νερό
Πυκνότητα	1,20 g/cm ³ (20°C)
Δείκτης διάθλασης	1.490 (25°C)

DMSO, διμεθυλοσουλφοξείδιο

Ο TBT είναι δραστικό συστατικό σε βιοκτόνα προϊόντα που στοχεύουν σε ευρύ φάσμα οργανισμών (Antizar-Ladislao, 2008). Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε βαφές υφαλοχρωμάτων λόγω της

αντιαποθετικής του δράσης (antifouling) και ως συντηρητικό ξύλου (Antizar-Ladislao, 2008).

Η δράση των βαφών υφαλοχρωμάτων βασίζεται στη συνεχή έκλυση δραστικού οργανοκασσιτερικού συστατικού, κυρίως TBT, κατά την επαφή τους με το θαλασσινό νερό. Αυτό απορροφάται ταχύτατα από τους θαλάσσιους οργανισμούς (Gadd, 2000) και τα φύκια (Luan *et al.*, 2006) και μέσω της τροφικής αλυσίδας φτάνει και στον άνθρωπο (Εικόνα 1.2) (Harino *et al.*, 1998 · Borghi and Porte, 2002 · Berge *et al.*, 2004).



Εικόνα 1.2. Μεταφορά των οργανοκασσιτερικών ενώσεων στον άνθρωπο.

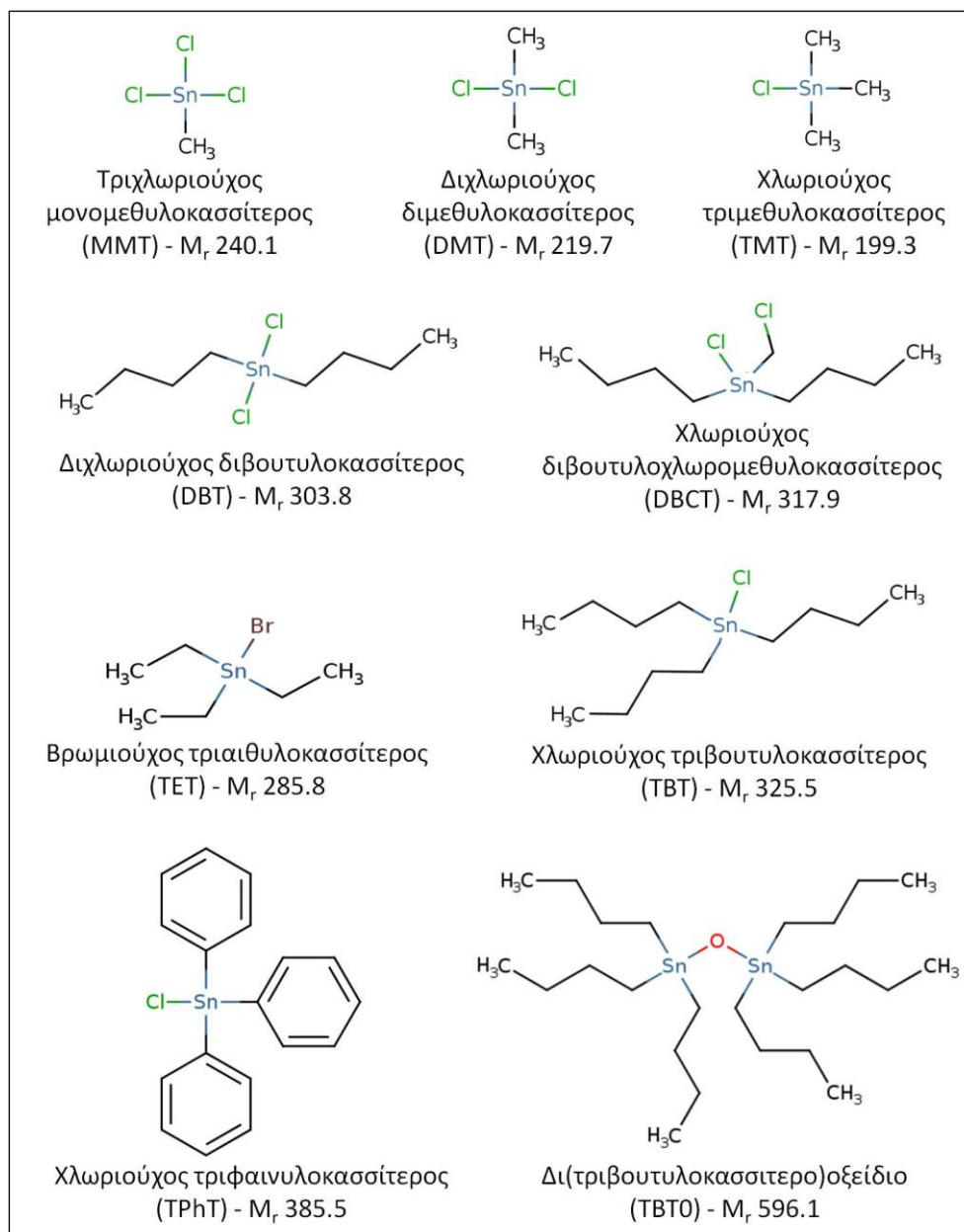
Οι πρώτες υποψίες για την τοξική δράση του TBT δημιουργήθηκαν τη δεκαετία του 1970, όταν αναφέρθηκε το φαινόμενο της επιβολής αρσενικών χαρακτηριστικών σε θηλυκά γαστρόποδα (*imposex*), το οποίο αποδόθηκε κυρίως στη δράση του TBT (Smith, 1981). Το 1990 ο Διεθνής Οργανισμός Ναυσιπλοΐας (IMO, International Maritime

Organisation) ζήτησε από τις κυβερνήσεις των χωρών-μελών του την απόσυρση του TBT από τις βαφές υφαλοχρωμάτων (IMO, 2020).

Επίσης, ο TBT χρησιμοποιήθηκε στην παραγωγή και σταθεροποίηση του πολυβινυλοχλωριδίου (PVC), και αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη χρήση του TBT σε τυπωμένα υφάσματα και σε παιδικά παιχνίδια (Hoch, 2001 · Fent *et al.*, 2006). Η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) θέσπισε τον Κανονισμό 1907/2006, στο παράρτημα XVII του οποίου θέτει ισχυρούς περιορισμούς στη χρήση και διάθεση προϊόντων που περιέχουν οργανοκασσιτερικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένου του TBT (ECHA – European Chemicals Agency, 2019). Η θέσπιση αυστηρών ορίων για τη χρήση των οργανοκασσιτερικών ενώσεων ως βιοκτόνων, και ειδικότερα για τον TBT, διευρύνθηκε με την Οδηγία 2009/48/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 18ης Ιουνίου 2009 σχετικά με την ασφάλεια των παιχνιδιών.

1.1.1 Σχέση δομής-τοξικότητας

Η τοξικότητα των οργανοκασσιτερικών ενώσεων (Εικόνα 1.3) ποικίλει σε πολύ μεγάλο βαθμό, από ιδιαίτερα τοξικές μέχρι μη τοξικές ενώσεις. Τοξικές δράσεις μπορούν να εκδηλωθούν μετά από πρόσληψη από το στόμα μέσω της τροφής, με εισπνοή, από το δέρμα ή από τους οφθαλμούς (Cornelis *et al.*, 2005 · Antizar-Ladislao, 2008).



Εικόνα 1.3. Χημική δομή ενδεικτικών οργανοκασσιτερικών ενώσεων. M_r : μοριακή μάζα (<http://www.t3db.ca/toxins> 9/4/2020)

Από τις πρώτες τοξικολογικές μελέτες που έγιναν στη δεκαετία του 1880 σε μικρά ζώα (White, 1880 · Ungar and Bodländer, 1886) άρχισε να διαφαίνεται η επίδραση των αλκυλοκασσιτερικών ενώσεων, και κυρίως του τριαιθυλοκασσίτερου (TET) σε διάφορα συστήματα, συμπεριλαμβανομένης της νευροτοξικότητας στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) (Stoner *et al.*, 1955 · Rose and Aldridge, 1968 · Lock and Aldridge, 1975). Σταθμό στη διερεύνηση

των οργανοκασιτερικών ενώσεων απετέλεσε η διάθεση τους στο εμπόριο, το 1940-1942, και η συγκριτική μελέτη της βιολογικής δράσης μιας σειράς αλκυλοκασιτερικών ενώσεων που πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια του Medical Research Council στην Αγγλία και στο Πανεπιστήμιο της Τουλούζης στη Γαλλία με τη χρηματοδότηση από το *Tin Research Institute* (Stoner *et al.*, 1955 · Ingham *et al.*, 1960).

Η φύση του ηλεκτροαρνητικού υποκαταστάτη X (βλέπε τύπο 1.1) επηρεάζει κυρίως τις φυσικοχημικές ιδιότητες του μορίου, όπως είναι η διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα ή μη πολικούς διαλύτες, ενώ η βιολογική και τοξικολογική δράση του μορίου επηρεάζεται από το είδος και τον αριθμό των άλκυλο και άρυλο ομάδων (Dubey and Roy, 2003).

Το ηλεκτροαρνητικό τμήμα του μορίου δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα του (Van der Kerk and Kujjen, 1954), αν και υποκαταστάτες με μικρή σταθερά Taft σ^* (σταθερά πολικών υποκαταστατών που περιγράφει τον τρόπο με τον οποίο ένας υποκαταστάτης θα επηρεάσει μια αντίδραση μέσω πολικών επιδράσεων) αυξάνουν την τοξικότητά του (Huang *et al.*, 1997).

Γενικά, οι ενώσεις του TBT δίστανται ταχέως σε υδατικά διαλύματα και το κατιόν που σχηματίζεται αποτελεί τη χαρακτηριστική τοξική ομάδα (Lagadic *et al.*, 2018). Η επίδραση του οργανικού μέρους του μορίου (Εικόνα 1.3) στην τοξικότητα σχετίζεται με τη λιποφιλία (λιποφιλικότητα) του (Cooney and Wuertz, 1989). Όσο αυξάνεται η λιποφιλία της ένωσης τόσο πιο τοξική είναι, λόγω της ευκολότερης διέλευσής της μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και πρόσβασης στο εσωτερικό του κυττάρου (Cooney and Wuertz, 1989 · Huang *et al.*, 1997 · Jenkins *et al.*, 2004). Επειδή το μόριο διαθέτει ταυτόχρονα λιπόφιλες και πολικές ομάδες, οι οργανοκασιτερικές ενώσεις αλληλεπιδρούν μέσω ομοιοπολικών και μη ομοιοπολικών δεσμών με

τα βιομόρια, συμπεριλαμβανομένων των κυτταρικών μεμβρανών (Pagliarani, 2010). Οι δε μεταβολές που προκαλούνται στις βιοχημικές διεργασίες των οργανισμών συνδέονται με τη χημική δραστικότητα του μορίου (Saxena, 1987 · Appel, 2004).

Σημειώνεται ότι, ο συντελεστής κατανομής οκτανίου/ύδατος, ο οποίος δείχνει την λιποφιλία μιας ένωσης και ορίζεται ως ο λογάριθμος της αναλογίας των συγκεντρώσεων της ουσίας στα δύο διαλυτικά μέσα (Amézqueta, 2020) είναι 1,9 για τον διβουτυλοκασσίτερο (DBT), 0,3 για τον τριμεθυλοκασσίτερο (TMT), -1,1 για τον διμεθυλοκασσίτερο (DMT) και -1,29 για τον μονομεθυλοκασσίτερο (MMT) (Jenkins *et al.*, 2004).

Παρά τους περιοριστικούς κανονισμούς που έχουν θεσπιστεί από διάφορους οργανισμούς για τη χρήση και τη διάθεση προϊόντων που περιέχουν οργανοκασσιτερικές ενώσεις, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) δεν έχει αναθεωρήσει από το 1978 την αξιολόγηση των ενώσεων αυτών ως πρόσθετα τροφίμων (WHO, 1978). Στην αξιολόγηση αυτή αναφέρεται ότι δεν έχουν παρατηρηθεί σε ζώα καρκινογόνες ή τερατογόνες δράσεις των οργανοκασσιτερικών ενώσεων, ενώ δεν ήταν εφικτός ο προσδιορισμός της ημερήσιας ανεκτής δόσης στον άνθρωπο, για το σύνολο των ενώσεων, λόγω της μεγάλης διακύμανσης στην τοξικότητα τους. Σε μια επόμενη αναφορά του Π.Ο.Υ. στις τριβουτυλοκασσιτερικές ενώσεις, η οποία εστίασε κυρίως στο οξειδίο του δισ-τριβουτυλοκασσίτερου (TBTO), η αποδεκτή πρόσληψη TBT στον άνθρωπο υπολογίσθηκε σε 250 ng/kg/ημέρα (WHO, 1990 · WHO, 1999).

Η τοξικότητα των οργανοκασσιτερικών μορίων ακολουθεί τη σειρά $R_3SnX > R_2SnX_2 > RSnX_3$ (Van der Krek, 1954). Οι συμμετρικές ενώσεις που φέρουν τον ίδιο υποκαταστάτη R (Τύπος 1.1 · Εικόνα 1.3) εμφανίζουν καλύτερη συσχέτιση με την τοξικότητα σε σχέση με

τις ασύμμετρες που φέρουν διαφορετικούς υποκαταστάτες (Huang *et al.*, 1997).

Επίσης, το μήκος της αλυσίδας των οργανικών υποκαταστατών συσχετίζεται με την τοξικότητα. Όσο το μήκος αυξάνει τόσο μειώνεται η τοξικότητα (Cooney, 1995). Οι βουτυλο- υποκαταστάτες είναι πιο τοξικοί από τους φαινυλο- και αυτοί πιο τοξικοί από τους βενζυλο- υποκαταστάτες (Fargašová, 2002). Ο TMT και ο TET απορροφούνται εύκολα από το γαστρεντερικό, και είναι επίσης ισχυροί αναστολείς του κυτταρικού μεταβολισμού. Οι αρυλοκασιτερικές και οι αλκυλοκασιτερικές ενώσεις με περισσότερα άτομα C (Εικόνα 1.3) απορροφούνται ελάχιστα από το γαστρεντερικό και είναι λιγότερο τοξικές όταν χορηγούνται από το στόμα παρά παρεντερικά (WHO, 1978). Σε κύτταρα φαιοχρωμοκυτώματος αρουραίου PC12, οι συγκεντρώσεις των οργανοκασιτερικών μορίων στις οποίες εμφανίστηκε νευροτοξικότητα ήταν $DMT > TMT > DBT$ (μεταβολίτης του TBT), ενώ ο MMT δεν εμφάνισε νευροτοξικότητα (Jenkins *et al.*, 2004).

1.1.2. Μεταβολισμός του TBT

Ο χλωριούχος TBT σε υδατικό περιβάλλον διίσταται σε οργανοκασιτερικό κατιόν και ανιόντα χλωρίου. Ο μεταβολισμός του TBT γίνεται από το σύστημα μονοοξυγονασών του κυτοχρώματος P₄₅₀ (CYP) ηπατικών μικροσωματίων αρουραίου (Kimmel *et al.*, 1976 · Aldridge *et al.*, 1977). Σε μικροσώματα θηλαστικών φαίνεται να αλληλεπιδρά με διάφορες ισομορφές CYP, όπως το CYP1A σε ποντίκια (DeLong and Rice, 1997), αλλά και με τις αρωματάσες του CYP19A1 σε μικροσώματα αρουραίου και ανθρώπου (Heidrich *et al.*, 2001 · Cooke, 2002), προκαλώντας τελικά την αναστολή του ενζύμου. Ο μεταβολισμός του φαίνεται να είναι λιγότερο αποτελεσματικός σε ανθρώπινα μικροσώματα σε σχέση με τα

μικροσωμάτια αρουραίου και μάλιστα χωρίς να εμφανίζονται φυλετικές διαφορές (Ohhira *et al.*, 2003).

Ο TBT αρχικά υδροξυλιώνεται και σχηματίζονται α-, β-, γ-, δ-υδροξυβουτυλδιβουτυλοκασσιτερικές ενώσεις καθώς και γ-κετοβουτυλδιβουτυλοκασσίτερος (Kimmel *et al.*, 1976) με τις γ-υδρόξυ, δ-υδρόξυ και γ-κέτο ενώσεις να εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστικότητα, η οποία πιθανόν συνδέεται με την πολικότητα (Aldridge *et al.*, 1977). Στη συνέχεια ακολουθεί σταδιακή απομάκρυνση των οργανικών ομάδων μέχρι την παραγωγή SnX₄ (Aldridge *et al.*, 1977).

1.2. Βιολογικές δράσεις του TBT

1.2.1. Ο TBT ως ενδοκρινικός διαταράκτης

Ως ενδοκρινικοί διαταράκτες (EDs, endocrine disruptors) χαρακτηρίζονται φυσικές ή συνθετικές ενώσεις, οι οποίες παρεμβαίνουν στη σύνθεση, έκκριση, μεταφορά ή/και δέσμευση των φυσιολογικών ορμονών, οδηγώντας τον οργανισμό σε ομοιοστατική ανισορροπία (Kavlock *et al.*, 1996) . Οι EDs μπορούν να εισέλθουν στον οργανισμό με διάφορους τρόπους όπως, από το στόμα με την κατανάλωση μολυσμένων τροφών, κατά την επαφή με το δέρμα, διαμέσου της εισπνοής και διαμέσου του πλακούντα και του μητρικού θηλασμού (Kavlock *et al.*, 1996 · Endocrine Society, 2020).

Αν και ο TBT αναγνωρίστηκε ως ED πριν από αρκετές δεκαετίες, ωστόσο οι υποκείμενοι μηχανισμοί άρχισαν να διασαφηνίζονται μόλις την τελευταία δεκαετία (Lagadic *et al.*, 2018). Ένα από τα αποδεκτά χαρακτηριστικά του TBT είναι ότι οι αρνητικές συνέπειες του, κυρίως στους πληθυσμούς των θαλάσσιων οργανισμών, παρατηρούνται σε χαμηλές δόσεις. Για παράδειγμα, συγκεντρώσεις στο νερό στο εύρος του 1 ng/L έχουν αναφερθεί ότι προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές

(imposex) στο θαλάσσιο μαλάκιο *Nucella lapillus* (Bryan *et al.*, 2009), συγκεντρώσεις > 2 ng/L αναστέλλουν την ασβεστοποίηση στο στρείδι *Crassostrea gigas*, ενώ σε δεκαπλάσιες συγκεντρώσεις ο TBT είναι θανατηφόρος (Alzieu *et al.*, 2000).

Όσον αφορά τα θηλαστικά, ενδεικτικά αναφέρεται ότι, σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων αδενοκαρκινώματος μαστού MCF-7, χαμηλές δόσες χλωριούχου TBT έδρασαν ως αγωνιστές του υποδοχέα οιστρογόνων (ER)-α και προκάλεσαν αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της αρωματάσης και της παραγωγής οιστραδιόλης (Sharan *et al.*, 2013). Σημειώνεται ότι, η αρωματάση εντοπίζεται σε διάφορους ιστούς, όπως οι γονάδες, ο εγκέφαλος, ο λιπώδης ιστός, ο πλακούντας, το δέρμα και τα οστά, όπου καταλύει την αρωματοποίηση των ανδρογόνων σε οιστρογόνα και την παραγωγή οιστραδιόλης (Russell and Wilson, 1994). Η οιστρογονική δράση του TBT στα MCF-7 κύτταρα περιελάμβανε γενωμικές και μη γενωμικές αλληλεπιδράσεις, καθώς και συμμετοχή της ενεργοποιούμενης από μιτογόνα πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK) και φωσφορυλίωση της ρυθμιζόμενης από εξωκυτταρικά μηνύματα κινάσης (ERK) (Sharan *et al.*, 2013).

1.2.2. Δράση του TBT στον μεταβολισμό της γλυκόζης

Η δράση των περιβαλλοντικών ρύπων, και του TBT ιδιαιτέρως ως ED, υποστηρίζει την υπόθεση διατάραξης του μεταβολισμού. Δηλαδή, μεταβάλλοντας την ενδοκρινική λειτουργία, ορισμένες περιβαλλοντικές χημικές ουσίες μπορούν να προκαλέσουν μεταβολικές αλλαγές που σχετίζονται με παχυσαρκία, μειωμένο μεταβολισμό γλυκόζης και δυσλιπιδαιμία (Marques *et al.*, 2018), καθώς και με το μεταβολικό σύνδρομο, μια πολυπαραγοντική παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από τον συνδυασμό

παχυσαρκίας, δυσλιπιδαιμίας, διαβήτη τύπου 2 και υπέρταση (Kelly *et al.*, 2008 · Rubio-Ruíz *et al.*, 2014).

Η παρατήρηση ότι οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις (Εικόνα 1.3) δρουν ως υψηλής συγγένειας αγωνιστές σε συγκεκριμένους πυρηνικούς υποδοχείς, όπως οι υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πολλαπλασιαστές των υπεροξεισωμάτων (PPAR)γ και οι υποδοχείς X των ρετινοειδών (RXR) (Ahmadian *et al.*, 2013), παρέχει ενδείξεις που συνδέουν την έκθεση σε χαμηλές δόσεις (nM) οργανοκασσιτερικών ουσιών με τις διαταραχές της ομοιόστασης των λιπιδίων και του λιπώδους ιστού, σε βιοχημικό, γενωμικό και/ή επιγενετικό επίπεδο (Grün, 2014).

Πειράματα, κυρίως σε τρωκτικά, έδειξαν ότι ο TBT είναι οιστρογονικός αγωνιστής, ο οποίος, σε μικρές δόσεις, προκαλεί εναπόθεση λίπους και σε μεγαλύτερες εμφανίζει οιστρογονική δράση (Penza *et al.*, 2011 · Da Costa *et al.*, 2019). Ο TBT φαίνεται να επιδρά σε διάφορα όργανα σε ενήλικα ποντίκια, επηρεάζοντας τόσο τον λιπώδη ιστό όσο και την περιοχή του υποθαλάμου που ρυθμίζει την όρεξη, και μάλιστα με ισχυρά φυλετικό διμορφικό τρόπο (Farinetti *et al.*, 2018).

Σε θηλυκούς αρουραίους Wistar, στους οποίους χορηγήθηκαν 100 ng/kg/ημέρα TBT, εμφανίστηκε αύξηση του λιπώδους ιστού, ινσουλινοαντοχή, αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης και δυσλιπιδαιμία (Freitas-Lima *et al.*, 2018). Η δράση του TBT ήταν δόσοεξαρτώμενη και προτάθηκε η επίδρασή του στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (De Picoli Souza *et al.*, 2015 · Slamkova *et al.*, 2016 · Forrester *et al.*, 2018). Η έκθεση αρσενικών ποντικών σε TBT προκάλεσε διαταραχή στον ηπατικό μεταβολισμό της γλυκόζης (Jing *et al.*, 2019)

Επίσης, σε μια πιο πρόσφατη μελέτη παρατηρήθηκε δυσλειτουργία της ινσουλίνης και διαταραχή της ομοιόστασης της γλυκόζης σε

ποντικούς που εκτέθηκαν σε χαμηλές, μη κυτταροτοξικές δόσεις TBT για 3 εβδομάδες (Chen *et al.*, 2017). Τα δεδομένα έδειξαν ότι οι δράσεις του TBT μεσολαβούνται στα παγκρεατικά β κύτταρα από ERs και/ή από οδούς που ρυθμίζουν το οξειδωτικό στρες (Chen *et al.*, 2017).

Στον άνθρωπο, ο TBT έχει συνδεθεί με τοξικότητα κατά την ανάπτυξη (Kotake, 2012). Η ύπαρξη TBT στον πλακούντα κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης σχετίστηκε με αυξημένο βάρος των αρσενικών νεογνών κατά το πρώτο τρίμηνο μετά τον τοκετό (Rantakokko *et al.*, 2014). Επίσης, η αναστολή της ανάπτυξης στα ανθρώπινα πολυδύναμα εμβρυονικά καρκινικά κύτταρα NT2/D1 κατά την έκθεση σε 100 nM (~30 ng/mL) TBT αποδόθηκε στη μεταβολή της γλυκολυτικής διεργασίας (Yamada *et al.*, 2013). Συγκεκριμένα, η έκθεση των κυττάρων NT2/D1 στον TBT ανέστειλε την πρόσληψη της γλυκόζης, μέσω αναστολής της εξαρτώμενης από την πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από την AMP (AMPK) μετατόπισης στην κυτταρική επιφάνεια του μεταφορέα της γλυκόζης GLUT1 (Yamada *et al.*, 2013).

1.2.3. Δράση του TBT στα αγγεία

Χορήγηση χαμηλών δόσεων TBT σε αρουραίους προκάλεσε αλλαγές στη αγγειακή λειτουργία στην αορτή (Rodrigues *et al.*, 2014 · Ximenes *et al.*, 2017), στις μεσεντερικές (Ribeiro *et al.*, 2016) και στις στεφανιαίες αρτηρίες (Santos *et al.*, 2012), ατροφία των λείων μυικών ινών, αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου και συσσώρευση ινώδους (Santos *et al.*, 2012 · Rodrigues *et al.*, 2014 · Ribeiro *et al.*, 2016 · Ximenes *et al.*, 2017). Ο TBT φαίνεται να επάγει το οξειδωτικό stress μέσω παραγωγής στα αγγεία υπεροξειδικών ανιόντων από την οξειδάση του NADPH (αναχθέν φωσφορικό νικοτιναμιδίο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο), και να μειώνει την παραγωγή

μονοξειδίου του αζώτου (NO) και την έκφραση της ενδοθηλιακής συνθάσης του NO (eNOS) (Chan and Baumbach, 2013 · Ronconi *et al.*, 2018).

Επίσης, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν τη γενωμική και μη γενωμική επίδραση του χλωριούχου TBT στη δραστικότητα και στην έκφραση των υποδοχέων της σεροτονίνης και της ισταμίνης στα αγγεία. Συγκεκριμένα, στην ανθρώπινη ομφαλική αρτηρία, το TBT προκάλεσε ταχεία δόσοεξαρτώμενη χάλαση *ex vivo*, ενώ μακροπρόθεσμα οδήγησε σε μείωση της έκφρασης των σεροτονινεργικών υποδοχέων 5-HT_{2A}, καθώς και των H₁ υποδοχέων της ισταμίνης (Glória *et al.*, 2018). Η ανθρώπινη ομφαλική αρτηρία είναι κρίσιμης σημασίας για τη μεταφορά των θρεπτικών υλικών από τον πλακούντα στο έμβρυο, και ρυθμίζεται από αγγειοδραστικές ουσίες που είτε παράγονται τοπικά είτε μεταφέρονται μέσω του αίματος, όπως η σεροτονίνη και η ισταμίνη (Tufan *et al.*, 2003 · Leung *et al.*, 2006).

1.2.4. Δράση του TBT στο ανοσοποιητικό σύστημα

Υπάρχουν ποικίλες αναφορές για δράσεις του TBT στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ο TBT προκαλεί απόπτωση σε ανθρώπινα ουδετερόφιλα, επιδρώντας στις κυταροσκελετικές πρωτεΐνες γελσολίνη, παξιλίνη και βιμεντίνη μέσω κασπασοεξαρτώμενου μηχανισμού (Lavastre and Girard, 2002).

Έκθεση των κυττάρων «φυσικών δολοφόνων» (NK, natural killer) σε TBT (200-300 nM) προκάλεσε αναστολή της δράσης τους έναντι των καρκινικών κυττάρων, πιθανώς μέσω μειωμένης έκφρασης των επιφανειακών αντιγόνων CD16 (FcγRIII), CD18 και CD56 (Whalen *et al.*, 2002). Επίσης, μείωσε την κυτταροτοξική δράση τους μέσω μεταγραφικής μείωσης των επιπέδων των κυτταροτοξικών πρωτεϊνών γράνζιμο Β και περφορίνη (Thomas *et al.*, 2004).

Ο TBT επηρέασε διαφορεικά την έκκριση του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF)-α από τα NK κύτταρα. Σε πληθυσμούς που αποτελούνταν κυρίως από κύτταρα NK μείωσε την έκκριση του TNF-α, χωρίς να μειώσει την επιβίωσή τους, ενώ σε πληθυσμούς που περιείχαν κι άλλους τύπους κυττάρων, όπως T κύτταρα, αυξήθηκε η έκκρισή του TNF-α, γεγονός που υποδεικνύει ότι διάφοροι τύποι κυττάρων απαντούν διαφορετικά στο TBT (Hurt *et al.*, 2013). Τέλος, ο TBT, σε συγκεντρώσεις 1 nM - 10 μM, προκάλεσε απόπτωση σε B κύτταρα, τόσο μέσω έμμεσης όσο και μέσω άμεσης δράσης (Baker *et al.*, 2017).

1.2.5. Φαρμακολογικές δράσεις του TBT

Από την εισαγωγή της σισπλατίνης στην αντικαρκινική θεραπεία, το ενδιαφέρον της σχετικής έρευνας στράφηκε και σε άλλες οργανομεταλλικές ενώσεις, όπως αυτές που περιέχουν ρουθίνιο (Ru), γάλλιο (Ga), σίδηρο (Fe), χρυσό (Au) και κασσίτερο (Sn) (Alama *et al.*, 2009).

Τα νεοπλασματικά κύτταρα, έχοντας αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς για να αποφύγουν τις θανατηφόρες επιπτώσεις των αντικαρκινικών φαρμάκων (Messingerova *et al.*, 2016), αναπτύσσουν αντίσταση σε πολλαπλά φάρμακα (MDR) (Kibria *et al.*, 2014). Η υπερέκφραση της P-γλυκοπρωτεΐνης (P-gp), μιας αντλίας εκροής στην κυτταρική μεμβράνη, είναι ένα από τα πιο συνήθη μοριακά αίτια της MDR (Breier *et al.*, 2014).

Ο TBT προκάλεσε αποπτωτικό θάνατο στην κυτταρική σειρά L1210 λευχαιμίας ποντικού, σε συγκεντρώσεις <0,5 μM, χωρίς να προκαλέσει υπερέκφραση της P-gp, αλλά κυρίως μέσω του ρυθμιστικού μονοπατιού της ογκοπρωτεΐνης του λεμφώματος B κυττάρων (Bcl)-2 (Bohacova *et al.*, 2018). Ανάλογες μελέτες στον *Schizosaccharomyces pombe* έδειξαν ότι ο Pdr5p μεταφορέας παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στο TBT

(Akiyama *et al.*, 2011). Ενδιαφέροντα ήταν και τα αποτελέσματα, όπου ο TBT προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων αδενοκαρκινώματος μαστού MCF-7 (Fickova *et al.*, 2015). Επίσης, ο TBT προκάλεσε απόπτωση και στην κυτταρική σειρά ανθρώπινου καρκίνου του μαστού MDA-MB-231 (Hunakova *et al.*, 2015). Ο TBT ρύθμιζε θετικά τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος RAR-β στα κύτταρα MDA-MB-231 και επιβράδυνε τη μετανάστευση τους (Flamini *et al.*, 2014 · Hunakova *et al.*, 2015).

1.3. Χαρακτηριστικά του *S. cerevisiae*

*1.3.1. Ο *S. cerevisiae* ως πειραματικό πρότυπο*

Ο *S. cerevisiae* είναι από τους πλέον γνωστούς ζυμομύκητες, που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία για τη μετατροπή των σακχάρων σε αλκοόλη στην μπύρα, το κρασί και άλλα ποτά, καθώς και ως διογκωτικός παράγοντας στο ψωμί λόγω της απελευθέρωσης αερίων (Pretorius *et al.*, 2012). Ο *S. cerevisiae* είναι ένας εξαιρετικά δημοφιλής οργανισμός που χρησιμοποιείται ως πειραματικό πρότυπο για τη διερεύνηση πολλών βιολογικών διεργασιών και φαρμακολογικών προσεγγίσεων (Tiligada *et al.*, 1996 · Delitheos *et al.*, 1995). Οι παράγοντες που οδήγησαν σε αυτήν τη δημοφιλία είναι:

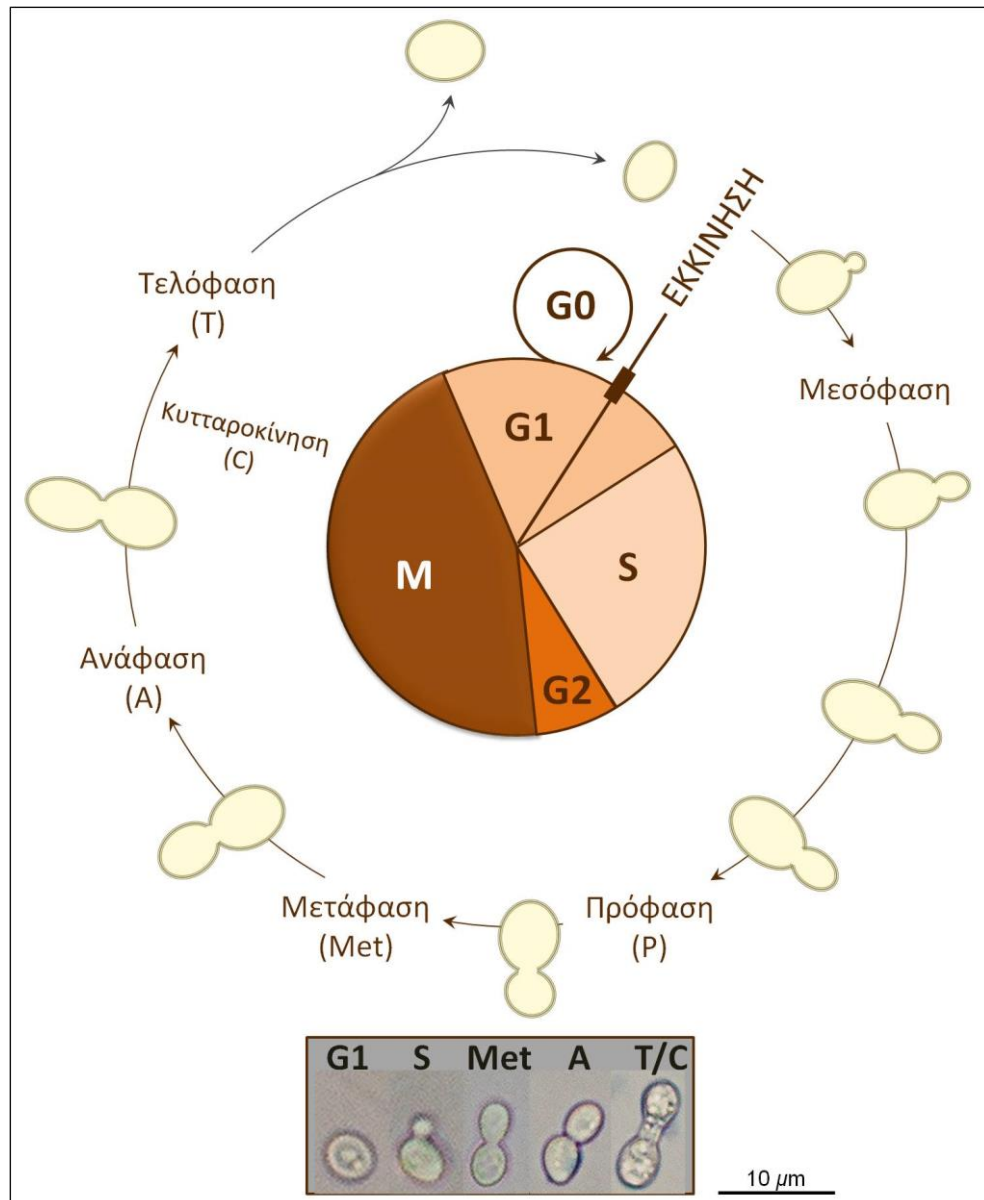
- Είναι μονοκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός με μικρό χρόνο διπλασιασμού (~90 λεπτά) (Delitheos *et al.*, 1995) και η καλλιέργειά του είναι απλή, εύκολη και οικονομική. Σχηματίζει ευδιάκριτες αποικίες εντός 48 h από τον ενοφθαλμισμό του σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα.
- Διαθέτει πλήθος εξελικτικώς συντηρημένων κυτταρικών διεργασιών που μπορούν να προβληθούν στα ανθρώπινα κύτταρα (Nielsen, 2019).

- Έχει γίνει πλήρης καταγραφή του συνολικού γονιδιώματός του, το οποίο αποτελείται από 5.885 γονίδια οργανωμένα σε 16 χρωμοσώματα (Goffeau *et al.*, 1996).
- Έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην μελέτη πολλών βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων του κυτταρικού κύκλου (Nasmyth, 1996), του οξειδωτικού, θερμικού (Delitheos *et al.*, 2010) και φαρμακολογικού stress (Miligkos *et al.*, 2000), της διερεύνησης, βιοχημικών, φυσιολογικών, φαρμακολογικών και άλλων μηχανισμών (Delitheos *et al.*, 1995 · Paramichael *et al.*, 2006).

1.3.2. Ο κυτταρικός κύκλος του *S. cerevisiae*

Ο ζαχαρομύκητας μπορεί να πολλαπλασιαστεί είτε αμφιγονικά, είτε μονογονικά με δημιουργία εκβλαστήσεων (Hartwell *et al.*, 1974 · Powell *et al.*, 2000). Ο μονογονικός τρόπος αναπαραγωγής είναι ο συνήθης για το φύλο των ασκομυκήτων, στο οποίο ανήκει ο ζαχαρομύκητας. Για την εκκίνηση του κυτταρικού κύκλου απαιτείται ένας συντονισμός ρύθμισης της ανάπτυξης και της κυτταρικής διαίρεσης με τα αναβολικά και καταβολικά μονοπάτια τα οποία παρέχουν την ενέργεια και τους πόρους που απαιτούνται για την κυτταρική δραστηριότητα (Ewald, 2018).

Ο κυτταρικός κύκλος διακρίνεται στις επιμέρους φάσεις (Εικόνα 1.4):



Εικόνα 1.4. Σχηματική παρουσίαση του κυτταρικού κύκλου του *S. cerevisiae*. Το μέγεθος της εκβλάστησης χρησιμοποιείται ως μορφολογικός δείκτης εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και επιτρέπει τη διάκριση των διαφορετικών φάσεων κυτταρικού κύκλου (G1, S, G2, M, G0) (Amoussouvi et al., 2018 · Teufel et al., 2019).

Φάση G1: είναι περίοδος προετοιμασίας του κυττάρου για τον επικείμενο πολλαπλασιασμό. Στη φάση αυτή, υπάρχει ένα χρονικό σημείο *ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ* (START), το οποίο ενεργοποιεί την, χωρίς επιστροφή, είσοδο του κυττάρου στην επόμενη φάση (Lord and Wheals, 1981). Στην *εκκίνηση*, η κυκλινοεξαρτώμενη κινάση (Cdk)

μαζί με την κυκλίνη Cln3 απενεργοποιούν τον αναστολέα Whi5, και αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση των απαραίτητων μεταγραφών που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο (Skotheim *et al.*, 2008).

Ανάμεσα στους κύριους ρυθμιστές του μεταβολισμού και της ανάπτυξης στον *S. cerevisiae* είναι τα μονοπάτια της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) και του στόχου της ραπαμυκίνης (TOR) που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της *εκκίνησης* (Ewald, 2018). Ένας αναστολέας της *εκκίνησης*, είναι και ο Cip1, ο οποίος αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στην G1 φάση, ως απάντηση σε περιβαλλοντικούς περιορισμούς, όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, αλλά και λόγω stress. Ο Cip1 αναστέλλει όλα τα σύμπλοκα Cdk1-Cln. Το αντίστοιχο γονίδιο *cip1*, μεταγράφεται κατά τη μετάβαση M/G1 και μέχρι το τέλος της G1 φάσης (Chang *et al.*, 2017).

Το μητρικό κύτταρο αυξάνεται σε μέγεθος μέχρι να αποκτήσει ένα κρίσιμο μέγεθος, λεπταίνει το κυτταρικό τοίχωμα και στην επιφάνεια του κυττάρου αρχίζει να σχηματίζεται ένας δακτύλιος από χητίνη, από τον οποίο βγαίνει η εκβλάστηση (Hartwell *et al.*, 1974 · Powell *et al.*, 2000 · Feldmann, 2012a).

Φάση S: σε αυτή τη φάση αρχίζει ο διπλασιασμός του DNA. Η εμφάνιση της εκβλάστησης σηματοδοτεί την είσοδο του κυττάρου στη φάση S του κύκλου και όσο μεγαλώνει η εκβλάστηση, τόσο το κύτταρο πλησιάζει προς την ολοκλήρωσή της (Lord and Wheals, 1981).

Φάση G2: Είναι φάση έντονης πρωτεϊνοσύνθεσης και αύξησης του κυττάρου. Το κύτταρο προετοιμάζεται για να εισέλθει στη μίτωση. Στη φάση G2 ο πυρήνας τοποθετείται στον αυχένα της εκβλάστησης και στη συνέχεια το κύτταρο προχωρά στη φάση M της κυτταρικής διαίρεσης (Lord and Wheals, 1981).

Φάση M: είναι η φάση διαχωρισμού του μητρικού και θυγατρικού κυττάρου (Feldmann, 2012a).

Φάση G₀: Όταν κάποιο κύτταρο δεν καταφέρει να περάσει το σημείο *εκκίνησης*, η διαίρεση σταματά και το κύτταρο εισέρχεται στην φάση G₀ (Forsburg, 1994). Τα κύτταρα εισέρχονται στην φάση G₀ όταν οι συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη, για παράδειγμα λόγω εξάντλησης των θρεπτικών υλικών. Κατά τη φάση αυτή δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού των κυττάρων, είναι δηλαδή μια φάση στασιμότητας (Wei *et al.*, 1993) και συνοδεύεται από συσσώρευση αποθηκευτικών υδατανθράκων και αυξημένη αντοχή στο stress, περιβαλλοντικό ή θερμικό, πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος και αυξημένη ικανότητα επιβίωσης σε συνθήκες νηστείας (Herman, 2002).

1.3.3. Αποικίες *Petite*

Οι αποικίες που χαρακτηρίζονται ως *petite*, λόγω του μικρού τους μεγέθους σε σχέση με τις φυσιολογικές, δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν ως πηγή άνθρακα γλυκερόλη ή αιθανόλη, ενώ σχηματίζουν μικρού μεγέθους αποικίες σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν γλυκόζη (Foury, 1989 · Day, 2013). Συνήθως αυτό οφείλεται σε ανωμαλίες στην αναπνευστική αλυσίδα που προκύπτουν είτε από ελλείψεις ή μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA (Bernardi, 1979), είτε από μια μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί μια υπομονάδα της ATP-συνθάσης (Weber *et al.*, 1995), είτε από μεταλλάξεις σε γονίδια του πυρηνικού DNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διεργασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Day, 2013).

1.3.4. Ήπιο και οξύ κυτταρικό stress

Ο όρος κυτταρικό stress αναφέρεται στις μεταβολές της κυτταρικής ομοιόστασης που προκαλούνται από οποιοδήποτε στρεσογόνο ερεθίσμα, είτε ενδογενές, είτε εξωγενές καθώς και στις κυτταρικές διεργασίες που οδηγούν στην αποκατάσταση της διαταραχής (cf. Ντεληθέος, 2011). Τα κύτταρα ανταποκρίνονται στο stress με ποικίλους μηχανισμούς που έχουν ως στόχο την προσαρμογή στις νέες συνθήκες και την αποκατάσταση της ομοιόστασης (Fulda *et al.*, 2010).

Ως *ήπιο stress* ορίζεται η κατάσταση στην οποία τα στρεσογόνα ερεθίσματα δεν υπερβαίνουν ένα συγκεκριμένο κατώφλι και το κύτταρο μπορεί να αποκκριθεί με την ενεργοποίηση ενός προσαρμοστικού μηχανισμού για να διασφαλίσει την επιβίωσή του (Lindquist, 1986 · Fulda *et al.*, 2010). Οι μηχανισμοί απάντησης στο stress που κινητοποιούνται έχουν προστατευτική δράση στο κύτταρο και το προετοιμάζουν για να αντέξει ένα επόμενο ισχυρό shock (Delitheos *et al.*, 1995 · Sommerschild and Kirkeboen, 2002 · Paramichael *et al.*, 2006 · Tiligada, 2006).

Η προστατευτική δράση του μηχανισμού της προσαρμοστικής απάντησης υπό την επίδραση ήπιου στρεσογόνου ερεθίσματος αναφέρεται συχνά ως κυτταρική προθέρμανση ή προπόνηση (preconditioning) ή προεπάση (pretreatment) και έχει ως αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα του κυττάρου σε επακόλουθο ισχυρό ή οξύ shock (Sommerschild and Kirkeboen, 2002). Όταν το κύτταρο δεν έχει περάσει από το στάδιο της προθέρμανσης, η αύξηση της έντασης ή/και της διάρκειας του ερεθίσματος μπορεί να προκαλέσει ακόμα και κυτταρικό θάνατο (Jaattela, 1999). Αν οι μηχανισμοί αυτοί αποτύχουν, το κύτταρο θέτει σε λειτουργία μηχανισμούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όπως η απόπτωση, η νέκρωση και η αυτοφαγία (Fulda *et al.*, 2010).

1.3.5. Δομή και λειτουργία των κενοτοπίων

Τα κενοτόπια είναι οργανίδια του κυττάρου, τα οποία έχουν πολλές ομοιότητες με τα κενοτόπια των κυττάρων των φυτών και με τα λυσοσώματα των κυττάρων των θηλαστικών. Είναι όξινα, με pH που κυμαίνεται μεταξύ 5,0-6,5 αναλόγως με τις συνθήκες ανάπτυξης (Martínez-Muñoz and Kane, 2008). Η παρουσία έστω και ενός κενοτοπίου είναι απαραίτητη για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου (Weisman, 2003).

Σχεδόν 200 από τα 5.885 γονίδια του σακχαρομύκητα κωδικοποιούν πρωτεΐνες που βρίσκονται στα κενοτόπια, με το 27% από αυτές να έχουν λειτουργία μεταφορέων (transporter) (Kane, 2006 · Li and Kane, 2009).

Ο ρόλος των κενοτοπίων είναι πολλαπλός. Η κύρια λειτουργία τους είναι η αποδόμηση των πρωτεϊνών με τη βοήθεια μεγάλου αριθμού ενδο- και έξω- πεπτιδασών που φιλοξενούν στο εσωτερικό τους (Van Den Hazel *et al.*, 1996). Περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα όπως πρωτεϊνάσες, καρβοξυπεπτιδάσες, τρεαλάση, αμινοπεπτιδάσες κλπ. Αποθηκεύουν μεταβολίτες όπως αμινοξέα, πολυφωσφορικά και άλλα ιόντα και συντελούν στην ομοιόσταση του κυττάρου μέσω της ρύθμισης του pH (Klionsky *et al.*, 1990).

Τα κενοτόπια είναι υπεύθυνα και για τη σημαντική κυτταρική λειτουργία της αυτοφαγίας, κατά την οποία κυτταρόπλασμα και οργανίδια διαχωρίζονται από το υπόλοιπο κύτταρο με μια διπλή μεμβράνη σχηματίζοντας το αυτοφαγόσωμα (Mari, 2011). Το αυτοφαγόσωμα συντήκεται με το κενοτόπιο και τα συστατικά του ανακυκλώνονται. Αυτός ο μηχανισμός διατηρείται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και χρησιμεύει για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης με την απομάκρυνση πρωτεϊνών και οργανιδίων που έχουν υποστεί βλάβες (Reggiori and Klionsky, 2002). Αυτοφαγία μπορεί να συμβεί και στη

στάσιμη φάση της ανάπτυξης λόγω έλλειψης θρεπτικών υλικών (Reggiori and Klionsky, 2002).

Τα κενοτόπια είναι δυναμικά οργανίδια ως προς το σχήμα, το μέγεθος και τον αριθμό τους, τα οποία αλλάζουν σε συνάρτηση με τις ανάγκες του κυττάρου (Cakar *et al.*, 2000). Το μέγεθος και το σχήμα τους είναι ενδεικτικά της φάσης ανάπτυξης αλλά και της φάσης του κύκλου που βρίσκονται τα κύτταρα και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα θρεπτικά υλικά. Κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης τα κενοτόπια αποτελούνται από δύο ή περισσότερους μεσαίου μεγέθους λοβούς. Καθώς τα κύτταρα εισέρχονται στη στάσιμη φάση της ανάπτυξης ή, γενικά, σε περιόδους εξάντλησης των θρεπτικών μέσων, οι λοβοί συνενώνονται σε έναν μεγάλο λοβό (Li and Kane, 2009). Τα κενοτόπια μπορούν να συντηκονται και να σχάνε. Η σχάση και η σύντηξη τους είναι απαραίτητη για την μεταφορά ουσιών μέσα και έξω από αυτά, για την απόκκριση του κυττάρου σε εξωκυττάρια ερεθίσματα και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Li and Kane, 2009).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το μέγεθος των κενοτοπίων πιθανώς επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο διαμέσου της ρύθμισης του κυτταρικού μεγέθους. Τα κύτταρα πρέπει να έχουν ένα κατάλληλο μέγεθος για να μπορέσουν να περάσουν το κατώφλι της *εκκίνησης* (Johnston *et al.*, 1977). Ένα κενοτόπιο μεγάλου μεγέθους, μπορεί να μην επηρεάζει τα σημεία ελέγχου G1/εκκίνηση και G2/M, αλλά να αναγκάζει το κύτταρο να συμπεριφέρεται σαν να είναι μικρού μεγέθους (Veses and Gow, 2008). Μεταξύ των πρωτεϊνών που έχουν ενοχοποιηθεί για τη διαφορική επίδρασή τους στο μέγεθος και το σχήμα των κενοτοπίων εντάσσονται οι πρωτεΐνες κενοτοπιακής διαλογής πρωτεϊνών (Vps) (Raymond *et al.*, 1992). Τα φαινοτυπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των κενοτοπίων στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα του σακχαρομύκητα που ορίζουν οι

μεταλλάξεις στα γονίδια *vps* -όπως προσδιορίζονται με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού- έχουν ταξινομηθεί σε 6 τάξεις A-F (Raymond *et al.*, 1992 · Aufschnaiter and Büttner, 2019).

Τα κενοτόπια κληρονομούνται από το μητρικό κύτταρο στο θυγατρικό. Αυτό συμβαίνει προς το τέλος της φάσης G1, πριν την εμφάνιση της εκβλάστησης, όπου ένα από τα μεγάλα κενοτόπια του μητρικού κυττάρου μεταφέρεται κοντά στη θέση της επικείμενης εκβλάστησης. Κατά την έναρξη της S φάσης, όταν η εκβλάστηση αρχίζει να γίνεται ορατή, σχηματίζεται η «δομή διαχωρισμού». Αυτή ξεκινά από το μητρικό κενοτόπιο που βρίσκεται πιο κοντά στην εκβλάστηση, το οποίο σχάται σε μικρότερα και επεκτείνεται στη θυγατρική εκβλάστηση μέσω ενός κυτταροσκελετού ακτινομοοσίνης (Weisman, 2006 · Veses and Gow, 2008). Η μεταφορά συνεχίζεται κατά τη διάρκεια των φάσεων S και G2 και έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά πολλών κυστιδίων στο θυγατρικό κύτταρο. Σύντηξη αυτών των κυστιδίων οδηγεί στη δημιουργία του νέου θυγατρικού κενοτοπίου (Fagarasanu and Rachubinski, 2007).

Η κενοτοπιακή H⁺ ATPάση (V ATPάση)

Η ρύθμιση του pH, τόσο στα θηλαστικά όσο και στο ζακχαρομύκητα, επιτυγχάνεται μέσω της τύπου V H⁺ ATPάσης. Η κενοτοπιακή H⁺ ATPάση (vacuolar proton-translocating ATPase, V ATPάση) είναι μία αντλία πρωτονίων (proton pump) που οφείλει το όνομά της στο γεγονός ότι είναι υπεύθυνη για την οξίνιση των κενοτοπίων (vacuole) των ζυμομυκήτων (Kakinuma *et al.*, 1981 · Beyenbach and Wiczorek, 2006). Σε ποικίλες βιολογικές μεμβράνες (κενοτόπια, λυσοσώματα, νευρώνες, κ.ά.), η V ATPάση μετατρέπει την ενέργεια από την υδρόλυση της ATP σε διαφορά ηλεκτροχημικού δυναμικού H⁺, μέσω ενεργού μεταφοράς H⁺ και προάγει την οξίνιση των ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών οργανιδίων παρέχοντας το

βέλτιστο pH για διάφορες κυτταρικές λειτουργίες (Nishi and Forgac, 2002 · Beyenbach and Wiczorek, 2006).

Οι τύπου V H⁺ ATPάσες είναι από τα μεγαλύτερα ένζυμα που απαντούν στα ευκαρυωτικά κύτταρα και μοιράζονται κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά με τις τύπου F ATPάσες. Γενικά, οι F ATPάσες παράγουν και οι V ATPάσες καταναλώνουν ATP (IUPHAR/BPS, 2020). Οι V ATPάσες αποτελούνται από έως και 14 υπομονάδες διατεταγμένες σε ένα κυτταροπλασματικό σύμπλοκο V₁ που υδρολύει την ATP, και σε ένα ενσωματωμένο στη μεμβράνη σύμπλοκο V₀ που περιέχει τον πόρο που μετατοπίζει τα H⁺ διαμέσου της μεμβράνης (Nishi and Forgac, 2002 · Beyenbach and Wiczorek, 2006 · Forgac, 2007). Στον σακχαρομύκητα οι 14 υπομονάδες κωδικοποιούνται από μόλις 1 γονίδιο, εκτός από τη μεγάλη υπομονάδα *a*, η οποία υπάρχει σε δύο ισομορφές *Vrh1p* και *Stv1p* (Manolson *et al.*, 1994), οι οποίες εντοπίζονται στα κενοτόπια και στα σωμάτια Golgi αντίστοιχα, και σε συνδυασμό με τις άλλες υπομονάδες δημιουργούν V ATPases εξειδικευμένες για το κάθε οργανίδιο (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001).

Η V ATPάση είναι κύριος ρυθμιστής της ομοιόστασης και της διάρκειας ζωής του κυττάρου (Aufschnaiter and Büttner, 2019). Οι λειτουργίες φαίνεται να επιτελούνται μέσω της συντονισμένης αλληλεπίδρασης μεταξύ της V ATPάσης και της ATPάσης Pma1 της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, ούτως ώστε να ρυθμίζονται η οξίνιση των κενοτοπίων και το κυτοσολικό pH, το οποίο είναι απαραίτητο για τη λειτουργία των μιτοχονδρίων και τις διεργασίες αποικοδόμησης, όπως η αυτοφαγία. Έχει προταθεί ότι, η μειωμένη δραστηριότητα της V ATPάσης οδηγεί σε προς τα κάτω ρύθμιση της Pma1, οξίνιση του κυτταροπλάσματος, αλκαλοποίηση των κενοτοπίων, μείωση του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού (ΔΨ), κατακερματισμό των μιτοχονδρίων και διαταραχή της

αυτοφαγικής ροής, με αποτέλεσμα τη μείωση της διάρκειας ζωής των κυττάρων του σακχαρομύκητα (Aufschnaiter and Büttner, 2019).

Τέλος, η ύπαρξη της υπομονάδας V_0 , αλλά όχι η δραστηριότητα μεταφοράς H^+ , είναι απαραίτητη για τη σύντηξη των κενοτοπίων (Bayer *et al.*, 2003 · Peters *et al.*, 2001). Αντιθέτως, η σχάση τους απαιτεί οξίνιση του κενοτοπίου διαμέσου της V ATPάσης. Σε κύτταρα που η δράση της V ATPάσης είχε ανασταλεί, τα κενοτόπια ήταν αδύνατον να προχωρήσουν σε σχάση (Baars *et al.*, 2007). Επίσης, σύμφωνα με την ταξινόμηση που βασίζεται στις μεταλλάξεις των *vps*, ο φαινότυπος τάξεως D σχετίζεται με βλάβη στον διαχωρισμό των κενοτοπίων, όπου το μητρικό κύτταρο έχει ένα μεγάλο, ενιαίο, σφαιρικό κενοτόπιο που δεν εκτείνεται στην αναπτυσσόμενη εκβλάστηση, ενώ η V ATPάση δεν συναρμολογείται σωστά στη μεμβράνη του κενοτοπίου, με αποτέλεσμα οι υπομονάδες της να διαχέονται στο κυτταρόπλασμα (Raymond *et al.*, 1992 · Aufschnaiter and Büttner, 2019).

1.3.6. Μεταβολισμός σακχάρων στον *S. cerevisiae*

Οι ζυμομύκητες αποκτούν την ενέργεια που χρειάζονται μέσω της ζύμωσης των σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη, σουκρόζη, γαλακτόζη, μαλτόζη) ή της οξειδωσης των προϊόντων της ζύμωσης, όπως η γλυκερόλη και η αιθανόλη (Johnston and Carlson, 1992).

Οι φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae* είναι στενά συνδεδεμένες με τα επίπεδα της γλυκόζης. Όταν κύτταρα του σακχαρομύκητα εμβολιάζονται σε θρεπτικό υλικό πλούσιο σε γλυκόζη, αφού περάσουν από τη φάση προσαρμογής, περνάνε στην επόμενη φάση της ανάπτυξης, τη λογαριθμική, όπου πολλαπλασιάζονται με ταχείς ρυθμούς ζυμώνοντας γλυκόζη σε αιθανόλη (Busti *et al.*, 2010).

Αν και σε αερόβιες συνθήκες τα κύτταρα του σακχαρομύκητα θα έπρεπε να μεταβολίζουν τη γλυκόζη μέσω της αναπνευστικής

αλυσίδας και του κύκλου του κιτρικού ή τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA), όπως οι περισσότεροι μικροοργανισμοί, προτιμούν το μεταβολισμό της γλυκόζης μέσω της αλκοολικής ζύμωσης (Busti *et al.*, 2010). Παρόλο που ενεργειακά είναι λιγότερο αποτελεσματική, η αλκοολική ζύμωση μπορεί να γίνει με ταχείς ρυθμούς και να επιτρέψει στα κύτταρα να παράγουν αιθανόλη, η οποία είναι τοξική για τους περισσότερους μικροοργανισμούς, δίνοντας στο σακχαρομύκητα πλεονέκτημα στην επιβίωση. Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης αρχίσουν να μειώνονται, ο μεταβολισμός τους αλλάζει από ζύμωση σε αναπνοή και τα κύτταρα συνεχίζουν να αναπτύσσονται, με χαμηλότερους ρυθμούς, καταναλώνοντας την αιθανόλη που είχε αρχικά παραχθεί. Η φάση αυτή της ανάπτυξης ονομάζεται διαυξική μετατόπιση. Όταν εξαντληθεί και η αιθανόλη, τα κύτταρα εισέρχονται στη στάσιμη φάση της ανάπτυξης όπου ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ουσιαστικά σταματάει (Busti *et al.*, 2010).

Η γλυκόζη ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι cAMP/PKA, το οποίο ρυθμίζει πολλές πτυχές της φυσιολογίας του κυττάρου, όπως την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τον μεταβολισμό, την αντοχή στο stress και τη γήρανση (Busti *et al.*, 2010). Τα επίπεδα του cAMP είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ της σύνθεσής του, η οποία καταλύεται από την αδενυλική κυκλάση (Casperson *et al.*, 1985) και της αποσύνθεσής του από τις φωσφοδιεστεράσες (Sass *et al.*, 1986 · Nikawa *et al.*, 1987).

Η PKA είναι μια εξελικτικά συντηρημένη κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία υπάρχει σε ανενεργή κατάσταση ως ολοένζυμο αποτελούμενο από δύο καταλυτικές υπομονάδες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *TPK1*, *TPK2* και *TPK3* (Toda *et al.*, 1987a) και δύο ρυθμιστικές υπομονάδες που κωδικοποιούνται από το *BCY1* (Toda *et al.*, 1987b).

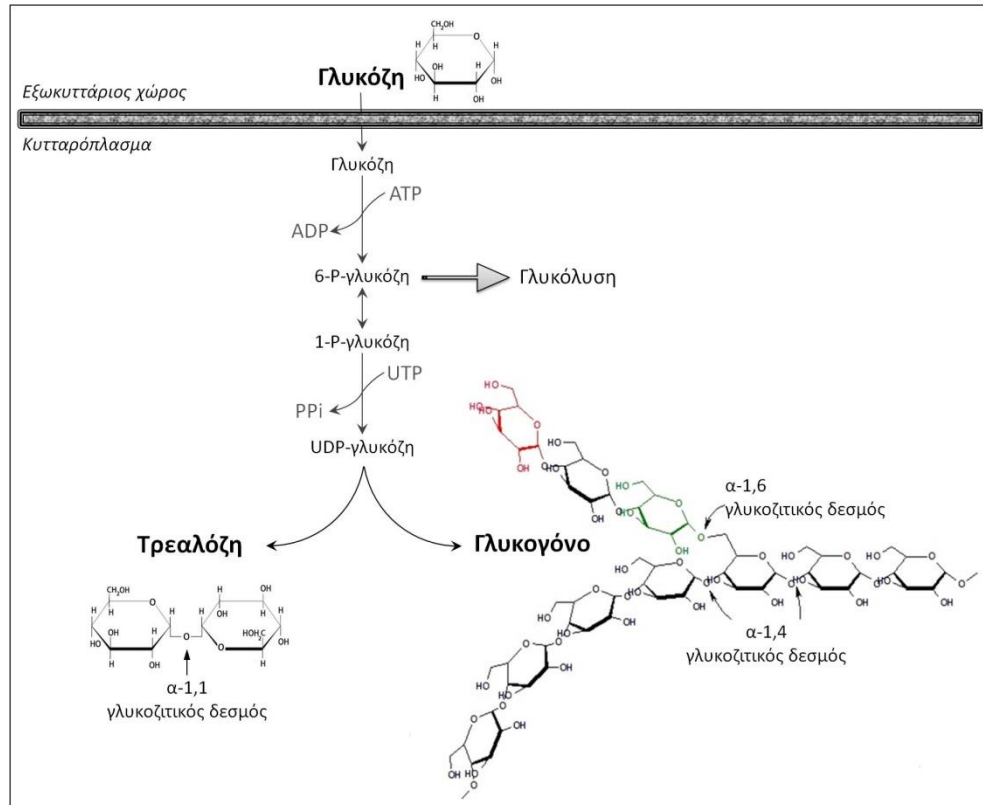
Όταν η γλυκόζη είναι άφθονη, η ενεργοποίηση του μονοπατιού cAMP/PKA ευνοεί τη γρήγορη ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων διεγείροντας τη γλυκολυτική ροή (Busti *et al.*, 2010). Στα υποστρώματα της κινάσης αυτής είναι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των αποθηκευτικών υδατανθράκων, ένζυμα της γλυκόλυσης και της γλυκονεογένεσης, μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην κυτταρική απάντηση στο stress και φυσικά ο μεταβολισμός των υδρατανθράκων (Zaman *et al.*, 2008).

Η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, ο ρυθμός ανάπτυξης και η απάντηση στο stress συνδέονται στενά, ενώ η μετάβαση στη ζύμωση συμπίπτει με τη μείωση της απόκρισης στο stress (Thevelein and Winde, 1999).

Από την άλλη, το γλυκογόνο και η τρεαλόζη αποτελούν αποθέματα της γλυκόζης (Εικόνα 1.5) στον *S. cerevisiae*, και τα επίπεδά τους μεταβάλλονται ταχέως ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος (François and Parrou, 2001).

Η τρεαλόζη είναι ένας δισακχαρίτης στον οποίο δύο μόρια γλυκόζης ενώνονται με α-1,1 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Εικόνα 1.5) και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (François and Parrou, 2001 · Eleutherio *et al.*, 2015). Ο καταβολισμός και η ρύθμιση της τρεαλόζης γίνεται μέσω τριών ενζύμων: των ουδέτερων τρεαλασών Nth1p και Nth2p, και της όξινης τρεαλάσης Ath1p. Η Nth1p, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (Elbein *et al.*, 2003) και θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο κυτταρικό stress (Singer and Lindquist, 1998a · Trevisol *et al.*, 2011). Η Nth2p, επίσης ουδέτερη τρεαλάση, βρίσκεται και αυτή στο κυτταρόπλασμα. Ο ρόλος της δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα αλλά πιστεύεται ότι αποτελεί ρυθμιστή της Nth1p (Nwaka *et al.*, 1995). Η Ath1p εντοπίζεται κυρίως στο περιπλάσμα, αλλά και στα κενοτόπια (Tran *et al.*, 2016) και ενεργοποιείται όταν το κύτταρο επιστρέψει σε

φυσιολογική κατάσταση μετά από έκθεση σε συνθήκες stress (Magalhães *et al.*, 2018).



Εικόνα 1.5. Μεταβολικές οδοί και δομή των σακχάρων στον *S. cerevisiae* (Francois and Parrou, 2001). ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη, ADP: διφωσφορική αδενοσίνη, P: φωσφορικό, PPi: ανόργανο πυροφωσφορικό, UDP: διφωσφορική ουριδίνη, UTP: τριφωσφορική ουριδίνη

Είναι ενδιαφέρον ότι σε συνθήκες ανάπτυξης παρουσία τρεαλόζης στο θρεπτικό υλικό, το μονοπάτι του πολυκυστιτικού σώματος (MVB) (Aufschnaiter and Büttner, 2019), διαμέσου του οποίου η Ath1p εισέρχεται στο κενοτόπιο ρυθμίζεται προς τα κάτω για να διευκολυνθεί η συσσώρευση του ενζύμου στην επιφάνεια του κυττάρου (Huang *et al.*, 2007). Αυτό επηρεάζει πιθανώς και άλλες πρωτεΐνες του κενοτοπίου που μεταφέρονται μέσω MVB και προκαλεί την μειωμένη δραστηριότητα του κενοτοπίου (Tran *et al.*, 2016).

Το γλυκογόνο είναι ένα βιοπολυμερές, μια α-γλυκάνη με α-1,4 και α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Εικόνα 1.5) και θεωρείται ο αποθηκευτικός υδατάνθρακας του κυττάρου. Εντοπίζεται με διαφορετικές μορφές στο κύτταρο. Το μη υδατοδιαλυτό γλυκογόνο αποτελεί βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ το υδατοδιαλυτό γλυκογόνο εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Gunja-Smith *et al.*, 1977).

Κατά την φυσιολογική ανάπτυξη του ζαχαρομύκητα, η τρεαλόζη βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο εσωτερικό του κυττάρου. Η αύξηση της συγκέντρωσής της ξεκινά όταν η γλυκόζη εξαντληθεί από το θρεπτικό μέσο (Lillie and Pringle, 1980). Και για τους δύο υδατάνθρακες, η συσσώρευσή τους συνοδεύεται από μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, ανεξάρτητα από τις συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται ο μύκητας (Paalman *et al.*, 2003). Το γλυκογόνο αρχίζει να συσσωρεύεται στο κύτταρο όταν τα θρεπτικά υλικά είναι ακόμα σε σχετική αφθονία. Αρχίζει να συντίθεται κατά τη διάρκεια της διαυξικής μετατόπισης - αμέσως μετά την λογαριθμική φάση της ανάπτυξης και πριν τη στάσιμη φάση -, ενώ κατά τη διάρκεια της στάσιμης φάσης, όταν τα θρεπτικά υλικά έχουν εξαντληθεί, αρχίζει ο καταβολισμός του. Η σύνθεση και ο καταβολισμός του βρίσκονται σε μια αέναη ισορροπία (Lillie and Pringle, 1980 · François *et al.*, 1988).

Το γλυκογόνο και η τρεαλόζη στον κυτταρικό κύκλο

Τόσο το γλυκογόνο όσο και η τρεαλόζη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο του σακχαρομύκητα, παρέχοντας ενέργεια στο κύτταρο για τις μεταβολικές του δραστηριότητες όταν δεν υπάρχει επάρκεια θρεπτικών υλικών, αλλά και σε περιόδους stress (Feldmann, 2012b). Οι ενδοκυττάριας συγκεντρώσεις τους ποικίλουν και εξαρτώνται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου καθώς και από τους περιορισμούς των θρεπτικών μέσων (Silljé *et al.*, 1997). Το γλυκογόνο και η τρεαλόζη κυρίως συσσωρεύονται στη G1

φάση και συνδέονται με την εμφάνιση της εκβλάστησης (Silljé *et al.*, 1997).

Οι εξαρτώμενες από τον κυτταρικό κύκλο αλλαγές στον μεταβολισμό του άνθρακα ελέγχονται από τη Cdk1 και την PKA. Κατά την μετάβαση G1/S, η Cdk1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την Nth1 και τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου Gph1, ώστε το κύτταρο να τροφοδοτηθεί με επιπλέον γλυκόζη κατά τη διάρκεια της μετάβασης S/G2/M (Ewald *et al.*, 2016 · Zhao *et al.*, 2016). Η διάρκεια της G1 φάσης στα κύτταρα αυξάνεται όσο η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο μειώνεται. Όσο η G1 επιμηκύνεται, τόσο περισσότερο αυξάνεται η συσσώρευση των δύο σακχάρων (Paalman *et al.*, 2003). Η αύξηση αυτή της G1 συνδέεται με τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς του κυτταρικού κύκλου που περιλαμβάνουν την PKA και πιθανώς τον TOR (Castrillo *et al.*, 2007). Η αναστολή του TOR έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της μετάφρασης του Cln3, αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση και συσσώρευση των υδατανθράκων (Barbet *et al.*, 1996). Ο TOR πιθανόν να εμπλέκεται στη σύνδεση του ρυθμού ανάπτυξης με την συσσώρευση των δύο υδατανθράκων (Silljé *et al.*, 1997 · Silljé *et al.*, 1999 · Paalman *et al.*, 2003).

Το γλυκογόνο και η τρεαλόζη στο κυτταρικό stress

Το γλυκογόνο και η τρεαλόζη παρέχουν προστασία στο κύτταρο όταν βρεθεί σε συνθήκες θερμικού, ωσμωτικού ή οξειδωτικού stress (Wiemken, 1990 · Ni and Laporte, 1995 · Parrou *et al.*, 1997 · Francois and Parrou, 2001).

Στο θερμικό stress, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της τρεαλόζης στο κύτταρο (Hottiger *et al.*, 1987 · Neves and Francois, 1992) που οφείλεται σε μεταγραφή γονιδίων και αύξηση της ενεργότητας της εξαρτώμενης από υψηλές θερμοκρασίες συνθετάσης και φωσφατάσης της τρεαλόζης (Hottiger *et al.*, 1989 · Neves and

Francois, 1992 · Parrou *et al.*, 1997). Η αύξηση της ενδοκυττάριας τρεαλόζης είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη αντοχής του κυττάρου σε συνθήκες stress (Mahmud *et al.*, 2009). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η τρεαλόζη έχει ρυθμιστικό ρόλο στη συγκέντρωση της ενδοκυττάριας γλυκόζης, στο ρυθμό γλυκόλυσης και συνεπώς στην ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου κατά το θερμικό stress (Singer and Lindquist, 1998b · Neves *et al.*, 1995 · van Vaeck *et al.*, 2001).

Υπό συνθήκες ήπιου οξειδωτικού ή ωσμωτικού stress, έλλειψης θρεπτικών συστατικών ή έκθεσης σε τοξικές ουσίες, η αύξηση των επιπέδων της τρεαλόζης δε συσχετίζεται με το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων του σακχαρομύκητα (Alexandre *et al.*, 1998 · Voit, 2003). Σε συνθήκες σοβαρού stress, δε σταματά η σύνθεση της τρεαλόζης, αφού σε αντίθεση με την ουδέτερη τρεαλάση, δεν απενεργοποιείται η σύνθεσή της τρεαλόζης, με αποτέλεσμα ο σακχαρομύκητας να εμφανίζει μεγαλύτερη δυνατότητα προσαρμογής σε ισχυρό stress (Voit, 2003).

Ο προστατευτικός ρόλος της τρεαλόζης υπό συνθήκες stress εντοπίζεται στη διατήρηση της δομής των πρωτεϊνών (Winkler *et al.*, 1991 · Singer and Lindquist, 1998a), του DNA και των λιπιδίων προστατεύοντάς τα από τις ελεύθερες ρίζες (Benaroudj *et al.*, 2001) και της ακεραιότητας της μεμβράνης (Crowe *et al.*, 1984). Καθοριστικό ρόλο για τα προστατευτικά χαρακτηριστικά της τρεαλόζης έχουν (α) η ιδιότητά της να προστατεύει τις κυτταρικές μεμβράνες από αφυδάτωση (Crowe *et al.*, 1992), και (β) η ικανότητά της να αφαιρεί νερό από την επιφάνεια των πρωτεϊνών και να τις προστατεύει από την μετουσίωση και την αναδίπλωσή τους από τις μοριακούς συνοδούς (chaperones) (Singer and Lindquist, 1998b · Cheng *et al.*, 1993).

Μετά την απομάκρυνση του στρεσογόνου ερεθίσματος, η τρεαλόζη συμμετέχει στην επαναδιάταξη της τεταρτοταγούς δομής των

πρωτεΐνών, διασπάται και επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα, γεγονός που είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου μετά το stress (Voit, 2003). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μεταβολισμός της τρεαλόζης έχει συσχετισθεί με πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (HSP) 90 και 104 (Hottiger, 1992 · Iwahashi *et al.*, 1998), ενώ κατά την απουσία της HSP70 έχει παρατηρηθεί αυξημένη παραγωγή τρεαλόζης και μικρός ρυθμός αποικοδόμησης μετά τη διακοπή του στρεσογόνου ερεθίσματος (Hottiger *et al.*, 1992).

1.4. Επίδραση του TBT στον σακχαρομύκητα

Η πλειονότητα των μετάλλων (Cd, Cu, Hg, Zn) εμφανίζει αντιμυκητιασικές ιδιότητες ανεξάρτητα από τη χημική μορφή στην οποία βρίσκονται τα στοιχεία αυτά. Αντίθετα, ο Sn δεν είναι τοξικός στις ανόργανες μορφές του, αλλά μπορεί να εμφανίσει τοξικότητα υπό μορφή οργανοκασσιτερικών, ιδιαίτερα τριαλκυλοκασσιτερικών μορίων (Luijten JGA and van der Kerk, 1955 · Ingham *et al.*, 1960 · Tobin and Cooney, 1999). Οι ενώσεις του τριαλκυλοκασσιτερου παρουσιάζουν αντιμυκητιασική δράση, η οποία δε φαίνεται να σχετίζεται με το ανιόν X του μορίου (βλέπε τύπο 1.1.), αλλά μάλλον με τον συνολικό αριθμό 9-12 ατόμων C στις ομάδες του αλκυλίου, ανεξάρτητα από το φύση των ομάδων αυτών (van der Kerk and Luijten, 1954· Ingham *et al.*, 1960).

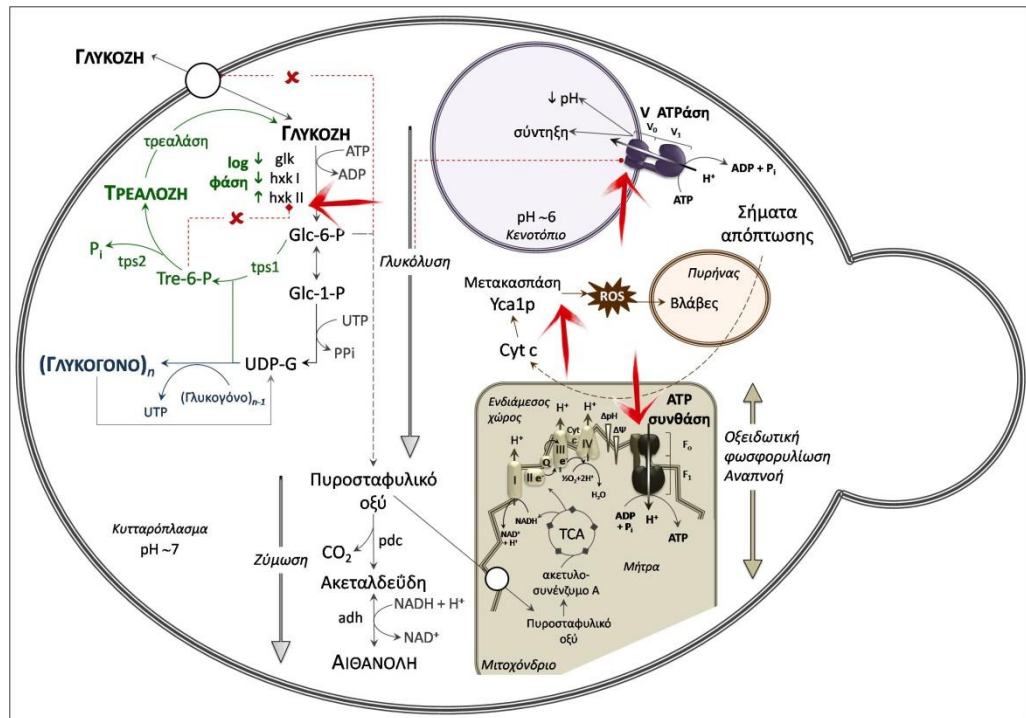
1.4.1. Αλληλεπίδραση με την F_1F_0 ATP συνθάση

Παρά τη χρήση των οργανοκασσιτερικών ενώσεων ως βιοκτόνα, οι αναφορές στην επίδραση τους στους ζυμομύκητες είναι περιορισμένες και οι υποκείμενοι μηχανισμοί δεν έχουν αποσαφηνιστεί μέχρι σήμερα. Οι πρώτες σχετικές μελέτες που δημοσιεύτηκαν πριν από περίπου 45 χρόνια αφορούσαν διάφορες

οργανοκασσιτερικές ενώσεις (Εικόνα 1.3) (Cain *et al.*, 1977). Στην πλειονότητα τους, οι μελέτες αυτές ανέφεραν κυρίως ανασταλτικές δράσεις επί πρωτεϊνών που συνδέονται με την αναπνευστική αλυσίδα, και γενικώς με τις ενεργειακές και μεταβολικές λειτουργίες των κυττάρων (Cain *et al.*, 1977) (Εικόνα 1.6), όπως άλλωστε είχεδειχθεί νωρίτερα για την επίδραση μιας σειράς οργανοκασσιτερικών ενώσεων στα μιτοχόνδρια ήπατος αρουραίου (Aldridge, 1958 · Aldridge *et al.*, 1977).

Τα δεδομένα υποστήριξαν ότι η αναστολή της ανάπτυξης του *S. cerevisiae* παρουσία TET οφειλόταν στην πρόσδεση του σε μια θέση υψηλής συγγένειας στο σύμπλοκο της συνθάσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) στα μιτοχόνδρια (σύμπλοκο V), με αποτέλεσμα την αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Lancashire and Griffiths, 1975 · Cain *et al.*, 1977).

Αργότερα, αναφέρθηκε ότι ο τριφαινυλοκασσίτερος (TPhT) (Εικόνα 1.3) προκαλεί μεταβολές στην διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του *S. cerevisiae* και εκροή K^+ , η οποία αποδόθηκε στην αναστολή της ATPάσης της κυτταρικής μεμβράνης, χωρίς να αποκλειστεί η επίδραση του TPhT στη μιτοχονδριακή ATPάση (Borst-Pauwels *et al.*, 1983) ή/και η εκλεκτική αναστολή του συστήματος αντιμεταφοράς K^+/H^+ (Hauer *et al.*, 1981). Πράγματι, μια σειρά αλκυλοκασσιτερικών ενώσεων, όπως ο TET και ο TBT, ανέστειλαν αναστρέψιμα τη μιτοχονδριακή ATP συνθάση (Εικόνα 1.6), ενώ ο διβουτυλοχλωρομεθυλοκασσίτερος (DBCT) ανέστειλε τη μεταφορά ενέργειας στα μιτοχόνδρια μέσω ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης με κάποιο, μάλλον λιπιδικό, συστατικό του συμπλόκου της ATP συνθάσης (Cain *et al.*, 1977).



Εικόνα 1.6. Απλοποιημένο διάγραμμα των κυτταρικών στοιχείων και διεργασιών που, σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, αποτελούν στόχο των οργανοκασιτερικών ενώσεων στον σακχαρομύκητα (κόκκινα βέλη). Υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, εντοπίζονται ίχνη τρεαλόζης στον σακχαρομύκητα, ενώ η γλυκόζη που έχει μεταφερθεί στο εσωτερικό του κυττάρου χρησιμοποιείται κυρίως για τη γλυκόλυση. Η περίσσεια γλυκόζης αποθηκεύεται με τη μορφή γλυκογόνου, το οποίο αποτελεί ενεργειακά ανώτερη αποθήκη υδατανθράκων από την τρεαλόζη. Εκτός από την προστασία των μακρομορίων και των μεμβρανών, ο κύκλος της τρεαλόζης εμπλέκεται στη ρύθμιση της γλυκόζης, η οποία με τη σειρά της ρυθμίζει την κενοτοπιακή (V) ΑΤΡάση με βάση τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Κατά τη λογαριθμική (log) φάση, η εξοκινάση (hck) I και η γλυκοκινάση (glk) ρυθμίζονται προς τα κάτω, ενώ η hck II επάγεται. Σε αναερόβιες συνθήκες, το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε αιθανόλη με τη καταλυτική δράση της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (pdc) και της αλκοολικής αφυδρογονάσης (adh). Σε αερόβιες συνθήκες, το πυροσταφυλικό οξύ μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια και μετατρέπεται σε ακετυλοσυνένζυμο Α, το οποίο εισέρχεται στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) που συνδέεται και συζεύγνυται με την οξειδωτική φωσφορύλιωση, η οποία παράγει >95% της ενέργειας του κυττάρου υπό μορφή ΑΤΡ. Η προ-αποπτωτική κασπάση ζύμης (Yca1p) παρεμβαίνει στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου του σακχαρομύκητα επιταχύνοντας τη μετάβαση G1/S και επιβραδύνοντας τη μετάβαση G2/M στον κυτταρικό κύκλο. Τα αποπτωτικά σήματα που μετατοπίζονται από τον πυρήνα στα μιτοχόνδρια προκαλούν απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Cyt c) και απώλεια του δυναμικού των μιτοχονδριακών μεμβρανών. Η απελευθέρωση του Cyt c σχετίζεται με την ενεργοποίηση της Yca1p και την επακόλουθη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). (Kane, 1995 · Francois and

Parrou, 2001 · Voit, 2003 · Heerden et al., 2014 · Azzopardi et al., 2017 · Lee et al., 2017 · Hayek et al., 2019). Διακεκομμένη κόκκινη γραμμή: ρύθμιση, * : αναστολή, O : μεταφορέας, ΔpH : βαθμίδα pH, ΔΨ : διαφορά μεμβρανικού δυναμικού, I-IV : σύμπλοκα στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, ADP : διφωσφορική αδενοσίνη, ATP : τριφωσφορική αδενοσίνη, e⁻ : ηλεκτρόνιο, F₁ : μη ενσωματωμένο στη μεμβράνη τμήμα της ATP συνθάσης, F_o : ενσωματωμένο στη μεμβράνη τμήμα της ATP συνθάσης, Glc-1-P : 1-φωσφορική γλυκόζη, Glc-6-P : 6-φωσφορική γλυκόζη, glk : γλυκοκινάση, hck : εξοκινάση, NAD : νικοτιναμιδίο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο, P_i : ανόργανο φωσφορικό, PP_i : ανόργανο πυροφωσφορικό, Q : συνένζυμο Q, tps1 : συνθάση της 6-φωσφορικής τρεαλόζης, tps2 : φωσφατάση της 6-φωσφορικής τρεαλόζης, Tre-6-P : 6-φωσφορική τρεαλόζη, UDP-G : διφωσφορική ουριδινό-γλυκόζη (Uridine DiPhosphate Glucose), UTP : τριφωσφορική ουριδίνη, V₀ : ενσωματωμένο στη μεμβράνη τμήμα της V ATPάσης, V₁ : μη ενσωματωμένο στη μεμβράνη τμήμα της V ATPάσης.

Η F₁F_o ATP συνθάση (σύμπλοκο V) είναι μία τύπου F (energy-coupling Factors) ATPάση, η οποία εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και αποτελείται από δύο διακριτά δομικά μέρη F₁ και F_o που συνδέονται μεταξύ τους με μια δομή που μοιάζει με λεπτό μίσχο. Το τμήμα F_o (κλάσμα πρόσδεσης της ολιγομυκίνης) διαπερνά τη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα και δημιουργεί έναν διαμεμβρανικό δίαυλο διέλευσης H⁺. Το τμήμα F₁ χρησιμοποιεί την ενέργεια της κίνησης των H⁺ σύμφωνα με το ηλεκτροχημικό τους πρηνές, από τον ενδιάμεσο χώρο προς το μιτοχονδριακό στρώμα, για τη σύνθεση της ATP από διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και ανόργανο φωσφορικό ιόν (P_i) (Song *et al.*, 2018 · Stoldt *et al.*, 2018 · Artika, 2019).

Αν και η θέση πρόσδεσης του TBT στην F₁F_o ATP συνθάση (Εικόνα 1.6) δεν είναι εύκολο να διασαφηνιστεί λόγω της μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης, το επικρατές μοντέλο εντοπίζει τη θέση αυτή στον ιοντικό δίαυλο της α υπομονάδας του ενσωματωμένου στη μεμβράνη F_o τμήματος της F₁F_o ATP συνθάσης (von Ballmoos *et al.*, 2004). Στην περίπτωση της Na⁺ ATP συνθάσης, η πύλη του υδρόφιλου διαύλου στην υπομονάδα α επιτρέπει στα ενυδατωμένα ιόντα Na⁺ να

περάσουν. Ο διάυλος λειτουργεί σαν εκλεκτικό φίλτρο, όπου το μέγεθος των ιόντων παίζει σημαντικό ρόλο. Το χλωριούχο TBT συνδέεται πολύ κοντά σε αυτό το εκλεκτικό φίλτρο και δεν επιτρέπει στα ιόντα Na^+ να περάσουν από τον διάυλο (von Ballmoos *et al.*, 2004).

1.4.2. Αλληλεπίδραση με τη V ATPάση

Οι V ATPάσες δρουν με μοριακό μηχανισμό παρόμοιο με τις τύπου F ATPάσες, διατηρημένο από τον ζυμομύκητα έως τα ζωικά κύτταρα (Parra *et al.*, 2014). Δηλαδή, η μετακίνηση των H^+ από την κυτταροπλασματική προς την ενδοσωμική ή εξωκυτταρική πλευρά της μεμβράνης γίνεται μέσω της περιστροφής του δακτυλίου με την παροχή ενέργειας από την υδρόλυση της ATP σε αναλογία $2\text{H}^+ : 1\text{ATP}$ (Beyenbach and Wieczorek, 2006). Συνεπώς, η δράση του TBT στην V ATPάση του σακχαρομύκητα δεν αποτελεί έκπληξη. Συγκεκριμένα, κατά την έκθεση του στελέχους *S. cerevisiae* BY4741 σε χλωριούχο TBT, παρατηρήθηκε αναστολή της υδρολυτικής δράσης της V ATPάσης με $\text{K}_i \sim 200 \text{ nM}$ (Akiyama *et al.*, 2008). Σε συνδυασμό με την αναστολή της ενεργότητας της V_1 περιοχής με $100 \mu\text{M}$ TBT (Uchida *et al.*, 1985) προτάθηκε ότι, αντίστοιχα με τη F_1F_0 ATP συνθάση (von Ballmoos *et al.*, 2004), η Vph1 υπομονάδα του ενσωματωμένου στη μεμβράνη V_0 τμήματος της V ATPάσης επίσης αποτελεί στόχο του TBT (Akiyama *et al.*, 2008) (Εικόνα 1.6). Παράλληλα, διαπιστώθηκαν διαταραχές στην οξίνιση των κενотоπιών με $0,5 \mu\text{M}$ χλωριούχου TBT (Akiyama *et al.*, 2008).

1.4.3. Αλληλεπίδραση με την εξοκινάση II

Ο βρωμιούχος TET (Εικόνα 1.3) αναφέρθηκε ότι, τόσο στον σακχαρομύκητα (Siebenlist and Taketa, 1980 · Siebenlist and Taketa, 1983) όσο και στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα (Siebenlist and Taketa, 1980), ανέστειλε εκλεκτικά την εξοκινάση *in vitro*, ένα

ένζυμο της γλυκολυτικής οδού που καταλύει τη φωσφορυλίωση της D-γλυκόζης, με τη δαπάνη ενός μορίου ATP, σχηματίζοντας 6-φωσφορική γλυκόζη (Εικόνα 1.6). Μάλιστα, η ανασταλτική ισχύς των οργανοκασιτερικών ενώσεων στη δραστικότητα του ενζύμου του σακχαρομύκητα συνδέθηκε με την αύξηση της υδροφοβικότητας των αλκυλομάδων που συνδέονται με τον Sn (Siebenlist and Taketa, 1983).

Κατά τη διάρκεια της εκθετικής ανάπτυξης του σακχαρομύκητα παρουσία γλυκόζης, η εξοκινάση I και η γλυκοκινάση ρυθμίζονται προς τα κάτω, ενώ η εξοκινάση II επάγεται και αποτελεί το κυρίαρχο ισοένζυμο που φωσφορυλιώνει τη D-γλυκόζη (Gancedo *et al.*, 1977). Η εξοκινάση II υπόκειται σε ανασταλτική ανατροφοδότηση από τη συνθάση της 6-φωσφορικής τρεαλόζης (TPS1), η οποία φρουρεί την «πύλη» της γλυκόλυσης στο σακχαρομύκητα (Voit, 2003 · Planqué *et al.*, 2014) (Εικόνα 1.6).

Ενδιαφέρον προκαλεί η παρατήρηση ότι οι δυνητικά πολλαπλές σταθερές καταστάσεις (steady states) των βιοχημικών ρυθμιστικών οδών προσδίδουν μεταβλητούς (ετερογενείς) φαινοτύπους στα κύτταρα, όπως, για παράδειγμα, οι διαφορετικές καταστάσεις της γλυκόλυσης που επέτρεψαν σε ορισμένους κυτταρικούς υποπληθυσμούς του σακχαρομύκητα να επιβιώσουν στις μεταβολές των επιπέδων της γλυκόζης και σε άλλους όχι (van Heerden *et al.*, 2014).

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι ανάμεσα στα ερεθίσματα που ρυθμίζουν τη V ATPάση είναι η γλυκόλυση (Εικόνα 1.6). Στον σακχαρομύκητα, η αποσυναρμολόγηση/επανασυναρμολόγηση της V ATPάσης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης και της ροής της γλυκόλυσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η V ATPάση ρυθμίζεται με βάση τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου (Kane, 1995 · Hayek *et al.*, 2019).

1.4.4. Επίδραση στην ανάπτυξη και την επιβίωση

Στο στελέχος *S. cerevisiae* BY4741, παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα παρουσία χλωριούχου TBT (Sekito *et al.*, 2014), με μέση ανασταλτική πυκνότητα (IC_{50}) $\sim 1,0 \mu M$ ($\sim 0,3 \mu g/mL$) (Akiyama *et al.*, 2008) και μέση θανατηφόρα πυκνότητα (LC_{50}) $\sim 10,0 \mu M$ ($\sim 3 \mu g/mL$) (Chahomchuen *et al.*, 2009). Αν και η ανάπτυξη ανεστάλη πλήρως με τη χορήγηση $5,0 \mu M$ ($\sim 1,5 \mu g/mL$) TBT, η επιβίωση του σακχαρομύκητα δεν επηρεάστηκε σημαντικά (Chahomchuen *et al.*, 2009). Αυτό πιθανώς να αφείλεται στην ανεπαρκή ενδοκυττάρια συσσώρευση του TBT, αφού σε μεταλλαγμένα στελέχη *pdr5Δ* που έφεραν διαγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αντίστασης σε πολλαπλά φάρμακα Pdr5, η IC_{50} και η LC_{50} μειώθηκαν σε $0,2 \mu M$ και $3,0 \mu M$ αντίστοιχα (Chahomchuen *et al.*, 2009).

Όμως, τα κύτταρα, στα οποία χορηγήθηκαν $10,0 \mu M$ TBT εμφάνισαν μορφολογικές αλλοιώσεις στον πυρήνα που περιελάμβαναν αυξημένο κατακερματισμό της χρωματίνης παράλληλα με την αύξηση του αριθμού των νεκρών κυττάρων. Επιπλέον, κατά την έκθεση στον TBT παρατηρήθηκε αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και προτάθηκε ότι, ο TBT επάγει την απόπτωση, τόσο στον σακχαρομύκητα όσο και σε πολλά κύτταρα θηλαστικών, μέσω εξαρτώμενων από την κασπάση $\gamma Ca1p$ μηχανισμών, πιθανώς καθοδικά της παραγωγής ROS (Chahomchuen *et al.*, 2009) (Εικόνα 1.6).

Στα θυμοκύτταρα αρουραίου έχειδειχθεί ότι η αποπτωτική οδός που ακολουθείται από τις ενώσεις οργανοκασσιτέρου ξεκινά με αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i, συνεχίζεται με την απελευθέρωση ROS και κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, ενεργοποίηση κασπασών και τέλος καταλήγει σε κατακερματισμό του DNA (Gennari *et al.*, 2000).

Οι ROS παράγονται κυρίως στα μιτοχόνδρια ως παραπροϊόν του μεταβολισμού κατά την μετατροπή του μοριακού O_2 σε H_2O . Στις ROS περιλαμβάνονται η ρίζα υπεροξειδίου ($\cdot O_2^-$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και η ρίζα υδροξειδίου ($\cdot OH^-$) (Zafarullah *et al.*, 2003). Η απόπτωση είναι προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, και μπορεί να οφείλεται σε ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες, όπως ROS, βαρέα μέταλλα, φάρμακα, και συνήθως αφορά γηρασμένα κύτταρα ή κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί μεταλλάξεις (Azzopardi *et al.*, 2017).

Η παραγωγή ROS επάγει το οξειδωτικό stress το οποίο προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 (Flattery-O'Brien and Dawes, 1998 · Chiu *et al.*, 2011). Έχει αναφερθεί ότι, φυσιολογικά, οι καλλιέργειες του *S. cerevisiae* BY4741 περιέχουν 55-60% κύτταρα στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου (μη διαιρούμενα – unbudded), ενώ μετά από 6-12 h επώασης παρουσία TBT, η αναλογία αυτή αυξήθηκε σε ~75%, υποδηλώνοντας ότι ο TBT προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση (Sekito *et al.*, 2014) (Εικόνα 1.4). Επίσης, σε συγχρονισμένες καλλιέργειες με τη χρήση νοκοδαζόλης, ένα δηλητήριο της ατράκτου που αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στη G2/M φάση (Storrie and Yang, 1998), μετά την απομάκρυνση της νοκοδαζόλης και την προσθήκη 5,0 μM TBT παρατηρήθηκε συσσώρευση των μη διαιρούμενων κυττάρων (Sekito *et al.*, 2014) (Εικόνα 1.4). Σε αυτές τις καλλιέργειες, με την προσθήκη N-ακετυλκυστεΐνης, η οποία εξουδετερώνει τις ROS (Aruoma *et al.*, 1989), συνδέθηκε μερικώς η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη G1 φάση από τον TBT με την παραγωγή ROS, χωρίς να αποκλειστεί η επίδραση του TBT στην πορεία του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 1.4) μέσω και άλλων διακριτών μηχανισμών (Sekito *et al.*, 2014).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του TBT στα κύτταρα του *S. cerevisiae*, με στόχο τη μελέτη των επιδράσεων και αλληλεπιδράσεων του TBT με τις βιολογικές διεργασίες των ευκαρυωτικών κυττάρων και οργανισμών. Συγκεκριμένα μελετήθηκε

- (α) η επίδραση εφάπαξ ή/και επαναλαμβανόμενης χορήγησης διαφόρων δοσολογικών σχημάτων TBT στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη μορφολογία των κυττάρων του *S. cerevisiae*, σε διαφορετικές φάσεις της ανάπτυξης ασύγχρονων πληθυσμών του σακχαρομύκητα,
- (β) η επίδραση του TBT στο μεταβολικό προφίλ του σακχαρομύκητα, και κυρίως στα επίπεδα γλυκόζης, τρεαλόζης και γλυκογόνου στις καλλιέργειες,
- (γ) η πρόκληση από τον TBT επιγενετικών αλλοιώσεων στον σακχαρομύκητα που σχετίζονται με μεταλλάξεις *petite*, και
- (δ) η πιθανότητα ανάπτυξης εν δυνάμει προστατευτικών ή/και προσαρμοστικών μηχανισμών κυτταρικού stress κατά τη χρόνια έκθεση του σακχαρομύκητα σε υποτοξικές συγκεντρώσεις TBT.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1. Στέλεχος του σακχαρομύκητα

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2366, το οποίο αγοράστηκε από την American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) και διατηρούνταν στους 4 °C σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Αρχικά, είχε προσδιορισθεί ως *Saccharomyces cerevisiae* με βάση την αλληλουχία του DNA, αλλά εκ των υστέρων, προσδιορίστηκε ως *Saccharomyces pastorianus* Reess ex Hansen ATCC® 2366™ (ATCC, 2020) (βλέπε Παράρτημα Ι). Αν και η ταυτότητά του χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, σε όλη την εργασία αναφέρεται με την αρχική ταυτοποίηση ως *S. cerevisiae* ATCC 2366.

2.1.2. Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια

Οι χημικές ουσίες και τα αντιδραστήρια αναφέρονται στον Πίνακα 2.1. Τα συστατικά των θρεπτικών υποστρωμάτων αναφέρονται στον Πίνακα 2.2. Τα διαλύματα και τα θρεπτικά υποστρώματα περιγράφονται στον Πίνακα 2.3.

Η παρασκευή των στερεών (ΥΑ) και υγρών (ΥΒ) θρεπτικών υποστρωμάτων γινόταν με διάλυση των συστατικών τους σε απιονισμένο νερό (d.H₂O) μέχρι βρασμού και αποστείρωση σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκαυστο, Π. Καϊμακέλης, Περιστέρι, Αθήνα), σε θερμοκρασία 121 °C και πίεση 1,2 Atm για 20 min.

Πίνακας 2.1. Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια.

Όνομα	Cas Nr	Προμηθευτής
CaCl ₂	10043-52-4	Sds, France
CH ₃ COONa	127-08-2	Merck, Germany
H ₂ SO ₄	7664-93-9	Merck, Germany
HCl	7647-01-0	Merck, Germany
KCl	7447-40-7	Merck, Germany
KOH	1310-58-3	Merck, Germany
NaCl	7647-14-5	Mallinckrodt, USA
NaHCO ₃	144-55-8	Merck, Germany
NaOH	1310-73-2	Merck, Germany
Αιθυλική αλκοόλη	64-17-5	Riedel-de Haën AG, Germany
Αμυλογλυκοσιδάση	EC 3.2.1.3	Sigma-Aldrich, USA
Ανθρόνη	90-44-8	Sigma-Aldrich, USA
Γλυκόζη (USP anhydrous)	50-99-7	Mallinckrodt, USA
Διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO)	67-68-5	Ferak, Germany
Κυανούν του μεθυλενίου (methylene blue, MB)	61-73-4 (122965-43-9)	Merck, Germany
Τρεαλόζη	6138-23-4	Serva, Germany
Τριβουτυλοκασσίτερος χλωριούχος (TBT)	1461-22-9	Dr Ehrenstorfer (LGC Standards)
Τριχλωροξικό οξύ (TCAC)	76-03-9	Merck, Germany

USP, United States Pharmacopeia · CAS Nr: μοναδικός, χαρακτηριστικός αριθμός για κάθε χημική ουσία που πιθανόν να έχει περισσότερες ονομασίες, έτσι ώστε αυτή να ταυτοποιείται αδιαμφισβήτητα.

Πίνακας 2.2. Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των θεραπευτικών υποστρωμάτων.

Όνομα	Κατασκευαστής
Άγαρ (agar bacteriological)	Oxoid Ltd, UK
Γλυκερόλη	Sigma-Aldrich, USA
Δεξτρόζη	Merck, Germany
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	Oxoid Ltd, UK
Πεπτόνη (mycological peptone)	Oxoid Ltd, UK

Πίνακας 2.3. *Θρεπτικά υποστρώματα και διαλύματα.*

	Συστατικά	Συγκέντρωση	Διαλύτης
Θρεπτικά υποστρώματα			
Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (YB)	Εκχύλισμα ζύμης	0,3% (w/v)	H ₂ O
	Πεπτόνη	0,5% (w/v)	
	Δεξτρόζη	1,0% (w/v)	
Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (YA) [pH 5,2-5,3]	Εκχύλισμα ζύμης	0,3% (w/v)	H ₂ O
	Πεπτόνη	0,5% (w/v)	
	Δεξτρόζη	1,0% (w/v)	
	Άγαρ	1,5% (w/v)	
Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα γλυκερόλης (YAG)	Εκχύλισμα ζύμης	0,3% (w/v)	H ₂ O
	Πεπτόνη	0,5% (w/v)	
	Γλυκερόλη	2,0% (w/v)	
	Άγαρ	1,5% (w/v)	
Διαλύματα			
Αμυλογλυκοσιδάση		1 mg/ml (40 IU/mg)	H ₂ O
Ανθρόνη		500 mg/L	72% (v/v) H ₂ SO ₄
HCl		5 N	H ₂ O
KOH		20% (w/v)	H ₂ O
NaOH		1 N	H ₂ O
Ρυθμιστικό διάλυμα Ringer [pH 7,3-7,4]	CaCl ₂	0,024 % (w/v)	H ₂ O
	KCl	0,042 % (w/v)	
	NaCl	0,09 % (w/v)	
	NaHCO ₃	0,05 % (w/v)	
	Δεξτρόζη	0,10 % (w/v)	
Ρυθμιστικό διάλυμα [pH 5.0]	CaCl ₂	0,56 % (w/v)	H ₂ O
	Οξικό κάλιο	4,10 % (w/v)	
Τριβουτυλοκασσίτερος (TBT)		5,0 - 31,5 μM	0,05% (v/v) DMSO
Τριχλωροξικό οξύ (TCAc)		0,5 M	H ₂ O
Χρώση κυανού του μεθυλενίου (MB)		0,01 % (w/v)	H ₂ O
DMSO, διμεθυλοσουλφοξειδίο			

Στη συνέχεια, το ΥΑ μοιραζόταν σε δείγματα ~15 mL, με ασηπτικές τεχνικές, σε πλαστικά τρυβλία Petri μιας χρήσης Ø 9.0 cm (Thermo Scientific™ Sterilin™, Newport, UK), εντός θαλάμου καθέτου νηματικής ροής εξοπλισμένο με φίλτρο HEPA και λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας 250-260 nm (Holten HV 2460, βιοασφάλειας II, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA).

Ο έλεγχος της στειρότητας των θρεπτικών μέσων γινόταν με επώαση σε επωαστικό κλίβανο (Astell Hearson, Kent, UK) στους 27 °C για 48 h. Τα υλικά φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4 °C μέχρι τη χρήση τους.

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Διάλυση του τριβουτυλοκασσίτερου (TBT)

Λόγω της μη διαλυτότητας του TBT στο H₂O, μετά από μελέτη της υπάρχουσας βιβλιογραφίας (pubchem, 2020a), ως διαλυτικό μέσο επιλέχθηκε το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).

Πιλοτικά πειράματα, στα οποία μελετήθηκε η ικανότητα διάλυσης του TBT στο DMSO, καθώς και η επίδραση εύρους συγκεντρώσεων 0,05 - 15% (v/v) DMSO σε καλλιέργειες του σακχαρομύκητα που επώαστηκαν σε ΥΒ στους 27 °C για 72 h, έδειξαν ότι 0,05% (v/v) DMSO ήταν αποδεκτή συγκέντρωση του διαλυτικού μέσου για τη διερεύνηση των ερωτημάτων που είχαν τεθεί.

2.2.2. Συντήρηση του σακχαρομύκητα

Μία διακριτή αποικία από διήμερη αμιγή καλλιέργεια του *S. cerevisiae* σε ΥΑ μεταφερόταν σε 5 mL ΥΒ με αποστειρωμένο σε λύχνο Bunsen βρόγχο ενοφθαλμισμού (κρίκος). Δείγμα 10 μL από το εναιώρημα επιστρωνόταν ασηπτικά σε ΥΑ και επωαζόταν σε επωαστικό κλίβανο (Astell Hearson, Kent, UK) στους 27 °C επί 48 h.

2.2.3. Καλλιέργεια του σακχαρομύκητα

Η επώαση του σακχαρομύκητα γινόταν στους 27 °C σε επωαστικό κλίβανο. Οι υγρές καλλιέργειες σε ΥΒ γίνονταν σε στείρους σωλήνες πολυπροπυλενίου των 10 mL με πώμα 2 θέσεων κατάλληλο για αερόβια καλλιέργεια (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany), λόγω της τάσης του TBT να προσκολλάται στα γυάλινα τοιχώματα (EN 71-3, European Committee for standardization). Η επώαση του σακχαρομύκητα σε ΥΑ γίνονταν σε πλαστικά τρυβλία Petri μιας χρήσης Ø 9.0 cm.

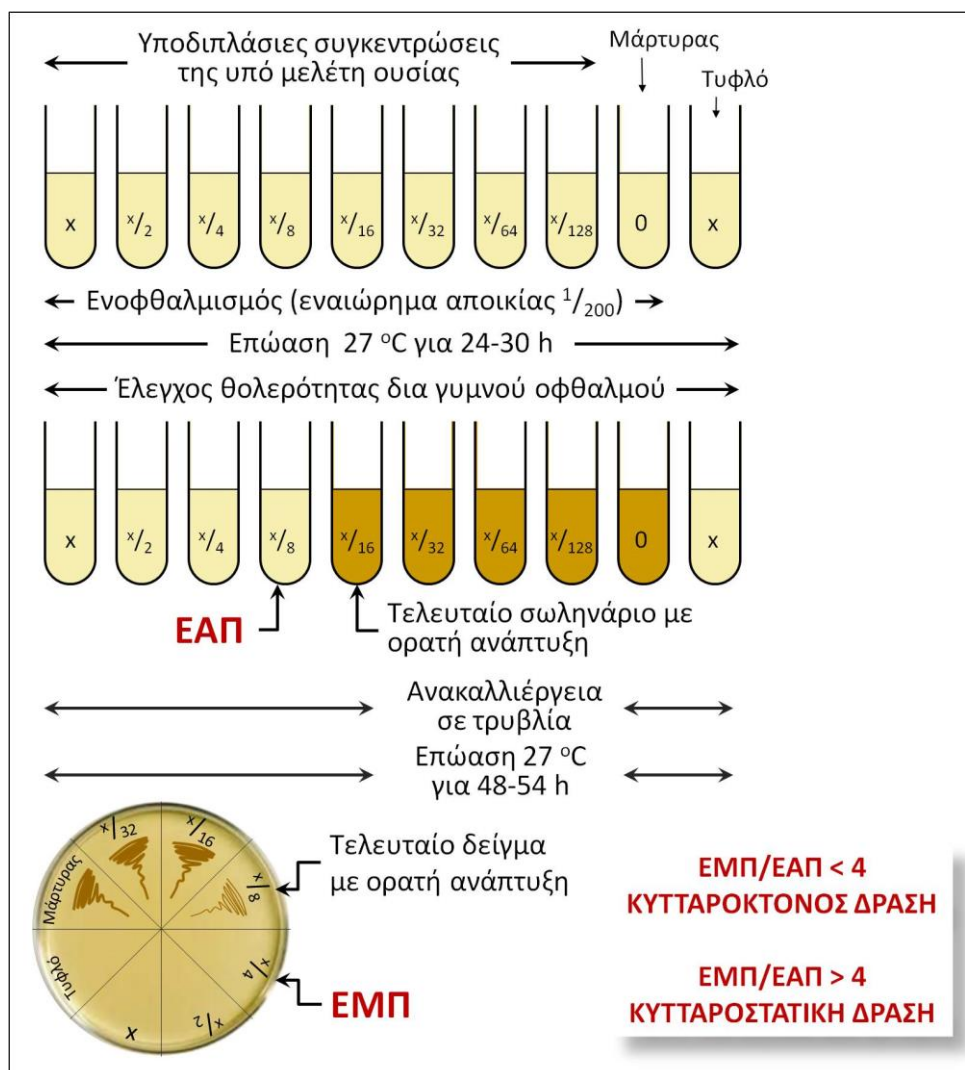
Η μεταφορά των αποικιών και η επίστρωση των δειγμάτων γινόταν με βρόγχο ενοφθαλμισμού νικελοχρωμίου (μικροβιολογικός κρίκος) ή μεταλλικό τρίγωνο. Τα εργαλεία αυτά αποστειρώνονταν αμέσως πριν τη χρήση τους με εμβάπτιση αρχικά σε διάλυμα 70% (v/v) αιθανόλης και στη συνέχεια με ερυθροपुरάκτωση σε γυμνή οξειδωτική φλόγα σε λύχνο Bunsen, και ψύχονταν με βύθιση σε αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό ή αποστειρωμένο ύδωρ.

Τα γυάλινα και μεταλλικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώνονταν σε κλίβανο ξηρής αποστείρωσης στους 160 °C για 2 h. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες, εκτός από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο και τον ποσοτικό προσδιορισμό των σακχάρων πραγματοποιήθηκαν σε άσηπτες συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.

2.2.4. Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής και ελάχιστης μυκητοκτόνου πυκνότητας

Ως ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (ΕΑΠ · Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση μιας ουσίας που μπορεί να προκαλέσει αναστολή της ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού, ενώ ως ελάχιστη μυκητοκτόνος πυκνότητα (ΕΜΠ · Minimum Fungicidal Concentration, MFC) ορίζεται η ελάχιστη

συγκέντρωση μιας ουσίας που μπορεί να σκοτώσει τον μικροοργανισμό (Andrews, 2001 · Espinel-Ingroff *et al.*, 2002). Ο προσδιορισμός τους περιγράφεται σχηματικά στην Εικόνα 2.1.



Εικόνα 2.1. Διαδικασία προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής (ΕΑΠ) και της ελάχιστης μυκητοκτόνου (EMΠ) πυκνότητας στις καλλιέργειες του σακχαρομύκητα. *x*: αρχική συγκέντρωση της προς μελέτη ουσίας

Αναλυτικά, για τον προσδιορισμό της ΕΑΠ, μια διήμερη μονήρης αποικία εμβολιάστηκε σε 5 mL ΥΒ και επώαστηκε στους 27 °C για 2 h μετά από ανάδευση. Δείγμα 100 μL αυτής της δώρης καλλιέργειας αραιώθηκε με 900 μL ΥΒ (αραίωση 1/10).

Ακολούθως, παρασκευάστηκαν 6 διαδοχικά διαλύματα TBT υποδιπλάσιας συγκέντρωσης, από 41,9 μM έως 1,3 μM , σε 0,05% DMSO. Σε διαδοχικά σωληνάρια προστέθηκαν 100 μL εναιωρήματος σακχαρομύκητα, 100 μL διαλύματος TBT διαδοχικής υποδιπλάσιας συγκέντρωσης και 1,8 mL ΥΒ.

Το πρωτόκολλο περιελάμβανε καλλιέργεια-μάρτυρα, που δεν περιείχε TBT και τυφλό δείγμα που δεν εμβολιάστηκε με σακχαρομύκητα.

Τα δείγματα επώαστηκαν στους 27 °C για 48 h. Η ανάπτυξη του σακχαρομύκητα σε κάθε καλλιέργεια εξετάστηκε μακροσκοπικά δια γυμνού οφθαλμού. Από τα σωληνάρια στα οποία δεν παρατηρήθηκε εμφανής ανάπτυξη, η μικρότερη συγκέντρωση της ουσίας που ανέστειλε την ανάπτυξη ορίστηκε ως ΕΑΠ. Από τα σωληνάρια αυτά, δείγμα 10 μL επιστρώθηκε με μικροβιολογικό κρίκο σε τρυβλία που περιείχαν ΥΑ και επώαστηκε στους 27 °C για 48 h. Στο τέλος της επώασης ελέγχθηκε μακροσκοπικά δια γυμνού οφθαλμού τυχόν ανάπτυξη του μύκητα στο ΥΑ. Ως ΕΜΠ, ορίστηκε η συγκέντρωση της ουσίας που δεν επέτρεψε την ανάπτυξη αποικιών στο ΥΑ.

2.2.5. Χρώση των κυττάρων του σακχαρομύκητα

Η χρώση των κυττάρων γινόταν με κυανούν του μεθυλενίου (MB). Η χρωστική αυτή χρωματίζει μπλε μόνο τα νεκρά κύτταρα ενώ τα ζωντανά παραμένουν άχρωμα λόγω των ενεργών μεταβολικών διεργασιών για τον καταβολισμό της χρωστικής (Painting and Kirsop, 1990 · Sevcik and Dunford, 1991).

Η χρωστική αποστειρωνόταν πριν τη χρήση με διηθητικό ηθμό 0,22 μm (Millex®- OR, Merck Millipore Ltd, Ireland). Δείγμα 20-100 μL της κάθε καλλιέργειας αραιωνόταν κατάλληλα με ρυθμιστικό διάλυμα Ringer. Ακολουθούσε χρώση των κυττάρων με 10 μL 0,01‰ (w/v) MB (Lee *et al.*, 1981 · Tiligada *et al.*, 1996).

2.2.6. Προσδιορισμός της ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης του σακχαρομύκητα

Μία διακριτή αποικία από διήμερη καλλιέργεια του *S. cerevisiae* σε ΥΑ εμβολιαζόταν σε 5 mL ΥΒ. Ακολουθούσε επώαση σε επωαστικό κλίβανο στους 27 °C επί 2 h. Δείγμα 100 μL της καλλιέργειας αυτής εμβολιαζόταν υπό άσηπτες συνθήκες σε τελικό όγκο 2 mL ΥΒ. Η χρονική αυτή στιγμή θεωρείτο η έναρξη της επώασης ($t = 0$).

Ακολουθούσε επώαση σε επωαστικό κλίβανο στους 27 °C. Η ανάπτυξη παρακολουθούταν μέσω προσδιορισμού του αριθμού των κυττάρων σε κάθε καλλιέργεια (Paramichael *et al.*, 2006 · Delitheos *et al.*, 2010), για χρονικό διάστημα έως και 48 h, αναλόγως των απαιτήσεων του πειραματικού πρωτοκόλλου.

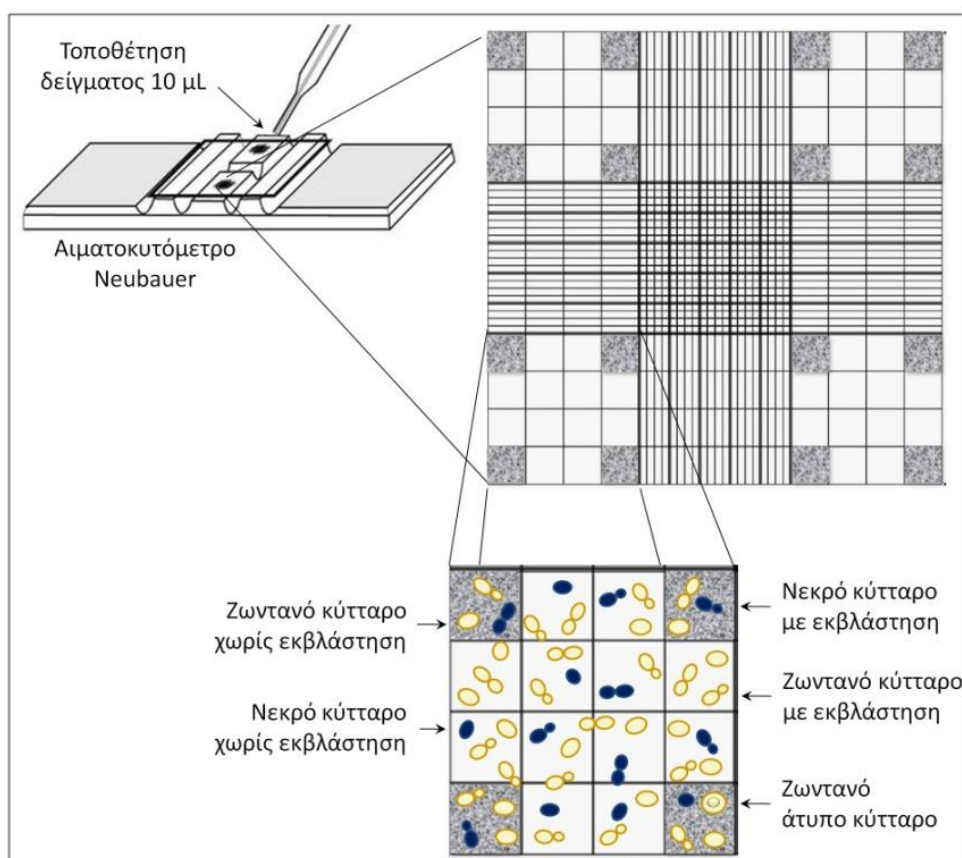
Ο αριθμός των κυττάρων του σακχαρομύκητα σε κάθε καλλιέργεια προσδιοριζόταν σε απλό μικροσκόπιο (Zeiss, Germany) και σε μεγέθυνση x400 με τη βοήθεια αιματοκυτομέτρου Neubauer, με μέτρηση των κυττάρων έπειτα από κατάλληλη αραιώση με ρυθμιστικό διάλυμα Ringer (Πίνακας 2.3) ώστε ο συνολικός αριθμός τους να κυμαίνεται μεταξύ 50-100 κύτταρα/10 μL. Σε κάθε βήμα η καλλιέργεια αναδευόταν ώστε το δείγμα να είναι όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφο και αντιπροσωπευτικό του πληθυσμού. Στη συνέχεια, 10 μL του δείγματος τοποθετούνταν στο αιματοκυτόμετρο Neubauer. Ακολούθως παρατηρούνταν στο απλό μικροσκόπιο και καταγράφονταν ο συνολικός αριθμός των κυττάρων, καθώς και η εκατοστιαία αναλογία των ζωντανών και νεκρών κυττάρων, αυτών με και χωρίς εκβλάστηση και αυτών με τυχόν μορφολογικές αλλοιώσεις (Εικόνα 2.2). Τα τελευταία χαρακτηρίστηκαν ως άτυπα κύτταρα.

Η ανάπτυξη του σακχαρομύκητα προσδιορίστηκε από τον αριθμό των κυττάρων σε κάθε δείγμα που εκφράστηκε ως *αριθμός κυττάρων / mL καλλιέργειας* (Εικόνα 2.2). Οι καμπύλες ανάπτυξης του

σακχαρομύκητα απεικονίστηκαν με γραφικές παραστάσεις με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Microsoft Excel® 2007.

Ο πολλαπλασιασμός του σακχαρομύκητα προσδιορίσθηκε από την εκατοστιαία αναλογία των κυττάρων με εκβλάστηση σε κάθε δείγμα και εκφράστηκε είτε ως εκατοστιαίο ποσοστό είτε ως *αριθμός κυττάρων με εκβλάστηση / mL καλλιέργειας*.

Ως επιβίωση του σακχαρομύκητα ορίστηκε η εκατοστιαία αναλογία των ζωντανών κυττάρων σε κάθε δείγμα και εκφράστηκε είτε ως εκατοστιαίο ποσοστό είτε ως *αριθμός ζωντανών κυττάρων / mL καλλιέργειας*.



Εικόνα 2.2. Προσδιορισμός ανάπτυξης του σακχαρομύκητα με αιματοκυτόμετρο Neubauer. Αριθμός κυττάρων / mL καλλιέργειας = αριθμός κυττάρων στα 16 σκιασμένα τετράγωνα του αιματοκυτομέτρου \times αραιώση του δείγματος $\times 10^4$.

2.2.7. Προσδιορισμός της ικανότητας σχηματισμού αποικιών

Κάθε αποικία που αναπτύσσεται στην επιφάνεια ενός τρυβλίου μετά την επιστροφή ενός δείγματος καλλιέργειας σε ΥΑ προέρχεται από ένα μόνο ζωντανό κύτταρο του σακχαρομύκητα και αντανακλά την ικανότητα των κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες (Colony Forming Unit, CFU) (Vonou *et al.*, 2004 · Paramichael *et al.*, 2006 · Delitheos *et al.*, 2010). Ο αριθμός των CFUs σε ένα τρυβλίο Petri με ΥΑ θεωρήθηκε ότι υποδηλώνει τον πληθυσμό των βιώσιμων κυττάρων του μύκητα που διατηρούν την ικανότητα πολλαπλασιασμού (Vonou *et al.*, 2004 · Paramichael *et al.*, 2006 · Delitheos *et al.*, 2010).

Για τον προσδιορισμό των CFUs, 100 μ L από την καλλιέργεια προς μελέτη αραιωνόταν με την κατάλληλη αραιώση με ΥΒ έτσι ώστε να προκύψει διάλυμα που περιείχε περίπου 1000 κύτταρα / mL. Δείγμα 100 μ L από την αραιωμένη καλλιέργεια επιστρωνόταν υπό άσηπτες συνθήκες και με τη βοήθεια μικροβιολογικού τριγώνου σε τρυβλία με ΥΑ. Μετά από επώαση στους 27 °C για 48 h γινόταν μακροσκοπική παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των αποικιών με γυμνό οφθαλμό και μέτρηση του αριθμού των CFUs (Mirisola *et al.*, 2014).

2.2.8. Έλεγχος μεταλλάξεων *petite*

Οι αποικίες που χαρακτηρίζονται ως *petite*, λόγω του μικρού τους μεγέθους σε σχέση με τις φυσιολογικές αποικίες, δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν ως πηγή άνθρακα γλυκερόλη ή αιθανόλη, ενώ σχηματίζουν μικρές αποικίες σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν γλυκόζη (Day, 2013). Για τον έλεγχο της παρουσίας μεταλλάξεων *petite* ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην §2.2.7, με την διαφοροποίηση ότι τα τρυβλία Petri περιείχαν, αντί για ΥΑ, στερεό θρεπτικό υλικό γλυκερόλης (YAG).

2.2.9. Προσδιορισμός του χρόνου διπλασιασμού του σακχαρομύκητα

Ο ρυθμός ανάπτυξης του σακχαρομύκητα προσδιορίστηκε με τον υπολογισμό του χρόνου διπλασιασμού (T_d) του κυτταρικού πληθυσμού κατά την λογαριθμική φάση της καλλιέργειας, σύμφωνα με την εξίσωση (2.1) και με την αποδοχή ότι κάθε κύτταρο διπλασιάζεται σε κάθε κυτταρικό κύκλο

$$T_d = 1/f \quad (2.1)$$

όπου, f η συχνότητα των κυτταρικών κύκλων ανά μονάδα του χρόνου, η οποία υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση (2.2)

$$N_t = N_0 2^{tf} \Rightarrow f = \frac{1}{t} * \log_2 \left(\frac{N_t}{N_0} \right) \quad (2.2)$$

όπου, N_0 και N_t ο αριθμός των κυττάρων στις 4 h και 6 h επώασης, αντίστοιχα.

Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η εξίσωση (2.3) με αντίστοιχα αποτελέσματα

$$T_d = (t_i - t_0) * \left[\frac{\log(2)}{\log(N_i/N_0)} \right] \quad (2.3)$$

όπου t_i και t_0 είναι ο τελικός και αρχικός χρόνος και N_i και N_0 ο αριθμός των κυττάρων τις χρονικές στιγμές $t_i = 6$ h και $t_0 = 4$ h αντίστοιχα (Sherley *et al.*, 1995).

2.2.10. Έκθεση του σακχαρομύκητα στον TBV

Μία μονήρης αποικία από διήμερη καλλιέργεια του *S. cerevisiae* σε ΥΑ εμβολιαζόταν σε 5 mL ΥΒ και επωαζόταν επί διώρου σε επωαστικό κλίβανο στους 27 °C. Μετά το πέρας του διώρου, 100 μ L της καλλιέργειας αυτής εμβολιαζόταν υπό άσηπτες συνθήκες σε τελικό όγκο 2 mL ΥΒ.

Ο TBT χορηγήθηκε στις καλλιέργειες του σακχαρομύκητα στις τρεις διαφορετικές φάσεις της ανάπτυξης ως ακολούθως:

- Λανθάνουσα φάση

Εφάπαξ χορήγηση TBT κατά την έναρξη της επώασης ($t = 0$) σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούσαν στο ήμισυ της ΕΑΠ, στην ΕΑΠ, στη διπλάσια και τριπλάσια της ΕΑΠ (δηλαδή 5,0 · 10,5 · 21,0 και 31,5 μM)

- Λογαριθμική φάση

(α) Εφάπαξ χορήγηση 10,5 μM TBT κατά την έναρξη της εκθετικής φάσης ($t = 3 \text{ h}$).

(β) Επαναλαμβανόμενη χορήγηση 10,5 μM TBT ανά μία ώρα από την 3η έως την 6η ώρα επώασης.

- Μεταλογαριθμική φάση

(α) Εφάπαξ χορήγηση 10,5 μM TBT σε $t = 22 \text{ h}$.

(β) Επαναλαμβανόμενη χορήγηση 10,5 μM TBT ανά δύο ώρες, από την 22η έως την 26η ώρα επώασης.

Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνονταν καλλιέργεια-μάρτυρας, όπου γινόταν προσθήκη μόνο DMSO και όχι TBT.

2.2.11. Προσδιορισμός της μέσης ανασταλτικής (ID_{50}) και μέσης θανατηφόρου (LD_{50}) δόσης

Ο υπολογισμός της μέσης ανασταλτική δόσης (ID_{50}), καθώς και της μέσης θανατηφόρου δόσης (LD_{50}) του TBT έγινε με το μοντέλο αντίστροφης κανονικής συνάρτησης (probit) λογιστικής παλινδρόμησης (regression). Με την ίδια διαδικασία υπολογίστηκαν η δόση του TBT που ανέστειλε την ανάπτυξη (ID_{99}) και εκείνη που προκάλεσε θάνατο στο 99% του υπό μελέτη πληθυσμού (LD_{99}).

2.2.12. Προεπώαση με TBT

Η πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο TBT διερευνήθηκε πιλοτικά μέσω προεπώασης του σακχαρομύκητα παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης TBT που αντιστοιχούσε στο 1/10 της ΕΑΠ. Συγκεκριμένα, μία μονήρης αποικία από διήμερη καλλιέργεια εμβολιάστηκε σε 5 mL ΥΒ και επώαστηκε επί διώρου σε επωαστικό κλίβανο στους 27 °C. Μετά το πέρας του διώρου, 100 μ L της καλλιέργειας εμβολιάστηκαν σε ΥΒ τελικού όγκου 2 mL που περιείχε 1,05 μ M TBT. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν παρουσία 1,05 TBT

- επί 3 h από την έναρξη της επώασης. Κατόπιν χορηγήθηκαν 3 δόσεις 10,5 μ M TBT στις 3, 4 και 5 h επώασης.
- επί 72 h. Δείγμα 100 μ L αυτής της καλλιέργειας εμβολιάστηκε σε ΥΒ τελικού όγκου 2 mL και κατόπιν χορηγήθηκαν 31,5 μ M TBT στις 3 h επώασης.

Σε κάθε πείραμα περιελήφθη καλλιέργεια-μάρτυρας, στην οποία είχε γίνει προεπώαση μόνο με DMSO, καθώς και μία καλλιέργεια στην οποία γινόταν εμβολιασμός με TBT όπως και στην προεπωασμένη με 1,05 μ M TBT καλλιέργεια.

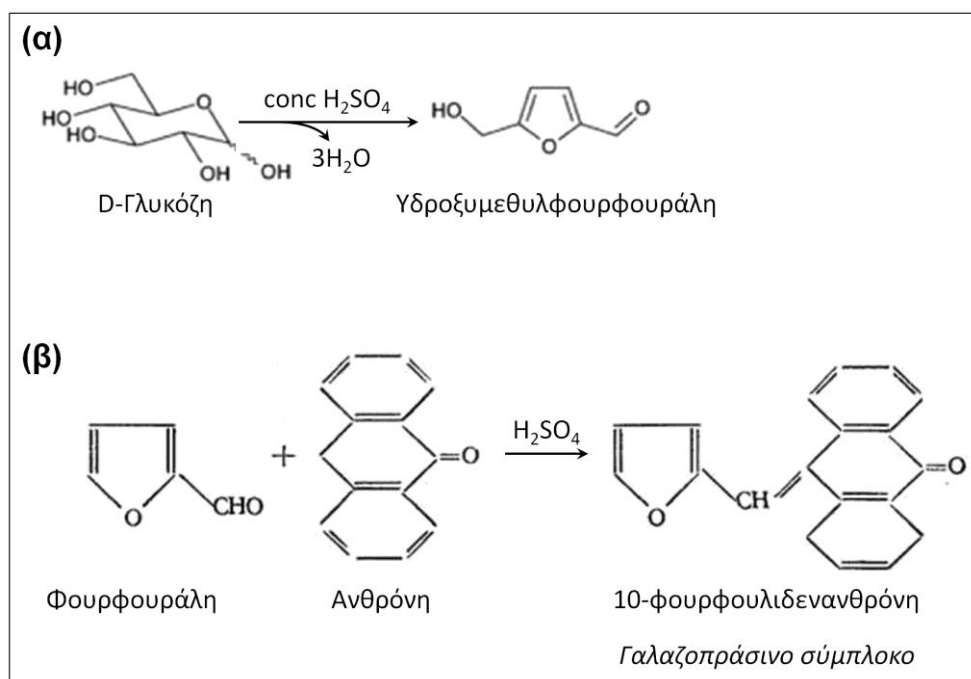
2.2.13. Δειγματοληψία

Σε όλες τις περιπτώσεις παραλαμβάνονταν 10-100 μ L κάθε καλλιέργειας σε διάφορα χρονικά σημεία της επώασης, ανάλογα με τη φάση στην οποία χορηγούταν ο TBT, και προσδιοριζόταν η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση του σακχαρομύκητα όπως περιγράφεται στην §2.2.6. Σε επιλεγμένες καλλιέργειες ελέγχθηκε η ικανότητα του σακχαρομύκητα να σχηματίζει CFUs όπως περιγράφεται στην §2.2.7.

2.2.14. Προσδιορισμός των επιπέδων σακχάρων

Αρχή προσδιορισμού της γλυκόζης με τη δοκιμασία της ανθρόνης

Ο προσδιορισμός των βασικών ενεργειακών μορίων του κυττάρου γλυκόζης, τρεαλόζης και γλυκογόνου βασίζεται στο σχηματισμό παραγώγων φουρφουράλης παρουσία πυκνού H_2SO_4 (conc H_2SO_4) και στην αντίδραση τους με την ανθρόνη για το σχηματισμό γαλαζοπράσινου παραγώγου (Spiro, 1966). Η γλυκόζη παρουσία conc H_2SO_4 συμπυκνώνεται σχηματίζοντας υδροξυ-μεθυλφουρφουράλη, ένα ενδιάμεσο προϊόν με έναν πενταμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο (Εικόνα 2.3α). Η φουρφουράλη αντιδρά με την ανθρόνη και σχηματίζεται ένα γαλαζοπράσινο σύμπλοκο (Εικόνα 2.3β) που μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά στα 620 nm (Spiro, 1966). Οι τιμές της τρεαλόζης και του γλυκογόνου εκφράζονται ως ισοδύναμα γλυκόζης (Lillie and Pringle, 1980).



Εικόνα 2.3. Αντίδραση της γλυκόζης με την ανθρόνη. Παρουσία πυκνού θειϊκού οξέως (conc H_2SO_4) σχηματίζεται υδροξυμεθυλφουρφουράλη ως ενδιάμεσο προϊόν (α), η οποία στη συνέχεια αντιδρά με την ανθρόνη και σχηματίζεται ένα γαλαζοπράσινο σύμπλοκο (β).

Προετοιμασία των κυττάρων του σακχαρομύκητα

Πέντε αποικίες από μία διήμερη καλλιέργεια εμβολιάζονταν σε 5 mL ΥΒ και επωάζονταν στους 27 °C για 2 h. Μετά το τέλος της επώασης, η καλλιέργεια εμβολιαζόταν σε 300 mL ΥΒ ($t = 0$ h). Μετά από 3 h ($t = 3$ h), η καλλιέργεια χωριζόταν σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος (60 mL) προσθέτονταν 30 μ L DMSO σε τελική συγκέντρωση 0,05% (v/v). Στο δεύτερο μέρος (180 mL) προσθέτονταν 90 μ L διαλύματος TBT σε τελική συγκέντρωση 10,5 μ M. Έπειτα από 3, 6, 12 και 22 h επώασης γινόταν δειγματοληψία όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.4. Σε κάθε δείγμα γινόταν προσδιορισμός του αριθμού κυττάρων.

Μετά την παραλαβή του δείγματος γινόταν προσθήκη ίσου περίπου όγκου θρυμματισμένου πάγου και ακολουθούσε φυγοκέντριση σε 1500 x g στους 4 °C για 10 min (Labofuge 400R, Heraeus, Hanau, Germany) (Lillie and Pringle, 1980). Το ίζημα των κυττάρων που προέκυπε πλενόταν 3 φορές με 2 mL d.H₂O και ακολουθούσε φυγοκέντριση σε 1500 x g στους 4 °C για 10 min (Lillie and Pringle, 1980). Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, το ίζημα των κυττάρων φυλασσόταν στους -20 °C μέχρι τη μέτρηση (Lillie and Pringle, 1980).

Πίνακας 2.4. Δειγματοληψία καλλιέργειας για τη μέτρηση των σακχάρων. Το διαφορετικό σχήμα δειγματοληψίας ανάμεσα στις καλλιέργειες-μάρτυρες που επώαζονταν παρουσία διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) και σε αυτές που επώαζονταν παρουσία τριβουτυλοκασσίτερου (TBT) οφειλόταν στον διαφορετικό αριθμό κυττάρων που αναπτύσσονταν στις καλλιέργειες.

Καλλιέργεια-μάρτυρας [0,05% (v/v) DMSO]		
Χρόνος επώασης	Μέτρηση γλυκόζης & τρεαλόζης	Μέτρηση γλυκογόνου
3 h	40 mL	20 mL
6 h	20 mL	5 mL
12 h	10 mL	5 mL
22 h	10 mL	5 mL
Καλλιέργεια παρουσία 10,5 μM TBT		
3 h	-	-
6 h	40 mL	20 mL
12 h	40 mL	20 mL
22 h	40 mL	20 mL

Προετοιμασία των δειγμάτων για τον προσδιορισμό της γλυκόζης και της τρεαλόζης

Για τον προσδιορισμό της γλυκόζης και της τρεαλόζης, στο ίζημα προσθέτονταν 0,5 mL 0,5M TCAc και αφηνόταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 h. Ακολουθούσε φυγοκέντριση σε 1500 x g στους 4 °C για 10 min. Συλλεγόταν το υπερκείμενο και επαναλαμβάνονταν η διαδικασία με προσθήκη στο ίζημα επιπλέον 0,5 mL 0,5 M TCAc, αναμονή 1 h και φυγοκέντριση υπό τις ίδιες συνθήκες. Μετά την συλλογή και του δεύτερου υπερκειμένου, ενωνόνταν τα δύο υπερκείμενα (Lillie and Pringle, 1980). Ο προσδιορισμός της γλυκόζης γινόταν σε 400 μL υπερκειμένου (διάλυμα A).

Για τον προσδιορισμό της τρεαλόζης, σε 200 μL υπερκειμένου γινόταν προσθήκη ίσου όγκου 1N NaOH. Το διάλυμα θερμαινόταν

στους 100 °C για 7 min και μετά από ψύξη παραλαμβάνονταν το υπερκείμενο (διάλυμα Β). Σημειώνεται ότι το NaOH καταστρέφει τη δυνατότητα αντίδρασης της γλυκόζης με την ανθρόνη, δεν επηρεάζει όμως αυτήν της τρεαλόζης (Van Handel, 1985).

Προετοιμασία των δειγμάτων για τον προσδιορισμό του γλυκογόνου

Για τον προσδιορισμό του γλυκογόνου χρησιμοποιούσαν το δεύτερο δείγμα που είχε συλλεχθεί. Τα κύτταρα εμβαπτιζόνταν σε 0,5 mL 20% KOH και θερμαίνονταν στους 100 °C για 1 h προκειμένου να εκχυλιστεί το γλυκογόνο (Gunja-Smith *et al.*, 1977). Ακολουθούσε ψύξη και ρύθμιση του pH ~6-7 με 5N HCl. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη 2 όγκων αιθανόλης για να καθιζάνει το γλυκογόνο (Gunja-Smith *et al.*, 1977). Το διάλυμα αφηνόταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 h. Ακολουθούσε φυγοκέντριση σε 1500 x g στους 4 °C για 10 min. Το ίζημα εκπλενόταν με 67% αιθανόλη και ακολουθούσε φυγοκέντριση σε 1500 x g στους 4 °C για 10 min. Η διαδικασία έκπλυσης επαναλαμβάνονταν 3 φορές. Το ίζημα αφηνόταν να στεγνώσει και στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 800 μL H₂O, ακολουθούμενη από ισχυρή ανάδευση ώστε να δημιουργηθεί εναιώρημα. Στο εναιώρημα περιεχόταν το υδατοδιαλυτό και το αδιάλυτο γλυκογόνο (Gunja-Smith *et al.*, 1977).

Στα 800 μL εναιωρήματος προσθέτονταν 100 μL αμυλογλυκοσιδάσης και 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος pH 5.0 και επωαζόταν σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C για 2 h. Ακολουθούσε φυγοκέντριση σε 1500 x g στους 4 °C για 10 min και συλλογή του υπερκειμένου (διάλυμα Γ) (Gunja-Smith *et al.*, 1977).

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

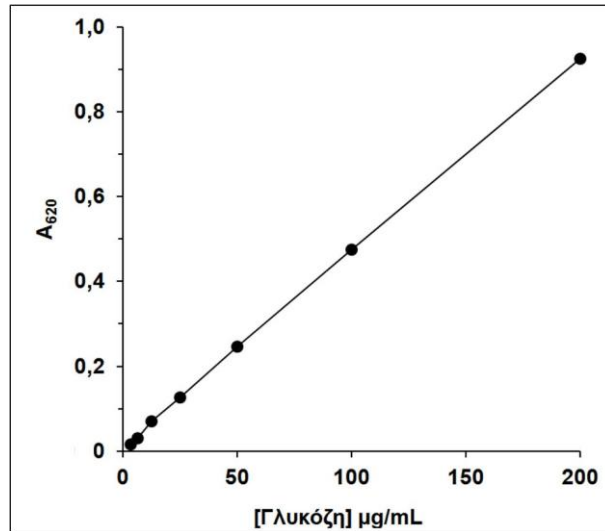
Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης στα δείγματα, αρχικά, παρασκευαζόταν διάλυμα 1 mg/mL (w/v) γλυκόζης σε 0,5 M TCAc. Ακολουθούσε

παρασκευή διαλυμάτων υποδιπλάσεων συγκεντρώσεων γλυκόζης 200–3,125 µg/mL (w/v) σε 0,5 M TCAC και τελικό όγκο 400 µL. Σε κάθε καμπύλη περιλαμβάνονταν ένα τυφλό δείγμα που περιείχε μόνο 0,5 M TCAC.

Ποσοτικός προσδιορισμός σακχάρων

Σε 400 µL από τα διαλύματα Α, Β και Γ, καθώς και από τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν για δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς όπως περιγράφονται παραπάνω, προσθέτονταν 4,6 mL διαλύματος 500 mg/L ανθρόνης σε 72% (v/v) H₂SO₄ και θερμαίνονταν στους 95-100 °C για 15 min (Gunja-Smith *et al.*, 1977). Τα διαλύματα αφήνονταν να ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 20 min. Η μέτρηση της απορρόφησης στα 620 nm (A₆₂₀) (Spiro, 1966) γινόταν σε κλάσμα 200 µL των διαλυμάτων σε πλάκες μικροτιτλοδότησης πολυστυρενίου 96 κελίων (96 well plate · Thermo Scientific™) με τη χρήση φασματοφωτομέτρου (SpectraMax PLUS 384, Molecular Devices, CA, USA).

Σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη αναφοράς (Εικόνα 2.4) και με κατάλληλους υπολογισμούς, τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε µg ισοδυνάμου γλυκόζης/10⁶ κύτταρα με τη χρήση του προγράμματος Microsoft Excel® 2007.



Εικόνα 2.4. Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης στα δείγματα. Συντελεστής συσχέτισης $r = 0,999$. A_{620} : απορρόφηση στα 620 nm

2.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα IBM® SPSS® Statistics έκδοση 25 (SPSS Inc., IL, USA). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα ($MO \pm SEM$) από n ανεξάρτητες παρατηρήσεις και απεικονίζονται με γραφήματα γραμμών (line chart) ή με ραβδογράμματα (bar charts). Τα κυριότερα χαρακτηριστικά της κατανομής των δεδομένων απεικονίζονται με θηκογράμματα (box plots) και η σχέση μεταξύ δύο μεταβλητών με διαγράμματα διασποράς (scatter plots). Για να καταδειχθεί η συμβολή κάθε κυτταρικού υποπληθυσμού στο σύνολο των κυττάρων μιας καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν γραφήματα σωρευμένων ράβδων (stacked bar chart).

Η σύγκριση μεταξύ δύο ομάδων έγινε με Independent Samples test και Mann-Whitney U test για τις μεταβλητές με κανονική και μη κανονική κατανομή, αντίστοιχα. Η σύγκριση μεταξύ πολλαπλών ομάδων με κανονική κατανομή των μεταβλητών έγινε με ανάλυση

διασποράς (Analysis of Variance - ANOVA), ακολουθούμενη από τη δοκιμασία Scheffe ή Dunnet's T3. Η σύγκριση μεταξύ πολλαπλών ομάδων με μη κανονική κατανομή πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία Kruskal-Wallis H test. Η συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών εκτιμήθηκε με το συντελεστή συσχέτισης r της δοκιμασίας Pearson ή ρ της δοκιμασίας Spearman, με βάση την κατανομή των υπό αξιολόγηση μεταβλητών.

Σε κάθε περίπτωση, αποδεκτό επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το $P < 0.05$, με διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

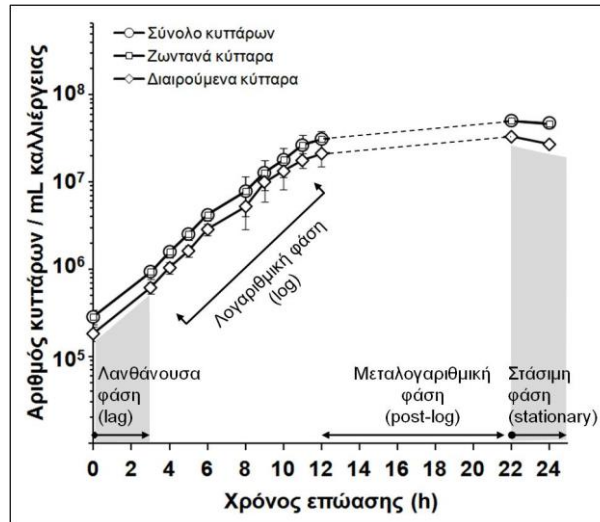
Ερώτημα 1: Ποια είναι τα βασικά χαρακτηριστικά της καμπύλης ανάπτυξης του *S. cerevisiae* ATCC 2366;

3.1. Ανάπτυξη, πολλαπλασιασμός και επιβίωση του *S. cerevisiae* ATCC 2366

Η ανάπτυξη των πληθυσμών και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων του *S. cerevisiae* που επωάζονταν σε ΥΒ στους 27 °C έως 24 h ήταν χρονοεξαρτώμενα χαρακτηριστικά, όπως υποδηλώνουν οι αντίστοιχες τιμές των συντελεστών συσχέτισης του χρόνου επώασης με τον αριθμό των συνολικών (Spearman's $\rho = 0,923 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3-10$) και των διαιρούμενων (Spearman's $\rho = 0,927 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3-10$) κυττάρων.

Επιπλέον, σε όλη τη διάρκεια της επώασης, τα κύτταρα ήταν στην πλειονότητά τους ζωντανά ($99,8 \pm 0,1\%$) και διαιρούμενα ($66,1 \pm 1,0\%$).

Όσον αφορά την καμπύλη ανάπτυξης, αυτή χαρακτηρίστηκε από διακριτές περιοχές που αντιστοιχούσαν στη λανθάνουσα (lag · φάση προσαρμογής), στη λογαριθμική (log · φάση εκθετικής ανάπτυξης), στη μεταλογαριθμική (post-log) και στη στάσιμη φάση (stationary · φάση στασιμότητας) της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Γραφική απεικόνιση της καμπύλης ανάπτυξης του *S. cerevisiae*. Η επώαση έγινε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C έως 24 h. Οι συνεχόμενες γραμμές δείχνουν το χρονικό διάστημα στο οποίο έγιναν μετρήσεις ανά 1-3 h και οι διακεκομμένες το διάστημα στο οποίο δεν έγιναν μετρήσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-8$).

Συμπεράσματα

- ❖ Η ανάπτυξη του *S. cerevisiae* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ήταν χρονοεξαρτώμενη και διακρινόταν στη λανθάνουσα, τη λογαριθμική, τη μεταλογαριθμική και τη στάσιμη φάση (Εικόνα 3.1).
- ❖ Τα δεδομένα ήταν σύμφωνα με προηγούμενες σχετικές αναφορές για το συγκεκριμένο στέλεχος του σακχαρομύκητα (Delitheos *et al.*, 1995 · Tiligada *et al.*, 1999 · Delitheos *et al.*, 2010).

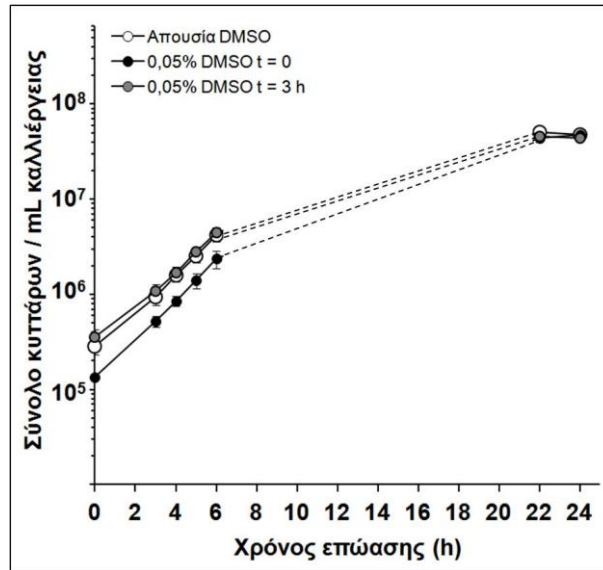
Ερώτημα 2: Πως επιδρά το διαλυτικό μέσο (DMSO) στα χαρακτηριστικά των καλλιέργειών του *S. cerevisiae*;

3.2. Επίδραση του DMSO στις καλλιέργειες του *S. cerevisiae*

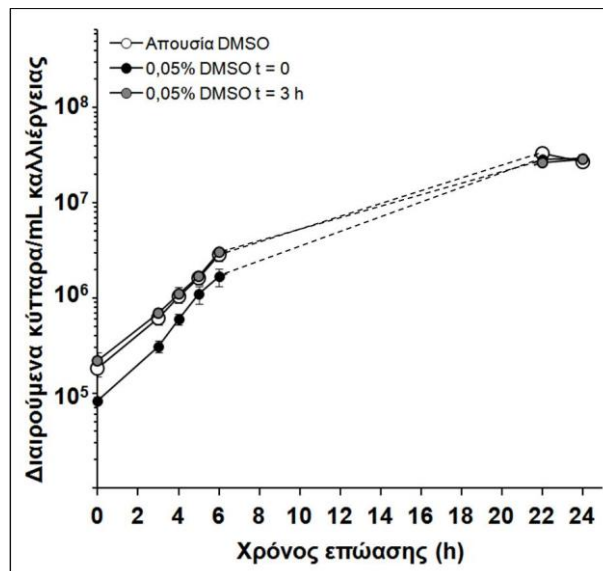
3.2.1. Εφ' άπαξ χορήγηση DMSO

Η χορήγηση 0,05% (v/v) DMSO στην έναρξη ή στις 3 h της επώασης του *S. cerevisiae* δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντικές μεταβολές έως τη στάσιμη φάση, τόσο στην ανάπτυξη [$F(2,40) = 2,123 \cdot P > 0,1 \cdot \text{ANOVA}$ επαναλαμβανόμενων μετρήσεων] (Εικόνα 3.2) και τον πολλαπλασιασμό [$F(2,40) = 0,332 \cdot P > 0,7 \cdot \text{ANOVA}$ επαναλαμβανόμενων μετρήσεων] (Εικόνα 3.3), όσο και στην επιβίωση [$F(2,40) = 2,130 \cdot P > 0,3 \cdot \text{ANOVA}$ επαναλαμβανόμενων μετρήσεων] (Εικόνα 3.4) του σακχαρομύκητα.

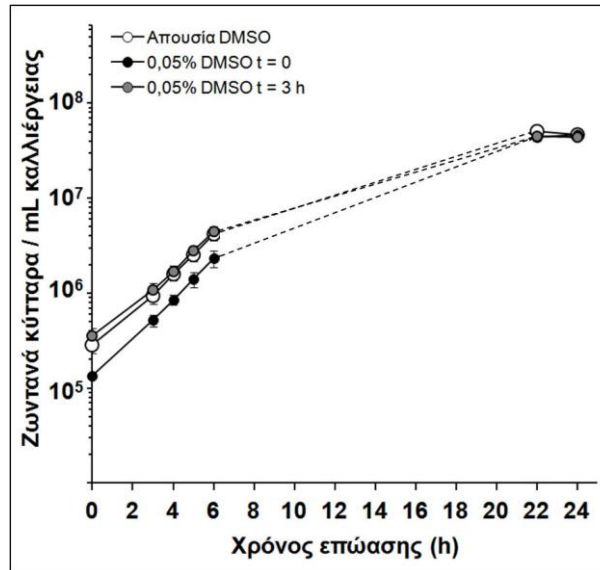
Όπως και στις καλλιέργειες που επώαστηκαν χωρίς την προσθήκη DMSO (Εικόνα 3.1), στις καλλιέργειες όπου χορηγήθηκε DMSO στην έναρξη και στις 3 h επώασης, τα κύτταρα ήταν στην πλειονότητά τους διαιρούμενα ($64,8 \pm 1,3\%$ και $63,8 \pm 1,4\%$, αντίστοιχα) (Εικόνα 3.3) και ζωντανά ($99,8 \pm 0,1\%$ και $99,9 \pm 0,1\%$, αντίστοιχα) (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.2. Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης DMSO στην ανάπτυξη του *S. cerevisiae*. Το DMSO χορηγήθηκε σε τελική συγκέντρωση 0,05% (v/v) στην έναρξη ($t = 0$) ή στις 3 h ($t = 3$ h) της επώασης του σακχαρομύκητα σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C. Οι συνεχόμενες γραμμές δείχνουν το χρονικό διάστημα στο οποίο έγιναν μετρήσεις ανά 1-3 h και οι διακεκομμένες το διάστημα όπου δεν έγιναν μετρήσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 5-10$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο.

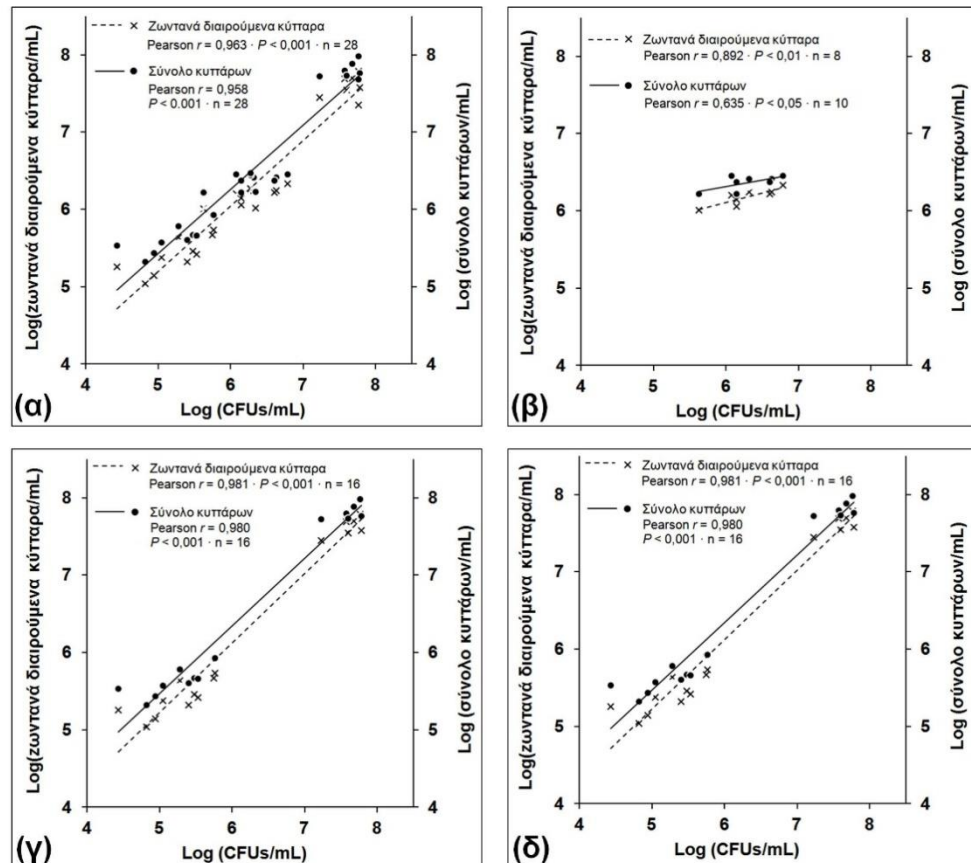


Εικόνα 3.3. Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης DMSO στον πολλαπλασιασμό του *S. cerevisiae*. Το DMSO χορηγήθηκε σε συγκέντρωση 0,05% (v/v) στην έναρξη ($t = 0$) ή στις 3 h ($t = 3$ h) της επώασης του σακχαρομύκητα σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C. Οι συνεχόμενες γραμμές δείχνουν το διάστημα στο οποίο έγιναν μετρήσεις ανά 1-3 h και οι διακεκομμένες το διάστημα όπου δεν έγιναν μετρήσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 5-10$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο.



Εικόνα 3.4. Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης DMSO στην επιβίωση του *S. cerevisiae*. Το DMSO χορηγήθηκε σε τελική συγκέντρωση 0,05% (v/v) στην έναρξη ($t = 0$) ή στις 3 h ($t = 3$ h) της επώασης του σακχαρομύκητα σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C για 24 h. Οι συνεχόμενες γραμμές δείχνουν το χρονικό διάστημα στο οποίο έγιναν μετρήσεις ανά 1-3 h και οι διακεκομμένες το διάστημα όπου δεν έγιναν μετρήσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 5-10$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο.

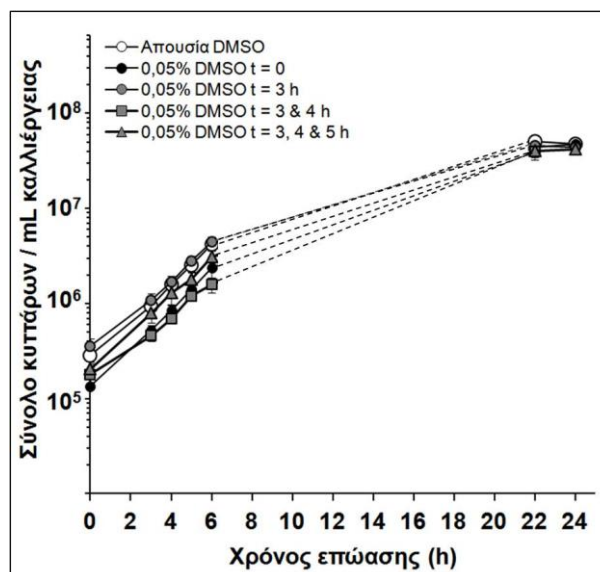
Η συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των σχηματισθέντων αποικιών (CFUs) μετά από επίστρωση δείγματος των καλλιεργειών του σακχαρομύκητα σε ΥΑ και των κυττάρων που μετρήθηκαν μικροσκοπικά στις αντίστοιχες καλλιέργειες ήταν στατιστικά σημαντική τόσο στο σύνολο των δειγμάτων που μελετήθηκαν (Εικόνα 3.5α), όσο και στα δείγματα των καλλιεργειών-μαρτύρων όπου δεν χορηγήθηκε DMSO (Εικόνα 3.5β) ή αυτών που χορηγήθηκε 0,05% (v/v) DMSO στην έναρξη (Εικόνα 3.5γ) ή στις 3 h (Εικόνα 3.5δ) επώασης. Επίσης, σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των CFUs και του υποπληθυσμού των ζωντανών διαιρούμενων κυττάρων του σακχαρομύκητα στις αντίστοιχες καλλιέργειες (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5. Συσχέτιση μεταξύ των CFUs και του αριθμού των κυττάρων που μετρήθηκαν μικροσκοπικά στις αντίστοιχες καλλιέργειες. Διαγράμματα διασποράς των ζευγών τιμών που ελήφθησαν (α) από το σύνολο των δειγμάτων που μελετήθηκαν και από δείγματα καλλιεργείων στις οποίες (β) δεν χορηγήθηκε DMSO, ή χορηγήθηκε 0,05% (v/v) DMSO (γ) στην έναρξη ή (δ) στις 3 h της επώασης του σακχαρομύκητα σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. CFUs: μονάδες με ικανότητα σχηματισμού αποικιών 48 h μετά την επίστρωση του δείγματος σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, DMSO: διμεθυλοσουλφοξειδίο, n: αριθμός παρατηρήσεων, r: συντελεστής συσχέτισης.

3.2.2. Επαναλαμβανόμενη χορήγηση DMSO

Παρατηρήθηκε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της ανάπτυξης και του χρόνου επώασης κατά την έκθεση του σακχαρομύκητα σε 2 ή 3 επαναλαμβανόμενες δόσεις 0,05% (v/v) DMSO στις 3 και 4 h (Spearman's $\rho = 0,989 \cdot P < 0,001 \cdot n = 2$) ή στις 3, 4 και 5 h (Spearman's $\rho = 0,934 \cdot P < 0,001 \cdot n = 5-6$) επώασης (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6. Επίδραση της επαναλαμβανόμενης χορήγησης DMSO στην ανάπτυξη του *S. cerevisiae*. Η ανάπτυξη του σακχαρομύκητα κατά την επαναλαμβανόμενη χορήγηση δόσεων 0,05% (v/v) DMSO στις 3 και 4 h ($t = 3 \text{ \& } 4 \text{ h}$) και στις 3, 4 και 5 h ($t = 3, 4 \text{ \& } 5 \text{ h}$) της επώασης παρουσιάζεται συγκριτικά με αυτήν που παρατηρήθηκε απουσία DMSO ή μετά από εφ' άπαξ χορήγηση της ουσίας στην έναρξη ($t = 0$) ή στις 3 h ($t = 3 \text{ h}$) της επώασης σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C. Οι συνεχόμενες γραμμές δείχνουν το διάστημα στο οποίο έγιναν μετρήσεις ανά 1-3 h και οι διακεκομμένες το διάστημα όπου δεν έγιναν μετρήσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 2-10$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο.

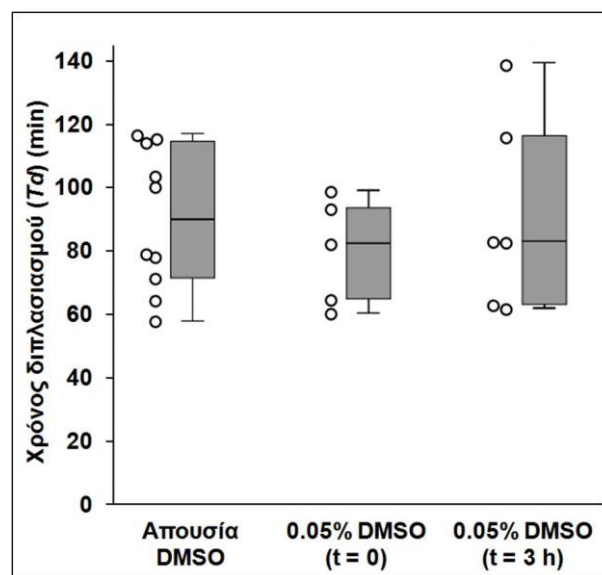
Τα δεδομένα ήταν συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν τόσο κατά την επώαση του σακχαρομύκητα χωρίς έκθεση στο DMSO (Spearman's $\rho = 0,923 \cdot P < 0,001 \cdot n = 8-10$), όσο και μετά από εφ' άπαξ χορήγηση 0,05% (v/v) DMSO στην έναρξη (Spearman's $\rho = 0,954 \cdot P < 0,001 \cdot n = 6$) ή στις 3 h (Spearman's $\rho = 0,853 \cdot P < 0,001 \cdot n = 5-6$) επώασης σε ΥΒ για 24 h (Εικόνα 3.6).

Όπως και στην εφ' άπαξ χορήγηση, στις καλλιέργειες όπου χορηγήθηκαν 2 ή 3 επαναλαμβανόμενες δόσεις 0,05% (v/v) DMSO, τα κύτταρα στην πλειονότητά τους ήταν ζωντανά (100% και $99,9 \pm 0,1\%$ αντίστοιχα) και διαιρούμενα ($69,4 \pm 2,5\%$ και $67,4 \pm 1,5\%$ αντίστοιχα), χωρίς να εντοπιστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές (ANOVA $\cdot P > 0,05 \cdot n = 8-10$) μεταξύ τους.

3.3. Χρόνος διπλασιασμού του *S. cerevisiae*

Κατά τη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης, ο χρόνος διπλασιασμού (Td) του σακχαρομύκητα ήταν $89,4 \pm 7,2$ min ($n = 10$). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή του Td (Kruskal-Wallis H test $\cdot \chi^2 = 0,682 \cdot d.f. = 2 \cdot P > 0,7$) στις καλλιέργειες όπου χορηγήθηκε 0,05% (v/v) DMSO στην έναρξη [$79,0 \pm 7,7$ min ($n = 5$)] ή στις 3 h της επώασης [$90,0 \pm 12,6$ min ($n = 6$)] (Εικόνα 3.7).

Η συχνότητα πολλαπλασιασμού στην αντίστοιχη χρονική περίοδο, ήταν $0,7 \pm 0,1$ ($n = 10$), $0,8 \pm 0,1$ ($n = 5$) και $0,7 \pm 0,1$ ($n = 6$) κύκλοι/h για τις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν απουσία DMSO και για εκείνες που εκτέθηκαν σε 0,05% (v/v) DMSO στην έναρξη και στις 3 h της επώασης, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.7. Χρόνος διπλασιασμού (Td) του *S. cerevisiae* ATCC 2366 κατά τη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης, απουσία DMSO ($n = 10$) και μετά από εφ' άπαξ χορήγηση 0,05% (v/v) DMSO στην έναρξη ($t = 0$) ($n = 5$) ή στις 3 h ($t = 3$ h) ($n = 6$) της επώασης σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με θηκογράμματα (εσωτερική οριζόντια γραμμή: διάμεσος, ύψος σκιασμένου παραλληλογράμμου: ενδοτεταρτημοριακό εύρος Q1 25ο εκατοστημόριο - Q3 75ο εκατοστημόριο, εξωτερικές γραμμές: φράκτες ελάχιστης και μέγιστης τιμής της κατανομής των διακριτών τιμών (λευκοί κύκλοι). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο.

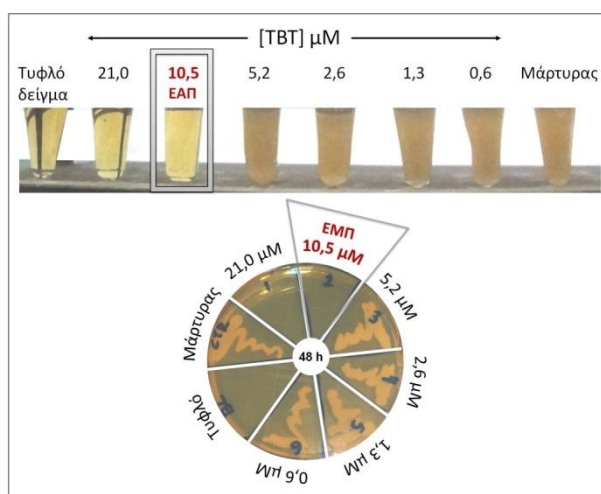
Συμπεράσματα

- ❖ Ο χρόνος διπλασιασμού του σακχαρομύκητα (Εικόνα 3.7) υπολογίστηκε σε $89,4 \pm 7,2$ min και η συχνότητα πολλαπλασιασμού σε $0,7 \pm 0,1$ κύκλους/h.
- ❖ Η εφ' άπαξ ή η επαναλαμβανόμενη χορήγηση 0,05% (v/v) DMSO κατά την έναρξη της λανθάνουσας ($t = 0$) ή της λογαριθμικής ($t = 3$ h) φάσης δεν επηρέασε σημαντικά τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης (Εικόνες 3.2, 3.6), του πολλαπλασιασμού (Εικόνα 3.3) και της επιβίωσης (Εικόνα 3.4) του *S. cerevisiae*.
- ❖ Ως αποδεκτή ομάδα ελέγχου (μάρτυρας) θεωρήθηκε κάθε καλλιέργεια του σακχαρομύκητα που αναπτυσσόταν παρουσία του κατάλληλου σε κάθε περίπτωση δοσολογικού σχήματος 0,05% (v/v) DMSO, υπό τις ίδιες συνθήκες με την αντίστοιχη ομάδα πειραματισμού.

Ερώτημα 3: Ποια είναι η επίδραση του TBT στα χαρακτηριστικά του *S. cerevisiae*; Ασκεί ο TBT χρονοεξαρτώμενες και/ή δοσοεξαρτώμενες δράσεις στον σακχαρομύκητα;

3.4. ΕΑΠ και ΕΜΠ του TBT στον *S. cerevisiae*

Κατά την επώαση του σακχαρομύκητα παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του TBT, τόσο η ελάχιστη ανασταλτική (ΕΑΠ), όσο και η ελάχιστη μυκητοκτόνος (ΕΜΠ) πυκνότητα βρέθηκαν να είναι 10,5 μM (Εικόνα 3.8). Επειδή οι τιμές της ΕΑΠ και ΕΜΠ ταυτίζονταν, ο TBT θεωρήθηκε ως κυτταροκτόνος παράγοντας στον *S. cerevisiae* ATCC 2366.

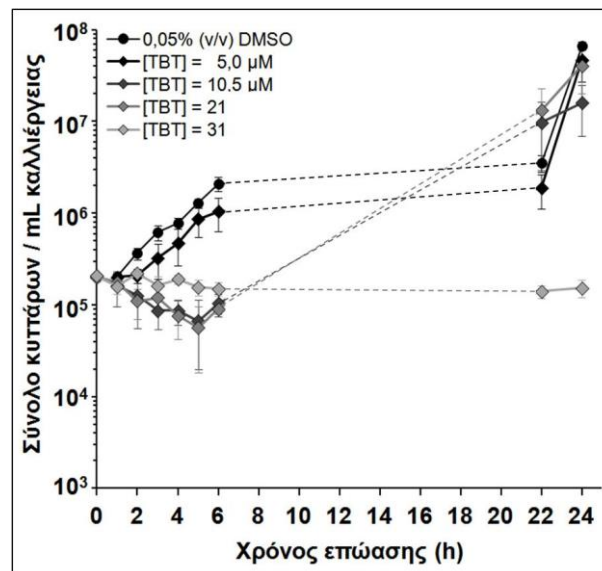


Εικόνα 3.8. Ελάχιστη ανασταλτική (ΕΑΠ) και μυκητοκτόνος (ΕΜΠ) πυκνότητα του TBT. Η καλλιέργεια-μάρτυρας δεν περιείχε TBT αλλά μόνο το διαλυτικό μέσο [0,05% (v/v) διμεθυλοσουλφοξείδιο] και το τυφλό δείγμα δεν περιείχε TBT και δεν εμβολιάστηκε με σακχαρομύκητα. TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

3.5. Εφ' άπαξ χορήγηση του TBT στη λανθάνουσα φάση

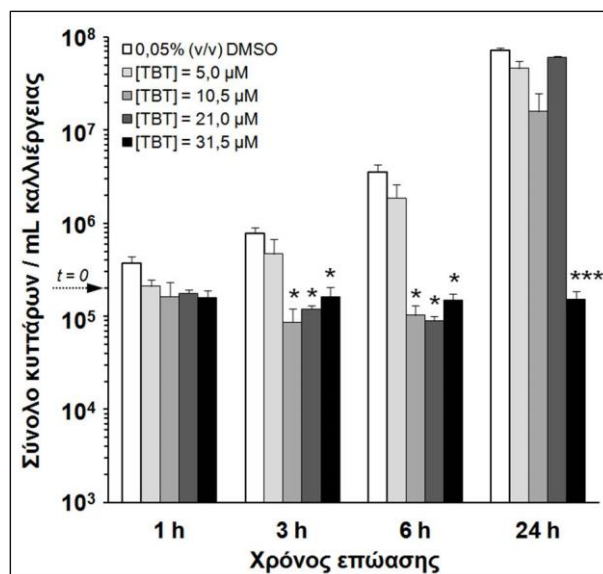
3.5.1. Επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στην ανάπτυξη του σακχαρομύκητα

Η χορήγηση 5,0 μM TBT στη λανθάνουσα φάση είχε ως αποτέλεσμα τη χρονοεξαρτώμενη ανάπτυξη του σακχαρομύκητα έως 24 h επώασης (Spearman's $\rho = 0,882 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3$), όπως και στις καλλιέργειες του μάρτυρα που επώαστηκαν παρουσία 0,05% (v/v) DMSO (Spearman's $\rho = 0,958 \cdot P < 0,001 \cdot n = 6$) (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9. Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στην ανάπτυξη του *S. cerevisiae*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ του συνολικού αριθμού των κυττάρων του σακχαρομύκητα που επώαστηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C για 24 h ($n = 3-6$). Οι συνεχόμενες γραμμές δείχνουν το χρονικό διάστημα στο οποίο έγιναν μετρήσεις ανά 1-2 h και οι διακεκομμένες το διάστημα όπου δεν έγιναν μετρήσεις. DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

Συγκριτικά με τις αντίστοιχες καλλιέργειες του μάρτυρα, η έκθεση σε 5,0 μM TBT δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντικές μεταβολές (ANOVA $\cdot P > 0,1 \cdot n = 3-6$) στον συνολικό αριθμό των κυττάρων σε όλες τις φάσεις της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10. Ανάπτυξη του *S. cerevisiae* μετά από εφ' άπαξ χορήγηση TBT κατά τη λανθάνουσα φάση ($t = 0$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως MO + SEM του συνολικού αριθμού των κυττάρων του σακχαρομύκητα στη λανθάνουσα ($t = 1$ h), στη λογαριθμική ($t = 3$ και 6 h) και στη στάσιμη ($t = 24$ h) φάση της ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C. * · *** $P < 0,05$ · $0,001$ vs ανάπτυξη στην αντίστοιχη φάση των μαρτύρων που είχαν λάβει μόνο DMSO (ANOVA, $n = 3-6$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των $10,5$ μM και $21,0$ μM TBT, ο συνολικός αριθμός των κυττάρων του σακχαρομύκητα δεν συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με τον χρόνο επώασης (Spearman's $\rho = 0,338$ · $P > 0,08$ και $\rho = -0,169$ · $P > 0,4$ αντίστοιχα · $n = 3$) (Εικόνα 3.9). Και στις δύο αυτές συγκεντρώσεις, η έκθεση στο TBT προκάλεσε στατιστικά σημαντική αναστολή της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα κατά τη λογαριθμική φάση (ANOVA · $P < 0,05$ · $n = 3-6$), ενώ παρατηρήθηκε ανάκτηση της φυσιολογικής ανάπτυξης στη στάσιμη φάση (ANOVA · $P > 0,05$ · $n = 3-6$) (Εικόνα 3.10).

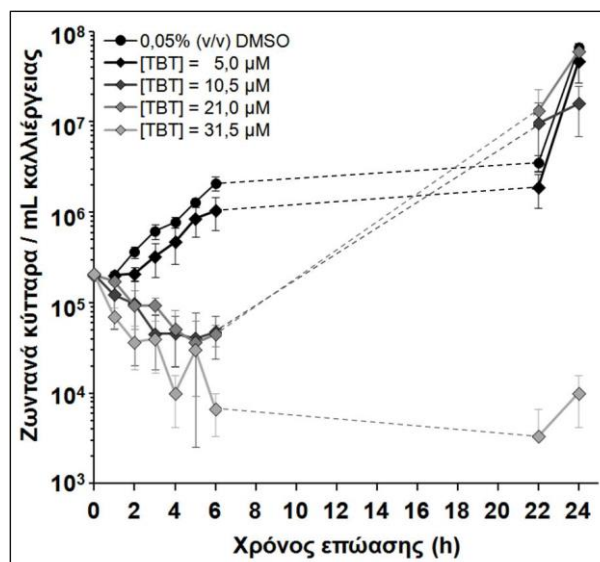
Αντίθετα, η έκθεση του σακχαρομύκητα σε $31,5$ μM TBT στη λανθάνουσα φάση οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση (Spearman's $\rho = -0,393$ · $P < 0,05$ · $n = 3$) μεταξύ του συνολικού αριθμού των κυττάρων και του χρόνου επώασης (Εικόνα

3.9) και, συνεπώς, σε στατιστικά σημαντική (ANOVA · $P < 0,05$ · $n = 3-6$) αναστολή της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα τόσο κατά τη λογαριθμική (ANOVA · $P < 0,05$ · $n = 3-6$), όσο και κατά τη στάσιμη (ANOVA · $P < 0,001$ · $n = 3-6$) φάση (Εικόνα 3.10).

3.5.2. Επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στην επιβίωση του σακχαρομύκητα

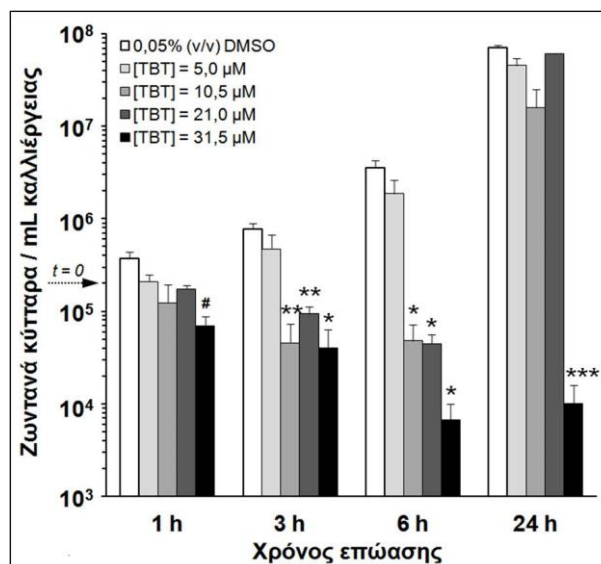
Αντίστοιχα με τον συνολικό αριθμό των κυττάρων (Εικόνα 3.9), χρονοεξαρτώμενη ήταν και η αύξηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων στις καλλιέργειες που επώαστηκαν έως και 24 h παρουσία 5,0 μM TBT (Spearman's $\rho = 0,882$ · $P < 0,001$ · $n = 3$), όπως και στις καλλιέργειες του μάρτυρα (Spearman's $\rho = 0,958$ · $P < 0,001$ · $n = 6$) (Εικόνα 3.11). Σε όλες τις φάσεις που μελετήθηκαν, η έκθεση σε 5,0 μM TBT δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντικές μεταβολές (ANOVA · $P > 0,1$ · $n = 3-6$) στον πληθυσμό των ζωντανών κυττάρων συγκριτικά με τον αντίστοιχο μάρτυρα (Εικόνα 3.12).

Μετά από χορήγηση 10,5 μM και 21,0 μM TBT, ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων δεν συσχετίστηκε με τον χρόνο επώασης (Spearman's $\rho = 0,322$ · $P > 0,1$ και Spearman's $\rho = -0,070$ · $P > 0,7$ αντίστοιχα · $n = 3$) (Εικόνα 3.11). Η έκθεση σε 10,5 μM και 21,0 μM TBT ανέστειλε στατιστικά σημαντικά την επιβίωση του σακχαρομύκητα κατά τη λογαριθμική φάση (ANOVA · $P < 0,05$ · $n = 3-6$). Η επιβίωση αποκαταστάθηκε με την πρόοδο της καλλιέργειας στη στάσιμη φάση (ANOVA · $P > 0,05$ · $n = 3-6$) (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.11. Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBST κατά τη λανθάνουσα φάση στην επιβίωση του *S. cerevisiae*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ του πληθυσμού των ζωντανών κυττάρων του σακχαρομύκητα που επώαστηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C για 24 h ($n = 3-6$). Οι συνεχόμενες γραμμές δείχνουν το χρονικό διάστημα στο οποίο έγιναν μετρήσεις ανά 1-2 h και οι διακεκομμένες το διάστημα όπου δεν έγιναν μετρήσεις. DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBST: τριβουτυλοκασσίτερος.

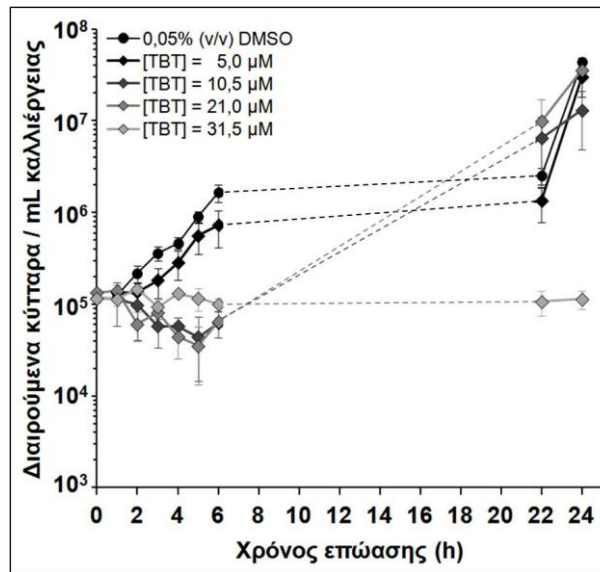
Σε αντίθεση με τις χαμηλότερες δόσεις, κατά την έκθεση του σακχαρομύκητα σε 31,5 μM TBST, ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων μειώθηκε σημαντικά με τον χρόνο επώασης (Spearman's $\rho = -0,692 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3$) (Εικόνα 3.11). Στη συγκέντρωση αυτή, η επιβίωση του σακχαρομύκητα παρουσίασε οριακή μείωση (ANOVA $\cdot P = 0,058 \cdot n = 3-6$) στη λανθάνουσα φάση (ANOVA $\cdot P = 0,058 \cdot n = 3-6$), μειώθηκε στατιστικά σημαντικά κατά τη λογαριθμική φάση ($P < 0,05 \cdot$ ANOVA) και παρέμεινε σημαντικά μικρότερη συγκριτικά με τον μάρτυρα στη στάσιμη φάση (ANOVA $\cdot P < 0,001 \cdot n = 3-6$) της ανάπτυξης (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12. Επιβίωση του *S. cerevisiae* μετά από εφ' άπαξ χορήγηση TBT στη λανθάνουσα φάση ($t = 0$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ του αριθμού των ζωντανών κυττάρων του σακχαρομύκητα στη λανθάνουσα φάση ($t = 1$ h) και στη λογαριθμική ($t = 3$ και 6 h) και στάσιμη ($t = 24$ h) φάση της ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C. * . ** . *** $P < 0,05$. $0,01$. $0,001$. # $P = 0,058$ vs ανάπτυξη στην αντίστοιχη φάση των μαρτύρων που είχαν λάβει μόνο DMSO (ANOVA, $n = 3-6$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

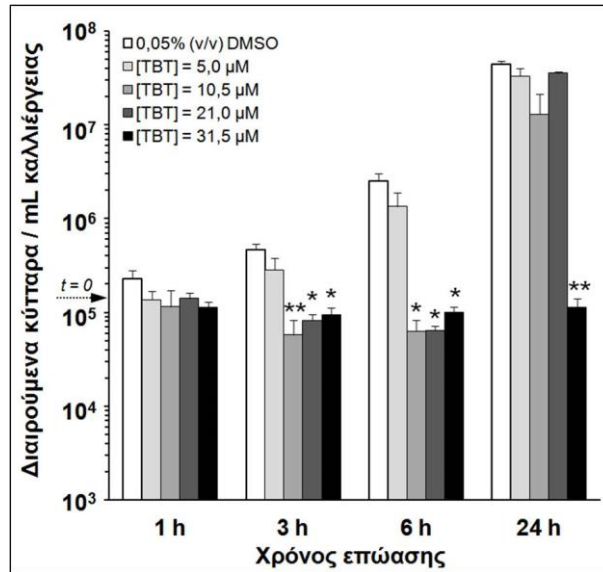
3.5.3. Επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στον πολλαπλασιασμό του σακχαρομύκητα

Όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό του σακχαρομύκητα, παρατηρήθηκε χρονοεξαρτώμενη αύξηση του αριθμού των διαιρούμενων κυττάρων στις καλλιέργειες που επώαστηκαν παρουσία $5,0$ μM TBT (Spearman's $\rho = 0,833$. $P < 0,001$. $n = 3$), όπως και στον μάρτυρα (Spearman's $\rho = 0,959$ $P < 0,001$, $n = 6$) (Εικόνα 3.13). Κατά την έκθεση σε $5,0$ μM TBT δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (ANOVA . $P > 0,1$. $n = 3-6$) στον πληθυσμό των διαιρούμενων κυττάρων συγκριτικά με τον αντίστοιχο μάρτυρα, σε όλες τις φάσεις που μελετήθηκαν (Εικόνα 3.14).



Εικόνα 3.13. Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στον πολλαπλασιασμό του *S. cerevisiae*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ του αριθμού των διαιρούμενων κυττάρων του σακχαρομύκητα που επώαστηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C για 24 h ($n = 3-6$). Οι συνεχόμενες γραμμές δείχνουν το χρονικό διάστημα στο οποίο έγιναν μετρήσεις ανά 1-2 h και οι διακεκομμένες το διάστημα όπου δεν έγιναν μετρήσεις. DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

Κατά τη χορήγηση 10,5 μM και 21,0 μM TBT, ο αριθμός των διαιρούμενων κυττάρων δεν συσχετίστηκε με τον χρόνο επώασης του σακχαρομύκητα (Spearman's $\rho = 0,338 \cdot P > 0,05$ και Spearman's $\rho = -0,093 \cdot P > 0,6$ αντίστοιχα $\cdot n = 3$) (Εικόνα 3.13). Όμοια με την αναστολή της επιβίωσης (Εικόνα 3.12), η χορήγηση 10,5 μM και 21,0 μM TBT ανέστειλε στατιστικά σημαντικά τον πολλαπλασιασμό του σακχαρομύκητα κατά τη λογαριθμική (ANOVA $\cdot P < 0,05 \cdot n = 3-6$), αλλά όχι κατά τη στάσιμη (ANOVA $\cdot P > 0,05 \cdot n = 3-6$) φάση (Εικόνα 3.14).

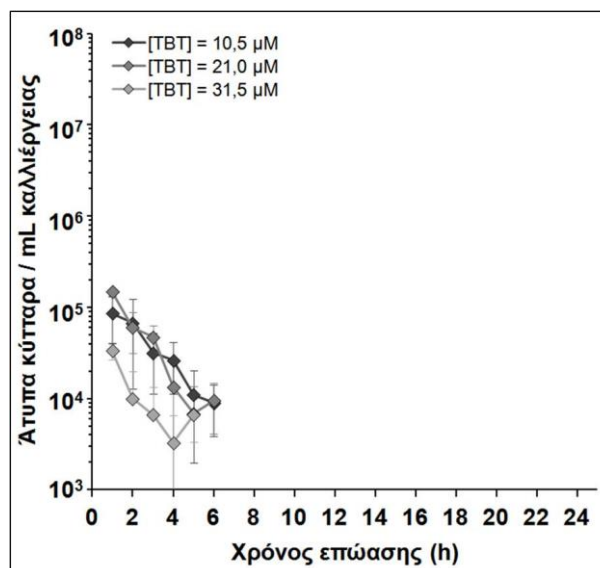


Εικόνα 3.14. Πολλαπλασιασμός του *S. cerevisiae* μετά από εφ' άπαξ χορήγηση TBT στη λανθάνουσα φάση ($t = 0$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ του αριθμού των διαιρούμενων κυττάρων του σακχαρομύκητα στη λανθάνουσα ($t = 1$ h), τη λογαριθμική ($t = 3$ και 6 h) και τη στάσιμη ($t = 24$ h) φάση της ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C. * . ** $P < 0,05$. $0,01$ vs ανάπτυξη στην αντίστοιχη φάση των μαρτύρων που είχαν λάβει μόνο DMSO (ANOVA, $n = 3-6$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασιίτερος.

Η μεγαλύτερη δόση των $31,5$ μM TBT δεν επέφερε στατιστικά σημαντική χρονοεξαρτώμενη μεταβολή στον πληθυσμό των διαιρούμενων κυττάρων (Spearman's $\rho = -0,181$. $P > 0,3$. $n = 3$) (Εικόνα 3.13), σε αντίθεση με τη χρονοεξαρτώμενη μείωση των ζωντανών κυττάρων (Εικόνα 3.11). Ο πολλαπλασιασμός του σακχαρομύκητα μειώθηκε στατιστικά σημαντικά (ANOVA . $P < 0,05$. $n = 3-6$) κατά τη λογαριθμική φάση ($P < 0,05$. ANOVA) και παρέμεινε σημαντικά μειωμένος συγκριτικά με τον μάρτυρα στη στάσιμη φάση (ANOVA . $P < 0,01$. $n = 3-6$) (Εικόνα 3.14).

3.5.4. Εμφάνιση άτυπων κυττάρων υπό την επίδραση TBT

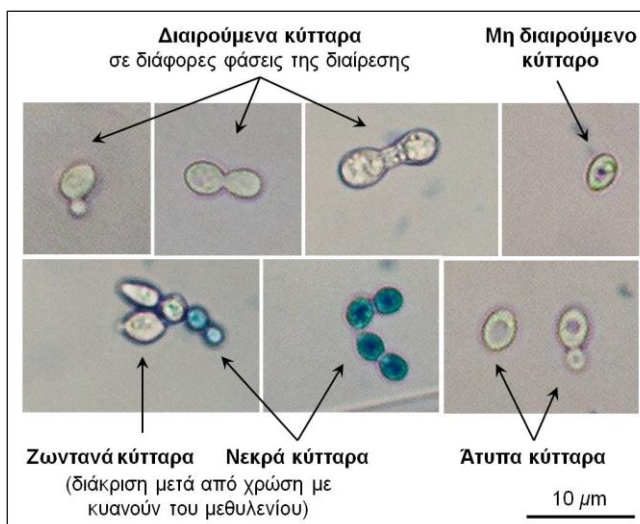
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η εμφάνιση ζωντανών άτυπων κυττάρων εντός της πρώτης ώρας μετά τη χορήγηση $10,5 - 31,5$ μM TBT (Εικόνα 3.15).



Εικόνα 3.15. Επίδραση στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του *S. cerevisiae* της εφ' άπαξ χορήγησης TBT στη λανθάνουσα φάση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ του αριθμού των άτυπων κυττάρων του σακχαρομύκητα που επωάστηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C για 24 h ($n = 3-6$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

Κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, ως άτυπα χαρακτηρίστηκαν τα διαιρούμενα και μη διαιρούμενα κύτταρα που εμφάνισαν ευδιάκριτες δομές στο κυτταρόπλασμα που παρέπεμπαν σε κενοτόπια, τα οποία ήταν μεγαλύτερα από αυτά των κυττάρων του μάρτυρα και καταλάμβαναν σχεδόν το ήμισυ της επιφάνειας του κυτταροπλάσματος (Εικόνα 3.16).

Ο αριθμός των άτυπων κυττάρων μειωνόταν με την πρόοδο της λογαριθμικής φάσης στις καλλιέργειες, στις οποίες είχαν χορηγηθεί 10,5 μM (Spearman's $\rho = -0,685 \cdot P < 0,05 \cdot n = 3$), 21,0 μM (Spearman's $\rho = -0,949 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3$) και 31,5 μM (Spearman's $\rho = -0,870 \cdot P < 0,01 \cdot n = 3$) TBT. Άτυπα κύτταρα δεν ανιχνεύθηκαν στη στάσιμη φάση της ανάπτυξης (Εικόνα 3.15).

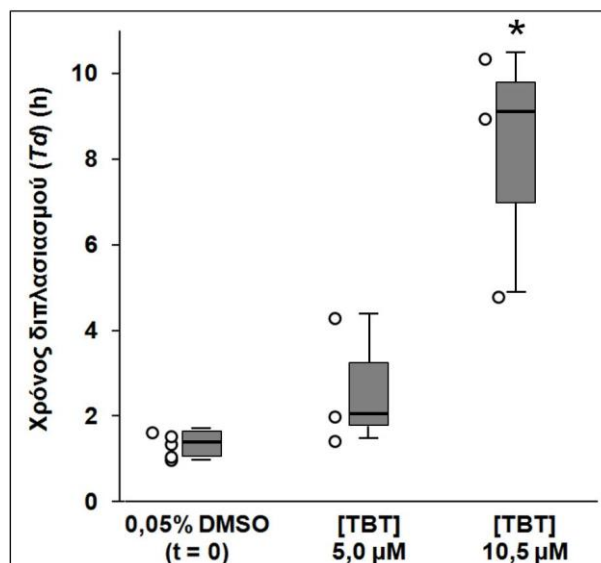


Εικόνα 3.16. Μικροσκοπική εικόνα κυττάρων του σακχαρομύκητα. Στην επάνω σειρά διακρίνονται φυσιολογικά κύτταρα που παρατηρούνταν στις καλλιέργειες των μαρτύρων. Στην κάτω σειρά διακρίνονται κύτταρα που παρατηρούνταν στις καλλιέργειες όπου είχε χορηγηθεί TBT. Τα άτυπα κύτταρα χαρακτηρίζονται από ευκρινή μεγάλα κενοτόπια.

3.5.5. Επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στον χρόνο διπλασιασμού του σακχαρομύκητα

Κατά τη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης ($t = 4-6$ h), ο Td του σακχαρομύκητα ήταν $1,4 \pm 0,1$ h ($n = 5$). Στις καλλιέργειες που χορηγήθηκε $5 \mu\text{M}$ TBT στη λανθάνουσα φάση, ο Td αυξήθηκε σε $2,0 \pm 1,1$ h ($n = 3$), ενώ σε αυτές που εκτέθηκαν σε $10,5 \mu\text{M}$ TBT, ο Td έφτασε τις $9,0 \pm 2,1$ h ($n = 3$) (Εικόνα 3.17).

Στην αντίστοιχη χρονική περίοδο, η συχνότητα πολλαπλασιασμού στις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν παρουσία DMSO ήταν $0,8 \pm 0,1$ κύκλοι/h ($n = 5$). Στις καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε $5,0$ και $10,5 \mu\text{M}$ TBT στην έναρξη της επώασης, η συχνότητα μειώθηκε σε $0,5 \pm 0,2$ ($n = 3$) και $0,14 \pm 0,04$ ($n = 3$) κύκλους/h, αντίστοιχα.



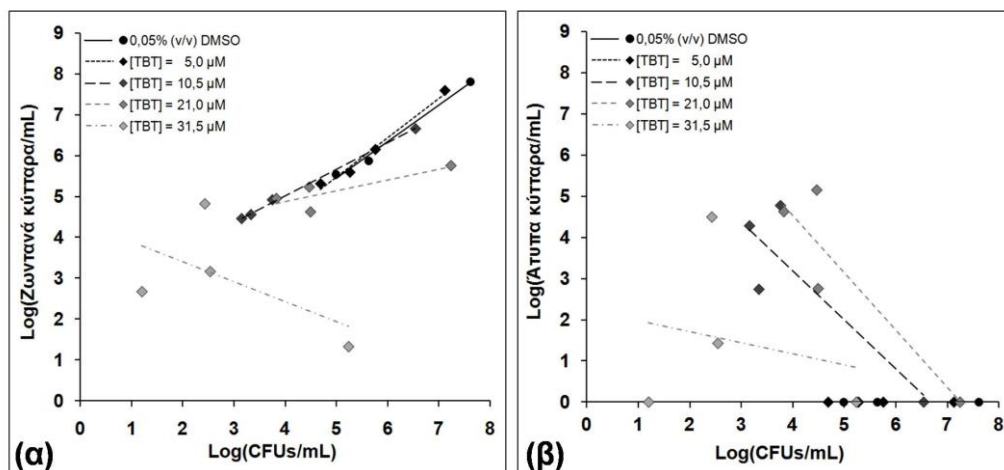
Εικόνα 3.17. Επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στον Td του *S. cerevisiae*. Ο Td υπολογίσθηκε στη λογαριθμική φάση μετά από εφ' άπαξ χορήγηση 0,05% (v/v) DMSO (n = 5) ή 5 μM και 10,5 μM TBT (n = 3) στην έναρξη της επώασης σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με θηκογράμματα (εσωτερική οριζόντια γραμμή: διάμεσος, ύψος σκιασμένου παραλληλογράμμου: ενδοτεταρτημοριακό εύρος Q1 25ο εκατοστημόριο - Q3 75ο εκατοστημόριο, εξωτερικές γραμμές: φράκτες ελάχιστης και μέγιστης τιμής της κατανομής των διακριτών τιμών (λευκοί κύκλοι). * P < 0,05 vs DMSO (Kruskal-Wallis H test · Dunn's pairwise test με διόρθωση Bonferroni · n = 3-5). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

3.5.6. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών και έλεγχος μεταλλάξεων *petite*

Στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ του αριθμού των CFUs και του αριθμού του συνόλου των ζωντανών κυττάρων που μετρήθηκαν μικροσκοπικά στις αντίστοιχες καλλιέργειες-μάρτυρες (Spearman's $\rho = 0,947 \cdot P < 0,001 \cdot n = 4-6$) και σε αυτές που επώαστηκαν παρουσία 5,0 μM (Spearman's $\rho = 0,916 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3$), 10,5 μM (Spearman's $\rho = 0,802 \cdot P < 0,01 \cdot n = 3$) και 21,0 μM (Spearman's $\rho = 0,817 \cdot P < 0,01 \cdot n = 3$) TBT στη λανθάνουσα φάση (Εικόνα 3.18a). Σημειώνεται ότι στις καλλιέργειες στις οποίες χορηγήθηκε 31,5 μM TBT παρατηρήθηκε αρνητική, αλλά στατιστικά μη σημαντική, συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των ζωντανών

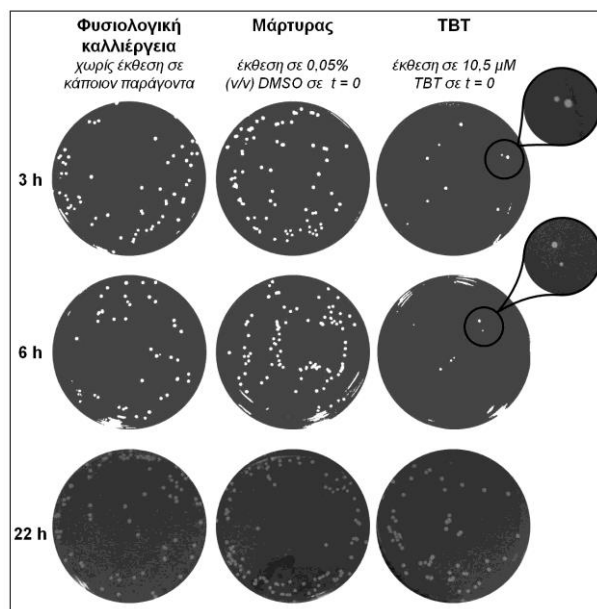
κυττάρων και των CFUs (Spearman's $\rho = -0,532 \cdot P > 0,1 \cdot n = 3$) (Εικόνα 3.18α). Προς το παρόν δεν μπορεί να αποκλειστεί το σφάλμα στην ανάλυση και την αξιολόγηση αυτού του αποτελέσματος, λόγω του εξαιρετικά μικρού αριθμού των ζωντανών κυττάρων που μετρήθηκαν μικροσκοπικά μετά τη χορήγηση 31,5 μM TBT.

Αντίθετα με τους πληθυσμούς των συνολικών ζωντανών κυττάρων (Εικόνα 3.18α), ο αριθμός των CFUs εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με τον αντίστοιχο αριθμό των άτυπων κυττάρων που ανιχνεύθηκαν στις καλλιέργειες στις οποίες είχε χορηγηθεί 10,5 μM (Spearman's $\rho = -0,303 \cdot P > 0,3 \cdot n = 3$) ή 21,0 μM (Spearman's $\rho = -0,326 \cdot P > 0,3 \cdot n = 3$) TBT, χωρίς όμως η σχέση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.18β). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι, πιθανώς, τα άτυπα κύτταρα δεν είχαν την ικανότητα σχηματισμού CFUs.



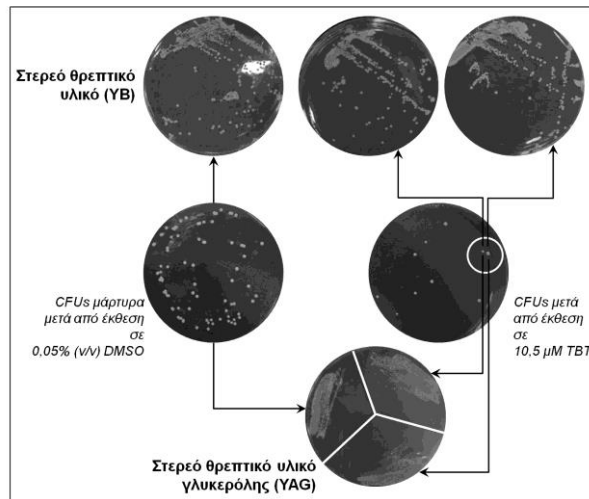
Εικόνα 3.18. Συσχέτιση CFUs και αριθμού κυττάρων σε καλλιέργειες που επώαστηκαν απουσία ή παρουσία TBT. Διαγράμματα διασποράς των ζευγών των τιμών των CFUs και των πληθυσμών (α) του συνόλου των ζωντανών κυττάρων και (β) των άτυπων ζωντανών κυττάρων που μετρήθηκαν μικροσκοπικά στις αντίστοιχες καλλιέργειες. Σε όλες τις περιπτώσεις, η χορήγηση του TBT έγινε κατά την έναρξη της επώασης. CFUs: μονάδες με ικανότητα σχηματισμού αποικιών 48 h μετά την επίστρωση του δείγματος σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

Στα δείγματα των καλλιιεργειών που είχαν επωαστεί παρουσία TBT, ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκάλεσε η εμφάνιση CFUs μικρότερου μεγέθους από αυτές των καλλιιεργειών των μαρτύρων (Εικόνα 3.19).



Εικόνα 3.19. Ενδεικτική μακροσκοπική εικόνα CFUs καλλιιεργειών του *S. cerevisiae* που επώαστηκαν 3, 6 και 22 h χωρίς την προσθήκη κάποιας δραστηρικής ουσίας, και μετά από χορήγηση διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) ή τριβουτυλοκασσίτερου (TBT) κατά την έναρξη της επώασης ($t = 0$). Στους κύκλους διακρίνονται αποικίες φυσιολογικού και μικρότερου μεγέθους (μεγέθυνση $\times 2$). CFUs: μονάδες με ικανότητα σχηματισμού αποικιών 48 h μετά την επίστρωση του δείγματος των καλλιιεργειών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανότητα να πρόκειται για μεταλλάξεις petite, έγινε ανακαλλιέργεια των μικρότερου μεγέθους CFUs σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε γλυκερόλη (YAG), στο οποίο δεν αναπτύσσονται αποικίες κυττάρων που φέρουν μεταλλάξεις petite (Day, 2013). Η ανάπτυξη των αποικιών μικρότερου μεγέθους τόσο στο YA όσο και στο YAG (Εικόνα 3.20) απομάκρυνε την πιθανότητα να πρόκειται για μεταλλάξεις petite.



Εικόνα 3.20. Ενδεικτική μακροσκοπική εικόνα ανάπτυξης διαφορετικού μεγέθους αποικιών του *S. cerevisiae* σε YA και YAG. Στον κύκλο διακρίνονται CFUs φυσιολογικού και μικρότερου μεγέθους. CFUs: μονάδες με ικανότητα σχηματισμού αποικιών 48 h μετά την επιστροφή του δείγματος των καλλιεργειών σε στερέο θρεπτικό υπόστρωμα, DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

3.5.7. Δοσοεξαρτώμενη επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στον σακχαρομύκητα

Η ανάπτυξη του σακχαρομύκητα μετά από έκθεση σε 5,0 – 31,5 μM TBT στην έναρξη της επώασης ήταν δοσοεξαρτώμενη. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του συνολικού αριθμού των κυττάρων του σακχαρομύκητα και της δόσης του TBT στη λανθάνουσα φάση (Spearman's $\rho = -0,682 \cdot P < 0,05 \cdot n = 3-6$), στην αρχή (Spearman's $\rho = -0,745 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3-6$) και στην πορεία (Spearman's $\rho = -0,738 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3-6$) της λογαριθμικής ανάπτυξης, καθώς και στην αρχή της στάσιμης φάσης (Spearman's $\rho = -0,856 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3-6$) (Εικόνα 3.21α).

Αντίστοιχη ήταν η επίδραση του TBT στην επιβίωση (Εικόνα 3.21β) και στον πολλαπλασιασμό (Εικόνα 3.21γ) του σακχαρομύκητα.

Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ των πληθυσμών των ζωντανών κυττάρων στις καλλιέργειες και της δόσης του TBT στη λανθάνουσα φάση

(Spearman's $\rho = -0,794 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3-6$), στην αρχή (Spearman's $\rho = -0,827 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3-6$) και στην πορεία (Spearman's $\rho = -0,889 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3-6$) της λογαριθμικής ανάπτυξης, καθώς και στη μεταλογαριθμική φάση (Spearman's $\rho = -0,869 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3-6$) (Εικόνα 3.19β).

Επίσης, βρέθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των πληθυσμών των διαιρούμενων κυττάρων και της δόσης του TBT, η οποία ήταν οριακά σημαντική στη λανθάνουσα φάση (Spearman's $\rho = -0,461 \cdot P = 0,054 \cdot n = 3-6$) και στατιστικά σημαντική στη λογαριθμική (Spearman's $\rho \cdot P < 0,001 \cdot n = 3-6$) και στη μεταλογαριθμική (Spearman's $\rho = -0,843 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3-6$) φάση της ανάπτυξης (Εικόνα 3.21γ).

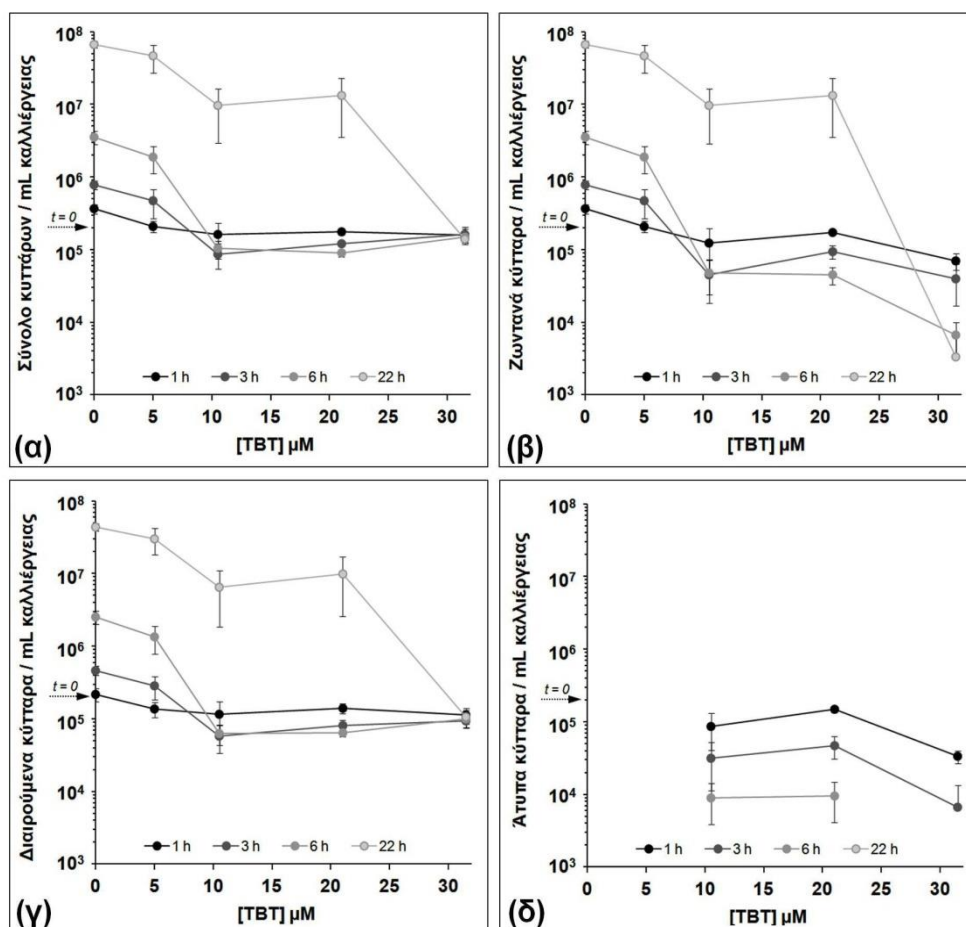
Αντιθέτως, ο αριθμός των άτυπων κυττάρων παρουσίασε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με τη δόση του TBT στη 1 h (Spearman's $\rho = 0,785 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3-6$) και στις 3 h (Spearman's $\rho = 0,568 \cdot P < 0,05 \cdot n = 3-6$) μετά τη χορήγηση της ουσίας (Εικόνα 3.21δ). Στις 6 h δεν εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των άτυπων κυττάρων και της χορηγηθείσας δόσης του TBT (Εικόνα 3.21δ).

Επί του συνόλου των κυττάρων σε κάθε καλλιέργεια, παρατηρήθηκε μείωση της εκατοστιαίας αναλογίας των ζωντανών κυττάρων στη λογαριθμική φάση των καλλιεργειών που είχαν εκτεθεί στον TBT κατά τη λανθάνουσα φάση της ανάπτυξης (Εικόνα 3.22).

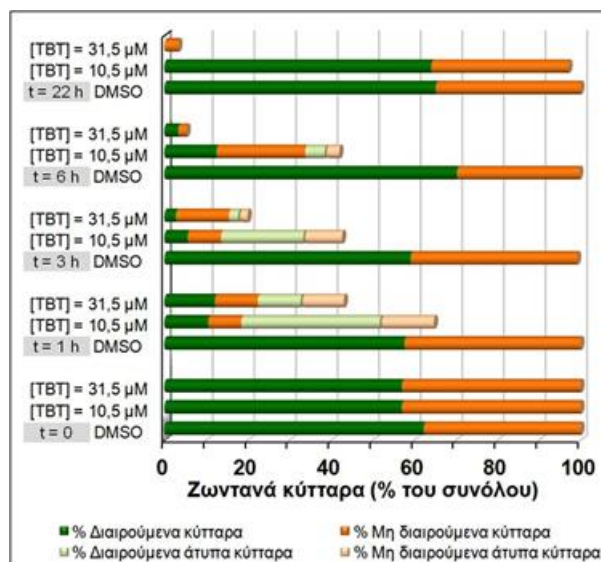
Οι καλλιέργειες που είχαν εκτεθεί σε 10,5 μM TBT ξεπέρασαν την τοξική δράση του TBT και δεν παρουσίασαν διαφορές στη μεταλογαριθμική φάση της ανάπτυξης συγκριτικά με τις καλλιέργειες των μαρτύρων (Εικόνα 3.22). Στη λανθάνουσα φάση, ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων ήταν ετερογενής και περιελάμβανε κυρίως διαιρούμενα και μη διαιρούμενα άτυπα

κύτταρα. Με την πρόοδο της λογαριθμικής φάσης, τα άτυπα κύτταρα μειώνονταν και επικρατούσαν φυσιολογικά κύτταρα (Εικόνα 3.22).

Αντίθετα, η έκθεση σε 31,5 μM TBT δεν επέτρεψε στον σακχαρομύκητα να ανακάμψει στη μεταλογαριθμική φάση της ανάπτυξης (Εικόνα 3.22).



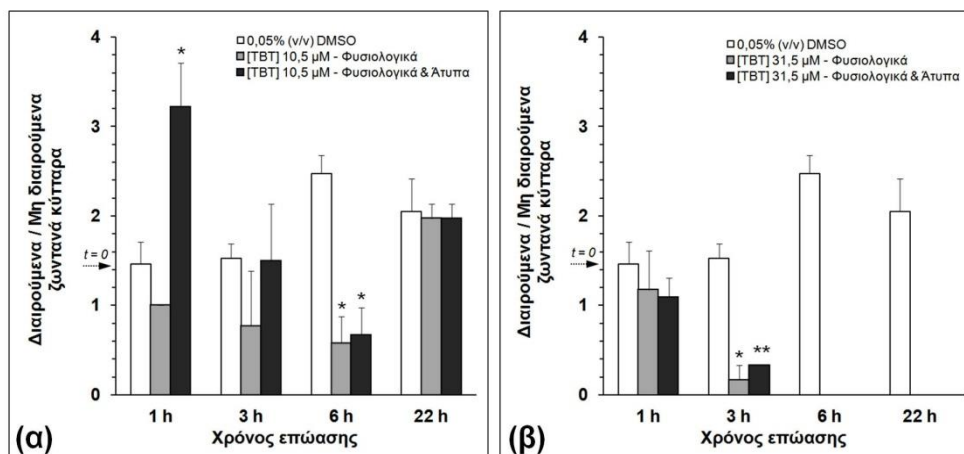
Εικόνα 3.21. Δοσοεξαρτώμενη επίδραση του TBT στα χαρακτηριστικά του *S. cerevisiae*. Η χορήγηση του τριβουτυλοκασσίτερου (TBT) έγινε στην έναρξη της επώασης ($t = 0$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $\text{MO} \pm \text{SEM}$ ($n = 3-6$) (α) του συνολικού αριθμού των κυττάρων και του αριθμού των (β) ζωντανών, (γ) διαιρούμενων και (δ) άτυπων κυττάρων του σακχαρομύκητα κατά τη λανθάνουσα (1 h), λογαριθμική (3 h, 6 h) και στάσιμη (22 h) φάση της ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 $^{\circ}\text{C}$.



Εικόνα 3.22. Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBT κατά τη λανθάνουσα φάση στην αναλογία των ζωντανών κυτταρικών υποπληθυσμών του *S. cerevisiae*. Η χορήγηση του TBT έγινε στην έναρξη της επώασης ($t = 0$). Η αναλογία των διαφόρων τύπων ζωντανών κυττάρων του σακχαρομύκητα παρουσιάζεται στη λανθάνουσα φάση ($t = 1$ h), στη λογαριθμική ($t = 3$ και 6 h) και στη στάσιμη ($t = 22$ h) φάση της ανάπτυξης ($n = 3-6$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

Ενδιαφέρον προκαλεί η παρατήρηση ότι η έκθεση του σακχαρομύκητα σε $10,5 \mu\text{M}$ TBT μείωσε την επικράτηση των διαιρούμενων ως προς τα μη διαιρούμενα φυσιολογικά κύτταρα στην λογαριθμική φάση της ανάπτυξης (Εικόνα 3.23α). Παράλληλα, προκάλεσε την άμεση εμφάνιση κυρίως διαιρούμενων άτυπων κυττάρων, τα οποία ήταν περίπου τετραπλάσια από τα αντίστοιχα μη διαιρούμενα κύτταρα στους πληθυσμούς που διένυαν τη λανθάνουσα φάση ($\times 4,6 \pm 2,3$) και την αρχή της εκθετικής ανάπτυξης ($\times 4,1 \pm 2,0$) (Εικόνα 3.23α).

Αντίθετα, κατά τη χορήγηση $31,5 \mu\text{M}$ TBT, αν και μειώθηκε άμεσα ο λόγος των διαιρούμενων προς τα μη διαιρούμενα φυσιολογικά κύτταρα, δεν παρατηρήθηκε παρόμοια επικράτηση των διαιρούμενων άτυπων κυττάρων ως προς τα αντίστοιχα μη διαιρούμενα (Εικόνα 3.23β).



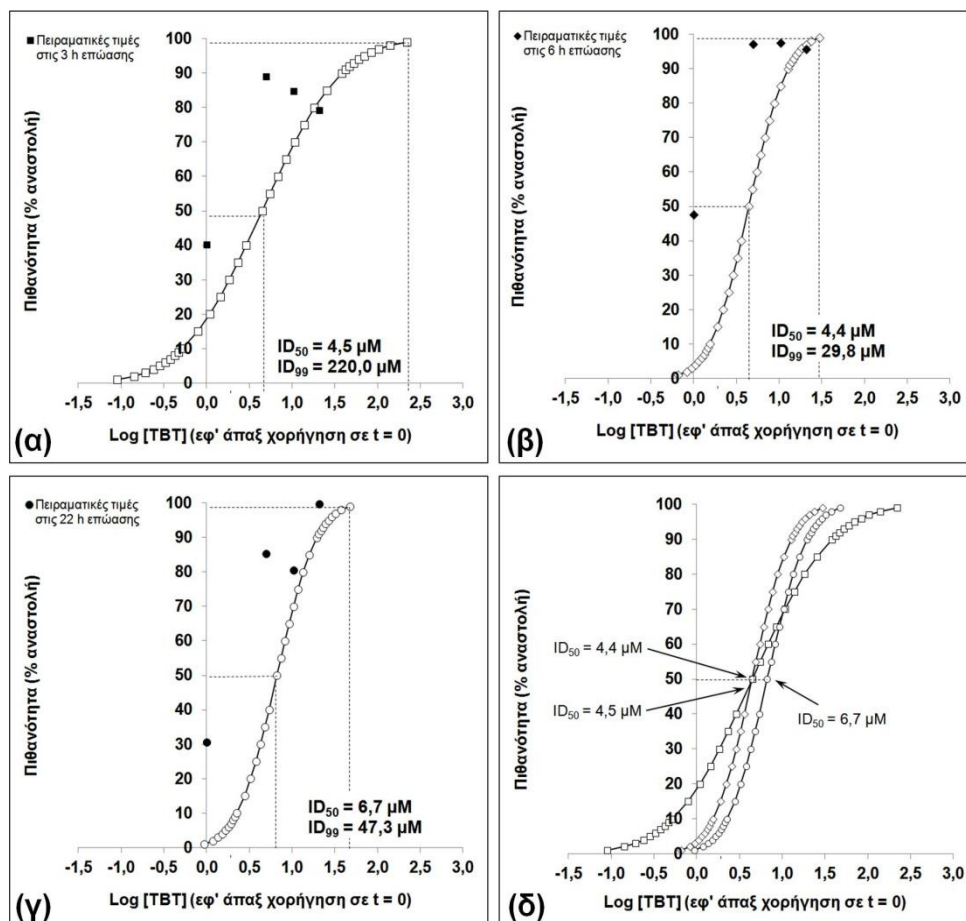
Εικόνα 3.23. Επίδραση του TBT στα διαιρούμενα ζωντανά κύτταρα του *S. cerevisiae* σε διάφορες φάσεις της ανάπτυξης. Η χορήγηση (α) 10,5 ή (β) 31,5 μM TBT έγινε στην έναρξη της επώασης ($t = 0$). Ο λόγος του αριθμού των διαιρούμενων προς τα μη διαιρούμενα ζωντανά κύτταρα παρουσιάζεται στη λανθάνουσα ($t = 1$ h), στη λογαριθμική ($t = 3$ και 6 h) και στη στάσιμη ($t = 22$ h) φάση της ανάπτυξης. * · ** $P < 0,05$ · $0,01$ vs λόγος των κυττάρων του μάρτυρα που έλαβαν DMSO στην αντίστοιχη φάση (ANOVA, $n = 3-5$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

Τέλος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των CFUs και του αντίστοιχου λόγου ζωντανών διαιρούμενων/μη διαιρούμενων φυσιολογικών κυττάρων στις καλλιέργειες που είχαν εκτεθεί σε 10,5 μM TBT (Spearman's $\rho = 0,631$ · $P < 0,05$ · $n = 11$). Αντίθετα, η συσχέτιση μεταξύ του αριθμού CFUs και του αντίστοιχου λόγου των συνολικών διαιρούμενων/μη διαιρούμενων κυττάρων ήταν οριακά σημαντική (Spearman's $\rho = 0,536$ · $P = 0,073$ · $n = 12$). Στην περίπτωση της χορήγησης 31,5 μM TBT, οι συσχετίσεις αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Spearman's $\rho = -0,074$ · $P > 0,8$ και Spearman's $\rho = -0,360$ · $P > 0,4$, αντίστοιχα · $n = 7$).

3.5.8. ID_{50} και ID_{99} κατά τη χορήγηση TBT στη λανθάνουσα φάση

Κατά τη χορήγηση του TBT στην έναρξη της επώασης, οι δόσεις της ουσίας που προκάλεσαν αναστολή της ανάπτυξης στο 50% του πληθυσμού (ID_{50}) έως τη μεταλογαριθμική φάση ήταν συγκρίσιμες και κυμάνθηκαν από 4,4 μM έως 6,7 μM (Εικόνα 3.24).

Οι δόσεις του TBT που ανέστειλαν την ανάπτυξη στο 99% του πληθυσμού (ID_{99}) στις ίδιες χρονικές στιγμές της επώασης βρέθηκαν να είναι αυξημένες τουλάχιστον κατά μία τάξη μεγέθους (Εικόνα 3.24). Σημειώνεται ότι η μεγαλύτερη τιμή της ID_{99} (220 μM) παρατηρήθηκε στις 3 h επώασης, γεγονός που υποδηλώνει πιθανώς μεγαλύτερη αντίσταση του σχετικά ετερογενούς κυτταρικού πληθυσμού του σακχαρομύκητα στην ανασταλτική δράση του TBT κατά τη λανθάνουσα φάση.

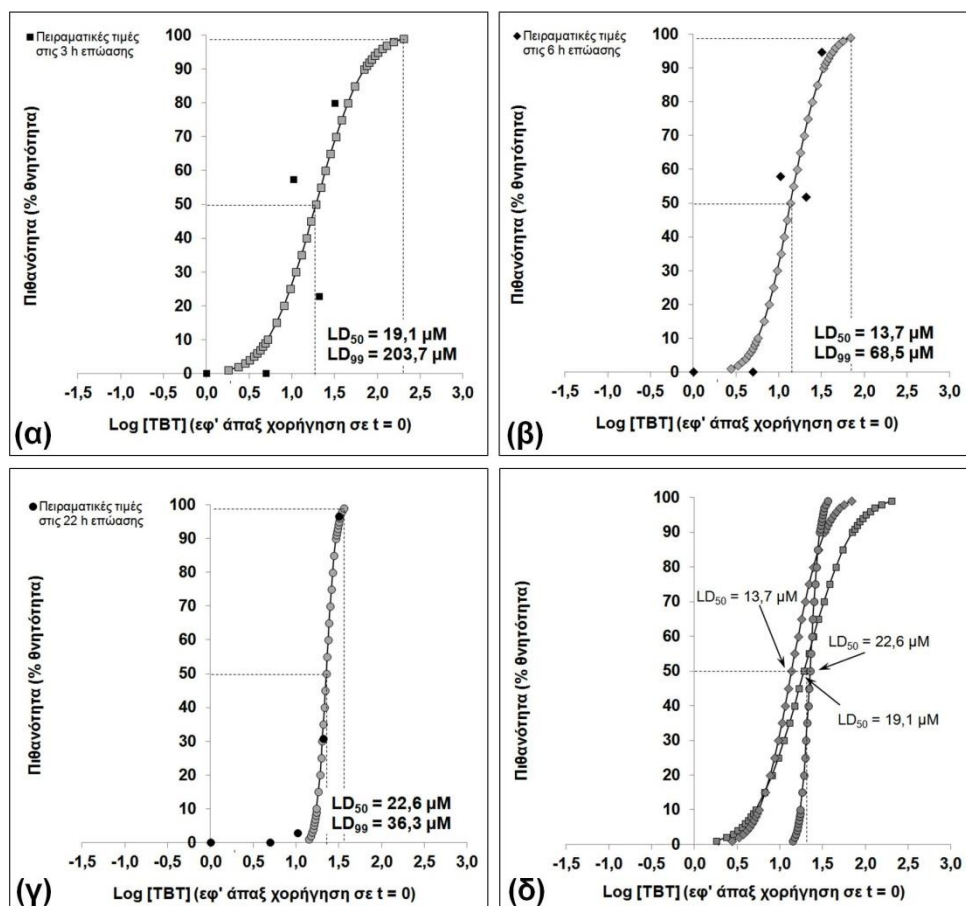


Εικόνα 3.24. ID_{50} και ID_{99} μετά από χορήγηση TBT στη λανθάνουσα φάση. Γραφική απεικόνιση λογιστικής παλινδρόμησης με το μοντέλο αντίστροφης κανονικής συνάρτησης (probit) της πιθανότητας επιτυχούς αναστολής της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα που εκτέθηκε σε διάφορες εφ' άπαξ δόσεις τριβουτυλοκασσίτερου (TBT) κατά την έναρξη της επώασης ($t = 0$). Η μέση ανασταλτική δόση (ID_{50}) και η δόση που προκάλεσε αναστολή στο 99% του υπό μελέτη πληθυσμού (ID_{99}) υπολογίστηκαν στη λογαριθμική [(α) 3 h, □ και (β) 6 h, ◇] και στη μεταλογαριθμική [(γ) 22 h, ○] της ανάπτυξης. Τα σύμβολα ■, ◆, ● δείχνουν τα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα για κάθε φάση. (δ) Συγκριτικά δεδομένα για την ID_{50} στις φάσεις της ανάπτυξης όπου αυτή προσδιορίστηκε.

3.5.9. LD_{50} και LD_{99} κατά τη χορήγηση TBT στη λανθάνουσα φάση

Κατά την χορήγηση του TBT στην έναρξη της επώασης, η θανατηφόρος δόση για το 50% του πληθυσμού του σακχαρομύκητα (LD_{50}) ήταν της ίδιας τάξης μεγέθους έως τη μεταλογαριθμική φάση (Εικόνα 3.25). Οι μεγαλύτερες τιμές της LD_{99} (203,7 μM)

υπολογίσθηκαν στις 3 και 6 h επώασης (Εικόνα 3.25), υποδηλώνοντας ότι τα κύτταρα του σακχαρομύκητα ήταν πιθανώς πιο ανθεκτικά στην τοξική επίδραση του TBT κατά τη λανθάνουσα και τη λογαριθμική φάση.



Εικόνα 3.25. LD_{50} και LD_{99} μετά από χορήγηση TBT στη λανθάνουσα φάση. Γραφική απεικόνιση λογιστικής παλινδρόμησης με το μοντέλο αντίστροφης κανονικής συνάρτησης (probit) της πιθανότητας επιτυχούς θανατηφόρου δράσης έναντι του σακχαρομύκητα που εκτέθηκε σε διάφορες εφ' άπαξ δόσεις τριβουτυλοκασσίτερου (TBT) κατά την έναρξη της επώασης ($t = 0$). Η μέση θανατηφόρος δόση (LD_{50}) και η δόση που προκάλεσε θάνατο στο 99% του υπό μελέτη πληθυσμού (LD_{99}) υπολογίσθηκαν στη λογαριθμική [(α) 3 h, \square και (β) 6 h, \diamond] και μεταλογαριθμική [(γ) 22 h, \circ] φάση της ανάπτυξης. Τα σύμβολα \blacksquare , \blacklozenge , \bullet δείχνουν τα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα για κάθε φάση. (δ) Συγκριτικά δεδομένα για την LD_{50} στις φάσεις της ανάπτυξης όπου αυτή προσδιορίστηκε.

Συμπεράσματα

- ❖ Η ελάχιστη ανασταλτική (ΕΑΠ) και μυκητοκτόνος (ΕΜΠ) πυκνότητα του TBT ήταν 10,5 μM (Εικόνα 3.8), υποδηλώνοντας ότι ο TBT δρα ως κυτταροκτόνος παράγοντας στον *S. cerevisiae* ATCC 2366.
- ❖ Η χορήγηση του TBT στη λανθάνουσα φάση είχε δόσοεξαρτώμενη επίδραση στα χαρακτηριστικά του *S. cerevisiae*. Συγκεκριμένα, (συγκριτικά με τις καλλιέργειες των μαρτύρων):
 - Κατά την έκθεση σε 10,5 & 21,5 μM TBT μειώθηκε η ανάπτυξη (Εικόνες 3.9, 3.10), ο πολλαπλασιασμός (Εικόνες 3.13, 3.14) και η επιβίωση (Εικόνες 3.11, 3.12) του σακχαρομύκητα έως τη μεταλογαριθμική φάση, στην οποία, όμως, παρατηρήθηκε αποκατάσταση των φυσιολογικών ιδιοτήτων. Σε αντίθεση, η χαμηλότερη δόση των 5,0 TBT δεν επηρέασε σημαντικά τις καλλιέργειες, ενώ η υψηλότερη δόση των 31,5 TBT προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης του *S. cerevisiae*, χωρίς επαναφορά σε φυσιολογικά επίπεδα τουλάχιστον έως τη μεταλογαριθμική φάση (Εικόνες 3.9 - 3.14).
 - Η χορήγηση 10,5 μM TBT επιμήκυνε σημαντικά τον χρόνο διπλασιασμού του σακχαρομύκητα κατά ~6,5 φορές (Εικόνα 3.17).
 - Η έκθεση του σακχαρομύκητα στον TBT συνοδεύτηκε από άμεση, παροδική, και σχετιζόμενη με τη δόση εμφάνιση άτυπων, κυρίως διαιρούμενων κυττάρων (Εικόνα 3.15), τα οποία χαρακτηρίζονταν από ευδιάκριτες κυτταροπλασματικές δομές που παρέπεμπαν σε μεγάλα κενοτόπια (Εικόνα 3.16) και, πιθανώς, από ανικανότητα σχηματισμού αποικιών (Εικόνα 3.18).

- Η χορήγηση TBT στον σακχαρομύκητα δεν φαίνεται να προάγει τη δημιουργία μεταλλάξεων petite (Εικόνα 3.20).
- ❖ Οι πληθυσμοί του σακχαρομύκητα φάνηκαν να είναι πιο ανθεκτικοί στην ανασταλτική/τοξική επίδραση του TBT κατά τη λανθάνουσα/λογαριθμική φάση της ανάπτυξης (Εικόνες 3.23, 3.24).
- ❖ Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, η συγκέντρωση που επιλέχθηκε για την περαιτέρω μελέτη της δράσης του TBT στον *S. cerevisiae* ήταν 10,5 μΜ.

Ερώτημα 4: Παρουσιάζουν οι δράσεις του TBT διαφορές ανάλογα με το δοσολογικό σχήμα και/ή τη φάση της ανάπτυξης κατά την οποία ο σακχαρομύκητας εκτίθεται σε αυτόν;

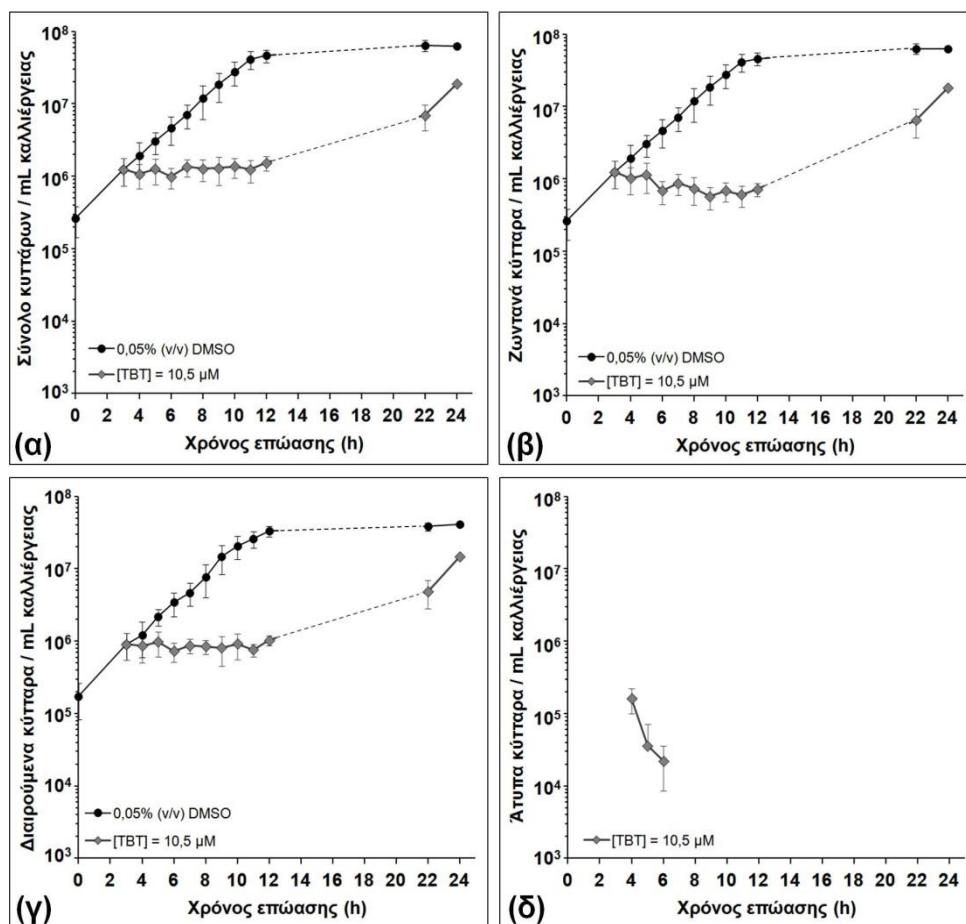
3.6. Εφ' άπαξ χορήγηση του TBT στη λογαριθμική φάση

3.6.1. Επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στα χαρακτηριστικά του σακχαρομύκητα

Σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου χορηγήθηκε DMSO, στις καλλιέργειες που επώαστηκαν παρουσία 10,5 μ M TBT από την αρχή της λογαριθμικής φάσης ($t = 3$ h) παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης (Εικόνα 3.26α), της επιβίωσης (Εικόνα 3.26β) και του πολλαπλασιασμού (Εικόνα 3.26γ) των κυττάρων του σακχαρομύκητα, η οποία ήταν σημαντική από τις 5 έως τις 24 h της επώασης (Mann-Whitney U test $\cdot P < 0,05 \cdot n = 3$). Επίσης, η έκθεση του σακχαρομύκητα σε 10,5 μ M TBT οδήγησε σε παροδική εμφάνιση άτυπων κυττάρων (Εικόνα 3.16) εντός 1 h από τη χορήγηση της ουσίας (Εικόνα 3.26δ).

Όσον αφορά το χρονικό διάστημα μεταξύ 3 h (χορήγηση 10,5 μ M TBT) και 12 h επώασης - κατά το οποίο γίνονταν μετρήσεις ανά 1 h-, στις καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 10,5 μ M TBT δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή ούτε στον συνολικό αριθμό των κυττάρων (Spearman's $\rho = 0,168 \cdot P > 0,3 \cdot n = 3$) (Εικόνα 3.26α), ούτε στον αριθμό των ζωντανών (Spearman's $\rho = -0,258 \cdot P > 0,1 \cdot n = 3$) (Εικόνα 3.26β) ή των διαιρούμενων (Spearman's $\rho = 0,030 \cdot P > 0,8 \cdot n = 3$) (Εικόνα 3.26γ) κυττάρων του σακχαρομύκητα. Σε αντίθεση, στο ίδιο χρονικό διάστημα στις καλλιέργειες του μάρτυρα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της ανάπτυξης (Spearman's $\rho = 0,913 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3$) (Εικόνα 3.26α), της επιβίωσης (Spearman's $\rho = 0,913 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3$) (Εικόνα 3.26β) και του

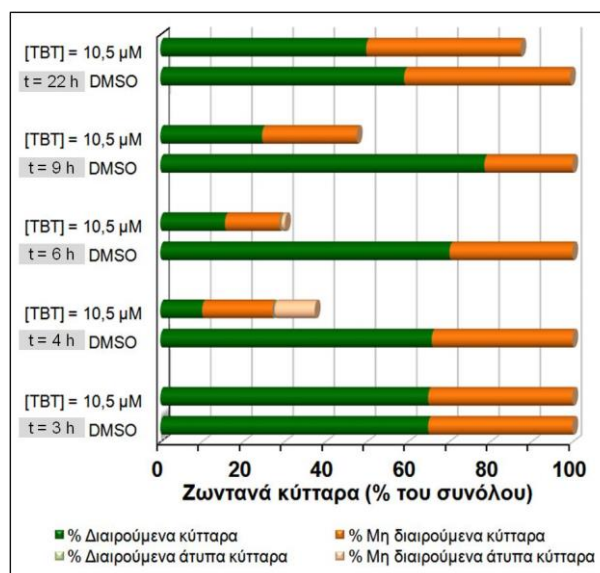
πολλαπλασιασμού (Spearman's $\rho = 0,915 \cdot P < 0,001 \cdot n = 3$) των κυττάρων του σακχαρομύκητα (Εικόνα 3.26γ).



Εικόνα 3.26. Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στα χαρακτηριστικά του *S. cerevisiae*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος $MO \pm SEM$ ($n = 3$) (α) του συνολικού αριθμού των κυττάρων και του αριθμού των (β) ζωντανών, (γ) διαιρούμενων και (δ) άτυπων κυττάρων του σακχαρομύκητα που επώαστηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C για 24 h. Οι συνεχόμενες γραμμές δείχνουν το χρονικό διάστημα στο οποίο έγιναν μετρήσεις ανά 1 ή 2 h και οι διακεκομμένες το διάστημα όπου δεν έγιναν μετρήσεις. DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

Η εκατοστιαία αναλογία των ζωντανών κυττάρων μειώθηκε στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης των καλλιεργειών που είχαν εκτεθεί σε 10,5 μM TBT (Εικόνα 3.27). Οι καλλιέργειες αυτές ξεπέρασαν την τοξική δράση του TBT και, συγκριτικά με τις

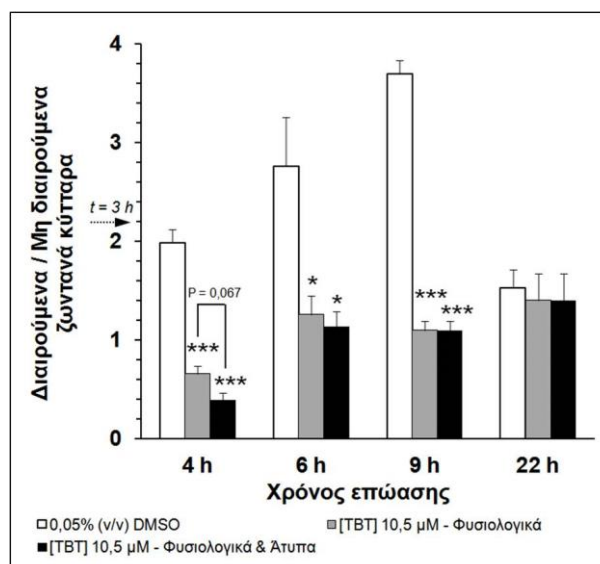
καλλιέργειες των μαρτύρων, δεν παρουσίασαν διαφορές στη μεταλογαριθμική φάση (Εικόνα 3.27), όπως και στην περίπτωση της εφ' άπαξ χορήγησης 10,5 μM TBT στην έναρξη της επώασης (Εικόνα 3.22).



Εικόνα 3.27. Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στην αναλογία των ζωντανών κυτταρικών υποπληθυσμών του *S. cerevisiae*. Η χορήγηση του TBT έγινε στην έναρξη της λογαριθμικής φάσης ($t = 3$ h). Η αναλογία των διάφορων ζωντανών κυττάρων του σακχαρομύκητα παρουσιάζεται στη λογαριθμική ($t = 4, 6, 9$ h) και στάσιμη ($t = 22$ h) φάση της ανάπτυξης ($n = 3-6$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

Επίσης, 1 h μετά την χορήγηση 10,5 μM TBT, μειώθηκε η επικράτηση των διαιρούμενων ως προς τα μη διαιρούμενα φυσιολογικά κύτταρα στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ εμφανίστηκαν ζωντανά άτυπα κύτταρα (Εικόνα 3.28). Σε αντίθεση με τη χορήγηση 10,5 μM TBT στη λανθάνουσα φάση ($t = 0$) (Εικόνα 3.22), τα άτυπα κύτταρα κατά τη χορήγηση 10,5 μM TBT στην λογαριθμική φάση ($t = 3$ h) ήταν μη διαιρούμενα (Εικόνα 3.28). Η εκατοστιαία αναλογία των άτυπων κυττάρων στο σύνολο του πληθυσμού ανερχόταν στο $12,8 \pm 3,1\%$ ($n = 8$) στις 4 h και στο 1,3

$\pm 0,9\% \cdot n = 5$) στις 6 h, ενώ δεν ήταν ανιχνεύσιμα στις 9 h και στις 22 h της επώασης (Εικόνες 3.27 και 3.28).

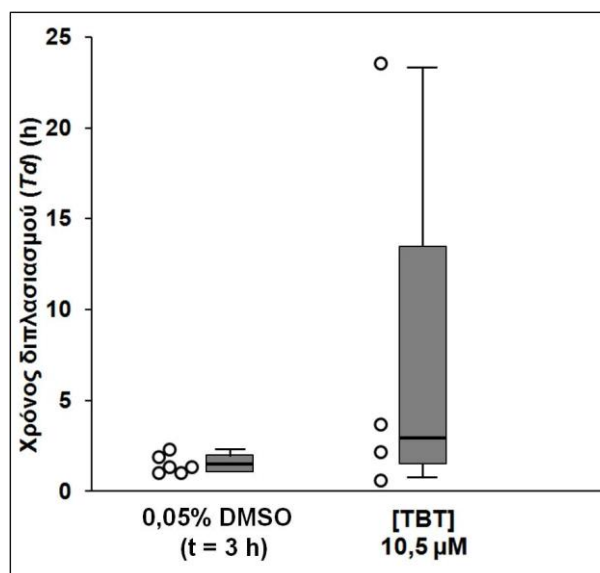


Εικόνα 3.28. Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στα διαιρούμενα και μη διαιρούμενα ζωντανά κύτταρα του *S. cerevisiae*. Η χορήγηση έγινε στην έναρξη της λογαριθμικής φάσης ($t = 3$ h). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος $MO \pm SEM$ ($n = 5-10$) του λόγου του αριθμού των διαιρούμενων προς τα μη διαιρούμενα ζωντανά κύτταρα 1 h μετά τη χορήγηση του TBT ($t = 4$ h), στη συνέχεια της λογαριθμικής φάσης ($t = 6$ και 9 h) και στη στάσιμη ($t = 22$ h) φάση της ανάπτυξης. * · *** $P < 0,05 \cdot 0,001$ vs αντίστοιχος λόγος των κυττάρων του μάρτυρα που έλαβαν DMSO (ANOVA). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκαρβοσίτερος.

3.6.2. Επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στον χρόνο διπλασιασμού του σακχαρομύκητα

Στις καλλιέργειες όπου χορηγήθηκε 0,05% DMSO στις 3 h της επώασης, ο Td του σακχαρομύκητα κατά την λογαριθμική φάση της ανάπτυξης ήταν $1,5 \pm 0,2$ h και η συχνότητα πολλαπλασιασμού $0,7 \pm 0,1$ κύκλοι/h ($n = 6$). Η αντίστοιχη τιμή του Td στις καλλιέργειες στις οποίες χορηγήθηκε 10,5 μM TBT στις 3 h επώασης ήταν $7,5 \pm 5,4$ h ($n = 4$) και η συχνότητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού υπολογίστηκε σε $0,6 \pm 0,4$ κύκλους/h ($n = 4$). Η αύξηση του Td δεν

ήταν στατιστικά σημαντική (Mann-Whitney U test · $Z = -1,073$ · $P > 0,3$), ενώ η διάμεσος ήταν 2,9 h και το εύρος των τιμών 23,0 h (Εικόνα 3.29).



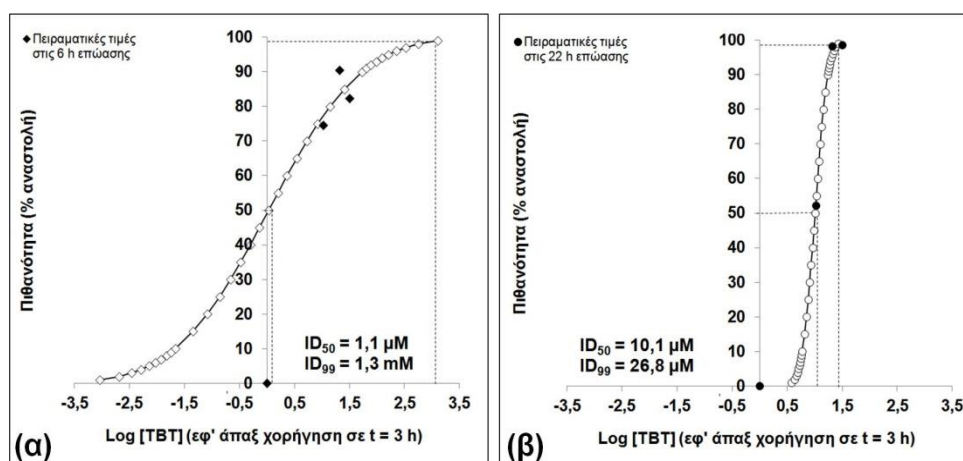
Εικόνα 3.29. Επίδραση της χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στον Td του *S. cerevisiae*. Ο χρόνος διπλασιασμού (Td) υπολογίσθηκε μετά από εφ' άπαξ χορήγηση 0,05% (v/v) DMSO (n = 6) ή 10,5 μM TBT (n=6) στην έναρξη της λογαριθμικής φάσης (t = 3 h) ανάπτυξης του σακχαρομύκητα σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με θηκογράμματα (εσωτερική οριζόντια γραμμή: διάμεσος, ύψος σκιασμένου παραλληλογράμμου: ενδοτεταρτημοριακό εύρος Q1 25ο εκατοστημόριο - Q3 75ο εκατοστημόριο, εξωτερικές γραμμές: φράκτες ελάχιστης και μέγιστης τιμής της κατανομής των διακριτών τιμών (λευκοί κύκλοι). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

3.6.3. ID₅₀ και ID₉₉ κατά τη χορήγηση TBT στη λογαριθμική φάση

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι τιμές των ID₅₀ και ID₉₉ κατά τη χορήγηση του TBT στην έναρξη της λογαριθμικής φάσης της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα, έγιναν πιλοτικά πειράματα στα οποία χορηγήθηκαν 5,0 και 31,5 μM TBT στις 3 h επώασης των καλλιιεργειών.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τιμές των ID_{50} και ID_{99} ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους (Εικόνα 3.30α), και χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές που υπολογίσθηκαν κατά τη χορήγηση του TBT στη λανθάνουσα φάση (Εικόνες 3.24β και 3.24γ).

Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανασταλτική επίδραση του TBT των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων πληθυσμών του σακχαρομύκητα κατά τη λογαριθμική φάση, συγκριτικά με τους πληθυσμούς που αναπτύσσονταν στη λανθάνουσα φάση.

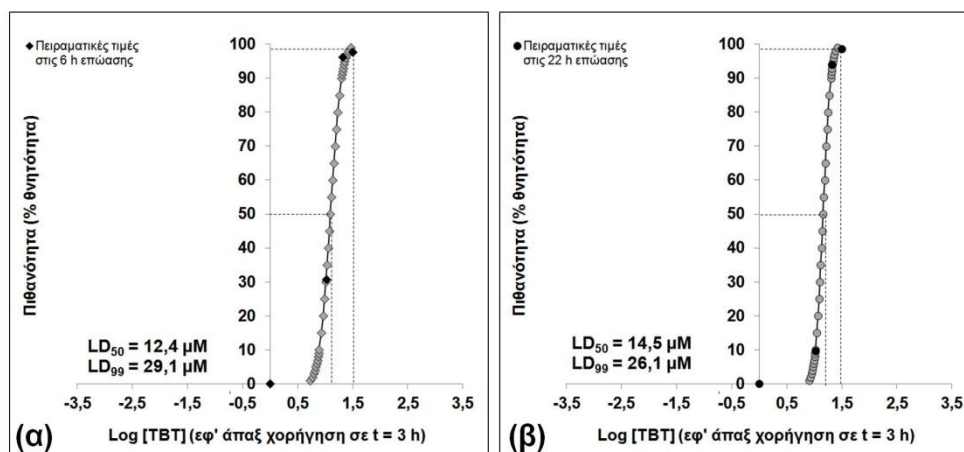


Εικόνα 3.30. ID_{50} και ID_{99} κατά τη χορήγηση του TBT στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης του *S. cerevisiae*. Γραφική απεικόνιση λογιστικής παλινδρόμησης με το μοντέλο αντίστροφης κανονικής συνάρτησης (probit) της πιθανότητας επιτυχούς αναστολής της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα που εκτέθηκε σε διάφορες εφ' άπαξ δόσεις τριβουτυλοκαασίτερου (TBT) στην έναρξη της λογαριθμικής φάσης ($t = 3 \text{ h}$). Η μέση ανασταλτική δόση (ID_{50}) και η δόση που προκάλεσε αναστολή στο 99% του υπό μελέτη πληθυσμού (ID_{99}) υπολογίσθηκαν στη λογαριθμική [(α) 6 h, ◆] και στη μεταλογαριθμική [(β) 22 h, ○] φάση της ανάπτυξης. Τα σύμβολα ◆, ● δείχνουν τα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα για κάθε φάση.

3.6.4. LD_{50} και LD_{99} κατά τη χορήγηση TBT στη λογαριθμική φάση

Κατά την χορήγηση του TBT στην έναρξη της λογαριθμικής φάσης, η LD_{99} ήταν περίπου διπλάσια της LD_{50} , τόσο κατά τη πορεία της

λογαριθμικής φάσης (Εικόνα 3.31α), όσο και στη μεταλογαριθμική φάση της ανάπτυξης (Εικόνα 3.31β).

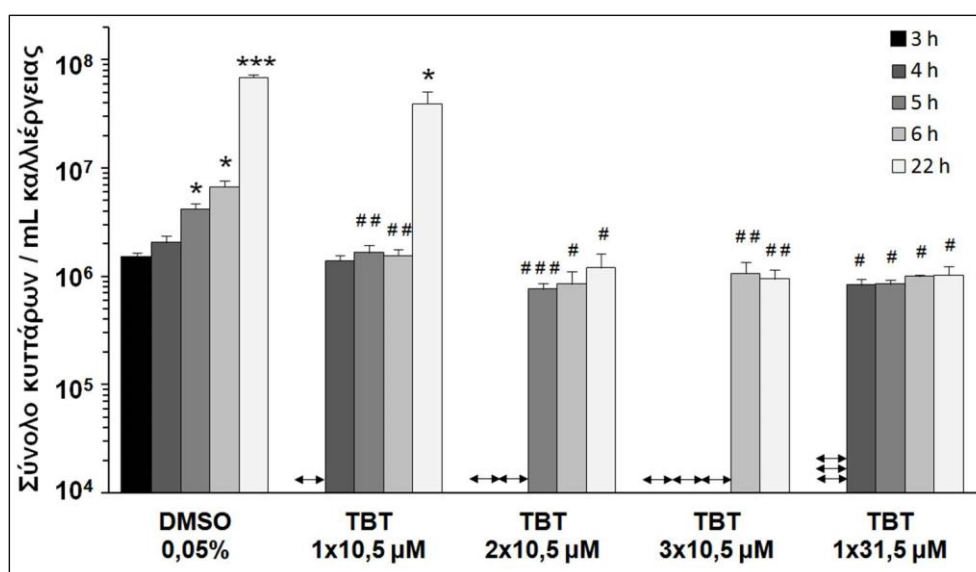


Εικόνα 3.31. LD_{50} και LD_{99} κατά τη χορήγηση του TBT στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης του *S. cerevisiae*. Γραφική απεικόνιση λογιστικής παλινδρόμησης με το μοντέλο αντίστροφης κανονικής συνάρτησης (probit) της πιθανότητας επιτυχούς θανατηφόρου δράσης έναντι του σακχαρομύκητα που εκτέθηκε σε διάφορες εφ' άπαξ δόσεις τριβουτυλοκασσίτερου (TBT) κατά την έναρξη της λογαριθμικής φάσης ($t = 3$ h). Η μέση θανατηφόρος δόση (LD_{50}) και η δόση που προκάλεσε θάνατο στο 99% του υπό μελέτη πληθυσμού (LD_{99}) υπολογίστηκαν στη λογαριθμική [(α) 6 h, ◆] και στη μεταλογαριθμική [(β) 22 h, ○] φάση της ανάπτυξης. Τα σύμβολα ◆, ● δείχνουν τα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα για κάθε φάση.

Οι συγκρίσιμες τιμές της LD_{50} στις 6 h επώασης κατά τη χορήγηση του TBT στη λανθάνουσα (Εικόνα 3.25β) και τη λογαριθμική (Εικόνα 3.31β) φάση, καθώς και η μεγαλύτερη τιμή της LD_{99} στο πρώτο συγκριτικά με το δεύτερο σχήμα είναι ενδεικτικά στοιχεία της πιθανής διαφορετικής θανατηφόρου επίδρασης του TBT στους υποπληθυσμούς των κυττάρων του σακχαρομύκητα.

3.7. Επαναλαμβανόμενη χορήγηση του TBT στην λογαριθμική φάση

Η έκθεση σε 1, 2 και 3 διαδοχικές δόσεις 10,5 μM TBT στην αρχή της λογαριθμικής φάσης (t = 3 h · 3, 4 h · 3, 4, 5 h, αντίστοιχα) προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα (Εικόνα 3.32).



Εικόνα 3.32. Επίδραση της εφ' άπαξ και της επαναλαμβανόμενης χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στην ανάπτυξη του *S. cerevisiae*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος MO ± SEM (n = 3-17) του συνολικού αριθμού των κυττάρων σε διάφορους χρόνους επώασης (3-22 h) των καλλιιεργειών που έλαβαν 1 (↔), 2 (↔↔) ή 3 (↔↔↔) δόσεις 10,5 μM TBT στη λογαριθμική φάση (3 h · 3, 4 h · 3, 4, 5 h, αντίστοιχα), καθώς και 1 δόση 31,5 μM TBT στις 3 h επώασης. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χορήγησης 1 δόσης DMSO στις 3 h επώασης, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων δοσολογικών σχημάτων χορήγησης DMSO στους μάρτυρες (Kruskal-Wallis H test P > 0,05). * · *** P < 0,05 · 0,001 vs αντίστοιχη τιμή στις 3 h (ANOVA). # · ## · ### P < 0,05 · 0,01 · 0,001 vs αντίστοιχη τιμή του μάρτυρα που έλαβε μόνο DMSO (Mann-Whitney U test). DMSO: διμεθυλοσουλφοξειδίο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

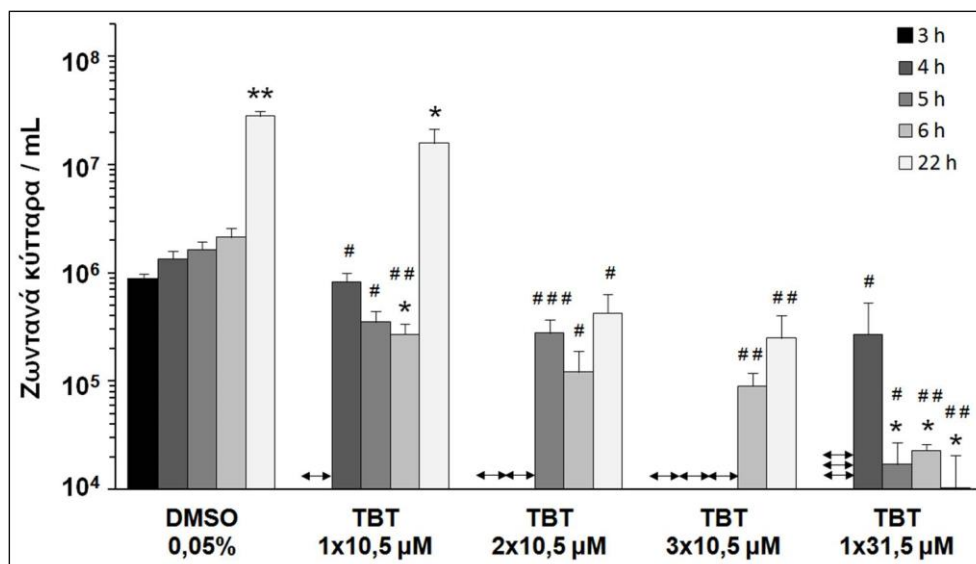
Σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου χορηγήθηκαν αντίστοιχες δόσεις 0,05% (v/v) DMSO σε αντίστοιχους χρόνους επώασης, προκλήθηκε

σημαντική αναστολή της ανάπτυξης έως τη μεταλογαριθμική φάση ($t = 22$ h) κατά την έκθεση του σακχαρομύκητα σε 2 (Mann-Whitney U test · $Z = -1,936$ · $P < 0,05$ · $n = 3-5$) ή 3 (Mann-Whitney U test · $Z = -2,619$ · $P < 0,01$ · $n = 5$), επαναλαμβανόμενες δόσεις 10,5 μ M TBT, σε αντίθεση με τη χορήγηση 1 δόσης 10,5 μ M TBT (Mann-Whitney U test · $Z = -1,768$ · $P > 0,05$ · $n = 6$).

Στη μεταλογαριθμική φάση ($t = 22$ h), η αναστολή της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα μετά από έκθεση σε 2 και 3 επαναλαμβανόμενες δόσεις 10,5 μ M TBT ήταν συγκρίσιμη (Mann-Whitney U test · $Z = -0,149$ · $P > 0,8$ · $n = 3-5$ και $Z = -0,458$ · $P > 0,6$ · $n = 3-5$, αντίστοιχα) με την αναστολή που προκάλεσε η εφ' άπαξ χορήγηση της τριπλάσιας δόσης των 31,5 μ M TBT στην αρχή της λογαριθμικής ($t = 3$ h) φάσης (Εικόνα 32).

Η αναστολή της ανάπτυξης συνοδεύτηκε από άμεση αναστολή της επιβίωσης των κυττάρων του σακχαρομύκητα (Εικόνα 3.33).

Στατιστικά σημαντική αναστολή της επιβίωσης σε σχέση με τον μάρτυρα παρατηρήθηκε εντός 1 h από τη χορήγηση της 1ης δόσης των 10,5 μ M TBT (Mann-Whitney U test · $Z = -2,183$ · $P < 0,05$ · $n = 14-17$) (Εικόνα 3.33). Αρνητική χρονοεξαρτώμενη αναστολή της επιβίωσης έως τη μεταλογαριθμική φάση εμφανίστηκε στους πληθυσμούς που εκτέθηκαν σε 2 (Spearman's $\rho = -0,439$ · $P < 0,05$ · $n = 5$) και 3 (Spearman's $\rho = -0,693$ · $P < 0,001$ · $n = 5-6$) επαναλαμβανόμενες δόσεις 10,5 μ M TBT, σε αντίθεση με τις καλλιέργειες που έλαβαν 1 μόνο δόση 10,5 μ M TBT (Spearman's $\rho = 0,098$ · $P > 0,6$ · $n = 6$).

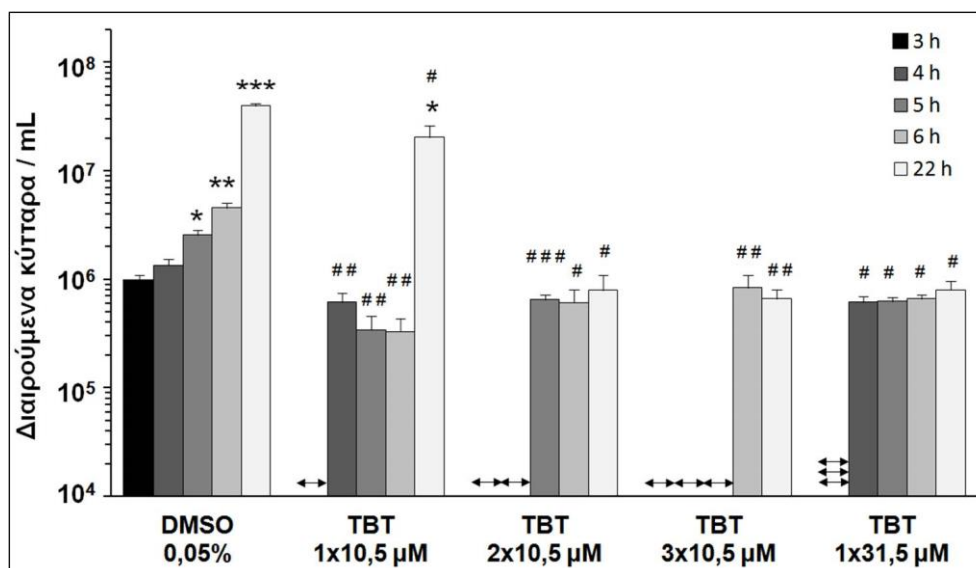


Εικόνα 3.33. Επίδραση της εφ' άπαξ και της επαναλαμβανόμενης χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στην επιβίωση του *S. cerevisiae*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος $MO \pm SEM$ ($n = 3-17$) του αριθμού των ζωντανών κυττάρων σε διάφορους χρόνους επώασης (3-22 h) των καλλιεργειών που έλαβαν 1 (\Leftrightarrow), 2 ($\Leftrightarrow\Leftrightarrow$) ή 3 ($\Leftrightarrow\Leftrightarrow\Leftrightarrow$) δόσεις 10,5 μM TBT στη λογαριθμική φάση (3 h · 3, 4 h · 3, 4, 5 h, αντίστοιχα), καθώς και 1 δόση 31,5 μM TBT στις 3 h επώασης. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χορήγησης 1 δόσης DMSO στις 3 h επώασης, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων δοσολογικών σχημάτων χορήγησης DMSO στους μάρτυρες (Kruskal-Wallis H test $P > 0,05$). * · ** $P < 0,05 \cdot 0,01$ vs αντίστοιχη τιμή στις 3 h (ANOVA). # · ## · ### $P < 0,05 \cdot 0,01 \cdot 0,001$ vs αντίστοιχη τιμή του μάρτυρα που έλαβε μόνο DMSO (Mann-Whitney U test). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

Όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή, επίσης εντός 1 h από τη χορήγηση της 1ης δόσης 10,5 μM TBT (Mann-Whitney U test · $Z = -2,937 \cdot P < 0,01 \cdot n = 14-17$). Ο ο αριθμός των διαιρούμενων κυττάρων παρέμεινε μειωμένος έως τις 6 h της επώασης (Mann-Whitney U test · $Z = -2,882 \cdot P < 0,01 \cdot n = 5-6$) συγκριτικά με τον μάρτυρα (Εικόνα 3.34).

Κατά την πρόοδο στη μεταλογαριθμική φάση, τα διαιρούμενα κύτταρα, παρόλο που ήταν λιγότερα από αυτά που προσδιορίστηκαν

στις καλλιέργειες των μαρτύρων (Mann-Whitney U test · $Z = -2,402$ · $P < 0,05$ · $n = 6$), εντούτοις αυξήθηκαν σημαντικά συγκριτικά με αυτά που ανιχνεύτηκαν στις ίδιες καλλιέργειες στις 3-6 h επώασης (ANOVA · $P < 0,05$ · $n = 6-17$)



Εικόνα 3.34. Επίδραση της εφ' άπαξ και της επαναλαμβανόμενης χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στον πολλαπλασιασμό του *S. cerevisiae*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος $MO \pm SEM$ ($n = 3-17$) του αριθμού των διαιρούμενων κυττάρων σε διάφορους χρόνους επώασης (3-22 h) των καλλιεργειών που έλαβαν 1 (↔), 2 (↔↔) ή 3 (↔↔↔) δόσεις 10,5 μM TBT στη λογαριθμική φάση (3 h · 3, 4 h · 3, 4, 5 h, αντίστοιχα), καθώς και 1 δόση 31,5 μM TBT στις 3 h επώασης. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χορήγησης 1 δόσης DMSO στις 3 h επώασης, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων δοσολογικών σχημάτων χορήγησης DMSO στους μάρτυρες (Kruskal-Wallis H test $P > 0,05$). * · ** · *** $P < 0,05$ · 0,01 · 0,001 vs αντίστοιχη τιμή στις 3 h (ANOVA). # · ## · ### $P < 0,05$ · 0,01 · 0,001 vs αντίστοιχη τιμή του μάρτυρα που έλαβε μόνο DMSO (Mann-Whitney U test). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκαρσατέρος.

3.7.1. Συσσωρευτική επίδραση του TBT στη λογαριθμική φάση

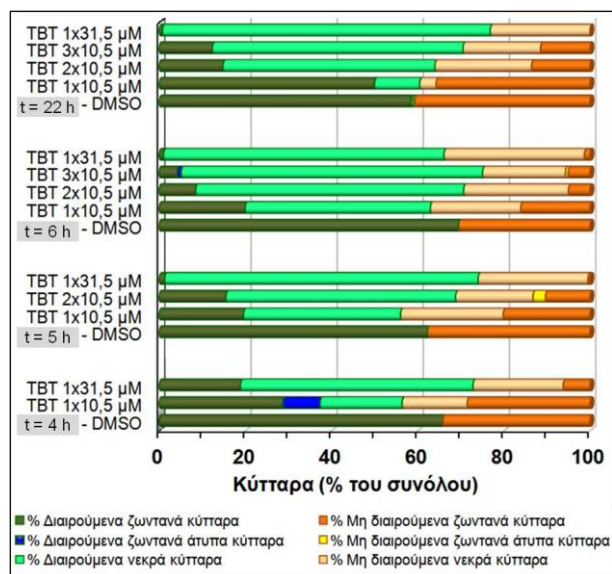
Στις 6 h επώασης, η αναλογία των ζωντανών κυττάρων στις καλλιέργειες των μαρτύρων ($n = 14$) ήταν 100%. Αντίστοιχα, η

αναλογία των διαιρούμενων κυττάρων ήταν $70,8 \pm 2,8\%$ και ο λόγος των διαιρούμενων/μη διαιρούμενων κυττάρων υπολογίστηκε σε $3,0 \pm 0,5$.

Εντός 1 h (t = 4 h) από τη χορήγηση της 1ης δόσης 10,5 μM TBT (t = 3 h), η εκατοστιαία αναλογία των ζωντανών κυττάρων του σακχαρομύκητα μειώθηκε σε σχέση με τον μάρτυρα (Εικόνα 3.33), και ήταν στατιστικά σημαντική για τα διαιρούμενα ($37,3 \pm 6,6\%$) (Mann-Whitney U test · Z = -2,660 · P < 0,01 · n = 14-17), αλλά όχι για τα μη διαιρούμενα ($28,5 \pm 3,6\%$) (Mann-Whitney U test · Z = -1,389 · P > 0,1 · n = 14-17) κύτταρα. Η μείωση αυτή συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση των νεκρών διαιρούμενων ($19,0 \pm 5,0\%$) (Mann-Whitney U test · Z = -4,957 · P < 0,001 · n = 14-17) και μη διαιρούμενων ($15,1 \pm 4,1\%$) (Mann-Whitney U test · Z = -4,143 · P < 0,001 · n = 14-17) κυτταρικών πληθυσμών, ενώ εμφανίστηκαν ζωντανά διαιρούμενα άτυπα κύτταρα (Εικόνα 3.16) σε ποσοστό $8,6 \pm 5,0\%$ του συνολικού πληθυσμού (Εικόνα 3.35).

Κατά την έκθεση στη 2η δόση 10,5 μM TBT (t = 4 h), παρατηρήθηκε άμεση (t = 5 h) περαιτέρω σημαντική μείωση της αναλογίας των ζωντανών μη διαιρούμενων πληθυσμών σε $10,3 \pm 2,9\%$ (Mann-Whitney U test · Z = -2,242 · P < 0,05 vs 1η δόση · n = 6-11) και οριακή αύξηση της αναλογίας των νεκρών διαιρούμενων κυττάρων σε $56,2 \pm 5,9\%$ (Mann-Whitney U test · Z = -1,910 · P = 0,056 vs 1η δόση · n = 6-11), ενώ ανιχνεύτηκαν ζωντανά μη διαιρούμενα άτυπα κύτταρα (Εικόνα 3.16) σε ποσοστό $\sim 2,9\%$ του συνολικού πληθυσμού (Εικόνα 3.35).

Η χορήγηση της 3ης δόσης 10,5 μM TBT (t = 5 h), δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική άμεση (t = 6 h) μεταβολή στην αναλογία των κυτταρικών υποπληθυσμών του σακχαρομύκητα, σε σχέση με τη χορήγηση της 2ης δόσης (Kruskal-Wallis H test · P > 0,9 Dunn's pairwise test με διόρθωση Bonferroni · n = 5-6) (Εικόνα 3.35).



Εικόνα 3.35. Επίδραση της εφ’ άπαξ και της επαναλαμβανόμενης χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση στην αναλογία διάφορων υποπληθυσμών κυττάρων του *S. cerevisiae*. Η χορήγηση του TBT έγινε σε 1, 2 ή 3 δόσεις 10,5 μM TBT στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης (3 h · 3, 4 h · 3, 4, 5 h αντίστοιχα), καθώς και σε 1 δόση 31,5 μM TBT στις 3 h επώασης. Η αναλογία των διάφορων κυττάρων παρουσιάζεται στη λογαριθμική (t = 4, 5, 6 h) και στη μεταλογαριθμική (t = 22 h) φάση της ανάπτυξης (n = 3-17). Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της έκθεσης σε 1 δόση DMSO στις 3 h επώασης, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων δοσολογικών σχημάτων χορήγησης DMSO στους μάρτυρες (Kruskal-Wallis H test P > 0,05). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

3.7.2. Οξεία επίδραση του TBT στη λογαριθμική φάση

Στην περίπτωση της χορήγησης τριπλάσιας δόσης (31,5 μM) TBT στην αρχή της λογαριθμικής φάσης (t = 3 h), παρατηρήθηκαν ομοιότητες, αλλά και διαφορές στο προφίλ της αναλογίας των διαφόρων υποπληθυσμών των κυττάρων του σακχαρομύκητα συγκριτικά με τη χορήγηση 1 ή επαναλαμβανόμενων δόσεων 10,5 μM TBT (Εικόνα 3.35).

Συγκεκριμένα, εντός 1 h (t = 4 h) από τη χορήγηση 31,5 μM TBT, η αναλογία των ζωντανών μη διαιρούμενων κυττάρων ($6,2 \pm 5,4\%$) μειώθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση τόσο με τον μάρτυρα (Mann-Whitney U test Z = -2,869 · P < 0,01 · n = 4-14) όσο και με

τις καλλιέργειες που είχαν εκτεθεί σε 1 δόση 10,5 μM TBT (Mann-Whitney U test $Z = -2,288 \cdot P < 0,05 \cdot n = 4-17$).

Η αντίστοιχη μείωση ήταν οριακά σημαντική για τα διαιρούμενα κύτταρα ($18,8 \pm 17,8\%$) (Mann-Whitney U test $Z = -1,806 \cdot P = 0,071 \cdot n = 4-17$, και $Z = -1,748 \cdot P = 0,081 \cdot n = 4$, αντίστοιχα).

Παράλληλα, η αναλογία των νεκρών διαιρούμενων ($54,0 \pm 16,2\%$) και μη διαιρούμενων ($20,9 \pm 7,4\%$) κυττάρων αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με τον μάρτυρα (Mann-Whitney U test $Z = -4,083 \cdot P < 0,001$ και $Z = -2,953 \cdot P < 0,01 \cdot n = 4-14$, αντίστοιχα).

Συγκριτικά με τη χορήγηση 1 δόσης 10,5 μM TBT, τα νεκρά διαιρούμενα κύτταρα αυξήθηκαν οριακά (Mann-Whitney U test $Z = -1,927 \cdot P = 0,052 \cdot n = 4-6$), ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στην αναλογία των νεκρών μη διαιρούμενων κυττάρων (Mann-Whitney U test $Z = -0,359 \cdot P > 0,7 \cdot n = 4-6$) ούτε ανιχνεύτηκαν άτυπα κύτταρα (Εικόνα 3.35).

3.7.3. Κυτταρικοί υποπληθυσμοί στη λογαριθμική φάση

Στις 6 h επώασης, η αναλογία των συνολικών ζωντανών κυττάρων, καθώς και των ζωντανών διαιρούμενων και μη διαιρούμενων υποπληθυσμών στις καλλιέργειες που είχαν εκτεθεί σε 31,5 μM TBT ήταν σημαντικά μικρότερη από τον μάρτυρα και από τη χορήγηση 1 δόσης 10,5 μM TBT ($P < 0,05 \cdot$ Dunn's pairwise test με διόρθωση Bonferroni $\cdot n = 4-6$), αλλά όχι από τις 2 ή 3 επαναλαμβανόμενες δόσεις 10,5 μM TBT ($P > 0,8 \cdot$ Dunn's pairwise test με διόρθωση Bonferroni $\cdot n = 4-6$).

Στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης ($t = 6$ h), οι αυξανόμενες τιμές της σχετικής αναλογίας συνολικών διαιρούμενων/μη διαιρούμενων κυττάρων μετά από χορήγηση 1 ($1,7 \pm 0,1 \cdot n = 6$), 2 ($2,5 \pm 0,4 \cdot n = 5$) και 3 ($3,4 \pm 0,5 \cdot n = 5$) δόσεων 10,5 μM TBT παρουσίασαν σημαντικές διαφορές (Kruskal-Wallis H test $\chi^2 = 11,359 \cdot d.f. = 2 \cdot P$

< 0,01) που εντοπίστηκαν μεταξύ της 1 και των 3 δόσεων 10,5 μM TBT ($P < 0,01$ · Dunn's pairwise test με διόρθωση Bonferroni).

Ο λόγος της αναλογίας των ζωντανών διαιρούμενων/μη διαιρούμενων κυττάρων δε διέφερε σημαντικά (Kruskal-Wallis H test $\chi^2 = 0,161$ · $d.f. = 2$ · $P > 0,9$) μεταξύ των δοσολογικών σχημάτων που μελετήθηκαν.

Αντίθετα, οι τιμές της σχετικής αναλογίας των νεκρών διαιρούμενων/μη διαιρούμενων κυττάρων κατά τη χορήγηση 1 ($2,1 \pm 0,3$ · $n = 6$), 2 ($3,4 \pm 1,0$ · $n = 5$) και 3 ($4,0 \pm 0,5$ · $n = 6$) δόσεων 10,5 μM TBT παρουσίασαν σημαντικές διαφορές (Kruskal-Wallis H test $\chi^2 = 5,505$ · $d.f. = 2$ · $P < 0,05$) που εντοπίστηκαν στην αύξηση κατά τη χορήγηση 3 δόσεων 10,5 μM TBT ($P < 0,05$, Dunn's pairwise test με διόρθωση Bonferroni) συγκριτικά με τον μάρτυρα.

Συνολικά, οι στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην αναλογία των κυτταρικών υποπληθυσμών στις καλλιέργειες του σακχαρομύκητα που εκτέθηκαν στα διάφορα δοσολογικά σχήματα του TBT κατά τη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. Μεταβολές στην εκατοστιαία αναλογία των κυτταρικών υποπληθυσμών κατά την έκθεση του σακχαρομύκητα στον TBT στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης. Το επίπεδο σημαντικότητας (P) προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία Dunn's pairwise με διόρθωση Bonferroni (Kruskal-Wallis H test) για τις συγκρίσεις που αφορούσαν αύξηση (↑) ή μείωση (↓) της αναλογίας ζωντανών (Z), νεκρών (N), διαιρούμενων (Δ) και μη διαιρούμενων (μΔ) κυττάρων στις αντίστοιχες καλλιέργειες. Αναφέρεται επίσης ο τύπος των άτυπων (A) κυττάρων που εμφανίστηκε στις καλλιέργειες. Το 1, τα 2 και τα 3 βέλη αντιστοιχούν στις τιμές $P < 0,05 \cdot 0,01 \cdot 0,001$.

Συγκρινόμενα δοσολογικά σχήματα	Z	Δ	μΔ	ZΔ	ZμΔ	NΔ	NμΔ	A
1x 10,5 μM TBT vs μάρτυρας1 (t = 4 h)	↓↓	↔	↔	↓↓	↔	↑↑	↑↑↑	Δ
2x vs 1x 10,5 μM TBT (t = 5 h)	↓↓	↓	↓	↓	↓↓↓	↑↑	↔	μΔ
3x vs 2x 10,5 μM TBT (t = 6 h)	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	δ/α
31,5 μM TBT vs μάρτυρας1 (t = 4 h)	↓↓↓	↔	↔	↓	↓↓	↑↑↑	↑↑	δ/α
31,5 μM TBT vs μάρτυρας1 (t = 6 h)	↓↓	↔	↔	↓↓	↓↓	↑	↑↑	δ/α
10,5 μM vs 31,5 μM TBT (t = 4 h)	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	δ/α
3x 10,5 μM vs 31,5 μM TBT (t = 6 h)	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	δ/α

¹χορήγηση 0,05% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) στις 3 h επώασης, ↔ μη στατιστικά σημαντική μεταβολή, δ/α: δεν ανιχνεύθηκαν, t: χρόνος επώασης που έγινε η παρατήρηση, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος

3.7.4. Κυτταρικοί υποπληθυσμοί στη μεταλογαριθμική φάση

Στις 22 h επώασης, η αναλογία των ζωντανών κυττάρων στις καλλιέργειες των μαρτύρων ($n = 13$) ήταν $99,3 \pm 0,3\%$. Η αντίστοιχη αναλογία των διαιρούμενων κυττάρων ήταν $62,2 \pm 2,1\%$ και ο λόγος των διαιρούμενων/μη διαιρούμενων κυττάρων υπολογίστηκε σε $1,7 \pm 0,2$.

Συγκριτικά με τη 1 δόση 10,5 μM TBT, η αναλογία των ζωντανών κυττάρων παρέμεινε σημαντικά μειωμένη (Kruskal-Wallis H test $\chi^2 = 13,499 \cdot d.f. = 3 \cdot P < 0,01 \cdot n = 3-6$) στους πληθυσμούς που

εκτέθηκαν σε 2 ($23,3 \pm 11,2\%$) και 3 ($23,7 \pm 10,5\%$) επαναλαμβανόμενες δόσεις $10,5 \mu\text{M}$ TBT ή σε $31,5 \mu\text{M}$ TBT ($0,7 \pm 0,7\%$) (Εικόνα 3.35).

Σε αντίθεση με τη λογαριθμική φάση ($t = 6 \text{ h}$), ο λόγος της αναλογίας των ζωντανών διαιρούμενων/μη διαιρούμενων κυττάρων στη στάσιμη φάση ($t = 22 \text{ h}$) δε διέφερε σημαντικά (Kruskal-Wallis H test $\chi^2 = 0,989 \cdot d.f. = 2 \cdot P > 0,6 \cdot n = 3-6$) μεταξύ των δοσολογικών σχημάτων που μελετήθηκαν και υπολογίστηκε σε $1,5 \pm 0,2$ ($n = 6$) · $1,0 \pm 0,4$ ($n = 4$) και $1,2 \pm 0,5$ ($n = 4$) για τη χορήγηση 1, 2 και 3 δόσεων $10,5 \mu\text{M}$ TBT, αντίστοιχα.

Επίσης, ο λόγος των νεκρών διαιρούμενων/μη διαιρούμενων κυττάρων δεν παρουσίασε διαφορές (Kruskal-Wallis H test $\chi^2 = 7,211 \cdot d.f. = 3 \cdot P > 0,6$) και υπολογίστηκε σε $3,0 \pm 0,7$ ($n = 4$) · $2,7 \pm 0,6$ ($n = 5$), $3,5 \pm 0,5$ ($n = 5$) και $3,6 \pm 0,9$ ($n = 3$) για τη χορήγηση 1, 2 και 3 δόσεων $10,5 \mu\text{M}$ TBT και 1 δόσης $31,5 \mu\text{M}$ TBT, αντίστοιχα.

Για το σύνολο των κυττάρων στις καλλιέργειες, ο λόγος των διαιρούμενων/μη διαιρούμενων κυττάρων παρουσίασε αυξανόμενες τιμές κατά τη χορήγηση 1 ($1,6 \pm 0,2 \cdot n = 6$), 2 ($1,8 \pm 0,2 \cdot n = 5$) και 3 ($2,5 \pm 0,3 \cdot n = 5$) δόσεων $10,5 \mu\text{M}$ TBT και 1 δόσης $31,5 \mu\text{M}$ TBT ($3,6 \pm 0,9 \cdot n = 3$), αντίστοιχα, και οριακή διαφορά μεταξύ της 1 δόσης $10,5 \text{ TBT}$ και της τριπλάσιας δόσης $31,5 \mu\text{M}$ TBT (Kruskal-Wallis H test · $P = 0,063$ Dunn's pairwise test με διόρθωση Bonferroni · $n = 3-6$) (Εικόνα 3.35).

3.8. Χορήγηση TBT στη στάσιμη φάση

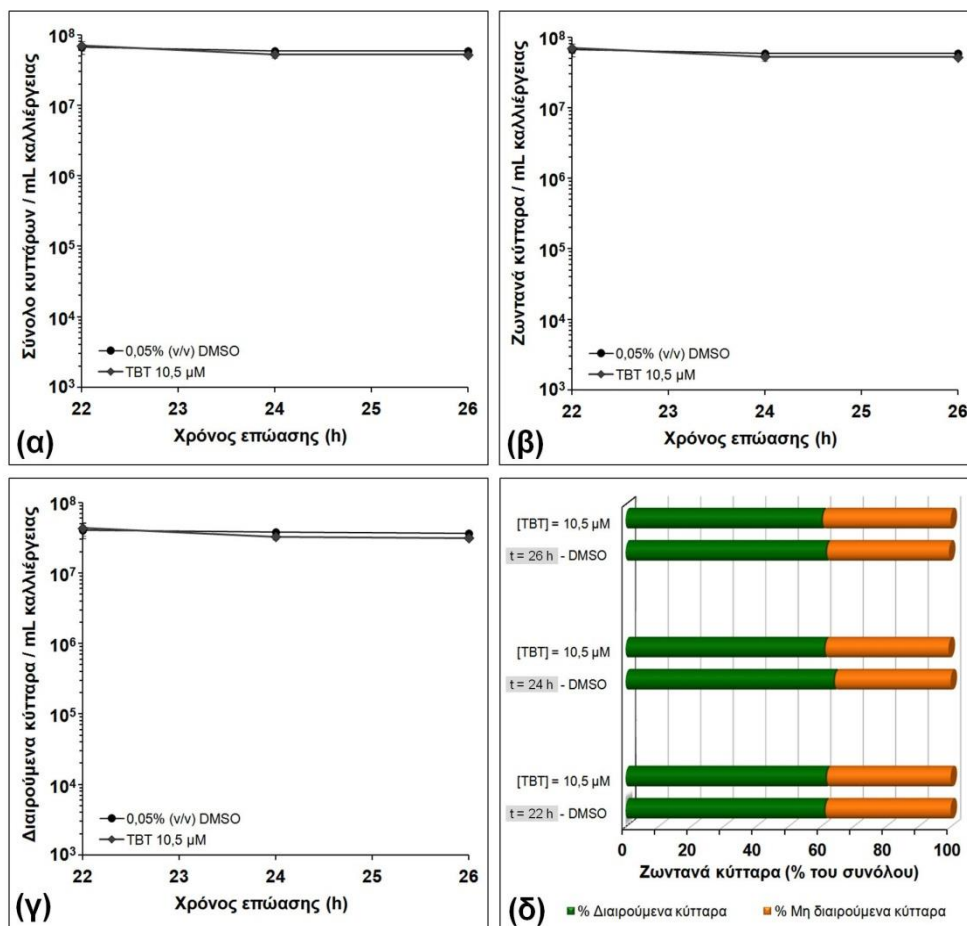
3.8.1. Εφ' άπαξ χορήγηση του TBT στη στάσιμη φάση

Κατά την χορήγηση 10,5 μ M TBT στις 22 h επώασης δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τις καλλιέργειες του μάρτυρα -όπου είχε χορηγηθεί 0,05% (v/v) DMSO στις 22 h επώασης- στην ανάπτυξη (Mann Whitney U test $P > 0,4 \cdot n = 3$) (Εικόνα 3.36α), την επιβίωση (Mann Whitney U test $P > 0,6 \cdot n = 3$) (Εικόνα 3.36β) και τον πολλαπλασιασμό (Mann Whitney U test $P > 0,3 \cdot n = 3$) (Εικόνα 3.36γ) του σακχαρομύκητα, σε όλους τους χρόνους που μελετήθηκαν.

Στις καλλιέργειες επικράτησαν τα διαιρούμενα κύτταρα σε αναλογία που κυμάνθηκε από 60,3% έως 64,0%, ενώ η εκατοστιαία αναλογία των νεκρών κυττάρων στους πληθυσμούς του σακχαρομύκητα ήταν $< 0,7\%$ (Εικόνα 3.36δ).

3.8.2. Επαναλαμβανόμενη χορήγηση του TBT στη στάσιμη φάση

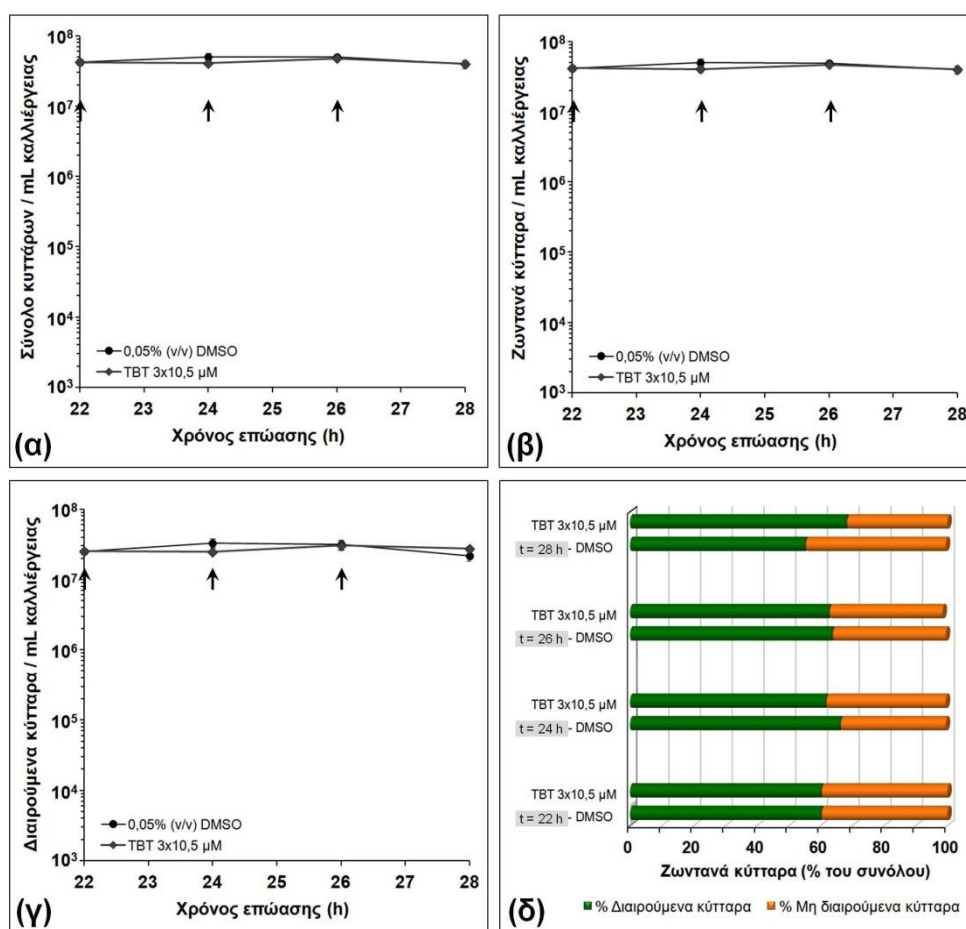
Κατά την χορήγηση 3 δόσεων 10,5 μ M TBT στις 22, 24 και 26 h επώασης, δεν παρατηρήθηκε χρονοεξαρτώμενη μεταβολή στην ανάπτυξη (Spearman's $\rho = -0,422 \cdot P > 0,2 \cdot n = 2$) (Εικόνα 3.37α), την επιβίωση (Spearman's $\rho = -0,422 \cdot P > 0,2 \cdot n = 2$) (Εικόνα 3.37β) και τον πολλαπλασιασμό (Spearman's $\rho = -0,527 \cdot P > 0,1 \cdot n = 2$) των κυττάρων (Εικόνα 3.37γ), κατά αντιστοιχία με τις καλλιέργειες των μαρτύρων (Spearman's $\rho \cdot P > 0,6 \cdot n = 2$) (Εικόνα 3.37).



Εικόνα 3.36. Επίδραση της εφ' άπαξ χορήγησης TBT κατά τη στάσιμη φάση στα χαρακτηριστικά του *S. cerevisiae*. Η χορήγηση 10,5 μM TBT έγινε στις 22 h επώασης ($t = 22$ h). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3$) (α) του συνολικού αριθμού των κυττάρων και του αριθμού (β) των ζωντανών και (γ) των διαιρούμενων κυττάρων στις καλλιέργειες που επώαστηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C για 26 h. (δ) Η αναλογία των διαιρούμενων και μη διαιρούμενων ζωντανών κυττάρων του σακχαρομύκητα παρουσιάζεται στη στάσιμη φάση ($t = 22-26$ h) της ανάπτυξης ($n = 3$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων χορηγήσεων TBT και DMSO στην ανάπτυξη (Mann Whitney U test $P > 0,3 \cdot n = 2$) (Εικόνα 3.37α), την επιβίωση (Mann Whitney U test $P > 0,6 \cdot n = 2$) (Εικόνα 3.37β) και τον πολλαπλασιασμό (Mann Whitney U test $P > 0,3 \cdot n = 2$) (Εικόνα 3.37γ) του σακχαρομύκητα, σε όλους τους χρόνους που μελετήθηκαν.

Όπως και στην περίπτωση της χορήγησης 1 δόσης 10,5 μM TBT στις 22 h (Εικόνα 3.36δ), κατά την έκθεση σε 3 δόσεις 10,5 μM TBT στις 22, 24 και 26 h επικράτησαν τα διαιρούμενα κύτταρα σε αναλογία που κυμάνθηκε από 55,0% έως 68,0%, ενώ η εκατοστιαία αναλογία των νεκρών κυττάρων στους πληθυσμούς του σακχαρομύκητα ήταν < 1,5% (Εικόνα 3.37δ).



Εικόνα 3.37. Επίδραση της επαναλαμβανόμενης χορήγησης TBT κατά τη στάσιμη φάση στα χαρακτηριστικά του *S. cerevisiae*. Η χορήγηση 3 δόσεων 10,5 μM TBT έγινε στις 22-26 h επώασης (βέλη). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 2$) (α) του συνολικού αριθμού των κυττάρων και του αριθμού (β) των ζωντανών και (γ) των διαιρούμενων κυττάρων στις καλλιέργειες που επώαστηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C για 28 h. (δ) Η αναλογία των διαιρούμενων και μη διαιρούμενων ζωντανών κυττάρων του σακχαρομύκητα παρουσιάζεται στις 22-28 h ($t = 22-28$ h) επώασης στη στάσιμη φάση της ανάπτυξης ($n = 2$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

Συμπεράσματα

- ❖ Όπως και κατά τη χορήγηση του TBT στη λανθάνουσα φάση, η έκθεση του σακχαρομύκητα σε 10,5 μM TBT στην έναρξη της λογαριθμικής φάση οδήγησε σε:
 - αναστολή της ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των κυττάρων έως τη μεταλογαριθμική φάση (Εικόνα 3.26),
 - επιμήκυνση του χρόνου διπλασιασμού που, όμως, δεν ήταν στατιστικά σημαντική και είχε μεγάλο εύρος τιμών (Εικόνα 3.29),
 - άμεση και παροδική εμφάνιση άτυπων κυττάρων, κυρίως μη διαιρούμενων (Εικόνα 3.27)
- ❖ Αντίθετα, η χορήγηση 10,5 μM TBT στη μεταλογαριθμική φάση δεν επηρέασε την ανάπτυξη, την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του *S. cerevisiae* (Εικόνες 3.36, 3.37).
- ❖ Ο TBT άσκησε συσσωρευτική ανασταλτική δράση στην επιβίωση των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων πληθυσμών του *S. cerevisiae* (Εικόνα 3.33). Τα δεδομένα αυτά απομάκρυναν, χωρίς να αποκλείσουν, την πιθανότητα ανάκαμψης της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα (Εικόνα 3.32) λόγω μεταβολισμού ή εξάντλησης της ουσίας.
- ❖ Οι ταχέως πολλαπλασιαζόμενοι πληθυσμοί του σακχαρομύκητα φαίνεται ότι ήταν πιο ευαίσθητοι στην ανασταλτική δράση του TBT (Εικόνα 3.30), συγκριτικά με τους πληθυσμούς που αναπτύσσονταν στη φάση προσαρμογής (Εικόνα 3.24).
- ❖ Επιπλέον, αν και ο TBT άσκησε άμεση θανατηφόρο δράση τόσο σε διαιρούμενα όσο και σε μη διαιρούμενα κύτταρα (Πίνακας 3.1), τα δεδομένα αναδεικνύουν την υπόθεση της διαφορικής επίδρασης των δόσεων του TBT -στο εύρος της LD₅₀-, στους

κυτταρικούς υποπληθυσμούς ασύγχρονων καλλιεργειών του σακχαρομύκητα (Εικόνες 3.25, Εικόνα 3.31). Έτσι, η χορήγηση 10,5 μM TBT πιθανώς ανέκοψε παροδικά τη διαίρεση διακριτών πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (Πίνακας 3.1), τα οποία παρέμειναν σε συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου και ανισχεύτηκαν μικροσκοπικά με τη μορφή άτυπων κυττάρων (Εικόνα 3.16), χωρίς ικανότητα πολλαπλασιασμού (Εικόνα 3.18), με αποτέλεσμα την επιμήκυνση του χρόνου διπλασιασμού (Εικόνα 3.29).

- ❖ Ο ανθεκτικός στον TBT κυτταρικός υποπληθυσμός που επιβίωσε υπό την επίδραση 10,5 μM TBT διατήρησε την ικανότητα πολλαπλασιασμού και τελικά ξεπέρασε την τοξική επίδραση της ουσίας έως τη μεταλογαριθμική φάση της ανάπτυξης (Εικόνα 3.35).

Ερώτημα 5: Κατά την έκθεση του *S. cerevisiae* σε υποτοξικές δόσεις TBT μπορεί να αναπτυχθεί ανθεκτικότητα έναντι της δράσης υψηλότερων συγκεντρώσεων της ουσίας;

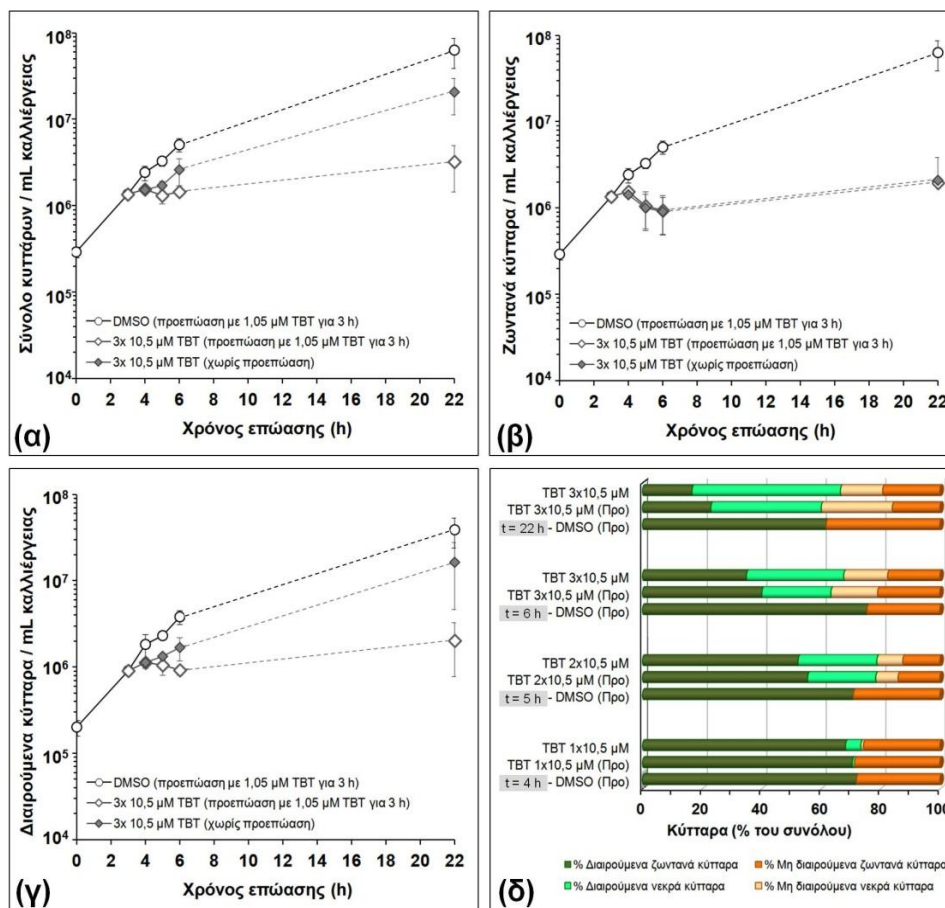
3.9. Προεπώαση με υποτοξικές δόσεις TBT

Σε μία σειρά πιλοτικών πειραμάτων έγινε προκαταρκτική διερεύνηση της πιθανής ανάπτυξης προστατευτικών και/ή προσαρμοστικών μηχανισμών στον σακχαρομύκητα, κατά τη βραχεία και χρόνια έκθεση σε χαμηλή δόση TBT (ήπιο stress) (Tiligada, 2006), έναντι της ανασταλτικής και/ή θανατηφόρου επίδρασης των υψηλότερων δόσεων του TBT (οξύ stress) (Tiligada, 2006).

Για το ήπιο stress επελέγη η δόση 1,05 μM TBT, η οποία ήταν $< \text{ID}_{50}$ κατά τη χορήγηση της ουσίας στη λανθάνουσα φάση (Εικόνα 3.24δ) και περίπου υποδεκαπλάσια της ID_{50} στη μεταλογαριθμική φάση της ανάπτυξης, κατά τη χορήγηση της ουσίας στη λογαριθμική φάση (Εικόνα 3.30β). Για το οξύ stress επελέγησαν οι δόσεις 10,5 και 31,5 μM TBT, οι οποίες ήταν, αντίστοιχα, $\sim \text{ID}_{50}$ και $> \text{LD}_{99}$ κατά τη χορήγηση του TBT στη λογαριθμική φάση (Εικόνες 3.30 και 3.31).

3.9.1. Προεπώαση του σακχαρομύκητα επί 3 h

Η προεπώαση των καλλιιεργειών με 1,05 μM TBT επί 3 h κατά τη λανθάνουσα φάση δεν προστάτεψε τον σακχαρομύκητα από την ανασταλτική δράση των επόμενων επαναλαμβανόμενων χορηγήσεων 10,5 μM TBT κατά τη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης (Εικόνα 3.38). Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων χορηγήσεων TBT και DMSO στις προεπωασμένες καλλιέργειες (Mann Whitney U test $P > 0,1 \cdot n = 2-4$) στην ανάπτυξη (Εικόνα 3.38α), την επιβίωση (Εικόνα 3.38β) και τον πολλαπλασιασμό (Εικόνα 3.38γ) του σακχαρομύκητα, σε όλους τους χρόνους που μελετήθηκαν.



Εικόνα 3.38. Επίδραση στα χαρακτηριστικά του *S. cerevisiae* της επαναλαμβανόμενης χορήγησης TBT κατά τη λογαριθμική φάση σε προεπωασμένες με TBT καλλιέργειες επί 3 h. Η χορήγηση 3 δόσεων 10,5 μM TBT ή 0,05% (v/v) DMSO έγινε στις 3, 4 και 5 h στις καλλιέργειες που είχαν εκτεθεί σε 1,05 TBT κατά τις πρώτες 3 h της επώασης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 2-4$) (α) του συνολικού αριθμού των κυττάρων και του αριθμού των (β) ζωντανών και (γ) διαιρούμενων κυττάρων στις καλλιέργειες που επώαστηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C για 22 h. (δ) Η αναλογία των διαιρούμενων και μη διαιρούμενων κυττάρων παρουσιάζεται στις 4-22 h ($t = 4-22$ h) επώασης ($n = 2-4$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασιίτερος.

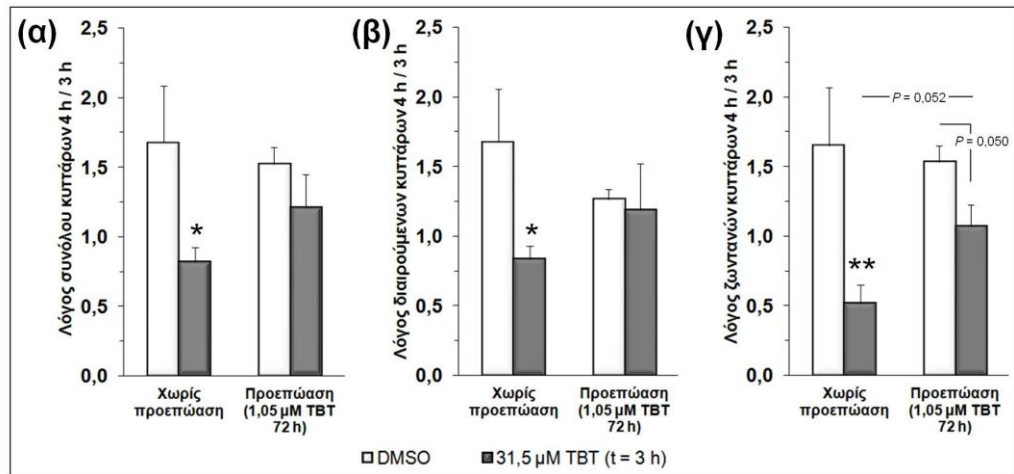
Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές (Mann Whitney U test $P > 0,2 \cdot n = 2-4$) στην ανάπτυξη (Εικόνα 3.38α), την επιβίωση (Εικόνα 3.38β) και τον πολλαπλασιασμό (Εικόνα 3.39γ) του σακχαρομύκητα στις προεπωασμένες με 1,05 μM TBT καλλιέργειες που, ακολούθως, έλαβαν επαναλαμβανόμενες δόσεις 10,5 μM TBT, συγκριτικά με αυτές που δεν είχαν προεπωαστεί

παρουσία 1,05 μM TBT. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην κατανομή της αναλογίας των κυτταρικών υποπληθυσμών (Kruskal-Wallis H test $\cdot d.f. = 2 \cdot P > 0,05$) ανάμεσα στις ομάδες που μελετήθηκαν (Εικόνα 3.38δ).

3.9.2. Προεπάση του σακχαρομύκητα επί 72 h

Η προεπάση καλλιέργειών του σακχαρομύκητα με 1,05 μM TBT επί 72 h πριν τον ενοφθαλμισμό τους σε ΥΒ παρείχε προκαταρκτικές ενδείξεις για την πιθανή τροποποίηση του σακχαρομύκητα κατά το χρόνιο ήπιο stress.

Συγκεκριμένα, η χορήγηση 31,5 μM TBT κατά τη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης των προεπωασμένων με 1,05 μM TBT εναιωρημάτων του σακχαρομύκητα έδειξε τάση άμεσης (εντός 1 h) αύξησης της ανάπτυξης (Εικόνα 3.39α) και του πολλαπλασιασμού (Εικόνα 3.39β) των κυττάρων του σακχαρομύκητα, συγκριτικά με τις καλλιέργειες των μη προεπωασμένων εναιωρημάτων. Η χορήγηση 31,5 μM TBT στα προεπωασμένα κύτταρα μείωσε οριακά την επιβίωση (Kruskal-Wallis H test $\cdot P > 0,1$ Dunn's pairwise test με διόρθωση Bonferroni $\cdot n = 3$) σε σχέση με τον μάρτυρα, σε αντίθεση με τις μη προεπωασμένες καλλιέργειες (Kruskal-Wallis H test $\cdot P < 0,05$ Dunn's pairwise test με διόρθωση Bonferroni $\cdot n = 9$) (Εικόνα 3.39β).



Εικόνα 3.39. Επίδραση της χρόνιας προεπώασης με υποτοξικές δόσεις TBT στα χαρακτηριστικά του *S. cerevisiae*. Η χορήγηση 31,5 μM TBT ή 0,15% (v/v) DMSO έγινε στις 3 h επώασης καλλιέργειών που είχαν ενοφθαλμιστεί με μη προεπωασμένο ή προεπωασμένο σε 1,05 TBT επί 72 h εναιώρημα του σακχαρομύκητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-9$) του λόγου (α) του συνολικού αριθμού, (β) των ζωντανών και (γ) των διαιρούμενων κυττάρων που προσδιορίστηκαν μετά τη χορήγηση 31,5 μM TBT (4 h) προς τις αντίστοιχες τιμές που ελήφθησαν πριν τη χορήγηση 31,5 μM TBT (3 h) σε καλλιέργειες που επώαστηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C. * · ** $P < 0,05 \cdot 0,01$ vs αντίστοιχη τιμή στον μάρτυρα που έλαβε μόνο DMSO (Mann-Whitney U test). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

Συμπεράσματα

- ❖ Παρά τους περιορισμούς αυτής της πιλοτικής μελέτης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χρόνια (Εικόνα 3.39) έκθεση του σακχαρομύκητα σε υποτοξικές συγκεντρώσεις TBT κινητοποίησε εν δυνάμει προστατευτικούς μηχανισμούς έναντι της τοξικής επίδρασης υψηλότερων συγκεντρώσεων της ουσίας.
- ❖ Τα δεδομένα αποτελούν έναυσμα για μελλοντική ενδελεχή διερεύνηση των πιθανών προσαρμοστικών, επιγενετικών και άλλων, μεταβολών που υφίστανται τα ευκαρυωτικά κύτταρα κατά τη χρόνια έκθεσή τους σε υποτοξικές δόσεις του TBT.

Ερώτημα 6: Επηρεάζεται το μεταβολικό προφίλ του *S. cerevisiae* από την έκθεση στον TBT;

3.10. Μεταβολικό προφίλ του σακχαρομύκητα

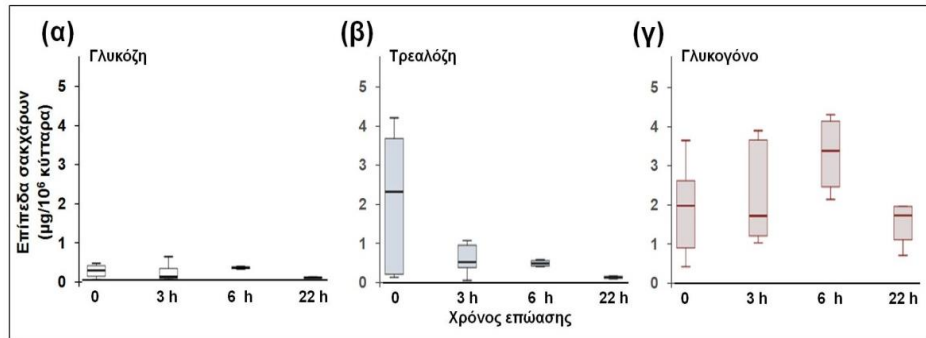
3.10.1. Φυσιολογικά επίπεδα σακχάρων στον *S. cerevisiae*

Κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη του σακχαρομύκητα, τα ενδοκυττάρια επίπεδα της γλυκόζης παρέμειναν χαμηλά σε όλη τη διάρκεια της επώασης έως τη μεταλογαριθμική φάση (Kruskal-Wallis H test $\chi^2 = 5,324 \cdot d.f. = 3 \cdot P > 0,1 \cdot n = 4-9$) (Εικόνα 3.40α).

Η κατανομή των τιμών της τρεαλόζης εμφάνισε οριακή διαφορά μεταξύ των διαφόρων χρονικών σημείων που μελετήθηκαν (Kruskal-Wallis H test $\chi^2 = 7,320 \cdot d.f. = 3 \cdot P = 0,062 \cdot n = 4-9$) (Εικόνα 3.40β), και τα επίπεδα της παρουσίασαν στατιστικά σημαντική χρονοεξαρτώμενη μείωση κατά τη διάρκεια της επώασης (Spearman's $\rho = -0,457 \cdot P < 0,5 \cdot n = 4-9$).

Αντίθετα, τα επίπεδα του γλυκογόνου παρέμειναν σε σχετικά υψηλότερα επίπεδα από αυτά της γλυκόζης και της τρεαλόζης, αλλά χωρίς σημαντική διακύμανση (Kruskal-Wallis H test $\chi^2 = 5,623 \cdot d.f. = 3 \cdot P > 0,1 \cdot n = 4-9$) στη διάρκεια της επώασης (Εικόνα 3.40γ).

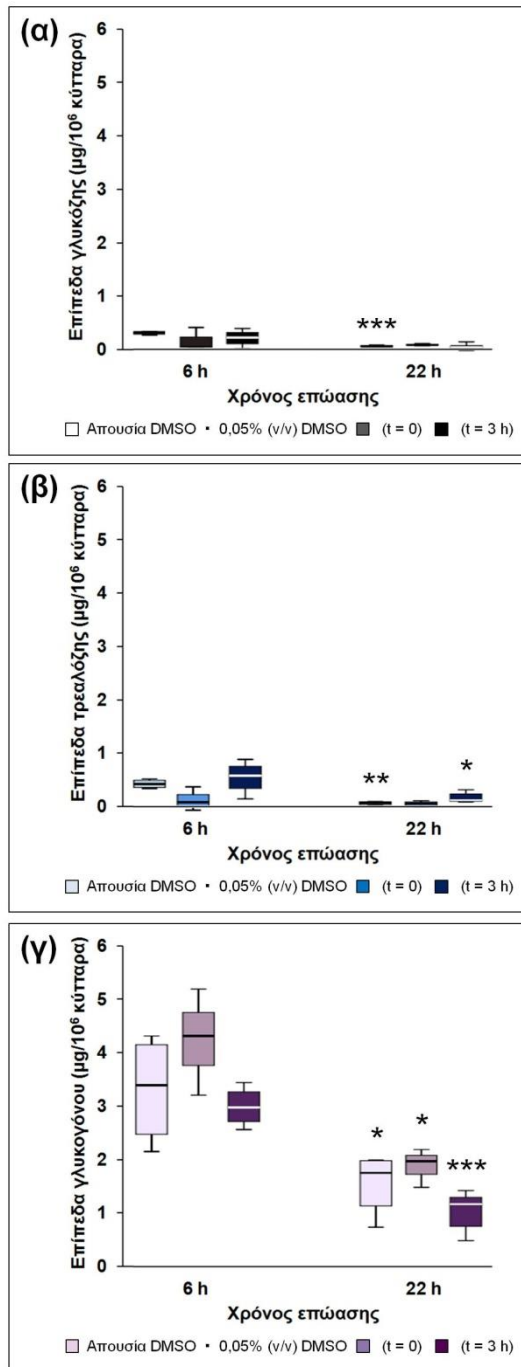
Σημειώνεται ότι στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων που αφορούσαν τα επίπεδα των σακχάρων δε συμπεριελήφθησαν τα πειράματα όπου υπήρχαν έκτροπες τιμές (outliers), οι οποίες αποκαλύφθηκαν κατά την ανάλυση των δεδομένων με τη χρήση του στατιστικού πακέτου IBM® SPSS® v. 25.



Εικόνα 3.40. Ενδοκυττάρια επίπεδα σακχάρων κατά την πορεία ανάπτυξης του *S. cerevisiae*. Τα επίπεδα (α) γλυκόζης, (β) τρεαλόζης και (γ) γλυκογόνου προσδιορίστηκαν στην έναρξη της επώασης (0), καθώς και στη λογαριθμική (3 και 6 h) και τη μεταλογαριθμική (22 h) φάση της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με θηκογράμματα (εσωτερική οριζόντια γραμμή: διάμεσος, ύψος σκιασμένου παραλληλογράμμου: ενδοτεταρτημοριακό εύρος Q1 25ο εκατοστημόριο - Q3 75ο εκατοστημόριο, εξωτερικές γραμμές: φράκτες ελάχιστης και μέγιστης τιμής της κατανομής των διακριτών τιμών).

3.10.2. Επίδραση του DMSO στα επίπεδα σακχάρων

Εστιάζοντας στη λογαριθμική και μεταλογαριθμική φάση της ανάπτυξης των καλλιεργειών που σακχαρομύκητα που επωάζονταν χωρίς προσθήκη κάποιας ουσίας, η ανάλυση των δεδομένων έδειξε σημαντική μείωση των επιπέδων γλυκόζης (Independent Samples test · $P < 0,001 \cdot n = 4-5$) (Εικόνα 3.41α), τρεαλόζης (Independent Samples test · $P < 0,01 \cdot n = 4-5$) (Εικόνα 3.41β) και γλυκογόνου (Independent Samples test · $P < 0,05 \cdot n = 4-5$) (Εικόνα 3.41γ) στη μεταλογαριθμική ($t = 22$ h), συγκριτικά με τη λογαριθμική ($t = 6$ h) φάση.



Εικόνα 3.41. Επίδραση του DMSO στα επίπεδα σακχάρων στον *S. cerevisiae*. Η χορήγηση 0,05% (v/v) DMSO έγινε στη λανθάνουσα ($t = 0$) ή στη λογαριθμική ($t = 3$ h) φάση. Τα επίπεδα (α) γλυκόζης, (β) τρεαλόζης & και (γ) γλυκογόνου προσδιορίστηκαν στη λογαριθμική (6 h) και μεταλογαριθμική (22 h) φάση της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με θηκογράμματα (εσωτερική οριζόντια γραμμή: διάμεσος, ύψος σκιασμένου παραλληλογράμμου: ενδοτεταρτημοριακό εύρος Q1 25ο εκατοστημόριο - Q3 75ο εκατοστημόριο, εξωτερικές γραμμές: φράκτες ελάχιστης και μέγιστης τιμής της κατανομής των διακριτών τιμών). * . ** . *** $P < 0,05$. 0,01 . 0,001 vs αντίστοιχη τιμή στις 6 h (Independent Samples test ή Mann-Whitney U test, $n = 3-6$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο.

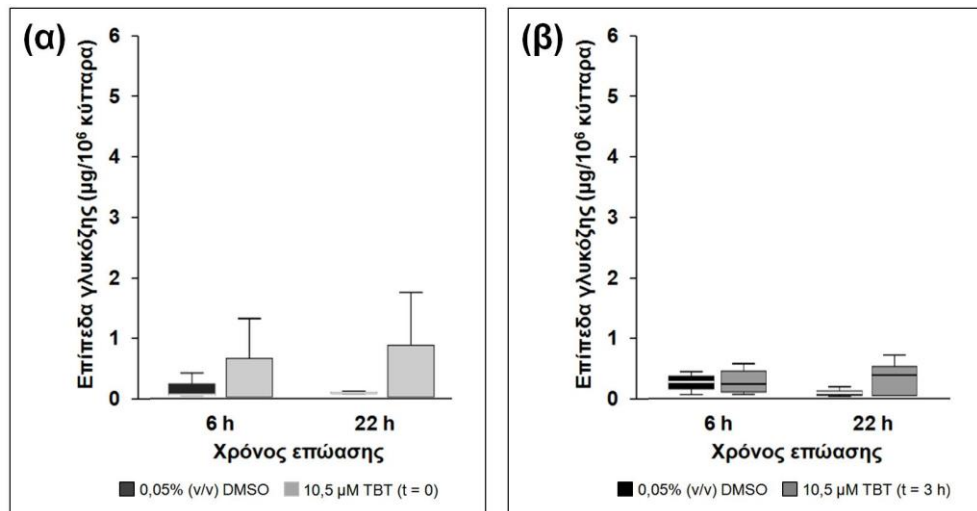
Η έκθεση του σακχαρομύκητα σε 0,05% (v/v) DMSO στην έναρξη ($t = 0$) ή στις 3 h ($t = 3$ h) επώασης δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στη λογαριθμική ($t = 6$ h) και τη μεταλογαριθμική ($t = 22$ h) φάση της ανάπτυξης στα επίπεδα της γλυκόζης (Εικόνα 3.41α), της τρεαλόζης (Εικόνα 3.41β) και του γλυκογόνου (Εικόνα 3.41γ), τόσο μεταξύ τους όσο και συγκριτικά με τις καλλιέργειες που δεν είχαν εκτεθεί στο DMSO (ANOVA · $P > 0,05$ · $n = 3-6$).

Επίσης, σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των σακχάρων και της εκατοστιαίας αναλογίας των ζωντανών ή των διαιρούμενων κυττάρων στις αντίστοιχες καλλιέργειες (Spearman rank correlation · $P > 0,1$ · $n = 3-6$)

3.10.3. Επίπεδα σακχάρων υπό την επίδραση του TBT

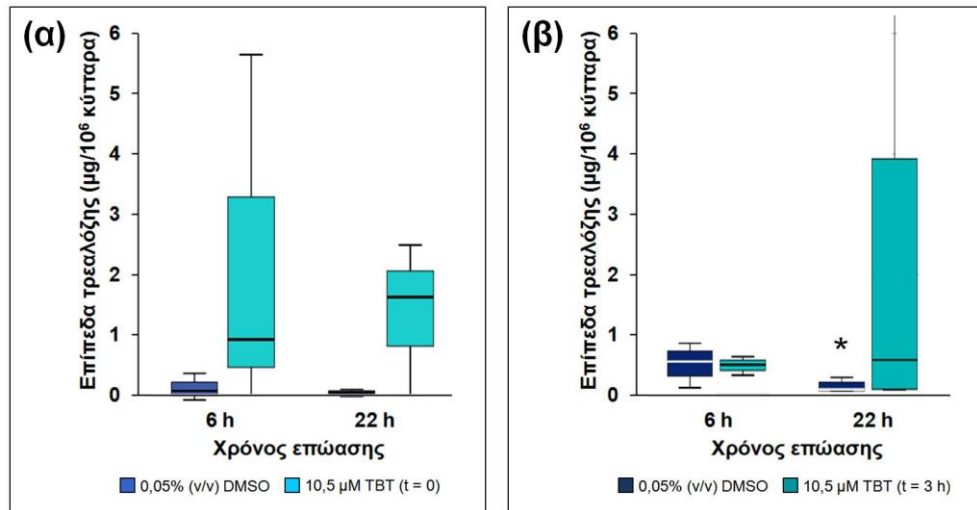
Στην πορεία της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα έως τη μεταλογαριθμική φάση δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της γλυκόζης στις καλλιέργειες που έλαβαν 10,5 μ M TBT στη λανθάνουσα ($t = 0$) (Mann-Whitney U test · $P > 0,5$ · $n = 3$) (Εικόνα 3.42α) ή στη λογαριθμική ($t = 3$ h) (Mann-Whitney U test · $P > 0,05$ · $n = 5-6$) (Εικόνα 3.42β) φάση της ανάπτυξης.

Όσον αφορά τα επίπεδα της τρεαλόζης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της επώασης όταν χορηγήθηκαν 10,5 μ M TBT στη λανθάνουσα ($t = 0$ · Mann-Whitney U test · $P > 0,3$ · $n = 3$) (Εικόνα 3.43α) ή στη λογαριθμική ($t = 3$ h · Mann-Whitney U test · $P > 0,8$ · $n = 5-6$) (Εικόνα 3.43β) φάση της ανάπτυξης. Μάλιστα, σε αντίθεση με τη χορήγηση DMSO (Spearman's $\rho = -0,685$ · $P < 0,05$ · $n = 3$), τα επίπεδα της τρεαλόζης στην περίπτωση του TBT ήταν μη χρονοεξαρτώμενα (Spearman's $\rho = -0,361$ · $P > 0,5$ · $n = 3$).



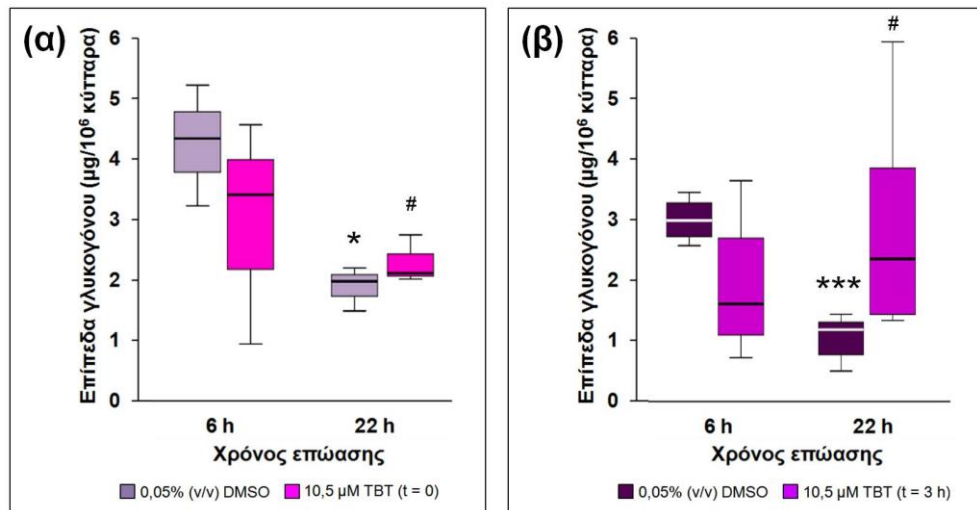
Εικόνα 3.42. Επίδραση του TBT στα ενδοκυττάρια επίπεδα γλυκόζης στον *S. cerevisiae*. Η χορήγηση 0,05% (v/v) DMSO ή 10,5 μM TBT έγινε (α) στη λανθάνουσα ($t = 0$) ή (β) στη λογαριθμική ($t = 3$ h) φάση. Τα επίπεδα γλυκόζης προσδιορίστηκαν στη λογαριθμική (6 h) και μεταλογαριθμική (22 h) φάση της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με θηκογράμματα (εσωτερική οριζόντια γραμμή: διάμεσος, ύψος σκιασμένου παραλληλογράμμου: ενδοτεταρτημοριακό εύρος Q1 25ο εκατοστημόριο - Q3 75ο εκατοστημόριο, εξωτερικές γραμμές: φράκτες ελάχιστης και μέγιστης τιμής της κατανομής των διακριτών τιμών).

Επίσης, σε σχέση με τις καλλιέργειες του μάρτυρα που είχαν εκτεθεί μόνο σε DMSO, παρατηρήθηκε οριακά σημαντική αύξηση της τρεαλόζης στη μεταλογαριθμική ($t = 22$ h) φάση της ανάπτυξης κατά την έκθεση του σακχαρομύκητα σε 10,5 μM TBT στις 3 h επώασης (Mann-Whitney U test · $P = 0,082$ · $n = 5-6$) (Εικόνα 3.43β).



Εικόνα 3.43. Επίδραση του TBT στα ενδοκυττάρια επίπεδα τρεαλόζης στον *S. cerevisiae*. Η χορήγηση 0,05% (v/v) DMSO ή 10,5 μM TBT έγινε (α) στη λανθάνουσα ($t = 0$) ή (β) στη λογαριθμική ($t = 3$ h) φάση. Τα επίπεδα τρεαλόζης προσδιορίστηκαν στη λογαριθμική (6 h) και μεταλογαριθμική (22 h) φάση της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με θηκογράμματα (εσωτερική οριζόντια γραμμή: διάμεσος, ύψος σκιασμένου παραλληλογράμμου: ενδοτεταρτημοριακό εύρος Q1 25ο εκατοστημόριο - Q3 75ο εκατοστημόριο, εξωτερικές γραμμές: φράκτες ελάχιστης και μέγιστης τιμής της κατανομής των διακριτών τιμών). * $P < 0,05$ vs αντίστοιχη τιμή στις 6 h (Mann-Whitney U test · $n = 5-6$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

Τέλος, συγκριτικά με τις καλλιέργειες που είχαν εκτεθεί σε DMSO, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων του γλυκογόνου στη μεταλογαριθμική φάση ($t = 22$ h) της ανάπτυξης, όταν ο TBT χορηγήθηκε στη λανθάνουσα ($t = 0$) (Εικόνα 3.44α) ή στη λογαριθμική ($t = 3$ h) (Εικόνα 3.44β) φάση της ανάπτυξης (Independent Samples test · $P < 0,05$ · $n = 3-6$).



Εικόνα 3.44. Επίδραση του TBT στα ενδοκυττάρια επίπεδα γλυκογόνου στον *S. cerevisiae*. Η χορήγηση 0,05% (v/v) DMSO ή 10,5 μM TBT έγινε (α) στη λανθάνουσα ($t = 0$) ή (β) στη λογαριθμική ($t = 3$ h) φάση. Τα επίπεδα γλυκογόνου προσδιορίστηκαν στη λογαριθμική (6 h) και μεταλογαριθμική (22 h) φάση της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 27 °C. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με θηκογράμματα (εσωτερική οριζόντια γραμμή: διάμεσος, ύψος σκιασμένου παραλληλογράμμου: ενδοτεταρτημοριακό εύρος Q1 25ο εκατοστημόριο - Q3 75ο εκατοστημόριο, εξωτερικές γραμμές: φράκτες ελάχιστης και μέγιστης τιμής της κατανομής των διακριτών τιμών). * . *** $P < 0,05$. 0,001 vs αντίστοιχη τιμή στις 6 h & # $P < 0,05$ vs αντίστοιχη τιμή στο μάρτυρα που έλαβε DMSO (Independent Samples test, $n = 3-6$). DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, TBT: τριβουτυλοκασσίτερος.

Συμπεράσματα

- ❖ Υπο φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης των πληθυσμών του *S. cerevisiae*, τα ενδοκυττάρια επίπεδα της γλυκόζης, της τρεαλόζης και του γλυκογόνου παρουσίασαν μείωση στη μεταλογαριθμική συγκριτικά με τη λογαριθμική φάση (Εικόνα 3.41).
- ❖ Η έκθεση του σακχαρομύκητα σε 0,05% DMSO δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στα ενδοκυττάρια επίπεδα των σακχάρων (Εικόνα 3.41).
- ❖ Η χορήγηση TBT στη λανθάνουσα ή στην αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης του *S. cerevisiae*
 - δεν επηρέασε τα επίπεδα της γλυκόζης (Εικόνα 3.42),
 - δεν μετέβαλε, ή αύξησε οριακά τα επίπεδα της τρεαλόζης στη μεταλογαριθμική φάση, σε αντίθεση με τον μάρτυρα (Εικόνα 3.43),
 - αύξησε σημαντικά τα επίπεδα γλυκογόνου στη μεταλογαριθμική φάση (Εικόνα 3.44).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παρά τη συνεχώς αυξανόμενη επιβάρυνση του περιβάλλοντος με χημικούς ρυπαντές, ελάχιστες μελέτες προσεγγίζουν τη φαρμακολογική δράση των ουσιών αυτών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελούν οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις (Εικόνα 1.3), στις οποίες ο άνθρωπος εκτίθεται μέσω πολλών πηγών (Hoch, 2001) (Εικόνα 1.2). Αν και η χρήση πολλών από αυτές υπόκειται σε περιορισμούς, οι επιδράσεις τους στον άνθρωπο δεν έχουν ερευνηθεί εκτενώς έως σήμερα. Μεταξύ αυτών, ο TBT (Εικόνα 1.1), μια οργανομεταλλική ένωση με κεντρικό μεταλλικό μόριο τον κασσίτερο, είναι ένας ευρέως διαδεδομένος, κυρίως θαλάσσιος, περιβαλλοντικός ρυπαντής (Antizar-Ladislao, 2008), λόγω της χρήσης του στις βαφές υφαλοχρωμάτων και στη σταθεροποίηση του PVC (Hoch, 2001 · Fent, 2006), που διαμέσου της τροφικής αλυσίδας φτάνει και στον άνθρωπο (Harino *et al.*, 1998 · Borghi and Porte, 2002 · Berge *et al.*, 2004) (Εικόνα 1.2).

Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του TBT στα κύτταρα του *S. cerevisiae*, με στόχο τη μελέτη των επιδράσεων και αλληλεπιδράσεων του TBT με τις βιολογικές διεργασίες των ευκαρυωτικών κυττάρων και οργανισμών. Ο *S. cerevisiae* αποτελεί ένα επιστημονικά αναγνωρισμένο και αξιόπιστο πειραματικό πρότυπο στον τομέα αυτόν. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως από τη διεθνή επιστημονική κοινότητα για τη μελέτη μηχανισμών που διατηρούνται εξελικτικά και απαντούν στους πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Mager and Ferreira, 1993 · Delitheos *et al.*, 1995 · Tiligada, 2006).

Ο TBT έχει χαρακτηριστεί ως ενδοκρινικός διαταράκτης (Lagadic *et al.*, 2018) και αυξάνει την εξαρτώμενη από τα οιστρογόνα σηματοδότηση μέσω διαφόρων βιοχημικών οδών (Sharan *et al.*, 2013). Επίσης, θεωρείται ότι προκαλεί την εμφάνιση μεταβολικού

συνδρόμου (Chen *et al.*, 2017 · Farinetti *et al.*, 2018 · Jing *et al.*, 2019). Στον άνθρωπο, ο TBT έχει συνδεθεί με τοξικότητα κατά την ανάπτυξη (Kotake, 2012), με επαγωγή οξειδωτικού stress στα αγγεία (Chan and Baumbach, 2013 · Ronconi *et al.*, 2018) και με τη χάλαση της ομφαλικής αρτηρίας (Glória *et al.*, 2018), ενώ έχει αναφερθεί επίδραση σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Thomas *et al.*, 2004) και στην έκκριση φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως ο TNF-α (Hurt *et al.*, 2013). Ενδιαφέρουσες είναι και οι φαρμακολογικές του δράσεις σε καρκινικές σειρές. Για παράδειγμα, προκαλεί αποπτωτικό θάνατο στις κυτταρικές σειρές L1210 λευχαιμίας ποντικού (Breier *et al.*, 2014) και MDA-MB-231 καρκίνου του μαστού (Hunakova *et al.*, 2015), καθώς και δόσοεξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων MCF-7 (Fickova *et al.*, 2015).

Η μελέτη της επίδρασης του TBT στα ευκαρυωτικά κύτταρα προσεγγίστηκε πειραματικά με χρόνια και οξεία έκθεση των καλλιιεργειών του σακχαρομύκητα στον TBT και επώαση στους 27 °C. Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνονταν δείγματα ελέγχου, τα οποία δεν είχαν εκτεθεί στην προς μελέτη ουσία. Η μελέτη ήταν πληθυσμιακή και πραγματοποιήθηκε σε μη συγχρονισμένες καλλιέργειες του σακχαρομύκητα. Η απάντηση των κυττάρων στην επίδραση του TBT αξιολογήθηκε με την αποτύπωση της ανάπτυξης, της επιβίωσης και της πολλαπλασιαστικής ικανότητας του σακχαρομύκητα. Η επιβίωση αξιολογήθηκε με χρώση των κυττάρων με κυανούν του μεθυλενίου (Εικόνα 3.16) και όχι με κριτήριο την ικανότητα σχηματισμού αποικιών, καθώς κύτταρα που είναι ανίκανα να δημιουργούν αποικίες μπορεί να παραμένουν ζωντανά (Vonou *et al.*, 2004). Ο πολλαπλασιασμός αξιολογήθηκε με μικροσκοπικό προσδιορισμό της αναλογίας των κυττάρων με εκβλαστήσεις (Εικόνα 3.16) και με την ικανότητα σχηματισμού CFUs (Vonou *et al.*, 2004 · Paramichael *et*

al., 2006 · Delitheos *et al.*, 2010). Επιπλέον, οι πληθυσμοί του μύκητα παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά για την εμφάνιση μορφολογικών κυτταρικών αλλοιώσεων (Εικόνα 3.16). Ο προσδιορισμός των σακχάρων έγινε με τη μέθοδο της ανθρόνης (Spiro, 1966) (Εικόνα 2.3). Η μέθοδος αυτή είναι απλή, οικονομική και αξιόπιστη και αφορά φασματοφωτομετρική μέτρηση των σακχάρων μετά από αντίδραση με διάλυμα ανθρόνης, με τη μορφή ισοδυνάμων γλυκόζης (Lillie and Pringle, 1980).

Η ανάπτυξη του *S. cerevisiae* υπό φυσιολογικές συνθήκες ήταν χρονοεξαρτώμενη, με διακριτές φάσεις (Εικόνα 3.1). Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του DMSO στην ανάπτυξη, επιβίωση και πολλαπλασιασμό του σακχαρομύκητα για να προσδιορισθεί η έκταση πιθανών επιδράσεων του στα κύτταρα. Η χορήγηση της ελάχιστης συγκέντρωσης [0,05% (v/v)] DMSO στην οποία μπορούσε να διαλυθεί ο TBT δεν επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη (Εικόνα 3.2), τον πολλαπλασιασμό (Εικόνα 3.3), την επιβίωση (Εικόνα 3.4) και το χρόνο διπλασιασμού του *S. cerevisiae* (Εικόνα 3.7), όταν χορηγήθηκε στην αρχή είτε της λανθάνουσας είτε της λογαριθμικής φάσης. Για το λόγο αυτό, ως μάρτυρες θεωρήθηκαν οι καλλιέργειες του σακχαρομύκητα που αναπτύσσονταν παρουσία 0,05% (v/v) DMSO υπό τις ίδιες συνθήκες με τις ομάδες πειραματισμού.

Για την εκτίμηση της δόσης χορήγησης του TBT στο υπό μελέτη στέλεχος του *S. cerevisiae* προσδιορίστηκαν πειραματικά η ΕΑΠ και η ΕΜΠ του TBT. Οι τιμές τους βρέθηκε ότι ταυτίζονταν και ήταν 10,5 μ M (Εικόνα 3.8). Συνεπώς, στον *S. cerevisiae* ATCC 2366 ο TBT έδειξε κυτταροκτόνο δράση. Στα δε πειραματικά πρωτόκολλα, τα δοσολογικά σχήματα περιελάμβαναν πολλαπλάσιες ή υποπολλαπλάσιες των τιμών της ΕΑΠ και ΕΜΠ δόσεις του TBT. Επιπλέον, σύμφωνα με τις φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae* (Εικόνα 3.1), η επίδραση του TBT μελετήθηκε σε πληθυσμούς που

βρίσκονταν στη φάση προσαρμογής (λανθάνουσα φάση, $t = 0$ h), ταχέος πολλαπλασιασμού (λογαριθμική φάση, $t = 3$ h) και στάσιμης ανάπτυξης ($t = 22$ h).

Γενικώς, η χαμηλή δόση των 5 μM TBT δεν επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη (Εικόνες 3.9 & 3.10), τον πολλαπλασιασμό (Εικόνες 3.13 & 3.14) και την επιβίωση (Εικόνες 3.11 & 3.12) του σακχαρομύκητα, αν και προκάλεσε μια ήπια επιβράδυνση της ανάπτυξης, η οποία αποτυπώθηκε στην αύξηση του χρόνου διπλασιασμού από ~1,4 σε ~2,00 h (Εικόνα 3.17) και στη μείωση της συχνότητας από 0,8 σε 0,5 κύκλους/h. Από την άλλη, η υψηλότερη δόση των 31,5 μM TBT ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη (Εικόνα 3.10), τον πολλαπλασιασμό (Εικόνα 3.14) και την επιβίωση (Εικόνα 3.12) του σακχαρομύκητα. Μεταξύ των δόσεων 10,5 και 21,0 μM TBT δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές όσον αφορά την επίδρασή τους στα χαρακτηριστικά των καλλιιεργειών του σακχαρομύκητα (Εικόνες 3.9 - 3.14). Συνεπώς, για τη διεξοδική μελέτη της επίδρασης του TBT στον σακχαρομύκητα επιλέχθηκε η δόση των 10,5 μM , η οποία αντιστοιχούσε στην ΕΑΠ/ΕΜΠ της προς μελέτη ουσίας (Εικόνα 3.8).

Η χορήγηση 10,5 μM TBT, στην αρχή της λανθάνουσας ή της λογαριθμικής φάσης, ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη (Εικόνες 3.9 & 3.26α), τον πολλαπλασιασμό (Εικόνες 3.13 & 3.26γ) και την επιβίωση (Εικόνες 3.11 & 3.26β) του σακχαρομύκητα μέχρι την στάσιμη φάση, όπου η ανάπτυξη αποκαταστάθηκε (Εικόνες 3.22 & 3.27). Επίσης, ο χρόνος διπλασιασμού του σακχαρομύκητα αυξήθηκε όταν ο TBT χορηγήθηκε σε δόση 10,5 μM στην αρχή της λανθάνουσας (Εικόνα 3.17) ή της λογαριθμικής (Εικόνα 3.29) φάσης. Αν και σε διάφορο χρόνο από τη χορήγηση του TBT, και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση της σχετικής αναλογίας διαιρούμενων/μη διαιρούμενων ζωντανών κυττάρων συγκριτικά με

τις καλλιέργειες των μαρτύρων (Εικόνες 3.23 & 3.28). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο TBT επιδρά στον κυτταρικό κύκλο του σακχαρομύκητα, μεταξύ άλλων διακόποντάς τον πιθανώς στην φάση G1 (Εικόνα 1.4) σύμφωνα και με προηγούμενες αναφορές (Sekito *et al.*, 2014 · Chang *et al.*, 2017). Σημειώνεται ότι στην φάση G1 σηματοδοτείται η έναρξη του πολλαπλασιασμού, όταν τα κύτταρα περάσουν το κατώφλι της «εκκίνησης» (Εικόνα 1.4) και αρχίσει να δημιουργείται η εκβλάστηση (Feldmann, 2012a).

Σύμφωνα με τις τιμές των ID₅₀/ID₉₉ και LD₅₀/LD₉₉ μπορεί να προταθεί ότι τα κύτταρα του σακχαρομύκητα είναι λιγότερο ευαίσθητα στην ανασταλτική επίδραση του TBT κατά τη φάση προσαρμογής (Εικόνες 3.24 & 3.25) συγκριτικά με τη φάση του ταχέως πολλαπλασιασμού τους (Εικόνες 3.30 & 3.31). Περαιτέρω ενδείξεις για την προτεινόμενη δράση του TBT κυρίως σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα του *S. cerevisiae* προέκυψαν και από την αδυναμία της ουσίας να επηρεάσει σημαντικά τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα όταν χορηγήθηκε στη στάσιμη φάση (Εικόνες 3.36 & 3.37).

Αν και ο TBT άσκησε άμεση θανατηφόρο δράση τόσο σε διαιρούμενα όσο και σε μη διαιρούμενα κύτταρα (Πίνακας 3.1), είναι πιθανόν η δράση του να διαφοροποιείται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των κυτταρικών υποπληθυσμών του σακχαρομύκητα, κατά την οποία ανακόπτεται, άμεσα αλλά παροδικά, η διαίρεση των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά ανιχνεύτηκαν μικροσκοπικά με τη μορφή ζωντανών άτυπων κυττάρων (Εικόνες 3.22 & 3.27), χωρίς ικανότητα πολλαπλασιασμού (Εικόνα 3.18), με αποτέλεσμα την επιμήκυνση του χρόνου διπλασιασμού (Εικόνες 3.17 & 3.29).

Η άμεση και παροδική εμφάνιση ζωντανών άτυπων κυττάρων κατά τη χορήγηση του TBT στις φάσεις προσαρμογής και ταχέως

πολλαπλασιασμού του σακχαρομύκητα, αλλά όχι στη φάση στασιμότητας, ήταν ιδιαίτερος ενδιαφέρον εύρημα. Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονταν από ευδιάκριτες δομές μεγάλου μεγέθους στο κυτταρόπλασμα που παρέπεμπαν σε κενοτόπια (Εικόνα 3.16). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κενοτοπίων -που αφορούν κυρίως το μέγεθος και το σχήμα τους- έχουν συσχετισθεί με τη σχάση τους μετά από οξίνιση διαμέσου της V ATPάσης (Raymond *et al.*, 1992 · Aufschnaiter and Büttner, 2019) και τον σχηματισμό της εκβλάστησης (Baars *et al.*, 2007) (βλέπε §1.3.5). Επίσης, η αύξηση του μεγέθους των κενοτοπίων συνδέεται με τη φάση ανάπτυξης και τη φάση του κυτταρικού κύκλου (Li and Kane, 2009). Τα κενοτόπια κληρονομούνται από το μητρικό στο θυγατρικό κύτταρο. Προς το τέλος της G1 φάσης και πριν την εμφάνιση της εκβλάστησης, παρατηρείται μεταφορά και σχάση ενός μεγάλου κενοτοπίου στη θέση της επικείμενης εκβλάστησης (Veses and Gow, 2008 · Weisman, 2006). Προτείνεται ότι, η εμφάνιση των άτυπων κυττάρων πιθανόν οφείλεται στην αναστολή της οξίνισης των κενοτοπίων από τον TBT, μέσω αναστολής της δράσης της V ATPάσης (Forgacs, 2007 · Akiyama *et al.*, 2008) (Εικόνα 1.6). Η αναστολή αυτή φαίνεται να οδήγησε σε αδυναμία σχάσης του κενοτοπίου, και επομένως αδυναμία δημιουργίας εκβλάστησης, αναστολή της «εκκίνησης» (Εικόνα 1.4) και διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 (Sekito *et al.*, 2014). Η δράση του TBT ήταν συσσωρευτική (Εικόνα 3.33), ενώ ο «ανθεκτικός» κυτταρικός υποπληθυσμός που επιβίωσε διατήρησε την ικανότητα πολλαπλασιασμού και τελικά ξεπέρασε την τοξική επίδραση του TBT έως τη μεταλογαριθμική φάση της ανάπτυξης (Εικόνα 3.35).

Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου συνδέεται με το μεταβολικό προφίλ των πληθυσμών του ζυμομύκητα. Για παράδειγμα, η σύνθεση και ο καταβολισμός του γλυκογόνου βρίσκονται σε μια αέναη

ισορροπία (Lillie and Pringle, 1980 · Francois *et al.*, 1988), ενώ κυρίως συσσωρεύεται στη φάση G1 και συνδέεται με την εμφάνιση της εκβλάστησης (Silljé *et al.*, 1997). Η αύξηση των επιπέδων του γλυκογόνου που παρατηρήθηκε στη μεταλογαριθμική φάση της ανάπτυξης των καλλιιεργειών που είχαν εκτεθεί στον TBT κατά τη λανθάνουσα ή τη λογαριθμική φάση (Εικόνα 3.44) πιθανόν να συνδέεται με την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη G1 φάση (Sekito *et al.*, 2014). Σε αντίθεση με το γλυκογόνο που αρχίζει να συσσωρεύεται στο κύτταρο όταν τα θρεπτικά υλικά είναι ακόμα σε σχετική αφθονία, η τρεαλόζη αποτελεί παράγοντα προστασίας του κυττάρου σε καταστάσεις stress (Wiemken, 1990 · Ni and Laporte, 1995 · Parrou *et al.*, 1997 · Francois and Parrou, 2001) και αυξάνεται όταν η γλυκόζη εξαντληθεί από το θρεπτικό μέσο (Lillie and Pringle, 1980). Και για τα δύο σάκχαρα, η συσσώρευση τους συνοδεύεται από μείωση των ρυθμών ανάπτυξης, ανεξάρτητα από τις συνθήκες ανάπτυξης (Paalman *et al.*, 2003). Αν και, προς το παρόν, δεν είναι εφικτός ο προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών των δράσεων του TBT, τόσο η σημαντική αύξηση των επιπέδων του γλυκογόνου (Εικόνα 3.44), όσο και η οριακή αύξηση των επιπέδων της τρεαλόζης (Εικόνα 3.43) στη μεταλογαριθμική φάση της ανάπτυξης των πληθυσμών που είχαν εκτεθεί στον TBT επιβεβαιώνουν την εκλεκτική επίδραση της ουσίας στα κύτταρα του σακχαρομύκητα.

Η επίδραση του TBT στην αναπνευστική αλυσίδα (Εικόνα 1.6) δεν μπορεί να αποκλειστεί. Όμως, η όποια σχετική δράση στο υπό μελέτη στέλεχος του *S. cerevisiae* δεν φάνηκε να οδηγεί σε επιγενετικές λειτουργικές διεργασίες που σχετίζονται με μεταλλάξεις *petite* (Bernardi, 1979 · Weber *et al.*, 1995). Ως επιγενετική δράση μιας ουσίας (περιβαλλοντικού ρυπαντή, φαρμάκου κ.ά.) αναφέρεται η πρόκληση διαφοροποιήσεων στην έκφραση των γονιδίων, οι οποίες

κληρονομούνται βραχυπρόθεσμα και δεν οφείλονται σε μεταλλάξεις αλλά σε τροποποιήσεις του γενετικού υλικού, όπως η μεθυλίωση ή τροποποίηση των ιστονών (Jaenisch and Bird, 2003). Οι επιγενετικοί μηχανισμοί επιτρέπουν στο κύτταρο να ανταπεξέλθει στις περιβαλλοντικές αλλαγές διαμέσου της γονιδιακής έκφρασης (Jaenisch and Bird, 2003). Οι μικρότερου μεγέθους αποικίες που εμφανίστηκαν σποραδικά μετά την ανακαλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα του σακχαρομύκητα που είχε εκτεθεί σε TBT (Εικόνα 3.19) οφειλόταν μάλλον σε διαφορές στον αριθμό των κυττάρων και όχι σε επιγενετικές αλλοιώσεις που παραπέμπουν σε μεταλλάξεις *petite* (Εικόνα 3.20).

Τέλος, παρά τους περιορισμούς που τίθενται σε μια πιλοτική μελέτη, ιδιαίτερο ενδιαφέρον και έναυσμα για μελλοντική ενδελεχή διερεύνηση παρουσίασαν τα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η χρόνια έκθεση του σακχαρομύκητα σε υποτοξικές συγκεντρώσεις TBT μπορεί να κινητοποιήσει εν δυνάμει προστατευτικούς μηχανισμούς έναντι της κυτταροκτόνου επίδρασης υψηλότερων συγκεντρώσεων της ουσίας (Εικόνα 3.39).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο τριβουτυλοκασσίτερος (TBT) είναι ένας διαδεδομένος περιβαλλοντικός ρυπαντής, αλλά ως ουσία με πιθανή φαρμακολογική δράση δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Ο μονοκύτταρος οργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* επιλέχθηκε ως κατάλληλο πειραματικό πρότυπο για την μελέτη της επίδρασης του TBT στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του TBT στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη μορφολογία και το μεταβολικό προφίλ του *S. cerevisiae*, και η διερεύνηση πιθανής ανάπτυξης επιγενετικών και προσαρμοστικών κατά την έκθεση στην υπό μελέτη ουσία, με στόχο την αποσαφήνιση των επιδράσεων και αλληλεπιδράσεων του TBT με τις βιολογικές διεργασίες των ευκαρυωτικών κυττάρων και οργανισμών.

Η πειραματική προσέγγιση αφορούσε εφάπαξ ή/και επαναλαμβανόμενη χορήγηση διαφόρων δοσολογικών σχημάτων TBT (5-31,5 μM) σε ασύγχρονες καλλιέργειες του *S. cerevisiae* ATCC 2366 κατά τη λανθάνουσα, λογαριθμική και/ή στάσιμη φάση της ανάπτυξης. Η απάντηση του σακχαρομύκητα αξιολογήθηκε με οπτικό μικροσκόπιο, κυρίως μέσω προσδιορισμού του συνολικού αριθμού και της αναλογίας των διαιρούμενων και των ζωντανών κυττάρων του σακχαρομύκητα, και περιγραφής τυχόν μορφολογικών μεταβολών, ενώ το μεταβολικό προφίλ αξιολογήθηκε με τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό με τη μέθοδο της ανθρόνης των επιπέδων γλυκόζης, τρεαλόζης και γλυκογόνου στις καλλιέργειες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν δόσοεξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης, της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού του σακχαρομύκητα κατά τη χορήγηση TBT στη λανθάνουσα και τη λογαριθμική φάση, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στη στάσιμη φάση. Κατά την έκθεση στον TBT, αξιοσημείωτη ήταν η άμεση και παροδική εμφάνιση ζωντανών άτυπων κυττάρων που χαρακτηρίζονταν από ευδιάκριτες κυτταροπλασματικές δομές μεγάλου μεγέθους που παρέπεμπαν σε κενοτόπια. Επίσης, η αύξηση των επιπέδων γλυκογόνου και τρεαλόζης στη μεταλογαριθμική φάση της ανάπτυξης των πληθυσμών που είχαν εκτεθεί στον TBT υποστηρίζουν την εκλεκτική επίδραση της ουσίας στον ρυθμό ανάπτυξης του σακχαρομύκητα, χωρίς ωστόσο να είναι εφικτός, προς το παρόν, ο προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών των δράσεων του TBT.

Τα δεδομένα παρείχαν ενδείξεις υπέρ της ανασταλτικής επίδρασης του TBT κυρίως στα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, όπου, πιθανώς, η αναστολή της V ATPάσης εμπόδισε την οξίνιση του κενοτοπίου και, τελικά, οδήγησε στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Η δράση του TBT ήταν συσσωρευτική, ενώ ο κυτταρικός υποπληθυσμός που επιβίωσε διατήρησε την ικανότητα πολλαπλασιασμού και τελικά ξεπέρασε την τοξική επίδραση του TBT έως τη μεταλογαριθμική φάση της ανάπτυξης. Τέλος, ο TBT δεν προκάλεσε επιγενετικές αλλοιώσεις στον σακχαρομύκητα που σχετίζονται με μεταλλάξεις *petite*, ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν τα πιλοτικά ευρήματα που υποστηρίζουν την κινητοποίηση εν δυνάμει προστατευτικών μηχανισμών κυτταρικού stress κατά τη χρόνια έκθεση του σακχαρομύκητα σε υποτοξικές συγκεντρώσεις TBT.

SUMMARY

Although tributyltin (TBT) is a widespread environmental pollutant, its effects at the cellular level has not been adequately studied. The unicellular eukaryote *S. cerevisiae* is considered as a appropriate model organism for the study of the effects of TBT on eukaryotic cells.

The aim of this study was to investigate the effects of TBT on the growth, proliferation, survival, morphology and metabolic profile of *S. cerevisiae* as well as the development of potential epigenetic alterations and/or adaptive mechanisms after TBT exposure. Ultimately, this study sought to explore the putative interactions of TBT with the biological processes in eukaryotic cells and organisms.

The experimental approach included single and/or repeated administration of different TBT dosages (5.0-31.5 μM) in asynchronous cultures of *S. cerevisiae* ATCC 2366 during the lag, logarithmic and/or stationery phase of growth. The yeast response was evaluated under the optical microscope, mainly by determining the total cell number, the proportion of the budded and living cells and any morphological changes, while the metabolic profile was investigated by the spectrophotometric determination of carbohydrates using the anthrone method.

The results showed a dose-dependent inhibition of growth, survival and proliferation of yeast cells upon TBT administration during the lag and the logarithmic phase. No effect was observed during administration at the stationery phase. Interestingly, shortly after exposure to TBT, live aberrant cells appeared, characterized by large cytoplasmic structures that referred to vacuoles. Also, the increase of glycogen and trehalose levels at the post-logarithmic phase of growth of cells exposed to TBT, were indicative of the selective action of the compound on the growth rate of yeast. Yet, the determination of the kinetic characteristics of TBT actions remain elusive.

The obtained data provided evidence for the inhibitory action of TBT, mainly on the rapidly proliferating cells, where V ATPase inhibition likely prevented vacuole acidification and lead to cell cycle arrest. The effect of TBT was cumulative and the cellular subpopulation that survived was capable to proliferate and to overcome the toxic effects of TBT at the post-logarithmic phase of growth. Finally, in the *S. cerevisiae* strain used in this study, TBT did not seem to cause any epigenetic alterations associated with "petite" mutations. Interestingly, the preliminary findings related to the development of the potentially protective cellular stress response during chronic exposure of yeast to subtoxic TBT concentrations deserve further consideration.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM (2013). PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 19: 557-566.
- Akiyama K, Chardwiriyaapreecha S, Chahomchuen T, Sugimoto N, Sekito T, Nishimoto S, Sugahara T, Kakinuma Y (2008). Vacuolar-type H⁺-translocating ATPase is the target of tributyltin chloride. *Biol Res Chem Poll* 1:241-249.
- Akiyama K, Iwaki T, Sugimoto N, et al (2011). Bfr1p is responsible for tributyltin resistance in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Toxicol Sci* 36:117-120.
- Alama A, Tasso B, Novelli F, Sparatore F (2009). Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotins as antitumor agents. *Drug Discov Today* 14:500-508.
- Aldridge WN (1958). The biochemistry of organotin compounds: trialkyltins and oxidative phosphorylation. *Biochem J* 69: 367-376.
- Aldridge WN, Casida JE, Fish RH, Kimmel EC, Street BW (1977). Action on mitochondria and toxicity of metabolites of tri-n-butyltin derivatives. *Biochem Pharmacol* 26: 1997-2000.
- Alexandre H, Plourde L, Charpentier, Francois J (1998). Lack of correlation between trehalose accumulation, cell viability and intracellular acidification as induced by various stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 144:1103-1111.
- Alzieu C (2000). Environmental impact of TBT: the French experience. *Sci Total Environ* 258:99-102.
- American Chemical Society (2020). CAS. <https://www.cas.org/about/faqs>. προσπέλαση 07/02/2020.
- American Type Culture Collection (2020). *Saccharomyces pastorianus* Rees ex Hansen (ATCC® 2366™) https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/2366.aspx?geo_country=gr προσπέλαση 07/02/2020.
- Amézqueta S, Subirats X, Fugu et E, Rosés M, Ràfols C (2020). Liquid-Phase Extraction. In Colin F. Poole (Eds). Elsevier. Chapter 6, pp. 183-208.
- Amoussouvi A, Teufel L, Reis M, Seeger M, Schlichting JK, Schreiber G, Herrmann A, Klipp E (2018). Transcriptional timing and noise of yeast

cell cycle regulators-a single cell and single molecule approach. NPJ Syst Biol Appl 4:17.

- Andrews JM (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations [published correction appears in J Antimicrob Chemother 2002 49:1049]. J Antimicrob Chemother 48 Suppl 1:5–16.
- Antizar-Ladislao B (2008). Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. Environ Int 34:292–308.
- Appel KE (2004). Organotin compounds: toxicokinetic aspects. Drug Metab Rev 36:763-786.
- Artika IM (2019). Current understanding of structure, function and biogenesis of yeast mitochondrial ATP synthase. J Bioenerg Biomembr 51:315-328.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. Free Radic Biol Med 6:593–597.
- Aufschnaiter A, Büttner S (2019). The vacuolar shapes of ageing: From function to morphology. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1866:957-970.
- Azzopardi M, Farrugia G, Balzan R (2017). Cell-cycle involvement in autophagy and apoptosis in yeast. Mech Ageing Dev 161:211–224.
- Baars TL, Petri S, Peters C, Mayer A (2007). Role of the V-ATPase in regulation of the vacuolar fission-fusion equilibrium. Mol Biol Cell 18:3873-3882.
- Baker AH, Wu TH, Bolt AM, Gerstenfeld LC, Mann KK, Schlezinger JJ (2017). From the Cover: Tributyltin alters the bone marrow microenvironment and suppresses B Cell development. Toxicol Sci 158:63–75.
- Barbet NC, Schneider U, Helliwell SB, Stansfeld I, Tuite MF, Hall MN (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. Mol Biol Cell 7:25-42.
- Bayer MJ, Reese C, Buhler S, Peters C, Mayer A (2003). Vacuole membrane fusion: V_0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca^{2+} -releasing channel. J Cell Biol 162:211–222.

- Benaroudj N, Lee DH, Goldberg AL (2001). Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J Biol Chem* 276:24261–24267.
- Berge JA, Brevik EM, Bjørge A, Følsvik N, Gabrielsen GW, Wolkers H (2004). Organotins in marine mammals and seabirds from Norwegian territory. *J Environ Monitor* 6:108–112.
- Bernardi G (1979). The petite mutation in yeast. *Trends Biochem Sci* 4:197–201.
- Beyenbach KW, Wieczorek H (2006). The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol* 209:577–589.
- Bohacova V, Seres M, Pavlikova L, et al (2018). Triorganotin derivatives induce cell death effects on L1210 leukemia cells at submicromolar concentrations independently of p-glycoprotein expression. *Molecules* 23:1053.
- Borghi V, Porte C (2002). Organotin pollution in deep-sea fish from the northwestern Mediterranean. *Environ Sci Technol* 36:4224–4228.
- Borst-Pauwels GW, Theuvenet AP, Stols AL (1983). All-or-none interactions of inhibitors of the plasma membrane ATPase with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 732:186–192.
- Breier A, Gibalova L, Seres M, Barancik M, Sulova Z (2013). New insight into p-glycoprotein as a drug target. *Anticancer Agents Med Chem* 13:159–170.
- Bryan GW, Gibbs PE, Hummerstone LG, Burt GR (2009). The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *J Mar Biol Assoc UK* 66: 611–640.
- Busti S, Coccetti P, Alberghina L, Vanoni M (2010). Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sensors (Basel)* 10:6195–6240.
- Cain K, Partis MD, Griffiths DE (1977). Dibutylchloromethyltin chloride, a covalent inhibitor of the adenosine triphosphate synthase complex. *Biochem J* 166:593–602.
- Cakar ZP, Sauer U, Bailey JE, Muller M, Stolz M, Wallimann T, Schlattner U (2000). Vacuolar morphology and cell cycle distribution are modified

- by leucine limitation in auxotrophic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol of the Cell* 92:629-637.
- Casperson GF, Walker N, Bourne HR (1985). Isolation of the gene encoding adenylate cyclase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5060-5063.
- Castrillo JI, Zeef LA, Hoyle DC, Zhang N, Hayes A, Gardner DC, Cornell MJ, Petty J, Hakes L, Wardleworth L, Rash B, Brown M, Dunn WB, Broadhurst D, O'Donoghue K, Hester SS, Dunkley TP, Hart SR, Swainston N, Li P, Gaskell SJ, Paton NW, Lilley KS, Kell DB, Oliver SG (2007). Growth control of the eukaryote cell: a systems biology study in yeast. *J Biol* 6:4.
- Chahomchuen T, Akiyama K, Sekito T, Sugimoto N, Okabe N, Nishimoto S, Sugahara T, Kakinuma Y (2009). Tributyl tin induces Yca1p-dependent cell death of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Toxicol Sci* 34:541-545
- Chan SL, Baumbach GL (2013). Deficiency of Nox2 prevents angiotensin II-induced inward remodeling in cerebral arterioles. *Front Physiol* 4:133.
- Chang YL, Tseng SF, Huang YC, Shen ZJ, Hsu PH, Hsieh MH, Yang CW, Tognetti S, Canal B, Subirana L, Wang CW, Chen HT, Lin CY, Posas F, Teng SC (2017). Yeast Cip1 is activated by environmental stress to inhibit Cdk1-G1 cyclins via Mcm1 and Msn2/4. *Nat Commun* 8:56.
- Chen YW, Lan KC, Tsai JR, Weng TI, Yang CY, Liu SH (2017). Tributyltin exposure at noncytotoxic doses dysregulates pancreatic β -cell function in vitro and in vivo. *Arch Toxicol* 91:3135-3144.
- Cheng L, Kirk N, Piper PW (1993). A small influence of HSP90 levels on the trehalose and heat shock element inductions of the yeast heat shock response. *Biochem Biophys Res Commun* 195:201-207.
- Chiu J, Tactacan CM, Tan SX, Lin RC, Wouters MA, Dawes IW (2011). Cell cycle sensing of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* by oxidation of a specific cysteine residue in the transcription factor Swi6p. *J Biol Chem* 286:5204-5214.
- Cooke GM (2002). Effect of organotins on human aromatase activity in vitro. *Toxicol Lett* 126:121-130.
- Cooney JJ (1995). Organotin compounds and aquatic bacteria: a review. *Helgoländer Meeresunters* 49:663-677.
- Cooney JJ, Wuertz SW (1989). Toxic effects of tin compounds on microorganisms. *J Ind Microbiol* 4:375-402.

- Cornelis C, Bierkens J, Goyvaerts MP, Joris I, Nielsen P, Schoeters G (2005). Framework for quality assessment of organotin in sediments in view of re-use on land. Study by order of DEC nv in the framework of the TBT Clean project (LIFE02 ENV/B/000341).
- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM (1992). Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 54:579-599.
- Crowe JH, Whittam MA, Chapman D, Crowe LM (1984). Interactions of phospholipid monolayers with carbohydrates. *Biochim Biophys Acta* 769:151-159.
- Da Costa CS, Miranda-Alves L, La Merrill MA, Silva IV, Graceli JB (2019). The tributyltin leads to obesogenic mammary gland abnormalities in adult female rats. *Toxic Letters* 307:59-71.
- Day M (2013). Yeast petites and small colony variants: for everything there is a season. *Adv Appl Microbiol* 85:1-41.
- De Picoli Souza K, Da Silva ED, Batista EC, Reis FCG, Silva SMA, Castro CHM, Luz J, Pesquero JL, Dos Santos EL, Pesquero JB (2015). Early pharmacological inhibition of angiotensin-I converting enzyme activity induces obesity in adulthood. *Front Pharmacol* 6:1-10.
- Delitheos A, Karavokyros I, Tiligada E (1995). Response of *Saccharomyces cerevisiae* strains to antineoplastic agents. *J Appl Bacteriol* 79:379-383.
- Delitheos B, Papamichael K, Tiligada E (2010). Histamine modulates the cellular stress response in yeast. *Amino Acids* 38:1219-1226.
- DeLong GT, Rice CD (1997). Tributyltin potentiates 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced cytochrome P-4501A-related activity. *J Toxicol Environ Health* 51:131-148.
- Dubey SK, Roy U (2003). Biodegradation of tributyltins (organotins) by marine bacteria. *Appl Organometal Chem* 17:3-8.
- EC, 1996. European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife (2-4 December 1996, Weybridge, UK). In: Rep. Proceedings, Publ. EUR Paris Fr. 175493. EUR 17549, pp. 1-127.
- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13:17R-27R.
- Eleutherio E, Panek A, De Mesquita JF, Trevisol E, Magalhães R (2015). Revisiting yeast trehalose metabolism. *Curr Genet* 61:263-274.

- Endocrine Society (2020). Endocrine disrupting chemicals. <https://www.endocrine.org/advocacy/position-statements/endocrine-disrupting-chemicals>. Προσπέλαση 22/03/2020.
- Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi MG, Walsh TJ (2002). Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. *J Clin Microbiol* 40:3204–3208.
- European Chemicals Agency (2019). Annex XVII : κατάλογος περιορισμών-Organostannic compounds. <https://echa.europa.eu/substances-restricted-under-reach/-/dislist/details/0b0236e1807e241f>. προσπέλαση 15/9/2019.
- European committee for standardization (2013). EN 71-3:2013, Safety of toys-part 3: Migration of certain elements.
- Ewald JC (2018). How yeast coordinates metabolism, growth and division. *Curr Opin Microbiol* 45:1–7.
- Ewald JC, Kuehne A, Zamboni N, Skotheim JM (2016). The yeast cyclin-dependent kinase routes carbon fluxes to fuel cell cycle progression. *Mol Cell* 62:532–545.
- Fagarasanu A, Rachubinski RA (2007). Orchestrating organelle inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Microb* 10:528-538.
- Fargašová A (2002). Structure-affected algicidal activity of triorganotin compounds. *Bull Environ Contam Toxicol* 69:0756–0762.
- Farinetti A, Marraudino M, Ponti G, Panzica GC, Gotti S (2018). Chronic treatment with tributyltin induces sexually dimorphic alterations in the hypothalamic POMC system of adult mice. *Cell Tissue Res* 374:587.
- Feldmann H (2012a). Yeast: Molecular and Cell Biology. In Horst Feldmann (Eds). 2nd edition. Wiley - Blackwell VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Chapter 7, pp. 186-191.
- Feldmann H (2012b). Yeast: Molecular and Cell Biology. In Horst Feldmann (Eds). 2nd edition. Wiley - Blackwell VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Chapter 3, pp. 30-31.
- Fent K, (2006). Worldwide Occurrence of Organotins from Antifouling Paints and Effects in the Aquatic Environment. In Konstantinou IK (Eds). *Antifouling Paint Biocides. The Handbook of Environmental Chemistry*, vol 50. Springer, Berlin, Heidelberg pp.71-100.

- Fickova M, Macho L, Brtko J (2015). A comparison of the effects of tributyltin chloride and triphenyltin chloride on cell proliferation, proapoptotic p53, Bax, and antiapoptotic Bcl-2 protein levels in human breast cancer MCF-7 cell line. *Toxic in Vitro* 29:727–731.
- Flamini MI, Gauna GV, Sottile ML, Nadin BS, Sanchez AM, Vargas-Roig LM (2014). Retinoic acid reduces migration of human breast cancer cells: role of retinoic acid receptor beta. *J Cell Mol Med* 18:1113–1123.
- Flattery-O'Brien JA, Dawes IW (1998). Hydrogen peroxide causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G1 arrest independent of RAD9 function. *J Biol Chem* 273:8564–8571.
- Forgac M (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:917–929.
- Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T, Rizzo V, Scalia R, Eguchi S (2018). Angiotensin II signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 98:1627–1738.
- Forsburg SL (1994). Cell cycle: in and out of the cell cycle. *Curr Biol* 4:828–830.
- Foury F (1989). Cloning and sequencing of the nuclear gene MIP1 encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* 264:20552–20560.
- Francois J, Parrou JL (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 25:125-145.
- François J, Villanueva ME, Hers HG (1988). The control of glycogen metabolism in yeast. 1. Interconversion in vivo of glycogen synthase and glycogen phosphorylase induced by glucose, a nitrogen source or uncouplers. *Eur J Biochem* 174:551–559.
- Freitas-Lima LC, Merlo E, Campos Zicker M, Navia-Pelaez JM, De Oliveira M, Capettini LSA, Nogueira CR, Ferreira AVM, Sousa Santos SH, Bernardes Graceli J (2018). Tributyltin impacts in metabolic syndrome development through disruption of angiotensin II receptor signaling pathways in white adipose tissue from adult female rats. *Toxic Lett* 299:21-31.
- Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A (2010). Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol* 2010:214074.

- Gadd GM (2000). Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. *Sci Tot Environ* 258:119–127.
- Gancedo JM, Clifton D, Fraenkel DG (1977). Yeast hexokinase mutants. *J Biol Chem* 252:4443–4444.
- Gennari A, Viviani B, Galli CL, Marinovich M, Pieters R, Corsini E (2000). Organotins induce apoptosis by disturbance of $[Ca^{2+}]_i$ and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 169:185-190.
- Glória S, Marques J, Feiteiro J, Marcelino H, Verde I, Cairrão E (2018). Tributyltin role on the serotonin and histamine receptors in human umbilical artery. *Toxicol In Vitro* 50:210–216.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274:546.
- Grün F (2014). The obesogen tributyltin. *Vitam Horm* 94:277–325.
- Guard HE, Cobet AB, Coleman WM 3rd (1981). Methylation of trimethyltin compounds by estuarine sediments. *Science* 213:770–771.
- Guérin T, Sirot V, Volatier JL, Leblanc JC (2007). Organotin levels in seafood and its implications for health risk in high-seafood consumers. *Sci Total Environ* 388:66-77.
- Gunja-Smith Z, Patil NB, Smith EE (1977). Two pools of glycogen in *Saccharomyces*. *J of Bacteriol* 130:818–825.
- Harino H, Fukushima M, Yamamoto Y, Kawai S, Miyazaki N (1998). Organotin compounds in water, sediment, and biological samples from the Port of Osaka, Japan. *Arch Environ Contam Toxicol* 35:558–564.
- Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183:46-51.
- Hauer R, Uhlemann G, Neumann J, Höfer M (1981). Proton pumps of the plasmalemma of the yeast *Rhodotorula gracilis*. Their coupling to fluxes of potassium and other ions. *Biochim Biophys Acta* 649:680-690.
- Hayek SR, Rane HS, Parra KJ (2019). Reciprocal regulation of V-ATPase and glycolytic pathway elements in health and disease. *Front Physiol* 10:127.

- Heidrich DD, Steckelbroeck S, Klingmuller D (2001). Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. *Steroids* 66:763–769.
- Herman PK (2002). Stationary phase in yeast. *Curr Opin Microbiol* 5:602–607.
- Hoch M (2001). Organotin compounds in the environment: an overview. *Appl Geochem* 16:719–743.
- Hottiger T, Boller T, Wiemken A (1989). Correlation of trehalose content and heat resistance in yeast mutants altered in the RAS/adenylate cyclase pathway: is trehalose a thermoprotectant? *FEBS Lett* 255:431–434.
- Hottiger T, De Virgilio C, Bell W, Boller T, Wiemken A (1992). The 70-kilodalton heat-shock proteins of the SSA subfamily negatively modulate heat-shock-induced accumulation of trehalose and promote recovery from heat stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 210:125–132.
- Hottiger T, Schmutz P, Wiemken A (1987). Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 169:5518–5522.
- Huang G, Sun H, Dai S (1997). Quantitative structure-activity relationship study for toxicity of organotin compounds on algae. *Bull Environ Contam Toxicol* 58:299–304.
- Huang J, Reggiori F, Klionsky DJ (2007). The transmembrane domain of acid trehalase mediates ubiquitin-independent multivesicular body pathwaysorting. *Mol Biol Cell* 18:2511–2524.
- Hunakova L, Macejova D, Toporova L, Brtko J (2016). Anticancer effects of tributyltin chloride and triphenyltin chloride in human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Tumour Biol* 37:6701–6708.
- Hurt K, Hurd-Brown T, Whalen M (2013). Tributyltin and dibutyltin alter secretion of tumor necrosis factor alpha from human natural killer cells and a mixture of T cells and natural killer cells. *J Appl Toxicol* 33:503–510.
- Ingham RK, Rosenberg SD, Gilman H (1960). Organotin compounds. *Chem Rev* 60:459–539.

- International Maritime Organisation (2020). Antifouling systems. <http://www.imo.org/en/OurWork/Environment/AntifoulingSystems/Pages/Default.aspx>. Προσπέλαση 14/04/2020.
- IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (2020). F-type and V-type ATPases. <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=137>. Προσπέλαση 14/04/2020.
- Iwahashi H, Nwaka S, Obuchi K, Komatsu Y (1998). Evidence for the interplay between trehalose metabolism and Hsp104 in yeast. *Appl Environ Microbiol* 64:4614–4617.
- Jaattela M (1999). Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med* 31:261-271.
- Jaenisch R, Bird A (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33:245–254.
- Jenkins SM, Ehman K, Barone S Jr (2004). Structure-activity comparison of organotin species: dibutyltin is a developmental neurotoxicant in vitro and in vivo. *Brain Res Dev Brain Res* 151:1–12.
- Jing X, Kunlin O, Chuqiao C, Binshui L, Jiaojiao G, Zhenghong Z, Chonggang W (2019). Tributyltin exposure disturbs hepatic glucose metabolism in male mice. *Toxicology* 425:152242.
- Johnston GC, Pringle JR, Hartwell LH (1977). Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Cell Res* 105:79–98.
- Johnston M, Carlson M (1992). Carbon regulation in *Saccharomyces*. In the molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: gene expression, ed. EW Jones, JR Pringle, JR Broach, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press pp. 198–281.
- Kakinuma Y, Ohsumi Y, Anraku Y (1981). Properties of H⁺-translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 256:10859-10863.
- Kane PM (1995). Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase in vivo. *J Biol Chem* 270:17025–17032.
- Kane PM (2006). The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:177–191.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, et al (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine

- disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104:715–740.
- Kawasaki-Nishi S, Bowers K, Nishi T, Forgac M, Stevens TH (2001). The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 276:47411–47420.
- Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J (2008). Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes* 32:1431–1437.
- Kibria G, Hatakeyama H, Harashima H (2014). Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system. *Arch Pharm Res* 37:4–15.
- Kim Vincent, San Francisco State University. Probit analysis. <http://userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/probit/ProbitAnalysis.pdf>. Προσπέλαση 14/03/2020.
- Kimmel EC, Fish RH, Casida JE (1976). Bioorganotin chemistry. Metabolism of organotin compounds in microsomal monooxygenase systems and in mammals. *J Agric Food Chem* 25:1–9.
- Klionsky DJ, Herman PK, Emr SD (1990). The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* 54:266–292.
- Kotake Y (2012) Molecular mechanisms of environmental organotin toxicity in mammals. *Biol Pharm Bull* 35:1876-1880.
- Kültz D (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol* 67:225–57.
- Lagadic L, Katsiadaki I, Biever R, Guiney PD, Karouna-Renier N, Schwarz T, Meador JP (2018). Tributyltin: Advancing the science on assessing endocrine disruption with an unconventional endocrine-disrupting compound. *Rev Environ Contam Toxicol* 245:65-127.
- Lancashire WE, Griffiths DE (1975). Studies on energy-linked reactions: isolation, characterisation and genetic analysis of trialkyl-tin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 51:377-392.
- Lavastre V, Girard D, (2002). Tributyltin induces human neutrophil apoptosis and selective degradation of cytoskeletal proteins by caspases. *J Toxicol Environ Health A* 65:1013–1024.
- Lee SS, Robinson SM, Wang HY (1981). Rapid determination of yeast viability. *Biotechn Bioeng Symp* 641-649.

- Leung SW, Quan A, Lao TT, Man RY (2006). Efficacy of different vasodilators on human umbilical arterial smooth muscle under normal and reduced oxygen conditions. *Early Hum Dev* 82:457–462.
- Li SC, Kane, PM (2009). The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochim Biophys Acta* 1793:650–663.
- Lillie S, Pringle J (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Responses to nutrient limitation. *J of Bacter* 138:1384-1394.
- Lindquist S (1986). The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151–1191.
- Lock EA, Aldridge WN (1975). The binding of triethyltin to rat brain myelin. *J Neurochem* 25:871-876.
- Lord PG, Wheals AE (1981). Variability in individual cell cycles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 50:361-376.
- Luan TG, Jin J, Chan SMN, Wong YS, Tam NFY (2006). Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. *Process Biochem* 41:1560–1565.
- Luijten JGA, van der Kerk GJM (1955). Investigations in the field of organotin chemistry. Tin Research Institute, Greenford, Middlesex, England
- Magalhães RSS, Popova B, Braus GH, Outeiro TF, Eleutherio ECA (2018). The trehalose protective mechanism during thermal stress in *Saccharomyces cerevisiae*: the roles of Ath1 and Agt1. *FEMS Yeast Res* 18:10.1093.
- Mager WH, Ferreira PM (1993). Stress response of yeast. *Biochem J* 290:1-13.
- Mahmud SA, Hirasawa T, Shimizu H (2010). Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses. *J Biosci Bioeng* 109:262–266.
- Manolson MF, Wu B, Proteau D, Taillon BE, Roberts BT, Hoyt MA, Jones EW (1994). STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase subunit Vph1p. *J Biol Chem* 269:14064–14074.
- Mari M, Tooze SA, Reggiori F (2011). The puzzling origin of the autophagosomal membrane. *F1000 Biol Rep* 3:25.

- Marques VB, Faria RA, Dos Santos L (2018). Overview of the Pathophysiological Implications of Organotin on the Endocrine System. *Front Endocrinol* 9:101.
- Martínez-Muñoz, GA, Kane P (2008). Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J Biol Chem* 283:20309–20319.
- Meador JP (2002). Determination of a tissue and sediment threshold for tributyltin to protect prey species of juvenile salmonoids listed under the US Endangered Species Act. *Aquat Conservation Mar Freshw Ecosys* 12:539–551.
- Messingerova L, Imrichova D, Coculova M, Zelina M, Pavlikova L, Kavcova H, Seres M, Bohacova V, Lakatos B, Sulova, Z et al (2016). Different mechanisms of drug resistance in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. In *Myelodysplastic Syndromes*. In Fusch O (Eds). Intech Open Science Open Minds: London UK pp. 181–200.
- Miligkos V, Tiligada E, Papamichael K, Ypsilantis E, Delitheos A (2000). Anticancer drugs as inducers of thermotolerance in yeast. *Folia Microbiol* 45:339-342.
- Mirisola MG, Braun RJ, Petranovic D (2014). Approaches to study yeast cell aging and death. *FEMS Yeast Res* 14:109–18.
- Nasmyth K (1996). At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet* 12:405-12.
- Neves MJ, Francois J (1992). On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 288:859-864.
- Neves MJ, Hohmann S, Bell W, Dumortier F, Luyten K, Ramos J, Cobbaert, P de KW, Kaneva Z, Thevelein JM (1995). Control of glucose influx into glycolysis and pleiotropic effects studied in different isogenic sets of *Saccharomyces cerevisiae* mutants in trehalose biosynthesis. *Curr Genet* 27:110-122.
- Ni HT, LaPorte DC (1995). Response of a yeast glycogen synthase gene to stress. *Mol Microbiol* 16:1197–1205.
- Nielsen J (2019). Yeast systems biology: Model organism and cell factory. *Biotechnol J* 14:1800421.

- Nikawa J, Sass P, Wigler M (1987). Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7:3629–3636.
- Nishi T, Forgacs M (2002). The vacuolar H⁺-ATPases: Nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:94-103.
- Ντεληθέος Β (2011). Επίδραση φαρμάκων στη στάσιμη φάση του κυτταρικού κύκλου του σακχαρομύκητα. Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Nwaka S, Kopp M, Holzer H (1995). Expression and function of the trehalase genes NTH1 and YBR0106 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270:10193–10198.
- Ohhira S, Watanabe M, Matsui H (2003). Metabolism of tributyltin and triphenyltin by rat, hamster and human hepatic microsomes. *Arch Toxicol* 77:138–144.
- Paalman JW, Verwaal R, Slofstra SH, Verkleij AJ, Boonstra J, Verrips CT (2003). Trehalose and glycogen accumulation is related to the duration of the G1 phase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 3:261–268.
- Pagliarani A, Nesci S, Trombetti F, Ventrella V (2010). Organotin effects on membrane-bound ATPase activities. In HF Chin (Eds). *Organometallic compounds: preparation structure and properties*, Nova Science Publishers Inc, New York pp. 225-253.
- Painting K, Kirsop B (1990). A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. *World J Microbiol Biotechnol* 6:346-347.
- Papamichael K, Vovou I, Miligkos V, Stavriniadis E, Delitheos A, Tiligada E. (2006). Effect of the Hsp90 modulators on the heat-shock response in eukaryotic cells. *Folia Microbiol* 51:33-37.
- Parra KJ, Chan CY, Chen J (2014). *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar H⁺-ATPase regulation by disassembly and reassembly: one structure and multiple signals. *Eukaryot Cell* 13:706-714.
- Parrou JL, Teste MA, François J (1997). Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology* 143:1891–1900.

- Penza M, Jeremic M, Marrazzo E, Maggi A, Ciana P, Rando G, Grigolato PG, Di Lorenzo D (2011). The environmental chemical tributyltin chloride (TBT) shows both estrogenic and adipogenic activities in mice which might depend on the exposure dose. *Toxic and Appl Pharm* 255: 65-75.
- Peters C, Bayer MJ, Buhler S, Andersen JS, Mann M, Mayer A (2001). Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* 409:581-588.
- Planqué R, Bruggeman FJ, Teusink B, Hulshof J (2014). Understanding bistability in yeast glycolysis using general properties of metabolic pathways. *Math Biosci* 255:33-42.
- Powell CD, Van Zandycke SM, Quain DE, Smart KA (2000). Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact on brewing fermentations. *Microbiology* 146:1023-1034.
- Pretorius IS, Curtin CD, Chambers PJ (2012). The winemaker's bug. From ancient wisdom to opening new vistas with frontier yeast science. *Bioeng Bugs* 3:147-156.
- Pubchem (2020). Tributyltin chloride (compound). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15096>. Προσπέλαση 14/03/2020.
- Rantakokko P, Main KM, Wohlfart-Veje C, Kiviranta H, Airaksinen R, Vartiainen T, Skakkebæk NE, Toppari J, Virtanen HE (2014). Association of placenta organotin concentrations with growth and ponderal index in 110 newborn boys from Finland during the first 18 months of life: a cohort study. *Environ Health* 13:45.
- Raymond CK, Howald-Stevenson I, Vater CA, Stevens TH (1992). Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell* 3:1389-1402.
- Reggiori F, Klionsky DJ (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 1:11-21.
- Ribeiro Junior RF, Marques VB, Nunes DO, Ronconi KS, Araujo JF, Rodrigues PL, et al (2016). Tributyltin chloride increases phenylephrine-induced contraction and vascular stiffness in mesenteric resistance arteries from female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 295:26-36.

- Ribeiro MPC, Santos AE, Custódio JBA (2014). Interplay between estrogen and retinoid signaling in breast cancer-current and future perspectives. *Cancer Lett* 353:17–24.
- Rodrigues SM, Ximenes CF, Batista PR, Simoes FV, Coser PH, Sena GC, et al (2014). Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats. *Toxicol Lett* 225:378–385.
- Ronconi KS, Stefanon I, Ribeiro Junior RF (2018). Tributyltin and vascular dysfunction: The role of oxidative stress. *Front Endocrinol* 9:354.
- Rose MS, Aldridge WN (1968). The interaction of triethyltin with components of animal tissues. *Biochem J* 106:821-828.
- Rubio-Ruíz ME, Del Valle-Mondragón L, Castrejón-Tellez V, Carreón-Torres E, Díaz-Díaz E, Guarner-Lans V (2014). Angiotensin II and 1-7 during aging in Metabolic Syndrome rats. Expression of AT1, AT2 and Mas receptors in abdominal white adipose tissue. *Peptides* 57:101–108.
- Russell DW, Wilson JD (1994). Steroid 5 α -reductase two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 63:25–61.
- Santos RL, Podratz GC, Fau-Sena PI, Sena VSD, Fau-Filho Gc, Filho PFI, et al (2012). Tributyltin impairs the coronary vasodilation induced by 17beta-estradiol in isolated rat heart. *J Toxicol Environ Health A* 75:948–59.
- Santos-Silva AJ, Cairrão E, Marques B, Verde I (2009). Regulation of human umbilical artery contractility by different serotonin and histamine receptors. *Reprod Sci* 16:1175–1185.
- Sass P, Field J, Nikawa J, Toda T, Wigler M (1986). Cloning and characterization of the high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83:9303–9307.
- Saxena AK (1987). Organotin compounds: toxicology and biomedical applications. *Appl Organometal Chem* 1:39-56
- Sekito T, Sugimoto N, Ishimoto M, Kawano-Kawada M, Akiyama K, Nishimoto S, Sugahara T, Kakinuma Y (2014). Tributyltin induces cell cycle arrest at G1 phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Toxicol Sci* 39:311-317.
- Sevcik P, Dunford HB (1991). Kinetics of the oxidation of NADH by methylene blue in a closed system. *J Phys Chem* 95:2411-2415.

- Sharan S, Nikhil K, Roy P (2013). Effects of low dose treatment of tributyltin on the regulation of estrogen receptor functions in MCF-7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 269:176–186.
- Sherley JL, Stadler PB, Stadler JS (1995). A quantitative method for the analysis of mammalian cell proliferation in culture in terms of dividing and non-dividing cells. *Cell Prolif* 28:137-144.
- Siebenlist KR, Taketa F (1980). Inhibition of red cell and yeast hexokinase by triethyltin bromide [(C₂H₅)₃SnBr]. *Biochem Biophys Res Commun* 95:758-764.
- Siebenlist KR, Taketa F (1983). Inactivation of yeast hexokinase B by triethyltin bromide. *Biochemistry* 22:4229-4234.
- Silljé HH, ter Schure EG, Rommens AJ, et al (1997). Effects of different carbon fluxes on G1 phase duration, cyclin expression, and reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179:6560–6565.
- Sillje HHW, Paalman JWG, ter Schure EG, Olsthoorn SQB, Verkleij AJ, Boonstra J, Verrips CT (1999). Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181:396-400.
- Singer MA, Lindquist S (1998a). Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol Cell* 1:639-648.
- Singer MA, Lindquist S (1998b). Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol* 16:460–468.
- Skotheim JM, Di Talia S, Siggia ED, Cross FR (2008). Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature* 454:291-296.
- Slamkova M, Zorad S, Krskova K (2016). Alternative renin-angiotensin system pathways in adipose tissue and their role in the pathogenesis of obesity. *Endocr Regul* 50:229–240.
- Smith BS (1981). Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus*=*Ilyanassa obsoleta*. *J Appl Toxicol* 1:141–144.
- Sommerschild HT, Kirkeboen KA (2002). Preconditioning - endogenous defence mechanisms of the heart. *Acta Anaesthesiol Scand* 46:123-37.
- Song J, Pfanner N, Becker T (2018). Assembling the mitochondrial ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 115:2850-2852.

Spiro RG (1966). Analysis of sugars found in glycoproteins. *Methods Enzymol* 8:3-26.

Σταυρινίδης Η (1999). Η επίδραση των αντικαρκινικών φαρμάκων στον κυτταρικό κύκλο των ευκαρυωτικών κυττάρων. Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

- Stoldt S, Wenzel D, Kehrein K, Riedel D, Ott M, Jakobs S (2018). Spatial orchestration of mitochondrial translation and OXPHOS complex assembly. *Nat Cell Biol* 20:528-534.
- Stoner HB, Barnes JM, Duff JI (1955). Studies on the toxicity of alkyl tin compounds. *Br J Pharmacol Chemother* 10:16-25.
- Storrie B, Yang W (1998). Dynamics of the interphase mammalian Golgi complex as revealed through drugs producing reversible Golgi disassembly. *Biochim Biophys Acta* 14:27-137.
- Teufel L, Tummler K, Flöttmann M, Herrmann A, Barkai N, Klipp E (2019). A transcriptome-wide analysis deciphers distinct roles of G1 cyclins in temporal organization of the yeast cell cycle. *Sci Rep* 9:3343.
- Thevelein JM, de Winde JH (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 33:904–918.
- Thomas LD, Shah H, Green SA, Bankhurst AD, Whalen MM (2004). Tributyltin exposure causes decreased granzyme B and perforin levels in human natural killer cells. *Toxicology* 200:221–233.
- Thoonen SHL, Deelman BJ, van Koten G (2004). Synthetic aspects of tetraorganotin and organotin(IV) halides. *J Organometal Chem* 689:2145–2157.
- Tiligada E, Giannakakou P, Karavokyros I, Delitheos A (1996). Effect of calcium channel blockers on the action of various antitumour agents in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Bacteriol* 81:481-485.
- Tiligada E, Miligkos V, Ypsilantis E, Papamichael K, Delitheos A (1999). Molybdate induces thermotolerance in yeast. *Lett Appl Microbiol* 29:77-80.
- Tiligada E, Papamichael K, Vovou I, Delitheos A (2006). Circumvention of camptothecin-induced resistance during the adaptive cellular stress response. *Anticancer Res* 26:421-425.
- Tiligada E. (2006) Chemotherapy: induction of stress responses. *Endocr Relat Cancer* 13:S115-124.
- Tobin JM, Cooney JJ (1999). Action of inorganic tin and organotins on a hydrocarbon-using yeast, *Candida maltosa*. *Arch Environ Contam Toxicol* 36:7-12.


- Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Scott JD, McMullen B, Hurwitz M, Krebs EG, Wigler M (1987b). Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7:1371–1377.
- Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Wigler M (1987a). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50:277–287.
- Tran LM, Bang SH, Yoon J, Kim YH, Min J (2016). Effect of acid trehalase (ATH) on impaired yeast vacuolar activity. *Enzyme Microb Technol* 93–94:44–50.
- Trevisol ET, Panek AD, Mannarino SC, Eleutherio EC (2011). The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:697–704.
- Tufan H, Ayan-Polat B, Tecder-Unal M, Polat G, Kayhan Z, Ogus E (2003). Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in ca-free medium and the effects of levromakalim. *Life Sci* 72:1321–1329.
- Uchida E, Ohsumi Y, Anraku Y (1985). Purification and properties of H⁺-translocating, Mg²⁺-adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 260:1090–1095.
- Ungar E, Bodländer G (1886). Ueber die toxischen Wirkungen der Zinns. *Z Hyg Infekt Kr* 2:241.
- Van Den Hazel HB, Kielland-Brandt MC, WintherJR (1996). Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast* 12:1-16.
- Van Der Kerk GJM, Kujjen (1954) Investigations on organo-tin compounds III : the biocidal properties of organo-tin compounds. *J Appl Chem* 4:314–319.
- Van Handel E (1985). Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitos. *J Am Mosq Control Assoc* 1:299-301.
- van Heerden JH, Wortel MT, Bruggeman FJ, Heijnen JJ, Bollen YJ, Planqué R, Hulshof J, O'Toole TG, Wahl SA, Teusink B (2014). Lost in transition: start-up of glycolysis yields subpopulations of nongrowing cells. *Science* 343:1245114.

- van Vaeck C, Wera S, van Dijck P, Thevelein JM (2001). Analysis and modification of trehalose 6-phosphate levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with the use of *Bacillus subtilis* phosphotrehalase. *Biochem J* 353:157–162.
- Veses V, Gow NAR (2008). Vacuolar dynamics during the morphogenetic transition in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 8:1339-1348.
- Voit EO (2003). Biochemical and genomic regulation of the trehalose cycle in yeast: review of observations and canonical model analysis. *J Theor Biol* 223:55-78.
- von Ballmoos C, Brunner J, Dimroth P (2004). The ion channel of F-ATP synthase is the target of toxic organotin compounds. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:11239–11244.
- Vovou I, Delitheos A, Tiligada E (2004). The heat shock response is dependent on the external environment and on rapid ionic balancing by pharmacological agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* 96:1271-1277.
- Wei W, Nurse P, Broek D (1993). Yeast cells can enter a quiescent state through G1, S, G2, or M phase of the cell cycle. *Cancer Res* 53:1867-1870.
- Weisman LS (2006). Organelles on the move: insights from yeast vacuole inheritance. *Nature Reviews Mol Cell Biol* 4:243-252.
- Weisman LS, (2003). Yeast vacuole inheritance and dynamics. *Annu Rev Genet* 37:435-460.
- Whalen MM, Ghazi S, Loganathan BG, Hatcher F (2002). Expression of CD16, CD18 and CD56 in tributyltin-exposed human natural killer cells. *Chem Biol Interact* 139:159–176.
- White TP (1880). Über die Wirkungen des Zinns auf den thierischen Organismus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch exp Path Pharmacol* 13, 53–69.
- Wiemken A (1990). Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek* 58:209-217.
- Winkler K, Kienle I, Burgert M, Wagner JC, Holzer H (1991). Metabolic regulation of the trehalose content of vegetative yeast. *FEBS Lett* 291:269–272.


- World Health Organization (1978). Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO TRS 631-JECFA 22/27.
- World Health Organization (1990). Tributyltin compounds. Environmental Health Criteria 116.
- World Health Organization (1999). Tributyltin oxide. Concise International Chemical Assessment Document 14.
- World Health Organization (2019). ATC/DDD Index 2019. www.whocc.no/atc_ddd_index/ Προσπέλαση 4/10/2019.
- Ximenes CF, Rodrigues SML, Podratz PL, Merlo E, Araujo JFP, Rodrigues LCM, Coitinho BJ, Vassalo DV, Graceli JB, Stefanon I (2017). Tributyltin chloride disrupts aortic vascular reactivity and increases reactive oxygen species production in female rats. *Environ Sci PollutRes Int* 24:24509–24520.
- Yamada S, Kotake Y, Sekino Y, Kanda Y (2013). AMP-activated protein kinase-mediated glucose transport as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells. *Metallomics* 5:484.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60:6–20.
- Zaman S, Lippman SI, Zhao X, Broach JR (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* 42:27–81.
- Zhao G, Chen Y, Carey L, Futcher B (2016). Cyclin-dependent kinase coordinates carbohydrate metabolism and cell cycle in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 62:546-557.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παράρτημα Ι


ATCC
Product Sheet
**Saccharomyces
pastorianus (ATCC®
2366™)**

Please read this FIRST


 Biosafety Level
1

Intended Use


This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Saccharomyces pastorianus* (ATCC® 2366™)


 **Description**

Strain Designation: 52 [CBS 1539, CCRG 20579, CCY 21-4-61, DSM 2548, NRRL Y-139]
Deposited Name: *Saccharomyces pastorianus* subsp. *arbigenensis* Steiner, teleomorph


 **Propagation**

ATCC® Medium 200: YM agar or YM broth


Growth Conditions
Temperature: 30.0°C

 **Isolation**

fermenting grapes

 **References**

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

 **Biosafety Level: 1**

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate. This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials. Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org.

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.
© ATCC 2012. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [12/05]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.898.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 1