ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

Τμήμα Χημικών Μηχανικών

ChemEngUP

Διερευνώντας το εκθέτωμα εγκύων σε φυτοφάρμακα, με μεταβολομική ανάλυση ορού αίματος, με Φασματομετρία Μάζας



ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΣΑΚΚΑ

Οκτώβρης 2024







ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ – ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

Διερευνώντας το εκθέτωμα εγκύων σε φυτοφάρμακα, με μεταβολομική ανάλυση ορού αίματος, με Φασματομετρία Μάζας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ
ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΣ ΣΑΚΚΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΑΡΙΑ ΚΛΑΠΑ

ΠΑΤΡΑ, ΟΚΤΩΒΡΗΣ 2024

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω πάρα πολύ, την επιβλέπουσα Ερευνήτρια Δρ. Μαρία Ι. Κλάπα, η οποία διευθύνει το Εργαστήριο Μεταβολικής Μηχανικής και Βιολογίας Συστημάτων του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) στην Πάτρα, για την αμέριστη βοήθεια της και το ενδιαφέρον της καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Οι συμβουλές της και οι τοποθετήσεις της επί του θέματος της διπλωματικής, μου έδειξαν ότι όχι μόνο χρειάζεται να έχεις μία πολύπλευρη οπτική επί των πραγμάτων, αλλά και να αναζητάς συνεχώς και να προσπαθείς για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα, με αυτοπεποίθηση να παρουσιάζεις όλα τα ευρήματα σου και να είσαι απόλυτα σίγουρος για αυτά. Θα ήθελα να ευχαριστήσω πάρα πολύ την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Παρασκευή Ζαγανά για τη συνεχή επικοινωνία και τη λύση οποιασδήποτε απορίας ή προβλήματος υπήρξε κατά τη διάρκεια της βιβλιογραφικής αναζήτησης, των πειραμάτων και της συγγραφής της διπλωματικής εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Μαρία Παπαγιάννη, και τον Καθηγητή Ενδοκρινολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Γεώργιο Μαστοράκο, οι οποίοι συνέβαλαν στην πραγματοποίηση αυτής της διπλωματικής εργασίας με την αποστολή των δειγμάτων και με την πολύτιμη βοήθεια τους σε όποια απορία υπήρξε. Τους ευχαριστώ πολύ επίσης για την εμπιστοσύνη που μας έδειξαν στην επιλογή που έκαναν για την ανάθεση αυτής της έρευνας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την συμφοιτήτρια μου Μαρία-Ελισάβετ Τσιούνη, με την οποία είχα το προνόμιο να συνεργαστώ στη συγκεκριμένη έρευνα, για την υποστήριξη της, τη συνεργασία της και τη βοήθεια της στο πειραματικό κομμάτι της συγκεκριμένης έρευνας.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, με τα οποία μπορεί να μην συνεργάστηκα σε αυτήν την πειραματική έρευνα, αλλά με βοήθησαν εξίσου με τις συμβουλές τους.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ το αφιερώνω στην οικογένεια μου. Είναι οι άνθρωποι που με στήριξαν, με βοήθησαν και έκαναν το όνειρο μου πραγματικότητα, να γίνω φοιτήτρια και να σπουδάσω το αντικείμενο το οποίο επέλεξα και αγάπησα. Χωρίς εκείνους τίποτα από όλα όσα έκανα δεν θα μπορούσε να επιτευχθεί.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Καθημερινά, οι άνθρωποι εκτίθενται σε πληθώρα παραγόντων, οι οποίοι περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, τις περιβαλλοντικές εκθέσεις και τις βιολογικές αποκρίσεις του ανθρώπινου οργανισμού σε συγκεκριμένα εξωτερικά ερεθίσματα. Το σύνολο των εκθέσεων στις οποίες έχει υποβληθεί ένα άτομο από τη στιγμή της σύλληψης του μέχρι τη στιγμή του θανάτου του, ονομάζεται εκθέτωμα (exposome) και προσπαθεί να συλλάβει όλο το εύρος των εκθέσεων του ανθρώπου σε συνθετικές χημικές ουσίες, διατροφικά συστατικά, ψυχοκοινωνικά στρεσογόνους παράγοντες και φυσικούς παράγοντες, καθώς και τον τρόπο που αποκρίνεται βιολογικά ένα άτομο σε αυτές. Με τη μελέτη του εκθετώματος, οι ερευνητές μπορούν να αναλύσουν πως επηρεάζουν οι περιβαλλοντικοί παράγοντες την υγεία και την προδιάθεση του ανθρώπου για διάφορες παθήσεις, παρέχοντας μία ολιστική προσέγγιση που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη στρατηγικών για τη βελτίωση της δημόσιας υγείας.

Οι εξωγενείς χημικές ουσίες, που απορροφώνται από τον άνθρωπο, όπως φάρμακα, εμπορικά προϊόντα, ενώσεις που υπάρχουν στη διατροφή, και περιβαλλοντικές χημικές ουσίες, μπορούν να είναι άμεσα ανιχνεύσιμες στον οργανισμό είτε ως χημικά μόρια ή ως προϊόντα του μεταβολισμού τους, είτε έμμεσα, λόγω μεταβολών στη μεταβολομική ισορροπία του οργανισμού που αντικατοπτρίζονται με διαφορετικό προφίλ βασικών ενδογενών μορίων, των μεταβολιτών. Η μεταβολομική, ως ένας από τους τομείς της ομικής, εξετάζει το σύνολο των μεταβολιτών σε κύτταρα, βιολογικά υγρά, ιστούς και οργανισμούς. Στόχος της μεταβολομικής ανάλυσης είναι η εύρεση και ανάλυση του μεταβολικού προφίλ ενός βιολογικού δείγματος, το οποίο αποτελείται από το σύνολο των μεταβολιτών του, παρέχοντας πληροφορίες για την φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού, τις παθολογικές του καταστάσεις ή/και την επίδραση που έχουν εξωτερικοί παράγοντες στον οργανισμό όπως είναι η διατροφή, τα φάρμακα, παθήσεις, κ.α.

Η συγκεκριμένη έρευνα ασχολείται με την πιθανή ανίχνευση φυτοφαρμάκων, εξωγενών, δηλαδή, χημικών ουσιών, στον ορό αίματος εγκύων γυναικών, που ζουν σε περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιείται εκτεταμένη χρήση φυτοφαρμάκων. Τα φυτοφάρμακα είναι χημικές ενώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη, προστασία και διατήρηση των φυτών. Ωστόσο η χρήση των φυτοφαρμάκων έχει επιπτώσεις τόσο στο περιβάλλον όσο και στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων (*Rani et al. 2021; Maipas et al. 2016*). Πληθώρα φυτοφαρμάκων έχουν χαρακτηριστεί ως ενδοκρινικοί διαταράκτες, δηλαδή ως ουσίες που διαταράσσουν την ομαλή λειτουργία του ορμονικού συστήματος. Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες συνδέονται με πληθώρα διαταραχών και ασθενειών, μεταξύ των οποίων είναι οι αναπαραγωγικές, δερματικές, καρδιαγγειακές, νευρολογικές, ηπατικές και ανοσολογικές διαταραχές, η παχυσαρκία, ο διαβήτης και ο καρκίνος (*Yilmaz et al. 2020; M. Heshmati H 2021*).

Στη συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιήθηκε ανάλυση των εμπορικών φυτοφαρμάκων Dursban, Dimento και Lentemul, με κύριες δραστικές ουσίες τον Chlorpyrifos, τη Dimethomorph και το 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) αντίστοιχα με χρήση υγρής χρωματογραφίας φασματομετρίας μάζας (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS). Αναλύθηκε, επίσης, ο ορός αίματος των εγκύων γυναικών, για πιθανή εύρεση όλων των παραπάνω ουσιών σε αυτό.

Σε παράλληλη έρευνα του εργαστηρίου Μεταβολομικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας, πραγματοποιήθηκε, από την κα. Μαρία-Ελισσάβετ Τσιούνη, φοιτήτρια του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστήμιου Πατρών, ανάλυση των φυτοφάρμακων Decis, Sivanto, Switch και Vertimec με δραστικές ουσίες την Deltamethrin, τη Flupyradifurone, τις Cyprodinil /Fludioxonil, και την Abamectin αντιστοίχως. Αναλύθηκαν, δείγματα αίματος από τον ομφάλιο λώρο των νεογέννητων αρσενικών τέκνων των γυναικών, με σκοπό την συσχέτιση πιθανών ευρημάτων στον ορό αίμα-

τος των μητέρων με πιθανά παρόμοια ευρήματα στο αίμα των νεογέννητων τέκνων τους. Ανιχνεύθηκαν τρία από τα παραπάνω φυτοφάρμακα στον ορό αίματος των εγκύων γυναικών και στο αίμα από τον ομφάλιο λώρο των νεογέννητων αρσενικών τέκνων, το Dursban, το Switch και το Vertimec.

ABSTRACT

Every day people are subjected to many exposures, including environmental exposures and human biological responses to specific external stimuli, among others. The set of exposures to which a person is subjected from the moment of conception to the moment of death is called exposome and attempts to capture the full range of human exposures to synthetic chemicals, dietary ingredients, psychosocial stressors, and physical agents, as well as how a person responds biologically to them. By studying the exposome, researchers can analyze how environmental factors, influence human health and predisposition to different diseases, providing a holistic approach that can lead to developing strategies to improve public health.

Exogenous chemicals absorbed by humans, such as drugs, commercial products, compounds present in the diet, and environmental chemicals, can be directly detected in the body either as chemical molecules or as products of their metabolism, or indirectly, due to alterations in the metabolic balance of the organism, which are reflected in a different profile of key endogenous molecules, the metabolites. Metabolomics, as one of the fields of omics, examines the set of metabolites in cells, biological fluids, tissues, and organisms. The metabolomic analysis aims to find and analyze the metabolic profile of a biological sample, which consists of all its metabolites, providing information on the physiological state of the organism, its pathological states and/or the effect of external factors on the organism such as diet, drugs, diseases, etc.

This research is concerned with the possible detection of pesticides, i.e. exogenous chemicals, in the blood serum of pregnant women living in an environment where pesticide use is extensive. Pesticides are natural or synthetic compoundsç that are used to grow, protect, and maintain plants. However, pesticide use has impacted both the environment and human and animal health (Rani et al. 2021; Maipas et al. 2016). A plethora of pesticides have been classified as endocrine disruptors, i.e. substances that have the potential to disrupt the normal functioning of the hormonal system. Endocrine disruptors are associated with a plethora of disorders and diseases, including reproductive, skin, cardiovascular, neurological, liver, and immune disorders, obesity, diabetes, and cancer (Yilmaz et al. 2020; M. Heshmati H 2021).

In this study, analysis of the commercial pesticides Dursban, Dimento, and Lentemul, with chlorpyr-ifos, dimethomorph, and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as the main active substances, re-spectively, was performed using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS). LC-MS also analyzed the blood serum of pregnant women for the detection of all the above substances.

In parallel research of the Laboratory of Metabolomic Engineering and Systems Biology, an analysis for the pesticides Decis, Sivanto, Switch and Vertimec with the active substances Deltamethrin, Flupyradifurone, Cyprodinil and Fludioxonil, and Abamectin, respectively, was also performed by Mrs. Maria-Elissavet Tsiouni, student of the Department of Chemical Engineering, University of Patras. Cord blood samples from the newborn male children of the women were also analyzed to correlate possible findings in the mothers' blood serum with possible similar findings in the blood of their newborn children. Three of these pesticides were detected in the blood serum of pregnant women and the cord blood of their newborn male children, Dursban, Switch, and Vertimec.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ....2
Περίληψη....3
ABSTRACT....5
Πίνακας περιεχομένων....6
Κατάλογος πινάκων....8
Κατάλογος εικόνων....9
Κατάλογος διαγραμμάτων....11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ....12
1.1 ΟΜΙΚΗ....12
1.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ....13
1.3 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ....14
1.3.1 Μεταβολομική ως πολυβηματική διαδικασία....16
1.3.2 Αναλυτικά στάδια....17
1.3.3 Υπολογιστικά στάδια....22
1.4 ΕΚΘΕΤΩΜΑ....23
1.5 ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ....24
1.6 ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ....27
1.6.1 Dimento....28
1.6.2 Dursban....30
1.6.3 Lentemul....31
2. ΣΚΟΠΟΣ....33
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ....34
3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ....34
3.1.1 Υλικά....34
3.1.2 Παραλαβή δειγμάτων....34
3.1.3 Ανάλυση φυτοφαρμάκων....35
3.1.4 Εκχύλιση ορών αίματος....38
3.1.5 Ανάκτηση του μεταβολικού προφίλ....39
3.1.6 Ταυτοποίηση κορυφών....39
3.1.7 Κανονικοποίηση και Φιλτράρισμα....40
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ....41
4.1 ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ....41
4.1.1 Υγρή Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας για την Νορλευκίνη και τη Θεοφυλλίνη 41
4.1.2 Πρότυπες καμπύλες φυτοφαρμάκων....42
4.1.3 Υγρή Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας για το Dimento....42
4.1.4 Υγρή Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας για το Dursban....47
4.1.5 Υγρή Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας για το Lentemul....51
4.1.6 Ανίχνευση φυτοφαρμάκων Vertimec και Switch....54
4.1.7 Όρια Ανίχνευσης των φυτοφαρμάκων (Limit of Detection-L0D)....56
4.1.8 Υγρή Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας για το Αίμα....57
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ....63

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....66

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3-1: Γενικές πληροφορίες όλων των φυτοφαρμάκων. 36
Πίνακας 3-2: Διαδοχικές αραιώσεις των αρχικών διαλυμάτων των φυτοφαρμάκων. 37
Πίνακας 3-3: Τελικές συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων προς ανάλυση. 38
Πίνακας 4-1: Το προφίλ των κορυφών του Dimento (όπως βρέθηκε στο διάλυμα b, το οποίο έχει την υψηλότερη συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος που αναλύθηκε). 43
Πίνακας 4-2: Τα εμβαδά κορυφής των κορυφών Dimento P1, Dimento P2 και της Norleukine για τις διάφορες συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων. 45
Πίνακας 4-3: Οι σχετικές περιοχές κορυφής των διάφορων συγκεντρώσεων των πρότυπων διαλυμάτων. 45
Πίνακας 4-4: Οι ενώσεις που είναι πιθανές να υπάρχουν στον ανθρώπινο οργανισμό, μετά την έκθεση του στον Chlorpyrifos 48
Πίνακας 4-5: Προφίλ κορυφών του Dursban (όπως βρέθηκε στο διάλυμα b, το πρότυπο διάλυμα με την υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε. 48
Πίνακας 4-6: Το προφίλ των κορυφών του Lentemul (όπως βρέθηκε στο διάλυμα b, το πρότυπο διάλυμα με την υψηλότερη συγκέντρωση του 2,4-D). 52
Πίνακας 4-7: Προφίλ κορυφών του Switch (όπως βρέθηκε στο διάλυμα b, το πρότυπο διάλυμα υψηλότερης συγκέντρωσης) 54
Πίνακας 4-8: Προφίλ κορυφών του Vertimec (όπως βρέθηκε στο διάλυμα b, το πρότυπο διάλυμα υψηλότερης συγκέντρωσης) 55
Πίνακας 4-9: Τα όρια ανίχνευσης των δραστικών ουσιών των φυτοφαρμάκων. 57
Πίνακας 4-10: Οι κορυφές του φυτοφαρμάκου Dursban στα δείγματα των ορών αίματος. 57
Πίνακας 4-11: Οι μέσες σχετικές περιοχές κορυφών, των κορυφών P10 και P11 του Dursban. 58
Πίνακας 4-12: Τα αποτελέσματα της ανάλυσης όλων των δειγμάτων, για την εύρεση των κορυφών του Switch και Vertimec. 58

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1-1:Οι κύριοι κλάδοι της ομικής (Πηγή: https://www.researchgate.net/publication/350668866_New_diagnostic_molecular_markers_and_biomarkers_in_odontogenic_tumors). 12
Εικόνα 1-2:Σχηματική αναπαράσταση της καταβολικής και αναβολικής διαδικασίας του μεταβολισμού. (Πηγή: https://www.britannica.com/science/metabolomics). 14
Εικόνα 1-3: Απεικόνιση των μηχανημάτων NMR (αριστερά), GC-MS (στη μέση), LC-MS(δεξιά) (Πηγές αντιστοίχως με τη σειρά:, https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mr/nmr/avancecore.html, https://6-napse.com/en/technical-means/analysis-gc-ms-gc-fid-gas-chromatography/, https://labrecycling.com/lc-ms-system). 15
Εικόνα 1-4: Τα στάδια της μεταβολομικής ανάλυσης. (Πηγή:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708520313959#fig0045) 17
Εικόνα 1-5: Αναπαράσταση της διαδικασίας της εκχύλισης και ξήρανσης ενός δείγματος (Πηγή: https://app.biorender.com/illustrations/66ca0a83f55aec8c8530eb0f). 18
Εικόνα 1-6: Αναπαράσταση σχηματικού διαγράμματος μίας διάταξης LC-MS (Πηγή: https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/lc-ms-what-is-lc-ms-lc-ms-analysis-and-lc-msms-348238). 19
Εικόνα 1-7: Σχηματικό διάγραμμα του συστήματος υγρής χρωματογραφίας (Πηγή: https://www.researchgate.net/publication/274251295_Chromatographic_detection_of_nitrofurans_in_foods_of_animal_origin). 20
Εικόνα 1-8: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) (Πηγή:https://www.researchgate.net/publication/225050758_Electrospray_Ionization_Mass_Spectrometry_A_Technique_to_Access_the_Information_beyond_the_Molecular_Weight_of_the_Analyte). 21
Εικόνα 1-9:Τετραπολικός αναλυτής μάζας παγίδας ιόντων. (Πηγή:https://www.researchgate.net/publication/236737006_Mass_spectrometry_and_hyphenated_instruments_in_food_analysis) 22
Εικόνα 1-10: Η απεικόνιση του εκθέματος (Πηγή: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/imt2.50). 24
Εικόνα 1-11: Ενδοκρινικό σύστημα (Πηγή: https://hypnotherapy4u.gr/?p=13716) 25
Εικόνα 1-12: Επιπτώσεις των ενδοκρινικών διαταρακτών (EDCs) στον ανθρώπινο οργανισμό (Πηγή: https://www.intechopen.com/chapters/74214). 26
Εικόνα 1-13: Η χημική δομή της Dimethomorph (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethomorph). 29
Εικόνα 1-14: Ο μεταβολίτης της Dimethomorph, 19-Hydroxydimethomorph (Πηγή: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969722006775#s0080). 29
Εικόνα 1-15: Χημική δομή του Chlorpyrifos (Πηγή: https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:34631) 30
Εικόνα 1-16: Χημική δομή του 2,4-D (αριστερά) και του2,4-D dimethylamine salt (δεξιά) (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-Dichlorophenoxyacetic-acid &. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-D-dimethylamine-salt) 32
Εικόνα 3-1: Εικόνα των δειγμάτων των ορών αίματος αριστερά και των φυτοφαρμάκων δεξιά. 35
Εικόνα 4-1: Το χρωματογράφημα των εσωτερικών προτύπων (α), το φάσμα μάζας της νορλευκίνης (b), και το φάσμα μάζας της θεοφυλλίνης (c). 42
Εικόνα 4-2: Τα χρωματογραφήματα των πρότυπων διαλυμάτων του Dimento. 44
Εικόνα 4-3: Τα χρωματογραφήματα των ανασυσταθέντων πρότυπων διαλυμάτων του Dursban. 51

Εικόνα 4-4: Τα χρωματογραφήματα των ανασυσταθέντων πρότυπων διαλυμάτων του Lentemul. 53
Εικόνα 4-5: Τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων αίματος, σε σύγκριση με το χρωματογράφημα του διαλύτη και του φυτοφαρμάκου Dursban. 62

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

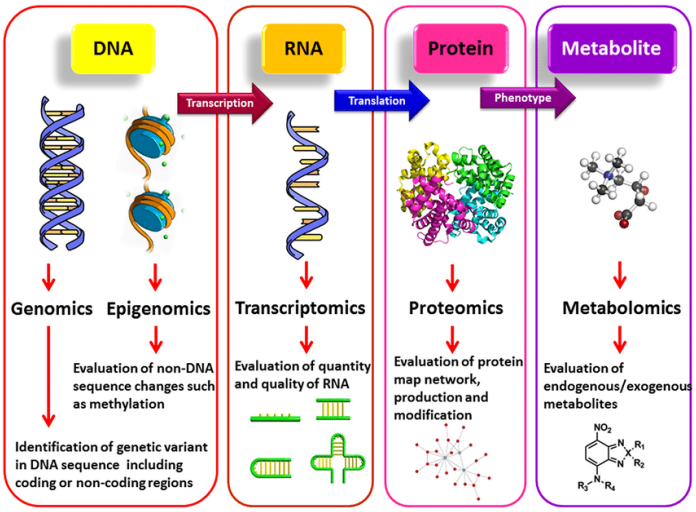
Διάγραμμα 4-1: Διάγραμμα σχετικών περιοχών κορυφών των Dimento P1 συναρτήσει των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων. 46
Διάγραμμα 4-2: Πρότυπη καμπύλη του Dimento P1 συναρτήσει των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων στη γραμμική περιοχή. 46
Διάγραμμα 4-3: :Διάγραμμα σχετικών περιοχών κορυφών του Dimento P3 συναρτήσει των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων. 46
Διάγραμμα 4-4: Πρότυπη καμπύλη του Dimento P3 συναρτήσει των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων στη γραμμική περιοχή. 46

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΟΜΙΚΗ

Η ομική, η οποία ορίζεται ως η διερεύνηση και ανάλυση μεγάλου όγκου δεδομένων που αντιπροσωπεύουν τη δομή και τη λειτουργία μιας ολόκληρης σύνθεσης ενός βιολογικού συστήματος, έχει φέρει επανάσταση στην επιστήμη (*Dai et al. 2022*). Η ομική αναλογία ορίζεται ως τεχνολογία υψηλής απόδοσης στη βιολογία και μελετά κύτταρα, ιστούς και οργανισμούς, με τρόπο που να συνδυάζει τα δεδομένα από διάφορους τομείς, ώστε να βοηθήσει στην ερμηνεία τους (*Narad, P. et al. 2018*). Στόχος της είναι η ανίχνευση και χαρτογράφηση γονιδίων, πρωτεϊνών και μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα (*Donovan et al. 2019*).

Η ομική περιέχει, μεταξύ άλλων, πέντε κύριους τομείς: την μεταβολομική (metabolomics), την γονιδιωματική (genomics), την πρωτεομική (proteomics), τη μεταγραφωματική (transcriptomics) και την επιγονιδιωματική (epigenomics). Η γονιδιωματική επικεντρώθηκε αρχικά στον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA και στη συνέχεια επεκτάθηκε μελετώντας τόσο το γονιδίωμα ενός ατόμου, το οποίο περιλαμβάνει τα γονίδια (τις κωδικοποιητικές περιοχές του DNA), της μη κωδικοποιητικές περιοχές του DNA, το μιτοχονδριακό DNA και το DNA των χλωροπλαστών, όσο και το προφίλ έκφρασης και το ρόλο των πρωτεϊνών (*Dimitra Dedousi et al. 2021; Del Giacco L. et al. 2012*). Η επιγονιδιωματική μελετά τις αναστρέψιμες τροποποίησης του DNA ή των πρωτεϊνών που σχετίζονται με το DNA, όπως η μεθυλίωση του DNA (*Hasin, Y. et al 2017*). Η μεταγραφωματική μελετά το μεταγράφωμα, το σύνολο όλων των μορίων αγγελιοφόρου RNA σε ένα κύτταρο, ιστό ή οργανισμό, που παράγονται από το γονιδίωμα και υπήρξε βασικό αντικείμενο στις επιστήμες υγείας μετά την αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος (*Vailati-Riboni, M. et al. 2017; Dimitra Dedousi et al. 2021*). Η πρωτεομική μελετά την πλήρη λειτουργία και δομή των πρωτεϊνών για την κατανόηση της φύσης ενός οργανισμού και το πρωτέωμα στο οποίο αντιστοιχεί ολόκληρο το συμπλήρωμα των πρωτεϊνών που παράγονται από έναν οργανισμό ή ένα σύστημα (*Al-Amrani, Safa et al. 2021; Vailati-Riboni, M. et al. 2017*). Η μεταβολομική μελετά το σύνολο των προϊόντων του μεταβολισμού, δηλαδή τους μεταβολίτες, μικρού μοριακού βάρους που υπάρχουν σε κύτταρα, ιστούς, όργανα και βιολογικά υγρά (*Donovan,Brittney M. et al. 2019*).



Εικόνα 1-1:Οι κύριοι κλάδοι της ομικής (Πηγή: https://www.researchgate.net/publication/350668866_New_diagnostic_molecular_markers_and_biomarkers_in_odontogenic_tumors).

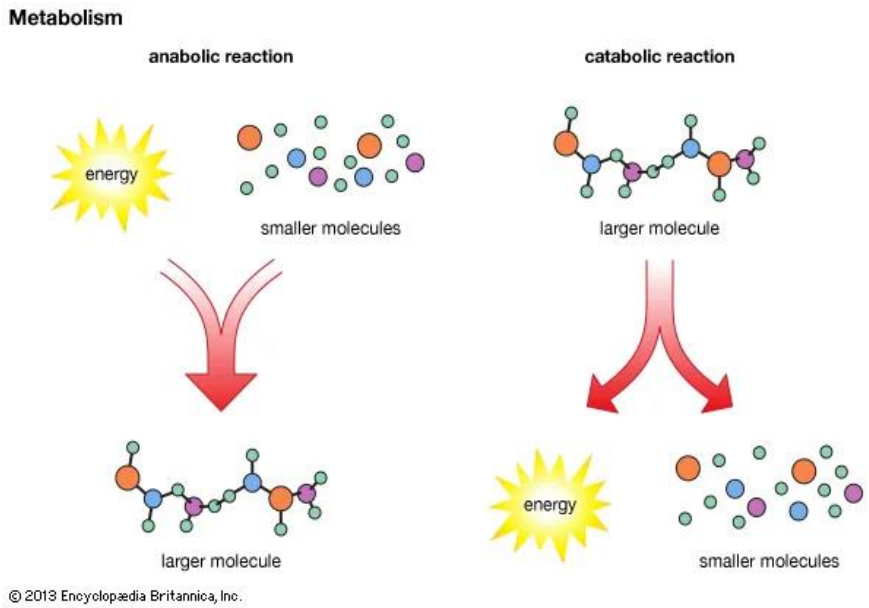
Οι ομικές τεχνολογίες περιλαμβάνουν, επίσης, και άλλους τομείς: τη λιπιδομική (lipidomics),, φαινομική (phenomics) και exposomics. Η λιπιδομική μελετά τα λιπίδια, συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών, αποθήκες ενέργειας και μεσολαβητές σε κυτταρικούς μηχανισμούς (*Donovan et al. 2019*). Η φαινομική , όρος που επινοήθηκε πρώτη φορά στην ομιλία του Dr. Steven A. Garan το 1996, ορίστηκε ως «η μελέτη και περιγραφή του φαινότυπου, δηλαδή μιας σειράς μετρήσιμων χαρακτηριστικών, που περιλαμβάνουν φυσικά, χημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά ατόμων και πληθυσμών (*Ying, W., 2023*). Τα χαρακτηριστικά προκύπτουν από πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ γενετικών παραγόντων, περιβαλλοντικών παραγόντων, διατροφής και συμβιωτικών μικροοργανισμών (*Ying, W. 2023*). Τέλος, η exposomics αναφέρεται στο σύνολο των εσωτερικών και εξωτερικών περιβαλλοντικών παραγόντων στους οποίους εκτίθεται ένα άτομο καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του (*Agache, Ioana 2019*).

Όλοι οι παραπάνω τομείς των ομικών τεχνολογιών συναποτελούν τη Βιολογία των Συστημάτων, η οποία περιγράφει τη συμπεριφορά των κυττάρων και των οργανισμών. Η βιολογία των συστημάτων είναι ένας σχετικά καινούργιος και εξελισσόμενος τομέας που πρωτοεμφανίστηκε πριν περίπου μία εικοσαετία και από τότε έχει σημειώσει αξιόλογη πρόοδο στην χαρτογράφηση και μοντελοποίηση της κυτταρικής λειτουργίας (*Chuang, H.-Y., et al. 2010*). Συνδυάζει μέσω υπολογιστικών προτύπων και μοντέλων τα επιστημονικά πεδία της χημείας, βιοχημείας, μοριακής βιολογίας, κυτταρικής φυσιολογίας και λειτουργίας των πολυκύτταρων οργανισμών, τα όποια από μόνα τους δεν είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους (*Kitano, H. 2002*). Στόχος της συστημικής βιολογίας είναι η πλήρης κατανόηση των βιολογικών συστημάτων ως ολότητα, η πρόβλεψη της συμπεριφοράς τους, η ανακάλυψη νέων θεραπειών και βιοτεχνολογικών εφαρμογών και η δημιουργία νέων εργαλείων και μεθόδων για την ενσωμάτωση δεδομένων.

1.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Ο μεταβολισμός ορίζεται ως το σύνολο των ενζυμικά καταλυόμενων βιοχημικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται στα κύτταρα των ζωντανών οργανισμών (*Guo, Jianping et al. 2017*). Ο μεταβολισμός περιλαμβάνει όλες εκείνες τι βιοχημικές αντιδράσεις που χρησιμοποιούν θρεπτικές ουσίες για να την παραγωγή και κατανάλωση ενέργειας, παραγωγή μακρομορίων (πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεικών οξέων) και των προϊόντων απέκκρισης από τον ανθρώπινο οργανισμό (*Na, Yi R. et al. 2018; Guo, Jianping et al. 2017*). Τα κύρια όργανα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό είναι το ήπαρ, τα λιποκύτταρα, το πάγκρεας, τα νεφρά και οι μύες, και μαζί με τον εγκέφαλο συνεργάζονται για να αποφασίσουν αν θα καταναλώσουν ή θα παράγουν ενέργεια για τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού (*Na, Yi R. et al. 2018; Shroff Tanvi et al. 2022*).

Ο μεταβολισμός χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: σε καταβολισμό και αναβολισμό. Ο καταβολισμός αναφέρεται σε όλες τις μεταβολικές διεργασίες στις οποίες μεγάλα μόρια διασπώνται σε μικρότερα, με ταυτόχρονη παραγωγή ενέργειας, ενώ ο αναβολισμός περιλαμβάνει όλες τις μεταβολικές διεργασίες που σχετίζονται με την δημιουργία μεγαλύτερων μορίων από μικρότερα, με ταυτόχρονη κατανάλωση ενέργειας για την πραγματοποίηση τους (*Theorell, 2009*).



Εικόνα 1-2:Σχηματική αναπαράσταση της καταβολικής και αναβολικής διαδικασίας του μεταβολισμού. (Πηγή: https://www.britannica.com/science/metabolomics).

Ο μεταβολισμός επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων όπως είναι οι περιβαλλοντικές συνθήκες, ο τρόπος ζωής, το φύλο, η ηλικία και ο γενετική κώδικας (*Kastenmüller, Gabi et al. 2015*). Στατιστικά οι γυναίκες έχουν μεγαλύτερο ποσοστό λίπους στο σώμα τους και ιδιαίτερα στα κάτω άκρα, λόγω της υψηλότερης ανάγκης θρεπτικών συστατικών κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης τους (*Power ML et al. 2008).* Η εγκυμοσύνη είναι μία διαδικασία, όπου πολλές ορμονικές αλλαγές λαμβάνουν χώρα. Η συσσώρευση αποθεμάτων θρεπτικών ουσιών στη μητέρα, η μεταφορά τους μεταξύ των ιστών και η αύξηση του μεταβολισμού επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο το σώμα διαχειρίζεται όλα τα θρεπτικά συστατικά του (*King, Janet C, 2000*). Η έκθεση της μητέρας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε τοξικές ουσίες, όπως τα φυτοφάρμακα, μπορεί να έχει άμεσες επιπτώσεις στη μεταβολική διαδικασία και κατ' επέκταση στην ανάπτυξη και υγεία του εμβρύου.

1.3 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ

Η Μεταβολομική είναι ένας όλο και περισσότερο εξελισσόμενος τομέας της ομικής, ο οποίος συνδυάζει τεχνικές για την ανίχνευση και τη μέτρηση των μεταβολιτών, χρησιμοποιώντας προηγμένες αναλυτικές μεθόδους, καθώς και στατιστικές και πολλαπλές μεθόδους για την ανάκτηση πληροφοριών και την εξαγωγή των δεδομένων (*Roessner, U. et al. 2009*). Στόχος της μεταβολομικής είναι η ερευνά της κατάστασης και τη δραστηριότητας του κυτταρικού μεταβολισμού, ανιχνεύοντας τους μεταβολίτες σε κύτταρα, βιολογικά υγρά και ιστούς, δηλαδή τις χημικές ουσίες, οι οποίες δεν προέρχονται από κάποια γονιδιακή έκφραση και παράγονται λόγω της διαδικασίας του μεταβολισμού (*Johnson et al. 2016; Vasilopoulou et al. 2016; Bain et al. 2024; Roux et al. 2010*). Οι μεταβολίτες συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των αμινοξέων και των υδατανθράκων, είναι σημαντικές βιολογικά ενεργές ενώσεις, προϊόντα και αντιδρώντα μεταβολικών αντιδράσεων (*Dayalan et al. 2018; Vasilopoulou et al. 2016; Johnson, C.H 2012).* Το σύνολο των μεταβολιτών ονομάζεται μεταβόλωμα και χωρίζεται σε ενδογενείς και εξωγενείς μεταβολίτες. Ενδογενείς μεταβολίτες ονομάζονται οι ουσίες που παράγονται από τον οργανισμό και χωρίζονται σε πρωτογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι είναι

υπεύθυνοι για την αναπαραγωγή, αύξηση και ανάπτυξη του οργανισμού και σε δευτερογενείς μεταβολίτες που δεν σχετίζονται με τα προαναφερθέντα. Εξωγενείς μεταβολίτες ονομάζονται οι ουσίες οι οποίες δεν παράγονται από τον οργανισμό με φυσικό τρόπο και μπορεί να προέρχονται από μικροοργανισμούς ή από διατροφικές και άλλες εξωγενείς πηγές, είναι οι ξένες ουσίες που επηρεάζουν τον οργανισμό και ο οργανισμός εκκρίνει μεταβολίτες λόγω αυτού του γεγονότος. (*Tanna, Bhakti et al. 2017*).

Η μεταβολομική είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό πεδίο στις ομικές επιστήμες, με κρίσιμη σημασία για τον τομέα της υγείας. Αναφορές έχουν γίνει για την χρησιμότητα της μεταβολομικής σε κλινικές διαγνώσεις, προγνώσεις ασθενειών και ταξινόμησης της σοβαρότητας των ασθενειών μέσω του προσδιορισμού του φαινότυπου διαφόρων ασθενειών (*Qiu, Shi et al. 2023; Johnson et al. 2016*). Ο φαινότυπος αναφέρεται στο σύνολο των παρατηρήσιμων χαρακτηριστικών ενός οργανισμού, όπως είναι η συμπεριφορά, η εμφάνιση και η ανάπτυξη, τα οποία χαρακτηριστικά καθορίζονται από την γενετική πληροφορία (γονότυπος) και από τις επιδράσεις του περιβάλλοντος στον οργανισμό (*Charames et al. 2020; Johnson et al. 2016*). Οι μεταβολίτες αντικατοπτρίζουν τον φαινότυπο ενός οργανισμού και συνδέονται άμεσα με τον εντοπισμό νέων διαγνωστικών βιοδεικτών. Η χρήση της μεταβολομικής που επικεντρώνεται στους μεταβολίτες μικρών μορίων έχει κερδίσει σημαντικό ενδιαφέρον για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών που μπορούν να βοηθήσουν στη διάγνωση ασθενειών και στην καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν σε μια νόσο (*Qiu, Shi et al. 2023*). Οι έρευνες που έχουν ως στόχο την εύρεση και ανάλυση των μεταβολιτών κρίνονται σημαντικές, καθώς παρουσιάζουν βιολογικές μεταβολές που προκλήθηκαν λόγω κάποιας παθολογικής κατάστασης ή περιβαλλοντικής επίδρασης και αποκάλυψαν νέα δεδομένα για περαιτέρω έρευνα (*Johnson, C.H 2012*).

Η μεταβολομική μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε στοχευμένες και μη στοχευμένες προσεγγίσεις. Οι στοχευμένες μελέτες της μεταβολικής εστιάζουν στην ανάλυση ενός συγκεκριμένου συνόλου γνωστών μεταβολιτών και ο σκοπός τους είναι η ταυτοποίηση και ανακατασκευή του μεταβολικού προφίλ (*Bingol, Kerem 2018*). Οι μη στοχευμένες μελέτες, αποβλέπουν στην εύρεση και αναγνώριση όσο τον δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών σε ένα δείγμα, χωρίς να υπάρχει προγενέστερη γνώση για το ποιοι είναι αυτοί (*Bingol, Kerem 2018*). Η επίτευξη των στοχευμένων ή μη στοχευμένων προσεγγίσεων πραγματοποιείται με διάφορες αναλυτικές τεχνικές.

Οι τρεις κυριότερες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την εύρεση του μεταβολικού προφίλ είναι ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance, NMR), η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) και η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS).



Εικόνα 1-3: Απεικόνιση των μηχανημάτων NMR (αριστερά), GC-MS (στη μέση), LC-MS(δεξιά) (Πηγές αντιστοίχως με τη σειρά:, https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mr/nmr/avancecore.html, https://6-napse.com/en/technical-means/analysis-gc-ms-gc-fid-gas-chromatography/, https://labrecycling.com/lc-ms-system).

Η τεχνική NMR ανιχνεύει τα χαρακτηριστικά των μορίων μετρώντας μια φυσική τους ιδιότητα, που ονομάζεται σπιν, η οποία βοηθά στην κατανόηση της δομής και της συμπεριφοράς των μορίων. Όταν οι πυρήνες εκτεθούν σε μία συγκεκριμένη συχνότητα ραδιοκυμάτων έχουν την ικανότητα να μεταπηδούν σε διαφορετικές ενεργειακές καταστάσεις, λόγω της απορρόφησης της ενέργειας αυτής (*Liu, X et al. 2017*). Αυτός ο τρόπος λειτουργίας δίνει πληροφορίες για το χημικό περιβάλλον των μορίων και κατά επέκταση της μοριακής του δομής (*Liu, X et al. 2017*). Το NMR μπορεί να προσδιορίσει και να ταυτοποιήσει ταυτόχρονα πληθώρα οργανικών ενώσεων στο μικρογραμμομοριακό εύρος και έχει μεγάλη επαναληψιμότητα. Το κυριότερο μειονέκτημα είναι η χαμηλή ευαισθησία, με αποτέλεσμα πολλοί μεταβολίτες να μην μπορούν να ανιχνευθούν ακόμα και με προσπάθειες ενίσχυσης του σήματος (*Shulaev, Vladimir 2006; Emwas, Abdul 2019*).

Η αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας (GC-MS) συνδυάζει δύο τεχνικές, την αέρια χρωματογραφία (GC) και την φασματομετρία μάζας (MS). Σε μία ανάλυση GC-MS το δείγμα, το οποίο αναλύεται, πρέπει να βρίσκεται σε αέρια μορφή. Στην περίπτωσή που το δείγμα είναι υγρό χρειάζεται να μετατραπεί σε αέριο. Αρχικά, οι μεταβολίτες διαχωρίζονται πρώτα στην στήλη της αέριας χρωματογραφίας με τη βοήθεια ενός φορέα αερίου βάσει του συντελεστή κατανομής, ο οποίος ορίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης μίας ουσίας μεταξύ της κινητής και της ακίνητης φάσης σε ένα δείγμα, και έπειτα ακολουθεί η ανίχνευση τους μέσω του φασματομέτρου μάζας (*Koo, Imhoi 2013; Schlosser, P.M. et al. 2009*). Το σύστημα GC-MS μετράει τους χρόνους κατακράτησης και το φάσμα μάζας κάθε μεταβολίτη (*Koo, Imhoi 2013*). Τα κυριότερα πλεονεκτήματα του GC-MS έναντι άλλων μεθόδων είναι η ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση και επιβεβαίωση των ανιχνευόμενων αναλυτών και χημικά διαφορετικών ενώσεων και η δυνατότητα φασματομετρικής διάλυσης των κορυφών συνέκλουσης όπου δύο οι περισσότερες ενώσεις δεν διαχωρίζονται πλήρως και ανιχνεύονται ταυτόχρονα (*Mastovska, K 2004; Shulaev, Vladimir 2006*). Από την άλλη μεριά τα μηχανήματα GC-MS παραμένουν ακριβότερα από τα μηχανήματα αέριας χρωματογραφίας και είναι ευαίσθητα σε παράγοντες περιβάλλοντος που μπορούν να επηρεάσουν την ακρίβεια των αποτελεσμάτων του (*Mastovska, K 2004*).

Η υγρή χρωματογραφία φασματομετρία μάζας (LC-MS) συνδυάζει δύο αναλυτικές τεχνικές την υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) και την φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) και είναι μία ισχυρή αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση, την εύρεση της δομής των μορίων και τον ποσοτικό προσδιορισμό (*Mukherjee, Pulok K. 2018*). Η υγρή χρωματογραφία φασματομετρία μάζας είναι η συνηθέστερη μέθοδος για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα, οργανικούς ρύπους, όπως και ενώσεων που διαταράσσουν το ενδοκρινικό σύστημα, όπως είναι τα φυτοφάρμακα (*Čelić, Mira et al. 2022*). Η LC-MS είναι χρήσιμη για την ανάλυση μικρού μοριακού βάρους μορίων, προσφέροντας υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα με χρησιμότητα σε πολλαπλές εφαρμογές (*Mukherjee, Pulok K. 2018).* Είναι μία πολύτιμη αναλυτική τεχνική για την ακρίβεια, την ευελιξία και την αποτελεσματικότητα της.

1.3.1 Μεταβολομική ως πολυβηματική διαδικασία

Η μεταβολομική είναι μία πολυβηματική διαδικασία υψηλής απόδοσης που αποτελείται από τον πειραματικό σχεδιασμό, δηλαδή τα προαναλυτικά στάδια, τα αναλυτικά στάδια και τα υπολογιστικά στάδια (*Vasilopoulou, et al. 2016*). Στα προαναλυτικά στάδια λαμβάνει χώρα η προετοιμασία του δείγματος, Τα αναλυτικά στάδια περιέχουν την ανάκτηση του μεταβολικού προφίλ μέσω μίας αναλυτικής μεθόδου (NMR ή GC-MS ή LC-MS) (*Cevallos-Cevallos, Juan M et al. 2009*). Τα υπολογιστικά στάδια περιλαμβάνουν την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των κορυφών, που έχουν εξαχθεί από την αναλυτική μέθοδο, καθώς και την κανονικοποίηση και το φιλτράρισμα των δεδομένων (*Cevallos-Cevallos, Juan M et al. 2009).*



Εικόνα 1-4: Τα στάδια της μεταβολομικής ανάλυσης.
(Πηγή:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708520313959#fig0045)

1.3.2 Αναλυτικά στάδια

1.3.2.1 Εκχύλιση και ξήρανση

Η διαδικασία της εκχύλισης στοχεύει στην απομόνωση και τη λήψη των μεταβολιτών από ένα δείγμα. Πριν από την εκχύλιση του δείγματος, το δείγμα πρέπει να είναι ομογενές προκειμένου να αυξηθούν οι πιθανότητες για μέγιστη εξαγωγή των μεταβολιτών (*Mushtaq, Mian Y et al. 2014*). Αν το δείγμα είναι στέρεο, η ομογενοποίηση είναι απαραίτητο βήμα για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Η επιλογή του διαλύτη είναι, επίσης, μία αρκετά σημαντική διαδικασία. Αρκετοί διαλύτες και μέθοδοι εκχύλισης θα πρέπει να δοκιμάζονται για την καταλληλόλητα τους αναλόγως της ομάδας των δειγμάτων σε μία έρευνα (*Cevallos-Cevallos, Juan M. et al 2009*). Στην μεταβολομική επιλέγεται κυρίως το μείγμα μεθανόλης και νερού, λόγω του χαρακτηριστικού των αλκοολών να είναι υδρόφιλες ή λιπόφιλες ενώσεις, συνδυασμός που προσδίδει υψηλή ισχύ διαλυτοποίησης και την ικανότητα εξαγωγής μεγάλου φάσματος μεταβολιτών (*Mushtaq, Mian Y. et al. 2014*). Οι οργανικοί διαλύτες είναι κατάλληλη για την εκχύλιση πολικών, μη πολικών και υδρόφοβων μεταβολιτών και η μεθανόλη, ως οργανικός διαλύτης, είναι συμβατή με τις αναλυτικές τεχνικές GC-MS, LC-MS, HPLC, NMR και μπορεί να εξάγει ένα ευρύ φάσμα μεταβολιτών, όπως είναι τα σάκχαρα, τα αμινοξέα, οι φαινολικές ενώσεις, τα οργανικά οξέα και τα αλκαλοειδή (*Mushtaq, Mian Y. et al. 2014*).

Στην διαδικασία της εκχύλισης συμμετέχουν, επίσης, εσωτερικά πρότυπα. Τα εσωτερικά πρότυπα χρησιμοποιούνται στην μεταβολομική ανάλυση για να βελτιώσουν την ακρίβεια των αποτελεσμάτων με την διόρθωση των μετρήσεων λόγω πιθανής απώλειας μέρος του δείγματος κατά την ανάλυση του (*Goodwin, John M et al. 2024; Bronsema, Kees J et al. 2012*). Τα εσωτερικά πρότυπα πρέπει να έχουν παρόμοιες φυσικές και χημικές ιδιότητες με τα μόρια του ενδιαφέροντος μας (*Goodwin, John M et al. 2024*). Θα πρέπει, επίσης, να είναι σταθερά κατά τη διάρκεια της ανάλυσης και να μην παρεμβαίνουν στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μορίων. Τα εσωτερικά πρότυπα πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας και να έχουν διακριτή χρωματογραφική κορυφή, η οποία να

είναι καλά διαχωρισμένη από τις κορυφές των υπόλοιπων μορίων, ώστε να αποφεύγεται οποιαδήποτε επικάλυψη ή συνέκλουση. Επιπλέον, θα πρέπει να είναι μη ενδογενή, να απουσιάζουν ή να υπάρχουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα στη βιολογική μήτρα ή στο δείγμα που αναλύεται, ώστε να διασφαλίζεται ότι δεν συμβάλλουν στο σήμα υποβάθρου και δεν παρεμβαίνουν στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μορίων.

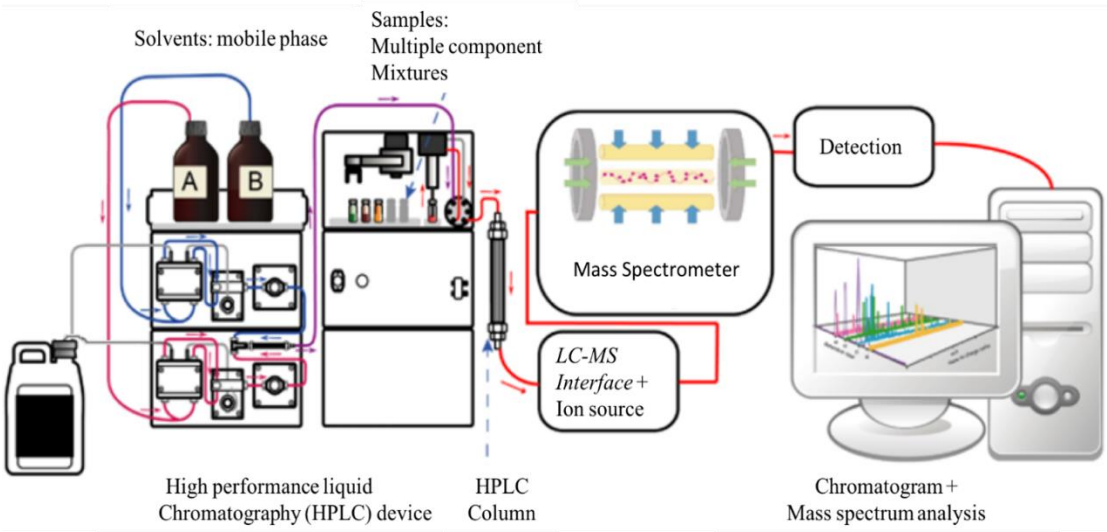
Τη διαδικασία της εκχύλισης ακολουθεί η διαδικασία της ξήρανσης. Μετά τη φάση της επώασης των δειγμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες με υδατόλουτρο, αφού έχει προστεθεί μεθανόλη και εσωτερικά πρότυπα, ακολουθεί η προσθήκη νερού και η φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων ιζημάτων. Μετά τη φυγοκέντρηση και την ανάκτηση του υπερκείμενου, τα δείγματα τοποθετούνται σε αντλία κενού για την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας. Η ξήρανση των μεταβολιτών είναι κρίσιμη για τη διατήρησή τους, καθώς αφαιρεί την υγρασία, παρατείνοντας τη διάρκεια αποθήκευσης τους (*Bakir, Sena et al. 2023*).



Εικόνα 1-5: Αναπαράσταση της διαδικασίας της εκχύλισης και ξήρανσης ενός δείγματος (Πηγή: https://app.biorender.com/illustrations/66ca0a83f55aec8c8530eb0f).

1.3.2.2 Ανάκτηση του μεταβολικού προφίλ

Το LC-MS είναι μία αναλυτική τεχνική συνδυάζει την ικανότητα διαχωρισμού της υγρής χρωματογραφίας και την ειδικότητα της ανίχνευσης της φασματομετρίας μάζας (*Guo, Hao et al. 2019*). Η δυνατότητα υψηλής ευαισθησίας και επιλεκτικότητας, με την εύκολη μέτρηση ενώσεων σε συγκεντρώσεις ng/mL, τη διαφοροποίηση μορίων σε διαφορετικά μοτίβα μάζας και θρυμματισμού, όπως και η δυνατότητα εύρεσης αυτών των μορίων αργότερα, την καθιστά μία εξαιρετική και ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική (*Moldoveanu, Serban C. et al. 2012*). Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου της υγρής χρωματογραφίας έναντι της αέριας χρωματογραφίας είναι η ικανότητα της να λειτουργεί απευθείας με υγρά δείγματα, όπως σε κλινικά ή βιολογικά δείγματα, χωρίς την απαίτηση η αναλυόμενη ουσία να εξατμιστεί (*Crooks, Peter A et al. 1999*).



Εικόνα 1-6: Αναπαράσταση σχηματικού διαγράμματος μίας διάταξης LC-MS (Πηγή: https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/lc-ms-what-is-lc-ms-lc-ms-analysis-and-lc-msms-348238).

1.3.2.2.1 Υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography-LC)

Η υγρή χρωματογραφία η οποία ονομάζεται και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), είναι μία μέθοδος διαχωρισμού στην οποία τόσο το δείγμα όσο και η κινητή φάση είναι υγρά (*Prado, Raquel et al. 2015; López-Porfiri, Pablo et al. 2023).* Η τεχνική διαχωρισμού της υγρής χρωματογραφίας βασίζεται στην κατανομή των χημικών ουσιών μεταξύ μιας υγρής κινητής φάσης και μίας στατικής φάσης (*Hage, David S 2017*). Το δείγμα ωθείται σε υψηλή πίεση μέσω μίας στήλης που εμπεριέχει τη στατική φάση, η οποία αποτελείται από σωματίδια ακανόνιστου ή σφαιρικού σχήματος (*Prado, Raquel et al. 2015*).

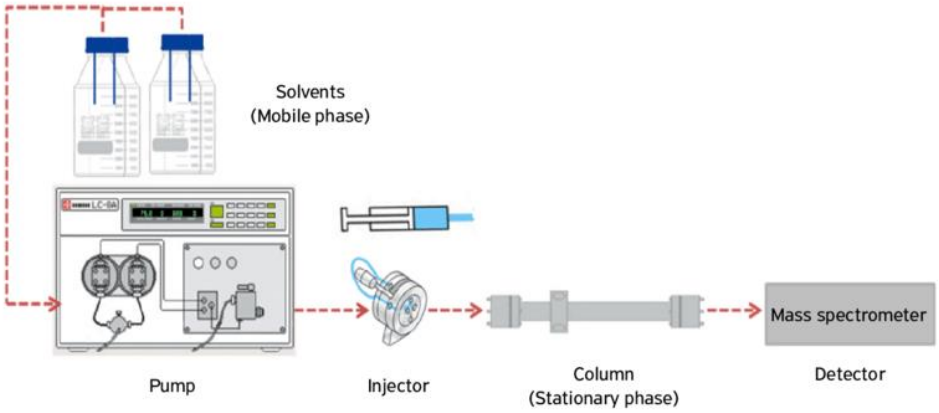
Υπάρχουν πέντε κύριοι τύποι υγρής χρωματογραφίας οι οποίοι ταξινομούνται ανάλογα με τους φυσικούς ή χημικούς μηχανισμούς με τους οποίους διαχωρίζουν το δείγμα. Οι πέντε κύριοι τύπου είναι η χρωματογραφία προσρόφησης, η χρωματογραφία ανταλλαγή ιόντων, η χρωματογραφία συγγένειας, η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών και η χρωματογραφία κατανομής (*Hage, David S 2017).*

Δύο κύριες κατηγορίες της χρωματογραφίας κατανομής υπάρχουν ανάλογα της πολικότητας της κινητής και της στατικής φάσης. Η υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης είναι η πρώτη κατηγορία, στην οποία η στατική φάση είναι περισσότερο πολική από την κινητή φάση και η δεύτερη κατηγορία είναι η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης όπου συμβαίνει το αντίθετο, δηλαδή η κινητή φάση είναι πιο πολική από την στατική φάση (*Prado, Raquel et al. 2015*).

Η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης διαχωρίζει τις διαλυμένες ουσίες ανάλογα με την υδροφοβικότητά τους (*Wajcman, Henri et al. 2009*). Τα υδρόφοβα ή μη πολικά ή ασθενώς πολικά μόρια του δείγματος τα οποία βρίσκονται στην πολική κινητή φάση, αλληλοεπιδρούν ισχυρότερα με την υδρόφοβη στατική φάση και προσροφώνται σε αυτή, ενώ τα υδρόφιλα μόρια αλληλοεπιδρούν περισσότερο με την κινητή φάση και είναι εκείνα που θα εκλυθούν πρώτα από την χρωματογραφική στήλη (*Wang, Wenqi et al. 2022*). Επομένως αυτό που μετράτε στην υγρή χρωματογραφία, είναι ο χρόνος κατακράτησης μίας ουσίας, δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται για να περάσει από τη στήλη ένα συστατικό και να ανιχνευθεί.

Η χρήση, επίσης, οργανικού διαλύτη στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης είναι αρκετά σημαντική, καθώς επιτυγχάνεται η μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης, δίνοντας την δυνατότητα στα υδρόφοβα μόρια να μπορέσουν να εκλυθούν από την χρωματογραφική στήλη (*Wang,*

Wenqi et al. 2022). Οι απαιτήσεις σε οργανικό διαλύτη αυξάνονται, όσο αυξάνονται και οι υδροφοβικότητες των μορίων, αφού όσο περισσότερο υδροφοβικά είναι τόσο ισχυρότερη θα είναι και η σύνδεση των μορίων αυτών με τη στατική φάση.

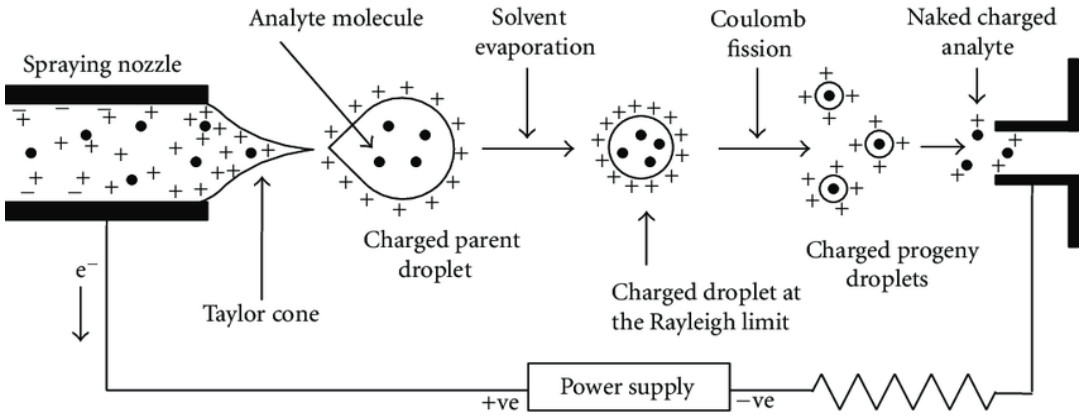


Εικόνα 1-7: Σχηματικό διάγραμμα του συστήματος υγρής χρωματογραφίας (Πηγή: https://www.researchgate.net/publication/274251295_Chromatographic_detection_of_nitrofurans_in_foods_of_animal_origin).

1.3.2.2.2 Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry- MS)

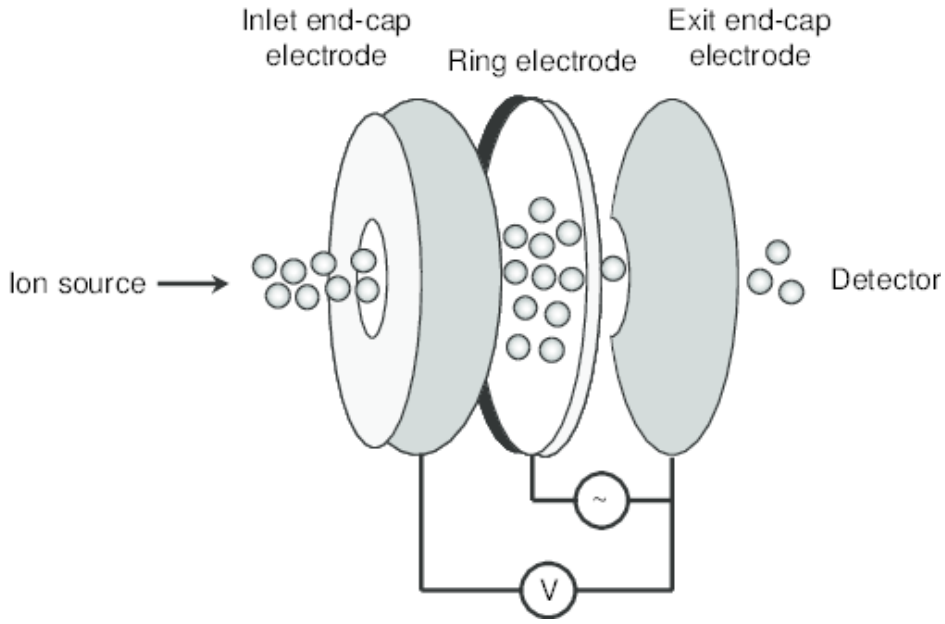
Η φασματομετρία μάζας είναι η δεύτερη αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται στην διαδικασία εύρεσης των χημικών ενώσεων και των βιολογικών μορίων. Ένα τυπικό φασματόμετρο μάζας αποτελείται από μία πηγή ιόντων, έναν αναλυτή μάζας ή φασματόμετρο και έναν ανιχνευτή, ο οποίος καταγράφει τον αριθμό των ιόντων σε κάθε τιμή m/z (*Calabrese, Barbara 2018*).Το δείγμα, το οποίο μπορεί να είναι στερεό, υγρό ή αέριο, βομβαρδίζεται με μία δέσμη ηλεκτρονίων, προκαλώντας τη μετατροπή των μορίων σε ιόντα, με ή χωρίς την θραύση τους (*Sparkman, 2000*). Τα ιόντα επιταχύνονται και εκτρέπονται στο ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο του φασματομέτρου διαφορετικά, ανάλογα με τις διαφορετικές αναλογίες μάζας προς φορτίο (m/z) των ιόντων, προκειμένου τα μόρια να αναγνωριστούν (*Khwa Museveni et al.. 2022*). Η φασματομετρία μάζας στοχεύει στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους, στην παροχή δομικών πληροφοριών και στην ποσοτική ανάλυση τόσο μικρών μορίων όσο και βιομορίων με υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία (*Calabrese, Barbara 2018*).

Οι δύο πιο κοινές τεχνικές ιονισμού ενός δείγματος είναι, το MALDI (Matrix Laser Desorption Ionization) και το ESI (Electrospray Ionization). Στην τεχνική ιονισμού MALDI ένα λέιζερ χρησιμοποιείται για τον ιονισμό και την εξάτμιση μικρής ποσότητας δείγματος, το οποίο μετά στη συνέχεια αναρροφάται για ανάλυση από το φασματόμετρο μάζας (*Calabrese, Barbara 2018*). Στην τεχνική ιονισμού ESI το υγρό προς ανάλυση, διέρχεται από τη βελόνα ηλεκτροψεκασμού στην οποία εφαρμόζεται υψηλή διαφορά δυναμικού, με αποτέλεσμα το υγρό να ιονίζεται, να φορτίζεται θετικά, και να εξέρχεται από τη βελόνα, σε περιβάλλον με ατμοσφαιρική πίεση, με τη μορφή πολύ μικρών φορτισμένων σταγονιδίων (*Wilm et al., 2011; Mishra et al., 2017*). Τα πολύ μικρά φορτισμένα σταγονίδια έπειτα εισάγονται στο χώρο μεταξύ της βελόνας και του φασματομέτρου. Εκεί λαμβάνει χώρα η εξάτμιση του διαλύτη και η παραγωγή ακόμα μικρότερων σωματιδίων, τα οποία έπειτα εισάγονται στο φασματόμετρο μάζας προς περαιτέρω ανάλυση (*Wilm, 2011*). Το ESI είναι μία τεχνική μαλακού ιονισμού, δηλαδή στην διαδικασία ιονισμού οι ενώσεις παρουσιάζουν ελάχιστο ή καθόλου θρυμματισμό και ελάχιστη ενέργεια συγκρατείται από τον αναλυόμενη ουσία κατά το σχηματισμό του ιόντος (*Vazquez-Roig et al., 2011*).



Εικόνα 1-8: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) (Πηγή:https://www.researchgate.net/publication/225050758_Electrospray_Ionization_Mass_Spectrometry_A_Technique_to_Access_the_Information_beyond_the_Molecular_Weight_of_the_Analyte).

Ο αναλυτής μάζας ή το φασματόμετρο που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία είναι η τρισδιάστατη ή τετραπολική παγίδα ιόντων (Quadrupole Ion Trap-3D, QIT-3D). Η τρισδιάστατη παγίδα ιόντων αποτελείται από τρία ηλεκτρόδια, δύο πλευρικό ηλεκτρόδια άκρου και ένα ηλεκτρόδιο δακτυλίου, το οποίο βρίσκεται ανάμεσα τους (*Hocart et al., 2009; Amoresano et al., 2021).* Αυτά τα τρία ηλεκτρόδια μαζί σχηματίζουν μία κοιλότητα στην οποία καθίσταται δυνατή η παγίδευση και η ανάλυση των ιόντων με τη δημιουργία δυναμικών ηλεκτρικών πεδίων (*Thomas,2018*). Η τετραπολική παγίδα ιόντων λειτουργεί σε υψηλές πιέσεις και με αέριο ήλιο, το οποίο βοηθά στη διατήρηση της τροχιάς των ιόντων και στην αποφυγή της μεταξύ τους σύγκρουσης (Hocart et al., 2009). Αρχικά τα ιόντα αποθηκεύονται μέσα στην παγίδα ιόντων μεταξύ των τριών ηλεκτροδίων, έχοντας σταθερές διαδρομές (*Amoresano et al., 2021*).Όταν υπάρξει κάποια μεταβολή στην τάση ή στην ραδιοσυχνότητα, τα ιόντα εκτινάσσονται και παγιδεύονται με βάση τα διαφορετικά m/z τους (*Thomas, 2018*). Το ένα υπερβολικό ηλεκτρόδιο άκρου έχει μόνο ένα άνοιγμα μέσω του οποίου μπορούν να περάσουν τα ιόντα για να εισέλθουν στην παγίδα ιόντων, ενώ το άλλο υπερβολικό ηλεκτρόδιο άκρου έχει πολλά ανοίγματα προκειμένου τα ιόντα τα οποία εκτινάσσονται να περνούν στον ανιχνευτή (*March, 2009*). Για την λήψη των φασμάτων μάζας, γίνεται συνεχής αλλαγή των δυναμικών τάσης ή των ραδιοσυχνοτήτων για την εξαγωγή ιόντων διαδοχικών αναλογιών m/z από την παγίδα ιόντων και διαδοχικής ανίχνευσης τους από τον ανιχνευτή (*Amoresano et al. 2021*).



Εικόνα 1-9:Τετραπολικός αναλυτής μάζας παγίδας ιόντων.
(Πηγή:https://www.researchgate.net/publication/236737006_Mass_spectrometry_and_hyphenated_instruments_in_food_analysis)

1.3.3 Υπολογιστικά στάδια

1.3.3.1 Ταυτοποίηση και Ποσοτικοποίηση

Η ταυτοποίηση των κορυφών είναι το πρώτο βήμα για την ανάκτηση του μεταβολικού προφίλ. Για την ταυτοποίηση των κορυφών των μεταβολιτών είναι αναγκαία η ύπαρξη ειδικών και επικυρωμένων βιβλιοθηκών που διαθέτουν πληροφορίες για το συνδυασμό του χρόνου κατακράτησης των ουσιών του δείγματος με το φάσμα μάζας του, χαρακτηριστικά διαφορετικά για κάθε ουσία. Οι βιβλιοθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα διπλωματική εργασία είναι η εμπορική βιβλιοθήκη NIST και η εσωτερική βιβλιοθήκη φασμάτων του εργαστηρίου Μεταβολομικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας. Η εσωτερική βιβλιοθήκη του εργαστηρίου σε σύγκριση με την εμπορική βιβλιοθήκη NIST και των διαθέσιμων δημοσίων βιβλιοθηκών είναι η συνεχής συμπλήρωση κορυφών που έχουν ταυτοποιηθεί με βάση την ανάλυση πρότυπων ενώσεων και κορυφών από προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο σε συγκεκριμένες συνθήκες.

Η ποσοτικοποίηση αναφέρεται στον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών. Πραγματοποιείται κυρίως στη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση για την εύρεση της συγκέντρωσης των μεταβολιτών σε ένα βιολογικό δείγμα συνυπολογίζοντας και τις κορυφές θραυσμάτων τους ή παραγώγων τους, παραδείγματος χάριν μετά από σύνδεση τους με κοινά ιόντα, όπως τα κατιόντα νατρίου, που είναι παρόντα στο σύστημα. Η ποσοτικοποίηση μπορεί να καθορίσει την συγκέντρωση των μεταβολιτών ανεξαρτήτως του πειραματικού πλαισίου (*Lu, Wenyun et al., 2008*). Για την επίτευξη της ποσοτικοποίησης κατασκευάζονται πρότυπες καμπύλες για τους μεταβολίτες ((*Lu, Wenyun et al., 2008).* Οι πρότυπες καμπύλες δημιουργούνται συσχετίζοντας τα κανονικοποιημένα (στο εσωτερικό πρότυπο) εμβαδά των κορυφών (Relative Peak Areas-RPA) με τη συγκέντρωσης του μεταβολίτη. Όταν η κατασκευή πρότυπης καμπύλης δεν είναι δυνατή, η ποσοτικοποίηση μπορεί να επιτευχθεί με σύγκριση του εμβαδού κορυφής του μορίου με το εμβαδό κορυφής του εσωτερικού προτύπου (γνωστής συγκέντρωσης) απευθείας.

1.3.3.2 Κανονικοποίηση και φιλτράρισμα

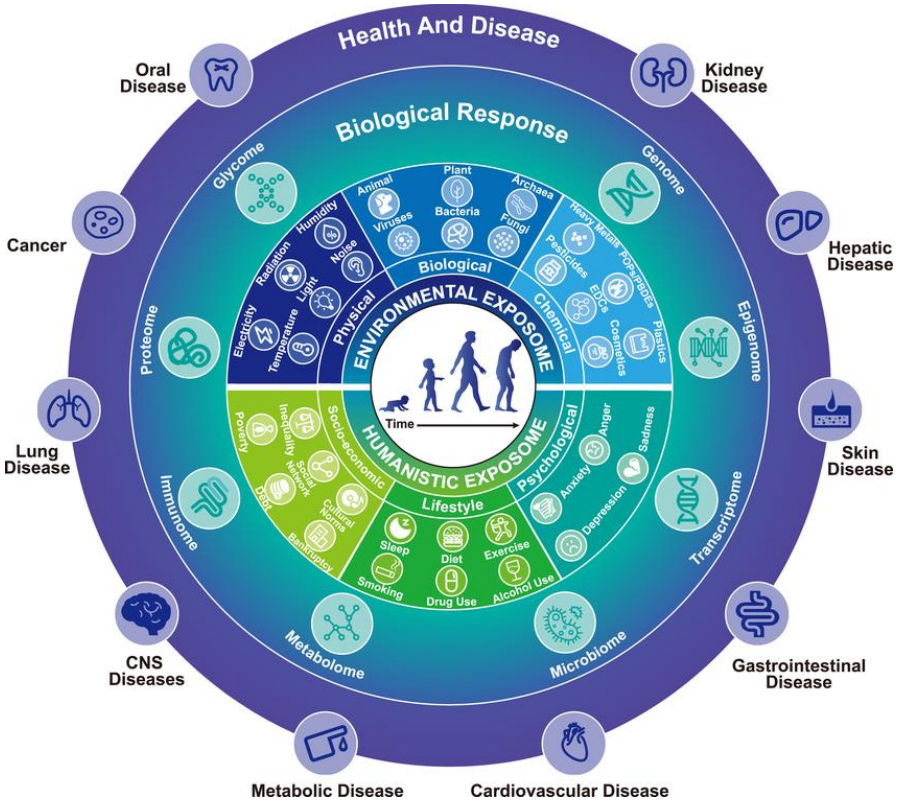
Η Μεταβολομική, όπως και όλοι οι υπόλοιποι κλάδοι της ομικής, χαρακτηρίζεται από πολύπλοκα σύνολα δεδομένων, με τρομερές αναλυτικές προκλήσεις στην αφαίρεση των μη βιολογικών παραγόντων που επηρεάζουν τις χρωματογραφικές κορυφές (*Boysen et al., 2018*). Για την αφαίρεση των σφαλμάτων που επηρεάζουν τις χρωματογραφικές κορυφές και την ανάκτηση συγκρίσιμων πειραματικών δεδομένων, απαιτείται η διαδικασία της κανονικοποίησης. Η κανονικοποίηση στην παρούσα διπλωματική επιτυγχάνεται μέσω των εσωτερικών προτύπων, τα οποία χρησιμοποιούνται ως ουσίες αναφοράς σε ένα μίγμα. Τα εσωτερικά πρότυπα, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι ουσίες οι οποίες δεν αλληλεπιδρούν με τις ουσίες που περιέχει ένα βιολογικό δείγμα, προστίθενται στην ίδια ποσότητα σε όλα τα δείγματα προς ανάλυση και υφίστανται τις ίδιες μεταβολές στη διαδικασία της εκχύλισης των δειγμάτων. Η κανονικοποίηση με τη χρήση εσωτερικών προτύπων πραγματοποιείται μέσω της διαίρεσης του εμβαδού της κορυφής του μεταβολίτη με το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου και δίνει ως αποτέλεσμα μία αναλογία, η οποία είναι συγκρίσιμη μεταξύ όλων των πειραματικών αποτελεσμάτων. Αυτή η αναλογία ονομάζεται σχετική περιοχή κορυφής (Relative Ppeak Area, RPA). Η συνέπεια της αναλυτικής διαδικασίας της απόκτησης των μεταβολικών προφίλ επαληθεύεται με βάση τη σύγκριση των RPAs στα πρότυπα δείγματα αναφοράς από τα οποία δημιουργήθηκαν και οι πρότυπες καμπύλες. Όσα προφίλ δεν συμβαδίζουν με τα RPAs των πρότυπων καμπυλών ή όσες κορυφές των μεταβολιτών βρίσκονται στα όρια ανίχνευσης και επομένως δεν μπορούν να ποσοτικοποιηθούν, φιλτράρονται και απορρίπτονται, διότι δεν είναι αξιόπιστα αποτελέσματα.

1.4 ΕΚΘΕΤΩΜΑ

Παρά τις προσπάθειες που έχουν γίνει για την σύνδεση των ασθενειών με την έκθεση σε διάφορες χημικές ουσίες, οι ερευνητικές προσεγγίσεις αποτυγχάνουν να αντιμετωπίσουν τη χημική πολυπλοκότητα του κόσμου. Έτσι έγινε επιτακτική η ανάγκη για την εύρεση ενός τρόπου συστηματικής και αναγνωστικής προσέγγισης για τον αυξανόμενο αριθμό των χημικών ουσιών που μολύνουν το περιβάλλον. Το εκθέτωμα αποτελείται από κάθε έκθεση στην οποία ένα άτομο έχει υποβληθεί από τη στιγμή της σύλληψης του μέχρι τη στιγμή του θανάτου του, προσπαθώντας να συλλάβει το εύρος των εκθέσεων του ανθρώπου σε συνθετικές χημικές ουσίες, διατροφικά συστατικά, ψυχοκοινωνικά στρεσογόνους παράγοντες και φυσικούς παράγοντες, καθώς και τις βιολογικές αποκρίσεις των ατόμων σε αυτές (*Vermeulen et al. 2020; Wild et al. 2012*).

Το πεδίο εφαρμογής του εκθέματως έχει επεκταθεί σε τρεις μεγάλες κατηγορίες οι οποίες συμπεριλαμβάνουν όλες τις εκθέσεις στις οποίες έχει υποβληθεί ο άνθρωπος. Η πρώτη κατηγορία είναι οι εσωτερικές εκθέσεις που περιλαμβάνουν όλες τις βιολογικές αποκρίσεις του ατόμου στα εξωτερικά ερεθίσματα. Η δεύτερη κατηγορία είναι οι ειδικές εξωτερικές εκθέσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν τις περιβαλλοντικές εκθέσεις και η τρίτη κατηγορία είναι οι γενικές εξωτερικές εκθέσεις που περιλαμβάνουν το κοινωνικό, πολιτιστικό και οικολογικό πλαίσιο της ζωής ενός ατόμου. Όλες οι κατηγορίες μαζί καλύπτουν πλήρως τις σχετικές βιολογικές αποκρίσεις και τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις του εκθέματως (*Wei et al. 2022; Hyötyläinen, Tuulia 2021).*

Οι έρευνες μέχρι το 2020 είχαν επικεντρωθεί κυρίως σε επιδημιολογικές μελέτες για την θνησιμότητα, την επιδείνωση των ασθενειών και την νοσηλεία, τα οποία έχουν δύσκολα αποτελέσματα. Ωστόσο, η κατανόηση των εσωτερικών βιοδεικτών έκθεσης και απόκρισης μέσω της τεχνολογίας των omics, μπορεί να διευκολύνει τις έρευνες που σχετίζονται με τις περιβαλλοντικές εκθέσεις (*Vineis et al. 2020).*



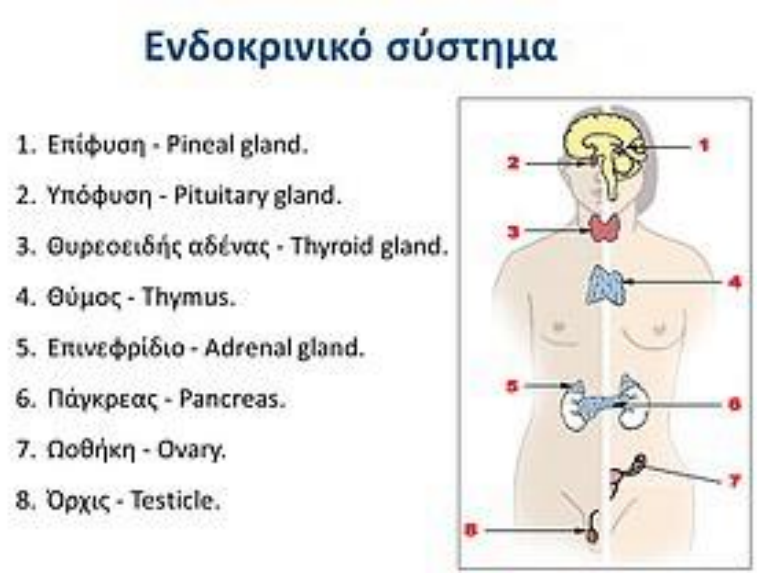
Εικόνα 1-10: Η απεικόνιση του εκθέματος (Πηγή: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/imt2.50).

Η μεταβολομική χρησιμοποιείται τακτικά ως χρήσιμο εργαλείο για την παροχή πληροφορίων και έχει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο των επιδημιολογικών ερευνών. Οι εξωγενείς χημικές ουσίες που απορροφώνται από τον άνθρωπο, φάρμακα, ενώσεις που υπάρχουν στη διατροφή, εμπορικά προϊόντα και περιβαλλοντικές χημικές ουσίες, είναι ανιχνεύσιμες στον μεταβολισμό, είτε ως ενώσεις, είτε ως προϊόντα που δημιουργήθηκαν λόγω του μεταβολισμού αυτών στον ανθρώπινο οργανισμό. Η ανάλυση του μεταβολικού προφίλ παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τους βιοδείκτες, οι οποίοι μπορούν να συμβάλουν στην εκτίμηση του κινδύνου έκθεσης, την πρόληψη και τη διαχείριση ασθενειών (*Walker et al. 2019; Cai, Y. et al. 2020*). Ο χαρακτηρισμός των ενδογενών και εξωγενών μεταβολιτών σε δείγματα από αίμα, ούρα, κόπρανα, εγκεφαλονωτιαίου υγρού και άλλων βιολογικών δειγμάτων, έχει ως αποτέλεσμα την παροχή πληροφοριών για υποκρύπτουσες νόσους. Σε σχετικά πρόσφατες μελέτες (2017-2019) αξιολογήθηκαν οι εκθέσεις εμβρύου- μητέρας, μέσω του μεταβολικού χαρακτηρισμού του αμνιακού υγρού, του αίματος του ομφάλιου λώρου και των μητρικών/ παιδικών ούρων ή δειγμάτων ορού, οι οποίες εκθέσεις συνδέθηκαν με αναπτυξιακά προβλήματα στο έμβρυο (*Walker et al. 2019*).

1.5 ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ

Το ενδοκρινικό σύστημα αποτελεί τον κυριότερο ρυθμιστικό μηχανισμό, ο οποίος ελέγχει διάφορες βασικές λειτουργείες του ανθρώπινου ή ζωικού οργανισμού συνδυαστικά με το νευρικό και το ανοσοποιητικό σύστημα. Οι ουσίες που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος ως απάντηση σε συγκεκριμένα ερεθίσματα και παράγονται από ενδοκρινικούς αδένες (επίφυση, υπόφυση, θυροειδής, θύμος, πάγκρεας, επινεφρίδια, όρχεις και ωαγωγοί) ονομάζονται ορμόνες και θα μπορούσαν να ονομασθούν αγγελιοφόροι του ενδοκρινικού συστήματος. Αφού εκκριθούν στο αίμα οι

ορμόνες μεταφέρονται στα κύτταρα-στόχους τους, όπου πυροδοτούν πολλές βιοχημικές αντιδράσεις, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της λειτουργίας ή της δραστηριότητας του κυττάρου-στόχου τους (*Lintelmann et al. 2003; Hiller-Sturmhöfel et al. 1998*). Η έκκριση των ορμονών αφορά την παραγωγή ενέργειας, την χρήση και αποθήκευση ενέργειας, την αναπαραγωγή και ανάπτυξη των εμβρύων και τη σύνθεση των ηλεκτρολυτών των σωματικών υγρών (*Lintelmann et al. 2003; Caserta et al. 2007*).



Εικόνα 1-11: Ενδοκρινικό σύστημα (Πηγή: https://hypnotherapy4u.gr/?p=13716)

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες είναι εξωγενείς χημικές ουσίες, οι οποίες διαταράσσουν την ομαλή λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος των ανθρώπων και των ζώων ή όπως έχει οριστεί από την Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ, είναι «παράγοντες που παρεμβαίνουν στην σύνθεση, έκκριση, μεταφορά, δέσμευση ή αποβολή φυσικών ορμονών στο σώμα που είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της ομοιόστασης, της αναπαραγωγής, της ανάπτυξης και/ή της συμπεριφοράς (*Kavlock et al., 1996; Monneret 2017; Kabir et al. 2015; E. KOUSTA 2012*).

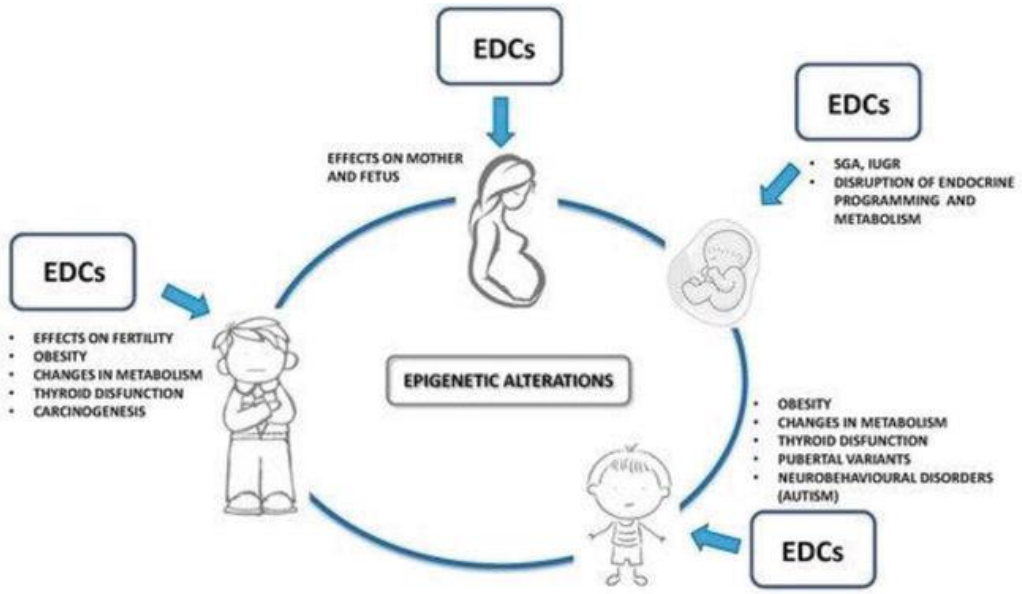
Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: τις φυσικές χημικές ουσίες και τις συνθετικές χημικές ουσίες. Οι φυσικές χημικές ουσίες βρίσκονται σε τροφές, τόσο στις ανθρώπινες όσο και στις ζωικές και οι συνθετικές χημικές ουσίες βρίσκονται σε πλαστικά, φυτοφάρμακα, πλαστικοποιητές, λιπαντικά και βιομηχανικούς διαλύτες, καθώς και σε ορισμένους φαρμακευτικούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα μερικά παραδείγματα εύρεσης ενδοκρινικών διαταρακτών είναι η διασφαινόλη Α, οι φθαλικές ενώσεις, τα οποία χρησιμοποιούνται ως μέρος της κατασκευής μερικών πλαστικών, σε καλλυντικά, προϊόντα προσωπικές περιποίησης και καλλυντικά , οι πολυβρώμιωμένοι διφαινυλαιθέρες τα οποία χρησιμοποιούνται ως επιβραδυντές φλόγας σε διάφορες εφαρμογές, τα parabens τα οποία χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά και οι οργανοχλωρικές και οι οργανοφοσφωρικές ενώσεις οι οποίες είναι παρούσες στα φυτοφάρμακα (*Kabir et al. 2015; Monneret 2017*). Εισέρχονται με διάφορους τρόπους στον ανθρώπινο οργανισμό, με κατανάλωση τροφής ή/και νερού, με επαφή τους με το ανθρώπινο δέρμα ή την εισπνοή τους, με χρήση της ενδοφλέβιας οδού, όπως οι φθαλικές ενώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται στην ενδοφλέβια σωλήνωση και βιολογικά με τη μεταφορά από τη μητέρα στο έμβρυο, μέσω του πλακούντα ή του μητρικού γάλακτος (*Kabir et al. 2015*).

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες αποτελούν απειλή για την ανθρώπινη υγεία, συμβάλλοντας σε ποικιλία ασθενειών και δυσλειτουργιών του ανθρωπίνου οργανισμού. Ο ενδοκρινικός διαταράκτης αν υπάρχει στον οργανισμό από μόνος του είναι πιθανόν να είναι αβλαβής, αν ωστόσο συνδεθεί με

άλλους ενδοκρινικούς διαταράκτες μπορεί να προκαλέσει επικίνδυνα αποτελέσματα. Η έκθεση σε ενδοκρινικούς διαταράκτες δεν είναι μεμονωμένη και συμβαίνει σε όλη τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου, από τη στιγμή της σύλληψης του και συνεχίζεται μέχρι και το θάνατο του, προκαλώντας πολυάριθμα προβλήματα στον άνθρωπο. Μερικά προβλήματα που προκαλεί είναι (*Yilmaz et al. 2020; M. Heshmati H 2021*):

- Η παχυσαρκία, αφού επηρεάζει τη ρύθμιση του λιπώδους ιστού και μειώνει τον μεταβολικό ρυθμό.
- Η ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 1 και διαβήτη τύπου 2, όπου η προγεννητική και πρώιμη έκθεση του ανθρώπου σε ενδοκρινικού διαταράκτες έχει συνδεθεί με τη μεταβολή των επιπέδων έκκρισης της ινσουλίνης.
- Η ανάπτυξη διαφορετικών καρκίνων, όπως είναι ο καρκίνος της μήτρας, του μαστού, του καρκίνου του δέρματος και του θυρεοειδούς.
- Η αυξημένη επίπτωση σε καρδιαγγειακές, νευρολογικές, ηπατικές, νεφρικές, αναπνευστικές, δερματικές και ανοσολογικές διαταραχές.
- Η πρόκληση διαφόρων δερματικών διαταραχών όπως αλλεργικές δερματίτιδες εξ' επαφής , υπερμελάγχρωση, γήρανση και καρκίνο.
- Ανδρικές και γυναικείες αναπαραγωγικές διαταραχές.

Ένα από τα προβλήματα που έχουν προκύψει λόγω των ενδοκρινικών διαταρακτών είναι οι γυναικείες και ανδρικές αναπαραγωγικές διαταραχές. Έχει παρατηρηθεί ότι οι ενδοκρινικοί διαταράκτες έχουν την δυνατότητα να παρεμβαίνουν στο αναπαραγωγικό σύστημα τόσο των γυναικών προκαλώντας ενδομητρίωση, πολυκυστικές ωοθήκες, στειρότητα, υπογονιμότητα, όσο και των ανδρών προκαλώντας μείωση του αριθμού του σπερματοζωαρίου, μείωση της κινητικότητας και ανώμαλη μορφολογία του σπέρματος, καθώς και παρέμβαση στον προσδιορισμό του αρσενικού φύλου και της σεξουαλικής διαφοροποίησης, όρος που χρησιμοποιείται για την περιγραφή του σχηματισμού των ωοθηκών ή των όρχεων (*Yilmaz et al. 2020, Sharpe et al. 2006*).



Εικόνα 1-12: Επιπτώσεις των ενδοκρινικών διαταρακτών (EDCs) στον ανθρώπινο οργανισμό (Πηγή: https://www.intechopen.com/chapters/74214).

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες υπάρχουν σε πληθώρα φυσικών και χημικών ουσιών, όπου μεταξύ των χημικών ουσιών βρίσκονται και τα φυτοφάρμακα. Η κύρια χρησιμότητα των φυτοφαρμάκων είναι να σκοτώνουν ή να απωθούν τα ανεπιθύμητα τρωκτικά, τους μύκητες, τα έντομα και τα «ζιζάνια» που προκαλούν προβλήματα στη γεωργία. Ωστόσο έχει βρεθεί ότι πολλά φυτοφάρμακα είναι επιβλαβή τόσο για το περιβάλλον, όσο και για τον άνθρωπο (*Mnif. Et al. 2011*). Ανάμεσα στις επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων στην ανθρώπινη υγεία ανήκει και η επίπτωση των φυτοφαρμάκων στην ανάπτυξη των γιων εγκύων γυναικών. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 113 ζευγάρια μητέρας-γιου, οι οποίες εκτίθενται καθημερινά σε φυτοφάρμακα, τα αγόρια εμφάνισαν μειωμένο μήκους πέους, όγκο όρχεων και αυξημένο επιπολασμό της κρυψορχίας, τα οποία οφείλονται στις ορμόνες που διαφοροποιούν το φύλο του εμβρύου (*Helle R. Andersen et al. 2008*).

1.6 ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

Τα φυτοφάρμακα είναι ενώσεις, φυσικές ή συνθετικές, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη, την προστασία και τη διατήρηση των φυτών μέσω της απώθησης, του ελέγχου ή τις εξαλείψεις των παρασίτων, οργανισμών που αποτελούν απειλή για τον άνθρωπο ή τις δραστηριότητές του (*Valette et al. 2018; Sheldon et al. 2009; Luquet et al. 2023*). Ανάλογα με τον οργανισμό των οποίων επιδιώκουν να εξαλείψουν τα φυτοφάρμακα χωρίζονται στις εξής κατηγορίες: εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, φυτοφάρμακα για τα τρωκτικά και τα ακάρεα, φυτοφάρμακα για τα μαλάκια (π.χ. σαλιγκάρια) και νηματοκτόνα για τους νηματώδεις σκώληκες (*Ballantyne, B et al. 2003*). Επιπλέον, τα φυτοφάρμακα χωρίζονται σε 3 μεγάλες κατηγορίες, μεταξύ άλλων, βάσει της δομής τους: στα οργανοχλωρικά, οργανοφοσφωρικά και καρβαμιδικά φυτοφάρμακα.

Τα οργανοχλωρικά φυτοφάρμακα, παράγωγα χλωριωμένων υδρογονανθράκων, τα οποία χρησιμοποιούνταν κατά κόρον παλαιότερα, έχουν αποσυρθεί σε μεγάλο βαθμό λόγω των επιπτώσεων που είχαν στην ανθρώπινη υγεία. Το πιο γνωστό οργανοχλωρικό φυτοφάρμακο είναι το DDT του οποίου η ανεξέλεγκτη χρήση έθεσε πολλά ζητήματα τόσο στο περιβάλλον όσο και στην ανθρώπινη υγεία. Παρά την απαγόρευση του, το DDT πιστεύεται ότι μπορεί να εντοπιστεί σε κάθε ζωντανό οργανισμό. Επιπροσθέτως, τα οργανοχλωρικα φυτοφάρμακα έχουν συσχετιστεί με ενδοκρινικές διαταραχές, επιδράσεις στην εμβρυική ανάπτυξη, των μεταβολισμό των λιπιδίων, καθώς και ηπατικές αλλοιώσεις (*Jawale CA et al. 2017; Maipas et al. 2016; Jayaraj R. et al. 2016*).

Τα οργανοφοσφωρικά φυτοφάρμακα, εστέρες φωσφορικού οξέος, είναι κυρίως εντομοκτόνα τα οποία προωθήθηκαν ως πιο οικολογική εναλλακτική λύση από τα οργανοχλωρικά και επιδρούν στο νευρικό σύστημα, επηρεάζοντας το ένζυμο που ρυθμίζει την ακετυλοχολίνη, ενός νευροδιαβιβαστή. Είναι πολύ δηλητηριώδη και δεν είναι συνήθως ανθεκτικά στο περιβάλλον. Πιθανές σχέσεις έχουν βρεθεί μεταξύ των οργανοφοσφορικών φυτοφαρμάκων και των αρνητικών επιπτώσεων στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα , καθώς και της μειωμένης διάρκειας κύησης και νευρολογικών προβλημάτων που εμφανίζονται στα παιδιά (*Jawale CA et al. 2017; Maipas et al. 2016; Jayaraj R. et al. 2016*).

Τα καρβαμιδικά φυτοφάρμακα, τα οποία λειτουργούν με τον ίδιο τρόπο με τα οργανοφοσφωρικά, είναι οργανικές ενώσεις που προέρχονται από το καρβαμικό οξύ (NH_2COOH) και έχουν, επίσης, συσχετιστεί με τη λειτουργία τους ως ενδοκρινικοί διαταράκτες με πιθανές αναπαραγωγικές διαταραχές, απόπτωσης ή/και νεκρώσεις σε ανθρώπινα κύτταρα το ανοσοποιητικού συστήματος (*Jawale CA et al. 2017; Maipas et al. 2016; Jayaraj R. et al. 2016*).

Άλλες κατηγορίες φυτοφαρμάκων είναι τα πυρεθροειδή φυτοφάρμακα, τα οποία είναι μία συνθετική εκδοχή του φυσικού φυτοφαρμάκου πυρεθρίνη, το οποίο βρίσκεται στα χρυσάνθεμα, τα νεονικοτινοειδή φυτοφάρμακα, τα οποία μοιάζουν χημικά με τη νικοτίνη, οι φαινυλαμίδες, οι οποίες παρουσιάζουν ισχυρή αντιμυκητιασική δράση, τα φαινοξυαλκονικά, τα οποία είναι μία ευρέως χρη-

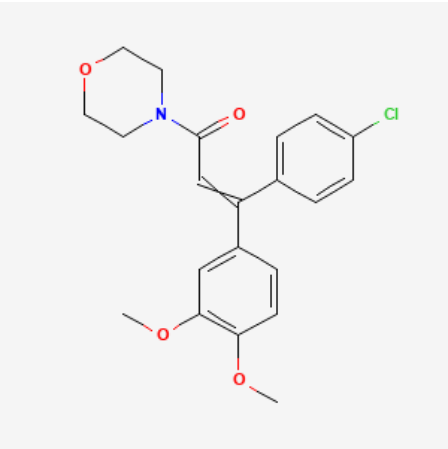
σιμοποιούμενη οικογένεια ζιζανιοκτόνων, οι τριαζίνες, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των ζιζανιοκτόνων φυτοφαρμάκων και πολλές ακόμη (*Jawale CA et al. 2017; Maipas et al. 2016; Jayaraj R. et al. 2016*).

Τα φυτοφάρμακα συμβάλουν στην σημερινή κοινωνία για την κάλυψη των αναγκών του πληθυσμού λόγω του όλου και αυξανόμενου αριθμού του. Εντούτοις, τα φυτοφάρμακα είναι τοξικά τόσο για το περιβάλλον, όσο και για τον άνθρωπο. Τα άτομα που επηρεάζονται άμεσα από τα φυτοφάρμακα είναι οι άνθρωποι που εργάζονται σε οργανισμούς παραγωγής φυτοφαρμάκων, χωράφια, θερμοκήπια και οι εξολοθρευτές οικιακών παράσιτων, όπου είναι πιο πιθανό να εκδηλώσουν αναπαραγωγικά σύνδρομα, νευρολογικές και αναπνευστικές διαταραχές, καρκίνο, σακχαρώδη διαβήτη και οξειδωτικό στρες(*Rani et al. 2021; Maipas et al. 2016*). Αναφορικά με το περιβάλλον, τα φυτοφάρμακα μπορούν να μολύνουν το νερό, το χορτάρι, το έδαφος και την χλωρίδα της περιοχής. Δρουν για να σκοτώσουν παρασιτοκτόνα, αλλά μπορεί να είναι δηλητηριώδη για άλλα ζώα, όπως πουλιά, ψάρια, επιθυμητά έντομα και βλάστηση που δεν αποτελεί στόχο. Η παραγωγή καινούργιων ασφαλέστερων φυτοφαρμάκων είναι αναγκαία (*Rani et al. 2021; Maipas et al. 2016*).

1.6.1 Dimento

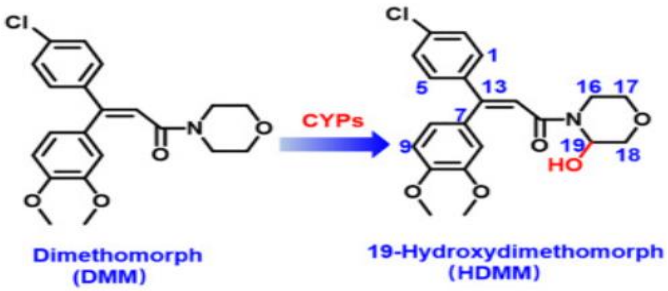
Το Dimento είναι ένα τοπικά διασυστηματικό μυκητοκτόνο, το οποίο ανήκει στην ομάδα μορφολινών με προληπτική, θεραπευτική και αντισπορογόνο δράση κατά του περονόσπορου, μύκητα που προκαλεί τεράστιες απώλειες στην παραγωγή, κυρίως στις αγγουροκαλιέργειες, παγκοσμίως (*L. M. Quesada-Ocampo et al. 2012; Ojiambo PS et al. 2010*). Απορροφάται ταχύτατα, εντός 1-2 ωρών, από το φύλλο και έχει τοπικά διασυστηματική και διελασματική κίνηση, δηλαδή το φυτοφάρμακο προσλαμβάνεται από τα φύλλα και μεταφέρεται στα κοντινότερα μέρη του φυτού από το σημείου ψεκασμού (*Simon-Delso et al. 2015*). Δρα προκαλώντας τον θάνατο του παθογόνου με την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος του και χρησιμοποιείται για την προστασία των αμπελιών και της τομάτας. Το φυτοφάρμακο αυτό είναι τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς με μακροχρόνιες επιπτώσεις, μπορεί να προκαλέσει αλλεργικές αντιδράσεις και να βλάψει τη γονιμότητα. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το Dimento που διατίθεται στο εμπόριο, σε μορφή συμπυκνωμένου εναιωρήματος από την εταιρεία ADAMA ΕΛΛΑΣ.

Το Dimento περιέχει μία κύρια δραστική ουσία. Η δραστική ουσία του φυτοφαρμάκου είναι η Dimethomorph, η οποία είναι ένα μίγμα από E- και Z- ισομερή με αναλογία 1:1, από τα οποία μόνο τα Z- ισομερή έχουν μυκητοκτόνα δράση (*Team E.W., Chebi*). Η Dimethomorph με μοριακό τύπο $C_{21}H_{22}ClNO_4$, έχει μοριακό βάρος ίσο με 387.9 g/mol, συγκέντρωση 50% w/v, δηλαδή 54 mg/ml, και ο συντακτικός τύπος της Dimethomorph παρουσιάζεται παρακάτω (National Center for Biotechnology Information). Το Dimento περιέχει, επίσης, την ουσία 1,2-Benzisothiazoolin-3-one σε συγκέντρωση 0.01-0.03 w/w με μοριακό βάρος 151.19 g/mol , η οποία είναι και υπεύθυνη για την εμφάνιση αλλεργικών αντιδράσεων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (National Center for Biotechnology Information). Η Dimethomorph έχει κατηγορηθεί για την πρόκληση ενδοκρινικών διαταραχών (*Archer, E. et al. 2015*).



Εικόνα 1-13: Η χημική δομή της Dimethomorph (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethomorph).

Η Dimethomorph παρουσιάζει έναν κύριο μεταβολίτη, τον 19-Hydrocydimethomorph (HDMM) (*Wang et al. 2020*). Ο μεταβολίτης αυτός παρήχθη σε ηπατικά μικροσώματα αρουραίων, ποντικιών, μικρών χοίρων, σκύλων, κουνελιών, ινδικών χοιριδίων, πιθήκων, βοοειδών και ανθρώπων, με δείγματα να προέρχονται από την Κίνα και την Αμερική (*Wang et al. 2020*).



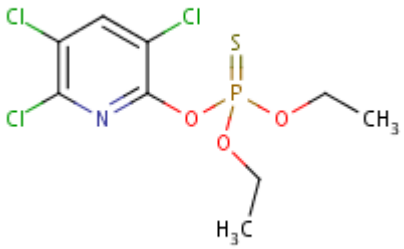
Εικόνα 1-14: Ο μεταβολίτης της Dimethomorph, 19-Hydroxydimethomorph (Πηγή: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969722006775#s0080).

Η Dimethomorph αναγνωρίζεται ως ενδοκρινικός διαταράκτης σύμφωνα με την πληθώρα στοιχείων που έχουν βρεθεί. Μελέτη αναφέρει πως η Dimethomorph άσκησε αντιανδρογόνο δράση, αφού μείωσε την ανταπόκριση των ανδρογόνων που αναμένονταν από την παρουσία του ανδρογόνου διυδροτεστοστερόνης (*Archer, E. et al. 2015).* Σε μια ακόμη μελέτη, η Επιτροπή Εκτίμησης Κινδύνου του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων αναφέρθηκε στις δυσμενείς επιδράσεις που έχει το φυτοφάρμακο στα ανδρικά αναπαραγωγικά όργανα και διερευνήθηκαν τα αποτελέσματα στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρουραίων, στα οποία έγινε δια του στόματος χορήγηση του φυτοφαρμάκου, με αποτελέσματα τη μειωμένη διάρκεια εγκυμοσύνης, καθυστερημένη εφηβεία στους άρρενες, μειωμένη ανάπτυξη και μείωση της ανωγεννητικής απόστασης, της απόστασης μεταξύ του πρωκτού και των γεννητικών οργάνων (*Alvarez et al. 2023*). Αποδείχθηκε, επίσης, ότι η Dimethomorph οδηγεί σε θηλυκοποίηση ή ατελή ανάπτυξη των πρωτογενών και βοηθητικών ανδρικών οργάνων, καθώς και μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας (*Choi, J. et al. 2024*). Η Dimethomorph πληροί τα κριτήρια μη έγκρισης του, όπως ορίζονται στο παράρτημα ΙΙ σημεία 3.6.5 και 3.8.2 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1107/2009, όπως τροποποιήθηκε από τον κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 2018/605 σχετικά με τη δυνατότητα ενδοκρινικής διαταραχής (*Alvarez et al. 2023*).

1.6.2 Dursban

Το Dursban είναι ένα οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο, το οποίο χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των μυζητικών (π.χ. αφίδες) και μασητικών (π.χ. κάμπια) εντόμων, μέσω της εφαρμογής του σε όλη την επιφάνεια των φύλλων του φυτού (*War, A.R. et al. 2013; Christensen, K. et al. 2009*). Είναι υδατοδιαλυτό γαλακτωματοποιήσιμο συμπύκνωμα και χρησιμοποιείται για την προστασία των εσπεριδοειδών, πυρηνόκαρπων, λαχανικών υπαίθρου, καθώς και σε βαμβάκι και πατάτες. Στην παρούσα μελέτη το χρησιμοποιείται το εμπορικά διαθέσιμο φυτοφάρμακο από την εταιρία Dow Agrosciences, USA.

Η δραστική ουσία του φυτοφαρμάκου είναι ο Chlorpyrifos , μοριακού τύπου $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$, μοριακής μάζας 350.59 g/mol και συγκέντρωσης 45% w/v, το οποίο αντιστοιχεί σε 450 mg/ml (*Christensen, K. et al. 2009*).



Εικόνα 1-15: Χημική δομή του Chlorpyrifos (Πηγή: https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:34631)

Το Dursban, επίσης, περιέχει και άλλες ουσίες σε συνολική συγκέντρωση 55.47% w/w. Αυτές οι ουσίες είναι:

- Διαλυτική νάφθα (πετρελαίου), ελαφριά αρωματική.
- 1,2,4-Τριμεθυλοβενζόλιο
- Βενζολοσουλφονικό οξύ, μονοC11-13-διακλαδισμένα αλκυλικά παράγωγα, άλατα ασβεστίου
- 1,3,5-Τριμεθυλοβενζόλιο
- Cumene
- Βαριά αρωματική νάφθα
- Υδρογονάνθρακες, C10, αρωματικά,
- Sulfotepp (O,O,O',O'-Τετραaιθυλοδιθειοδιφωσφορικό)
- Chlorpyrifos-Methyl

Ο τρόπος δράσης του Chlorpyrifos είναι μέσω της δράσης του στο νευρικό σύστημα των εντόμων, αναστέλλοντας το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (*Ubaid ur Rahman et al. 2021*). Ο Chlorpyrifos και άλλα οργανοφοσφωρικά φυτοφάρμακα παρεμβαίνουν στην σηματοδότηση από τον νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη που υπάρχει στις νευρομυϊκές συνδέσεις (*Ubaid ur Rahman 2021*).Ένας μεταβολίτης του Chlorpyrifos που ονομάζεται Chlorpyrifos -oxon, συνδέεται μόνιμα με το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση στη σύναψη και η προκύπτουσα συσσώρευση της ακετυλοχολίνης οδηγεί σε υπερδιέγερση των νευρικών κυττάρων, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε νευροτοξικότητα και τελικά θάνατο (*Ubaid ur Rahman et al. 2021; Christensen, K. et al. 2009; Flaskos, J. 2012*).

Οι άνθρωποι μπορούν να εκτεθούν στον Chlorpyrifos , είτε μέσω της κατανάλωσης φαγητού ή νερού, είτε μέσω εισπνοής, είτε μέσω της απορρόφησής του από τον οργανισμό. Ο Chlorpyrifos αφού έχει εισέλθει στον ανθρώπινο οργανισμό, μεταβολίζεται από τα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα και

το ανθρώπινο ήπαρ και σχηματίζονται οι μεταβολίτες 3,5,6-τριχλωρο-2-πυριδινόλη (TCP) και διαιθυλοθειοφωσφορικό οξύ (DETP) (*Choi et al. 2006*). Επίσης, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω σχηματίζεται ο μεταβολίτης Chlorpyrifos -oxon, που είναι ένα από τα πιο τοξικά ενδιάμεσα προϊόντα, αφού αναστέλλει την ακετυλοχολινεστεράση (*Choi et al. 2006*).

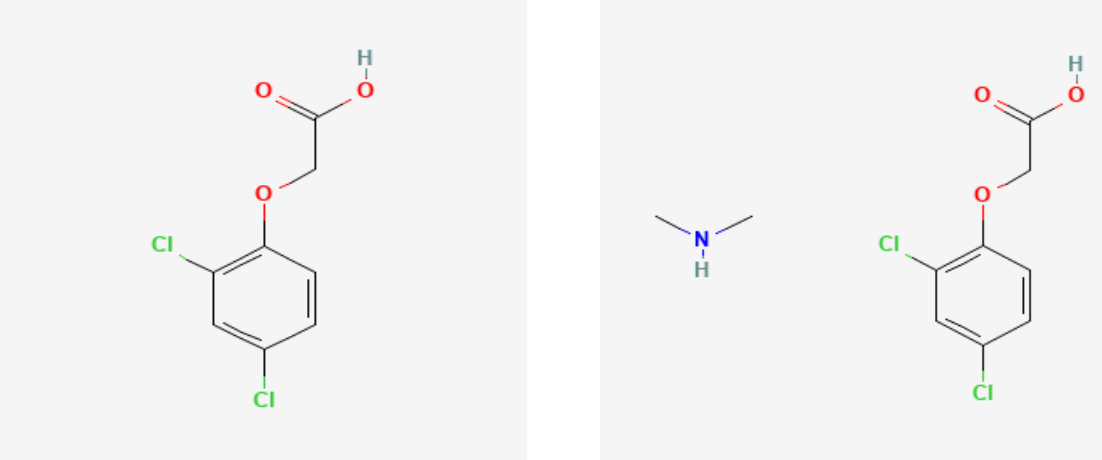
Η χρήση του Chlorpyrifos είχε σοβαρές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Η συσσώρευση του Chlorpyrifos πραγματοποιείται κυρίως στο λιπώδη ιστό και συσχετίζεται όλο και περισσότερο με ηπατική και ανοσολογική διαφοροποίηση, γονοτοξικότητα και εμβρυοτοξικότητα (*Ubaid ur Rahman et al. 2021*). Ακόμη σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε αναφέρθηκαν οι επιπτώσεις που έχει η έκθεση του Chlorpyrifos στα νεογέννητα, με την ελάττωση του βάρους τους και του μήκους του σώματος τους (*Whyatt RM et al. 2005*), ενώ σε δύο ακόμη μελέτες έγινε σύνδεση των παιδιών που είχαν εκτεθεί ως έμβρυα στον Chlorpyrifos με ψυχοκινητικές διαταραχές και γνωστικά ελλείμματα που σχετίζονται με τη μαθησιακή ικανότητα, την προσοχή, την μνήμη, και δομικών αλλοιώσεων στον εγκέφαλο (*Rauh V. et al. 2011; Rauh VA et al. 2012*).

Μελέτες έχουν διεξαχθεί που αναγνωρίζουν τον Chlorpyrifos ως ενδοκρινικό διαταράκτη. Η αναστολή του ενζύμου της ακετυλοχολίνης από τον chlorpyrifos, έχει ως αποτέλεσμα την συγκέντρωση της ακετυλοχολίνης στην συναπτική σχισμή, κάτι που σημαίνει αποτυχία μετάφρασης των ορμονικών ρυθμίσεων και κατά συνέπειά εξασθένιση της ενδοκρινικής ομοιόστασης στο σώμα (*Ubaid ur Rahman et al. 2021*). Ο Chlorpyrifos αναγνωρίστηκε ως ενδοκρινικός διαταράκτης στους ενήλικες, αφού παρενέβη στην έκκριση των φυσικών ορμονών, των οιστρογόνων ή/και των ανδρογόνων (Ventura et al. 2012). Η ενδοκρινική διαταραχή που προκαλείται από τον Chlorpyrifos μπορεί επίσης να συσχετιστεί με φυλοεξαρτώμενες δυσλειτουργίες με επιρροή στην παραγωγή, δράση και τον μεταβολισμό των ενδογενών στεροειδών, με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή ή την υποπαραγωγή των στεροειδών ορμονών, μεγάλης σημασίας για τον μηχανισμό της σεξουαλικής διαφοροποίησης (*Evanthia Diamanti-Kandarakis et al. 2009*).

Η απαγόρευση των φυτοφαρμάκων με τη δραστική ουσία Chlorpyrifos πραγματοποιείται σταδιακά από το 2010 και έπειτα, λόγω των επιπτώσεων που έχει στην ανθρώπινη υγεία. Η Ευρωπαϊκή Ένωση και η ΗΠΑ ανέφεραν την απαγόρευση των πωλήσεων φυτοφαρμάκων που περιέχουν την ουσία Chlorpyrifos τον Ιανουάριο του 2020 (EFSA 2019) και τον Αύγουστο του 2021 (USEPA 2021) αντίστοιχα, αφού είχε δημοσιευτεί άρθρο που κατέληγε στο συμπέρασμα ότι τα κριτήρια για την ανθρώπινη ασφάλεια δεν πληρούνται. Στην δημοσίευση αυτή έκαναν λόγω για την πρόκληση γνωστικών και συμπεριφορικών ελλειμάτων μέσω προγεννητικής έκθεσης στη συγκεκριμένη ουσία, λόγω του ότι ο Chlorpyrifos είναι μία νευροτοξίνη που επηρεάζει την αναπτυξιακή συμπεριφορά στους ανθρώπους.

1.6.3 Lentemul

Το Lentemul είναι ένα μεταφυτρωτικό και εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο της ομάδας των φαινοξυαλκανοικών (*Song, Yaling 2014*). Είναι ένα υδατοδιαλυτό υγρό συμπύκνωμα που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση πλατύφυλλων ζιζανίων στα χειμερινά σιτηρά (σιτάρι, κριθάρι, σίκαλη, βρόμη), αφού τα ανεπιθύμητα φυτά ή αλλιώς ζιζάνια έχουν αναπτυχθεί, στοχεύοντας μόνο εκείνα, και στον χλοοτάπητα (*John D. Stark et al. 2001; Song, Yaling 2014*). Η κύρια δραστική ουσία του είναι το 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), μοριακού βάρους 221.04 g/mol και συγκέντρωσης 60% w/v, (ίση με 600 mg/ml) , το οποίο βρίσκεται με την μορφή 2,4-D άλατος διμεθυλαμίνης (2,4-D dimethylamine salt), μοριακής μάζας 266.12 g/mol και σε συγκέντρωση 72.24% w/v (ίση 722.4 mg/ml) (National Center for Biotechnology Information). Οι βοηθητικές ουσίες βρίσκονται σε συγκέντρωση 47.9%w/w, άλλα η ταυτότητα τους δεν αναφέρεται στο δελτίο πληροφοριών ή στην βιβλιογραφία. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το διαθέσιμο στο εμπόριο Lentemul της εταιρείας Nufarm GmbH & Co KG.



Εικόνα 1-16: Χημική δομή του 2,4-D (αριστερά) και του2,4-D dimethylamine salt (δεξιά) (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-Dichlorophenoxyacetic-acid &. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-D-dimethylamine-salt)

Το 2,4- D είναι μία μιμητική ή συνθετική αυξίνη. Το συγκεκριμένο ζιζανιοκτόνο σκοτώνει το ζιζάνιο-στόχο μιμούμενο την αυξίνη, την ορμόνη ανάπτυξης των φυτών, προκαλώντας την ανεξέλεγκτη και αποδιοργανωμένη ανάπτυξή τους οδηγώντας τα σε θάνατο (University of Georgia Center for Invasive Species and Ecosystem Health 2001; Song, Yaling 2014). Πιστεύεται ότι προκαλεί οξίνιση των κυτταρικών τοιχωμάτων, γεγονός που προκαλεί ανεξέλεγκτη επιμήκυνση στα φυτά. Ακόμα και χαμηλές συγκεντρώσεις του 2,4-D μπορούν να αναστείλουν την κυτταρική διαίρεση ή να οδηγήσουν σε ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση και ανάπτυξη, με αποτέλεσμα την καταστροφή των αγγειακών ιστών (*University of Georgia Center for Invasive Species and Ecosystem Health 2001*). Και στις δύο περιπτώσεις επέρχεται θάνατος των ζιζανίων εντός τριών ως πέντε εβδομάδων.

Το 2,4-D ζιζανιοκτόνο, είναι ένα πολύ γνωστό φυτοφάρμακο, το οποίο συντέθηκε πρώτη φορά το 1941 και κυκλοφόρησε στην αγορά των ΗΠΑ το 1950 και έκτοτε παράγεται παγκοσμίως (Garabrant, D. H. et al. 2002). Έκτοτε έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για τη σύνδεση του φυτοφαρμάκου με τη νόσο του Hodgkin, τη νόσο του Non-Hodgkin λέμφωμα και το σάρκωμα μαλακών μορίων και για την σύνδεση του φυτοφαρμάκου με διαταραχές του ανθρωπίνου οργανισμού μεταξύ αυτών και των αναπαραγωγικών διαταραχών (*Garabrant, D. H. et al. 2002*).

Πρόσφατες μελέτες έχουν καταδείξει το 2,4-D ως πιθανός ενδοκρινικό διαταράκτη, λόγω της ικανότητας του να παρεμβαίνει στην δράση της ορμόνης του φύλου ή σεξουαλικής ορμόνης (*Dalsager et al., 2018; Glover et al., 2022; Liang et al., 2022; Liu et al.,2024*). Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Δανία με τη συμμετοχή 858 γυναικών, βρέθηκε ότι η έκθεση σε 2,4-D στο δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης είχε ως επίπτωση η ανωγεννητική απόσταση, δηλαδή η απόσταση μεταξύ του πρωκτού και των γεννητικών οργάνων, των αγοριών να μικραίνει σε σχέση με την ανωγεννητική απόσταση του πρώτου τριμήνου (*Dalsager et al., 2018*). Σε ένα ακόμη άρθρο βρέθηκε αρνητική συσχέτιση του 2,4-D με χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης στους άντρες και της ολικής τεστοστερόνης στις γυναίκες (*Glover et al., 2022; Liang et al., 2022*), ενώ σε μία ακόμη μελέτη προτάθηκε ότι η έκθεση σε χαμηλό επίπεδο 2,4-D σε αρχικό στάδιο της εγκυμοσύνης μπορεί να επηρεάσει την ομοιόσταση της βρεφικής στεροειδούς ορμόνης (*Liu et al., 2024*).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σε συνεργασία με την Καθηγήτρια Μαρία Παπαγιάννη, του τμήματος Διατροφολογίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστήμιου Θεσσαλονίκης και τον καθηγητή Γεώργιο Μαστοράκο της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, διεξήχθη μελέτη στο εργαστήριο Μεταβολομικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας του Ινστιτούτου Τεχνολογίας και Έρευνας στην Πάτρα, στην οποία πραγματοποιήθηκαν μεταβολομικές αναλύσεις με σκοπό την πιθανή ανίχνευση φυτοφαρμάκων στον ορό αίματος εγκύων γυναικών που κυοφορούσαν αρσενικά έμβρυα από τη Θεσσαλία, μία περιοχή της Ελλάδος ιδιαίτερα επιβαρυμένης με φυτοφάρμακα. Σκοπός της μελέτης υπήρξε η διερεύνηση πιθανών ιχνών φυτοφαρμάκων στον οργανισμό τους, η ανίχνευση αλλαγών στο μεταβολικό τους προφίλ, καθώς και η συσχέτιση των συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων με αναπαραγωγικές διαταραχές στο έμβρυο μελλοντικά.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζεται η ανάλυση των φυτοφαρμάκων Dimento, Durban και Lentemul με δραστικές ουσίες τη Dimethomorph, τον Chlorpyrifos και το 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid αντίστοιχα. Οι συγκεκριμένες δραστικές ουσίες των φυτοφαρμάκων αυτών έχουν αναγνωριστεί πως λειτουργούν ως ενδοκρινικοί διαταράκτες και έχει αποδειχθεί πως έχουν άμεσες επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα, στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση ύπαρξης των Dimento, Dursban και Lentemul στον ορό αίματος των εγκύων γυναικών μέσω της υγρής χρωματογραφίας φασματομετρίας μάζας (LC-MS). Αρχικά αναλύθηκαν, τα τρία εμπορικά φυτοφάρμακα (Dimento, Dursban και Lentemul) με σκοπό την εύρεση των χαρακτηριστικών κορυφών των δραστικών ουσιών τους. Με τον τρόπο αυτόν, λάβαμε πλήρη πληροφορία για τη συμπεριφορά των φυτοφαρμάκων στις πειραματικές συνθήκες που ακολουθήθηκαν στη συνέχεια.

Στη συνέχεια, τα δείγματα ορού αίματος αναλύθηκαν, σε παρόμοιες πειραματικές συνθήκες με τα εμπορικά σκευάσματα των φυτοφαρμάκων, με χρήση της υγρής χρωματογραφίας φασματομετρίας μάζας (LC-MS), και μελετήθηκαν για πιθανή εύρεση των δραστικών ουσιών των φυτοφαρμάκων, θραυσμάτων τους, παραγώγων μορίων τους, καθώς και πιθανών μεταβολιτών τους μετά την κυκλοφορία τους μέσα στον οργανισμό.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1.1 Υλικά

Τα εμπορικά σκευάσματα των φυτοφαρμάκων, τα αναλώσιμα και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων, ήταν:

- Lentemul 60 (Nyfarm GmbH & Co KG)
- Dimento 500 (ADAMA HELLAS)
- Dursban 480 (Dow Agroscience, USA)
- HPLC-grade νερό (Merck)
- HPLC-grade μεθανόλη (Merck)
- Νορλευκίνη 1mg/ml (SIGMA) και θεοφυλλίνη 0,1mg/ml (ACROS ORGANICS) ως εσωτερικά πρότυπα
- Αναδευτήρας Vortex (LabTech, LVM -202)
- Υδατόλουτρο (Water bath)
- Φυγόκεντρος ψύξης (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ΗΠΑ)
- Περιστροφικός εξατμιστήρας υπό κενό (Speed vac) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- FREEDOM Evo, by Tecan (Liquid Handler)
- Υγρός χρωματογράφος Surveyor LC pump (Thermo Finnigan)
- Φασματογράφος μαζών παγίδας ιόντων LCQ Advantage (Thermo Finnigan)
- Χρωματογραφική στήλη Luna C18 Phenomenex
- Αέριο Άζωτο 99,99%
- Αέριο Ήλιο 99,99% (Air Liquide Hellas, Αθήνα, Ελλάδα)

3.1.2 Παραλαβή δειγμάτων

68 δείγματα ορών αίματος εγκύων γυναικών στάλθηκαν στο Εργαστήριο Μεταβολικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας προς ανάλυση. Τα δείγματα στάλθηκαν παγωμένα σε cryovials. Μετά την παραλαβή τους τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε υπερκαταψύκτη στους -80 °C.

Τα εμπορικά φυτοφάρμακα, επίσης από την κυρία Παπαγιάννη, στάλθηκαν σε γυάλινα μπουκάλια με προστατευτικό περιτύλιγμα και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι την ανάλυση τους, σύμφωνα με τις εμπορικές οδηγίες.



Εικόνα 3-1: Εικόνα των δειγμάτων των ορών αίματος αριστερά και των φυτοφαρμάκων δεξιά.

3.1.3 Ανάλυση φυτοφαρμάκων

Τα φυτοφάρμακα τα οποία αναλύσαμε είναι το Dimento, Dursban και Lentemul.

Το Dimento, με κύρια δραστική ουσία, την Dimethomorph, κυκλοφορεί σε μορφή υδατοδιαλυτού γαλακτώματος με περιεκτικότητα δραστικής ουσίας 50% w/v (500 mg/ml) (πίνακας 3-1).

Το Lentemul, με δραστική ουσία την 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid, υπό μορφή 2,4-D άλατος διμεθυλαμίνης, βρίσκεται σε μορφή πυκνού υδατοδιαλυτού διαλύματος, με περιεκτικότητα δραστικής ουσίας 2,4 -D 60% w/v (600 mg/ml) και υπό μορφή άλατος διμεθυλαμίνης 2,4- D (DMA) βρίσκεται σε περιεκτικότητα 72.24 % w/v (722,4 mg/ml) (πίνακας 3-1).

Τέλος, το Dursban βρίσκεται σε μορφή υδατοδιαλυτού γαλακτωματοποιήσιμου συμπυκνώματος με δραστική ουσία το Chlorpyrifos και περιεκτικότητα δραστικής 45w/v (450 mg/ml) (πίνακας 3-1).

Πίνακας 3-1: Γενικές πληροφορίες όλων των φυτοφαρμάκων.

ΕΜΠΟΡΙΚΟ ΟΝΟΜΑ	ΕΙΔΟΣ	ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΜΟΡΦΗ	ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ, Σ.Τ. και MW Chebi (g/mole)	ΒΟΗΘΗΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ - MW Chebi (g/mole)	ΠΤΗΤΙΚΟΤΗΤΑ	ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	ΣΤΟΧΟΣ	ΔΗΛΩΣΕΙΣ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ		
DECIS Bayer Ελλάς ΑΒΕΕ	Πυρεθρινοειδές εντομοκτόνο επαφής και στομάχου	EC (Emulsifiable concentrate). ΥΓΡΟ υδατοδιαλυτό	Deltamethrin 2,5 % w/v, C22H19Br2NO3 MW 504.8 (Pyrethroid (cyclopropanecarboxylate ester)	• Tetrapropylene benzene sulfonate, calcium salt, 1-5 %w/w, MW 318.4 • 2-Methylpropan-1-ol, 1-5 % w/w, MW 74.1 • 2,6-Di-tert-butyl-4- methylphenol, 0,10 – 0,25% w/w MW 220.35	semi-volatile	Στο νευρικό σύστημα των εντόμων και συγκεκριμένα στις διαύλους των ιόντων Na στις προσυναπτικές μεμβράνες των νευρικών κυττάρων. 1) EC 3.1.3.16 (phosphoprotein phosphatase) inhibitor 2) calcium channel agonist 3) pyrethroid ester insecticide	Μυζητικά και μασητικά έντομα.	Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης, πιθανός θάνατος σε περίπτωση κατάποσης και διείσδυσης στις αναπνευστικές οδούς	Ερεθισμός του δέρματος, σοβαρή οφθαλμική βλάβη, υπνηλία ή ζάλη.	Επιβλαβές σε περίπτωση εισπνοής, ερεθισμό της αναπνευστικής οδού.
LENTEMUL Nufarm GmbH & Co KG	Μεταφυτρωτικό, διασυστηματικό, εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο της ομάδας των φαινοξυαλκανοϊκών	SL (Πυκνό διάλυμα) ΥΓΡΟ υδατοδιαλυτό	2,4-Dichlorophenoxy-acetic acid 60% w/v C8H6Cl2O3, MW 221.04. Υπό μορφή 2,4-D άλατος διμεθυλαμίνης		volatile	Δρα όπως οι φυσικές αυξίνες. Απορροφάται κυρίως από τα φύλλα ζιζανίων. Συγκεντρώνεται στους νεαρούς μεριστωματικούς ιστούς. Προκαλεί επιναστία, επηρεάζει την αναπνοή , τα αποθέματα των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και την κυτταρική διαίρεση. 1) EC 1.1.1.25 (shikimate dehydrogenase) inhibitor 2) synthetic auxin	Καταπολέμηση πλατύφυλλων ζιζανίων στα σιτηρά (σιτάρι, κριθάρι, σίκαλη, βρώμη) και το χλοοτάπητα.	Ερεθισμό αναπνευστικής οδού, οφθαλμική βλάβη .	Ξηρότητα δέρματος ή σκάσιμο.	
SIVANTO Bayer Ελλάς ΑΒΕΕ	Διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου	SL (Πυκνό διάλυμα) GEL υδατοδιαλυτό	Flupyradifurone 20 % w/v, C12H11ClF2N2O2, MW 288.68	Propylene carbonate 42.888%w/w	Low volatility	Ταχύτατη αρχική δράση (knock-down effect) οδηγεί σε άμεση διακοπή της απομύζησης χυμών από τα έντομα. Δρα στα διάφορα στάδια του βιολογικού κύκλου των εντόμων (προνύμφες, νύμφες, ακμαία). 1) nicotinic acetylcholine receptor agonist	Καταπολέμηση μυζητικών εντόμων (Αφίδες, Αλευρώδεις, Τζιτζικάκια).	Αλλεργική δερματική αντίδραση	Επιβλαβές σε περίπτωση εισπνοής	
DIMENTO ΑΔΑΜΑ ΕΛΛΑΣ ΜΟΝΟΠΡΟΣΩΠΗ ΠΗ Α.Ε.	Τοπικά διασυστηματικό μυκητοκτόνο, ανήκει στην ομάδα μορφολινών.	SC (Suspension concentrate). ΓΑΛΑΚΤΩΜΑ υδατοδιαλυτό	Dimethomorph 50% w/w, (diphenylmethanel), C21H22ClNO4, MW 387.86	1,2-Benzisothiazolin-3-one 0.01-0.03 w/w, MW 151.19	low volatility	Παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα προκαλώντας θάνατο του παθογόνου	Προληπτική, θεραπευτική και αντισπορογόνος δράση κατά του περονόσπορου. Αμπέλι, τομάτα 1) antifungal agrochemical 2) xenobiotic 3) fungicide	Μπορεί να βλάψει τη γονιμότητα	Αλλεργική αντίδραση		
DURSBAN Dow Agrosciences	Οργανοφωσφορική ένωση.	EC (Emulsifiable concentrate). ΥΓΡΟ υδατοδιαλυτό	Chlorpyrifos 45% w/v, (aryl thiophosphate) C9H11Cl3NO3PS, MW 350.59	• Solvent naphtha (petroleum), light aromatic, 40,0 - 50,0 % w/w • 1,2,4-Trimethylbenzene, 10,0 - 20,0 % w/w MW 120.19 • Benzenesulfonic acid, monoC11-13-branched alkyl derivs., calcium salts, 3,0 - 10,0 % w/w, MW 158.18 • Chlorpyrifos-Methyl, 0,0 - 0,1 % w/w, mw 320.895 • Βοηθητικές ουσίες: 58%	quite volatile	Δρα αναστέλλοντας τη δράση της ακετυλ-χολινεστεράσης	Εσπεριδοειδή,Μηλοειδή,Πυρηνόκαρπα,Λαχανικά υπαίθρου, Βαμβάκι, Πατάτες. Δεν επιτρέπεται η χρήση του σε πρώιμες ποικιλίες ροδακινιάς και αχλάδια κρυοπάλλια, γιατί μπορεί να εμφανιστεί φυτοτοξικότητα. 1) EC 3.1.1.7 (acetylcholinesterase) inhibitor 2) EC 3.1.1.8 (cholinesterase) inhibitor 3) xenobiotic	Υγρό και ατμοί εύφλεκτα. Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Μπορεί να προκαλέσει θάνατο σε περίπτωση κατάποσης και διείσδυσης στις αναπνευστικές οδούς.	Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.	Επιβλαβές σε περίπτωση εισπνοής. Μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό της αναπνευστικής οδού.
Switch 25/37.5 Syngenta Hellas Μονοπρόσωπη ΑΕΒΕ	Μείγμα ενός διασυστηματικού μυκητοκτόνου και ενός επαφής	WG (Water dispersible granules). ΣΤΕΡΕΟ Διλυτά στο νερό.	Cyprodinil 37.5% w/w, (ανιλινοπυριμιδίνη) C14H15N3 , MW 225.29 Fludioxonil 25% w/w, (φαινυλοπυρρολη) C12H6F2N2O2, MW 248.04	• Reaction products of naphthalene, 1-3 %w/w • Βοηθητικές ουσίες 35.8% w/w.	not volatile	Μείγμα ενός διασυστηματικου μυκητοκτονου και ενός επαφής με παροτατευτική και θεραπευτική δραση. Βα φαινυλοπυρρολικα προκαλούν βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες των μυκητων. Οι συνλυσπορμιδίνες παρεμποδίζουν την απόκριση λυτικών ενζύμων από τα παθογόνα. 1) androgen antagonist 2) estrogen receptor agonist 3) antifungal agrochemical 4) fungicide	Αλλεργική αντίδραση του δέρματος. Πολύ τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς με μακροχρόνιες επιπτώσεις.			
Vertimec Syngenta Hellas Μονοπρόσωπη ΑΕΒΕ	Εντομοκτόνο- ακαροκτόνο στομάχου και επαφής.	EC (Emulsifiable concentrate). GEL Διλυτά στο νερό.	Abamectin 1.8% w/v, C95H142O28, MW 1732.10. (macrocyclic lactone). Mixture of 80% avermectin B1a and 20% avermectin B1b	• Cyclohexanol, 50-70% w/w, MW 100,158 • 2,6-di-tert-butyl-p-cresol, 1-2, % w/w, MW 276.5 • Βοηθητικές ουσίες 97.96 % w/w	not volatile	Προκαλεί παράλυση στα έντομα με αποτέλεσμα το θάνατο τους από ασιτία.	Δεν είναι φυτοτοξικό στις εγκεκριμένες καλλιέργειες και στις συνιστώμενες δόσεις εφαρμογής	Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό και πνευμονικό ερεθισμό	Μπορεί να προκαλέσει βλάβες στα όργανα ύστερα από παρατεταμένη ή επανειλημμένη έκθεση.	Πολύ τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς. Πιθανώς επικίνδυνο για τις μέλισσες.

Για την χρωματογραφική ανάλυση των εμπορικών φυτοφαρμάκων και τη κατασκευή προτύπων καμπυλών συναρτήσει της συγκέντρωσης, αρχικά συμβουλευτήκαμε την σχετική βιβλιογραφία. Βρίσκοντας σχετικές αραιώσεις μέσα στα όρια ανίχνευσης των δραστικών μας ουσιών σε παρόμοιες με τις δικές μας πειραματικές συνθήκες, προχωρήσαμε σε διαδοχικές 1/10 αραιώσεις, μέχρι να καταλήξουμε σε διαλύματα της τάξης των 10^{-7} mg δραστικής/ml, για να παρασκευάσουμε τα πρότυπα διαλύματα κάθε φυτοφάρμακου, ως εξής:

Πίνακας 3-2: Διαδοχικές αραιώσεις των αρχικών διαλυμάτων των φυτοφαρμάκων.

Δραστική ουσία	ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ - ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ								
	100ul εμπορικού +900ul HPLC H2O	Διαδοχικές αραιώσεις 1/10							
	A, mg/ml	B, mg/ml	C, mg/ml	D, mg/ml	E, mg/ml	F, mg/ml	G, mg/ml	H, mg/ml	I, mg/ml
2,4-D	60	6	0,6	0,06	6,00E-03	6,00E-04	6,00E-05	6,00E-06	6,00E-07
DMA	72,24	7,224	0,7224	0,07224	7,22E-03	7,22E-04	7,22E-05	7,22E-06	7,22E-07
Dimethomorph	50	5	0,5	0,05	5,00E-03	5,00E-04	5,00E-05	5,00E-06	5,00E-07
Chlorpyrifos	45	4,5	0,45	0,045	4,50E-03	4,50E-04	4,50E-05	4,50E-06	4,50E-07

3.1.3.1 Διαδικασία ανάλυσης

Σε κάθε πρότυπο διάλυμα που παρασκευάσαμε προστέθηκαν HPLC-grade μεθανόλη, αλλά και νορλευκίνη/θεοφυλλίνη ως εσωτερικά πρότυπα σε αναλογία 1:2, ακριβώς όπως θα κάναμε μετέπειτα για τα δείγματα αίματος κατά τη διαδικασία εκχύλισης των μεταβολιτών τους, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου (*Papadimitropoulos et al, 2018*). Τα δείγματα στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 70 ^{o}C, για 15-20 λεπτά, αφού η υψηλή θερμοκρασία βοηθάει στη εκχύλιση. Τα δείγματα βγήκαν από το υδατόλουτρο και προστέθηκε ίσος όγκος νερού HPLC-grade, όσο η μεθανόλη HPLC-grade που τους προσθέσαμε στην αρχή. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 10,000 rpm, στους 4 ^{o}C, για 10 λεπτά (η χαμηλή θερμοκρασία βοηθάει στην καταβύθιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών). Τα υπερκείμενα στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν με προσοχή σε καινούργια γυάλινα φιαλίδια και τοποθετήθηκαν στον περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό (Speed vac), όπου αφαιρέθηκε όλη η υγρή φάση και στη συνέχεια φυλάχτηκαν στο ψυγείο στους 4 ^{o}C μέχρι την ανάλυση τους.

Για την ανάλυση τους τα ξηρά δείγματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν με HPLC-grade MeOH / H_2O σε αναλογία 9:1 (v/v), αναλογία που χρησιμοποιείται βάσει πρωτοκόλλου του εργαστηρίου Μεταβολομικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας, και αναδεύτηκαν ήπια με vortex, για αρκετή ώρα, πριν από την ανάλυση LC-MS. Οι τελικές συγκεντρώσεις στα επαναδιαλυμένα δείγματα του 2,4-D ή DMA, της Dimethomorph και του Chlorpyrifos παρουσιάζονται στον πίνακα 3-3 παρακάτω.

Πίνακας 3-3: Τελικές συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων προς ανάλυση.

ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ								
	Τελικές συγκεντρώσεις:								
	a, mg/ml	b, mg/ml	c, mg/ml	d, mg/ml	e, mg/ml	f, mg/ml	g, mg/ml	h, mg/ml	i, mg/ml
2,4-D	9	0,9	0,09	0,009	0,0009	9,00E-05	9,00E-06	9E-07	9E-08
DMA	10,836	1,0836	0,10836	0,010836	1,08E-03	1,08E-04	1,08E-05	1,08E-06	1,08E-07
Dimethomorph	7,5	0,75	0,075	0,0075	7,50E-04	7,50E-05	7,5E-06	7,5E-07	7,5E-08
Chlorpyrifos	6,75	0,675	0,0675	0,00675	6,75E-04	6,75E-05	6,75E-06	6,75E-07	6,75E-08

3.1.4 Εκχύλιση ορών αίματος

Από τα 68 δείγματα ορών αίματος εγκύων γυναικών, εκχυλίστηκαν 4 τυχαία δείγματα ορού αίματος. Τα δείγματα αυτά ήταν με κωδικοί ονομασία το 4Α, 16Α, 17Α και 21Α, εκ των οποίων τα 17Α και 21Α εκχυλίστηκαν και μεταγενέστερα με τη βοήθεια του liquid handler, πέρα από την τυπική διαδικασία. Για την εύρεση των αποτελεσμάτων, μαζί με τους ορούς αίματος των εγκύων γυναικών αναλύθηκαν και νερό HPLC-grade και νερό HPLC-grade μαζί με τα εσωτερικά πρότυπα.

3.1.4.1 Διαδικασία εκχύλισης

Μία μέρα πριν από την έναρξη της εκχύλισης τα δείγματα ορού αίματος 4Α, 16Α, 17Α και 21Α αφέθηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4 ^{o}C για να πραγματοποιηθεί ήπια απόψυξη. Σε κάθε δείγμα ορού αίματος προστέθηκαν ice-cold HPLC-grade μεθανόλη, ως διαλύτης εκχύλισης, και νορλευκίνη/θεοφυλλίνη ως εσωτερικά πρότυπα. Ακολούθησε ήπια ανάδευση και τα δείγματα επωάστηκαν σε υδατόλουτρο στους 70 ^{o}C για 15-20 λεπτά. Στη συνέχεια τα δείγματα βγήκαν από το υδατόλουτρο και στο κάθε δείγμα προστέθηκε ίδιος προς μεθανόλη όγκος HPLC-grade νερού. Μετά από ήπια ανάμιξη, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στους 4 ^{o}C, στα 10,000 rpm, για 10 λεπτά. Παρατηρήθηκε μεγάλη ποσότητα ιζήματος μετά την πρώτη φυγοκέντρηση (πρωτεΐνες αίματος) και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν ξανά για την ανάκτηση ενός καθαρού υπερκείμενου διαλύματος. Ο ρόλος της φυγοκέντρησης στη διαδικασία της εκχύλισης είναι ο διαχωρισμός του υγρού υπερκειμένου από μεγαλομοριακά και στερεά σωματίδια που περιέχονται μέσα στα δείγματα, που είναι ανεπιθύμητα (παραδείγματος χάριν πρωτεΐνες) λόγω της φύσης της ανάλυσης, αλλά και για να αποφευχθεί η απόφραξη της στήλης στο σύστημα της υγρής χρωματογραφίας. Με αυτό τον τρόπο προστατεύουμε τον ευαίσθητο εξοπλισμό LC και εξασφαλίζουμε ένα πιο καθαρό και ομοιογενές δείγμα και αξιόπιστα αποτελέσματα. Τέλος, τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν στον συμπυκνωτή κενού, προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η υγρή φάση του δείγματος. Με την αφαίρεση της υγρής φάσης, οι μεταβολίτες είναι πιο σταθεροί και μπορούν να αποθηκευτούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα χωρίς αποικοδόμηση. Τα στεγνά διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους 4^{o}C έως την ημέρα της ανάλυσης τους. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για δείγματα HPLC-grade νερού ως δείγματα αναφοράς.

Οι εκχυλίσεις των δειγμάτων ορού αίματος 17Α και 21Α πραγματοποιήθηκαν επίσης μέσω του liquid handler, με στόχο τη σύγκρισή τους με αυτά της προηγούμενης διαδικασίας. Ο liquid handler

είναι ένα εργαστηριακό όργανο που χρησιμοποιείται για τον αυτοματοποιημένο χειρισμό υγρών και προσφέρει υψηλή ακρίβεια και ακρίβεια στον χειρισμό υγρών, διασφαλίζοντας επαναληψιμότητα σε εργασίες όπως η ανάμιξη με πιπέτα, η ανάμειξη αντιδραστηρίων και η μεταφορά δείγματος (*Torres-Acosta et al., 2022*). Η προσθήκη της μεθανόλης, της νορλευκίνης και της θεοφυλλίνης πριν το υδατόλουτρο στα δείγματα, καθώς και η προσθήκη HPLC-grade νερού έγινε αυτόματα με τον liquid handler, χωρίς να εμπεριέχεται ανθρώπινος παράγοντας. Η διαδικασία εκχύλισης ήταν ακριβώς η ίδια και οι ποσότητες των κάθε ουσιών οι ίδιες με την τυπική διαδικασία της εκχύλισης.

Για την ανάλυση τους τα ξηρά εκχυλίσματα ενυδατώθηκαν με HPLC-grade MeOH / H_2O σε αναλογία 9:1 (v/v) και αναδεύτηκαν με vortex πολύ καλά πριν από την ανάλυση LC-MS.

3.1.5 Ανάκτηση του μεταβολικού προφίλ

Η παρούσα μελέτη εστιάζει στη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος εγκύων γυναικών για την εύρεση των φυτοφαρμάκων στο μεταβολικό τους προφίλ και των ποσοτήτων τους στο αίμα.

Τα δείγματα αναλύθηκαν με LC-MS και ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με βάση την πολικότητα του κάθε μορίου. Τα πιο πολικά μόρια εκλύονται πρώτα και τα λιγότερο πολικά και μη- πολικά μόρια είναι εκείνα που εκλύονται μεταγενέστερα. Ο τύπος της χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε είναι η Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης, ο ιονισμός του δείγματος πραγματοποιήθηκε μέσω της τεχνικής ηλεκτροψεκασμού και ο τύπος αναλυτή μάζας προς φορτίο που χρησιμοποιήθηκε είναι η τρισδιάστατη παγίδα ιόντων. Η κινητή φάση περιλάμβανε τους ακόλουθους διαλύτες:

A. HPLC-grade H_2O με 0,1% v/v φορμικό οξύ
B. HPLC-grade MeOH με 0,1% v/v φορμικό οξύ

Η ποσότητα που εισήχθη στον υγρό χρωματογράφο ήταν 20uL από κάθε επαναδιαλυτοποιημένο δείγμα και ο ρυθμός ροής των διαλυτών ρυθμίστηκε στα 0.5 ml/min. Η φασματομετρία μάζας λειτουργούσε σε θετικό ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI+) με τάση +4.5 kV και η είσοδος των ιόντων στο φασματόμετρο ήταν μέσω τριχοειδούς σωλήνα σε θερμοκρασία 350 ^{o}C. Η παγίδα ιόντων λειτουργούσε σε καταγραφή πλήρους σάρωσης ιόντων με θετικό φορτίο και λόγο μάζας/φορτίου (m/z) από 50 έως 800. Ο χρόνος εκτέλεσης της διαδικασίας αυτής ρυθμίστηκε στα 50 min. Κάθε δείγμα μετρήθηκε εις τριπλούν.

3.1.6 Ταυτοποίηση κορυφών

Η ταυτοποίηση των κορυφών των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με βάση την βιβλιοθήκη κορυφών του εργαστηρίου Μεταβολομικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας (MESBL) (*Maga-Nteve and Klapa, 2016- Papadimitropoulos et al., 2018*), καθώς και της εμπορικής βιβλιοθήκης κορυφών NIST. Η ανάλυση των προφίλ επιτεύχθηκε με τη χρήση του λογισμικού Thermo Scientific™ Xcalibur™ Software (v1.3). Η συνολική περιοχή κορυφής κάθε μεταβολίτη εκτιμήθηκε από το άθροισμα όλων των κορυφών που αντιστοιχούν στον εν λόγω μεταβολίτη (τα εμβαδά κορυφών των μητρικών ιόντων, των παραγώγων τους με ιόντα (adducts), όπως Na+ παρόντα στο σύστημα, και των θραυσμάτων τους).

Με αυτή τη μέθοδο ελέγχονται αυτόματα όλα τα χρωματογραφήματα και καταγράφεται το μεταβολικό προφίλ από κάθε χρωματογράφημα, ώστε να προκύψει ένας τελικός πίνακας που περιέχει τους μεταβολίτες με τις αντίστοιχες επιφάνειες κορυφής για κάθε δείγμα.

3.1.7 Κανονικοποίηση και Φιλτράρισμα

Η κανονικοποίηση των μεταβολικών δεδομένων είναι αναγκαία ώστε να εξαχθούν αποτελέσματα τα οποία είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους και να διορθωθούν πιθανά σφάλματα κατά την προετοιμασία των δειγμάτων και την αναλυτική διαδικασία. Τα εμβαδά των ταυτοποιημένων κορυφών κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με τα εμβαδά των κορυφών της νορλευκίνης (Relative Peak Areas, RPA).

Κορυφές με μεγάλη διακύμανση μεταξύ των τεχνικών επαναλήψεων ή οι μη ποσοτικοποιήσιμοι μεταβολίτες (κορυφές με μηδενικές ή μη αξιόπιστες χαμηλές τιμές, στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου) εξαιρούνται από την ανάλυση. Κατόπιν, τα προφίλ αυτά χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή βιολογικά σχετικών συμπερασμάτων στην ανάλυση δεδομένων και οι διαφορές μεταξύ αυτών μπορούν να αποδοθούν μόνο στην εκάστοτε υπό μελέτη περίπτωση.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

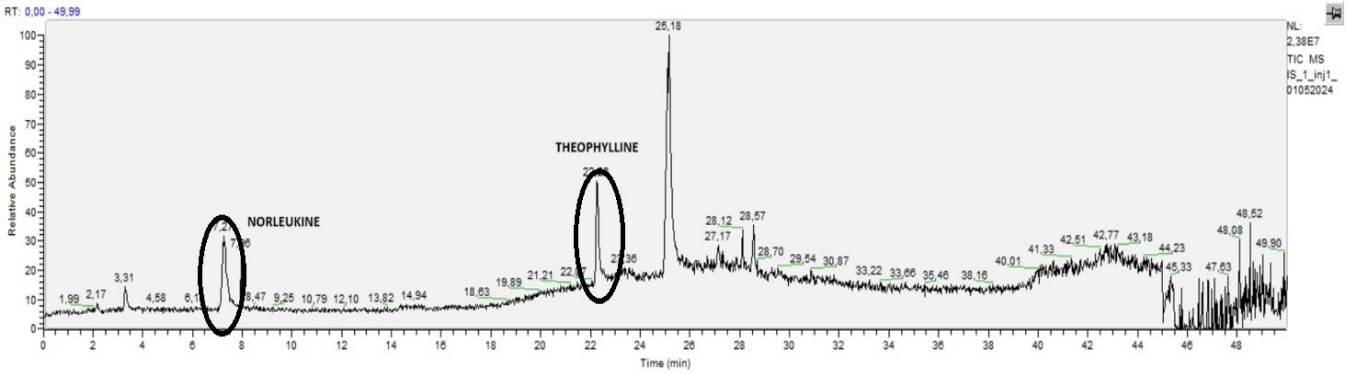
4.1 ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

Έπειτα από τις αναλύσεις των φυτοφαρμάκων Dimento, Dursban και Lentemul και τις εκχυλίσεις στα δείγματα ορού αίματος 4Α, 16Α, 17Α και 21Α, πραγματοποιήθηκε η ανάκτηση των προφίλ των δειγμάτων με τη μέθοδο Υγρής Χρωματογραφίας- Φασματομετρίας μάζας (LC-MS). Τα αποτελέσματα της μεθόδου ήταν τα χρωματογραφήματα όλων των δειγμάτων.

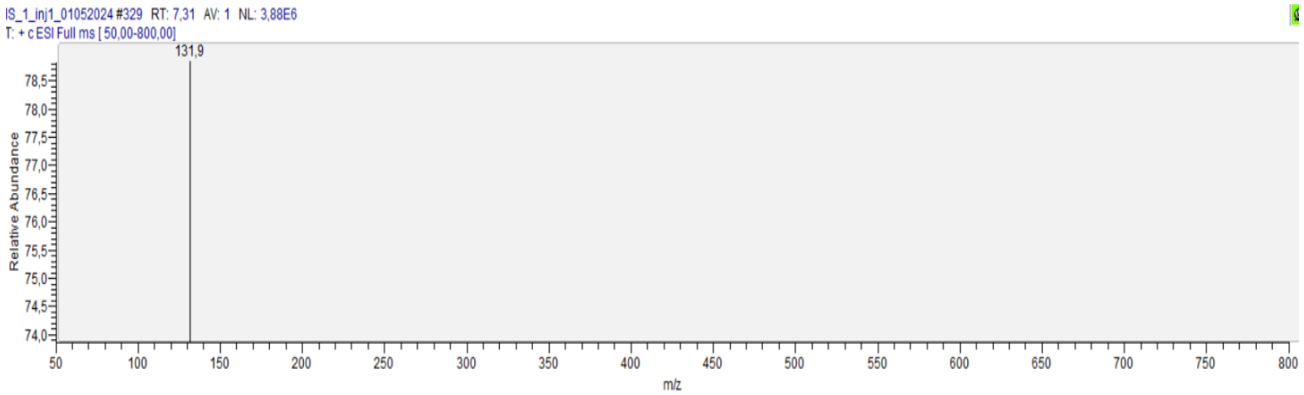
4.1.1 Υγρή Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας για την Νορλευκίνη και τη Θεοφυλλίνη

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία έχουμε προσθέσει δύο εσωτερικά πρότυπα στα δείγματα μας, τη νορλευκίνη και τη θεοφυλλίνη. Τα εσωτερικά πρότυπα νορλευκίνη και θεοφυλλίνη τα προσθέσαμε για την ανάλυση των δειγμάτων στην τεχνική υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS). Η νορλευκίνη έχει μοριακή μάζα 131.17 g/mol και μοριακό τύπο $C_6H_{13}NO_2$ και η θεοφυλλίνη έχει μοριακή μάζα 180.16 g/mol και μοριακό τύπο $C_7H_8N_4O_2$ (PubChem). Με βάση την εσωτερική βιβλιοθήκη κορυφών του εργαστηρίου Μεταβολομικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας αναμένουμε η νορλευκίνη να δώσει κορυφή m/z 132.1 σε χρόνο κατακράτησης 7.31 min και η θεοφυλλίνη αναμένουμε να δώσει κορυφή m/z 181.2 σε χρόνο κατακράτησης 22.15 min.

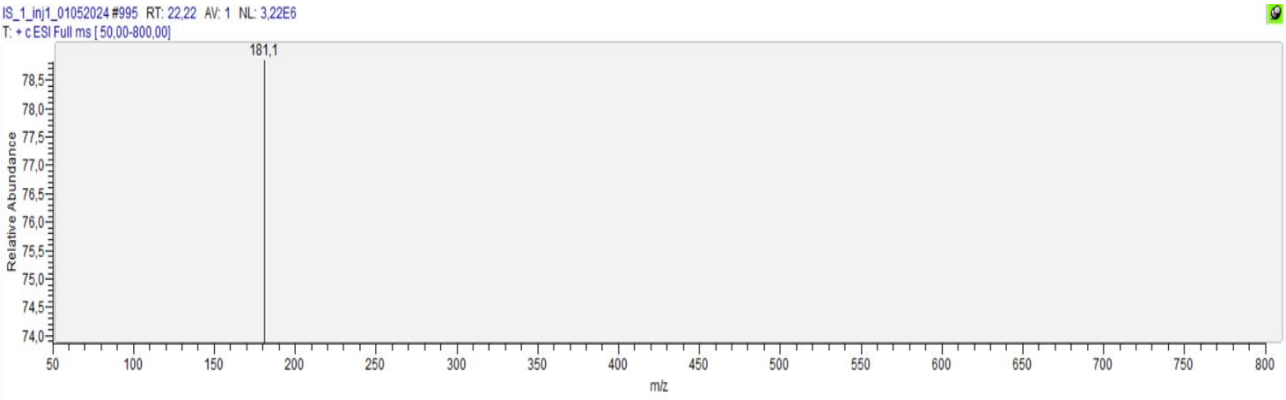
(a)



(b)



(c)



Εικόνα 4-1: Το χρωματογράφημα των εσωτερικών προτύπων (α), το φάσμα μάζας της νορλευκίνης (b), και το φάσμα μάζας της θεοφυλλίνης (c).

4.1.2 Πρότυπες καμπύλες φυτοφαρμάκων

Η πρότυπη καμπύλη είναι ένα μοντέλο παλινδρόμησης που χρησιμοποιείται για να προβλέψει τις άγνωστες συγκεντρώσεις των αναλυόμενων ουσιών-στόχων με βάση την απόκριση του οργάνου στα γνωστά πρότυπα (*Moosavi SM et al. 2018*). Το γνωστό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία είναι το εσωτερικό πρότυπο νορλευκίνη.

Σε ποσοτικούς προσδιορισμούς που έχουν να κάνουν με την αναλυτική τεχνική φασματομετρίας μάζας (MS) χρησιμοποιείται η γραμμική παλινδρόμηση ελάχιστων τετραγώνων, για την δημιουργία των πρότυπων καμπυλών, της περιοχής κορυφής της αναλυόμενης ουσίας προς την περιοχή κορυφής του εσωτερικού προτύπου και των αναμενόμενων συγκεντρώσεων των αναλυόμενων ουσιών (*Grant et al., 2017*). Η γραμμική παλινδρόμηση ελάχιστων τετραγώνων χρησιμοποιείται για την εύρεση της καλύτερης προσαρμοσμένης γραμμής για το σύνολο των δεδομένων που έχουμε (*Lipu et al., 2018*).

Ο κύριος σκοπός της δημιουργίας των πρότυπων καμπυλών ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός των φυτοφαρμάκων στο αίμα. Για την δημιουργία των πρότυπων καμπυλών χρειάστηκε να επιλέξουμε τα εύρη των συγκεντρώσεων των φυτοφαρμάκων που θα αναλύαμε, ώστε να μπορέσουμε να βρούμε τα όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Identification, LOQ) των φυτοφαρμάκων στο αίμα και τη γραμμική εξίσωση y(x) που περιέχει τις σχετικές περιοχές κορυφής (ανεξάρτητες μεταβλητές (y)) συναρτήσει της συγκέντρωσης των φυτοφαρμάκων (εξαρτημένη μεταβλητή(x)).

4.1.3 Υγρή Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας για το Dimento

Το φυτοφάρμακο Dimento περιέχει τη δραστική ουσία Dimethomorph με μοριακό βάρος 387.9 mg/ml, η οποία είναι σε αρχική συγκέντρωση 500 mg/ml στο εμπορικό σκεύασμα. Με διαδοχικές αραιώσεις της τάξης του 1/10, λάβαμε εύρος συγκεντρώσεων από $5 \cdot 10^{-7}$ έως 50 mg/ml. Και μέσω της διαδικασίας της εκχύλισης και την προσθήκη της HPLC-grade μεθανόλη/νερού και των εσωτερικών προτύπων τα καινούργια εύρη των συγκεντρώσεων της δραστικής ουσίας Dimethomorph κυμαίνονταν από $7.5 \cdot 10^{-8}$ έως 7.5 mg/ml.

4.1.3.1 Επιλογή εύρους συγκεντρώσεων

Σε μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της Dimethomorph από σκεύασμα φυτοφαρμάκου με την αναλυτική τεχνική υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, με χρήση κινητής φάσης ακετονιτριλίου και νερού σε αναλογία 80:20, επιλέχθηκε εύρος συγκεντρώσεων για πρότυπη καμπύλη 12.5-400 ug/ml (0.0125-0.4 mg/ml) και το όριο ανίχνευσης της Dimethomorph βρέθηκε σε συγκέντρωση 9.22 ug/ml (*Khan, G. et al, 2019*). Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα η επιλογή

του εύρους συγκέντρωσης για την ανάλυση του Dimento και τη δημιουργία των πρότυπων καμπυλών είναι 7.5-750 ug/ml. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι γνωρίζοντας τις πληροφορίες του άρθρου αυτού πραγματοποιήθηκαν οι αραιώσεις του Dimento μέχρι την τιμή συγκέντρωσης του Dimethomorph $5 \cdot 10^{-7}$ mg/ml (0.0005 ug/ml) και μετά την εκχύλιση $7.5 \cdot 10^{-8}$ mg/ml (0.000075 ug/ml).

4.1.3.2 Ανάκτηση μεταβολικών δεδομένων

Από την ανάλυση της Dimethomorph προέκυψαν δύο κορυφές «μητρικού ιόντος» (m/z 388.2), που προέκυψαν από τα δύο ισομερή αυτής της ένωσης (E- και Z- ισομερή), η μία κορυφή βρίσκεται στα 32.71 min και η δεύτερη κορυφή βρίσκεται στα 34.20 min. Μία χαμηλότερης έντασης κορυφή m/z 301.1, η οποία μπορεί να αντιστοιχεί σε θραύσμα της Dimethomorph, το οποίο προκύπτει από την απώλεια ενός ουδέτερου θραύσματος των 87 Da (C_5H_9O) από το μητρικό ιόν, παρατηρήθηκε και στους δύο προαναφερθέντες χρόνους κατακράτησης. Η απώλεια αυτή θα μπορούσε να οφείλεται σε διάσπαση γύρω από τον εστερικό ή αιθερικό δεσμό, εντός της δομής της Dimethomorph, με αποτέλεσμα ένα σταθερό θραύσμα. Επιπλέον, δεν ανιχνεύθηκε καμία κορυφή που να μπορεί να αποδοθεί στην ουσία 1,2-Benzisothiazoolin-3-one (αδρανής ένωση), που περιείχε το εμπορικό σκεύασμα του φυτοφαρμάκου. Ένα m/z 165 που είχε αναφερθεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία, το οποίο αντιστοιχεί σε ένα σταθερό αρωματικό θραύσμα, όπως ένας υποκατεστημένος φαινυλικός δακτύλιος, δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωσή μας, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανότατα δεν έλαβε χώρα διάσπαση αρωματικού δακτυλίου στις Χρωματογραφικές μας συνθήκες (*Walorczyk, 2013).*

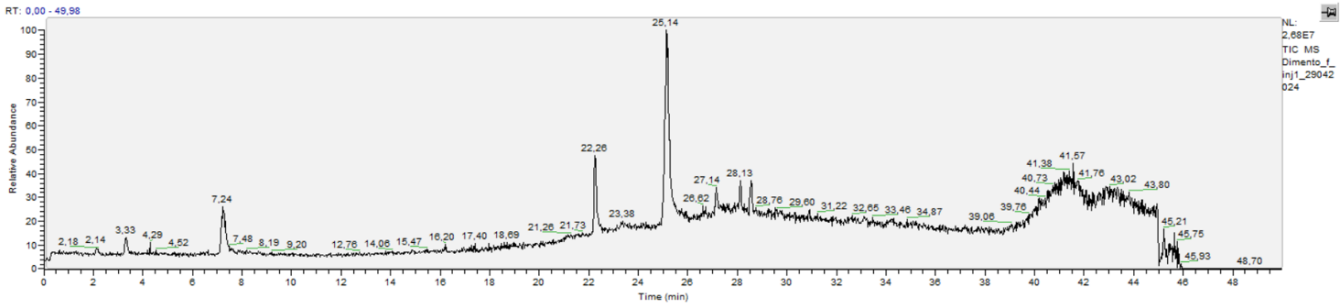
Το διάλυμα a με συγκέντρωση δραστικής ουσίας 7,500 ug/ml δεν αναλύθηκε, δεδομένου ότι είναι πολύ συμπυκνωμένο και πιθανότατα δεν χρειάζεται για το προφίλ των κορυφών ή για την ανίχνευσή μικρών ποσοτήτων φυτοφαρμάκου στο ορό αίματος.

Πίνακας 4-1: Το προφίλ των κορυφών του Dimento (όπως βρέθηκε στο διάλυμα b, το οποίο έχει την υψηλότερη συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος που αναλύθηκε).

Peak ID	RT	m/z	Intensity (a.u)	Possible Compound	Notes
Dimento_P1_388a	32.7	388.2	397,349,674	Dimethomorph Parent compound [M+H]+	Main Peak
Dimento_P2_301a	32.7	301.1	49,100,218	Loss of C_5H_9O (87 Da) from dimethomorph	Loss of C_5H_9O (87 Da)
Dimento_P3_388b	34.25	388.2	292,923,207	Dimethomorph Parent compound [M+H]+	Main Peak
Dimento_P4_301b	34.25	301.1	41,833,998	Loss of C_5H_9O (87 Da) from dimethomorph	Loss of C_5H_9O (87 Da)
Norleucine	7.31	132.1	44,288,978	Internal Standard	
Theofylline	22.15	181.20	10,456,504	Internal Standard	

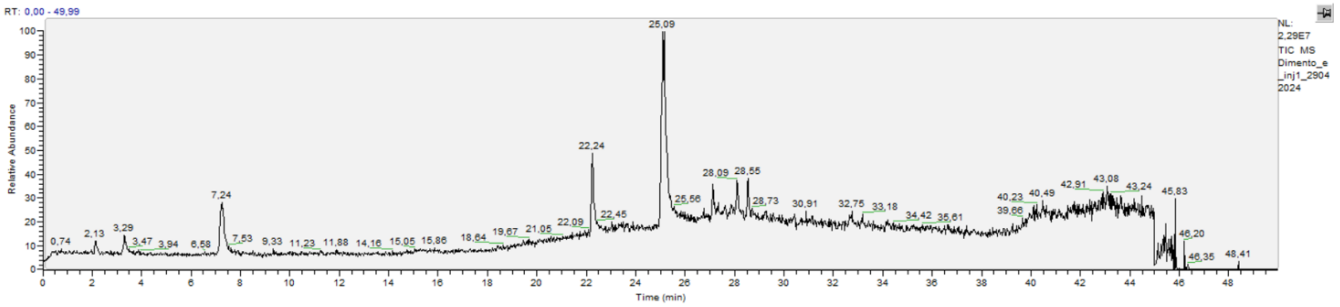
Διάλυμα f

(0.075 ug/ml)



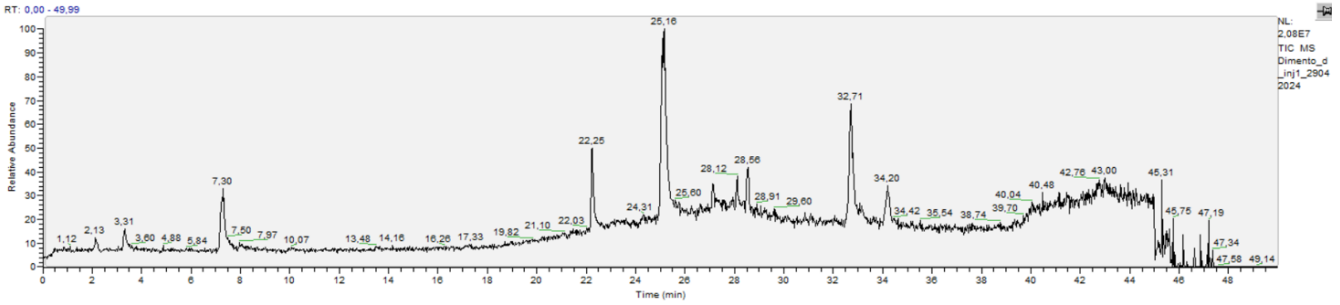
Διάλυμα e

(0.75 ug/ml)



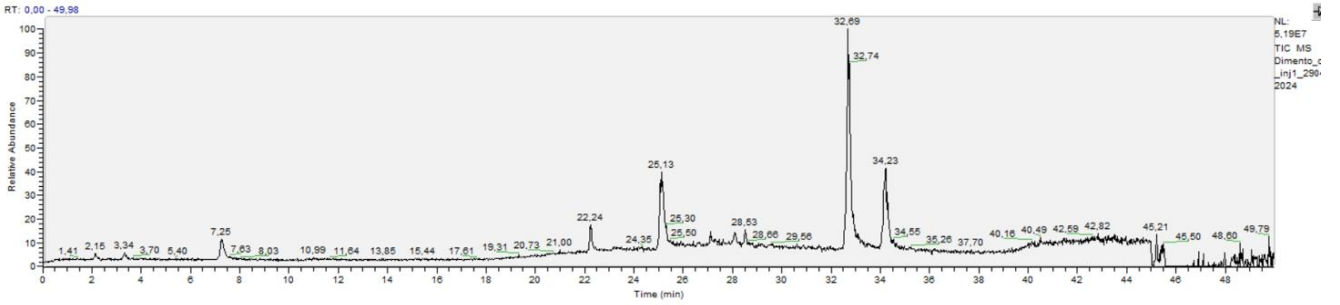
Διάλυμα d

(7.5 ug/ml)



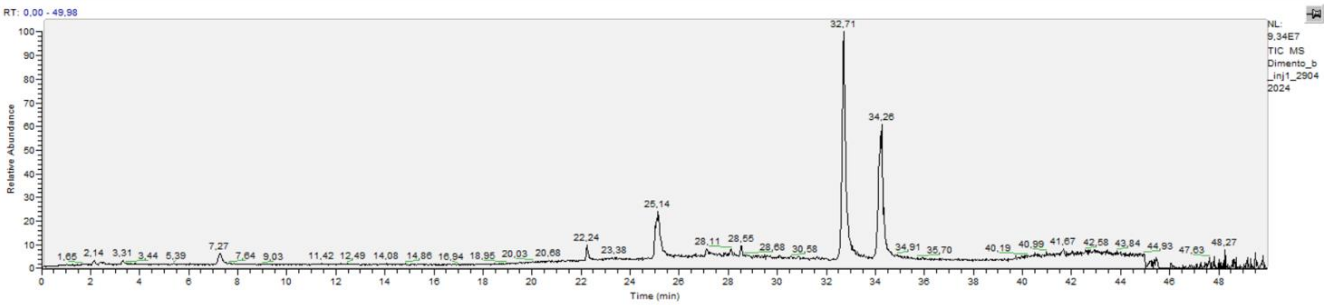
Διάλυμα c

(75 ug/ml)



Διάλυμα b

(750 ug/ml)



Εικόνα 4-2: Τα χρωματογραφήματα των πρότυπων διαλυμάτων του Dimento.

4.1.3.3 Πρότυπες Καμπύλες και γραμμικότητα

Για την δημιουργία των πρότυπων καμπυλών των κύριων κορυφών (Dimento P1, Dimento P3), το σύνολο των δεδομένων που ελήφθη κανονικοποιήθηκε ως προς το εσωτερικό πρότυπο Νορλευκίνη και οι σχετικές περιοχές κορυφής (RPAs) συναρτήσει των συγκεντρώσεων, καθώς και οι πίνακες των δεδομένων απεικονίζονται παρακάτω (πίνακες 4.2-4.3).

Πίνακας 4-2: Τα εμβαδά κορυφής των κορυφών Dimento P1, Dimento P2 και της Norleukine για τις διάφορες συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων.

Peak ID	RT	m/z	Dimento_b intensity (a.u)	Dimento_c Intensity (a.u)	Dimento_d Intensity (a.u)	Dimento_e Intensity (a.u)	Dimento_f Intensity (a.u)
Dimento P1	32.7	388.2	397,349,674	382,899	59,211,365	5,937,481	3,876,344
Dimento P3	34.25	388.2	292,923,207	92,097,636	19,067,441	2,091,151	3,569,591
Norleucine	7.31	132.1	44,288,978	46,382,899	50,963,987	50,185,545	55,620,020

Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση:

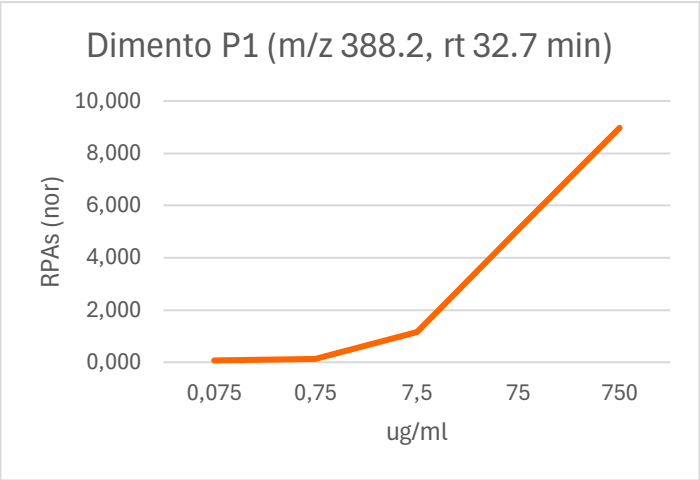
$$RPAs = \frac{Intensity\ (Dimento\ P1\ or\ Dimento\ P2\ )}{Intensity\ Norleucine} \qquad \text{Εξίσωση 4.1}$$

Με χρήση της εξίσωσης αυτής τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω πίνακα (πίνακας 4.3):

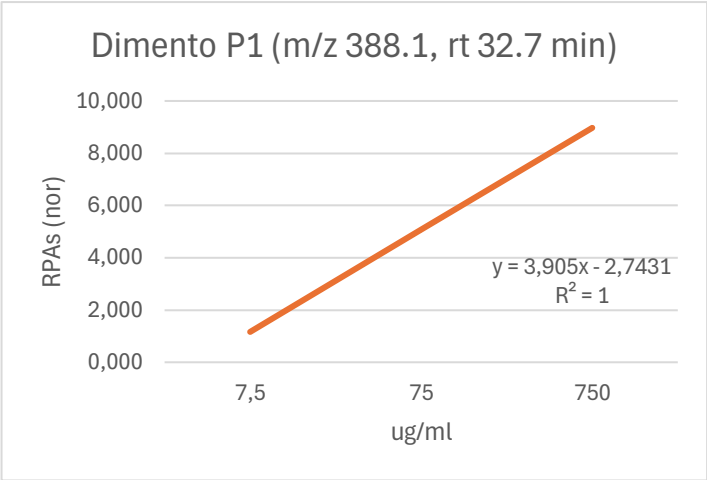
Πίνακας 4-3: Οι σχετικές περιοχές κορυφής των διάφορων συγκεντρώσεων των πρότυπων διαλυμάτων.

RPAs					
Peak ID	**Dimento_b 750 ug/ml**	**Dimento_c 75 ug/ml**	**Dimento_d 7.5 ug/ml**	**Dimento_e 0.75 ug/ml**	**Dimento_f 0.075 ug/ml**
D imento_P1	8.972	0.008	1.162	0.118	0.070
Dimento_P3	6.614	1.986	0.374	0.042	0.064
Norleucine	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

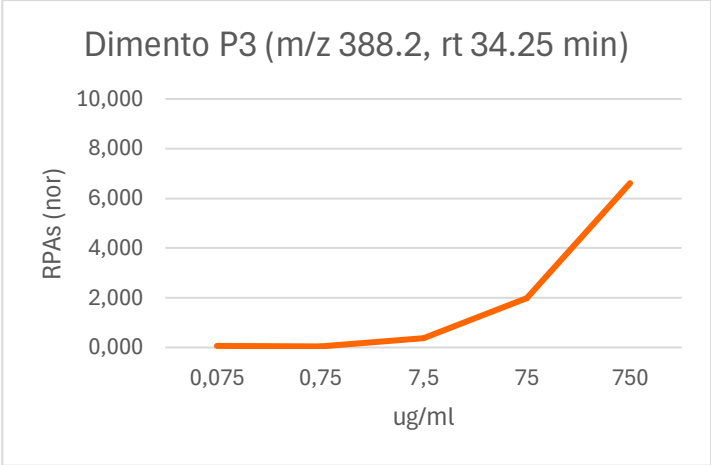
Γραμμικά διαγράμματα ελήφθησαν για το m/z 388.2 για τα εύρη συγκεντρώσεων από 7.5-750 ug/ml (οι συγκεντρώσεις αυτές αναφέρονται στα ανασυσταθέντα πρότυπα διαλύματα) για τους δύο διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης, 32.7 min και 34.25 min. Οι καμπύλες αυτές ήταν γραμμικές για τη συγκεκριμένη περιοχή, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις από 7.5 ug/ml δεν παρατηρήθηκαν κορυφές του μητρικού ιόντος (Διαγράμματα 4.1-4.4).



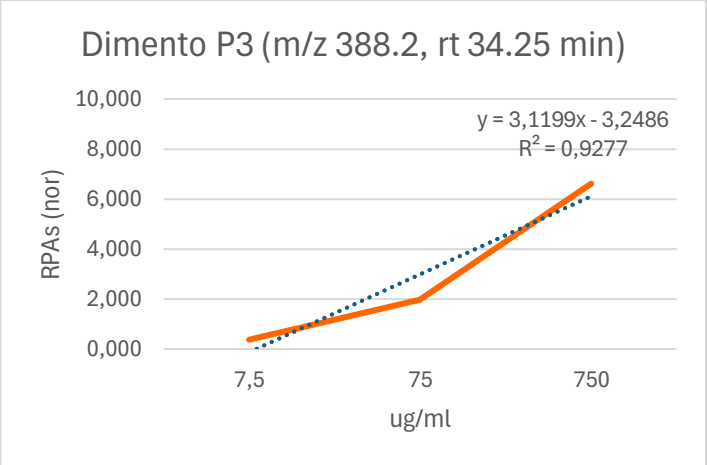
Διάγραμμα 4-1: Διάγραμμα σχετικών περιοχών κορυφών των Dimento P1 συναρτήσει των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων.



Διάγραμμα 4-2: Πρότυπη καμπύλη του Dimento P1 συναρτήσει των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων στη γραμμική περιοχή.



Διάγραμμα 4-3: :Διάγραμμα σχετικών περιοχών κορυφών του Dimento P3 συναρτήσει των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων.



Διάγραμμα 4-4: Πρότυπη καμπύλη του Dimento P3 συναρτήσει των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων στη γραμμική περιοχή.

4.1.3.4 Όριο ανίχνευσης (Limit Of Detection-LOD) και όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Quantitation-LOQ).

Η χαμηλότερη μετρούμενη συγκέντρωση ελήφθη ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού(LOQ) και όριο ανίχνευσης (LOD) και διαπιστώθηκε ότι ήταν 7.5 ug/ml για τη Dimethomorph.

4.1.3.5 Carryover

Μετά το δείγμα υψηλότερης συγκέντρωσης που αναλύθηκε (750 ug/ml για τη Dimethomorph), τα τυφλά δείγματα (HPLC-grade MeOH / HPLC-grade H_2O 9/1 v/v) αναλύθηκαν. Στα τυφλά δείγματα δεν παρατηρήθηκαν κορυφές, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει σημαντική επίδραση μεταφοράς της Dimethomorph (carry-over effect).

4.1.4 Υγρή Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας για το Dursban

Το φυτοφάρμακο Dursban περιέχει τη δραστική ουσία Chlorpyrifos, η οποία βρίσκεται σε αρχική συγκέντρωση 450 mg/ml στο εμπορικό σκεύασμα. Με διαδοχικές αραιώσεις της τάξης του 1/10, λάβαμε εύρος συγκεντρώσεων από $4.5 \cdot 10^{-7}$ έως 45 mg/ml. Μέσω της διαδικασίας εκχύλισης και την προσθήκη της HPLC-grade μεθανόλη/νερού και των εσωτερικών προτύπων τα καινούργια εύρη των συγκεντρώσεων της δραστικής ουσίας Chlorpyrifos κυμαίνονταν $6.75 \cdot 10^{-8}$ έως 6.75 mg/ml.

4.1.4.1 Επιλογή εύρους συγκεντρώσεων

Βρέθηκαν πέντε συνολικά έρευνες, μέσω των οποίων αποφασίστηκε το εύρος των συγκεντρώσεων της δραστικής ουσίας Chlorpyrifos για την ανάλυση του Dursban. Η πρώτη έρευνα αφορούσε την ανάλυση εγκληματολογικών σπλαχνικών δειγμάτων και σωματικών υγρών μέσω την αναλυτικής τεχνικής υγρής χρωματογραφίας φασματομετρίας μάζας (LC-MS), με χρήση κινητής φάσης μεθανόλης, στην οποία επιλέχθηκε εύρος συγκέντρωσης για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης 0.001-0.1 ug/ml και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης βρέθηκαν σε συγκέντρωση 0.005 ug/ml και 0.010 ug/ml αντίστοιχα (*Tabasum et al., 2022*). Στη δεύτερη έρευνα , η οποία αφορούσε της ανάλυση δειγμάτων ήπατος βούβαλου μέσω της αναλυτικής τεχνικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), με χρήση κινητής φάσης ακετονιτριλίου, δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη με εύρος συγκέντρωσης 0.03-12 ug/ml (*Kumar, P et al., 2011*). Η τρίτη έρευνα αφορούσε την ανάλυση δειγμάτων από το έδαφος μιας φυτείας φοινικέλαιου με χρήση της αναλυτικής τεχνικής αέριας χρωματογραφίας (GC), με κινητή φάση το n-εξάνιο, στην οποία επιλέχθηκε εύρος συγκέντρωσης 0.005-0.12 ug/ml για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης και βρέθηκε όριο ανίχνευσης 0.005 ug/ml (*Halimah et al., 2012*). Η τέταρτη έρευνα αφορούσε την ανάλυση δειγμάτων σε πλαγκτόν, όπου έχουν αναπτυχθεί σε περιβάλλον πλούσιο με θρεπτικά συστατικά, με τη χρήση της αναλυτικής τεχνικής αέριας χρωματογραφίας και χρήση εξανίου ως κινητή φάση όπου για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης επιλέχθηκε το εύρος συγκέντρωσης 0.0025-0.1 ug/ml (*Van Wijngaarden RP et al., 2005*). Τέλος, στην πέμπτη έρευνα πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε κύτταρα και μέσα καλλιέργειας με την αναλυτική τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (LCMS), με χρήση ακετονιτριλίου ως κινητή φάση και για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε εύρος συγκεντρώσεων 0.05-5 ug/ml και το όριο ποσοτικοποίησης του Chlorpyrifos στο αίμα βρέθηκε ίσο με 1 ng/ml (*Yang, Xiangkun et al., 2017*).

Βάσει όλων των παραπάνω πληροφοριών το εύρος συγκεντρώσεων που επιλέχθηκε για την παρούσα διπλωματική για την ανάλυση του Chlorpyrifos και την δημιουργία των πρότυπων καμπυλών είναι 0.0000675 – 0.675 mg/ml (0.0675-675 ug/ml). Επίσης λόγω των παραπάνω πληροφοριών των προαναφερθέντων άρθρων αποφασίστηκε να πραγματοποιηθούν αραιώσεις του Dursban μέχρι η τιμή της συγκέντρωσης του Chlorpyrifos να ισούται με $4.5 \cdot 10^{-7}$ mg/ml (0.00045 ug/ml) και μετά την εκχύλιση να ισούται με $6.75 \cdot 10^{-8}$ mg/ml (0.0000675 ug/ml).

4.1.4.2 Ανάκτηση μεταβολικών δεδομένων

Το φυτοφάρμακο Dursban έχει ως δραστική ουσία τον Chlorpyrifos με μοριακό βάρος 350.59 g/mol και μοριακού τύπο $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι ακόλουθες κορυφές είναι χαρακτηριστικές στα δείγματα ανθρώπινου αίματος μετά την έκθεση τους στον Chlorpyrifos (*Tang J et al. 2001).*

Πίνακας 4-4: Οι ενώσεις που είναι πιθανές να υπάρχουν στον ανθρώπινο οργανισμό, μετά την έκθεση του στον Chlorpyrifos
.

Πιθανή ένωση	Τύπος	m/z	Notes
Chlorpyrifos [M+H]+	Molecular Ion [M+H]+	350	
	3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) moiety	199	
	Ομάδα αιθυίου(C_2H_5)	314	
	Θραύσμα πυριδινόλης	125	
Μεταβολίτες			
3,5,6-Trichloro-2-pyridinol (TCP)	Molecular Ion [M+H]+	198	
	θραύσμα	160	Απώλεια HCl
	θραύσμα	125	Απώλεια CO
Chlorpyrifos-oxon	Molecular Ion [M+H]+	336	
	θραύσμα	181	θραύσμα Oxon
	θραύσμα	125	θραύσμα πυριδινόλης
Diethylthiophosphoric Acid (DETP	Molecular Ion [M+H]+	171	στο ανθρώπινο σώμα, μετά την έκθεση στον chlorpyrifos
	θραύσμα	153	απώλεια νερού
Diethylphosphoric Acid (DEP) (στο ανθρώπινο σώμα)	Molecular Ion [M+H]+	153	στο ανθρώπινο σώμα, μετά την έκθεση στον Chlorpyrifos
	θραύσμα	135	απώλεια νερού
Adducts (Προσθήκες)			
Na+			+22 Da
K+			+38 Da

Οι αναμενόμενες κορυφές δεν παρατηρήθηκαν ακόμη και στο πρότυπο διάλυμα υψηλότερης συγκέντρωσης. Παρατηρήθηκαν όμως κορυφές οι οποίες αν και δεν είναι αναγνωρίσιμες, υπάρχουν λόγω του Chlorpyrifos (πίνακας 4.5).

Πίνακας 4-5: Προφίλ κορυφών του Dursban (όπως βρέθηκε στο διάλυμα b, το πρότυπο διάλυμα με την υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε.

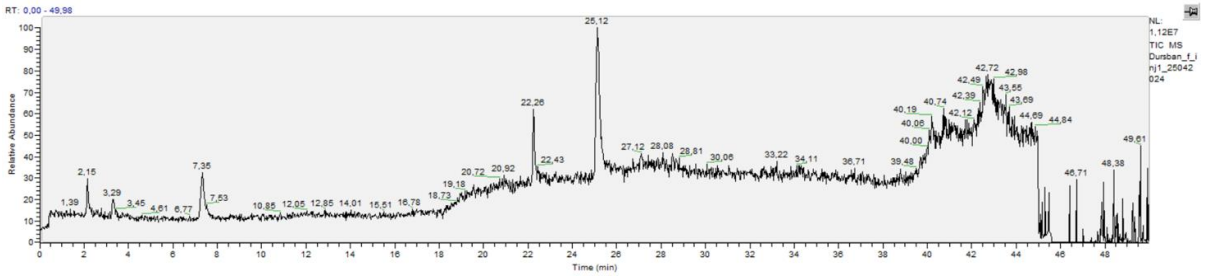
Peak ID	RT	m/z	Intensity (a.u)	Possible Compound
Dursban P1	22.91	668.90	200,613	Not identified
Dursban P2	23.05	327.00	574,663	Not identified

Dursban P3	23.05	344.00	560,334	Not identified
Dursban P4	23.05	349.30	419,896	Not identified
Dursban P5	23.60	690.00	297,001	Not identified
Dursban P6	24.02	437.30	1,202,708	Not identified
Dursban P7	24.15	622.20	290,545	Not identified
Dursban P8	24.70	503.10	2,148,315	Not identified
Dursban P9	24.70	525.40	2,107,455	Not identified
Dursban P10	25.00	219.20	3,363,494	Not identified
Dursban P11	25.00	264.00	2,271,413	Not identified
Dursban P12	25.00	547.30	1,906,401	Not identified
Dursban P13	25.00	564.20	1,880,762	Not identified
Dursban P14	25.00	569.40	2,171,961	Not identified
Dursban P15	25.51	576.40	7,108,327	Not identified
Dursban P16	25.51	635.20	1,430,329	Not identified
Dursban P17	25.51	652.40	1,723,331	Not identified
Dursban P18	25.51	657.40	1,213,708	Not identified
Dursban P19	25.95	598.40	11,823,893	Not identified
Dursban P20	25.77	620.70	15,843,470	Not identified
Dursban P21	25.86	642.70	19,838,525	Not identified
Dursban P22	25.98	664.70	22,638,443	Not identified
Dursban P23	26.12	686.70	21,444,615	Not identified
Dursban P24	26.25	708.60	18,569,904	Not identified
Dursban P25	26.35	730.60	16,154,311	Not identified
Dursban P26	26.42	752.60	12,138,266	Not identified
Dursban P27	26.52	774.70	10,571,184	Not identified
Dursban P28	26.92	538.60	2,997,344	Not identified
Dursban P29	27.02	560.60	2,994,257	Not identified
Dursban P30	27.02	678.50	820,146	Not identified
Dursban P31	27.15	582.50	2,996,926	Not identified

Dursban P32	27.23	604.60	2,617,582	Not identified
Dursban P33	27.97	641.10	3,674,443	Not identified
Dursban P34	28.06	670.40	2,783,573	Not identified
Dursban P35	28.06	705.40	945,149	Not identified
Dursban P36	28.27	757.50	1,718,550	Not identified
Dursban P37	28.54	783.00	1,055,241	Not identified
Norleucine	7.31	132.10	40,756,526	Internal Standard
Theofylline	22.15	181.20	37,688,398	Internal Standard

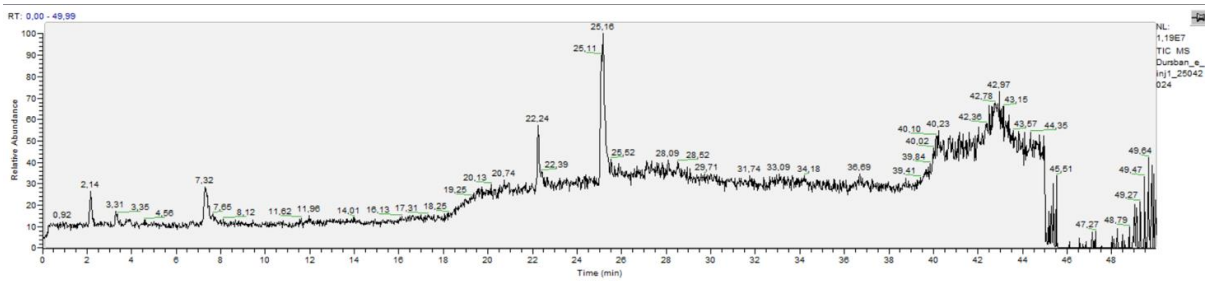
Διάλυμα f

(0.0675 ug/ml)



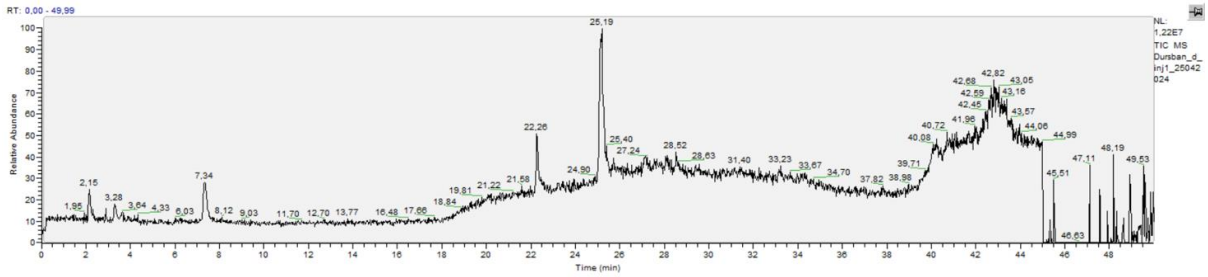
Διάλυμα e

(0.675 ug/ml)



Διάλυμα d

(6.75 ug/ml)

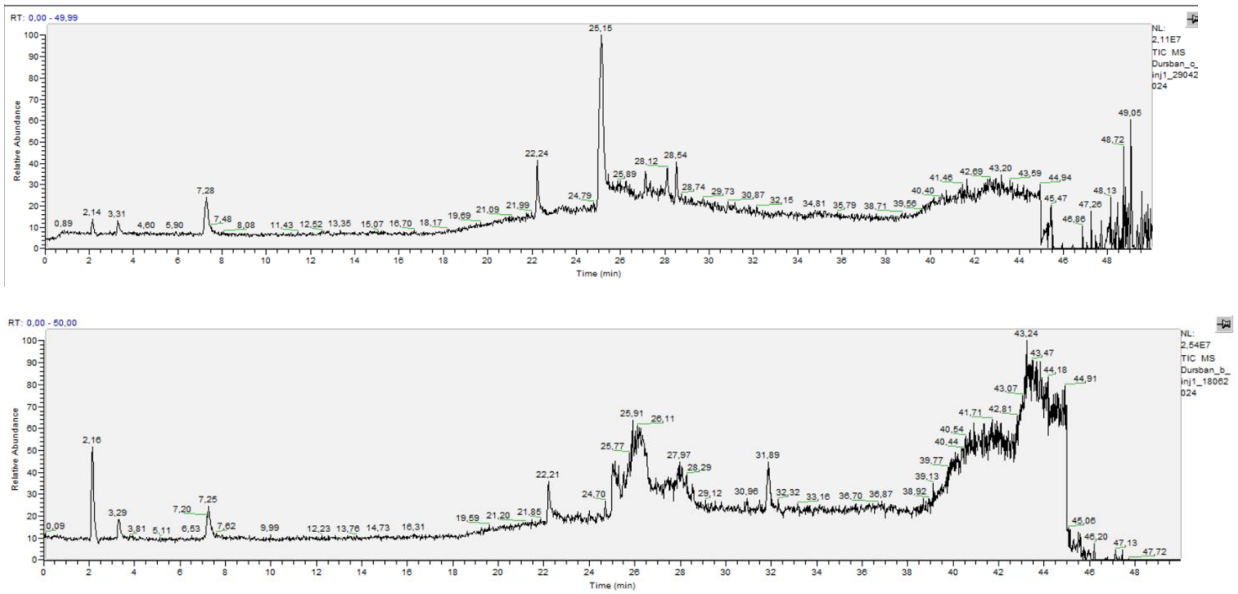


Διάλυμα c

(67.5 ug/ml)

Διάλυμα b

(675 ug/ml)



Εικόνα 4-3: Τα χρωματογραφήματα των ανασυσταθέντων πρότυπων διαλυμάτων του Dursban.

Το διάλυμα a συγκέντρωσης 6750 ug/ml δεν αναλύθηκε αφού είναι πολύ συμπυκνωμένο και πιθανότατα δεν απαιτείται για τη δημιουργία του προφίλ κορυφών ή για την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων φυτοφαρμάκων στο αίμα. Επιπλέον η ομάδα των πολλαπλών κορυφών μεταξύ 39-46 λεπτών και η κορυφή στα 2.16 λεπτά είναι χαρακτηριστικές για το μείγμα των διαλυτών μας.

4.1.4.3 Carryover

Μετά το δείγμα υψηλότερης συγκέντρωσης που αναλύθηκε (675 ug/ml για τον Chlorpyrifos), τα τυφλά δείγματα (MeOH ποιότητας HPLC/ H_2O ποιότητας HPLC 9/1 v/v) αναλύθηκαν. Στα τυφλά δείγματα δεν παρατηρήθηκαν κοινές κορυφές, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει σημαντική επίδραση μεταφοράς του Chlorpyrifos (carry-over effect).

4.1.5 Υγρή Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας για το Lentemul

Το φυτοφάρμακο Lentemul περιέχει τη δραστική ουσία 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) με μοριακή μάζα 221.04 g/mol, υπό τη μορφή 2,4- D άλατος διμεθυλαμίνης (DMA) με μοριακή μάζα 266.12 g/mol. Η 2,4-D βρίσκεται σε αρχική συγκέντρωση 600 mg/ml ή αλλιώς υπό μορφή άλατος διμεθυλαμίνης βρίσκεται σε αρχική συγκέντρωση 722.4 mg/ml στο εμπορικό σκεύασμα. Με διαδοχικές αραιώσεις της τάξης του 1/10, λάβαμε εύρος συγκεντρώσεων του 2,4-D από $6 \cdot 10^{-7}$ έως 60 mg/ml ή εύρος συγκεντρώσεων του DMA από $7.22 \cdot 10^{-7}$ έως 72.24 mg/ml. Μέσω της διαδικασίας της εκχύλισης και της προσθήκη της HPLC-grade μεθανόλη/νερού και των εσωτερικών προτύπων τα καινούργια εύρη των συγκεντρώσεων για τη δραστική ουσία 2,4-D κυμαίνονταν από $9 \cdot 10^{-8}$ έως 9 mg/ml ή τα καινούργια εύρη συγκεντρώσεων του DMA κυμαίνονταν από $1.08 \cdot 10^{-8}$ έως 10.836 mg/ml.

4.1.5.1 Επιλογή εύρους συγκεντρώσεων για τη χρωματογραφική ανάλυση

Βρέθηκαν συνολικά τρεις έρευνες, μέσω των οποίων αποφασίστηκε το εύρος των συγκεντρώσεων της δραστικής ουσίας 2.4-D για την ανάλυση του Lentemul και τη δημιουργία των πρότυπων

καμπυλών. Η πρώτη έρευνα αφορούσε την ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος γυναικείων και αρσενικών αρουραίων, μέσω της αναλυτικής τεχνικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), με χρήση ακετονιτριλίου ως κινητής φάσης, στην οποία το εύρος των συγκεντρώσεων για τη δημιουργία των πρότυπων καμπυλών κυμαινόταν από 0.1 έως 400 ug/ml και το όριο ανίχνευσης της δραστικής ουσίας ήταν 0.3 ug/ml (*Chen, Xiao et al., 2018*). Στη δεύτερη έρευνα πραγματοποιείται ανάλυση δειγμάτων νερού μέσω της αναλυτικής τεχνικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με χρήση ακετονιτριλίου ως κινητή φάση, στην οποία χρησιμοποιήθηκε εύρος συγκεντρώσεων που κυμαινόταν από 0.00001 έως 0.05 ug/ml και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ήταν 0.000004 ug/ml και 0.00001 ug/ml αντίστοιχα (*Orooji et al., 2021*). Τέλος, η τελευταία έρευνα αφορούσε την ανάλυση δειγμάτων χώματος από το έδαφος μέσω της μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), με χρήση ακετονιτριλίου ως κινητή φάση στην οποία το εύρος των συγκεντρώσεων για τη δημιουργία των πρότυπων καμπυλών κυμαινόταν από 0.002 έως 0.1 ug/ml (*Hay et al., 2000*).

Με βάση όλες τις παραπάνω πληροφορίες το εύρος των συγκεντρώσεων του 2,4-D που επιλέχθηκε για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία είναι 0.00009 – 0.9 mg/ml (0.09-900 ug/ml). Αξίζει επιπλέον να σημειωθεί ότι οι αραιώσεις του Lentemul πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις παραπάνω πληροφορίες μέχρι η τιμή της συγκέντρωσης του 2,4-D να ισούται με $6 \cdot 10^{-7}$ mg/ml (0.0006 ug/ml) και μετά την εκχύλιση να ισούται με $9 \cdot 10^{-8}$ mg/ml (0.00009 ug/ml).

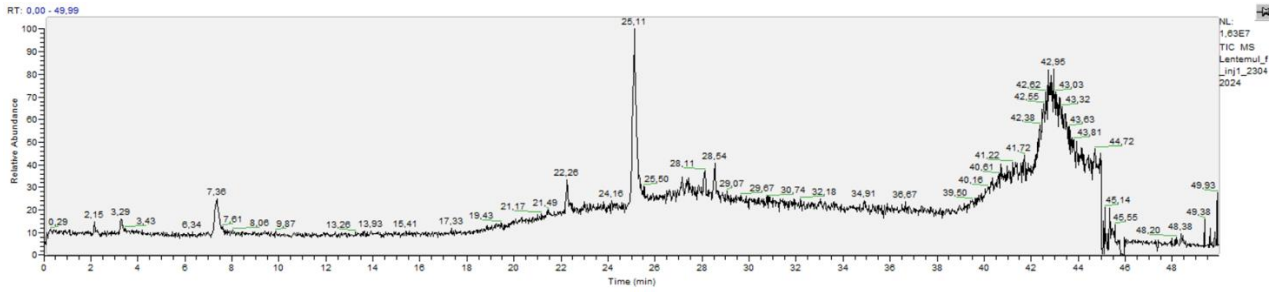
4.1.5.2 Ανάκτηση μεταβολικών δεδομένων

Δύο μικρές κορυφές παρατηρήθηκαν στα διαλύματα υψηλότερης συγκέντρωσης διάλυμα b (900 ug/ml) και διάλυμα c (90 ug/ml)): μια κορυφή m/z 576.8 σε χρόνο κατακράτησης 30.19 min και μία κορυφή m/z 248 σε χρόνο κατακράτησης 31.40 min. Η κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 30.19 min μπορεί να αποδοθεί στο μητρικό ιόν [M+H]+ του 2,4-D. Καμία κορυφή δεν παρατηρήθηκε που να αντιστοιχεί στο μητρικό ιόν [M+H]+ του DMA (m/z 267). Το εμβαδόν της κορυφής του μητρικού ιόντος [M+H]+ του 2,4-D είναι άγνωστο, διότι υπήρχε πρόβλημα με το λογισμικό. Αν και υπήρχε πρόβλημα με το λογισμικό, η κορυφή παρατηρήθηκε.

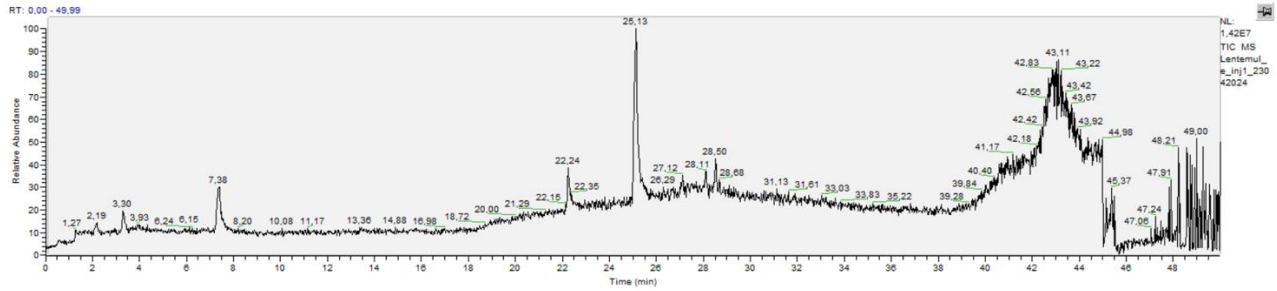
Πίνακας 4-6: Το προφίλ των κορυφών του Lentemul (όπως βρέθηκε στο διάλυμα b, το πρότυπο διάλυμα με την υψηλότερη συγκέντρωση του 2,4-D).

Peak ID	RT	m/z	Intensity (a.u.)	Possible compound	Notes
Lentemul P1	30.19	576.80	1,110,957	Not identified	
Lentemul P2	31.90	222.90	N/A	2,4-D	Main peak [M+H]+
Lentemul P3	31.40	248.0	2,607,720	Not identified	
Norleucine	7.31	132.1	49,197,718	Internal Standard	
Theofylline	22.15	181.20	48,818,127	Internal Standard	

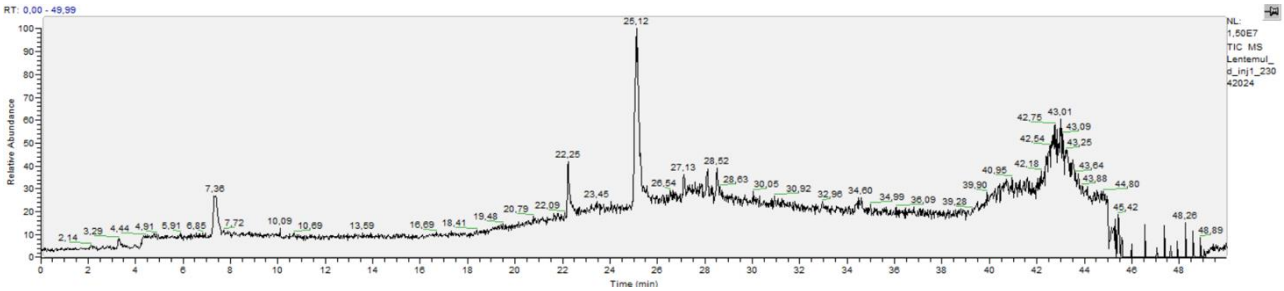
Διάλυμα f
(0.09 ug/ml)



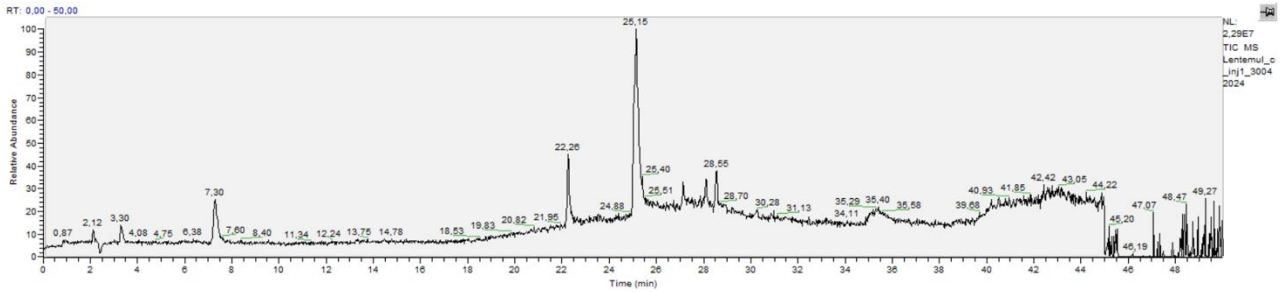
Διάλυμα e
(0.9 ug/ml)



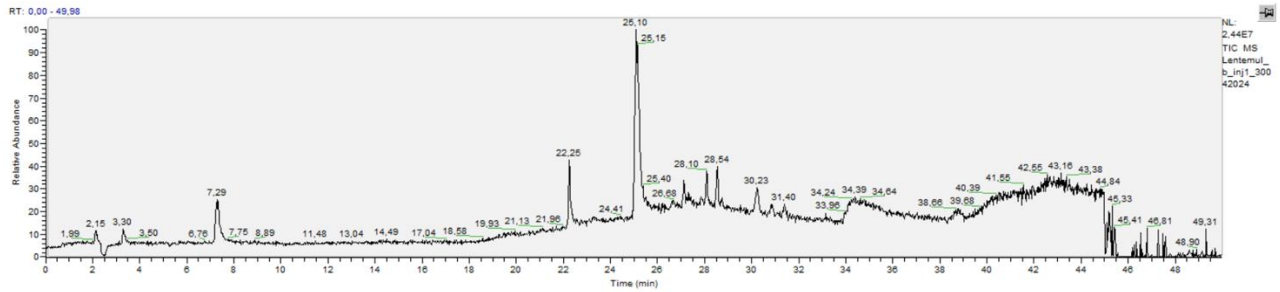
Διάλυμα d
(9 ug/ml)



Διάλυμα c
(90 ug/ml)



Διάλυμα b
(900 ug/ml)



Εικόνα 4-4: Τα χρωματογραφήματα των ανασυσταθέντων πρότυπων διαλυμάτων του Lentemul.

Η ομάδα υψηλών κορυφών μεταξύ 39-46 λεπτών και η κορυφή στα 2.16 λεπτά είναι χαρακτηριστικές για το μείγμα των διαλυτών μας.

4.1.5.3 Carryover

Μετά το δείγμα υψηλότερης συγκέντρωσης που αναλύθηκε (900 ug/ml για το 2.4-D), τα τυφλά δείγματα (MeOH ποιότητας HPLC/ H_2O ποιότητας HPLC 9/1 v/v) αναλύθηκαν. Στα τυφλά δείγματα δεν παρατηρήθηκαν P1 κορυφές του Lentemul, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει σημαντική επίδραση μεταφοράς του 2,4-D (carry-over effect).

4.1.6 Ανίχνευση φυτοφαρμάκων Vertimec και Switch

Σε παράλληλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μεταβολομικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας βρέθηκαν επίσης τα φυτοφάρμακα Vertimec και Switch στο ορό αίματος εγκύων γυναικών. Τα φυτοφάρμακα που αναλύθηκαν συνολικά ήταν 7. Το Dimento, το Dursban και το Lentemul (για τα οποία έχει πραγματοποιηθεί εκτενής ανάλυση στην παρούσα διπλωματική) και τα φυτοφάρμακα Decis με δραστική ουσία την Deltamethrin, Sivanto με δραστική ουσία το Flupyrafidurone, το Switch με δραστικές ουσίες το cyprodinil και fludioxonil και το Vertimec με δραστική ουσία την Abamectin (στη διπλωματική εργασία της κας. Τσιούνη).

Το Switch που χρησιμοποιήθηκε στην παράλληλη έρευνα είναι το εμπορικά διαθέσιμο Switch (Syngenta Hellas), με τη μορφή υδατοδιαλυτών κόκκων. Αποτελείται από Cyprodinil 37.5 %w/w, C14H15N3, με μοριακή μάζα 225.29 g/mol και Fludioxonil 25 %w/w C12H6F2N2O2, με μοριακή μάζα 248.04 g/mol. Το Switch περιέχει επίσης προϊόντα αντίδρασης ναφθαλίνης, 1-3 %w/w και άλλες αδρανείς ενώσεις 35.8 %w/w.

Το Vertimec που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτό που διατίθεται στην αγορά (Syngenta Hellas). Το .Vertimec είναι ένα υδατοδιαλυτό γαλακτωματοποιήσιμο συμπύκνωμα (EC). Αποτελείται από .Abamectin 1,8% w/v, μοριακής μάζας 1732.10 g/ml,το οποίο είναι μείγμα 80% αβερμεκτίνης B1a, με μοριακή μάζα 875.52 g/mol και 20% αβερμεκτίνης B1b με μοριακή μάζα 858.48 g/mol. Το Vertimec περιέχει επίσης κυκλοεξανόλη, 50-70 %w/w (MW 100,158 g/mol), 2,6-δι-τερτ-βουτυλο-p-κρεσόλη, 1-2, %w/w (MW 276.5 g/mol) και άλλες (αδρανείς) ουσίες, 97,96 %w/w.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα προφίλ κορυφών του Switch και του Vertimec μέσω της ανάλυσης του με υγρή χρωματογραφίας φασματομετρίας μάζας για εύρος συγκέντρωσης για το Switch 0.075-750 ug/ml (Cyprodinil) και 0.049- 490 ug/ml (Fludioxonil) και εύρος συγκέντρωσης για το Vertimec 0.00270- 270 ug/ml (Abamectin)

Πίνακας 4-7: Προφίλ κορυφών του Switch (όπως βρέθηκε στο διάλυμα b, το πρότυπο διάλυμα υψηλότερης συγκέντρωσης)

Peak Numebr	Retention Time	m/z	Intensity (a.u.)	Possible Compound	Notes
Switch_P1	33.85	226.3	246,553,257	Cyprodinil	Main peak [M+H]+
Switch_P2	34.08	241.1	23,433,420	Not identified	
Switch_P3	34.08	258.7	45,895,954	Not identified	
Switch_P4	2.4	498.6	11,677,384	Not identified	
Switch_P5		566.6	8,708,300	Not identified	
Switch_P6		634.5	10,062,494	Not identified	
Switch_P7		702.8	19,715,452	Not identified	
Switch_P8		770.6	22,636,279	Not identified	
Norleucine	7.31	132.1	45,895,954	Internal Standard	

Πίνακας 4-8: Προφίλ κορυφών του Vertimec (όπως βρέθηκε στο διάλυμα b, το πρότυπο διάλυμα υψηλότερης συγκέντρωσης)

Peak Number	Retention Time	m/z	Intensity (a.u)	Possible Compound
Vertimec_P1	23.57	371.1	1,350,792	Not identified
Vertimec_P2	23.57	393.3	2,323,600	Not identified
Vertimec_P3	23.99	415.2	2,584,142	Not identified
Vertimec_P4	23.99	437.3	4,058,194	Not identified
Vertimec_P5	24.36	459.2	5,241,374	Not identified
Vertimec_P6	24.36	481.3	6,866,643	Not identified
Vertimec_P7	24.68	503.4	9,731,926	Not identified
Vertimec_P8	24.68	525.4	10,409,654	Not identified
Vertimec_P10	24.96	547.5	14,021,562	Not identified
Vertimec_P9	24.96	569.4	16,675,699	Not identified
Vertimec_P11	25.23	591.4	21,646,709	Not identified
Vertimec_P12	25.23	613.4	17,863,628	Not identified
Vertimec_P13	25.47	635.5	28,456,623	Inert compound
Vertimec_P14	25.47	657.5	20,947,071	Inert compound adduct
Vertimec_P15	25.47	652.6	24,106,954	Inert compound adduct
Vertimec_P16	25.68	679.5	23,999,193	Inert compound adduct
Vertimec_P17	25.68	696.7	26,597,144	Inert compound adduct
Vertimec_P18	25.68	701.6	21,431,324	Not identified
Vertimec_P19	25.85	723.6	15,192,852	Not identified
Vertimec_P20	25.85	740.5	21,128,229	Not identified
Vertimec_P21	25.85	745.6	17,633,515	Not identified
Vertimec_P22	26.04	767.5	8,450,028	Not identified
Vertimec_P23	26.04	784.5	16,780,125	Not identified
Vertimec_P24	26.04	789.6	14,087,459	Not identified
Vertimec_P25	26.27	509.6	21,117,858	Not identified
Vertimec_P26	26.4	450.5	13,857,254	Not identified
Vertimec_P27	26.4	531.5	29,219,961	Not identified
Vertimec_P28	26.51	472.7	21,765,316	Not identified
Vertimec_P29	26.51	553.6	43,393,464	Avermectin B_{1b} fragment

Vertimec_P30	26.63	575.6	54,666,998	Vertimec_P29 Na^+ adduct
Vertimec_P31	26.74	597.7	68,138,452	Vertimec_P29 Na^+ adduct
Vertimec_P32	26.85	619.7	78,452,897	Vertimec_P29 Na^+ adduct
Vertimec_P33	26.94	641.7	91,381,381	Vertimec_P29 Na^+ adduct
Vertimec_P34	27.01	663.5	74,448,246	Vertimec_P29 Na^+ adduct
Vertimec_P35	27.01	685.9	76,796,965	Vertimec_P29 Na^+ adduct
Vertimec_P36	27.18	707.7	52,598,934	Vertimec_P29 Na^+ adduct
Vertimec_P37	27.24	729.6	36,422,193	Vertimec_P29 Na^+ adduct
Vertimec_P38	27.34	751.6	27,828,681	Vertimec_P29 Na^+ adduct
Vertimec_P39	27.41	773.6	18,787,650	Vertimec_P29 Na^+ adduct
Vertimec_P40	27.45	795.8	8,911,604	Vertimec_P29 Na^+ adduct
Vertimec_P41	27.6	567.6	6,736,588	**Avermectin B_{1a} fragment**
Vertimec_P42	27.66	589.5	2,684,948	Vertimec_P41 Na^+ adduct
Vertimec_P43	27.66	665.9	6,830,370	Not identified
Vertimec_P44	27.66	680.3	6,523,355	Not identified
Vertimec_P45	27.72	695.2	5,612,276	Not identified
Vertimec_P46	27.75	611.6	3,940,296	Vertimec_P41 Na^+ adduct
Vertimec_P47	27.83	622.6	2,392,774	Not identified
Vertimec_P48	27.83	633.9	2,395,671	Vertimec_P41 Na^+ adduct
Vertimec_P49	27.83	724.6	3,026,095	Not identified

4.1.7 Όρια Ανίχνευσης των φυτοφαρμάκων (Limit of Detection-L0D)

Βάσει των αναλύσεων των 7 φυτοφαρμάκων μέσω της συγκεκριμένης διπλωματικής και της παράλληλης έρευνας που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μεταβολομικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας, βρέθηκαν τα κατώτερα όρια ανίχνευσης της κάθε δραστικής ουσίας του κάθε φυτοφαρμάκου, μέσω την αναλυτικής τεχνικής υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS) (πίνακας 4.9).

Πίνακας 4-9: Τα όρια ανίχνευσης των δραστικών ουσιών των φυτοφαρμάκων.

Φυτοφάρμακα	Δραστική ουσία	Όριο ανίχνευσης (LOD)
Dursban	Chlorpyrifos	67.5 ug/ml
Dimento	Dimethomorph	7.5 ug/ml
Lentemul	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), υπό τη μορφή 2,4-D άλατος διμεθυλαμίνης	90 ug/ml
Vertimec	Abamectin (80% avermectin B1a και 20% avermectin B1b)	0.54 ug/ml
Switch	Cyprodinil και Fludioxonil	7.5 ug/ml (Cyprodinil)
Sivanto	Flupyradifurone	$3 \cdot 10^{-7}$ ug/ml
Decis	Deltamethrin	37.5 ug/ml

4.1.8 Υγρή Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας για το Αίμα

Ο ορός αίματος εγκύων γυναικών αναλύθηκε με τη τεχνική υγρής χρωματογραφίας φασματομετρίας μάζας με σκοπό την ανίχνευση των φυτοφαρμάκων Dimento, Dursban και Lentemul. Στο αίμα δύο κορυφές παρόμοιες με τις κορυφές P10 και P11 του Dursban ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα, εκτός από το δείγμα 16A. Οι κοινές κορυφές μεταξύ των διαλυτών που χρησιμοποιήσαμε και των δειγμάτων αίματος δεν λήφθηκαν υπόψιν, καθώς και πρόσθετες κορυφές στο αίμα που δεν αποδίδονταν στην παρουσία των φυτοφαρμάκων (θεωρούμαι ότι είναι κορυφές από ουσίες που υπάρχουν στο ίδιο το αίμα).

Επίσης βρέθηκαν οι κορυφές Vertimec (P32, P33 και P34) και οι κορυφή Switch P7, σε όλα τα δείγματα ορού αίματος των εγκύων γυναικών.

Πίνακας 4-10: Οι κορυφές του φυτοφαρμάκου Dursban στα δείγματα των ορών αίματος.

Sample	Peak ID	Retention Time (min)	m/z	Mean Intensity (a.u.)	Type
4A	Dursban P10	25.00	219.20	4,953,729 ± 268,861	Not Identified
	Dursban P11	25.00	264.00	1,787,582 ± 442,744	Not Identified
17A	Dursban P10	25.00	219.20	2,504,179 ± 369,958	Not Identified
	Dursban P11	25.00	264.00	1,543,433 ± 267,857	Not Identified
21A	Dursban P10	25.00	219.20	5,131,103 ± 46,422	Not Identified
	Dursban P11	25.00	264.00	3,164,636 ± 248,489	Not Identified
17A Liquid Hadler	Dursban P10	25.00	219.20	1,668,201 ± 201,578	Not Identified
	Dursban P11	25.00	264.00	1,081,302 ± 87,038	Not Identified
21A Liquid Handler	Dursban P10	25.00	219.20	1,698,446 ± 594,073	Not Identified
	Dursban P11	25.00	264.00	1,290,760 ± 336,336	Not Identified
ALL	Norleucine	7.31	131.2	23,773,272 ± 1,029	Internal Standard

Οι κορυφές Dursban P10 και Dursban P11 που ελήφθησαν από κάθε δείγμα κανονικοποιήθηκαν ως προς το εσωτερικό πρότυπο νορλευκίνη, μέσω της εξίσωσης:

$$RPA = \frac{Intensity\ (\text{Dursban P10}\ or\ \text{Dursban P11}\ )}{Intensity\ Norleucine}$$ Εξίσωση 4.2

Από τα αποτελέσματα των σχετικών περιοχών κορυφής (RPAs) βγήκε ένας μέσος όρος των σχετικών περιοχών κορυφής και η τυπική απόκλιση τους(Standard Deviation, STD) (πίνακας 4.11).

Πίνακας 4-11: Οι μέσες σχετικές περιοχές κορυφών, των κορυφών P10 και P11 του Dursban.

Sample	Peak ID	Mean Relative Peak Area (RPA) on Nor
4A	Dursban P10	0.210 ± 0.024
	Dursban P11	0.077 ± 0.023
17A	Dursban P10	0.062 ± 0.001
	Dursban P11	0.038 ± 0.002
21A	Dursban P10	0.163 ± 0.005
	Dursban P11	0.100 ± 0.004
17A Liquid Hadler	Dursban P10	0.037 ± 0.008
	Dursban P11	0.024 ± 0.001
21A Liquid Handler	Dursban P10	0.044 ± 0.018
	Dursban P11	0.034 ± 0.010
Norleucine		1.000

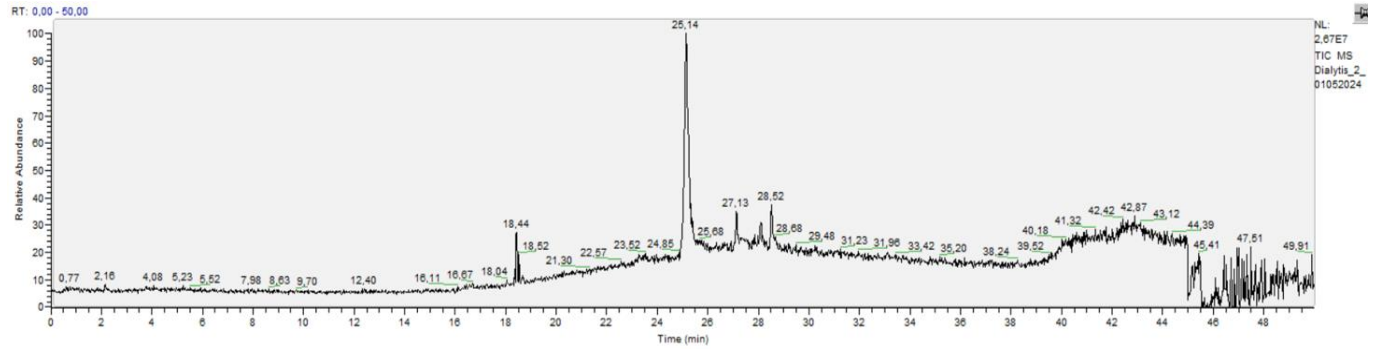
Συνοπτικά οι κορυφές των φυτοφαρμάκων Vertimec και Switch που βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα (4A, 16A, 17A και 21A, 17A_liquid handler και 21A_liquid handler), οι μέσες περιοχές των κορυφών και οι μέσες σχετικές περιοχές των κορυφών βάσει της νορλευκίνης (πίνακας 4.12).

Πίνακας 4-12: Τα αποτελέσματα της ανάλυσης όλων των δειγμάτων, για την εύρεση των κορυφών του Switch και Vertimec.

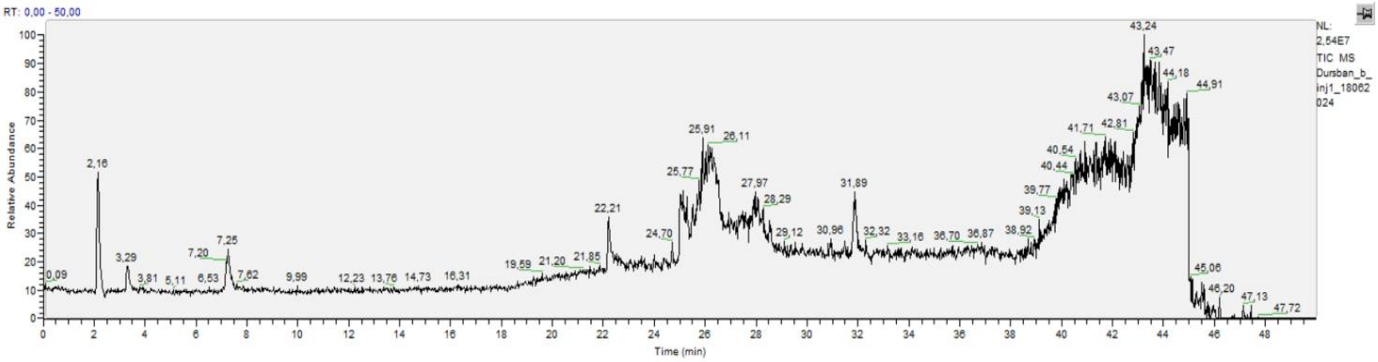
Sample ID	Peak ID	RT	m/z	Mean Intensity	Mean Relative Peak Areas	Type
4A	Vertimec_P32	26.85	619.7	2320434 ± 265962	0,097 ± 0.005	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Vertimec_P33	26.94	641.7	9086856 ± 1933864	0,389 ± 0.105	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Vertimec_P34	27.01	663.5	594956 ± 22670	0,025 ± 0.002	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Switch_ P7	2.4	702.8	1059950 ± 7545	0,045 ± 0.003	Not identified, probably oligomer or Cyprodinil / Fludioxonil derivative
	Vertimec_P32	26.85	619.7	609867 ± 38125	0,024 ± 0.001	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Vertimec_P33	26.94	641.7	1571939 ± 199186	0,087 ± 0.004	Vertimec_P29 Na^+ adduct

16A	Vertimec_P34	27.01	663.5	191619 ± 18770	0,013 ± 0.001	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Switch_ P7	2.4	702.8	3220293 ± 169669	0,047 ± 0.005	Not identified, probably oligomer or Cyprodinil / Fludioxonil derivative
17A	Vertimec_P32	26.85	619.7	8343901 ± 94246	0,021 ± 0.012	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Vertimec_P33	26.94	641.7	4076622 ± 62945	0,103 ± 0.000	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Vertimec_P34	27.01	663.5	540956 ± 58017	0,014 ± 0.012	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Switch_ P7	2.4	702.8	1891094 ± 211754	0,049 ± 0.000	Not identified, probably oligomer or Cyprodinil / Fludioxonil derivative
21A	Vertimec_P32	26.85	619.7	276842 ± 36424	0,009 ± 0.001	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Vertimec_P33	26.94	641.7	1798400 ± 382761	0,058 ± 0.014	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Vertimec_P34	27.01	663.5	210738 ± 20794	0,007 ± 0.001	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Switch_ P7	2.4	702.8	2057968 ± 232,313	0,066 ± 0.010	Not identified, probably oligomer or Cyprodinil / Fludioxonil derivative
17A Liquid Handler	Vertimec_P32	26.85	619.7	903616 ± 131184	0,020 ± 0.002	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Vertimec_P33	26.94	641.7	5358899 ± 747355	0,119 ± 0.015	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Vertimec_P34	27.01	663.5	704329 ± 112031	0,016 ± 0.004	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Switch_ P7	2.4	702.8	24808010 ± 1118237	0,0542 ± 0.018	Not identified, probably oligomer or Cyprodinil / Fludioxonil derivative
21A Liquid Handler	Vertimec_P32	26.85	619.7	402693 ± 40178	0,011 ± 0.001	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Vertimec_P33	26.94	641.7	2259812 ± 92741	0,059 ± 0.003	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Vertimec_P34	27.01	663.5	416099 ± 23419	0,011 ± 0.001	Vertimec_P29 Na^+ adduct
	Switch_ P7	2.4	702.8	2064232 ± 274356	0,054 ± 0.007	Not identified, probably oligomer or Cyprodinil / Fludioxonil derivative
ALL	Norleucine	7.31	131.2	23,773,271.67 ± 1,028.58	1.000 ± 0.000	Internal Standard

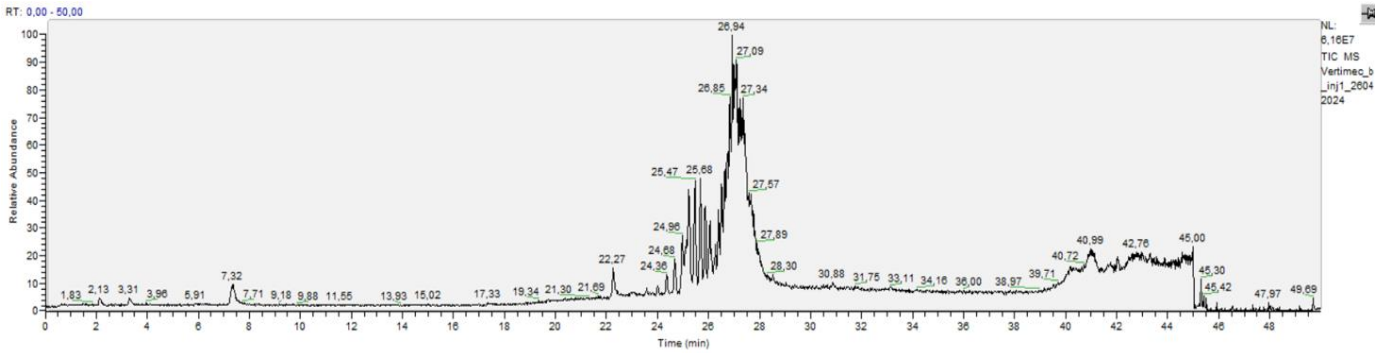
Plain Solvent Chromatograph



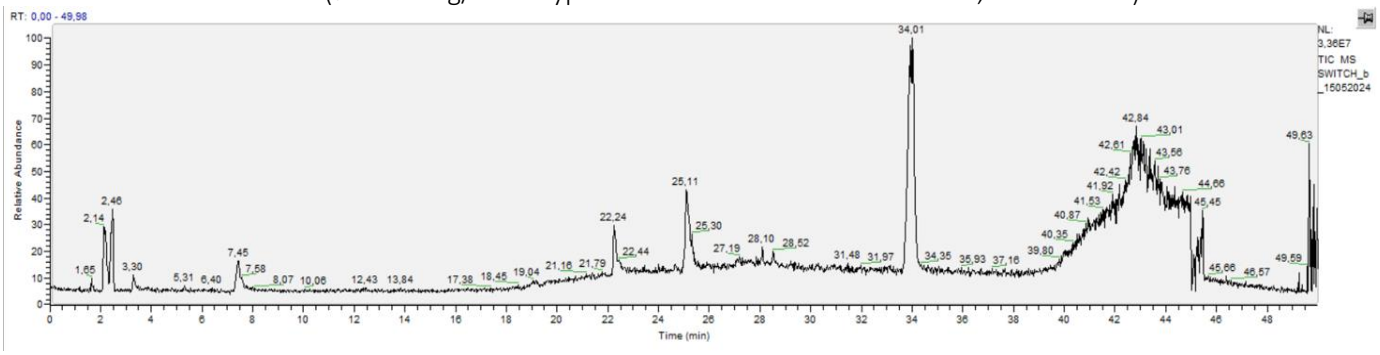
Dursban (675 ug/ml, solution b)



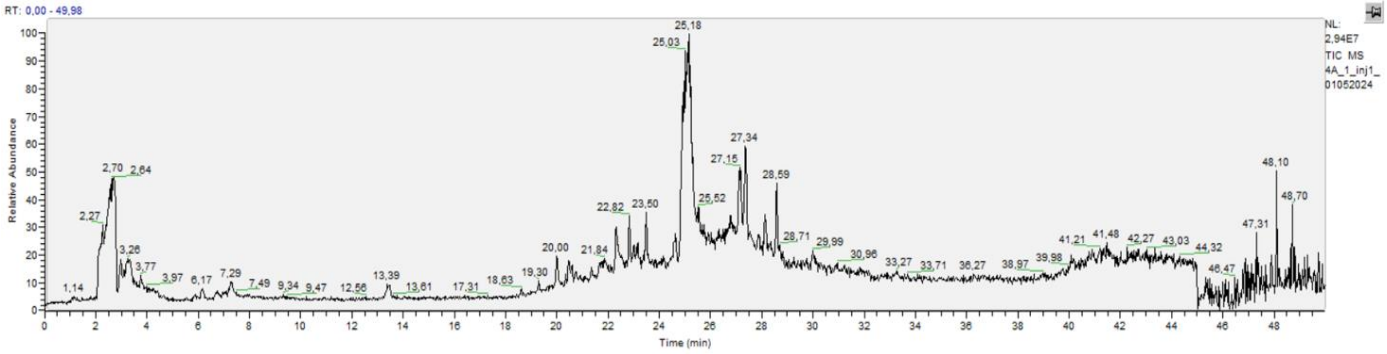
Vertimec (270 ug/ml, solution “b”)



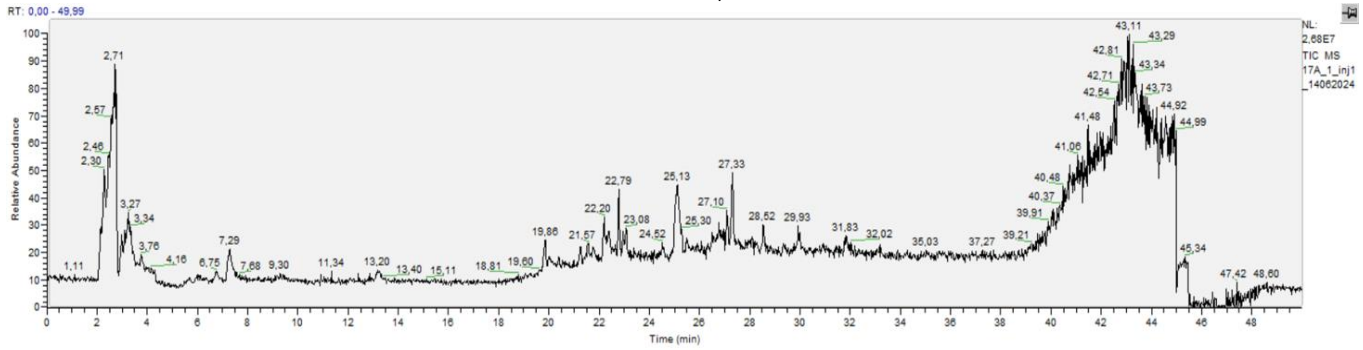
Switch (7.5x103 ug/ml in Cyprodinil and 4.9 x103 in Fludioxonil, solution “b”)



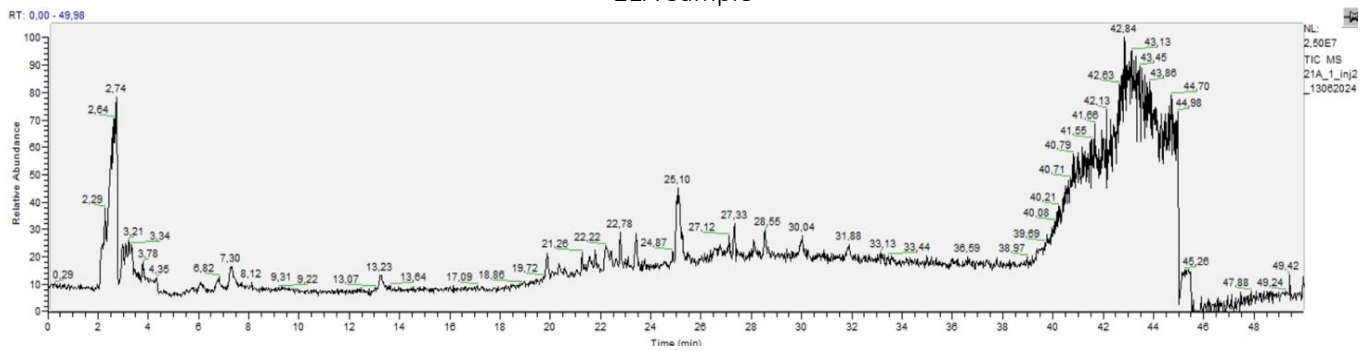
4A Sample



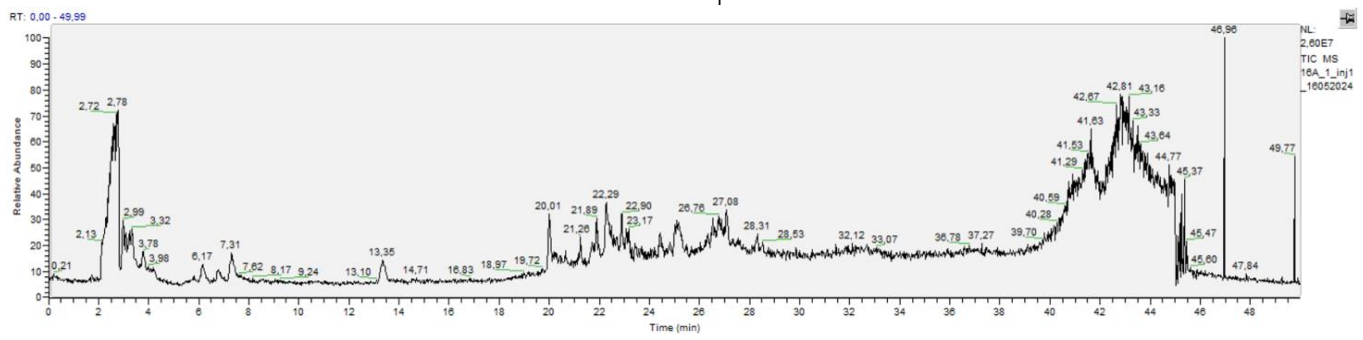
17A Sample



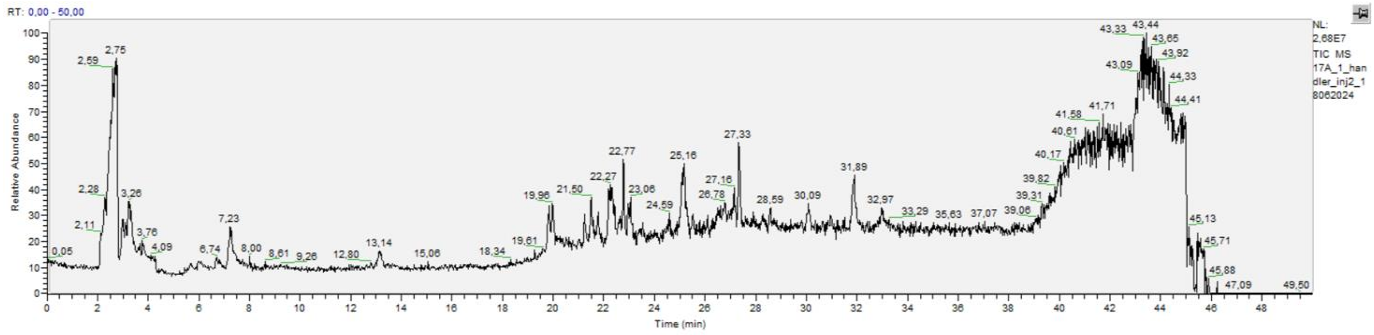
21A Sample



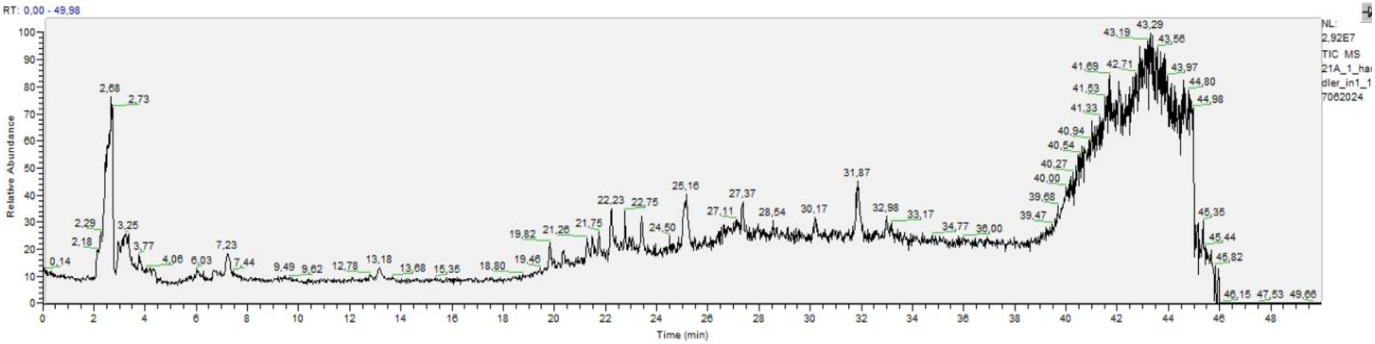
16A Sample



17A Liquid Handler Sample



21A Liquid Handler Sample



Εικόνα 4-5: Τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων αίματος, σε σύγκριση με το χρωματογράφημα του διαλύτη και του φυτοφαρμάκου Dursban.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία διερευνά την έκθεση των εγκύων γυναικών σε φυτοφάρμακα, μέσω της μεταβολομικής ανάλυσης του ορού αίματος των εγκύων γυναικών με χρήση υγρής χρωματογραφίας φασματομετρίας μάζας. Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα διπλωματική μελέτα τα φυτοφάρμακα Dimento, Dursban και Lentemul ως ενδοκρινικούς διαταράκτες, δηλαδή εξωγενείς χημικές ουσίες, οι οποίες διαταράσσουν την ομαλή λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος των ανθρώπων, και πως τα συγκεκριμένα φυτοφάρμακα μπορούν να διαταράσσουν τη φυσιολογία του.

Η κάθε έκθεση στην οποία ένα άτομο έχει υποβληθεί από τη στιγμή της σύλληψης του μέχρι τη στιγμή του θανάτου του είναι το εκθέτωμα. Το εκθέτωμα προσπαθεί να συλλάβει το εύρος των εκθέσεων του ανθρώπου σε συνθετικές χημικές ουσίες, όπως είναι τα φυτοφάρμακα και αποτελεί ένα μέσω συστηματικής και αναγνωστικής προσέγγισης του αυξανόμενου αριθμού των χημικών ουσιών που μολύνουν το περιβάλλον, με εφαρμογές κυρίως στον τομέα των επιστημών υγείας. Ως συνέχεια της συγκεκριμένης έρευνας, μπορεί να συσχετιστεί ο τρόπος ζωής, η εργασία και το περιβάλλον των γυναικών, μέσω των ανώνυμων ερωτηματολογίων που έχουν συμπληρωθεί, με κωδική ονομασία, τον κωδικό Sample ID, για την περαιτέρω επεξήγηση των αποτελεσμάτων. Μεγάλης σημασίας είναι η άμεση έκθεση των εγκύων γυναικών ή των συζύγων τους σε φυτοφάρμακα, καθώς όπως έχει ήδη αναφερθεί η έκθεση των εγκύων γυναικών κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης σε φυτοφάρμακα μπορεί να έχει άμεσες επιπτώσεις στο έμβρυο και η έκθεση των αντρών σε φυτοφάρμακα πριν την σύλληψη του εμβρύου μπορεί να έχει άμεσες επιπτώσεις στην ποιότητα του σπέρματος τους και κατά επέκταση στην διαδικασία ανάπτυξης του εμβρύου.

Όσον αφορά στο πειραματικό κομμάτι οι αναλύσεις των φυτοφαρμάκων πραγματοποιήθηκαν βάσει του πρωτοκόλλου του εργαστηρίου της Μεταβολομικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας. Οι αραιώσεις των φυτοφαρμάκων που πραγματοποιήθηκαν και τα εύρη των συγκεντρώσεων που αποφασίστηκε να αναλυθούν προέκυψαν μέσω διαφόρων ερευνών που είχαν ως δείγμα το σκεύασμα του φυτοφαρμάκου ή βιολογικά δείγματα όπως σωματικά υγρά, όργανα, αίμα, φυτικούς οργανισμούς και κύτταρα ή δείγματα χώματος και νερού. Η επιλογή του εύρους των συγκεντρώσεων ήταν επιτυχής διότι μπορέσαμε να προσδιορίσουμε τα όρια ανίχνευσης των φυτοφαρμάκων μέσω της ανάλυσης τους με υγρή χρωματογραφία φασματομετρία μάζας. Επίσης βάσει των αποτελεσμάτων των αναλύσεων μπορέσαμε να δημιουργήσουμε την πρότυπη καμπύλη του φυτοφαρμάκου Dimento και να βρούμε τη γραμμική σχέση μεταξύ των σχετικών περιοχών κορυφής συναρτήσει της συγκέντρωσης των φυτοφαρμάκων. Στα άλλα δύο φυτοφάρμακα, προκειμένου να δημιουργηθεί η καμπύλη χρειάζεται να γίνουν μικρότερες αραιώσεις, για παράδειγμα της τάξης 1/2, μεταξύ δύο δειγμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων στα οποία έχει ήδη ανιχνευθεί το φυτοφάρμακο, κάτι το οποίο είναι μέρος της συνέχειας της έρευνας και των πειραμάτων μας.

Από τα 4 δείγματα τα οποία αναλύσαμε, σε 3 δείγματα βρέθηκε το φυτοφάρμακο Dursban, του οποίου η χρήση έχει απαγορευθεί στην Ελλάδα από το 2020, μια απαγόρευση η οποία όπως φαίνεται δεν τηρείται. Δεν βρέθηκαν ωστόσο τα φυτοφάρμακα Dimento και Lentemul στο ορό αίματος. Τα φυτοφάρμακα Dimento και Lentemul υπάρχει πιθανότητα να βρίσκονται στον ορό αίματος των εγκύων γυναικών, αλλά οι ποσότητες τους να είναι χαμηλότερες από τα όρια ανίχνευσης του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού.

Πιο αναλυτικά, για το φυτοφάρμακο Dimento ανιχνεύθηκαν 4 κορυφές που αντιστοιχούν στις ουσίες που περιέχει το συγκεκριμένο φυτοφάρμακο, εκ των οποίων οι δύο ήταν οι κύριες κορυφές της δραστικής ουσίας της Dimethomorph, τις οποίες, και οι άλλες δύο κορυφές ήταν θραύσματα της δραστικής ουσίας, αλλά δεν βρέθηκε κάποιος μεταβολίτης της δραστικής. Για το φυτοφάρμακο Lentemul ανιχνεύθηκαν τρεις κορυφές που αντιστοιχούν στις ουσίες που περιέχει το συγκεκριμένο

φυτοφάρμακο, εκ των οποίων η μία κορυφή ήταν η κύρια κορυφή της δραστικής ουσίας του φυτοφαρμάκου, 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid, και δύο κορυφές που δεν αναγνωρίστηκαν. Οι κορυφές αυτές ακόμα και αν δεν αναγνωρίστηκαν γνωρίζουμε ότι ανήκουν στο φυτοφάρμακο Lentemul, διότι από το χρωματογράφημα του αποκλείσαμε τις κορυφές που υπάρχουν λόγω του διαλύτη και των εσωτερικών προτύπων. Επίσης, όπως στο φυτοφάρμακο Dimento, δεν βρέθηκε κάποιος μεταβολίτης του φυτοφαρμάκου Lentemul. Για το φυτοφάρμακο Dursban ανιχνεύθηκαν 37 κορυφές που αντιστοιχούν στις ουσίες που περιέχει το συγκεκριμένο φυτοφάρμακο, εκ των οποίων καμία δεν αναγνωρίστηκε, δηλαδή καμία δεν αντιστοιχούσε στη δραστική ουσία του φυτοφαρμάκου, σε κάποια βοηθητική ουσία, σε κάποιον μεταβολίτη του, σε κάποιο θραύσμα ή σε κάποια πρόσμιξή του.

Σε παράλληλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μεταβολομικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας αναλύθηκαν τα φυτοφάρμακα Decis, Sivanto, Switch και Vertimec, από τα οποία τα φυτοφάρμακα Switch και Vertimec ανιχνεύθηκαν στον ορό αίματος εγκύων γυναικών. Όπως και πριν αναφέρθηκε ότι υπάρχει πιθανότητα τα φυτοφάρμακα Decis και Sivanto να υπάρχουν στον ορό αίματος των εγκύων γυναικών, αλλά να βρίσκονται σε τόσο χαμηλές ποσότητες ώστε να μην μπορούν να ανιχνευθούν.

Μέσω της ανάλυσης του φυτοφαρμάκου Switch ανιχνεύθηκαν 8 κορυφές που αντιστοιχούν στις ουσίες του συγκεκριμένου φυτοφαρμάκου, εκ των οποίων η μία κορυφή είναι η κύρια κορυφή της μίας από τις δύο δραστικές του ουσίες, του Cyprodinil και οι υπόλοιπες 7 κορυφές δεν ήταν αναγνωρίσιμες, δηλαδή δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν με τις πιθανές ενώσεις που θα μπορούσαν να προκύψουν από την ανάλυση του. Αναμέναμε, επίσης, την ανίχνευση της δεύτερης δραστικής ουσίας του φυτοφαρμάκου το Fludioxonil, καθώς και τους μεταβολίτες αυτών των δύο δραστικών ουσιών, και πιθανά θραύσματα ή προσμίξεις τους. Υπήρχε μία κορυφή του φυτοφαρμάκου που ανιχνεύθηκε στον ορό αίματος των εγκύων γυναικών. Η κορυφή που ανιχνεύθηκε στο αίμα που αντιστοιχεί σε κάποια ουσία που προέρχεται από το φυτοφάρμακο Switch, είναι μία κορυφή η οποία δεν ταυτοποιήθηκε με κάποια πιθανή ένωση, αλλά πιθανότατα είναι κάποιο ολιγομερές το οποίο προήλθε από μία από τις δύο δραστικές ουσίες, είτε από το Cyprodinil, είτε από το Fludioxonil.

Μέσω της ανάλυσης του φυτοφαρμάκου Vertimec ανιχνεύθηκαν 49 κορυφές που αντιστοιχούν σε ουσίες του συγκεκριμένου φυτοφαρμάκου, εκ των οποίων δύο κορυφές αντιστοιχούσαν σε θραύσματα των ενώσεων από τις οποίες αποτελείται η δραστική ουσία του, η Abamectin(Avermectin B_{1a} και Avermectin B_{1b}) . Συγκεκριμένα ανιχνεύθηκε μία κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο θραύσμα της ουσίας Avermectin B_{1b} και μία κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο θραύσμα της ουσίας Avermectin B_{1a}. Επίσης, 14 κορυφές από τις 49 αντιστοιχούν σε ενώσεις που υπάρχει σύνδεση του κατιόντος του νατρίου Na^+ με τα θραύσματα των δύο ουσιών Avermectin B_{1a} και Avermectin B_{1a} (11 κορυφές αντιστοιχούν στο θραύσμα Avermectin B_{1b} Na^+ adduct και τρεις στο θραύσμα Avermectin B1a Na^+ adduct). Πέντε κορυφές από τις 49, αντιστοιχούν σε αδρανή ένωση, η οποία είναι ουσία που περιέχεται στο εμπορικό σκεύασμα του φυτοφαρμάκου και στην πρόσμιξη της με το κατιόν Νατρίου (Na^+ adduct). Οι υπόλοιπες 28 κορυφές που ανιχνεύθηκαν δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν με πιθανές ενώσεις που θα μπορούσαν να προκύψουν από την ανάλυση του. Τρεις ήταν οι κορυφές που ανιχνεύθηκαν στον ορό αίματος εγκύων γυναικών που αντιστοιχούν στο προφίλ κορυφών του Vertimec. Και οι τρεις ήταν ενώσεις του θραύσματος της Avermectin B_{1b} με κατιόν νατρίου (Na^+ adduct).

Τα αποτελέσματα μέσω της τυπικής εκχύλισης και της εκχύλισης μέσω του liquid handler ήταν τα ίδια, δηλαδή ανιχνεύθηκαν και στις δύο περιπτώσεις οι κορυφές του Dimento P10 και P11 με μόνη διαφορά τη μικρότερη διακύμανση των τιμών (μέσες τιμές των σχετικών περιοχών κορυφής) με το liquid handler. Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί με το γεγονός ότι στην περίπτωση της εκχύλισης μέσω του liquid handler, που δεν περιέχει τον ανθρώπινο παράγοντα, τα σφάλματα ήταν λιγότερα.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε για 4 δείγματα από τα 68 που έχουμε συνολικά. Μελλοντικά, εν συνεχεία της έρευνας, θα πραγματοποιηθεί η εκχύλιση όλων των δειγμάτων μέσω του liquid handler. Η πραγματοποίηση των εκχυλίσεων μέσω του liquid handler, όπως προαναφέραμε, εμπεριέχει

μικρότερες πιθανότητες σφάλματος, διότι δεν περιέχει τον ανθρώπινο παράγοντα, κάτι το οποίο αποδείχθηκε και από τα αποτελέσματα του πειράματός μας. Η ανάλυση και των υπόλοιπων δειγμάτων μπορεί να φέρει καινούργια αποτελέσματα, όπως είναι η ανίχνευση των υπόλοιπων φυτοφαρμάκων και να δώσει πιο εμπεριστατωμένα αποτελέσματα καθώς η έρευνα θα περιλαμβάνει μεγαλύτερο δείγμα εγκύων γυναικών.

Ως μελλοντική πρόταση, αξίζει να ερευνηθεί ο ορός αίματος των εγκύων γυναικών της Θεσσαλίας μετά από τις καταστροφικές πλημμύρες λόγω του Μεσογειακού Κυκλώνα «Daniel», τον Σεπτέμβριο του 2023. Οι πλημμύρες στη Θεσσαλία είχαν σοβαρές επιπτώσεις όχι μόνο στις υποδομές και τις ζωές των κατοίκων, αλλά και στο περιβάλλον λόγω της διαρροής των φυτοφαρμάκων από γεωργικές εκτάσεις και σπίτια, με αποτέλεσμα την μόλυνση των υδάτων. Η έκθεση των ανθρώπων σε αυτά τα χημικά, είτε μέσω της επαφής τους με τα νερά είτε μέσω της κατανάλωσης των γεωργικών προϊόντων που παράγονται στη Θεσσαλία, μπορεί να επιφέρει σοβαρά προβλήματα υγείας. Για αυτό είναι σημαντική η συνέχιση της έρευνας, για τον εντοπισμό εκ νέου των φυτοφαρμάκων στον ορό αίματος των γυναικών οι οποίες έχουν εκτεθεί σε μεγαλύτερες ποσότητες φυτοφαρμάκων σε σχέση με παλαιότερα, ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα των ποσοτήτων των φυτοφαρμάκων που υπήρχαν στον ορό αίματος πριν και μετά τις πλημμύρες και ίσως να εντοπισθούν και επιπλέον φυτοφάρμακα. Επίσης, μελλοντικά σχέδια μπορούν να περιλαμβάνουν τη παρακολούθηση, εάν κατέστη δυνατή λόγω της ανωνυμίας των δοτών, των ανήλικων τέκνων κατά τη παιδική και εφηβική τους ηλικία, ώστε να εκτιμηθούν φαινοτυπικές ιδιαιτερότητες που θα μπορούσαν να συνδεθούν με την επίδραση των φυτοφαρμάκων. Τέλος, επιθυμητή θα ήταν και η σύνδεση των δεδομένων μας με τον τρόπο ζωής των γυναικών μέσα από ερωτηματολόγια που έχουν συμπληρωθεί ανώνυμα με πρωτοβουλία της ομάδας της κας. Μαρίας Παπαγιάννη.

Τα φυτοφάρμακα αν και βοηθούν στην αύξηση της γεωργικής παραγωγής, λόγω της προστασίας που παρέχουν από έντομα, ζιζάνια και παράσιτα, επιφέρουν πολύ σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Πολλά φυτοφάρμακα έχει αποδειχθεί ότι λειτουργούν ως ενδοκρινικοί διαταράκτες, παρεμβάλλοντας στην ομαλή λειτουργία του ορμονικού συστήματος και όχι μόνο. Η μελλοντική απαγόρευση αυτών των ουσιών και η μη συνέχιση της χρήσης τους παρά την απαγόρευση τους, είναι κάτι που θα έπρεπε να απασχολεί την κοινωνία του σήμερα.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agache, Ioana, Rachel Miller, James E. Gern, Peter W. Hellings, Marek Jutel, Antonella Muraro, Wanda Phipatanakul, Santiago Quirce, and David Peden. "Emerging Concepts and Challenges in Implementing the Exposome Paradigm in Allergic Diseases and Asthma: A Practall Document." Allergy 74, no. 3 (2019): 449-463.
- Agrahari, Vibhuti, Pierre Burnouf, Thierry Burnouf, and Vivek Agrahari. "Nanoformulation Properties, Characterization, and Behavior in Complex Biological Matrices: Challenges and Opportunities for Brain-targeted Drug Delivery Applications and Enhanced Translational Potential." *Advanced Drug Delivery Reviews 148*, (2019): 146-180.
- Al-Amrani, Safa, Zaaima Al-Jabri, Adhari Al-Zaabi, Jalila Alshekaili, and Murtadha Al-Khabori. "Proteomics: Concepts and Applications in Human Medicine." World Journal of Biological Chemistry 12, no. 5 (2021): 57-69.
- Amoresano, Angela, and Piero Pucci. "Mass Spectrometry in Metabolomics." Metabolomics Perspectives, (2021): 109-147.
- Archer, E. and Van Wyk, J. (2015) 'The potential anti-androgenic effect of agricultural pesticides used in the Western Cape: In vitro investigation of mixture effects', Water SA, 41(1), p. 129. doi:10.4314/wsa.v41i1.16.
- Bain, James and Newgard, Chris. "metabolomics". Encyclopedia Britannica, 27 Apr. 2024,
- Bakir, Sena, Robert D. Hall, Ric C. De Vos, Roland Mumm, Çetin Kadakal, and Esra Capanoglu. "Effect of Drying Treatments on the Global Metabolome and Health-related Compounds in Tomatoes." Food Chemistry 403, (2023): 134123.
- Ballantyne, B. and Marrs, T.C. (2003). Pesticides: An Overview of Fundamentals. In Pesticide Toxicology and International Regulation (eds D. Anderson, M.D. Waters, T.C. Marrs, T.C. Marrs and B. Ballantyne).
- Blanco, Antonio, and Gustavo Blanco. "Proteins." *Medical Biochemistry*, (2016): 21-71.
- Bingol, Kerem. "Recent Advances in Targeted and Untargeted Metabolomics by NMR and MS/NMR Methods." High-Throughput 7, no. 2 (2018): 9. Liu, X., & Locasale, J. W. (2017). Metabolomics: A Primer. Trends in Biochemical Sciences, 42(4), 274–284. doi:10.1016/j.tibs.2017.01.
- Bouchot, Jean, William L. Trimble, Gregory Ditzler, Yemin Lan, Steve Essinger, and Gail Rosen. "Advances in Machine Learning for Processing and Comparison of Metagenomic Data." Computational Systems Biology (Second Edition), (2013): 295-329.
- Boysen, A.K., Heal, K.R., Carlson, L.T., Ingalls, A.E., 2018. Best-Matched Internal Standard Normalization in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Metabolomics Applied to Environmental Samples. Anal. Chem. 90, 1363–1369.
- Bronsema, Kees J., Rainer Bischoff, and Nico C. Van de Merbel. "Internal Standards in the Quantitative Determination of Protein Biopharmaceuticals Using Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry." Journal of Chromatography B 893-894, (2012): 1-14.
- Cai, Y., Rosen Vollmar, A.K., Johnson, C.H. (2020). Analyzing Metabolomics Data for Environmental Health and Exposome Research. In: Li, S. (eds) Computational Methods

and Data Analysis for Metabolomics. Methods in Molecular Biology, vol 2104. Humana, New York, NY.

- Calabrese, Barbara. "Experimental Platforms for Extracting Biological Data: Mass Spectrometry, Microarray, Next Generation Sequencing." *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, (2018): 126-129.
- Carlson, Bruce M. "The Circulatory System." *The Human Body*, (2018): 271-301..
- Caserta, D., L. Maranghi, A. Mantovani, R. Marci, F. Maranghi, and M. Moscarini. "Impact of Endocrine Disruptor Chemicals in Gynaecology." Human Reproduction Update 14, no. 1 (2007): 59-72.
- Čelić, Mira, Marinella Farré, Miren L. De Alda, Sandra Perez, Damia Barceló, and Mira Petrovic. "Environmental Analysis: Emerging Pollutants." Liquid Chromatography (Third Edition), (2022): 549-578.
- Cevallos-Cevallos, Juan M., José I. Reyes-De-Corcuera, Edgardo Etxeberria, Michelle D. Danyluk, and Gary E. Rodrick. "Metabolomic Analysis in Food Science: A Review." Trends in Food Science & Technology 20, no. 11-12 (2009): 557-566
- Charames, George S., Peter Sabatini, and Nicholas Watkins. "Clinical and Genetic Evidence and Population Evidence." Clinical DNA Variant Interpretation, (2020): 59-87.
- Chen, Wenhui, Yao Yao, Tianyu Chen, Wei Shen, Sheng Tang, and Hian K. Lee. "Application of Smartphone-based Spectroscopy to Biosample Analysis: A Review." Biosensors and Bioelectronics 172, (2021): 112788.
- Chen, Xiao, Hongling Zhang, Yanjian Wan, Xi Chen, and Yuanyuan Li. 2018. "Determination of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) in Rat Serum for Pharmacokinetic Studies with a Simple HPLC Method." PLOS ONE 13, no. 1 e0191149.
- Choi, J., Rotter, S., Ritz, V. et al. Thresholds of adversity for endocrine disrupting substances: a conceptual case study. Arch Toxicol 98, 2019–2045 (2024).
- Choi, Kyoungju, Hyun Joo, Randy L. Rose, and Ernest Hodgso. "Metabolism of Chlorpyrifos and Chlorpyrifos Oxon by Human Hepatocytes*." Journal of Biochemical and Molecular Toxicology 20, no. 6 (2006): 279-291.
- Christensen, K.; Harper, B.; Luukinen, B.; Buhl, K.; Stone, D. (2009). "Chlorpyrifos Technical Fact Sheet". National Pesticide Information Center. Retrieved 3 July 2014.
- Chuang, H.-Y., Hofree, M., & Ideker, T. (2010). A Decade of Systems Biology. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 26(1), 721–744.
- Claude Monneret. What is an endocrine disruptor?. Comptes Rendus. Biologies, Volume 340 (2017) no. 9-10, pp. 403-405. doi: 10.1016/j.crvi.2017.07.004.
- Crooks, Peter A., and Gary D. Byrd. "Use of High-performance Liquid Chromatographic–Mass Spectrometric (LC–MS) Techniques for the Determination of Nicotine and Its Metabolites." Analytical Determination of Nicotine and Related Compounds and Their Metabolites, (1998): 225-264.
- Dalsager, Louise, Lisa E. Christensen, Malene G. Kongsholm, Henriette B. Kyhl, Flemming Nielsen, Greet Schoeters, Tina K. Jensen, and Helle R. Andersen. "Associations of Maternal Exposure to Organophosphate and Pyrethroid Insecticides and the Herbicide 2,4-D with Birth Outcomes and Anogenital Distance at 3 Months in the Odense Child Cohort." Reproductive Toxicology 76, (2018): 53-62.

- Dai, Xiaofeng, and Li Shen. "Advances and Trends in Omics Technology Development." *Frontiers in Medicine 9*, (2022).
- EFSA (European Food Safety Authority), 2019. Updated statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos. EFSA Journal;17(11):e05908, 21 pp.
- Dayalan, Saravanan, Jianguo Xia, Rachel A. Spicer, Reza Salek, and Ute Roessner. "Metabolome Analysis." Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology, (2018): 396-409.
- Del Giacco, L., Cattaneo, C. (2012). Introduction to Genomics. In: Espina, V., Liotta, L. (eds) Molecular Profiling. Methods in Molecular Biology, vol 823. Humana Press.
- Dimitra Dedousi, Panagiotis C. Mpantounas, George P. Patrinos. “The importance of integrating results from different -omics technologies for the Personalized Medicine”. Issue 1, January - April. 2021.
- Immunology 123, no. 6 (2019): 550-557.
- Emwas, Abdul, Raja Roy, Ryan T. McKay, Leonardo Tenori, Edoardo Saccenti, G. A. Gowda, Daniel Raftery et al. "NMR Spectroscopy for Metabolomics Research." Metabolites 9, no. 7 (2019): 123.
- Evanthia Diamanti-Kandarakis, Jean-Pierre Bourguignon, Linda C. Giudice, Russ Hauser, Gail S. Prins, Ana M. Soto, R. Thomas Zoeller, Andrea C. Gore, Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement, *Endocrine Reviews*, Volume 30, Issue 4, 1 June 2009, Pages 293–342.
- E. KOUSTA, G. MASTORAKOS. “Endocrine disruptors and thyroid function”. Archives of Hellenic Medicine 2012, 29(1):7–14.
- Flaskos, John. "The Developmental Neurotoxicity of Organophosphorus Insecticides: A Direct Role for the Oxon Metabolites." Toxicology Letters 209, no. 1 (2012): 86-93.
- Garabrant, D. H., & Philbert, M. A. (2002). Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Epidemiology and Toxicology. Critical Reviews in Toxicology, 32(4), 233–257. doi:10.1080/20024091064237
- Goodwin, John M., Heather C. Kuiper, Barrett Brister, and Hubert W. Vesper. "Impact of Internal Standard Selection on Measurement Results for Long Chain Fatty Acids in Blood." Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab 33, (2024): 22-30.
- Grant, Russell P., and Brian A. Rappold. "Development and Validation of Small Molecule Analytes by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*, (2017): 115-179.
- Guo, Hao, and John A. MacKay. "A Pharmacokinetics Primer for Preclinical Nanomedicine Research." Nanoparticles for Biomedical Applications, (2019): 109-128.
- Guo, Jianping, Ji Cheng, Brian J. North, and Wenyi Wei. "Functional Analyses of Major Cancer-related Signaling Pathways in Alzheimer's Disease Etiology." *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer 1868*, no. 2 (2017): 341-358.
- Hage, David S. "Chromatography." *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*, (2017): 1-32.

- Halimah, M., Hassan, O., Tan, Y., & Ismail, B.S. (2012). 'An improved method for the determination of chlorpyrifos in palm oil matrices using gas chromatography', Journal of Oil Palm Research, 24(August), pp. 1404-1411.
- Hasin, Y., Seldin, M. & Lusis, A. Multi-omics approaches to disease. Genome Biol 18, 83 (2017).
- Hay, Anthony G., James F. Rice, Bruce M. Applegate, Nathan G. Bright, and Gary S. Sayler. "A Bioluminescent Whole-Cell Reporter for Detection of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and 2,4-Dichlorophenol in Soil." Applied and Environmental Microbiology 66, no. 10 (2000): 4589-4594.
- Helle R. Andersen, Ida M. Schmidt, Philippe Grandjean, Tina K. Jensen, Esben Budtz-Jørgensen, Mia B. Kjærstad, Jesper Bælum, Jesper B. Nielsen, Niels E. Skakkebæk, and Katharina M. Main. (2008) 'Impaired reproductive development in sons of women occupationally exposed to pesticides during pregnancy', Environmental Health Perspectives, 116(4), pp. 566–572.
- Hiller-Sturmhöfel, Susanne, and Andrzej Bartke. "The Endocrine System: An Overview." Alcohol Health and Research World 22, no. 3 (1998): 153-164.
- Hocart, Charles H. "Mass Spectrometry: An Essential Tool for Trace Identification and Quantification." Comprehensive Natural Products II, (2009): 327-388.
- Hyötyläinen, Tuulia. "Analytical Challenges in Human Exposome Analysis with Focus on Environmental Analysis Combined with Metabolomics." Journal of Separation Science 44, no. 8 (2021): 1769-1787.
- Jawale CA, Rajput KH and Ugale BJ (2017) Assessing the impact of pesticides: An overview; International J. of Life Sciences, 5 (3): 474-479
- Jayaraj R.,Megha P. and Sreedev P. (2016) Review Article. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. Interdisciplinary Toxicology, Vol.9 (Issue 3-4), pp. 90-100.
- John D. Stark, John E. Banks, "Selective" Pesticides: Are They Less Hazardous to the Environment?, *BioScience*, Volume 51, Issue 11, November 2001, Pages 980–982.
- Johnson, C.H. and Gonzalez, F.J. (2012), Challenges and opportunities of metabolomics. J. Cell. Physiol., 227: 2975-2981.
- Johnson, Caroline H., Julijana Ivanisevic, and Gary Siuzdak. "Metabolomics: Beyond Biomarkers and towards Mechanisms." Nature Reviews Molecular Cell Biology 17, no. 7 (2016): 451-459.
- Johnson, Caroline H., Julijana Ivanisevic, and Gary Siuzdak. "Metabolomics: Beyond Biomarkers and towards Mechanisms." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology 17*, no. 7 (2016): 451.
- Joscilin Mathew, Parvathy Sankar, Matthew Varacallo. (2023) "Physiology, blood plasma", StatPearls [Internet].
- Kabir, Eva R., Monica S. Rahman, and Imon Rahman. "A Review on Endocrine Disruptors and Their Possible Impacts on Human Health." Environmental Toxicology and Pharmacology 40, no. 1 (2015): 241-258.
- Kastenmüller, Gabi, Johannes Raffler, Christian Gieger, and Karsten Suhre. "Genetics of Human Metabolism: An Update." Human Molecular Genetics 24, no. R1 (2015): R93-R101.

- Khan, G., Abbas, N., Khan, M., Iqbal, Z., and Khan, S., 2019. The efficiency of amalgamation and cyanidation for the extraction of placer gold deposits of Indus River Basin along Gilgit to Thalachi (Gilgit-Baltistan). International Journal of Economic and Environmental Geology, 10(1), pp.32–39
- Khwa Museveni, Sikukuu, Godfrey Nakitare Nambafu, and Naomi Kollongei. "Understanding Degradation of Electroactive Molecules in Organic Redox Flow Batteries: Decomposition Analysis Methods." Materials Science for Energy Technologies 6, (2022): 561-566.
- King, Janet C. "Physiology of Pregnancy and Nutrient Metabolism." *The American Journal of Clinical Nutrition 71*, no. 5 (2000): 1218S-1225S.
- Kitano, H. (2002). Systems Biology: A Brief Overview. Science, 295(5560), 1662–1664. doi:10.1126/science.1069492
- Koo, Imhoi, Xiaoli Wei, and Xiang Zhang. "Analysis of Metabolomic Profiling Data Acquired on GC–MS." *Methods in Enzymology 543*, (2013): 315-324.
- Kosari, Erfan, and Kambiz Vafai. "Thermal Stimulation of Targeted Neural Circuits via Remotely Controlled Nano-transducers: A Therapy for Neurodegenerative Disorders." Advances in Heat Transfer 52, (2019): 543-581.
- Kumar, P., Singh, S.P., Shrikant, K. and Madhukar, D., 2011. Analysis of buffalo liver samples for the presence of chlorpyrifos residues by using high performance liquid chromatography. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 35(4), pp.219-226.
- L. M. Quesada-Ocampo, L. L. Granke, J. Olsen, H. C. Gutting, F. Runge, M. Thines, A. Lebeda, and M. K. Hausbeck. The Genetic Structure of Pseudoperonospora cubensis Populations. Plant Disease, 2012, 96:10, 1459-1470
- Liang, Huanzhu, Xiaomei Wu, Huojie Yao, Xueqiong Weng, Shan Liu, Jingmin Chen, Yexin Li et al. "Association of Urinary Metabolites of Non-persistent Pesticides with Serum Sex Hormones among the US Females: NHANES 2013–2014." Chemosphere 300, (2022): 134577.
- Liang, Huanzhu, Xiaomei Wu, Huojie Yao, Xueqiong Weng, Shan Liu, Jingmin Chen, Yexin Li et al. "Association of Urinary Metabolites of Non-persistent Pesticides with Serum Sex Hormones among the US Females: NHANES 2013–2014." Chemosphere 300, (2022): 134577.
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L. and Wenzel, A. (2003) Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, Vol. 75 (Issue 5), pp. 631-681.
- Lipu, M.S. H., M.A. Hannan, Aini Hussain, M.M. Hoque, Pin J. Ker, M.H.M. Saad, and Afida Ayob. "A Review of State of Health and Remaining Useful Life Estimation Methods for Lithium-ion Battery in Electric Vehicles: Challenges and Recommendations." *Journal of Cleaner Production 205*, (2018): 115-133..
- Liu, Jiangtao, Tingting Yang, Ying Li, Shulan Li, Yuanyuan Li, Shunqing Xu, and Wei Xia. "Associations of Maternal Exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid during Early Pregnancy with Steroid Hormones among One-month-old Infants." Science of The Total Environment 912, (2024): 169414. Accessed August 13, 2024.

- López-Porfiri, Pablo, Patricia Gorgojo, and María González-Miquel. "Recovery of Bio-based Organic Acids Using Green Technologies." Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, (2023).
- Lu, Wenyun, Bryson D. Bennett, and Joshua D. Rabinowitz. "Analytical Strategies for LC–MS-based Targeted Metabolomics." Journal of Chromatography B 871, no. 2 (2008): 236-242.
- Luquet, Carlos M., and Flavia Bieczynski. "Absorption and Excretion: Detoxification of Wastes and Toxins in the Fish Gastrointestinal System." Encyclopedia of Fish Physiology (Second Edition), (2023): 431-440.
- M. Heshmati H (2021) Human Health Consequences of Endocrine-Disrupting Chemicals. Environmental Issues and Sustainable Development. IntechOpen.
- Maipas, Sotirios, Chrysanthi Kotampasi, Panagiotis Stamatis, and Luc Hens. "Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture." Frontiers in Public Health 4, (2016): 178764.
- Maipas, Sotirios, Chrysanthi Kotampasi, Panagiotis Stamatis, and Luc Hens. "Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture." Frontiers in Public Health 4, (2016): 178764.
- March, Raymond E. "Ion Trap Mass Spectrometers." Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second Edition), (2009): 1165-1173.
- Mastovska, K. "FOOD AND NUTRITIONAL ANALYSIS | Pesticide Residues." Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition), (2004): 251-261.
- Mishra, Jigni, Raj K. Sharma, and Kshipra Misra. "Characterization Techniques for Herbal Products." Management of High Altitude Pathophysiology, (2017): 171-202.
- Mnif, Wissem, Aziza I. Hassine, Aicha Bouaziz, Aghleb Bartegi, Olivier Thomas, and Benoit Roig. "Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review." International Journal of Environmental Research and Public Health 8, no. 6 (2011): 2265-2303.
- Moldoveanu, Serban C., and Victor David. "Basic Information about HPLC." *Essentials in Modern HPLC Separations*, (2012): 1-51.
- Moosavi SM and Ghassabian S (2018) Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability. Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches. InTech.
- Mukherjee, Pulok K. "LC–MS: A Rapid Technique for Understanding the Plant Metabolite Analysis." Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs, (2018): 459-479.
- Mushtaq, Mian Y., Young H. Choi, Robert Verpoorte, and Erica G. Wilson. "Extraction for Metabolomics: Access to The Metabolome." Phytochemical Analysis 25, no. 4 (2014): 291-306..
- Na, Yi R., Sungmo Je, and Seung H. Seok. "Metabolic Features of Macrophages in Inflammatory Diseases and Cancer." Cancer Letters 413, (2018): 46-58.
- Narad, P., Kirthanashri, SV (2018). Εισαγωγή στο Omics. Στο: Arivaradarajan, P., Misra, G. (eds) Omics Approaches, Technologies And Applications. Springer, Σιγκαπούρη. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2925-8_1
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 1486, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid.

- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 16180, 2,4-D dimethylamine salt
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 86298, Dimethomorph.
- Ojiambo PS, Paul PA, Holmes GJ. A quantitative review of fungicide efficacy for managing downy mildew in cucurbits. Phytopathology. 2010 Oct;100(10):1066-76. Ojiambo, P. S.; Paul, P. A.; Holmes, G. J. (2010). "A quantitative review of fungicide efficacy for managing downy mildew in cucurbits". Phytopathology. 100 (10): 1066–76.
- Orooji, Naghmeh, Afshin Takdastan, Reza J. Yengejeh, Sahand Jorfi, and Amir H. Davami. "A Quick and Inexpensive Method to Determine 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid Residues in Water Samples by HPLC." Desalination and Water Treatment 217, (2021): 329-338.
- Power ML, Schulkin J. Sex differences in fat storage, fat metabolism, and the health risks from obesity: possible evolutionary origins. British Journal of Nutrition. 2008;99(5):931-940.
- Prado, Raquel, and Cameron C. Weber. "Applications of Ionic Liquids." *Application, Purification, and Recovery of Ionic Liquids*, (2015): 1-58.
- PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 21236, L-Norleucine.
- PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 2153, Theophylline.
- Qiu, Shi, Ying Cai, Hong Yao, Chunsheng Lin, Yiqiang Xie, Songqi Tang, and Aihua Zhang. "Small Molecule Metabolites: Discovery of Biomarkers and Therapeutic Targets." Signal Transduction and Targeted Therapy 8, (2023).
- R J Kavlock, G P Daston, C DeRosa, P Fenner-Crisp, L E Gray, S Kaattari, G Lucier, M Luster, M J Mac, C Maczka, R Miller, J Moore, R Rolland, G Scott, D M Sheehan, T Sinks, and H A Tilson. 1996. “Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop”.Environmental Health Perspectives 104:suppl 4
- Rani, Lata, Komal Thapa, Neha Kanojia, Neelam Sharma, Sukhbir Singh, Ajmer S. Grewal, Arun L. Srivastav, and Jyotsna Kaushal. "An Extensive Review on the Consequences of Chemical Pesticides on Human Health and Environment." Journal of Cleaner Production 283, (2021): 124657. Accessed August 8, 2024.
- Rauh V, Arunajadai S, Horton M, Perera F, Hoepner L, Barr DB, Whyatt R. Seven- year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. Environ Health Perspect 2011; Aug;119(8):1196-201.
- Rauh VA, Perera FP, Horton MK, Whyatt RM, Bansal R, Hao X, Liu J, Barr DB, Slotkin TA, Peterson BS. Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. PNAS May 15, 2012; 109(20): 7871-7876.
- Roessner, U. and Bowne, J. (2009) ‘What is metabolomics all about?’, BioTechniques, 46(5), pp. 363–365.

- Roux, Aurélie, Dominique Lison, Christophe Junot, and Jean Heilier. "Applications of Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry-based Metabolomics in Clinical Chemistry and Toxicology: A Review." Clinical Biochemistry 44, no. 1 (2010): 119-135.
- Schlosser, P.M., B.A. Asgharian, and M. Medinsky. "Inhalation Exposure and Absorption of Toxicants." *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*, (2009): 75-109.
- Ser, Zheng, Xiaojing Liu, Ngoc N. Tang, and Jason W. Locasale. "Extraction Parameters for Metabolomics from Cultured Cells." Analytical Biochemistry 475, (2015): 22-28.
- Sharpe, Richard M. "Pathways of Endocrine Disruption during Male Sexual Differentiation and Masculinisation." Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 20, no. 1 (2006): 91-110.
- Sheldon, Linda S. "Exposure Framework." Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition), (2009): 971-976.
- Shroff Tanvi, Aina Kehinde, Maass Christian, Cipriano Madalena, Lambrecht Joeri, Tacke Frank, Mosig Alexander and Loskill Peter (2022).”Studying metabolism with multi-organ chips: new tools for disease modelling, pharmacokinetics and pharmacodynamics”. Open Biol.12: 210333.
- Shulaev, Vladimir. "Metabolomics Technology and Bioinformatics." Briefings in Bioinformatics 7, no. 2 (2006): 128-139.
- Simon-Delso, N., V. Amaral-Rogers, L. P. Belzunces, J. M. Bonmatin, M. Chagnon, C. Downs, L. Furlan et al. "Systemic Insecticides (Neonicotinoids and Fipronil): Trends, Uses, Mode of Action and Metabolites." Environmental Science and Pollution Research International 22, no. 1 (2015): 5-34.
- Sparkman, O. David (2000). *Mass spectrometry desk reference*. Pittsburgh: Global View Pub. ISBN 978-0-9660813-2-9.
- Tabasum, Husna, S.E. Neelagund, K.R. Kotresh, M.D. Gowtham, and N. Sulochana. "Estimation of Chlorpyrifos Distribution in Forensic Visceral Samples and Body Fluids Using LCMS Method." Journal of Forensic and Legal Medicine 91, (2022): 102423.
- Tang J, Cao Y, Rose RL, et al. Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes. Drug Metab Dispos. 2001;29(9):1201-1204.
- Tanna, Bhakti, and Avinash Mishra. "Metabolomics of Seaweeds: Tools and Techniques." Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress, (2017): 37-52.
- Team, E.W. Chebi, (E)-dimethomorph (CHEBI:83426). Available at: https://www.ebi.ac.uk/chebi/chebiOntology.do?chebiId=CHEBI%3A83426
- Theorell, T. (2009), "Anabolism and catabolism at work", Sonnentag, S., Perrewé, P.L. and Ganster, D.C. (Ed.) *Current Perspectives on Job-Stress Recovery* (*Research in Occupational Stress and Well Being, Vol. 7*), Emerald Group Publishing Limited, Leeds, pp. 249-276.
- Thomas, Stefani N. "Mass Spectrometry." Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition), (2018): 171-185.
- Torres-Acosta, Mario A., Gary J. Lye, and Duygu Dikicioglu. "Automated Liquid-handling Operations for Robust, Resilient, and Efficient Bio-based Laboratory Practices." Biochemical Engineering Journal 188, (2022): 108713.

- Ubaid ur Rahman, Hafiz, Waqas Asghar, Wahab Nazir, Mansur A. Sandhu, Anwaar Ahmed, and Nauman Khalid. "A Comprehensive Review on Chlorpyrifos Toxicity with Special Reference to Endocrine Disruption: Evidence of Mechanisms, Exposures and Mitigation Strategies." Science of The Total Environment 755, (2021): 142649.
- Ubaid ur Rahman, Hafiz, Waqas Asghar, Wahab Nazir, Mansur A. Sandhu, Anwaar Ahmed, and Nauman Khalid. "A Comprehensive Review on Chlorpyrifos Toxicity with Special Reference to Endocrine Disruption: Evidence of Mechanisms, Exposures and Mitigation Strategies." Science of The Total Environment 755, (2021): 142649. Accessed August 11, 2024.
- University of Georgia Center for Invasive Species and Ecosystem Health. "Weed Control Methods Handbook: 2,4-D" (PDF). invasive.org. April 2001
- USEPA, 2021. Tolerance revocations: Chlorpyrifos. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Washington, D.C. August 29, 2021.
- Vailati-Riboni, M., Palombo, V., Loor, J.J. (2017). What Are Omics Sciences?. In: Ametaj, B. (eds) Periparturient Diseases of Dairy Cows. Springer, Cham.
- Valette, Armance, Karine Weiss, Patrick Rateau, and Benoit Roig. "Chemistry and Psychology: Cross Views on Pesticide Risks." Management of Emerging Public Health Issues and Risks, (2018): 225-242.
- Van Wijngaarden, R. P., Brock, T. C., & Douglas, M. T. (2005). Effects of chlorpyrifos in freshwater model ecosystems: the influence of experimental conditions on ecotoxicological thresholds. Pest management science, 61(10), 923–935.
- Vasilopoulou, Catherine G., Marigoula Margarity, and Maria I. Klapa. "Metabolomic Analysis in Brain Research: Opportunities and Challenges." Frontiers in Physiology 7, (2016): 203459.
- Vazquez-Roig, P., and Y. Pico. "Gas Chromatography and Mass Spectroscopy Techniques for the Detection of Chemical Contaminants and Residues in Foods." Chemical Contaminants and Residues in Food, (2011): 17-61.
- Ventura, Clara, Mariel Núñez, Noelia Miret, Diego Martinel Lamas, Andrea Randi, Andrés Venturino, Elena Rivera, and Claudia Cocca. "Differential Mechanisms of Action Are Involved in Chlorpyrifos Effects in Estrogen-dependent or -independent Breast Cancer Cells Exposed to Low or High Concentrations of the Pesticide." Toxicology Letters 213, no. 2 (2012): 184-193.
- Vermeulen, R., Schymanski, E. L., Barabási, A.-L., & Miller, G. W. (2020). The exposome and health: Where chemistry meets biology. Science, 367(6476), 392–396.
- Versieck, J. "The Collection and Preparation of Human Blood Plasma or Serum for Trace Element Analysis." *Journal of Research of the National Bureau of Standards 91*, no. 2 (1986): 87-92.
- Vignoli, Alessia, Leonardo Tenori, Cristina Morsiani, Paola Turano, Miriam Capri, and Claudio Luchinat. "Serum or Plasma (and Which Plasma), That Is the Question." Journal of Proteome Research 21, no. 4 (2022): 1061-1072.
- Vineis, Paolo, Oliver Robinson, Marc Chadeau-Hyam, Abbas Dehghan, Ian Mudway, and Sonia Dagnino. "What Is New in the Exposome?" Environment International 143, (2020): 105887.

- Wajcman, Henri, and Jean Riou. "Globin Chain Analysis: An Important Tool in Phenotype Study of Hemoglobin Disorders." *Clinical Biochemistry 42*, no. 18 (2009): 1802-1806.
- Walker, D.I., Valvi, D., Rothman, N. *et al.* The Metabolome: a Key Measure for Exposome Research in Epidemiology. *Curr Epidemiol Rep* **6**, 93–103 (2019).
- Walker, D.I., Valvi, D., Rothman, N. *et al.* The Metabolome: a Key Measure for Exposome Research in Epidemiology. *Curr Epidemiol Rep* **6**, 93–103 (2019).
- Walorczyk, Stanislaw. (2013). Improved Method for Determination of the Fungicide Dimethomorph in Vegetables. Acta Chromatographica. 25. 725-733.10.1556/AChrom.25.2013.4.10
- Wang, Jia, Jing Li, Jing Ning, Xiao Huo, Zhen Yu, Yan Tian, Bao Zhang et al. "Human Cytochrome P450 3A-mediated Two-step Oxidation Metabolism of Dimethomorph: Implications in the Mechanism-based Enzyme Inactivation." Science of The Total Environment 822, (2022): 153585.
- Wang, Wenqi, Zhicheng Liu, Yongjian Liu, Zhijun Su, and Yonggang Liu. "Plant Polypeptides: A Review on Extraction, Isolation, Bioactivities and Prospects." International Journal of Biological Macromolecules 207, (2022): 169-178.
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ignacimuthu, S. et al. Defensive Responses in Groundnut Against Chewing and Sap-Sucking Insects. J Plant Growth Regul 32, 259–272 (2013).
- Wei, Xin, Zinuo Huang, Liuyiqi Jiang, Yueer Li, Xinyue Zhang, Yuxin Leng, and Chao Jiang. "Charting the Landscape of the Environmental Exposome." IMeta 1, no. 4 (2022): e50.
- Whyatt RM, Camann D, Perera FP, Rauh VA, Tang D, Kinney PL, Garfinkel R, Andrews H, Hoepner L, Barr DB. Biomarkers in assessing residential insecticide exposures during pregnancy and effects on fetal growth. Tox Appl Pharm 2005; Aug 7;206(2):246-254.
- Wild, Christopher P. "The Exposome: From Concept to Utility." International Journal of Epidemiology 41, no. 1 (2012): 24-32.
- Wilm, Matthias. "Principles of Electrospray Ionization." Molecular & Cellular Proteomics 10, no. 7 (2011): M111.009407.
- Yang, Xiangkun, Xian Wu, Kyle A. Brown, Thao Le, Steven L. Stice, and Michael G. Bartlett. "Determination of Chlorpyrifos and Its Metabolites in Cells and Culture Media by Liquid Chromatography-electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry." Journal of Chromatography B 1063, (2017): 112-117.
- Yilmaz, B., Terekeci, H., Sandal, S. *et al.* Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Rev Endocr Metab Disord* **21**, 127–147 (2020
- Ying, W. Phenomic Studies on Diseases: Potential and Challenges. *Phenomics* **3**, 285–299 (2023).