

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

“ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Επίδραση περιγεννητικής έκθεσης χαμηλών δόσεων γλυφosatης και
μύγματος της με 2,4-D και dicamba στο οξειδοαναγωγικό προφίλ σπλήνα και
μυός επίμυων»

ΚΑΚΛΙΔΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

BSc ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΛΑΡΙΣΑ, 2025

«Επίδραση περιγεννητικής έκθεσης χαμηλών δόσεων γλυφοσάτης και μίγματος της
με 2,4-D και dicamba στο οξειδοαναγωγικό προφίλ σπλήνα και μυός επίμυων»

Επιβλέπων: Τέκος Φώτιος

Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών

«Effect of perinatal exposure to low doses of glyphosate and its mixture with 2,4-D
and dicamba on the redox profile of spleen and muscle in rats»

Supervisor: Tekos Fotios

Laboratory of Animal Physiology

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Τέκος Φώτιος

Διδάσκων ΠΜΣ Τοξικολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

Κουρέτας Δημήτριος

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

Βεσκούκης Αριστείδης

Επίκουρος Καθηγητής Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διατροφολογίας και Διαιτολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χειμερινό εξάμηνο του 2024.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, κατ' αρχήν, τον κύριο Τέκο Φώτιο, Διδάσκων του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Τοξικολογία», που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω τη συγκεκριμένη διπλωματική και να συνεργαστώ με το Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές κύριο Κουρέτα Δημήτριο και κύριο Βεσκούκη Αριστείδη που συμπληρώνουν την τριμελή εξεταστική επιτροπή μου.

Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υπεύθυνη μου στο εργαστήριο και υποψήφια διδάκτωρ Νεχαλιώτη Μαρία-Παρασκευή, η βοήθεια και οι συμβουλές της οποίας έκαναν δυνατή την ολοκλήρωση μιας τόσο ενδιαφέρουσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το φιλικό και συνεργατικό κλίμα, καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.

Περιεχόμενα

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή.....	3
Ευχαριστίες	4
Περιεχόμενα	5
Περίληψη	8
Abstract	10
1. Εισαγωγή	11
1.1 Ελεύθερες ρίζες	11
1.2 Πηγές ελεύθερων ριζών.....	13
1.2.1 Ενδογενείς πηγές	14
1.2.2 Εξωγενείς πηγές.....	18
1.3 Επιδράσεις ελεύθερων ριζών.....	19
1.3.1 Θετικές επιδράσεις.....	19
1.3.2 Αρνητικές επιδράσεις ελεύθερων ριζών	21
1.4 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί	26
1.4.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	28
1.4.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	32
1.5 Οξειδωτικό στρες	35
1.6 Φυτοφάρμακα – Φυτοπροστατευτικά προϊόντα.....	37
1.6.1 Ιστορική αναδρομή.....	38
1.6.2 Κατηγοριοποίηση φυτοφαρμάκων	39
1.6.3 Ανθρώπινη έκθεση στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα.....	43
1.6.4 Ανθρώπινη υγεία και έκθεση στα φυτοφάρμακα.....	46
1.6.5 Επιδράσεις φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον	49
1.6.6 Ρυθμιστικό πλαίσιο.....	50
1.7 Ζιζανιοκτόνα	51
1.7.1 Γλυφosatη (Glyphosate).....	53
1.7.2 Dicamba.....	55
1.7.3 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic Acid)	57

1.8	Μίγματα ζιζανιοκτόνων.....	58
1.8.1	Υπολειμματικότητα ζιζανιοκτόνων – Έκθεση στα ξενοβιοτικά.....	60
1.8.2	Περιγεννητική έκθεση	62
1.9	Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για τα μίγματα ζιζανιοκτόνων	63
2.	Σκοπός	65
3.	Υλικά – Μέθοδοι	66
3.1	Εργαστηριακά ζώα	66
3.2	Δοσολογία και τρόπος χρήσης ζιζανιοκτόνων	66
3.3	Πειραματικός σχεδιασμός	66
3.4	Συλλογή και προετοιμασία ιστών	67
3.5	Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης.....	68
3.5.1	Εκτίμηση ολικής πρωτεΐνης ιστού.....	68
3.5.2	Προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης	68
3.5.3	Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)	70
3.5.4	Προσδιορισμός του ρυθμού αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H ₂ O ₂)	71
3.5.5	Προσδιορισμός των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	72
3.5.6	Προσδιορισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS).....	73
3.6	Στατιστική ανάλυση	75
4.	Αποτελέσματα	76
4.1	Επιδράσεις της γλυφosatής και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο σπλήνα θηλυκών επίμυων	76
4.2	Επιδράσεις της γλυφosatής και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο σπλήνα αρσενικών επίμυων	77
4.3	Επιδράσεις της γλυφosatής και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο σκελετικό μυ θηλυκών επίμυων.....	79
4.4	Επιδράσεις της γλυφosatής και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο σκελετικό μυ αρσενικών επίμυων	81
5.	Συζήτηση	83

6. Βιβλιογραφία	90
-----------------------	----

Περίληψη

Περισσότερα από 220 είδη ζιζανίων έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα, εκ των οποίων τα 24 είναι ανθεκτικά στη γλυφοσάτη. Ακόμη, η έλλειψη ζιζανιοκτόνων με νέες θέσεις δράσης, σε συνδυασμό με αυστηρότερους κανονισμούς, περιορίζει τις διαθέσιμες επιλογές καταπολέμησης και απειλεί τη γεωργική παραγωγή. Έτσι, υιοθετήθηκε ως κυρίαρχη γεωργική πρακτική η ταυτόχρονη εφαρμογή συνδυασμού ζιζανιοκτόνων για τη στρατηγική αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος. Ωστόσο, η διαρκής έκθεση σε μίγματα και η ευρεία χρήση τους εγείρει ταυτόχρονα προβληματισμούς στην επιστημονική κοινότητα σχετικά με τις επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον. Νεότερες έρευνες δείχνουν, πως τέτοια μίγματα ενδέχεται να είναι πιο τοξικά από κάθε χημική ουσία μεμονωμένα, γεγονός που εντείνει την ανάγκη αξιολόγησης πιο ρεαλιστικών συνθηκών έκθεσης. Λαμβάνοντας λοιπόν όλα τα παραπάνω δεδομένα υπόψιν, η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία στοχεύει στη διερεύνηση των μακροπρόθεσμων επιδράσεων της έκθεσης σε χαμηλές δόσεις γλυφοσάτης και μίγματος της με 2,4-D και dicamba, σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε ιστούς σπλήνα και σκελετικού μυ, ως αποτέλεσμα περιγεννητικής έκθεσης. Ειδικότερα, 80 επίμυες της φυλής Wistar (40 αρσενικοί και 40 θηλυκοί απόγονοι) κατανεμήθηκαν σε 4 πειραματικές ομάδες και εκτέθηκαν στα υπό εξέταση ζιζανιοκτόνα μέσω του πόσιμου νερού, από την έκτη μέρα της κύησης μέχρι την πρώιμη ενήλικη ζωή. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, αξιολογήθηκε η επίδραση της γλυφοσάτης στην ημερήσια αποδεκτή πρόσληψη (ADI) και στο επίπεδο μη παρατηρούμενων δυσμενών επιπτώσεων (NOAEL), καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba στις αντίστοιχες δόσεις ADI. Στους ιστούς σπλήνα και μυ που συλλέχθηκαν, προσδιορίστηκε με φασματοφωτομετρικές μεθόδους ένα σύνολο δεικτών της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, συμπεριλαμβανομένων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), του ρυθμού αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), καθώς και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η περιγεννητική έκθεση στο μίγμα των ζιζανιοκτόνων σε δόση ADI εξασθένησε την αντιοξειδωτική άμυνα στο σπλήνα και των δύο φύλων, όπως διαφαίνεται από τη μείωση του ρυθμού αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου, ενώ προκάλεσε και οξειδωτική βλάβη στις πρωτεΐνες σε αρσενικούς απογόνους. Στο σκελετικό μυ, η έκθεση στη γλυφοσάτη σε δόση NOAEL αύξησε τα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων και στα δύο φύλα, ενώ το μίγμα στη δόση ADI προκάλεσε οξειδωτική βλάβη σε λιπίδια και

πρωτεΐνες μόνο στους θηλυκούς επίμυες. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η οποία προσομοιάζει τον κίνδυνο από τα ξενοβιοτικά σε ρεαλιστικές συνθήκες, μπορούν να συμβάλλουν στην ακριβέστερη εκτίμηση του κινδύνου που μπορεί να προκύψει από τα μίγματα φυτοφαρμάκων και τον επαναπροσδιορισμό των κανονιστικά επιτρεπτών δόσεων.

Abstract

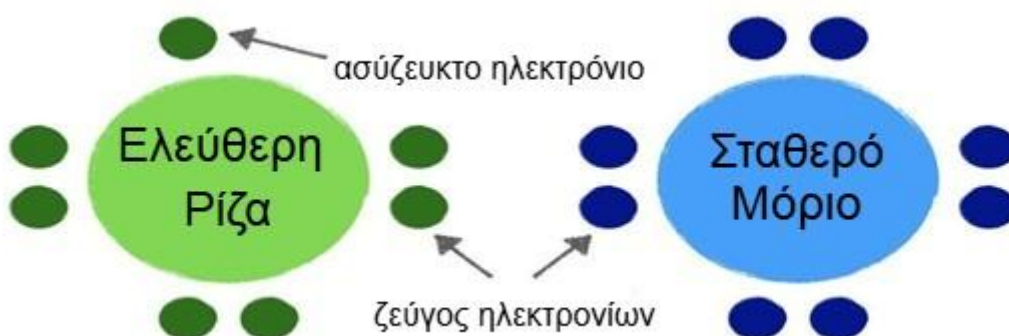
More than 220 weed species have developed resistance to herbicides, 24 of which are glyphosate-resistant weed species. Moreover, the combination of stricter registration and environmental regulations for herbicides has led to limited available weed management options and poses a serious threat to global agricultural productivity. As a response, the combined application of multiple herbicides has become a common agricultural strategy to manage resistance. However, the continuous exposure and widespread use of such mixtures has raised concerns within the scientific community about their potential impact on human health and environment. This concern rises from the fact that most toxicological evaluations focus on the administration of high doses to single compounds, whereas people in their daily lives are exposed to low doses of complex chemical mixtures. Recent research supports that such mixtures may be more toxic than the individual chemical, reinforcing the need for more realistic studies of these phenomena. Therefore, taking the aforementioned into account, the present thesis aims to investigate the long-term effects of perinatal exposure to low doses of glyphosate and its mixture with 2,4-D and dicamba, on redox state of spleen and muscle tissues. In the present study, a total of 80 Wistar rats (40 males and 40 females) were divided into 4 experimental groups and exposed to the studied herbicides via drinking water from gestational day 6 through early adulthood. The experimental design examined glyphosate exposure at the EU Acceptable Daily Intake (ADI) and the No-Observed-Adverse-Effect Level (NOAEL), as well as a herbicide mixture (glyphosate, 2,4-D, dicamba) at their respective ADI doses. Spleen and skeletal muscle tissues were collected and we evaluated a panel of redox biomarkers, including reduced glutathione (GSH), total antioxidant capacity (TAC), hydrogen peroxide decomposition rate, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyls (CARBS), via spectrometry. The perinatal exposure to the ADI mixture impaired antioxidant defense in spleen, indicated by the decrease in the hydrogen peroxide decomposition rate in both sexes and the induction of protein oxidation in male offspring. In skeletal muscle, exposure to glyphosate NOAEL increased protein carbonyls levels in both sexes, whereas the ADI mixture caused oxidative damage to lipids and proteins exclusively in females. These findings reinforce the concept of real-life risk simulation and may contribute to more accurate risk assessment of pesticide mixtures and support a reevaluation of current regulatory safety limits.

1. Εισαγωγή

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ο όρος «ρίζα» εισήχθη για πρώτη φορά από τον Guyton de Morveau το 1786 και αργότερα χρησιμοποιήθηκε από τους Gay-Lussac, Liebig και Berzelius για να υποδηλώσει ομάδες ατόμων που βρέθηκαν αμετάβλητες σε πολλές ουσίες. Ο όρος αποδόθηκε στους Liebig και Wöhler, το έργο των οποίων άσκησε σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη της οργανικής χημείας. Μετά την ταξινόμηση των οργανικών ενώσεων σε ομόλογες σειρές, οι ρίζες θεωρήθηκαν ως ομάδες ατόμων, που ανήκουν σε μόρια οργανικών ενώσεων, τα οποία διατηρούνται αμετάβλητα στις αντιδράσεις που αφορούν τη λειτουργική ομάδα των ενώσεων και μπορούν να αντικατασταθούν από άλλες ρίζες χωρίς να τροποποιούνται ουσιαστικά οι αντιδράσεις.¹

Οι ελεύθερες ρίζες είναι χημικά είδη (άτομα, μόρια ή ιόντα) που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στα εξωτερικά τροχιακά τους και ως εκ τούτου παρουσιάζουν αξιοσημείωτη δραστικότητα.



Εικόνα 1. Δομή ελεύθερης ρίζας και σταθερού μορίου²

Ο όρος δραστική μορφή είναι μία γενικότερη έννοια και αναφέρεται σε μόρια ή άτομα με οξειδωτική δράση, τα οποία χημικά είναι είτε ελεύθερες ρίζες είτε όχι¹. Η απόδειξη της ύπαρξής τους επιτεύχθηκε στις αρχές του 20ού αιώνα. Σταδιακά χημικοί διαπίστωσαν τη συμμετοχή των ελευθέρων ριζών στις οργανικές αντιδράσεις και, στα μέσα του 20ού αιώνα, την παραγωγή τους σε βιολογικά συστήματα.³

Για αρκετά χρόνια, οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνταν ότι προκαλούσαν αποκλειστικά βλαπτικές επιδράσεις. Η υπόθεση αυτή υποστηρίχθηκε στο γεγονός ότι οι δραστικές

μορφές οξυγόνου αντιδρούν εύκολα με όλα τα βιολογικά μακρομόρια, προκαλώντας οξειδωτική τροποποίηση και κατ' επέκταση κυτταρική βλάβη. Επιπλέον, προέκυψαν αποδείξεις ότι η αδυναμία εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών από συστήματα βιοχημικής άμυνας, συμβάλλει στην εμφάνιση και εξέλιξη παθολογικών καταστάσεων³. Ωστόσο, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, έγινε σαφές ότι τα έμβια συστήματα όχι μόνο είχαν προσαρμοστεί στη συνύπαρξη με τις ελεύθερες ρίζες, αλλά ανέπτυξαν και μηχανισμούς για να αξιοποιήσουν αυτές τις τοξικές ουσίες προς όφελός τους, χρησιμοποιώντας τις σε κρίσιμες φυσιολογικές διεργασίες. Επομένως, οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν διπλό ρόλο: είναι τοξικά παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού, που προκαλούν οξειδωτικές βλάβες και δυσλειτουργία των ιστών, και χρησιμεύουν ως μοριακά σήματα που ενεργοποιούν ευεργετικές αποκρίσεις στρες.³

Οι δραστικές μορφές είναι ασταθείς και ιδιαίτερα δραστικές δομές. Ανάλογα με τη δομή τους, τα δραστικά είδη μπορούν να χωριστούν σε δραστικά είδη οξυγόνου (ROS), δραστικά είδη αζώτου (RNS), δραστικά είδη θείου (RSS) και δραστικά καρβονυλικά είδη (RCS). Στα **δραστικά είδη οξυγόνου (ROS)** συμπεριλαμβάνονται η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), οι ρίζες υδροξυλίου ($OH^{\cdot}$) και περοξυλίου ($ROO^{\cdot}$), καθώς και μη ριζικά μόρια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το όζον (O_3) και το μονήρες οξυγόνο ($^1O_2$), ενώ στα **δραστικά είδη αζώτου (RNS)** κατηγοριοποιούνται το μονοξειδίο του αζώτου ($NO^{\cdot}$), το διοξειδίο του αζώτου ($NO_2^{\cdot}$) και το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ($ONOO^{\cdot}$).⁴ Τα **δραστικά είδη θείου (RSS)** συμπεριλαμβάνουν τη ρίζα θειλίου ($RS^{\cdot}$) και μόρια όπως υδρόθειο (H_2S), δισουλφίδιο ($RSSR$), θειόλη (RSH), S-νιτροσοθειόλη ($RSNO$) και σουλφενικό οξύ ($RSOH$). Τέλος, υπάρχουν και **δραστικά καρβονυλικά είδη (RCS)** στα οποία εντάσσονται το μονοξειδίο του άνθρακα (CO), η φορμαλδεΰδη (FA), η γλυοξάλη (GO), η ακρολεΐνη και η γλυκοζόνη.⁵

1.2 Πηγές ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν μέσω διάφορων μηχανισμών :

A) Με την προσθήκη ή αποβολή ενός ηλεκτρονίου από μια μη ρίζα

B) Με ομολυτική σχάση όταν ένας ομοιοπολικός δεσμός (C-C, C-H ή C-O)

διασπάται και ένα ηλεκτρόνιο από το ζεύγος δεσμών παραμένει σε κάθε άτομο. Οι εν λόγω δεσμοί χαρακτηρίζονται από υψηλή ενέργεια σύνδεσης και παρουσιάζουν αυξημένη σταθερότητα, με αποτέλεσμα να απαιτείται σημαντική ενέργεια για τη ρήξη τους. Αντιθέτως, άλλοι δεσμοί με χαμηλότερη ενέργεια σύνδεσης υφίστανται ομολυτική διάσπαση πιο εύκολα.

Ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν ενδογενώς ή με την επίδραση εξωγενών παραγόντων. Οι ενδογενείς πηγές, περιλαμβάνουν διάφορα κυτταρικά οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξεισώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, ενζυμικές αντιδράσεις, το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και τη φαγοκύτωση. Οι εξωγενείς παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν παραγωγή ελεύθερων ριζών είναι διάφοροι τύποι ακτινοβολίας (ακτίνες X, γ-ακτίνες, υπεριώδης ακτινοβολία A, ορατό φως παρουσία ευαισθητοποιητή), βαρέα ή μεταβατικά μέταλλα (π.χ., Cd, Hg, Pb, As, μεταλλικά ιόντα όπως Fe^{2+} και Cu^{+}), το μαγείρεμα (καπνιστό κρέας, χρησιμοποιημένο μαγειρικό λάδι), οι υψηλές θερμοκρασίες, περιβαλλοντικοί ρύποι (αρωματικοί υδρογονάνθρακες, φυτοφάρμακα, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, διοξίνες και πολλά άλλα), μικροβιακές λοιμώξεις, φάρμακα και μεταβολίτες αυτών.⁶

ΠΗΓΕΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ	
ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΠΗΓΕΣ
• Μόλυνση νερού και αέρα • Βαρέα μέταλλα • Φυτοπροστατευτικά προϊόντα (ζιζανιοκτόνα κ.α.) • Υψηλές θερμοκρασίες • UV ακτινοβολία	• Μιτοχόνδρια, υπεροξεισώματα, ενδοπλασματικό δίκτυο • Ενζυμικά συστήματα(κυτόχρωμα P450) • Φαγοκύτωση

• Ακτίνες-γ • Φάρμακα • Επεξεργασμένα τρόφιμα, καπνιστό κρέας κ.α.	
--	--

Πίνακας 1. Πηγές ελεύθερων ριζών(ενδογενείς και εξωγενείς) ⁶

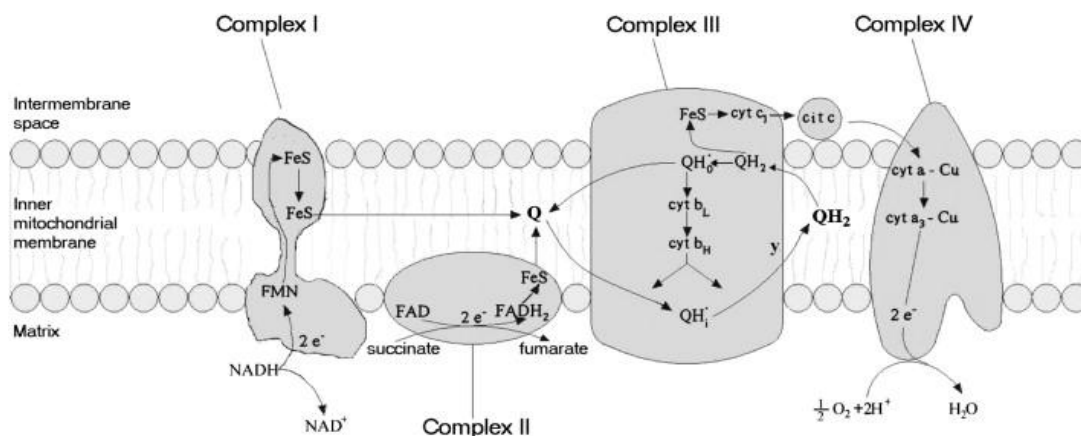
1.2.1 Ενδογενείς πηγές

ROS μπορούν να παραχθούν είτε από ενδογενείς πηγές είτε ως απόκριση σε εξωτερικούς παράγοντες. Οι ενδογενείς πηγές ROS περιλαμβάνουν διάφορα κυτταρικά όργανα, όπως τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξεισώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου η κατανάλωση οξυγόνου είναι υψηλή. ⁷ Η κύρια ενδοκυτταρική πηγή είναι η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα. Θεωρείται ότι στους αερόβιους οργανισμούς οι ROS σχηματίζονται κυρίως κατά το φυσιολογικό μεταβολισμό του οξυγόνου, ως παραπροϊόντα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, κατά τη σύνθεση του ATP. ⁸ Ακόμη, σημαντική πηγή κυτταρικών ROS είναι και οι NADPH οξειδάσες (NOXs) κατά την «αναπνευστική έκρηξη» των φαγοκυττάρων. Επιπλέον, ROS παράγονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στα υπεροξεισώματα, με τη συμμετοχή της ξανθίνης και της ενδοθηλιακής οξειδάσης και κατά τη διαδικασία αυτοοξειδωσης μικρών μορίων.

Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας για τις βιολογικές μας ανάγκες προέρχεται από την οξείδωση (καύση) των διαφόρων συστατικών της τροφής που προσλαμβάνουμε. Ως αποτέλεσμα της γλυκόλυσης και του κύκλου κιτρικού οξέος, παράγονται NADH και FADH₂ που λειτουργούν ως φορείς ηλεκτρονίων με τελικό αποδέκτη το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται σε νερό.⁹

Η οξείδωση πραγματοποιείται σε μια σειρά από επόμενα στάδια, έτσι ώστε η ενέργεια που προκύπτει από την πτώση της δυναμικής ενέργειας των ηλεκτρονίων να απελευθερώνεται σταδιακά. Σε μια τέτοια διαδικασία εμπλέκονται διάφορα οξειδοαναγωγικά κέντρα, τα οποία σε μεγάλο βαθμό είναι οργανωμένα σε τέσσερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα ενσωματωμένα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.¹⁰



Εικόνα 2. Δομή της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας.⁹

Τα μιτοχόνδρια είναι οι σημαντικότερες πηγές H_2O_2 στα κύτταρα. Γενικά, τα σύμπλοκα I και III θεωρούνται οι μόνες πηγές μιτοχονδριακών ROS, με το τελευταίο αναπνευστικό σύμπλοκο να χρησιμεύει ως η κύρια μιτοχονδριακή πλατφόρμα για την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση. Η επιφύλαξη σε αυτή την κοινή παραδοχή είναι ότι τα μιτοχόνδρια μπορεί να περιέχουν έως και 12 γεννήτριες ROS που σχετίζονται με την καύση καυσίμων και την οξειδωτική φωσφορυλίωση.¹¹

Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη»

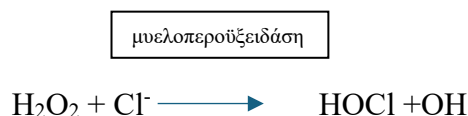
Η φαγοκυττάρωση αποτελεί μια διαδικασία που εκτελείται από μονοπύρηννα φαγοκύτταρα και ουδετερόφιλα, μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η πρόσληψη και απομάκρυνση μεγάλων σωματιδίων (με διάμετρο μεγαλύτερη από 0,5 μm), όπως μολυσματικοί παράγοντες, γηρασμένα κύτταρα και κυτταρικά υπολείμματα.¹² Τα φαγοκυτταρικά λευκοκύτταρα αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς.

Η αναπνευστική έκρηξη των φαγοκυττάρων στοχεύει στη δημιουργία ουσιών που έχουν άμεση μικροβιοκτόνο δράση ή αποκτούν τέτοια δράση σε συνδυασμό με άλλα συστατικά των φαγοκυττάρων. Αυτή η διαδικασία χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου, που καταλήγει στην παραγωγή υπεροξειδίου (O_2^-), μια αντίδραση που καταλύεται από το σύστημα NADPH-οξειδάσης:¹³



Η ικανότητα της αναπνευστικής έκρηξης καθορίζει σε μεγάλο βαθμό το κυτταροτοξικό δυναμικό του ουδετερόφιλου.¹⁴

Η κυτταροπλασματική δισμουτάση του υπεροξειδίου μετατρέπει το $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε $OH^{\cdot}$ μέσω της αντίδρασης Fenton ή σε $HOCl$ μέσω της αντίδρασης που καταλύει η μυελοϋπεροξειδάση:



Αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση θεωρείται σημαντική, ωστόσο οι ROS και άλλα οξειδωτικά μόρια που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξείδωση των λιπιδίων.¹⁵

Υπεροξεισώματα

Τα υπεροξεισώματα θεωρούνται ως οι κύριες θέσεις παραγωγής H_2O_2 στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, λόγω του κατά βάση οξειδωτικού χαρακτήρα του μεταβολισμού τους. Διαδραματίζουν καίριο ρόλο στη ρύθμιση της παραγωγής αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) υπό συνθήκες αβιοτικού στρες, όπως εκείνες που προκαλούνται από το βαρύ μέταλλο κάδμιο (Cd) και το ξеноβιοτικό 2,4-D, καθώς και κατά τη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης μέσω οξειδωτικών μηχανισμών. Οι τοξικές επιδράσεις του Cd και του 2,4-D διαταράσσουν τον μεταβολισμό των ROS και επηρεάζουν τη δυναμική και κατανομή των υπεροξειδιοσωμάτων εντός του κυττάρου.¹⁶

Στα υπεροξειδιοσώματα, η αναπνευστική αλυσίδα μεταφέρει ηλεκτρόνια από διάφορους μεταβολίτες προς το οξυγόνο, σχηματίζοντας H_2O_2 . Αυτή η διαδικασία, ωστόσο, δεν συνοδεύεται από οξειδωτική φωσφορυλίωση για την παραγωγή ATP. Αντίθετα, η απελευθερούμενη ενέργεια εκλύεται ως θερμότητα. Ειδικότερα, η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων αποτελεί την κύρια μεταβολική οδό στα οργανίδια που παράγει H_2O_2 . Εκτός από το H_2O_2 , τα υπεροξειδιοσώματα παράγουν επίσης και άλλες ελεύθερες ρίζες, όπως H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$ και $NO^{\cdot}$.¹⁷

Ενδοπλασματικό δίκτυο

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) αποτελεί ένα σύνθετο και δυναμικό σύστημα σωληνάριων, το οποίο εξυπηρετεί την εισαγωγή, την επεξεργασία και την αποστολή εκκριτικών και διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που εισέρχονται στο ΕΔ είτε αναδιπλώνονται σωστά και κατευθύνονται σε άλλα οργανίδια είτε, αν αναδιπλωθούν εσφαλμένα, προορίζονται για αποικοδόμηση. Το οξειδοαναγωγικό περιβάλλον του ΕΔ διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στον καθορισμό της πορείας αυτών των πρωτεϊνών, ενώ η ισορροπία των οξειδοαναγωγικών παραγόντων επηρεάζει την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS).¹⁸

Σύμφωνα με ερευνητικά δεδομένα, το στρες του ΕΔ και η παραγωγή ROS συνδέονται στενά μέσω οξειδοαναγωγικών μεσολαβητών, όπως:

- Η ισομεράση πρωτεϊνικών δισουλφιδίων (PDI)
- Η οξειδοαναγωγική ουσία του ΕΔ (ERO1)
- Η γλουταθειόνη (GSH) και το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG)
- Η NADPH-οξειδάση 4 (Nox4)
- Η αναγωγή NADPH-P450 (NPR)
- Το ασβέστιο, το οποίο επηρεάζει την ομοιόσταση του ΕΔ

Αυτοί οι παράγοντες διαμορφώνουν τις οξειδοαναγωγικές διεργασίες εντός του ΕΔ, συμβάλλοντας στην ισορροπία μεταξύ σωστής αναδίπλωσης πρωτεϊνών και κυτταρικού στρες.¹⁹

Κυτόχρωμα P450

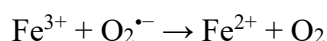
Τα κυτοχρώματα P450 (P450) στα θηλαστικά αποτελούν μια οικογένεια αιμοπρωτεϊνών που εμπλέκονται στον οξειδωτικό μεταβολισμό ενός ευρέος φάσματος ενδογενών και εξωγενών λιπόφιλων ενώσεων. Όταν ο καταλυτικός κύκλος των P450 δεν λειτουργεί σωστά, προκύπτει συνεχής παραγωγή ROS, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τα κυτταρικά σήματα και κυτταρικές λειτουργίες.²⁰ Η παραγωγή ROS από τα P450 ελέγχεται μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής μεταγραφής και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών της μονοοξυγενάσης, οι οποίες επηρεάζουν τη δραστηριότητα, τη

σύζευξη και τη σταθερότητά τους. Αν οι μηχανισμοί αυτοί αποτύχουν, μπορεί να υπάρξει υπερβολική παραγωγή ROS, προκαλώντας υπεροξειδωση λιπιδίων και οξειδωτικό στρες.²¹ Το οξειδωτικό στρες με τη σειρά του μειώνει τα επίπεδα της P450 μέσω μηχανισμών ανατροφοδότησης.²²

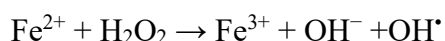
Αντίδραση Haber-Weiss και Fenton

Μέταλλα όπως ο σίδηρος (Fe), ο χαλκός (Cu), ο ψευδάργυρος (Zn) και το αλουμίνιο (Al), εξαιτίας των πολλαπλών οξειδωτικών καταστάσεών τους, μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με το μοριακό οξυγόνο, οδηγώντας στη δημιουργία ROS και RNS. Οι αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην παραγωγή ROS και στην ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων, ιδιαίτερα στη περίπτωση του νευρικού συστήματος.²³

Το πρώτο βήμα (Haber-Weiss) περιλαμβάνει τη μετατροπή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή:



Οι αντιδράσεις Fenton περιγράφουν τη διαδικασία κατά την οποία ο δισθενής σίδηρος (Fe^{2+}) οξειδώνεται από H_2O_2 , παράγοντας τρισθενή σίδηρο (Fe^{3+}) και διάφορα ROS²⁴:



Οι παραλλαγές των αντιδράσεων τύπου Fenton περιλαμβάνουν τη συμμετοχή μεταλλικών ιόντων εκτός από το Fe^{2+} (όπως Mn^{2+} , Co^{2+} και Cu^{2+}). Αυτά τα μέταλλα έχουν την ικανότητα να αναγάγουν το H_2O_2 σε υδροξείδιο ($\text{HO}^\bullet$) και υπεροξείδιο ($\text{O}_2^{\bullet-}$) υπό σχεδόν ουδέτερες, βιολογικά συναφείς συνθήκες.²⁵

1.2.2 Εξωγενείς πηγές

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών από εξωγενείς παράγοντες είναι αποτέλεσμα έκθεσης σε περιβαλλοντική ρύπανση, ακτινοβολία, αλκοόλ, βαρέα μέταλλα (Fe, Cu, Co, Cr), μέταλλα μετάπτωσης, στον καπνό του τσιγάρου, σε ορισμένα φυτοφάρμακα και φάρμακα

όπως αλοθάνιο και παρακεταμόλη²⁶. Ειδικότερα, ο καπνός του τσιγάρου αποτελεί μια ιδιαίτερα συμπυκνωμένη πηγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS). Η πίσσα που περιέχεται στον καπνό έχει την ικανότητα να παράγει υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα όταν βρίσκεται σε υδατικά περιβάλλοντα.²⁷ Το μαγείρεμα επίσης (καπνιστό κρέας, χρησιμοποιημένο λάδι, λίπος) αποτελεί μία από τις συχνότερες εξωγενείς πηγές.²⁸

1.3 Επιδράσεις ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν αναγνωριστεί για το διττό τους ρόλο, καθώς μπορούν να είναι τόσο ωφέλιμες όσο και επιβλαβείς, ανάλογα με την επίδρασή τους στα βιολογικά συστήματα. Σε χαμηλές και βέλτιστες συγκεντρώσεις, οι ROS και RNS έχουν θετική επίδραση και προάγουν την κυτταρική σηματοδότηση, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις που υπάρχει αδυναμία εξουδετέρωσης από τον αμυντικό μηχανισμό, επιφέρουν βλαπτικές συνέπειες. Στη δεδομένη περίπτωση, η υπέρμετρη παραγωγή ελεύθερων ριζών επηρεάζει αρνητικά τις φυσιολογικές διαδικασίες σε διάφορα στάδια, προκαλώντας αλυσιδωτές αντιδράσεις που καταλήγουν σε μοριακές βλάβες στους ιστούς και στους μηχανισμούς σηματοδότησης του οργανισμού.²⁹ Έτσι, η ισορροπία μεταξύ της παραγωγής και εξουδετέρωσης ROS είναι πολύ σημαντική. Όταν εμφανίζεται ανισορροπία υπέρ των ROS, επέρχεται οξειδωτικό στρες.³⁰

1.3.1 Θετικές επιδράσεις

Οι ROS θεωρούνταν παλαιότερα ότι προέρχονται κυρίως από τον μιτοχονδριακό μεταβολισμό. Ωστόσο, ολοένα και περισσότερα δεδομένα δείχνουν ότι ένζυμα όπως οι NADPH οξειδάσες παράγουν σημαντικές ποσότητες ROS στον ανθρώπινο οργανισμό. Επιπλέον, άλλες πηγές ROS περιλαμβάνουν κυτταρικούς τύπους όπως ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, καρδιομυοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και ένζυμα όπως οι οξειδάσες της ξανθίνης, το κυτόχρωμα P450, οι λιποξυγονάσες και οι συνθάσες του μονοξειδίου του αζώτου.³¹ Η βιωσιμότητα των κυττάρων είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την παρουσία των ROS στα βιολογικά συστήματα, καθώς οι ίδιες δραστικές μορφές

δύνανται να δράσουν ως σηματοδοτικά μόρια ή μεσολαβητές για διάφορες εργασίες, όπως παραδείγματος χάρη ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η δράση ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς και η ενεργοποίηση μεταγραφικών μονοπατιών.

Το γεγονός ότι το μονοξείδιο του αζώτου συμβάλλει στο σχηματισμό της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανωσίνης (cGMP) οδήγησε στη διαπίστωση ότι τα ζωντανά συστήματα προσαρμόζονται στη συνύπαρξη με τις ελεύθερες ρίζες και ταυτόχρονα αναπτύσσουν μεθόδους για να μετατρέπουν τις τοξικές ουσίες προς όφελός τους, χρησιμοποιώντας τις κυρίως σε κρίσιμες φυσιολογικές διεργασίες. Έρευνες έδειξαν πως σε κυτταρικό επίπεδο οι ROS ρυθμίζουν την ανάπτυξη, την απόπτωση και άλλες σηματοδοτήσεις, ενώ σε επίπεδο συστήματος, μπορούν να συμβάλουν ευεργετικά σε πολλές λειτουργίες, όπως η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και η γνωστική λειτουργία.³²

Όσον αφορά τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, είναι ευρέως γνωστό πως οι δύο βασικοί τύποι ανοσολογικών αντιδράσεων είναι η έμφυτη και η επίκτητη. Και οι δύο ρυθμίζονται μέσω σύνθετων μηχανισμών, οι οποίοι περιλαμβάνουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Μία από τις πρώτες γραμμές άμυνας ενάντια στους παθογόνους οργανισμούς είναι η αναπνευστική έκρηξη, η οποία προκύπτει από την αυξημένη πρόσληψη οξυγόνου από τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα. Τα φαγοκύτταρα εξουδετερώνουν τους μικροοργανισμούς χρησιμοποιώντας μηχανισμούς ενδοκυτταρικής θανάτωσης που είναι είτε εξαρτημένοι είτε ανεξάρτητοι από το οξυγόνο.³³ Στην πρώτη περίπτωση, τα φαγοκύτταρα αυξάνουν την κατανάλωση οξυγόνου, προκαλώντας την παραγωγή οξειδωτικής έκρηξης. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, παράγεται υπεροξείδιο, το οποίο μετατρέπεται στη συνέχεια σε υπεροξείδιο του υδρογόνου μέσω της δράσης του ενζύμου SOD. Επιπλέον, το υπεροξείδιο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδρούν, δημιουργώντας ρίζες υδροξυλίου. Η παραγωγή των ROS έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απόκρισης, ενώ παράλληλα παίζει ρόλο στη συναρμολόγηση και την ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων.³³

Η επαγόμενη από τις ROS αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιείται μέσω της ρύθμισης πολλών σηματοδοτικών διαδρομών, οι οποίες περιλαμβάνουν cAMP-μεσολαβούμενες οδούς, τις διαδρομές ασβεστίου-καλμοδουλίνης και τις ενδοκυτταρικούς μεταδότες σήματος, όπως το μονοξείδιο του αζώτου³⁴. Το μονοξείδιο του αζώτου είναι ένας σημαντικός αγγελιαφόρος, απαραίτητος για τη σωστή ρύθμιση της κυκλοφορίας του

αίματος, συμμετέχει στη θρόμβωση και είναι σημαντικός για τη φυσιολογική νευρική λειτουργία³⁵. Επιπλέον, μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι ROS είναι ικανές να απελευθερώσουν ασβέστιο από ενδοκυτταρικές δεξαμενές, οδηγώντας στην ενεργοποίηση κινασών, όπως η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), που ελέγχει διάφορες κυτταρικές δραστηριότητες που αφορούν τον πολλαπλασιασμό, τον κυτταρικό κύκλο, τη διαφοροποίηση, την οργάνωση του κυτταροσκελετού και την απόπτωση.³⁴

1.3.2 Αρνητικές επιδράσεις ελεύθερων ριζών

Υπολογίζεται ότι ο μέσος άνθρωπος δέχεται περίπου 10.000-20.000 επιθέσεις από ελεύθερες ρίζες σε κάθε κύτταρο του σώματός του καθημερινά. Παρά την ύπαρξη του αντιοξειδωτικού συστήματος άμυνας των κυττάρων, το οποίο προσπαθεί να αντιμετωπίσει την οξειδωτική βλάβη από τις ROS, οι επαγόμενες βλάβες στο DNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες έχουν προταθεί ως σημαντικοί παράγοντες στην ανάπτυξη και εξέλιξη εκφυλιστικών ασθενειών, όπως η μυατροφική πλευρική σκλήρυνση, η ισχαιμική καρδιοπάθεια, η νόσος Alzheimer, η νόσος Parkinson, ο καρκίνος, η αρθρίτιδα και η διαδικασία της γήρανσης.³⁶ Ακολούθως παρουσιάζονται συνοπτικά οι αρνητικές επιδράσεις των ελεύθερων ριζών.

Πρωτεΐνες

Οι ROS προκαλούν αλλαγή του ηλεκτρικού φορτίου των πρωτεϊνών, διάσπαση της πεπτιδικής αλυσίδας, διασταύρωση των πρωτεϊνών και οξείδωση αμινοξέων (π.χ. κατάλοιπα κυστεΐνης, μεθειονίνης), με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας των πρωτεϊνών στην πρωτεόλυση από τις πρωτεάσες.³⁷ Ειδικότερα, ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να οξειδώνουν αμινοξέα και κατά συνέπεια πρωτεΐνες. Η οξείδωση των αμινοξέων συνεπάγεται μεταβολή της στερεοδιαμόρφωσης του ενεργού κέντρου ενός ενζύμου, γεγονός που οδηγεί σε υπερβολική δραστηριότητα ή καταστροφή του. Έτσι, πρωτεΐνες που έχουν λειτουργικό ή δομικό ρόλο ενδέχεται να χάσουν την ικανότητα μεταφοράς εάν είναι υποδοχείς ή μεταφορείς.³⁸

Πρωτεΐνες που έχουν υποστεί οξειδωτικές τροποποιήσεις από ελεύθερες ρίζες είναι ανθεκτικές στην πρωτεολυτική διάσπαση και μπορούν να λειτουργούν ως αναστολείς των λυσοσωμικών υδρολασών και του πρωτεασώματος. Σε αυτή την περίπτωση το

πρωτεάσωμα είναι ευαίσθητο σε οξειδωτικές τροποποιήσεις, οδηγώντας σε αδρανοποίηση της λειτουργίας του.³⁹ Εξαιρετικά ευαίσθητες σε οξείδωση από τις ROS εμφανίζονται οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων, όπως ιστιδίνη, κυστεΐνη, μεθειονίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη και λευκίνη.⁴⁰ Όλα τα προαναφερθέντα αμινοξέα, εκτός της κυστεΐνης, μετατρέπονται σε καρβονυλομάδες με τελικό στάδιο το σχηματισμό δραστικών ριζών. Οι θειολικές μονάδες της κυστεΐνης όμως οξειδώνονται σε ρίζες θείου.⁴¹

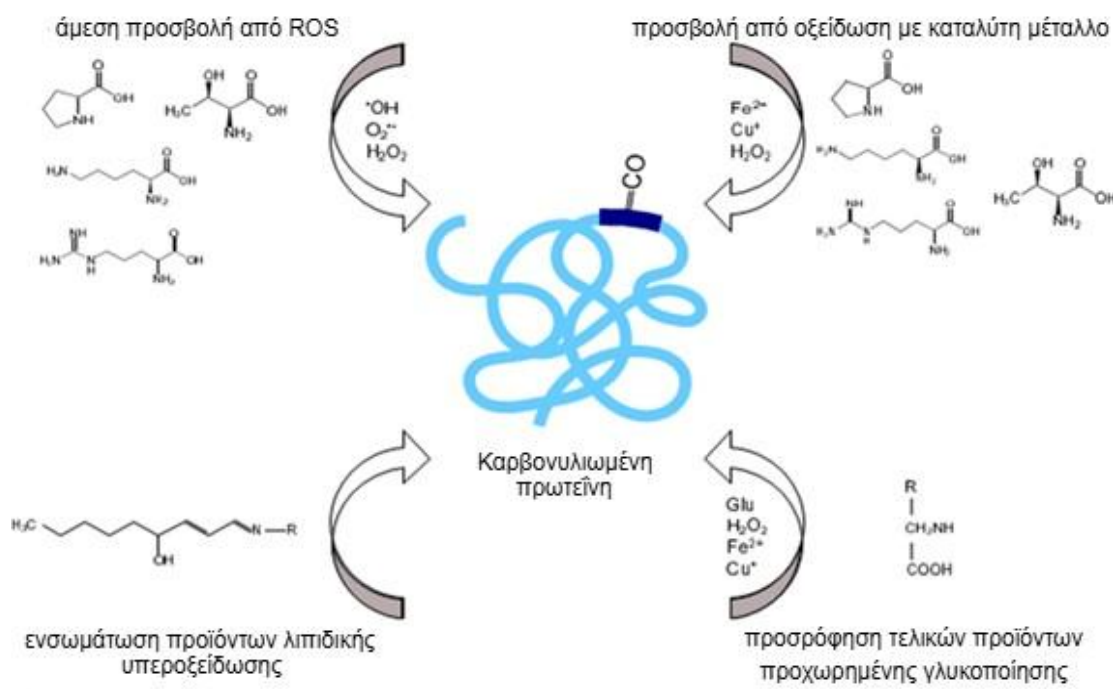
Παρά το γεγονός ότι οι μερικώς οξειδωμένες πρωτεΐνες μπορούν να αποικοδομηθούν από το πρωτεόσωμα, οι βαριά καρβονυλιωμένες σχηματίζουν συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους, τα οποία δεν αποικοδομούνται, αλλά μπορούν να αναστείλουν τη λειτουργία του πρωτεοσώματος.⁴²

Η πιο καλά μελετημένη μη αναστρέψιμη οξείδωση πρωτεϊνών είναι η καρβονυλίωση. Οι καρβονυλικές ομάδες (όπως οι δραστικές αλδεϋδες και οι κετόνες) είναι δυνατόν να εισαχθούν στις πρωτεΐνες με οξείδωση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων ή να δημιουργηθούν μέσω οξειδωτικής διάσπασης των πρωτεϊνών, οδηγώντας στον σχηματισμό πεπτιδίων με α -κετοπαράγωγο στο N-τελικό άκρο. Τέλος, η σύζευξη με αλδεϋδες που παράγονται κατά την υπεροξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) (Τελικά Προϊόντα Προηγμένης Υπεροξείδωσης, ALE) αλλά και με αντιδραστικά καρβονυλικά παράγωγα που παράγονται από την αντίδραση με αναγωγικούς υδατάνθρακες (Τελικά Προϊόντα Προηγμένης Γλυκοποίησης, AGE), είναι ικανή να οδηγήσει σε καρβονυλίωση των πρωτεϊνών.

Ο συνηθέστερος μηχανισμός καρβονυλίωσης στα κύτταρα είναι η οξείδωση που καταλύεται από μέταλλα (MCO). Η μέση συνολική συγκέντρωση ιόντων Fe και Cu στα υγιή ζωντανά κύτταρα ανήκει στη μικρομοριακή κλίμακα, αν και εξειδικευμένα κύτταρα όπως τα ερυθροκύτταρα με την τεράστια περιεκτικότητά τους σε αιμοσφαιρίνη μπορεί να περιέχουν έως και 20 mM Fe. Ο μηχανισμός καρβονυλίωσης που καταλύεται από μέταλλα λαμβάνει χώρα, όταν ανηγμένα ιόντα μετάλλων όπως ο Fe^{2+} ή ο Cu^+ αλληλεπιδρούν με το H_2O_2 στη λεγόμενη αντίδραση Fenton και παράγουν τις εξαιρετικά δραστικές ρίζες υδροξυλίου. Η ρίζα υδροξυλίου με τη σειρά της, οξειδώνει πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων ή προκαλεί διάσπαση του πρωτεϊνικού σκελετού, έχοντας ως αποτέλεσμα το σχηματισμό καρβονυλικών ομάδων.

Διαφαίνεται πως υπάρχει στενή αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφόρων τύπων καρβονυλίωσης πρωτεϊνών και της MCO. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η MCO και οι

ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των AGEs και της πρωτεϊνικής διασταυρούμενης σύνδεσης που προκαλείται από τα αυτά.⁴³



Εικόνα 3. Οι πιο συνηθισμένες οδοί καρβονυλίωσης πρωτεϊνών περιλαμβάνουν την άμεση προσβολή από ROS σε κατάλοιπα αμινοξέων [προλίνη (Pro), αργινίνη (Arg), λυσίνη (Lys)], την προσβολή από οξείδωση με καταλύτη μέταλλο (MCO) σε κατάλοιπα Lys, Arg και Pro παρουσία ROS και ανηγμένων μεταλλικών ιόντων, την προσρόφηση τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοποίησης (AGEs) που σχηματίζονται παρουσία ROS, ανηγμένων μεταλλικών ιόντων και αναγωγικών σακχάρων, π.χ. π.χ. γλυκόζη (Glu), και ενσωμάτωση προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσίας, π.χ. 4-hydroxynonenal. Το R αντιπροσωπεύει κατάλοιπο αμινοξέος της στοχευόμενης πρωτεΐνης για καρβονυλίωση.⁴⁴

Νουκλεϊκά οξέα

Οι ROS μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με το DNA προκαλώντας βλαπτικές επιδράσεις, παρά το γεγονός ότι είναι ένα σχετικά σταθερό μόριο. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να προκαλέσει τροποποιήσεις στις βάσεις του DNA, θραύσεις, απώλεια πουρινών και πυριμιδινών, βλάβες στην εξόζη, καθώς και δυσλειτουργίες στο σύστημα επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA. Οι οξειδωτικές τροποποιήσεις στα νουκλεϊκά οξέα επηρεάζουν αρνητικά την αντιγραφή, τη μεταγραφή και τη μετάφραση, διαδικασίες που είναι απαραίτητες για την έκφραση των πρωτεϊνών. Παράλληλα, αυτές οι αλλαγές μπορούν να

οδηγήσουν σε μεταλλάξεις, οι οποίες ενδέχεται να προκαλέσουν παθολογικές καταστάσεις ή ακόμη και να καταλήξουν στον θάνατο του οργανισμού.⁴⁵

Οι ROS χαρακτηρίζονται ως βασικοί μεσολαβητές βλαβών στο DNA. Για παράδειγμα, η ιονίζουσα ακτινοβολία (IR) προκαλεί δίκλωνες ρήξεις στο DNA, είτε μέσω άμεσης υψηλής ενέργειας στον κορμό του σακχάρου του DNA είτε μέσω της παραγωγής ελεύθερων ριζών, κυρίως $\cdot\text{OH}$, από την αποδόμηση του νερού στα κύτταρα. Οι επαγόμενες από την ιονίζουσα ακτινοβολία ROS μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο DNA μέσω οξείδωσης νουκλεοτιδικών βάσεων, οδηγώντας στο σχηματισμό τροποποιημένων μορίων, όπως 8-υδροξυ-δεοξυγουανωσίνης. Η μη επιδιόρθωση της βλάβης αυτής ενδέχεται να οδηγήσει σε τροποποιήσεις βάσεων, όπως G-T ή G-A. Οι οξειδωμένες βάσεις συνήθως αναγνωρίζονται και επιδιορθώνονται μέσω της οδού επιδιόρθωσης, αλλά εάν οι βλάβες εμφανίζονται ταυτόχρονα σε αντίθετες αλυσίδες, οι προσπάθειες επιδιόρθωσης μπορεί να προκαλέσουν τη δημιουργία διπλών θραύσεων στο DNA. Επιπλέον, η συσσώρευση ROS συνδέεται με βλάβες στο μιτοχονδριακό DNA, όπως θραύσεις και αποικοδόμηση του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού.⁴⁶

Οι οξειδωτικές βλάβες στο DNA έχουν αποδειχθεί επιβλαβείς, τόσο για τα κύτταρα όσο και για τα διάφορα όργανα, σε αντίθεση με τις βλάβες που υφίσταται το RNA, οι οποίες δεν τυγχάνουν ιδιαίτερης προσοχής, πιθανόν λόγω της παραδοχής ότι τα κατεστραμμένα μόρια RNA δε συσσωρεύονται, εξαιτίας της παροδικής φύσης του. Ωστόσο, η παραμονή των ανθρώπινων μορίων mRNA χαρακτηρίζεται από χρόνο ημιζωής περίπου 10 ωρών, ενώ οι βλάβες που προκαλούνται από τις ROS διαρκούν μόλις μερικά λεπτά. Επιπλέον, είναι γνωστό πως τα σταθερά είδη RNA (όπως το ριβοσωμικό RNA) αποτελούν την πλειονότητα του κυτταρικού RNA και δεν αποικοδομούνται κατά την εκθετική ανάπτυξη.⁴⁷

Το RNA που εντοπίζεται στα κύτταρα είναι πιθανότατα πιο επιρρεπές στην οξειδωτική βλάβη σε σύγκριση με το DNA και πιο εύκολα προσβάσιμο στις ROS για τους παρακάτω λόγους:

- Είναι κυρίως μονόκλωνο
- Έχει σχετικά λιγότερη συσχέτιση με πρωτεΐνες
- Έχει εκτεταμένη υποκυτταρική κατανομή και το κυτταροπλασματικό RNA βρίσκεται κοντά στα μιτοχόνδρια όπου παράγεται η πλειονότητα των ROS
- Σε αντίθεση με το DNA, δεν έχουν εντοπιστεί ενεργοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης στα μόρια RNA που έχουν υποστεί οξειδωτική βλάβη

Έτσι, είναι πιθανό, οι επαγόμενες από τις ROS οξειδωτικές βλάβες, να μεταβάλλουν τη δομή του RNA και άλλων κυτταρικών μορίων, με αποτέλεσμα τη μεταβολή ή απώλεια της λειτουργικότητάς του. Η οξείδωση του mRNA μειώνει σημαντικά την μεταφραστική ικανότητα και οδηγεί στην παραγωγή μη φυσιολογικών πρωτεϊνών, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*.⁴⁷

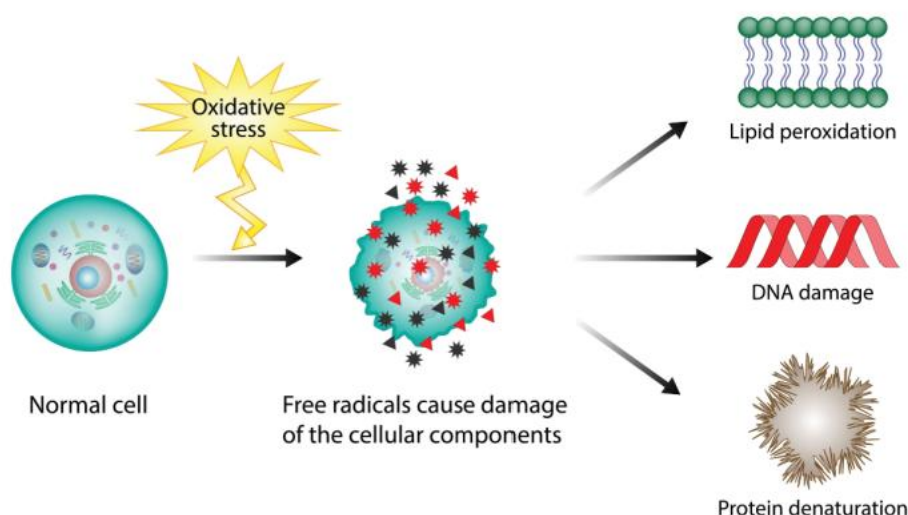
Πρόσφατα, αναφέρθηκαν αξιοσημείωτες αυξήσεις των οξειδωμένων προϊόντων RNA σε πάσχοντες, κυρίως εκφυλιστικών ασθενειών, που σχετίζονται με την ηλικία. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι νόσοι Alzheimer και Parkinson, η ατροφία του πολλαπλού συστήματος, η άνοια με σωματίδια Lewy και η αθηροσκλήρωση. Στα πρώιμα στάδια της νόσου Alzheimer, τα επίπεδα των μορίων RNA που έχουν υποστεί οξειδωτική βλάβη είναι αυξημένα. Η βλάβη του RNA μπορεί να είναι ένας αρχικός αιτιολογικός ή ενισχυτικός παράγοντας ή απλώς μια συνέπεια της νόσου.⁴⁷

Λιπίδια

Η διαδικασία κατά την οποία οξειδωτικά μόρια όπως οι ελεύθερες ρίζες επιτίθενται σε λιπίδια, ιδίως σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), είναι γνωστή ως υπεροξείδωση των λιπιδίων⁴⁸. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στον κυτταρικό θάνατο, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης και της αυτοφαγίας. Αυτός ο θεμελιώδης μηχανισμός βασίζεται στην περίσσεια δραστικών μορφών οξυγόνου που επιτίθεται στις βιομεμβράνες, πολλαπλασιάζει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις υπεροξείδωσης των λιπιδίων και στη συνέχεια επάγει διάφορους τύπους κυτταρικού θανάτου.⁴⁹

Η διαδικασία υπεροξείδωσης των λιπιδίων με την μεσολάβηση των ROS περιλαμβάνει 3 στάδια. Κατά την έναρξη, ελεύθερες ρίζες αφαιρούν υδρογόνο από τα λιπίδια-στόχους, σχηματίζοντας ρίζα λιπαρού οξέος, με πυρήνα άνθρακα (L·). Κατά την μετάδοση, η ρίζα λιπαρού οξέος αντιδρά με οξυγόνο δημιουργώντας λιπιδική ρίζα υπεροξυλίου (LOO·). Στη συνέχεια η ρίζα LOO· αποσπά ένα άλλο άτομο υδρογόνου από ένα ακόρεστο λιπίδιο για τον σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων (LOOH) και πολλαπλασιάζει την αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών⁵⁰. Κατά τον τερματισμό τα αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη E, προσφέρουν υδρογόνο στην λιπιδική ρίζα υπεροξυλίου, σταματώντας την αλυσιδωτή αντίδραση και σχηματίζοντας μη ριζικά προϊόντα.⁴⁸ Τέλος κατά την λιπιδική υπεροξείδωση προκύπτουν και παραπροϊόντα, όπως η 4-υδροξυεπενάλη (4-HNE) και η

μαλονδιαλδεϋδη (MDA), που χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα τοξικές και μεταλλαξιγόνες ουσίες της υπεροξειδωδης.⁵¹



Εικόνα 4. Η δράση των ROS στο DNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες οδηγεί σε οξείδωση των βάσεων του DNA, υπεροξειδωση των λιπιδίων και καρβονυλίωση των πρωτεϊνών, αντίστοιχα.⁵²

1.4 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Με τον όρο αντιοξειδωτικό ορίζουμε κάθε ουσία η οποία προλαμβάνει, καθυστερεί ή απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη από/σε ένα μόριο στόχο. Ο κύριος ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι η προστασία των κυττάρων από τις επιβλαβείς επιδράσεις των ελεύθερων ριζών, η εξουδετέρωση της περίσσειας αυτών και η αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες.⁵³ Οι μηχανισμοί της αντιοξειδωτικής δράσης περιλαμβάνουν: άμεση εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών (δραστικών ειδών οξυγόνου/αζώτου), ανάκτηση σταθερών μορίων, δέσμευση μεταλλικών ιόντων που εμπλέκονται στην παραγωγή ελεύθερων ριζών, αναστολή δράσης οξειδωτικών ενζύμων και επιδιόρθωση οξειδωτικών βλαβών. Ο όρος «οξειδωσιμο υπόστρωμα» περιλαμβάνει σχεδόν όλα τα μόρια που συναντώνται στα ζωντανά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων, των υδατανθράκων και του DNA.⁵⁴

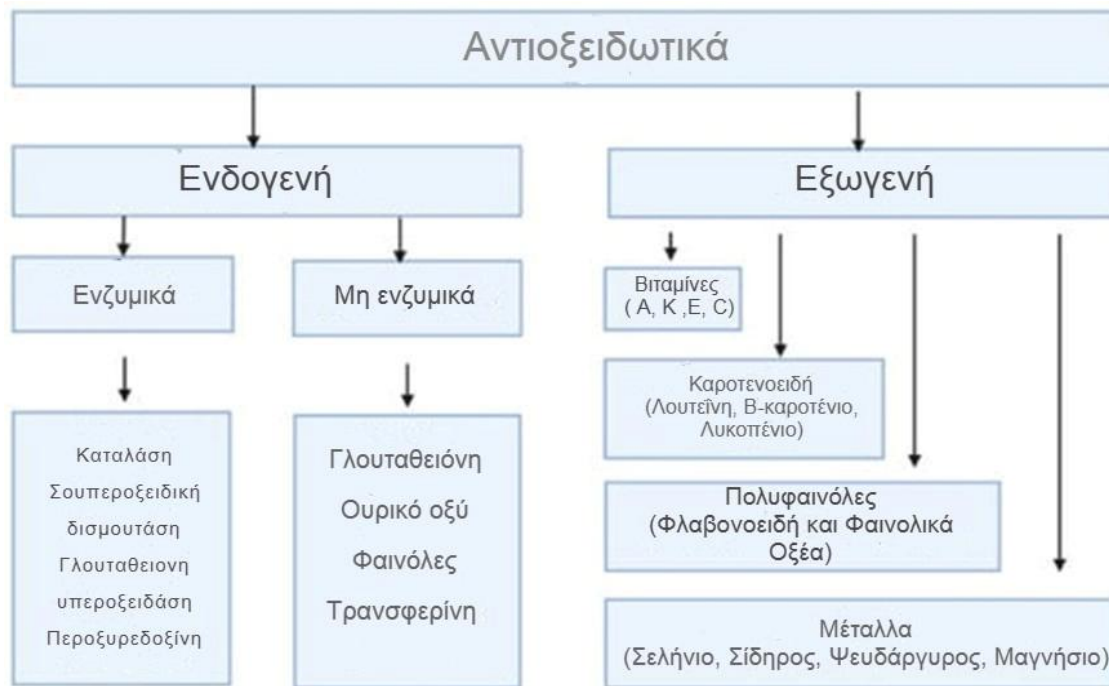
Τα αντιοξειδωτικά είναι χημικές ουσίες που δρουν είτε για να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες είτε για να παρεμποδίσουν τη δράση τους. Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει έναν επαρκή αμυντικό μηχανισμό για την προστασία τους από τις βλαπτικές δράσεις των ελεύθερων ριζών. Μεταξύ των αντιοξειδωτικών συμπεριλαμβάνονται: α) ένζυμα όπως υπεροξειδικές δισμουτάσες (SOD) και υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPx), β) μικρά μόρια, όπως οι θειόλες και το ουρικό οξύ και γ) εξωγενή αντιοξειδωτικά, όπως βιταμίνη C και E.⁵⁵ Στο περίπλοκο αυτό σύστημα αντιοξειδωτικής προστασίας περιλαμβάνονται επίσης, πρωτεΐνες δέσμευσης μετάλλων, όπως φερριτίνη, λακτοφερρίνη, αλβουμίνη και κερουλοπλασμίνη, οι οποίες δεσμεύουν ελεύθερα ιόντα σιδήρου και χαλκού, ικανά να καταλύουν οξειδωτικές αντιδράσεις, και πολυάριθμα άλλα αντιοξειδωτικά φυτοθεραπευτικά συστατικά που υπάρχουν σε μεγάλη ποικιλία φυτικών τροφίμων.⁵⁶

Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να εμφανίζονται φυσικά σε φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς ή να συντίθενται με χημικά μέσα. Τα ανώτερα φυτά και τα συστατικά τους παρέχουν μια πλούσια πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως οι τοκοφερόλες και οι πολυφαινόλες που βρίσκονται σε αφθονία στα μπαχαρικά, τα βότανα, τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά, τους σπόρους, τα τσάγια και τα έλαια.⁵⁷

Τα αντιοξειδωτικά ταξινομούνται σε δύο κύριες κατηγορίες, τα ενδογενή και τα εξωγενή. Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά είναι εκείνα τα οποία παράγονται εντός των κυττάρων (in vivo) και ακολουθούν περαιτέρω υποκατηγοριοποίηση σε ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.⁵⁵ Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά καταλύουν την μετατροπή ROS ή των οξειδωμένων προϊόντων τους σε πιο σταθερά, λιγότερο δραστικά είδη, χρησιμοποιώντας συμπαραγόντες όπως σίδηρο, ψευδάργυρο, χαλκό και μαγνήσιο, ενώ τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά αναχαιτίζουν και τερματίζουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών.

Στα ενδογενή αντιοξειδωτικά περιλαμβάνονται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSHpx), η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GSSGR) και η οξυγενάση της αίμης.⁵⁸ Τα αντιοξειδωτικά αυτά ένζυμα δρουν χρησιμοποιώντας συμπαραγόντες μικροθρεπτικών συστατικών, με αποτέλεσμα η ανεπαρκής διατηρητική πρόσληψη αυτών των ιχνοστοιχείων να μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την αποτελεσματικότητα αυτών των μηχανισμών.⁵⁷ Το αντιοξειδωτικό μας σύστημα, είναι ατελές χωρίς εξωγενείς αναγωγικές ενώσεις, όπως η βιταμίνη C και E, τα καροτενοειδή και οι πολυφαινόλες. Τα εξωγενή αντιοξειδωτικά συνεισφέρουν σημαντικά στην ισορροπία

μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών στα έμβια συστήματα.. Τα ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά δρουν αλληλεπιδρούν, ώστε να διατηρηθεί ή να αποκατασταθεί η οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, όπως η αναγέννηση της βιταμίνης E από τη γλουταθειόνη (GSH).⁵⁹



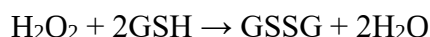
Εικόνα 5. Μηχανισμοί άμυνας του οργανισμού έναντι του οξειδωτικού στρες. Παράγοντες που προστατεύουν από τη δημιουργία ελεύθερων ριζών και συμμετέχουν στη μετατροπή τους σε ανενεργά παράγωγα. Περιλαμβάνονται τόσο εξωγενείς όσο και ενδογενείς ενώσεις, οι οποίες σχηματίζουν ένα σύνθετο αντιοξειδωτικό σύστημα με ενζυμικές και μη ενζυμικές ιδιότητες.⁶⁰

1.4.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

➤ Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Η οικογένεια της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) ανήκει στα κύρια ένζυμα που προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες. Σε γενικές γραμμές, η GPx δρα

καταλύοντας την αναγωγή του H_2O_2 και των οργανικών υδροϋπεροξειδίων σε νερό και αλκοόλες, αντίστοιχα.⁶¹



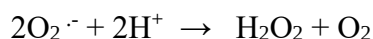
Στον άνθρωπο συναντώνται οχτώ ισομορφές, εκ των οποίων οι πέντε κωδικοποιούν πρωτεΐνες που περιέχουν σεληνοκυστεΐνη, ενώ μόλις τέσσερα από αυτά εκμεταλλεύονται το σελήνιο στην παραπάνω κατάλυση.⁶²

Η GPx θεωρείται ο σημαντικότερος αντιοξειδωτικός ενζυμικός αμυντικός μηχανισμός στο δέρμα. Για παράδειγμα, μια μικρή αύξηση της δραστηριότητας GPx είναι ικανή να αντισταθμίσει πλήρως την πλήρη απουσία καταλάσης (CAT) σε ινοβλάστες από ασθενείς με ανεπάρκεια CAT. Η δραστηριότητα της GPx εξαρτάται από την παρουσία Se σε καθεμία από τις τέσσερις υπομονάδες του ενζύμου και από την άφθονη παροχή GSH, η οποία είναι ο μοναδικός δότης υδρογόνου για αυτό το ένζυμο.⁶³

➤ Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι ένα μεταλλοένζυμο και ως εκ τούτου, απαιτεί ένα μέταλλο ως συμπαράγοντα για τη δραστηριότητα του. Τα μεταλλικά ιόντα που κανονικά δεσμεύονται από τη SOD είναι ο σίδηρος (Fe), ο ψευδάργυρος (Zn), ο χαλκός (Cu) και το μαγγάνιο (Mn). Υπό αυτό το πρίσμα, οι SOD ταξινομούνται σε τρεις ισομορφές: (i) Fe-SOD, (ii) Mn-SOD και (iii) το Cu/Zn-SOD.⁶⁴

Το εξαιρετικά δραστικό ανιόν υπεροξείδιο που σχηματίζεται *in vivo* μετατρέπεται σε μεγάλο βαθμό από την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) σε H_2O_2 . Σε αντίθεση με το $\text{O}_2^{\cdot -}$, το H_2O_2 θεωρείται ότι διασχίζει εύκολα τις μεμβράνες.⁶⁵

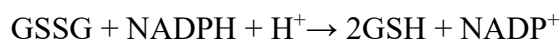


Η SOD καταλύει την αναγωγή του ανιόντος υπεροξειδίου στο λιγότερο δραστικό H_2O_2 , συνεπώς μείωση στη δραστηριότητα του ενζύμου θα μπορούσε να οδηγήσει σε οξειδωτική βλάβη στο κύτταρο. Ως εκ τούτου, θα ήταν ωφέλιμη η διατήρηση σε κανονικά,

βέλτιστα επίπεδα. Επανειλημμένη έκθεση του δέρματος σε υπεριώδη ακτινοβολία ή άλλοι τύποι οξειδωτικού στρες επάγουν αύξηση της δραστηριότητας της SOD μακροπρόθεσμα.⁶⁶ Συμπερασματικά, το ένζυμο είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ομοιόστασης, προστατεύοντας τα κύτταρα του σώματος από την υπερβολική ποσότητα $O_2 \cdot^-$ και άλλων επιβλαβών παραγόντων που προάγουν τη γήρανση ή τον κυτταρικό θάνατο.⁶⁷

➤ Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) είναι ένα βασικό ένζυμο για τη μετατροπή της οξειδωμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη μορφή της (GSH), η οποία είναι σημαντική για τη διατήρηση του κυτταρικού επιπέδου της GSH στα φυσιολογικά επίπεδα.⁶⁸ Η GR καταλύει την αντίδραση αναγωγής της οξειδωμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη μορφή της (GSH), με ταυτόχρονη οξείδωση του NADPH, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση⁶⁹ :

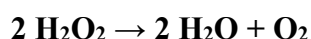


Κατά τη μετατροπή της GSSG σε GSH, τα δύο ηλεκτρόνια που παρέχονται από το NADPH διαχωρίζονται από τη GR και μεταφέρονται σε καθένα από τα δύο άτομα θείου του GSSG. Γενικότερα, η GR είναι υπεύθυνη για τον κυτταρικό οξειδοαναγωγικό κύκλο της GSH, ο οποίος είναι ζωτικής σημασίας για την αποτοξικοποίηση των ενδογενών υπεροξειδίων. Σε αυτή τη διαδικασία η GSH δρα ως δότης ηλεκτρονίων για την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx).⁷⁰

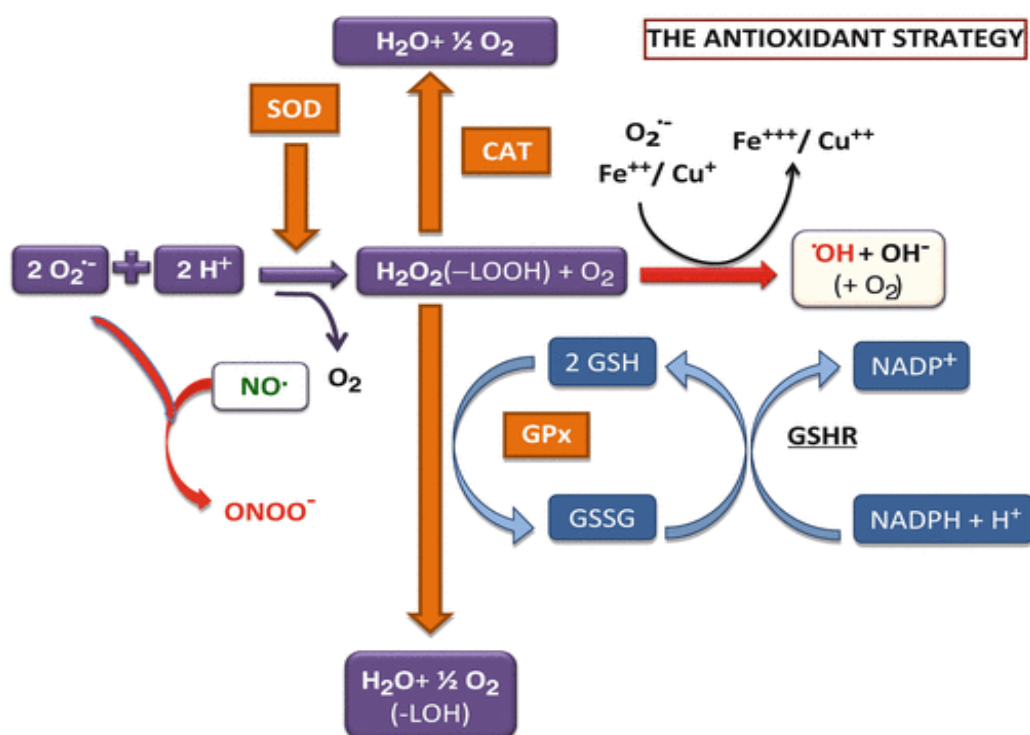
Έχει αποδειχθεί πως ο ψευδάργυρος (Zn) αναστέλλει τη δραστηριότητα των ενζύμων που σχετίζονται με το μεταβολισμό της γλουταθειόνης (GSH), ιδίως της αναγωγής της γλουταθειόνης (GR).⁷⁰ Πέραν της GR, ο ψευδάργυρος επιδρά και σε άλλα ένζυμα του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), επηρεάζοντας τη συνολική ικανότητα του κυττάρου να διαχειρίζεται το οξειδωτικό στρες.⁷¹

➤ Καταλάση (CAT)

Η προέλευση της καταλάσης μπορεί να αναχθεί στον 19ο αιώνα, όταν ο Thénard ανακάλυψε το H_2O_2 και υποψιάστηκε ότι η αποικοδόμησή του στους ιστούς των ζωντανών οργανισμών ήταν αποτέλεσμα της δραστηριότητας μιας «ειδικής» ουσίας (Thénard, 1811). Το ένζυμο αυτό μεταβολίζει το H_2O_2 αλλά αντιδρά και με πλήθος άλλων υποστρωμάτων.⁷² Η καταλάση είναι ο κύριος ρυθμιστής μεταβολισμού του H_2O_2 , το οποίο διασπά σε νερό και οξυγόνο, ολοκληρώνοντας κατά συνέπεια τη διαδικασία αποτοξίνωσης που εκκινείται από τη SOD. Στους ιστούς με χαμηλή δραστηριότητα καταλάσης, όπως το πάγκρεας και η καρδιά, καθώς και στα ερυθροκύτταρα, οι υψηλές συγκεντρώσεις του ενζύμου παρέχουν άμυνα έναντι αυξημένων επιπέδων υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2).⁷³ Η καταλάση είναι εξαιρετικά αποτελεσματική και μπορεί να διασπάσει εκατομμύρια μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ένα δευτερόλεπτο.⁷⁴



Η καταλάση συμμετέχει επίσης στην αποτοξίνωση των φαινολών, του μυρμηκικού οξέος, της μεθανόλης και της αιθανόλης. Εντοπίζεται κυρίως στα υπεροξεισώματα και σε κάποιο βαθμό υπάρχει και στο κυτταροπλασματικό κλάσμα.⁷⁵



Εικόνα 6. Δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων⁷⁶

1.4.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

➤ Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη, ένα σημαντικό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό, το οποίο συντίθεται από τα αμινοξέα γλυκίνη, γλουταμινικό οξύ και κυστεΐνη. Υπάρχει στα κύτταρα τόσο σε ανηγμένη (GSH) όσο και σε οξειδωμένη μορφή (GSSG), ενώ μπορεί επίσης να είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με πρωτεΐνες.⁵⁶ Η αναλογία GSH προς GSSG αποτελεί σημαντικό δείκτη της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου.⁷⁷ Η γλουταθειόνη είναι η πιο άφθονη θειόλη χαμηλού μοριακού βάρους στα κύτταρα των θηλαστικών και το κύριο ενδογενές μη πρωτεϊνικό αντιοξειδωτικό.⁷⁸ Καταπολεμά άμεσα τις ROS, όπως τα υπεροξείδια των λιπιδίων, και διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών.⁷⁹ Αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μηχανισμούς εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών, υπεύθυνος για την εξάλειψη O_2 και την παροχή ηλεκτρονίων για να δράσουν ένζυμα όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που είναι υπεύθυνη για τη μείωση του H_2O_2 σε H_2O , και διαδραματίζει κομβικό ρόλο στη διατήρηση της ενδοκυτταρικής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, τη μείωση των οξειδωτικών βλαβών και την πρόληψη της απόπτωσης.⁷⁸

Ακόμη έρευνες έχουν αποδείξει ότι η γλουταθειόνη και η βιταμίνη C λειτουργούν αλληλεπιδραστικά για την απόσβεση των ελευθέρων ριζών και επιδρούν αμοιβαία.⁸⁰

➤ Βιταμίνες A, E, C

Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι ένα απαραίτητο θρεπτικό συστατικό, το οποίο δεν μπορεί να συντεθεί από τον άνθρωπο, λόγω της έλλειψης ενός βασικού ενζύμου στη βιοσυνθετική οδό.⁸¹ Η βιταμίνη C δρα ως δότης ηλεκτρονίων, ιδιότητα στην οποία αποδίδονται όλες τις γνωστές λειτουργίες της, όπως και το γεγονός πως είναι ένα ισχυρό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό. Οι αντιοξειδωτικές ικανότητες της βιταμίνης C έχουν αποδειχθεί σε πολλά πειράματα *in vitro*⁸², καθώς η ικανότητάς της να προσφέρει εύκολα ηλεκτρόνια, έχει ως αποτέλεσμα την προστασία σημαντικών βιομορίων, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια, οι υδατάνθρακες και τα νουκλεϊκά οξέα από βλάβες που προκαλούνται από οξειδωτικά που παράγονται κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού

κυτταρικού μεταβολισμού και μέσω της έκθεσης σε τοξίνες και ρύπους (π.χ. καπνός τσιγάρου).⁸¹

Η βιταμίνη Ε είναι ένα από τα σημαντικότερα θρεπτικά συστατικά που ανακαλύφθηκαν τη δεκαετία του 1920 ⁸³. Δώδεκα χρόνια αργότερα, οι Evans and Bishop απομόνωσαν τη βιταμίνη Ε από το έλαιο φύτρων σιταριού και την ονόμασαν «α-τοκοφερόλη (α-TocH)» , ονομασία που προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις tocos (τοκετός), phero (γεννώ) και ol (αλκοόλη) (Evans, H. M., and Bishop, K. S. ,1922). Η αντιοξειδωτική λειτουργία της βιταμίνης Ε είναι γνωστή , καθώς εξουδετερώνει τις ρίζες υπεροξυλίου, τερματίζοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις.⁸⁴ Τέλος ρυθμίζει την οξειδοαναγωγική ισορροπία στον οργανισμό λόγω της υψηλής συγκέντρωσης μεταξύ των λιποδιαλυτών βιταμινών, ενώ κατανέμεται στις λιποπρωτεΐνες και τις κυτταρικές μεμβράνες, ως συστατικό των περισσότερων μεμβρανών.⁸⁵

Η βιταμίνη Α αποτελεί ένα έμμεσο αντιοξειδωτικό, του οποίου η έμμεση δράση έγκειται στη μεταγραφική ρύθμιση ενός αριθμού γονιδίων που εμπλέκονται στη διαμεσολάβηση των αντιοξειδωτικών αποκρίσεων του οργανισμού, μέσω των στοιχείων απόκρισης του ρετινοϊκού οξέος που υπάρχουν σε αυτά τα γονίδια.⁸⁶

➤ Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί ένα τελικό ενζυμικό προϊόν της αποδόμησης των πουρινών και των ελεύθερων βάσεων στον άνθρωπο. Παρά το γεγονός πως αποτελεί ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό στο ανθρώπινο πλάσμα, τα υψηλά επίπεδα ουρικού οξέος (υπερουριχαιμία) συσχετίζονται με την ανάπτυξη παχυσαρκίας, υπέρτασης και καρδιαγγειακής νόσου, καταστάσεις που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.⁸⁷ Πράγματι, πειραματικές μελέτες έχουν εντοπίσει μηχανισμούς μέσω των οποίων το ουρικό οξύ μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη παχυσαρκίας, διαβήτη, μη αλκοολικής λιπώδους ηπατικής νόσου και χρόνιας νεφρικής νόσου. Ο επικρατέστερος από τους μηχανισμούς αυτούς ,περιλαμβάνει την ενδοκυτταρική παραγωγή ουρικού οξέος ,ως απόκριση στη φρουκτόζη από τα προστιθέμενα σάκχαρα.⁸⁸

Όσον αφορά την συσχέτιση του ουρικού οξέος με την υπέρταση, πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν πως η υπέρταση προκύπτει από την δημιουργία νεφρικής αγγειοσύσπασης, ισχαιμίας και οξειδωτικού στρες, τα οποία συνεπάγονται την ενεργοποίηση ανοσολογικών

μηχανισμών που προκαλούν μια επίμονη φλεγμονή στα όργανα-στόχους, με αποτέλεσμα την αύξηση της αρτηριακής πίεσης.⁸⁹

Έτσι, το ουρικό οξύ σε φυσιολογικά επίπεδα δρα ως αντιοξειδωτικό (κυρίως στο πλάσμα), αλλά όταν αυξάνεται (υπερουριχαιμία), μπορεί να μετατραπεί σε προ-οξειδωτικό παράγοντα (κυρίως εντός του κυττάρου).⁸⁷

Στην αντιοξειδωτική ικανότητα του ουρικού οξέος συμβάλλουν δύο μηχανισμοί:

1) Η αντίδραση και η οξείδωση ελεύθερων ριζών, οδηγώντας στην οξείδωσή του σε αλλαντοΐνη, οξονικό οξύ και παραβανικό οξύ.

2) Ο σχηματισμός συμπλόκου με τον τρισθενή σίδηρο (Fe^{3+}), που συνεπάγεται την δέσμευσή του και την αναστολή της οξείδωσης του ασκορβικού οξέος από αυτόν.⁹⁰

Το ουρικό οξύ είναι ισχυρός αποδέκτης των ριζών υπεροξυλίου και υδροξυλίου. Επιπλέον εκτός από την ικανότητά του να εξουδετερώνει ρίζες, μπορεί να χηλικοποιήσει μεταλλικά ιόντα, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, μετατρέποντάς τα σε λιγότερο δραστικές μορφές, οι οποίες δεν μπορούν να καταλύσουν αντιδράσεις παραγωγής ελεύθερων ριζών.⁹¹ Τέλος το ουρικό οξύ πιθανώς να προστατεύει όχι μόνο τα ερυθροκύτταρα, αλλά και τα T και B λεμφοκύτταρα που περιέχουν DNA και έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής όπως και τα μακροφάγα.⁹²

➤ Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι παρούσες σε ποικιλία φυτών, όπου και παράγονται φυσιολογικά ως αμυντικός μηχανισμός έναντι σε εξωτερικούς παράγοντες και χρησιμοποιούνται ως σημαντικά συστατικά διατροφής.⁹³

Μερικές από τις πιο μελετημένες ενώσεις που ανήκουν στις πολυφαινόλες είναι τα φλαβονοειδή, τα οποία βρίσκονται στα ανώτερα φυτά και υποδιαιρούνται σε διάφορες υποκατηγορίες. Τα φλαβονοειδή υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα φρούτα και τα λαχανικά, καθώς και σε ποτά όπως το κρασί και το τσάι.⁹⁴ Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών βασίζεται στο φαινολικό δακτύλιο, με τις ενώσεις που περιέχουν κατεχολικά τμήματα και έχουν την ικανότητα να σταθεροποιούν ασύζευκτα ηλεκτρόνια, να εμφανίζουν την ισχυρότερη δράση.⁹⁵

➤ Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή αποτελούν φυσικές χρωστικές που συντίθενται μόνο από μικροοργανισμούς και φυτά και βρίσκονται στα τρόφιμα που καταναλώνουμε καθημερινά.⁹⁶ Είναι μια μεγάλη κατηγορία ενώσεων που παράγονται ως επί το πλείστον από φωτοσυνθετικά φύκη, φυτά και βακτήρια, καθώς και από ορισμένα πρωτόζωα και βακτήρια. Τα καροτενοειδή είναι ισοπρενοειδείς ενώσεις⁹⁷ και ανήκουν στα τερπενοειδή, μία ομάδα που περιλαμβάνει επίσης τις στερόλες, τα χοπανοειδή και τις ουμπικινόνες.⁹⁸

Αξίζει να σημειωθεί πως αποτελούν καθιερωμένα λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά, είναι ιδανικοί δότες ηλεκτρονίων για την αντιμετώπιση ριζών και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, δρώντας αποτελεσματικά έναντι του μονήρους οξυγόνου. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα καροτενοειδή μπορούν να μειώσουν τα προφλεγμονώδη μόρια και τη δραστηριότητα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, τα οποία εμπλέκονται στην ανάπτυξη της σχιζοφρένειας.⁹⁶ Τέλος, είναι γνωστό ότι υπάρχουν περίπου 600 διαφορετικά καροτενοειδή και ένα μεγάλο ποσοστό από αυτά έχουν αντιοξειδωτική δράση, ενώ μπορεί επίσης να συμβάλλουν στην ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης, της επικοινωνίας των διαχωριστικών σημείων και της δραστηριότητας των ενζύμων που μεταβολίζουν καρκινογόνα.⁹⁹

1.5 Οξειδωτικό στρες

Στο άρθρο του Selye το 1976 αναφέρεται πως «το στρες είναι η μη ειδική αντίδραση του οργανισμού σε οποιαδήποτε απαίτηση».¹⁰⁰ Το οξυγόνο είναι ευρέως γνωστό για το διττό ρόλο που κατέχει, καθώς μπορεί να έχει τόσο θετικές όσο και δυνητικά επιβλαβείς παρενέργειες για τα βιολογικά συστήματα. Η ικανότητα του οξυγόνου να αντιδρά και να συμμετέχει στη μεταφορά ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας, έχει ως επακόλουθο την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων τριφωσφορικής αδενοσίνης-5 (ATP) μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Έτσι το σώμα μας μπορεί να βρίσκεται υπο συνεχή οξειδωτική επίθεση από διάφορα δραστικά είδη οξυγόνου, τα οποία παράγονται στα μιτοχόνδρια.¹⁰¹ Καθίσταται έτσι σημαντική, για τους αερόβιους οργανισμούς, η ενεργοποίηση ενός μηχανισμού αντιμετώπισης των δραστικών ειδών οξυγόνου για τη διατήρηση της ζωής.¹⁰²

Στο εγχειρίδιο που δημοσιεύθηκε το 1985 από τον Sies, αναφέρθηκε για πρώτη φορά ο ορισμός του οξειδωτικού στρες, ως «η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και

αντιοξειδωτικών που ενδεχομένως οδηγεί σε βλάβη».¹⁰³ Μερικά μόνο χρόνια αργότερα το 2006 ,διατυπώνεται ένας νέος ορισμός ,ο οποίος αναφέρει πως «το οξειδωτικό στρες είναι η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, υπέρ των πρώτων , και οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου ή/και μοριακή βλάβη» .¹⁰⁴

Από τους παραπάνω ορισμούς προκύπτουν 3 διακριτά ζητήματα:

- I. η παραγωγή αντιδραστικών μορφών οξυγόνου
- II. η πιθανή τοξικότητα
- III. η παρουσία συστημάτων αποτοξίνωσης

Το οξυγόνο στα κύτταρα χρησιμοποιείται μόνο κατά την ενεργοποίηση των ROS , γεγονός που αποδεικνύει πως οι ROS είναι απαραίτητες για ένα πλήθος σημαντικών λειτουργιών στα κύτταρα.¹⁰⁵ Μάλιστα, το γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες συνοδεύεται συνήθως και από άλλες μορφές κυτταρικού στρες και όχι μεμονωμένα, δικαιολογείται από την ικανότητα των ROS να ενεργοποιούν πολλές κυτταρικές διεργασίες.¹⁰⁵

Η πιθανή οξειδωτική βλάβη των ιστών και η επακόλουθη δυσλειτουργία που παρουσιάζεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις , είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την αυξημένη κυτταρική παραγωγή ROS και RNS ή από τη μη ισορροπημένη απομάκρυνση αυτών.¹⁰⁶ Υψηλή παραγωγή ROS στο σώμα μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή της δομής του DNA, τροποποίηση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων , ενεργοποίηση διαφόρων παραγόντων μεταγραφής επαγόμενων από το στρες και παραγωγή προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών.¹⁰⁷ Το οξυγόνο μπορεί να έχει τοξικές επιδράσεις και οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν, χάρη στην αντιοξειδωτική άμυνα που διαθέτουν. Για αυτό το λόγο μάλιστα, τα κύτταρα του εγκεφάλου και ιδιαίτερα οι νευρώνες απαιτούν αποτελεσματική αντιοξειδωτική προστασία, καθώς παρουσιάζουν υψηλότερη κατανάλωση οξυγόνου από τους υπόλοιπους ιστούς.¹⁰⁸

Έρευνες δείχνουν πως η υψηλή κατανάλωση αλκοόλ, το χρόνιο κάπνισμα, η παχυσαρκία και η συνεχής έκθεση σε ατμοσφαιρικούς ρύπους έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση οξειδωτικού στρες. Το οξειδωτικό στρες συσχετίζεται με πληθώρα ασθενειών και χρόνιων νοσημάτων, όπως ο διαβήτης, η αποφρακτική πνευμονοπάθεια ,ο καρκίνος ,το Αλτσχάιμερ, όπως και νοσήματα που σχετίζονται με την γήρανση.¹⁰³

Το 1956 ο Dr. Harman ισχυρίστηκε ότι η συσσώρευση των ελεύθερων ριζών με την πάροδο του χρόνου προκαλεί βλάβη των βιομορίων και την ανάπτυξη παθολογικών

διαταραχών, με αποτέλεσμα τη γήρανση των κυττάρων και του οργανισμού. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι τα δραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια σε πολλές φυσιολογικές ενζυματικές/γονιδιακές διεργασίες. Μία από τις θεωρίες που καταρρίπτει τον επιζήμιο ρόλο των ελεύθερων ριζών και εξηγεί το διττό ρόλο που ασκούν είναι το φαινόμενο της όρμησης.¹⁰⁹ Ο όρος «όρμηση» περιγράφει τις ευεργετικές διαδικασίες που προκύπτουν από την απόκριση ενός οργανισμού σε έναν στρεσογόνο παράγοντα χαμηλής έντασης.¹¹⁰ Μπορεί επίσης να περιγραφεί ως ένα είδος φαινομένου ανάκαμψης, μια μέτρια αντίδραση υπεραντισταθμίσεως μετά από μια αρχική διαταραχή της ομοιόστασης.¹¹¹ Η βασική ιδέα πίσω από τον όρο αυτό είναι η πρόκληση της εγγενούς ικανότητας ενός οργανισμού - αντί της παροχής εξωγενών αντιοξειδωτικών - να αντισταθμίσει τη μείωση των φυσιολογικών δραστηριοτήτων στους συνολικούς μηχανισμούς συντήρησης της ζωής.¹¹⁰

Τέλος, θεωρείται πως υπάρχουν τρία βασικά επίπεδα στα οποία θα μπορούσε να επιτευχθεί η μείωση του οξειδωτικού στρες μέσω :

1. της μείωσης της έκθεσης σε περιβαλλοντικούς ρύπους
2. της αύξησης των επιπέδων ενδογενών και εξωγενών αντιοξειδωτικών
3. της σταθεροποίησης της παραγωγής και απόδοσης της μιτοχονδριακής ενέργειας¹¹⁰

1.6 Φυτοφάρμακα – Φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Αναπόσπαστο κομμάτι πλέον της γεωργικής πρακτικής αποτελεί η χρήση ενός μεγάλου φάσματος χημικών ουσιών, τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες, με σκοπό την καταστροφή παρασίτων, ζιζανίων και άλλων επιβλαβών οργανισμών. Απώτερος στόχος της δεδομένης πρακτικής είναι η αύξηση της απόδοσης των καλλιεργειών και η μείωση των απωλειών μετά το πέρας της συγκομιδής.¹¹² Ως φυτοφάρμακα προσδιορίζονται ετερογενείς ομάδες δραστικών ουσιών ή μιγμάτων, που αποτελούνται από μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες με σκοπό την πρόληψη, την καταστροφή, την απώθηση ή το μετριασμό οργανισμών που θεωρούνται παράσιτα. Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (ΦΠΠ) είναι φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση επιβλαβών οργανισμών, εχθρών των φυτών και ασθενειών, επηρεάζουν τις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών, διατηρούν τα φυτικά προϊόντα και καταστρέφουν ή προλαμβάνουν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων φυτών ή μερών φυτών.¹¹³

1.6.1 Ιστορική αναδρομή

Η χρήση αγροχημικών χρονολογείται πριν από εκατοντάδες χρόνια. Το 1600 χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ένα μίγμα μελιού και αρσενικού για τον έλεγχο των μυρμηγκιών. Αρκετά χρόνια αργότερα, στα τέλη του 1800, αγρότες στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής χρησιμοποίησαν διάφορες χημικές ουσίες όπως η θειική νικοτίνη, το αρσενικό ασβέστιο και το θείο στα χωράφια τους. Το 1867 μια ακάθαρτη μορφή χαλκού, το αρσενικό, χρησιμοποιήθηκε για τον περιορισμό της επιδημίας τους κριθαριού της πατάτας Κολοράντο στις ΗΠΑ. Την περίοδο του Β' Παγκοσμίου πολέμου παρήχθησαν αρκετά αποτελεσματικά και φθηνά φυτοφάρμακα όπως το Aldrin, το διχλωροδιφαινυλο τριχλωροαιθάνιο (DDT) το 1939, η διελδρίνη, το β-βενζόλιο εξαχλωριούχο (BHC), το 2,4-διχλωροφαινοξυοξικό οξύ (2,4-D), το Chlordane και το Endrin.

Ο όρος φυτοφάρμακο περιλαμβάνει τις κατηγορίες εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων, ζιζανιοκτόνων, χημικές ουσίες κήπου και απολυμαντικά οικιακής χρήσης, με σκοπό να σκοτώσουν ή να προστατεύσουν από τα παράσιτα.¹¹⁴ Παράσιτο χαρακτηρίζεται κάθε οργανισμός (ζωικός ή φυτικός), ο οποίος ζει και αναπτύσσεται εις βάρος ενός άλλου οργανισμού που αποκαλείται ξενιστής. Συνήθως, τα παράσιτα ζουν πάνω ή μέσα στον ξενιστή τους, τρεφόμενα από αυτόν, αντλώντας τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες για την επιβίωσή τους.

Η χρήση φυτοφαρμάκων στη γεωργία αποτελεί υποκατηγορία της μεγαλύτερης ομάδας βιομηχανικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται στο σημερινό κόσμο. Σύμφωνα με την Αμερικανική Χημική Εταιρεία, 50.000.000 διαφορετικές χημικές ενώσεις αναγνωρίστηκαν το 2009, με την προσθήκη 2.500.000 νέων χημικών ενώσεων ετησίως.¹¹⁵ Πολλές δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται εκτός Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) έχουν απαγορευτεί ή είναι υπό συνεχή επανεξέταση εντός της Ένωσης, λόγω ανησυχιών για καρκινογένεση, τοξικότητα ή επιπτώσεις στους επικονιαστές (π.χ. μέλισσες), με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη γλυφοσάτη (glyphosate). Στην ΕΕ η χρήση φυτοφαρμάκων ρυθμίζεται αυστηρά, καθώς υπάρχει μεγάλη ανησυχία για τις δυνητικές επιπτώσεις της εφαρμογής τους στο περιβάλλον, τη βιοποικιλότητα και τη δημόσια υγεία, ενώ διέπεται κυρίως από δύο βασικούς κανονισμούς:

- **Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1107/2009:** Αφορά την έγκριση, διάθεση στην αγορά και χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων

- **Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 396/2005:** Καθορίζει τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων (MRLs) φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα και ζωοτροφές

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, μεταξύ 2015-2017 και 2022, η χρήση και ο κίνδυνος από χημικά φυτοφάρμακα μειώθηκαν κατά 46%.¹¹⁶ Το 2022, αναλύθηκαν 110.829 δείγματα τροφίμων στην ΕΕ, εκ των οποίων το 96,3% ήταν εντός των επιτρεπόμενων ορίων υπολειμμάτων, ενώ μόλις το 1,6% υπερέβη τα νόμιμα όρια.¹¹⁷

1.6.2 Κατηγοριοποίηση φυτοφαρμάκων

Τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα ποικίλουν και διαφοροποιούνται με βάση τον τρόπο δράσης, πρόσληψης, μεταβολισμού, αποβολής και τοξικότητας τους στον κάθε οργανισμό.¹¹²

Σύμφωνα με την ΕΕ, τα φυτοφάρμακα διακρίνονται στα βιοκτόνα φυτοφάρμακα και τα φυτοπροστατευτικά. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν παράγοντες που δρουν έναντι οργανισμών που δύνανται να προκαλέσουν ανεπιθύμητες επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου ή των ζώων, ενώ στην δεύτερη κατηγορία εντάσσονται παράγοντες που προορίζονται να δράσουν έναντι οργανισμών επικίνδυνων για τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα.¹¹³

Σύμφωνα με τον Drum (1980) υπάρχουν 4 διαδεδομένες μέθοδοι ταξινόμησης των φυτοφαρμάκων σύμφωνα με:

1. τη χημική τους δομή
2. τον τρόπο εισόδου
3. τον τρόπο δράσης
4. τον οργανισμό στόχο¹¹⁸

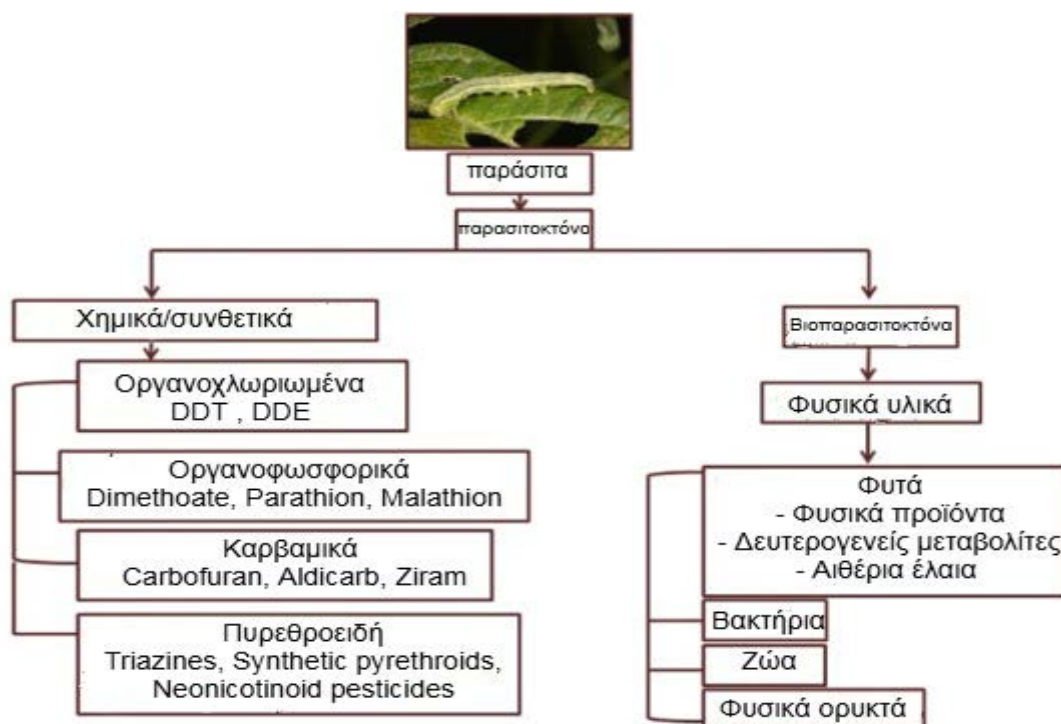
✓ Χημική δομή

Τα φυτοφάρμακα ταξινομούνται με βάση τη χημική τους δομή σε χημικά ή συνθετικά (οργανικά και ανόργανα) και σε βιοπαρασιτοκτόνα. Υπάρχουν διάφοροι τύποι οργανικών χημικών φυτοφαρμάκων:

1. **Οργανοχλωριωμένα:** οργανικά φυτοφάρμακα που περιέχουν τουλάχιστον πέντε άτομα χλωρίου (π.χ. DDT και χλωρδάνιο)

2. **Οργανοφωσφορικά:** παράγωγα φωσφορικού οξέος με υψηλή αποτελεσματικότητα και μικρότερη σταθερότητα (π.χ. παραθείο και μαλαθείο)
3. **Καρβαμικά:** παράγωγα καρβαμιδικού οξέος (π.χ. καρβαρύλιο και αμινοκάρβον)
4. **Συνθετικά πυρεθροειδή:** συνδυασμός οργανικών φυτοφαρμάκων που παρασκευάζονται μέσω της αντιγραφής των φυσικών πυρεθρινών, ενώ αποτελούν την ασφαλέστερη επιλογή για εφαρμογή σε τρόφιμα (π.χ. κυπερμεθρίνη και περμεθρίνη)¹¹⁹

Τα βιοκτόνα είναι φυσικά προϊόντα ή μικροοργανισμοί, προέρχονται από βακτήρια, φυτά, ζώα ή ορισμένα μέταλλα, και είναι σημαντικοί παράγοντες καταπολέμησης επιβλαβών οργανισμών, φιλικό προς το περιβάλλον. Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό τους είναι η εξειδίκευση στην αναγνώριση του ξενιστή, γεγονός που τα καθιστά πολύ αποτελεσματικά.¹²⁰



Εικόνα. 7. Κατηγοριοποίηση φυτοφαρμάκων με βάση την χημική τους δομή¹²⁰

✓ Τρόπος εισόδου

Ο τρόπος με τον οποίο τα φυτοφάρμακα εισέρχονται ή έρχονται σε επαφή με τον οργανισμό-στόχο ονομάζεται τρόπος εισόδου.¹²⁰ Έτσι, τα φυτοφάρμακα κατηγοριοποιούνται σε συστηματικά, δηλητήρια επαφής, δηλητήρια στομάχου, υποκαπνιστικά και απωθητικά.

- **Συστηματικά:** απορροφούνται από τα ζώα ή τα φυτά και μεταφέρονται σε όλους τους ιστούς
- **Μη συστηματικά - επαφής:** απαιτείται φυσική επαφή με τον οργανισμό-στόχο για την αποτελεσματικότητα
- **Δηλητήρια στομάχου:** προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής, εισέρχονται στο πεπτικό σύστημα και προκαλούν θάνατο από δηλητήρια
- **Υποκαπνιστικά:** σχηματίζουν δηλητηριώδη αέρια κατά την εφαρμογή τους και εισέρχονται μέσω του αναπνευστικού συστήματος στον οργανισμό-στόχο
- **Απωθητικά:** παρεμποδίζουν τα παράσιτα να εντοπίσουν την καλλιέργεια απομακρύνοντας τα χωρίς να τα σκοτώσουν

✓ Τρόπος δράσης

Τα φυτοφάρμακα ταξινομούνται με βάση τον τρόπο δράσης τους στις εξής κατηγορίες :

- **Φυσικά δηλητήρια:** ασκούν μια φυσική επίδραση με σκοπό την θανάτωση του οργανισμού-στόχου
- **Πρωτοπλασματικά δηλητήρια:** υπεύθυνα για την καταβύθιση των πρωτεϊνών
- **Αναπνευστικά δηλητήρια:** αδρανοποιούν τα αναπνευστικά ένζυμα
- **Νευρικά δηλητήρια:** αναστέλλουν την ομαλή μετάδοση νευρικών ώσεων
- **Αναστολή της χητίνης:** αναστέλλουν την σύνθεση της χητίνης στα παράσιτα ¹¹⁴

✓ Οργανισμοί στόχοι

Ανάλογα με τους οργανισμούς που στοχεύουν να αντιμετωπίσουν, τα φυτοφάρμακα διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

- Εντομοκτόνα (Insecticides), όταν στοχεύουν στην αντιμετώπιση εντόμων

- Ζιζανιοκτόνα (Herbicides), όταν στοχεύουν στην αντιμετώπιση ζιζανίων
- Μυκητοκτόνα (Fungicides), όταν στόχος είναι οι μύκητες
- Ακαρεοκτόνα (Acaricides), όταν στοχεύουν στην αντιμετώπιση ακάρεων
- Νηματωδοκτόνα (Nemadocides), όταν στόχος είναι οι νηματώδεις¹²¹

✓ Τοξικότητα

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας κατατάσσει τα φυτοφάρμακα με βάση την επικινδυνότητα τους σε πέντε κατηγορίες (**Ia, Ib, II, III και V**).

Η κατηγορία Ia ταξινομείται ως εξαιρετικά επικίνδυνη κλάση, περιέχει φυτοφάρμακα με οξεία LD₅₀ από το στόμα μικρότερη από 5 mg/kg και LD₅₀ στο δέρμα μικρότερη από 50 mg/kg. Τα φυτοφάρμακα της κλάσης Ib είναι εξαιρετικά επικίνδυνα, της κατηγορίας II μέτρια επικίνδυνα και της III ελαφρώς επικίνδυνα. Οι τρεις αυτές κατηγορίες έχουν οξεία τοξικότητα από το στόμα 5-50, 50-2000 και πάνω από 2000 mg/kg και οξεία τοξικότητα στο δέρμα 50-200, 200-2000 και πάνω από 2000 mg/kg, αντίστοιχα. Τέλος στην κατηγορία V κατατάσσονται τα φυτοφάρμακα που δεν μπορούν να παρουσιάσουν οξεία επικινδυνότητα και έχουν οξεία τοξικότητα από το στόμα ή το δέρμα 5000 mg/kg.¹²²

Class	LD ₅₀ of rat		Hazardous level
	Dermal	Oral	
Ia	Less than 50 mg/kg body weight	Less than 5 mg/kg body weight	Extremely
Ib	50–200 mg/kg body weight	5–50 mg/kg body weight	Highly
II	200–2000 mg/kg body weight	50–2000 mg/kg body weight	Moderately
III	Above 2000	Above 2000	Slightly
U	5000 or above	5000 or above	Unlikely to present acute hazard

Εικόνα 8. Ταξινόμηση φυτοφαρμάκων με βάση την τοξικότητα¹²²

Εκτός από την τοξικότητά τους, τα φυτοφάρμακα διακρίνονται και με βάση το εύρος δράσης τους σε εκλεκτικά και μη εκλεκτικά (γενικής δράσης). Τα εκλεκτικά φυτοφάρμακα στοχεύουν συγκεκριμένα είδη παρασίτων ή παθογόνων, προκαλώντας ελάχιστη ή μηδενική επίδραση σε άλλους οργανισμούς ή στο ίδιο το φυτό. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμα σε καλλιέργειες όπου απαιτείται προστασία ενός είδους χωρίς να διαταράσσεται η υπόλοιπη

βιοκοινότητα. Τα μη εκλεκτικά φυτοφάρμακα επιδρούν σε ευρύ φάσμα οργανισμών και συχνά χρησιμοποιούνται για ολική καταστροφή ανεπιθύμητων ειδών, όπως στην περίπτωση κάποιων ζιζανιοκτόνων (π.χ. glyphosate), που εξουδετερώνουν όλα τα φυτά σε μια περιοχή.¹²³

1.6.3 Ανθρώπινη έκθεση στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Στην γεωργία καταναλώνεται το μεγαλύτερο ποσοστό (σχεδόν το 85% της παγκόσμιας παραγωγής) φυτοφαρμάκων για την καταπολέμηση παρασίτων. Τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται επίσης στη δημόσια υγεία για έλεγχο ασθενειών, σε καλλωπιστικά τοπία και πάρκα, σε χαλιά, χρώματα, ακόμη και σε υλικά συσκευασίας τροφίμων.

Η παγκόσμια χρήση φυτοφαρμάκων έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες, φτάνοντας από 2,3 εκατομμύρια τόνους το 1990 σε περισσότερους από 4 εκατομμύρια τόνους το 2020. Οι κυριότερες χώρες χρήσης περιλαμβάνουν την Κίνα, τις Ηνωμένες Πολιτείες και τη Βραζιλία. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), το 2009, το 8,4% των δειγμάτων φρούτων και λαχανικών από χώρες της Νότιας Αμερικής υπερέβαιναν τα Μέγιστα Επιτρεπτά Όρια Υπολειμμάτων (MRLs). Στις Ηνωμένες Πολιτείες, μεταξύ 2003 και 2007, καταγράφηκαν 487 περιστατικά έκθεσης σε φυτοφάρμακα, με το 47,2% των θυμάτων να είναι μέλη του γενικού πληθυσμού και το 42,5% εργαζόμενοι. Το 82% των εργαζομένων και διασωστών που εκτέθηκαν, δεν φορούσαν κανένα προσωπικό προστατευτικό εξοπλισμό.¹²⁴

Στην Ευρώπη, σύμφωνα με την Έκθεση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) για το 2019 σχετικά με τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα (Αριθμός Αναλυμένων Δειγμάτων: 96.302), η πλειονότητα των δειγμάτων (96,1%) συμμορφώθηκε με τα καθορισμένα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα υπολειμμάτων (MRLs). Ωστόσο, ένα μικρό ποσοστό (3,9%) υπερέβη τα όρια αυτά, υποδεικνύοντας την ανάγκη για συνεχή παρακολούθηση και βελτίωση των συστημάτων ελέγχου.¹²⁵

Η ακούσια έκθεση είναι εξαιρετικά επικίνδυνη για τους διάφορους οργανισμούς, ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα, ιδιαίτερα κατά την πρώιμη ανάπτυξη, καθώς η σωματική διάπλαση και η φυσιολογία των παιδιών τα καθιστά πιο ευαίσθητα σε σύγκριση με τους ενήλικες¹²⁶.

Οι άνθρωποι μπορεί να εκτίθενται άμεσα σε φυτοφάρμακα κατά τις επαγγελματικές, γεωργικές και οικιακές δραστηριότητες, αλλά και έμμεσα μέσω μολυσμένων περιβαλλοντικών μέσων, όπως ο αέρας, το νερό, το έδαφος και τα τρόφιμα . Οι κύριοι τρόποι με τους οποίους τα φυτοφάρμακα εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό είναι μέσω της δερματικής, της στοματικής, της αναπνευστικής και της οφθαλμικής οδού. ¹²⁷ Ο κίνδυνος μόλυνσης από φυτοφάρμακα συνήθως αυξάνεται με τη δοσολογία (συγκέντρωση) , σχετίζεται με τον χρόνο έκθεσης, την οδό, με την κατάσταση υγείας του ατόμου και τις κρίσιμες περιόδους εκτός από την τοξικότητα της χημικής ουσίας ενδιαφέροντος. ¹²⁶



Εικόνα 9. Διαφορετικοί οδοί έκθεσης σε φυτοφάρμακα¹²⁸

Μία από τις πιο κοινές και αποτελεσματικές οδούς έκθεσης είναι η δερματική. Η δερματική απορρόφηση μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαρροής ψεκασμού, να συμβεί κατά τη διάθεση ή τον καθαρισμό των φυτοφαρμάκων ή ακόμη και από την έκθεση σε μεγάλες ποσότητες υπολειμμάτων. Η ικανότητα απορρόφησης των σκευασμάτων από το δέρμα μπορεί να επηρεαστεί, εκτός από την ποσότητα και τη διάρκεια της έκθεσης, και από άλλους παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και η χρήση προστατευτικού εξοπλισμού. Είναι ευρέως γνωστό πως οι στερεές μορφές (π.χ. σκόνες) απορροφούνται πιο δύσκολα από το δέρμα σε σχέση με τα υγρά σκευάσματα. Τέλος, η απορρόφηση διαφέρει

για κάθε μέρος του σώματος, καθώς περιοχές όπως αυτές των γεννητικών οργάνων είναι πιο ευαίσθητες .¹²⁹

Η έκθεση από το στόμα μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή δηλητηρίαση και μπορεί να προκύψει λόγω ατυχήματος ή για σκόπιμους λόγους. Περιπτώσεις τυχαίας έκθεσης έχουν σημειωθεί όταν φυτοφάρμακα μεταφέρθηκαν από τον αρχικό επισημασμένο περιέκτη σε μη επισημασμένο δοχείο. Σημαντικός είναι ο καθαρισμός των χεριών από εργαζομένους οι οποίοι χειρίζονται φυτοφάρμακα ή εξοπλισμό για την εφαρμογή τους. ¹²⁶ Οι στοματικές παθήσεις θεωρούνται πρώιμοι δείκτες της γενικής υγείας ενός πληθυσμού και ο επιπολασμός τους είναι υψηλότερος στις αναπτυσσόμενες από ό,τι στις αναπτυγμένες χώρες. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) εκτίμησε το 2021 ότι περίπου 2 δισεκατομμύρια ενήλικες έπασχαν από τερηδόνα, ενώ 750 εκατομμύρια διαγνώστηκαν με περιοδοντίτιδα, ενώ εκτιμήθηκε επίσης ότι 476.125 άτομα διαγνώστηκαν με καρκίνο του στόματος το 2020. Διάφοροι παράγοντες αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης αυτών των παθολογιών, μεταξύ των οποίων είναι η έκθεση σε φυτοφάρμακα και οι αλλαγές στο στοματικό μικροβίοκοσμο.¹³⁰

Η έκθεση μέσω της εισπνοής ή της αναπνοής συμβαίνει λόγω των πτητικών συστατικών των φυτοφαρμάκων και είναι επικίνδυνη για την υγεία των εργαζομένων (ιδίως για τη μύτη, το λαιμό και τους πνευμονικούς ιστούς) σε περίπτωση που εισπνεύσουν μεγάλες ποσότητες φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον μέσω του αέρα, του νερού και του εδάφους.¹²⁷ Επιπλέον με την αύξηση της θερμοκρασίας, τα επίπεδα ατμών αρκετών φυτοφαρμάκων αυξάνονται και επιδεινώνουν την εν λόγω έκθεση. Για αυτό το λόγο, συνιστάται να μην εφαρμόζονται φυτοφάρμακα σε θερμοκρασίες αέρα άνω των 30 °C (U.S. Environmental Protection Agency, USEPA, 2007). Τέλος τα φυτοφάρμακα θα πρέπει να εφαρμόζονται με επαρκή εξοπλισμό για την προστασία του αναπνευστικού συστήματος.¹²⁶

Ο ανθρώπινος οφθαλμός εκτίθεται σε χημικές ουσίες μέσω διαφόρων καταστάσεων, όπως έκθεση σε χημικά σωματίδια, ατμούς ή αέρια. Μετά την έκθεση στην οποιαδήποτε χημική ουσία είναι απαραίτητη η πλύση των ματιών με άφθονο νερό. Ακόμη όμως και χωρίς πλύσιμο, έχει αποδειχθεί ότι εάν η ουσία έρθει σε επαφή με την επιφάνεια του ανθρώπινου ματιού, πάνω από το 80% αυτής αποβάλλεται με φυσικό τρόπο σε λιγότερο από 2 λεπτά. Ωστόσο, η έκθεση όμως σε χημικές ουσίες μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό ή/και διάβρωση, παρά τους μηχανισμούς προστασίας των οφθαλμών με την έκκριση

δακρύων και τις οδούς αποστράγγισης.¹³¹ Έχει αναφερθεί πως ορισμένα φυτοφάρμακα απορροφούνται από τα μάτια σε επαρκείς ποσότητες, ενώ κρίσιμης σημασίας είναι το μέγεθος και το βάρος των σωματιδίων. Γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η χρήση εξοπλισμού προστασίας, όπως ασπίδες προσώπου ή γυαλιά, κατά τον ψεκασμό ώστε να αποφευχθεί η επαφή των ματιών με σωματίδια και σκόνες¹²⁶.

1.6.4 Ανθρώπινη υγεία και έκθεση στα φυτοφάρμακα

Η παγκόσμια χρήση φυτοφαρμάκων αυξήθηκε δραματικά μετά τη δεκαετία του 1960, ενώ μέχρι σήμερα συνεχίζουν να σημειώνονται μεγάλες αυξήσεις σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες. Καθημερινά χρησιμοποιούνται παγκοσμίως εκατομμύρια μορφές δραστικών συστατικών, με τα ζιζανιοκτόνα να αντιπροσωπεύουν την κυρίαρχη μορφή, ειδικότερα στη γεωργία, καθώς αποτελούν το 40% της συνολικής χρήσης.¹³² Τόσο η επαγγελματική όσο και η μη επαγγελματική έκθεση σε φυτοφάρμακα μπορεί να επιφέρει αρνητικές επιπτώσεις στους οργανισμούς, ακόμη και μη στόχους, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. Η άμεση εφαρμογή τους οδηγεί σε συσσώρευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε δείγματα λαχανικών, φρούτων και διάφορων τροφίμων, μέχρι και στο νερό, σε πολλές χώρες.¹³³

Τα φυτοφάρμακα κατά την εισαγωγή τους στον οργανισμό μπορεί να μεταβολίζονται, απεκκρίνονται, αποθηκεύονται ή βιοσυσσωρεύονται στο σωματικό λίπος. Δυστυχώς είναι πολυάριθμες οι αρνητικές επιπτώσεις που συσχετίζονται με τα χημικά φυτοφάρμακα λόγω της άμεσης έκθεσης, του χειρισμού ή των υπολειμμάτων που υπάρχουν σε τρόφιμα και νερό. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται δερματολογικές, αναπνευστικές, αναπαραγωγικές, ενδοκρινικές και γαστρεντερικές επιπτώσεις, και σε ορισμένες περιπτώσεις και καρκινογένεση. Τέλος, η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις φυτοφαρμάκων, τυχαίες ή σκόπιμες, μπορεί να οδηγήσει σε νοσηλεία ή ακόμη και σε θάνατο.¹³⁴

Η άμεση έκθεση σε φυτοφάρμακα συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο καρκινογένεσης. Μόλις 31 αναφορές ερευνών έχουν επιβεβαιώσει την ισχυρή σχέση μεταξύ της άμεσης επαφής με συγκεκριμένα φυτοφάρμακα και της εμφάνισης καρκίνου. Ειδικότερα, δεδομένα από τη μελέτη γεωργικής υγείας ανέδειξαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, του μαστού, της ουροδόχου κύστης, των πνευμόνων, του παχέος εντέρου, της λευχαιμίας και του πολλαπλού μυελώματος σε άτομα με συνεχή έκθεση σε φυτοφάρμακα.

Αξίζει να σημειωθεί πως ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC), αξιολόγησε τους κινδύνους των φυτοφαρμάκων για τον άνθρωπο και ενέταξε τα φυτοφάρμακα αρσενικό και 2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-p-διοξίνη στην κατηγορία των καρκινογόνων (IARC, 1991)¹³⁵.

Ακόμη, η ανησυχητική αύξηση στην εμφάνιση του διαβήτη έχει συνδεθεί με την έκθεση σε φυτοφάρμακα, με επιδημιολογικές μελέτες να υποδεικνύουν υψηλότερο κίνδυνο σχετικά με τα οργανοχλωριωμένα και οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα.¹³⁶ Τα αυξημένα επίπεδα των φυτοφαρμάκων DDT και του εποξειδίου του επταχλωρίου στο ανθρώπινο αίμα συσχετίστηκαν με την εμφάνιση διαβήτη και διαβητικής νεφροπάθειας. Επίσης, όλο και περισσότερα στοιχεία συσχετίζουν την παχυσαρκία με την έκθεση σε συγκεκριμένα φυτοφάρμακα, συμπεριλαμβανομένου του DDT και του μεταβολίτη του DDE.¹³⁵

Γενικότερα, οι ισχυρότερα τεκμηριωμένες επιπτώσεις της έκθεσης σε φυτοφάρμακα στην υγεία αφορούν το νευρικό σύστημα. Η υψηλή έκθεση σε φυτοφάρμακα έχει συνδεθεί με μία σειρά νευρολογικών συμπτωμάτων, όπως ελλείματα στη νευροσυμπεριφορική απόδοση και δυσλειτουργίες του νευρικού συστήματος. Επίσης, η παρατεταμένη έκθεση έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για τις νόσους του Parkinson και Alzheimer.¹³³ Σε σχετική μελέτη σε επίμυες, αποδείχθηκε ότι η έκθεση σε ροτενόνη (ένα ευρέος φάσματος εντομοκτόνο και ιχθυοκτόνο) οδήγησε σταδιακά σε νευροεκφυλισμό και βλάβες των κινητικών νευρών, ιδίως στα ισχιακά νεύρα, εξαιτίας της έλλειψης ντοπαμίνης και της διάσπασης των νευρικών συνάψεων.¹³⁷ Ακόμη, η προγεννητική έκθεση σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα έχει συσχετιστεί με γνωστικές διαταραχές, εξαιτίας βλάβης στους χολινεργικούς νευρώνες του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου, με επακόλουθα προβλήματα μνήμης και αισθητικότητας.¹³⁷

Ένας σημαντικός μηχανισμός δράσης και εκδήλωσης της τοξικότητας των φυτοφαρμάκων είναι η πρόκληση οξειδωτικού στρες, μέσω της αύξησης των επιπέδων των ROS. Το χαμηλό μοριακό βάρος και η υψηλή λιποδιαλυτότητα πολλών φυτοφαρμάκων αυξάνουν την απορρόφηση, ενισχύοντας την τοξικότητά τους. Συγκεκριμένα, τα οργανοφωσφορικά (OP) και καρβαμιδικά φυτοφάρμακα αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση, οδηγώντας σε συσσώρευση ακετυλοχολίνης και αύξηση των επιπέδων ROS. Γενικότερα, το επαγόμενο οξειδωτικό στρες έχει συνδεθεί με υπεροξείδωση των λιπιδίων, βλάβη του DNA και κυτταρική δυσλειτουργία.¹³⁸

Αξίζει ακόμη να σημειωθεί πως τα φυτοφάρμακα μπορούν να δράσουν και ως χημικές ουσίες που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές (EDCs), ικανές να παρεμβαίνουν στη σύνθεση, έκκριση, μεταφορά, δέσμευση, δράση ή εξάλειψη των φυσικών ορμονών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της ομοιόστασης γεγονότων όπως η αναπαραγωγή και η ανάπτυξη.¹³⁹ Έτσι, έχουν συσχετιστεί με διακυμάνσεις των επιπέδων των σεξουαλικών ορμονών, μειωμένη λίμπιντο, καθυστέρηση του εμμηνορροϊκού κύκλου, δυσλειτουργία των ωοθηκών, αλλοίωση της ποιότητας της σπερματογένεσης και μειωμένη γονιμότητα σε άνδρες και γυναίκες.¹⁴⁰

Τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα (OPs), τα οποία είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα, έχουν συσχετιστεί και με ηπατοτοξικότητα, προκαλώντας διαταραχές στο αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα και τελικά οξειδωτικό στρες, μεταβολές στην απόπτωση, καθώς και το μιτοχονδριακό και μικροσωμικό μεταβολισμό.¹⁴¹



Εικόνα 10. Δυσμενείς επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων στην ανθρώπινη υγεία ως διαφορετικά ζωντανά συστήματα.¹⁴²

1.6.5 Επιδράσεις φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον

Χημικές ουσίες από τη χρήση οικιακών, βιομηχανικών και γεωργικών αποβλήτων μολύνουν τον αέρα, το νερό και το έδαφος, έχοντας σημαντικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, την ευημερία και την αξία της φύσης. Οι σημαντικότεροι ρυπαντές του νερού είναι τα λύματα, τα νιτρικά άλατα, τα εντομοκτόνα, τα ιζήματα και η περίσσεια οργανικών ουσιών. Οι επιβλαβείς αυτές ουσίες μπορούν να φτάσουν στα υδάτινα σώματα μέσω της εφαρμογής λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων στα γεωργικά χωράφια και από την έξοδο των σωλήνων στις βιομηχανίες. Ταυτόχρονα η μόλυνση του εδάφους επιτυγχάνεται μέσω διασποράς τοξικών ενώσεων, χημικών λιπασμάτων, φυτοφαρμάκων, εντομοκτόνων και την συσσώρευση βαρέων μετάλλων και ανόργανων ρύπων.¹⁴³

Τα φυτοφάρμακα έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν στο περιβάλλον μέσω της εφαρμογής τους στον οργανισμό-στόχο ή κατά την απόρριψή τους στο έδαφος. Μετά την είσοδό τους στο περιβάλλον, μπορούν να υποστούν διαδικασίες όπως η μεταφορά και η αποικοδόμηση. Κατά την αποικοδόμηση παράγονται νέες χημικές ουσίες, ενώ κατά την μεταφορά μετακινούνται από την περιοχή στόχο σε άλλα περιβαλλοντικά μέσα ή φυτά μη-στόχους, με διαδικασίες όπως η προσρόφηση, η έκπλυση, η εξάτμιση ή η επιφανειακή απορροή. Η περιβαλλοντική συμπεριφορά διαφέρει μεταξύ των διάφορων τύπων χημικών ουσιών.¹³⁸

Οι διάφοροι ρύποι που καταλήγουν στο περιβάλλον μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε βιο-αποικοδομήσιμους και μη αποικοδομήσιμους. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα υλικά που αποσυντίθενται απλά από τα φυσικά φαινόμενα, μπορεί όμως να αποτελέσουν πρόβλημα εάν ο ρυθμός πρόσθεσής τους υπερσχύει του ρυθμού αποσύνθεσής τους. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι ρύποι που αποσυντίθενται με πιο αργό ρυθμό από τη διάσπαση τους, με αποτέλεσμα η απομάκρυνσή τους από το περιβάλλον να είναι σχεδόν αδύνατη.¹⁴³ Διάφορες φυσικές και μικροβιολογικές διεργασίες, όπως το φως, η θερμοκρασία, η υγρασία, το οξυγόνο και οι μικροοργανισμοί βοηθούν στην αποικοδόμηση των φυτοφαρμάκων. Κατά την αποικοδόμηση, νέες χημικές οντότητες που ονομάζονται μεταβολίτες δημιουργούνται και μπορεί να είναι επικίνδυνοι ή και μη τοξικοί ανάλογα με τη χημική τους σύσταση. Λόγω της έλξης μεταξύ των εδαφικών σωματιδίων και των φυτοφαρμάκων στα συστήματα απορρόφησης, τα φυτοφάρμακα μπορούν να παραμείνουν

στο έδαφος για μεγάλα χρονικά διαστήματα, έχοντας επιβλαβείς επιπτώσεις στο έδαφος και το οικοσύστημα.¹²²



Εικόνα 11. Ένας πλήρης περιβαλλοντικός κύκλος των φυτοφαρμάκων ¹⁴⁴

1.6.6 Ρυθμιστικό πλαίσιο

Από το 1991, η ΕΕ διαθέτει νομοθετικό πλαίσιο για την έγκριση των ΦΠΠ, την προώθηση της ορθολογικής χρήσης τους και τη μείωση του κινδύνου που ενέχει η χρήση αυτών για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον.¹⁴⁵ Ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 396/2005 καθορίζει τα ανώτατα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων (MRLs) σε τρόφιμα ή ζωοτροφές, εξασφαλίζοντας την προστασία της ανθρώπινης και ζωικής υγείας, καθώς και της ελεύθερης κυκλοφορίας των προϊόντων εντός της ΕΕ.¹⁴⁶ Ακόμη, η έγκριση των υποψήφιων φυτοφαρμάκων απαιτεί εναρμόνιση με τον Κανονισμό (ΕΚ) 1107/2009, κατά τον οποίο προβλέπεται κυκλοφορία μίας ουσίας μόνο εάν αποκλείονται οι μη αποδεκτές επιπτώσεις στο περιβάλλον και τη δημόσια υγεία (άρθρο 4 και 56).¹⁴⁷

Η ΕΕ ισχυρίζεται ότι έχει το αυστηρότερο ρυθμιστικό καθεστώς για τα φυτοφάρμακα στον κόσμο, απαγορεύοντας περισσότερα από 80 φυτοφάρμακα τα οποία επιτρέπονται στις ΗΠΑ. Παρομοίως, η αυστηρή ρύθμιση των γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών στην ΕΕ τις τελευταίες δεκαετίες, καθιστά τον τομέα της πολιτικής για τα φυτοφάρμακα μοναδικό σε παγκόσμια κλίμακα. Ωστόσο, σε πολλές χώρες της ΕΕ παρατηρείται συχνή και εθνική ρύπανση των υδάτινων σωμάτων από φυτοφάρμακα, υπογραμμίζοντας την απαίτηση για αποτελεσματικότερη εφαρμογή και παρακολούθηση της νομοθεσίας.¹⁴⁸

Η συνεχής μελέτη και αξιολόγηση των ΦΠΠ αποτελεί μείζον ζήτημα, όπως προβλέπεται από τον κανονισμό 1107/2009 για τακτική επαναξιολόγηση των δραστικών ουσιών κάθε 10-15 χρόνια, βάσει νέων δεδομένων που συλλέγονται από την EFSA σχετικά με τους μηχανισμούς τοξικότητας και την απαίτηση για αναθεώρηση εγκρίσεων.¹⁴⁹ Επιπλέον, οι τυπικές εγκρίσεις δεν εξετάζουν πολυπαραγοντικούς κινδύνους, όπως η χρήση πολλών φυτοφαρμάκων (το φαινόμενο "cocktail effect"), φαινόμενο που μπορεί να ενισχύσει την τοξικότητά τους. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας εντόμων ή ζιζανίων οδηγεί σε νέες μεθόδους ή συνδυασμούς εφαρμογής φυτοφαρμάκων που πρέπει να ελεγχθούν ξανά.¹⁵⁰

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η γλυφοσάτη.¹⁵¹ Αξίζει να σημειωθεί, πως η χρήση της είχε τεθεί υπό έλεγχο στην ΕΕ, ιδίως μετά την ταξινόμηση της ως καρκινογόνου, από τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο το 2015. Το 2017, έπειτα από μακρά συζήτηση και δύο προσωρινές παρατάσεις, η έγκρισή της ανανεώθηκε στην ΕΕ για μια περίοδο 5 ετών. Στις 28 Νοεμβρίου 2023, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή εφάρμοσε τον Κανονισμό 2023/2660 για την ανανέωση της έγκρισης χρήσης της για άλλα 10 έτη σύμφωνα με τον Κανονισμό αριθ. 1107/2009. Παρ' όλα αυτά, η στρατηγική της ΕΕ απαιτεί μείωση της χρήσης φυτοφαρμάκων κατά 50% έως το 2030.¹⁵²

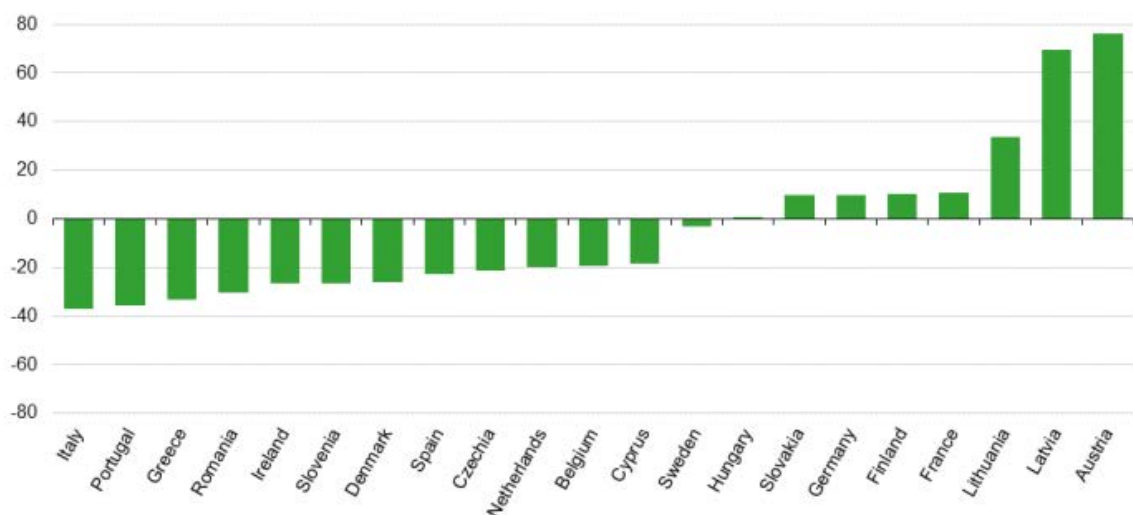
1.7 Ζιζανιοκτόνα

Ο τρέχων επίσημος ορισμός της Weed Science Society of America (WSSA) χαρακτηρίζει το ζιζάνιο ως «ένα φυτό που προκαλεί οικονομικές απώλειες ή οικολογική ζημία, δημιουργεί προβλήματα υγείας στον άνθρωπο ή τα ζώα ή είναι ανεπιθύμητο εκεί όπου αναπτύσσεται», ενώ ο ορισμός της European Weed Research Society (EWRS) αναφέρει πως «τα ζιζάνια είναι φυτικά είδη που εμφανίζονται σε οικολογικά συστήματα

που διαχειρίζεται ο άνθρωπος.¹⁵³ Επομένως, τα ζιζανιοκτόνα είναι μια κατηγορία ΦΠΠ που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση ή εξάλειψη ανεπιθύμητων φυτών (ζιζανίων).¹⁵⁴

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι οι απώλειες που προκαλούνται από τα ζιζάνια έχουν υπερβεί αυτές από οποιαδήποτε κατηγορία γεωργικών παρασίτων, δηλαδή, έντομα, ασθένειες, νηματώδη, τρωκτικά, κ.λπ. Παγκοσμίως, η εκτιμώμενη ζημία που προκαλείται από τα ζιζάνια ανέρχεται σε περίπου 40 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως, αποτελώντας σοβαρή απειλή για την ασφάλεια τροφίμων. Η παγκόσμια χρήση ζιζανιοκτόνων έχει αυξηθεί δραματικά, προσεγγίζοντας το 47,50% της συνολικής εφαρμογής φυτοφαρμάκων. Σχεδόν δύο χιλιάδες ενώσεις ζιζανιοκτόνων έχουν ανακαλυφθεί και εφαρμόζεται για τη διαχείριση των ζιζανίων σε διάφορες καλλιεργήσιμες εκτάσεις παγκοσμίως.¹⁵⁴

Το 2022, οι πωλήσεις φυτοφαρμάκων στην ΕΕ μειώθηκαν σε περίπου 322.000 τόνους, το χαμηλότερο επίπεδο από την αρχή της σειράς δεδομένων από το 2011. Η μείωση το 2022 ήταν ισοδύναμη με 10% σε σύγκριση με τις πωλήσεις το 2021, και 12% συγκριτικά με το 2011 (Εικόνα 12). Η Γαλλία, η Ισπανία, η Γερμανία και η Ιταλία κατέγραψαν τους υψηλότερους όγκους πωλήσεων, καθώς αποτελούν τους κύριους αγροτικούς παραγωγούς στην ΕΕ, αντιπροσωπεύοντας συλλογικά το 52% της συνολικής χρησιμοποιούμενης γεωργικής έκτασης και το 49% της συνολικής καλλιεργούμενης γης της ΕΕ.



Εικόνα 12. Εξέλιξη των πωλήσεων φυτοφαρμάκων (% , επιλεγμένες χώρες της ΕΕ, 2011-2022).¹⁵⁵

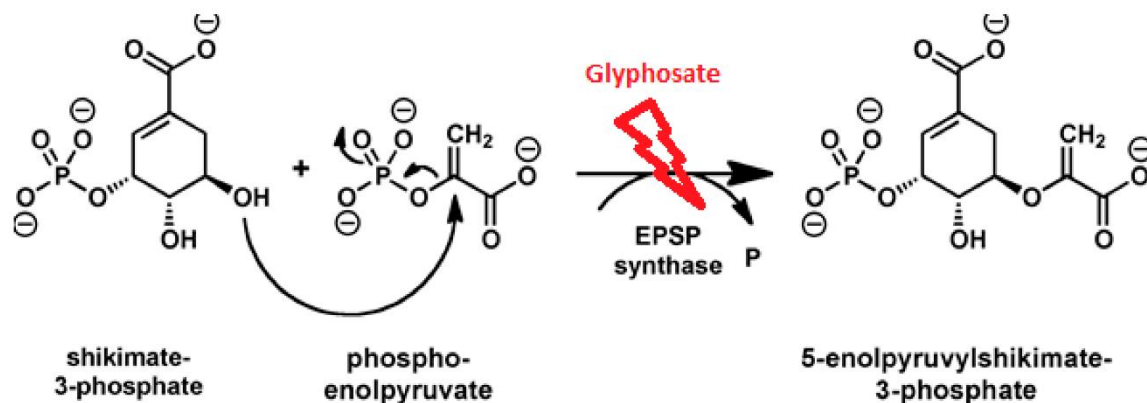
1.7.1 Γλυφοσάτη (Glyphosate)

Το μόριο της γλυφοσάτης συντέθηκε για πρώτη φορά από τον Henri Martin σε μια μικρή ελβετική φαρμακευτική εταιρεία (Cilag), αλλά δεν κατοχυρώθηκε ως ζιζανιοκτόνο. Ο John E Franz της Monsanto Co. ήταν αυτός που συνέθεσε και έλεγξε για πρώτη φορά τη γλυφοσάτη ως ζιζανιοκτόνο το 1970, κατοχυρώνοντας τη χημική ουσία με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας για ζιζανιοκτόνο χρήση. Η γλυφοσάτη είναι δραστικό ως άλας με διάφορα κατιόντα (π.χ. τα άλατα νατρίου ή ισοπροπυλαμίνης). Το άλας της ισοπροπυλαμίνης της γλυφοσάτης κυκλοφόρησε για πρώτη φορά στην αγορά το 1974 ως μεταφωτρωτικό, μη εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο, με αυξανόμενη δημοτικότητα τα επόμενα κιόλας χρόνια¹⁵⁶ για την προστασία της καλλιέργειας από τα αγρωστώδη, τα ετήσια πλατύφυλλα ζιζάνια και τα ξυλώδη φυτά.¹⁵⁷

Η εισαγωγή των ανθεκτικών στη γλυφοσάτη καλλιεργειών (GRCs) αύξησε σημαντικά τη χρήση της στις χώρες που ενέκριναν την καλλιέργειά τους. Σχεδόν το 90% της έκτασης που καλύπτεται από γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες παγκοσμίως, φυτεύεται με ανθεκτικές στα ζιζανιοκτόνα καλλιέργειες (HRCs), χάρη στην οικονομική ωφέλεια των αγροτών. Η επανάσταση στη διαχείριση των ζιζανίων, ξεκίνησε με την εισαγωγή της πρώτης ανθεκτικής στη γλυφοσάτη καλλιέργειας σόγιας, το 1996. Μέσα σε 10 χρόνια, η υιοθέτηση της GR σόγιας στις ΗΠΑ ήταν υψηλότερη από 90%, ακολουθούμενη αργότερα από αντίστοιχα ποσοστά υιοθέτησης του ανθεκτικού στη γλυφοσάτη βαμβακιού και αραβόσιτου, η οποία κορυφώθηκε σε χώρες όπως η Αργεντινή και η Βραζιλία.¹⁵⁸

Η γλυφοσάτη (N-φωσφομεθυλο-γλυκίνη) είναι ένα μοναδικό μεταφωτρωτικό ζιζανιοκτόνο ευρέος φάσματος που χαρακτηρίζεται από τις ιδιότητες της καλής μετατόπισης, της ταχείας αδρανοποίησης από τους οργανισμούς του εδάφους και της χαμηλής τοξικότητας σε οργανισμούς εκτός των φυτών.¹⁵⁹ Η γλυφοσάτη αποτελεί το μοναδικό μόριο που είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό στην αναστολή του ενζύμου EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) της οδού του σικιμικού οξέος. Το γεγονός ότι στους φυτικούς ιστούς που έχουν υποστεί επεξεργασία από τη γλυφοσάτη συσσωρεύονται υψηλά επίπεδα σικιμικού, οδήγησε στην ανακάλυψη της EPSPS ως τη μοριακή θέση-στόχο της γλυφοσάτης.¹⁵⁶ Έχει διαπιστωθεί ότι η γλυφοσάτη αναστέλλει τη σύνθεση των φλαβονοειδών και του χλωρογενικού οξέος, τα οποία βιοσυνθετικά προέρχονται από τη φαινυλαλανίνη.¹⁵⁹ Η αναστολή της EPSPS από τη γλυφοσάτη έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της σύνθεσης των απαραίτητων δευτερογενών μεταβολιτών

και πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα περιορίζει τις ζωτικές ενεργειακές οδούς στα μικρόβια του εδάφους και τα φυτά. Μια μελέτη αποκαλύπτει ότι η γλυφοσάτη είναι ικανή να μεταβάλλει την υφή του εδάφους και τη μικροβιακή ποικιλομορφία, περιορίζοντας σημαντικά τον μικροβιακό πλούτο και αυξάνοντας τον πληθυσμό των φυτοπαθογόνων μυκήτων.¹⁵⁷



Εικόνα 13 . Σχηματική αναπαράσταση της σύνδεσης της γλυφοσάτης με τη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος της συνθάσης (EPSPS), της αναστολής της δραστηριότητάς της και της παρεμπόδισης της εισαγωγής της στον χλωροπλάστη¹⁵⁷.

Μια μεγάλη ποικιλία ανθρώπινων ασθενειών έχει συσχετιστεί με την αυξημένη χρήση γλυφοσάτης, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων μορφών καρκίνου, νεφρικής βλάβης και ψυχικών παθήσεων όπως η Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ΔΕΠΥ), ο αυτισμός, η νόσος του Alzheimer και η νόσος του Parkinson. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια εκστρατειών αεροψεκασμού με γλυφοσάτη για την εξάλειψη των φυτών κόκας στην Κολομβία σημειώθηκαν περιστατικά αποβολών, δερματολογικές και αναπνευστικές παθήσεις. Τέλος σε μελέτες που έγιναν σε καλλιέργειες ανθρώπινων ερυθροκυττάρων, η γλυφοσάτη και το προϊόν διάσπασής της AMPA, οδήγησαν σε αύξηση των ROS σε μέτρια υψηλές συγκεντρώσεις για 24 ώρες.¹⁶⁰

Το δραστικό τμήμα στα προϊόντα γλυφοσάτης, όντας οξύ, μπορεί να διαμορφωθεί ως άλας ή εστέρας, προσφέροντας μεγάλη ευελιξία στη χημική δομή του μορίου. Το οξύ γλυφοσάτης είναι λιγότερο αποτελεσματικό, συγκριτικά με τα εμπορικά διαθέσιμα άλατα, γεγονός που ίσως είναι αποτέλεσμα της μειωμένης απορρόφησης από τα φυτά. Ωστόσο, παρουσία κατιόντων, η διαλυτότητα της γλυφοσάτης αυξάνεται και η φυσική μορφή της αλλάζει, καθιστώντας την πιο διαθέσιμη.¹⁶¹ Την ίδια στιγμή η αποτελεσματικότητά της μπορεί να μειωθεί, καθώς πολλά κατιόντα χηλικοποιούνται παρουσία αυτής. Ειδικότερα αναστολή μεταβολισμού σικιμικού στα φυτά εκδηλώνεται ως προδιάθεση σε μια μεγάλη

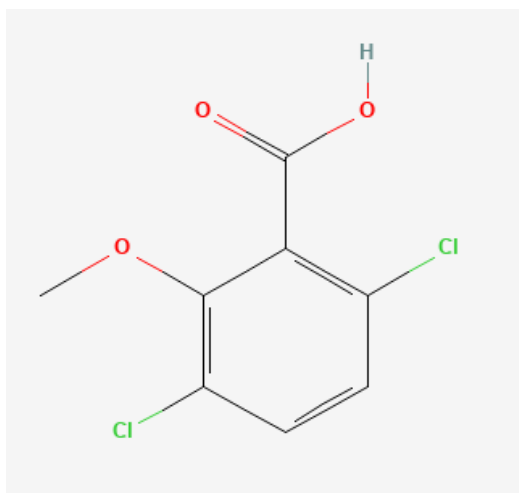
ποικιλία φυτοπαθογόνων. Αξίζει να σημειωθεί πως η γλυφοσάτη λειτουργεί ως συνεργιστής για τα μυκοφυτοκτόνα, με σκοπό την ενίσχυση της μολυσματικότητας και της παθογένειας των οργανισμών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την βιολογική καταπολέμηση των ζιζανίων. Επομένως, η συνεργιστική δράση της γλυφοσάτης οφείλεται για την εμφάνιση αλλά και την επανεμφάνιση πολλών ασθενειών, οι οποίες θεωρούνταν διαχειρίσιμες, γεγονός που υποδεικνύει την ανάγκη για περαιτέρω έλεγχο και διερεύνηση της εκτεταμένης χρήσης της.¹⁶²

Η γλυφοσάτη αξιολογήθηκε και εγκρίθηκε για πρώτη φορά στην ΕΕ το 2002, με επαναξιολογήσεις και ανανέωση της έγκρισης το 2012-2017 και το 2019-2023. Παρά την κατάταξή της το 2015 από τον IARC ως «πιθανώς καρκινογόνο για τον άνθρωπο» (Ομάδα 2Α), η EFSA και ο ECHA δεν εντόπισαν επαρκή στοιχεία για την απαγόρευσή της. Η έγκρισή της ανανεώθηκε έως τις 15 Δεκεμβρίου 2033, υπό όρους και περιορισμούς χρήσης, θεωρώντας ότι δεν προκαλεί σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία ή το περιβάλλον όταν χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις ορθές γεωργικές πρακτικές.¹⁶³

1.7.2 Dicamba

Το dicamba (3,6 διχλωρο-2-μεθοξυβενζοϊκό οξύ) είναι ένα εκλεκτικό, ευρέως χρησιμοποιούμενο, χαμηλού κόστους, φιλικό προς το περιβάλλον ζιζανιοκτόνο που δεν παραμένει στο έδαφος και παρουσιάζει μικρή ή καθόλου τοξικότητα για την άγρια πανίδα και τον άνθρωπο.¹⁶⁴ Αποτελεί μια συνθετική ένωση αυξίνης που χρησιμοποιείται σε πολλές χώρες για πάνω από 50 χρόνια, με σκοπό την καταπολέμηση πλατύφυλλων ζιζανίων.

Τα ζιζανιοκτόνα με δράση μιμητή αυξίνης ασκούν την δράση τους «χειραγωγώντας» τις αντιδράσεις των φυτοορμονών των φυτών, όπως η αύξηση της παραγωγής του αιθυλενίου και η αύξηση της βιοσύνθεσης του αβισικού οξέος (ABA).¹⁶⁵ Τα αυξημένα επίπεδα ABA αναστέλλουν την ανάπτυξη των φυτών, περιορίζοντας την αφομοίωση του διοξειδίου του άνθρακα, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση υπεροξειδίου του υδρογόνου. Αυτή η συσσώρευση δραστικών ειδών οξυγόνου, είναι πιθανόν ένας βασικός παράγοντας που συμβάλλει στην αναστολή της ανάπτυξης των φυτών, την γήρανση και την αποσύνθεση των ιστών.¹⁶⁶



Εικόνα 14. Χημική δομή του dicamba.¹⁶⁷

Το dicamba χαρακτηρίζεται ως ρυθμιστής ανάπτυξης των φυτών (PGR) καθώς έχει την ικανότητα να μιμείται τις φυσικές φυτικές αυξίνες και να επηρεάζει τους υποδοχείς κυτταρικών πρωτεϊνών. Η ομάδα καρβοξυλίου είναι κρίσιμη για την αναγνώριση από τους υποδοχείς αυξινών, δηλαδή για τη δραστηριότητά του, ενώ οι υποκατάστατες (Cl και OCH₃) επηρεάζουν τη σταθερότητα και τη συγγένεια του dicamba με τους υποδοχείς.¹⁶⁸ Ο ρόλος των φυσικών φυτικών αυξινών είναι η ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης, της διαφοροποίησης, της επιμήκυνσης και των αναπαραγωγικών ιστών. Οι ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τα φυτά με παρόμοιο τρόπο όπως εκείνο των φυσικών αυξινών, παράγοντας όμως ταυτόχρονα έντονες και μακροχρόνιες επιδράσεις. Όταν οι συγκεντρώσεις των αυξινών γίνονται δυσανάλογες, η ανάπτυξη του φυτού αναστέλλεται και μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο των φυτικών ιστών.

Η εφαρμογή του dicamba πραγματοποιείται μέσω ενός φορέα νερού στα φύλλα των φυτών και στη συνέχεια ακολουθεί η προσρόφηση και η μετατόπιση του στα μεριστώματα των φυτών. Η αυξίνη μεταφέρεται στο αγγειακό σύστημα, καθώς απορροφάται μέσω των στομάτων των φύλων, γεγονός που καθιστά το dicamba συστηματικό ζιζανιοκτόνο.¹⁶⁹ Ωστόσο, τα διαθέσιμα σκευάσματα dicamba έχουν ένα πολύ σημαντικό ελάττωμα, την υψηλή ευαισθησία σε φαινόμενα μετατόπισης και εξάτμισης των ατμών. Το dicamba θεωρείται εξαιρετικά κινητό στο έδαφος και είναι γνωστό ότι διαπερνά και μολύνει τόσο τα υπόγεια όσο και τα επιφανειακά ύδατα.¹⁷⁰

1.7.3 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic Acid)

Το 2,4-διχλωροφαινοξυοξικό οξύ ήταν το πρώτο προ/μεταφυτρωτικό συστημικό, εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο, που εισήχθη στην αγορά τη δεκαετία του 1940, για τον έλεγχο των πλατύφυλλων ζιζανίων. Είναι αρκετά διαδεδομένο λόγω του χαμηλού κόστους, της αποτελεσματικότητας, της εκλεκτικότητας και του ευρέως φάσματος δράσης. Η ταχεία απορρόφησή του από τα φύλλα και τις ρίζες ενισχύεται από τη διαλυτότητα στο νερό και οργανικούς διαλύτες, χαρακτηριστικό που συμβάλλει καθοριστικά στην αποτελεσματικότητά του. Δρα ως μιμητής της φυσικής αυξίνης και μπορεί να αυξήσει τη διάρκεια ζωής των καρπών σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Περισσότερα από 1500 ζιζανιοκτόνα περιέχουν το 2,4-D ως συστατικό, ενώ αποτέλεσε και μέρος του Agent Orange του ζιζανιοκτόνου που χρησιμοποιήθηκε ευρέως κατά τη διάρκεια του πολέμου στο Βιετνάμ.¹⁷¹

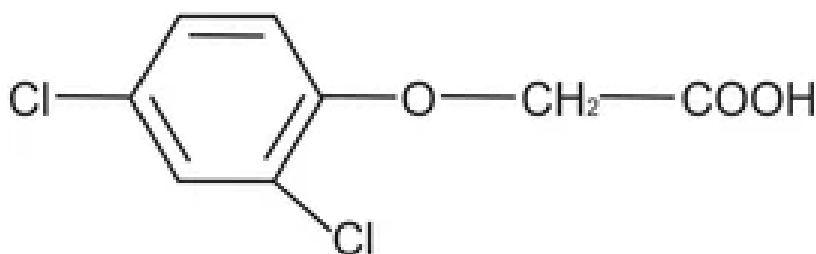
Η βασική δομή του 2,4-D αποτελείται από ένα οξύ, μπορεί όμως να παραχθεί ως ανόργανο άλας αμίνης ή εστέρας μέσω διαφόρων διαδικασιών παραγωγής. Οι συνθετικές αυξίνες όπως το 2,4-D διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα στα φυτά γεγονός που τις καθιστά αποτελεσματικές και θανατηφόρες. Το συγκεκριμένο ζιζανιοκτόνο δρα μέσω αύξησης της πλαστικότητας του κυτταρικού τοιχώματος και μη φυσιολογικής αύξησης της σύνδεσης πρωτεϊνών και αιθυλενίου, έχοντας ως αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση και βλάβη στον αγγειακό ιστό των φυτών.¹⁷²

Το 2,4-D έχει παρόμοιο μηχανισμό δράσης με το dicamba, καθώς και τα δύο μιμούνται την φυσική φυτική αυξίνη, συνδέονται στους ίδιους υποδοχείς αυξινών και υπερδιεγείρουν τα μονοπάτια ανάπτυξης. Η ομάδα καρβοξυλίου (-COOH) είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση από τους υποδοχείς αυξινών στα φυτά, ενώ τα υπόλοιπα μέρη ρυθμίζουν την ισχύ και την εκλεκτικότητα του.¹⁷³

Σύμφωνα με τους Kennerpohl και Munro (2001), η καρκινογόνος δράση του 2,4-D δεν είναι αποδεδειγμένη, καθώς η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών (USEPA 2005), κατέταξε την ένωση ως ζιζανιοκτόνο της ομάδας D (μη ταξινομούμενο ως καρκινογόνο για τον άνθρωπο) λόγω της έλλειψης αποδείξεων ως καρκινογόνο. Το Βραζιλιάνικο Ινστιτούτο Περιβάλλοντος (Instituto do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis) δείχνει ότι μεταξύ 2009 και 2012 το 2,4-D κατείχε την τρίτη θέση ως δραστικό συστατικό στην κατάταξη των περισσότερων φυτοφαρμάκων που πωλούνται στη Βραζιλία, ενώ μετά το 2013-2014 αποτελούσε το δεύτερο δραστικό

συστατικό με τις περισσότερες πωλήσεις στη χώρα, γεγονός που το καθιστά το εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο με τις περισσότερες πωλήσεις στη Βραζιλία μεταξύ 2009-2014.¹⁷⁴

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έχει εγκρίνει πολλά προϊόντα, τα οποία περιέχουν 2,4-D και πληρούν τις απαιτήσεις ασφαλείας που ορίζονται στο άρθρο 5 της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ, με βάση την εφαρμογή του 2,4-D σε καλλιέργειες (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 1991).¹⁷⁵ Η έγκριση της δραστικής ουσίας 2,4-D στην Ευρωπαϊκή Ένωση διέπεται από τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1107/2009, που αφορά τη διάθεση φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αγορά. Η τελευταία ανανέωση της έγκρισης πραγματοποιήθηκε με τον Εκτελεστικό Κανονισμό (ΕΕ) 2015/2033 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, ο οποίος τέθηκε σε ισχύ την 1η Ιανουαρίου 2016. Σύμφωνα με τον κανονισμό αυτό, η έγκριση του 2,4-D ισχύει έως τις 31 Δεκεμβρίου 2030.¹⁷⁶



Εικόνα 15. Χημική δομή του 2,4-διχλωροφαινοξυοξικού οξέος¹⁷⁴

Αξίζει να αναφερθεί πως η εκτεταμένη χρήση της γλυφοσάτης έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών ζιζανίων σε αυτή, περιορίζοντας την αποτελεσματικότητά της. Επιπλέον, η ανάπτυξη γεννητικά τροποποιημένων καλλιεργειών, ανθεκτικών στη γλυφοσάτη και το dicamba, όπως και στη γλυφοσάτη και το 2,4-D, έχει ενισχύσει τη χρήση μιγμάτων ζιζανιοκτόνων.¹⁷⁷ Οι καλλιεργητές συνήθως εφαρμόζουν δύο ή περισσότερα ζιζανιοκτόνα διαδοχικά ή ως μίγμα, με σκοπό να διευρύνουν το φάσμα καταπολέμησης των ζιζανίων και να αποτρέψουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας.¹⁷⁸

1.8 Μίγματα ζιζανιοκτόνων

Η εφαρμογή μιγμάτων ζιζανιοκτόνων χρησιμοποιήθηκε με πρωταρχικό σκοπό την καταπολέμηση ζιζανίων με διαφορετική ευαισθησία, ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη ανθεκτικότητας από τα ζιζάνια, μειώνοντας παράλληλα και το κόστος εφαρμογής. Ως επί το πλείστον, τα μίγματα προέρχονται από δεξαμενές, και είτε αναμιγνύονται εκ των

προτέρων από τον κατασκευαστή είτε αναμιγνύονται από τον τελικό χρήστη. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρούνται διαδοχικοί ψεκασμοί, γεγονός που αποσκοπεί στη κοινή δράση μιγμάτων, όπως τα μίγματα δεξαμενής.¹⁷⁹

Κατά την ανάμειξη των ζιζανιοκτόνων προκύπτουν φυσικοχημικές και φυσιολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, οι οποίες μπορεί να συμβούν στο εσωτερικό του δοχείου ψεκασμού, στην επιφάνεια των φύλλων ή/και στο εσωτερικό του φυτού. Από αυτές τις αλληλεπιδράσεις μπορεί να προκύψουν προσθετικές, συνεργιστικές ή ανταγωνιστικές επιδράσεις.¹⁸⁰ Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ζιζανιοκτόνων είναι συχνότερα ανταγωνιστικές παρά συνεργιστικές, ανεξάρτητα από το αν τα ζιζανιοκτόνα αλληλεπιδρούν ή απορροφούνται από τα ίδια ή διαφορετικά μέρη του φυτού, έχουν τις ίδιες ή διαφορετικές ικανότητες μετατόπισης, έχουν τους ίδιους ή διαφορετικούς τρόπους δράσης και ανεξάρτητα από το αν τα φυτά-στόχοι είναι πολυετή φυτά, καλλιέργειες ή ζιζάνια.¹⁸¹

- ο Προσθετικές επιδράσεις : προκύπτουν όταν η φυτοτοξικότητα στο βιολογικό στόχο μετά την εφαρμογή του μίγματος δεν μεταβάλλεται από την αναμενόμενη φυτοτοξικότητα των ζιζανιοκτόνων όταν εφαρμόζονται μεμονωμένα.
- ο Ανταγωνιστικές επιδράσεις : προκύπτουν όταν η αποτελεσματικότητα των μιγμάτων είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με τον αναμενόμενο έλεγχο όταν τα ζιζανιοκτόνα εφαρμόζονται μεμονωμένα. Αποτελούν ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις, καθώς συνήθως απαιτούνται υψηλότερες δόσεις για πιο ικανοποιητικά επίπεδα ελέγχου.
- ο Συνεργιστικές επιδράσεις : η συνέργεια περιγράφει κάθε είδος αλληλεπίδρασης ή συνεργασίας που επιφέρει ένα αποτέλεσμα μεγαλύτερο από το απλό άθροισμα των μερών της. Οι αρχές που επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις αυτές είναι:
 - Η βιοδιαθεσιμότητα μιας χημικής ουσίας αυξάνεται εξαιτίας μίας άλλης
 - Η δραστηριότητα μιας χημικής ουσίας αυξάνεται εξαιτίας μίας άλλης
 - Η αποικοδόμηση μιας χημικής ουσίας παρεμποδίζεται ή επιβραδύνεται εξαιτίας μίας άλλης
 - Δύο χημικές ουσίες δρουν παράλληλα αλλά με διαφορετικούς μηχανισμούς
 - Δύο χημικές ουσίες δρουν στην ίδια βιοσυνθετική οδό αλλά αναστέλλουν διαφορετικούς στόχους.¹⁸⁰

Η μεγαλύτερη ανησυχία που πρέπει να αντιμετωπιστεί σχετικά με τις επιδράσεις που προκαλούνται από την αλληλεπίδραση των ζιζανιοκτόνων είναι η πολυπλοκότητά τους σε

συνδυασμό με το γεγονός ότι είναι μη προβλέψιμες. Επιπλέον, η ανησυχία εντείνεται καθώς οι φυσιολογικές επιδράσεις ποικίλουν ανάλογα με το φυτό -στόχο, το στάδιο ανάπτυξης των ζιζανίων, τις δόσεις και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ζιζανιοκτόνων.¹⁸²

1.8.1 Υπολειμματικότητα ζιζανιοκτόνων – Έκθεση στα ξενοβιοτικά

Στις δεκαετίες του 1970 και 1980 η ανησυχία του κοινού για τις παρενέργειες των ζιζανιοκτόνων στο περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία αυξήθηκε, καθώς κατέστη δυνατή η ανίχνευση ζιζανιοκτόνων σε ελάχιστες συγκεντρώσεις, ως υπολείμματα στο περιβάλλον και τα γεωργικά προϊόντα. Η εξέλιξη αυτή προκάλεσε περαιτέρω την ανησυχία του κοινού και σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες, πραγματοποιήθηκαν σχέδια δράσης για τα φυτοφάρμακα, τα οποία απαιτούσαν τη μείωση της χρήσης και των εκπομπών φυτοφαρμάκων. Η πρόβλεψη της απόδοσης των μιγμάτων δύο ή περισσότερων ζιζανιοκτόνων είναι πιο περίπλοκη και απαιτεί τη χρήση ενός καλά καθορισμένου μοντέλου αναφοράς και μιας κατάλληλης πειραματικής διάταξης.

Η πρόσληψη φυτοφαρμάκων από τον άνθρωπο συμβαίνει κυρίως διαμέσου των τροφίμων και του νερού. Συνήθως, τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων που ανιχνεύονται στα τρόφιμα κυμαίνονται από 0,1 έως 1 p.p.m., ενώ στα υπόγεια ύδατα οι ποσότητες κυμαίνονται από 0,01 έως 1 p.p.b. Τα μυκητοκτόνα καθώς και τα εντομοκτόνα, τα οποία εφαρμόζονται αργά κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, αποτελούν τη πλειονότητα των ευρημάτων στα προγράμματα παρακολούθησης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων. Τα ζιζανιοκτόνα και οι μεταβολίτες τους είναι η κύρια πηγή μόλυνσης των υπόγειων υδάτων. Η ορθή γεωργική πρακτική (GAP) εξασφαλίζει ότι τα υπολείμματα στα τρόφιμα παραμένουν σαφώς κάτω από τα MRL. Τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων, αν και προκαλούν ανησυχία στο κοινό, είναι ήδη σε χαμηλά επίπεδα, συχνά πολύ κάτω από την αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ADI).¹⁸³

Οι άνθρωποι εκτίθενται καθημερινά σε μία πληθώρα ξενοβιοτικών ουσιών, τόσο στο εργασιακό τους περιβάλλον, όσο και δια μέσου της διατροφής τους. Οι ξενοβιοτικές ουσίες είναι ξένες προς τον οργανισμό και περιλαμβάνουν χημικές ουσίες, μολυσματικούς παράγοντες, σκόνες, αλλεργιογόνα και αερολύματα, φυτοφάρμακα, επαγγελματικές χημικές ουσίες, περιβαλλοντικούς ρύπους, κλινικά φάρμακα, και ναρκωτικά κατάχρησης, στις οποίες ο ανθρώπινος οργανισμός αντιδρά.¹⁸⁴ Δυστυχώς είναι αδύνατον να

προσδιοριστούν όλοι οι τοξικοί παράγοντες στους οποίους εκτίθεται ο πληθυσμός, καθώς σπάνια η έκθεση αυτή περιλαμβάνει μόνο έναν παράγοντα σε βάθος χρόνου. Σε μία πρόσφατη ανάλυση εξετάστηκαν οι σχέσεις μεταξύ της έκθεσης σε ξενοβιοτικά και των αυτοάνοσων νοσημάτων στον άνθρωπο, εντοπίζοντας «σίγουρες», «πιθανές» και «απίθανες» συσχετίσεις. Επιπλέον, αρκετές μελέτες αναγνωρίζουν το κάπνισμα ως ισχυρή δραστηριότητα για την ρευματοειδή αρθρίτιδα, την σκλήρυνση κατά πλάκας και την αυτοανοσία του θυρεοειδούς.¹⁸⁵

Σύμφωνα με τον Caldwell , τα φάρμακα και οι ξενοβιοτικές ουσίες μπορεί να υποστούν μία ή και περισσότερες από τις τέσσερις παρακάτω μεταβολικές διαδικασίες:

1. Αμετάβλητη αποβολή
2. Αμετάβλητη κατακράτηση
3. Αυθόρμητος μεταβολικός μετασχηματισμός
4. Ενζυμικός μεταβολισμός.¹⁸⁶

Έτσι, η αποβολή αμετάβλητων υδρόφιλων ενώσεων στα ούρα θεωρείται απίθανη, όπως και η αμετάβλητη αποβολή λιπόφιλων ενώσεων από τα κόπρανα. Ένας μικρός αριθμός ξενοβιοτικών ουσιών παραμένουν αναλλοίωτες στο χρόνο, ενώ έχει παρατηρηθεί πως ορισμένες ανόργανες ενώσεις αποθηκεύονται στα οστά, όπως ο μόλυβδος και το κάδμιο, ενώ άλλες αποθηκεύονται στο λίπος.¹⁸⁷

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, τα Μέγιστα Επιτρεπτά Όρια Υπολειμμάτων (MRLs) για φυτοπροστατευτικές ουσίες καθορίζονται από τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 396/2005, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο σημείο. Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) αξιολογεί την ασφάλεια των καταναλωτών, με βάση την τοξικότητα του φυτοφαρμάκου, τα μέγιστα επίπεδα που αναμένονται στα τρόφιμα και τις διαφορετικές διατροφικές συνήθειες των Ευρωπαίων.¹⁸⁸ Η EFSA στην ανασκόπηση του 2018, αξιολόγησε τα υπάρχοντα MRLs για την γλυφosatη, σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 396/2005. Η αξιολόγηση αυτή, περιλάμβανε την εξέταση υπολειμμάτων σε φυτά, επεξεργασμένα προϊόντα, καλλιέργειες και ζώα εκτροφής, καθώς οι τιμές των ορίων ποικίλουν ανάλογα με το προϊόν. Παραδείγματος χάριν, η ανώτατη επιτρεπτή τιμή για τα φρέσκα φυτικά τρόφιμα είναι 0,1 mg/kg, ενώ για τα ξηρά προϊόντα (π.χ. φασόλια, φακές, σόγια) έως 20 mg/kg.¹⁸⁹ Αντίστοιχη αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε και για τα ζιζανιοκτόνα 2,4-D και dicamba, με σκοπό τη διασφάλιση των επιπέδων εντός ασφαλών

ορίων, λαμβάνοντας υπόψη τα διαθέσιμα δεδομένα υπολειμμάτων για τις πιθανές επιπτώσεις στην υγεία των καταναλωτών. Στην περίπτωση των παραπάνω ζιζανιοκτόνων τα MRLs για τα δημητριακά είναι 0,05 mg/kg, ενώ για τα φρούτα από 0,01 έως 0,05 mg/kg.

190

1.8.2 Περιγεννητική έκθεση

Η περιγεννητική περίοδος χαρακτηρίζεται από έντονες ενδοκρινικές αλλαγές, οι οποίες είναι απαραίτητες για την εγκυμοσύνη, τον τοκετό, τη γαλουχία, καθώς και την ανάπτυξη και την επιβίωση του παιδιού.¹⁹¹ Ως περιγεννητική περίοδος ορίζεται ολόκληρο το διάστημα από την εγκυμοσύνη έως και τις πρώτες εβδομάδες μετά τον τοκετό, συμπεριλαμβανομένης της γαλουχίας.¹⁹²

Μια τεράστια ποικιλία ξеноβιοτικών μπορεί να επιφέρει αρνητικές επιδράσεις στο ενδομήτριο, όπως:

- Τοξικές περιβαλλοντικές ουσίες, όπως το διοξείδιο του θείου, ο καπνός και το μονοξείδιο του άνθρακα
- Φάρμακα, όπως τα γλυκοκορτικοειδή (δεξαμεθαζόνη, βηταμεθαζόνη)
- Τρόφιμα και ποτά, όπως η καφεΐνη και η αιθανόλη¹⁹³

Η περιγεννητική έκθεση σε γλυφοσάτη συνδέεται με γενετικές ανωμαλίες, απώλειες εμβρύων και μειωμένη αναπαραγωγική λειτουργία σε διάφορα είδη ζώων, όπως βάτραχοι, όρνιθες και άλλα θηλαστικά. Ωστόσο, ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν για τις επιπτώσεις της έκθεσης σε γλυφοσάτη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης στον ανθρώπινο πληθυσμό. Σε αυτό το πλαίσιο, μελέτη που διεξήχθη σε έγκυες υψηλού κινδύνου μεταξύ 2013 και 2016, και κατέγραψε τα επίπεδα γλυφοσάτης στα ούρα κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, απέδειξε συγκεντρώσεις υψηλότερες από το όριο ανίχνευσης (0,1 ng/mL) σε 186 από τις 187 (99%) έγκυες γυναίκες, ενισχύοντας την απαίτηση διερεύνησης των επιπτώσεων σε ανθρώπινες εγκυμοσύνες σε μεγαλύτερες πληθυσμιακές μελέτες.¹⁹⁴

Πρόσφατα ευρήματα έδειξαν πως η έκθεση σε ξеноβιοτικά μπορεί να επηρεάσει το ενδοκρινικό σύστημα. Η συχνότητα εμφάνισης ενδομητρίωσης αυξάνεται σε νεαρή ηλικία πριν την εφηβεία, ο καρκίνος του μαστού έχει αυξηθεί κατά 1% ετησίως τα τελευταία 50 χρόνια, ενώ παρατηρείται και ανάπτυξη δευτερογενών χαρακτηριστικών φύλου σε νεαρή ηλικία σε παιδιά των οποίων οι μητέρες λάμβαναν αντισυλληπτικά χάπια.¹⁹⁵

1.9 Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για τα μίγματα ζιζανιοκτόνων

Η αυξημένη έκθεση σε μίγματα ζιζανιοκτόνων εντείνει τις ανησυχίες σχετικά με κινδύνους για το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία. Η εμφάνιση ζιζανίων ανθεκτικών στη γλυφοσάτη, καθώς και η ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών, προωθεί την ταυτόχρονη εφαρμογή μιγμάτων ζιζανιοκτόνων ως κυρίαρχη γεωργική πρακτική. Ωστόσο, ελάχιστες μελέτες σε εργαστηριακά ζώα εξετάζουν τις τοξικές επιδράσεις της περιγεννητικής έκθεσης στη γλυφοσάτη μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με 2,4-D και dicamba. Πιο ειδικά, σε μελέτη της περιγεννητικής έκθεσης σε χαμηλές δόσεις γλυφοσάτης: ημερήσια αποδεκτή πρόσληψη (ADI) – 0,5 mg/kg/bw/day (EE) και επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις (NOAEL) – 50 mg/kg/bw/day (EE), καθώς και ADI μίγματος [(γλυφοσάτη (0,5 mg/kg), dicamba (0,002 mg/kg) και 2,4-D (0,3 mg/kg), όλα στις αντίστοιχες ADI της EE] σε επίμυες της φυλής Wistar, μέρος της οποίας αποτελεί και η παρούσα εργασία, παρατηρήθηκε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης στο ήπαρ απογόνων που εκτέθηκαν στο μίγμα ζιζανιοκτόνων.¹⁹⁶

Ακόμη, στο πλαίσιο της ίδιας μελέτης, αξιολογήθηκαν οι επιδράσεις της περιγεννητικής έκθεσης στη νεφρική και θυρεοειδική λειτουργία των μητέρων, καθώς και στην υγεία των απογόνων. Οι μητέρες που εκτέθηκαν σε μίγμα γλυφοσάτης με 2,4-D και dicamba εμφάνισαν πειραματική και σωληναριακή δυσλειτουργία των νεφρών, και αυξημένα επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Παράλληλα, η έκθεση στη γλυφοσάτη και το μίγμα της προκάλεσε αντιανδρογονικές επιδράσεις στους αρσενικούς απογόνους, αποδεικνύοντας την εκδήλωση τοξικότητας παρά τις χαμηλές και κανονιστικά επιτρεπτές δόσεις.¹⁹⁷ Επίσης, εξετάστηκε και η επίδραση στη δομή και τη λειτουργία του ήπατος των έγκυων επίμυων, και προέκυψε πως η έκθεση στη γλυφοσάτη προκάλεσε μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, ενώ η έκθεση στο μίγμα συσχετίστηκε με ηπατικές επιδράσεις, όπως διάταση της κεντρικής φλέβας, αγγειακή συμφόρηση κ.α. Έτσι, υπογραμμίζεται πως ακόμα και χαμηλές, ρυθμιστικά αποδεκτές δόσεις χημικών ουσιών, είναι δυνατό να προκαλέσουν τοξικές επιδράσεις όταν συνδυάζονται.¹⁹⁸

Σε μία ακόμη μελέτη που διεξήχθη μέσω συστηματικής ανασκόπησης και μετα-ανάλυσης επιδημιολογικών μελετών, εξετάστηκε η σχέση μεταξύ έκθεσης στη γλυφοσάτη και του κινδύνου εμφάνισης λεμφοαιματοποιητικών καρκίνων, όπως το λέμφωμα non-

Hodgkin (NHL), το λέμφωμα Hodgkin (HL), το πολλαπλό μυέλωμα (MM) και η λευχαιμία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η έκθεση στη γλυφοσάτη σχετίζεται με έναν οριακά στατιστικά σημαντικό αυξημένο κίνδυνο για NHL και MM, ωστόσο δεν τεκμηριώνεται αιτιολογική σχέση, καθώς ο περιορισμένος αριθμός μελετών περιορίζει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.¹⁹⁹

Όσον αφορά τις επιδράσεις των ζιζανιοκτόνων στη μορφολογία και μορφομετρία των μυών, σε έρευνα που διεξήχθη σε θηλυκούς μύες C57BL/6 που εκτέθηκαν σε γλυφοσάτη σε δόση ADI EE (0,5 mg/kg/bw/day), κατά την κύηση και τη γαλουχία, προέκυψε μειωμένη πρόσληψη βάρους και χαμηλότερο τελικό σωματικό βάρος, δεδομένα που έχουν καταγραφεί και σε προηγούμενες μελέτες. Έτσι, διαφαίνεται, πως η γλυφοσάτη μειώνει την όρεξη και την δίψα, ενώ δεν παρουσιάζεται να προκαλεί σημαντικές αλλοιώσεις στους μυες.²⁰⁰ Τέλος, μελέτη εξέτασε τις επιδράσεις των ζιζανιοκτόνων γλυφοσάτη και 2,4-D, μεμονωμένα και σε συνδυασμό, στις αναπαραγωγικές διαταραχές που προκαλεί η δυτικού τύπου διατροφή (πλούσια σε σάκχαρα και λίπη) σε αρσενικούς μύες C57BL6J. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως μεμονωμένα τα ζιζανιοκτόνα δεν προκαλούν μεταβολικές διαταραχές, ο συνδυασμός τους όμως με μια δυτικού τύπου διατροφή επηρέασε σημαντικά την ποιότητα του σπέρματος, τη λειτουργικότητα της επιδιδυμίδας, και τα επίπεδα τεστοστερόνης στο αίμα ήταν σημαντικά μειωμένα σε υψηλές δόσεις.²⁰¹

Δυστυχώς ο περιορισμένος αριθμός ερευνών σχετικά με τις επιδράσεις της γλυφοσάτης και των μιγμάτων της με άλλα ζιζανιοκτόνα, ειδικότερα με 2,4-D και dicamba δεν επιτρέπουν την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για πιθανή ιστοειδικότητα ή φυλοειδικότητα.

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αξιολόγηση της επίδρασης χαμηλών δόσεων γλυφοσάτης και μίγματός της με 2,4-D και dicamba στο οξειδοαναγωγικό προφίλ σπλήνα και σκελετικού μυός επίμυων, ως αποτέλεσμα της περιγεννητικής έκθεσης σε αυτά – από την 6^η ημέρα της κύησης μέχρι το πρώτο τρίμηνο της ενήλικης ζωής των απογόνων. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίστηκαν κρίσιμοι βιοδείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, αντιπροσωπευτικοί της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού, όπως η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ο ρυθμός αποικοδόμησης του H₂O₂ και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Ακόμη, αξιολογήθηκε η πρόκληση οξειδωτικής βλάβης σε λιπίδια και πρωτεΐνες, εκτιμώντας τα επίπεδα ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS).

Απώτερος σκοπός της δεδομένης μελέτης είναι η μίμηση της διατροφικής έκθεσης του γενικού πληθυσμού σε γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες που είναι ανεκτικές στο συνδυασμό ζιζανιοκτόνων και η αξιολόγηση της ασφάλειας των φυτοφαρμάκων, όταν εφαρμόζονται σε μορφή μιγμάτων σε ρυθμιστικά επιτρεπτές δόσεις.

3. Υλικά – Μέθοδοι

3.1 Εργαστηριακά ζώα

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 20 ενήλικοι, θηλυκοί, κλινικά υγιείς επίμυες της φυλής Wistar, με τυπικό βάρος περίπου 300g, που στεγάστηκαν σε ειδικά κλουβιά και σε ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες: 12 ώρες φως / σκοτάδι, σταθερή θερμοκρασία 19°C - 23°C, και σχετική υγρασία μεταξύ 35-55%. Η διατροφή τους περιλάμβανε τυπική ζωική τροφή (Cantacuzino Institute, Bucharest) και φιλτραρισμένο πόσιμο νερό κατά βούληση.

Το πειραματικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ήταν σύμφωνο με την οδηγία 2010/63/EE της Επιτροπής για πειράματα σε ζώα και εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Ιατρικής και Φαρμακευτικής της Craiova, στη Ρουμανία.

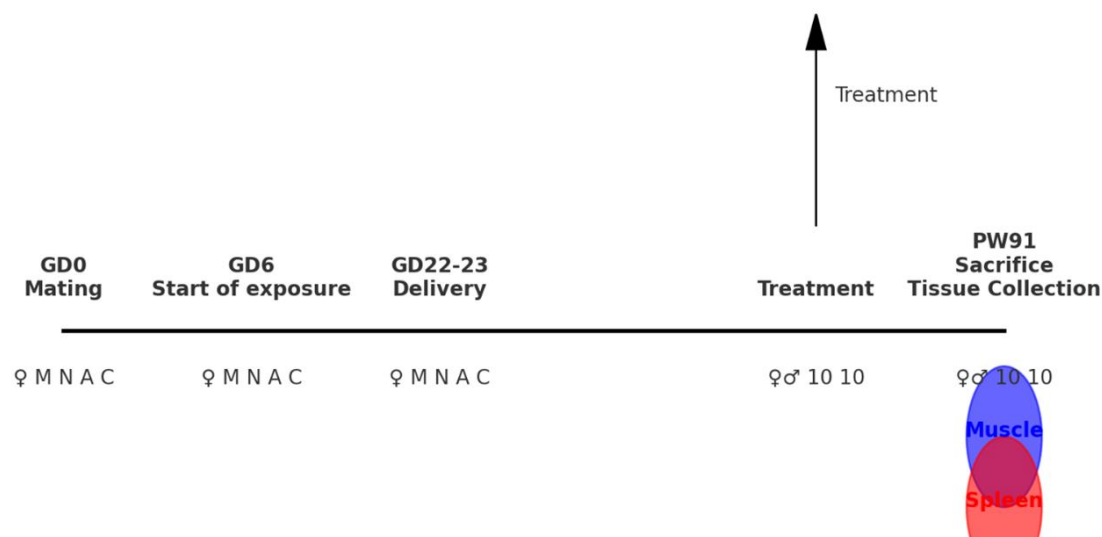
3.2 Δοσολογία και τρόπος χρήσης ζιζανιοκτόνων

Η γλυφοσάτη χορηγήθηκε σε δόση αντίστοιχη της ημερήσιας αποδεκτής πρόσληψης (ADI) της ΕΕ και στο επίπεδο μη παρατηρούμενης δυσμενούς επίδρασης (NOAEL), οι οποίες είναι ισοδύναμες με 0,5 και 50 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα αντίστοιχα (EFSA, 2015)²⁰². Το μίγμα γλυφοσάτης, 2,4-D και dicamba, χορηγήθηκε σε δόση αντίστοιχη με το ADI των επιμέρους ζιζανιοκτόνων, δηλαδή 0,5 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, 0,3 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα (EFSA, 2014) και 0,02 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα (EFSA, 2013), αντίστοιχα. Η χορήγηση των ουσιών υπό δοκιμή έγινε μέσω του πόσιμου νερού.

3.3 Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός περιλάμβανε 20 εγκύους θηλυκούς επίμυες της φυλής Wistar, που κατανεμήθηκαν τυχαία σε 4 ομάδες των 5 ζώων. Η πρώτη ομάδα έλαβε τυπική διατροφή και πόσιμο νερό, αποτελώντας την ομάδα ελέγχου (Control). Η δεύτερη και η τρίτη ομάδα έλαβαν τη γλυφοσάτη σε καθαρή μορφή, σε δόσεις αντίστοιχες με τη δόση ADI και NOAEL, αντίστοιχα (Gly ADI και Gly NOAEL). Στην τέταρτη ομάδα χορηγήθηκε μίγμα γλυφοσάτης, 2,4-D και dicamba, στην αντίστοιχη δόση ADI του κάθε ζιζανιοκτόνου (Mixture ADI). Ως έναρξη του πειραματικού πρωτοκόλλου και της χορήγησης ζιζανιοκτόνων ορίστηκε η 6^η ημέρα της κύησης, έκθεση η οποία συνεχίστηκε

έως τον απογαλακτισμό των απογόνων, 28 ημέρες μετά την γέννησή τους. Με την ολοκλήρωση του απογαλακτισμού, τα νεογνά διαχωρίστηκαν από τις μητέρες τους και συνέχισαν να λαμβάνουν το ίδιο σχέδιο δόσεων, στο οποίο είχαν εκτεθεί και προγεννητικά, για ακόμη 13 εβδομάδες, ακολουθώντας τις κατευθυντήριες οδηγίες του OECD TG 414. Κάθε πειραματική ομάδα αποτελούνταν από 10 θηλυκούς και 10 αρσενικούς απογόνους.



Εικόνα 16. Πειραματικός σχεδιασμός²⁰³

3.4 Συλλογή και προετοιμασία ιστών

Μετά το πέρας του πειραματικού πρωτοκόλλου, οι επίμυες αναισθητοποιήθηκαν με μίγμα ξυλαζίνης και κεταμίνης (9,1 mg/kg σωματικού βάρους και 9,1 mg/kg σωματικού βάρους) και θυσιάστηκαν. Έγινε συλλογή των ιστών του σπλήνα και σκελετικού μυός, οι οποίοι στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με ισοτονικό φυσιολογικό ορό, τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο και καταψύχθηκαν στους -80°C μέχρι τη βιοχημική ανάλυση.

Κατά την προετοιμασία των ιστών, προστέθηκε γνωστή ποσότητα ιστού σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS (Phosphate Buffered Saline), το οποίο περιείχε αναστολείς πρωτεασών (Complete mini protease inhibitors), σε αναλογία ιστού και PBS 1:5 για το σπλήνα και 1:4 για το σκελετικό μυ. Η ομογενοποίηση διήρκεσε 60 δευτερόλεπτα (δύο επαναλήψεις των 30 δευτερολέπτων στη μέγιστη ένταση με ενδιάμεση επώαση στον πάγο) με τη χρήση ομογενοποιητή (Bertin Technologies). Ακολούθως, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (15,000 g, 5 min, 5 °C), συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό, το οποίο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

3.5 Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης

3.5.1 Εκτίμηση ολικής πρωτεΐνης ιστού

Ο προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης βόειου ορού, με τη χρήση του αντιδραστηρίου Bradford.²⁰⁴

Πειραματική διαδικασία

	Δείγμα	Blank
<i>Ομογενοποιημένος ιστός</i>	20μl	-
<i>PBS</i>	-	20μl
<i>Αντιδραστήριο Bradford</i>	1ml	1ml

Πίνακας 2: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε διαδοχική σειρά για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με το αντιδραστήριο Bradford

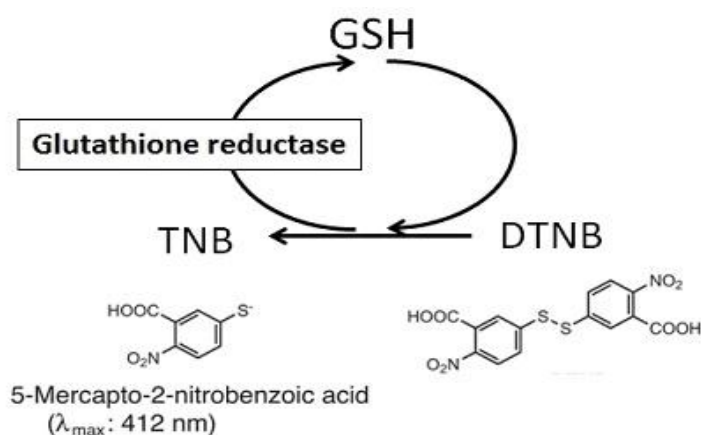
Ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι για 15 λεπτά και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595nm.

Υπολογισμοί

Η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης εκτιμήθηκε με βάση τους συντελεστές που προέκυψαν από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης σε mg/ml.

3.5.2 Προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα της GSH να οξειδώνεται από το διθειοδυο-νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB). Ως αποτέλεσμα, παράγεται GSSG και 2 νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ, ένα έγχρωμο προϊόν το οποίο απορροφά στα 412nm.²⁰⁵



Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης που πραγματοποιείται μεταξύ της GSH και του DTNB²⁰⁶

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάμιξη 35 μL ομογενοποιημένου ιστού με 35 μL TCA 5% (1:1) για την αρχική κατεργασία του δείγματος και ακολούθως φυγοκέντρηση (15,000 g, 5 min, 5 °C). Έγινε συλλογή του υπερκειμένου και προσθήκη των κάτωθι αντιδραστηρίων:

	Δείγμα	Blank
Phosphate Buffer (67mM, pH=7,95)	660 μl	660 μl
PBS	-	20 μl
Ομογενοποιημένος ιστός με αραιώση 1:2	20 μl	-
DTNB 1mM	330 μl	330 μl

Πίνακας 3: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε διαδοχική σειρά για τον προσδιορισμό των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση στο σκοτάδι για 15 λεπτά και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 412nm.

Υπολογισμοί

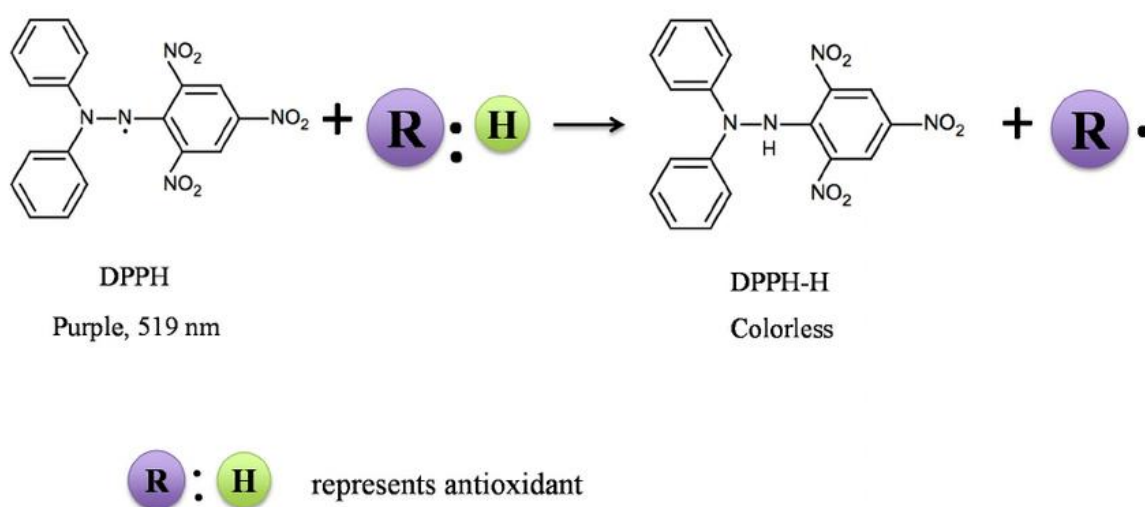
Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{GSH } (\mu\text{mol/ml}) = (\text{Absδείγματος} - \Delta\text{Abstufλού}/13,6) \times 2 \times 50,5 \times \text{συντελεστής ομογενοποίησης} \times \text{συντελεστής αραιώσης κατά τη μέθοδο}$$

Στην παραπάνω εξίσωση το 13,6 αντιστοιχεί στον συντελεστή μοριακής απόσβεσης του DTNB (L/mmol/cm), το 50,5 στον συντελεστή αραίωσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010μL) με τον όγκο του δείγματος (20μL), το 2 στο συντελεστή της πρώτης αραίωσης που έγινε από το TCA 5%. Ακόμη συνυπολογίστηκε ο συντελεστής ομογενοποίησης (5 για το σπλήνα και 4 για το σκελετικό μυ) και ο συντελεστής αραίωσης που έγινε σε κάθε ιστό για τη μέθοδο (2 για σπλήνα και σκελετικό μυ). Τέλος, η τιμή διαιρέθηκε με τα mg της ολικής πρωτεΐνης και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της GSH σε μmol/mg ολικής πρωτεΐνης.

3.5.3 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του ιστού να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες αθροιστικά. Στη μέθοδο αυτή, η ρίζα DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ανάγεται από το σύνολο των αντιοξειδωτικών μορίων του ιστού στην αντίστοιχη υδραζίνη (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine) και υπολογίζεται η μετατροπή αυτή φωτομετρικά στα 520nm.²⁰⁷



Εικόνα 18. Σχηματική απεικόνιση της αναγωγής της ρίζας DPPH• στην αντίστοιχη υδραζίνη.²⁰⁸

Πειραματική διαδικασία

	Δείγμα	Blank
Phosphate Buffer (10mM, pH=7,4)	460μl	500μl
DPPH 0.1 mM	500μl	500μl
Ομογενοποιημένος ιστός	40μl	-

Πίνακας 4: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε διαδοχική σειρά για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας TAC

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση στο σκοτάδι για 60 λεπτά, φυγοκέντρωση (15000g, 3min, RT) και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 520nm.

Υπολογισμοί

Ο υπολογισμός της TAC πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν/mL ιστού} =$

$$\left[(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 25 \times \text{συντελεστής ομογενοποίησης} \times \text{συντελεστής αραίωσης κατά τη μέθοδο} \right] / 1000$$

όπου: διαίρεση με το 100 για τη ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης, πολλαπλασιασμός με το 50 για τη συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα (50μmol/L), πολλαπλασιασμός με το 25 για την 25πλάσια αραίωση του ιστού στην κυψελίδα, πολλαπλασιασμός με το συντελεστή ομογενοποίησης (5 για το σπλήνα και 4 για το σκελετικό μυ), πολλαπλασιασμός με το συντελεστή αραίωσης που έγινε σε κάθε ιστό για τη μέθοδο (10 για σπλήνα και σκελετικό μυ) και διαίρεση με το 1.000 για μετατροπή των L σε mL. Η τιμή διαιρέθηκε με τα mg της ολικής πρωτεΐνης και προσδιορίστηκαν τα mmol DPPH που απομακρύνθηκαν/mg ολικής πρωτεΐνης.

3.5.4 Προσδιορισμός του ρυθμού αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂)

Η καταλάση αποτελεί ένα από τα ένζυμα που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) σε νερό και οξυγόνο. Στον ομογενοποιημένο ιστό προστίθεται H₂O₂ ως υπόστρωμα και καταγράφεται η μείωση της απορρόφησης στα 240nm.²⁰⁹

Πειραματική διαδικασία

	Δείγμα
Ομογενοποιημένος ιστός	5μl
Phosphate buffer (67mM, pH=7,4)	2990μl

Πίνακας 5: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε διαδοχική σειρά για τον προσδιορισμό του ρυθμού αποικοδόμησης του H₂O₂.

Έγινε προσθήκη των αντιδραστηρίων σε δοκιμαστικούς σωλήνες σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, ακολούθησε επώαση στους 37°C για 15 λεπτά. Έπειτα, το περιεχόμενο μεταφέρθηκε σε κυψελίδα Quartz, όπου προστέθηκαν 5μL 30% H₂O₂ και πραγματοποιήθηκε καταγραφή της μεταβολής της οπτικής απορρόφησης για 125s στα 240nm.

Υπολογισμοί

Η δραστικότητα της καταλάσης υπολογίστηκε σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

Δραστικότητα καταλάσης (U/mg total protein) = (Δ Abssample/min /40) x (600 x 1000 x συντελεστής ομογενοποίησης x συντελεστής αραίωσης κατά τη μέθοδο) / mg Protein

Η διαίρεση με το 40 αντιστοιχεί στο συντελεστή της μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ 40 (mol/L), ο πολλαπλασιασμός με το 600 στη διαίρεση του τελικού όγκου (3.000μL) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (5μL), ο πολλαπλασιασμός με το 1000 για τη μετατροπή σε μmol/L. Ακόμη, συμπεριλήφθηκε ο πολλαπλασιασμός με το συντελεστή ομογενοποίησης (5 για το σπλήνα και 4 για το σκελετικό μυ) και ο πολλαπλασιασμός με το συντελεστή αραίωσης που έγινε σε κάθε ιστό για τη μέθοδο (2 για σπλήνα και χωρίς αραίωση σε σκελετικό μυ). Τέλος, η τιμή διαιρέθηκε με τα mg της ολικής πρωτεΐνης.

3.5.5 Προσδιορισμός των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεϋδη (MDA), η οποία μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, παράγοντας ένα σύμπλοκο που απορροφά στα 530nm.²¹⁰

Πειραματική διαδικασία

	Δείγμα	Blank
Ομογενοποιημένος ιστός	100μl	-

PBS	-	100μl
TCA 35%	500μl	500μl
Tris-HCL (200Mm, pH=7,4)	500μl	500μl
Επώαση 10 λεπτά σε RT		
Na ₂ SO ₄ - TBA	1mL	1mL
Επώαση 45 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 95°C		
TCA 70%	1mL	1mL

Πίνακας 6: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε διαδοχική σειρά για τον προσδιορισμό της λιπιδικής υπεροξειδωσης

Ακολουθήθηκαν όλα τα βήματα που αναφέρονται στον παραπάνω πίνακα και στη συνέχεια 1 mL δείγματος μεταφέρθηκε σε Eppendorf, όπου ακολούθησε φυγοκέντρωση (11,200 g, 3 min, 25 °C) και καταγραφή της οπτικής απορρόφησης στα 530nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίστηκε σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg total protein) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0,156 * 31 x συντελεστής ομογενοποίησης x συντελεστής αραίωσης κατά τη μέθοδο / mg Protein

Το 0,156 αντιστοιχεί στο συντελεστή της μοριακής απόσβεσης της MDA (156.000/10⁻⁶ για μετατροπή των mol/L σε μmol/L), το 31 στο συντελεστή αραίωσης (διαίρεση του τελικού όγκου με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού - 3100 μL προς 100 μL). Ακόμη, συνυπολογίστηκε ο συντελεστής ομογενοποίησης (5 για το σπλήνα και 4 για το σκελετικό μυ) και ο συντελεστής αραίωσης που έγινε σε κάθε ιστό για τη μέθοδο (5 για σπλήνα και 2 για σκελετικό μυ). Τέλος, η τιμή διαιρέθηκε με τα mg της ολικής πρωτεΐνης.

3.5.6 Προσδιορισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS)

Ένας σημαντικός δείκτης που αντικατοπτρίζει την οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών είναι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ανιχνεύονται μέσω της αντίδρασής τους με το DNPH (2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη), από την οποία σχηματίζεται το DNP-hydrazone (2,4-δινιτροφαινυλδραζόνιο), το οποίο ανιχνεύεται φωτομετρικά στα 375nm.²¹¹

Πειραματική διαδικασία

	Δείγμα	Τυφλό
Ομογενοποιημένος ιστός	25μl	25μl
TCA 20%	25μl	25μl

Επώαση για 15 λεπτά στον πάγο, φυγοκέντρηση (15,000 g, 5 min, 4 °C) και απομάκρυνση υπερκλειμένου. Ακολούθησε προσθήκη των κάτωθι ποσοτήτων αντιδραστηρίων:

	Δείγμα	Τυφλό
DNPH (10 mM) σε (HCl) (2.5 N)	250μl	-
HCl (2.5 N)	-	250μl

Έγινε διαλυτοποίηση ιστού, επώαση για 60 λεπτά σε RT (με ανάδευση κάθε 15 λεπτά), φυγοκέντρηση (15,000 g, 5 min, 4 °C) και απομάκρυνση του υπερκλειμένου. Στη συνέχεια προστέθηκαν:

	Δείγμα	Blank
TCA 10%	500μl	500μl

Ανάδευση, φυγοκέντρηση (15,000 g, 5 min, 4 °C) και απομάκρυνση υπερκλειμένου

	Δείγμα	Blank
Ethanol/ethyl acetate (1:1)	500μl	500μl

Ανάδευση, φυγοκέντρηση (15,000 g, 5 min, 4 °C) και απομάκρυνση υπερκλειμένου (επανάληψη 3 φορές)

	Δείγμα	Blank
Ουρία (5 M, pH = 2.3)	500μl	500μl

Ανάδευση, επώαση για 15 λεπτά στους 37°C και φυγοκέντρηση (15,000 g, 3 min, 4 °C). Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 375 nm.

Πίνακας 7: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε διαδοχική σειρά για τον προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg total prot.)=

$$\frac{[(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού}}) / 0,022] \times 1000 / 50 \times \text{συντελεστής ομογενοποίησης} \times \text{συντελεστής αραίωσης κατά τη μέθοδο}}{\text{mg πρωτεΐνης}}$$

Το 0,022 προκύπτει από τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης του DNPH, ίσος με 22μM /cm, το 1000/50 αποτελεί τον συντελεστή αραίωσης (1.000μL στην κυψελίδα διά 50μL δείγματος). Ακόμη, συνυπολογίστηκε ο συντελεστής ομογενοποίησης (5 για το σπλήνα και 4 για το σκελετικό μυ) και ο συντελεστής αραίωσης που έγινε σε κάθε ιστό για τη μέθοδο (2 για σπλήνα και σκελετικό μυ). Τέλος, η τιμή διαιρέθηκε με τα mg της ολικής πρωτεΐνης.

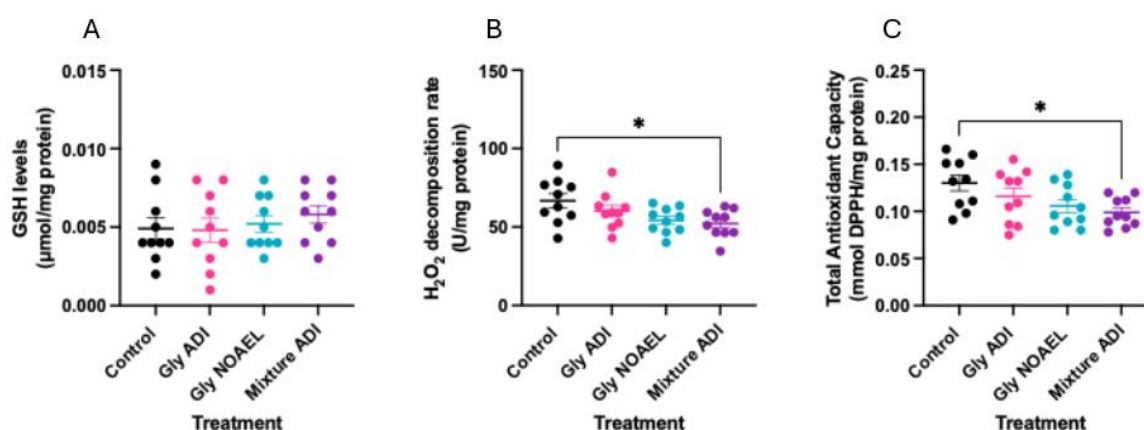
3.6 Στατιστική ανάλυση

Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων έγινε ως μέσος όρος $\pm$ SEM (τυπικό σφάλμα του μέσου) με 95% διάστημα αξιοπιστίας ($p < 0.05$) χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 8.0.1. (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Πριν την στατιστική ανάλυση, έγινε αποκλεισμός των ακραίων τιμών (outliers) με το πρόγραμμα GraphPad Outliers. Στη συνέχεια, ακολούθησε ανάλυση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και πιο συγκεκριμένα one-way ANOVA, η οποία συνδυάστηκε με τη δοκιμή post hoc Tukey, για τη σύγκριση των μέσων μεταξύ των πειραματικών ομάδων χορήγησης σε θηλυκούς και αρσενικούς επίμυες ξεχωριστά.

4. Αποτελέσματα

4.1 Επιδράσεις της γλυφosatής και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο σπλήνα θηλυκών επίμυων

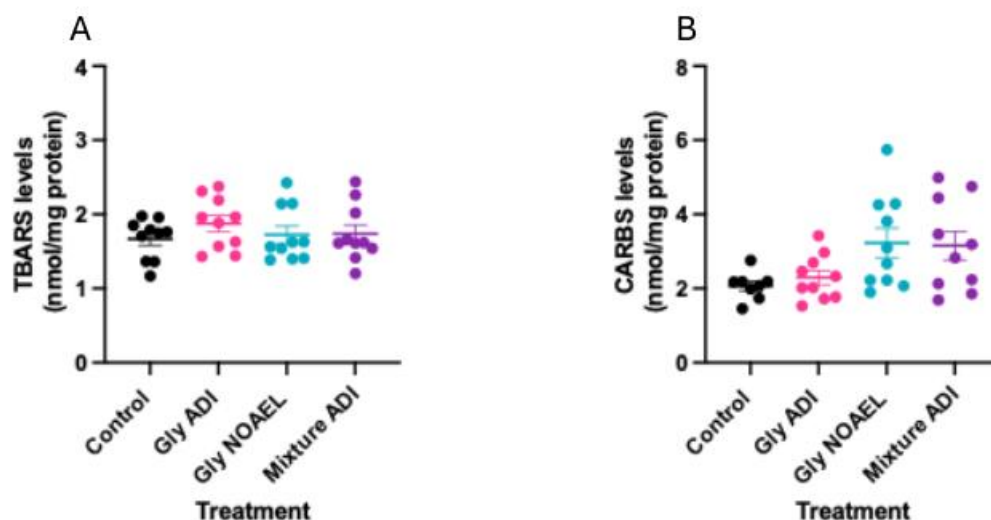
Τα αποτελέσματα της έκθεσης της γλυφosatής στις δόσεις ADI και NOAEL, καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba, στις αντίστοιχες δόσεις ADI, στο σπλήνα θηλυκών επίμυων απεικονίζονται στο Γράφημα 1. Τα επίπεδα του ρυθμού αποικοδόμησης του H_2O_2 (Γράφημα 1B), καθώς και τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Γράφημα 1C) εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση στην περίπτωση του μίγματος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, καμία μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (Γράφημα 1A).



Γράφημα 1. Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων της γλυφosatής στις δόσεις ADI, NOAEL, καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba, στην αντίστοιχη δόση ADI, σε δείκτες αντιοξειδωτικής άμυνας στο σπλήνα θηλυκών επίμυων, και πιο συγκεκριμένα (A) στα επίπεδα της GSH, (B) στο ρυθμό αποικοδόμησης του H_2O_2 , (C) στα επίπεδα της TAC. * Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control group).

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα των βιοδεικτών οξειδωτικής βλάβης στο σπλήνα θηλυκών επίμυων, όπως παρουσιάζονται στο Γράφημα 2, διαφαίνεται ότι η χορήγησή της γλυφosatής σε δύο δοσολογικά επίπεδα, καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba στη δόση ADI, δεν προκάλεσε κάποια σημαντική διαταραχή στα επίπεδα

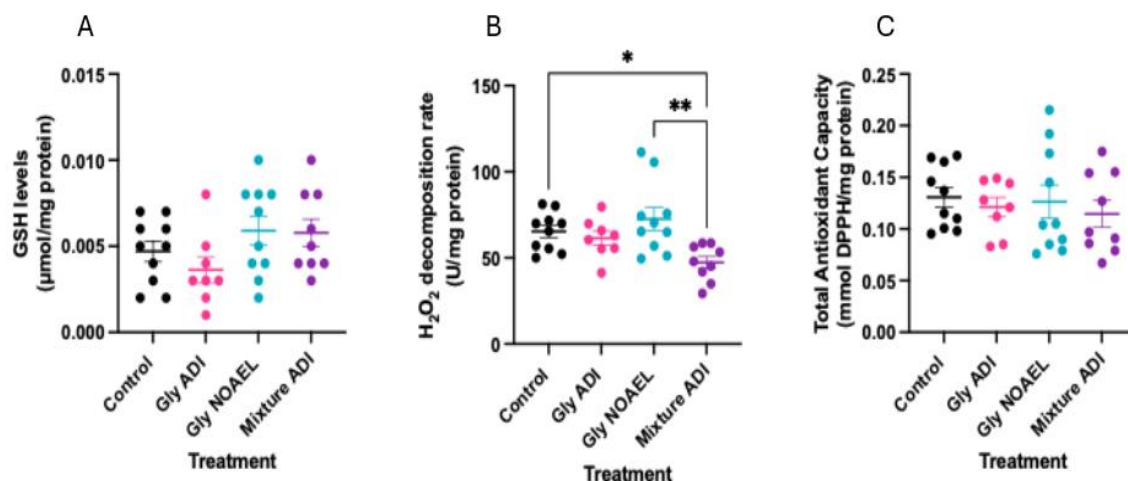
TBARS και CARBS, υποδεικνύοντας τη μη πρόκληση οξείδωσης σε λιπίδια και πρωτεΐνες (Γραφήματα 2A, B).



Γράφημα 2. Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων της γλυφοσάτης στις δόσεις ADI, NOAEL, καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba, στην αντίστοιχη δόση ADI, σε δείκτες οξειδωτικής βλάβης στο σπλήνα θηλυκών επίμυων, και πιο συγκεκριμένα των επιπέδων TBARS (A) και CARBS (B). Οριζόμενο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0.05$.

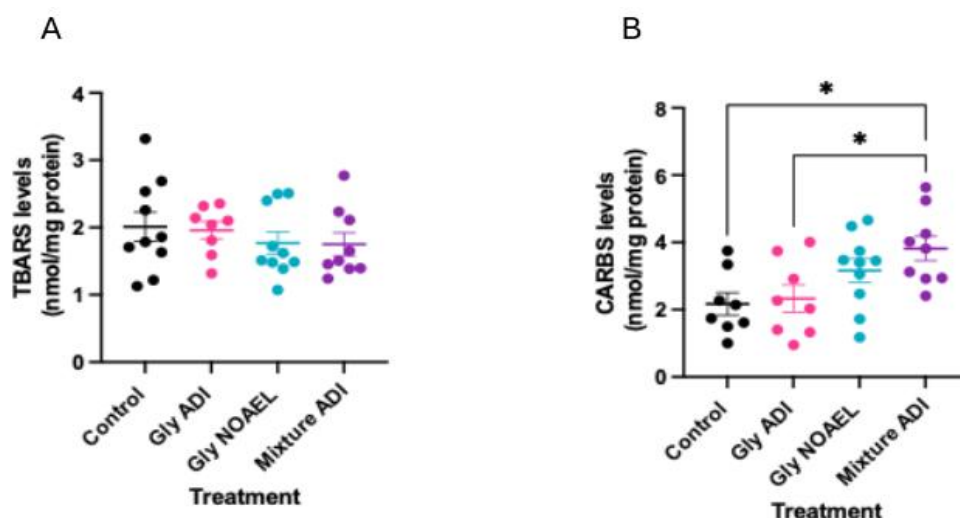
4.2 Επιδράσεις της γλυφοσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο σπλήνα αρσενικών επίμυων

Η περιγεννητική έκθεση του μίγματος της γλυφοσάτης με 2,4-D και dicamba προκάλεσε στατιστικώς σημαντική μείωση στα επίπεδα του ρυθμού αποικοδόμησης του H_2O_2 του σπλήνα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, καθώς και με την ομάδα που έλαβε τη γλυφοσάτη σε δόση NOAEL (Γράφημα 3B). Ωστόσο, δεν παρουσιάστηκε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας από τη χορήγηση των ζιζανιοκτόνων (Γραφήματα 3A, C).



Γράφημα 3. Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων της γλυφοσάτης στις δόσεις ADI, NOAEL, καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba, στην αντίστοιχη δόση ADI, σε δείκτες αντιοξειδωτικής άμυνας στο σπλήνα αρσενικών επίμυων, και πιο συγκεκριμένα (A) στα επίπεδα της GSH, (B) στο ρυθμό αποικοδόμησης του H₂O₂, (C) στα επίπεδα της TAC. * Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control group) και την ομάδα της γλυφοσάτης NOAEL (GLY NOAEL group).

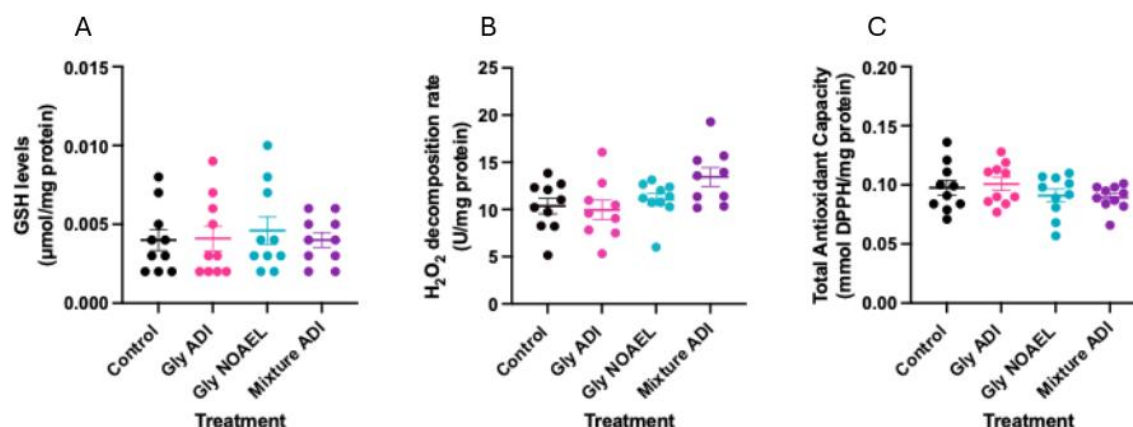
Η περιγεννητική έκθεση στο μίγμα της γλυφοσάτης με 2,4-D και dicamba προκάλεσε αύξηση των επιπέδων των CARBS σε στατιστικώς σημαντικό επίπεδο συγκριτικά με τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου, αποδεικνύοντας την πρόκληση οξειδωτικής βλάβης στις πρωτεΐνες (Γράφημα 4B). Μάλιστα, η συγκεκριμένη αύξηση εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική και συγκριτικά με την ομάδα που έλαβε μεμονωμένα τη γλυφοσάτη σε δόση ADI. Αντίθετα, τα επίπεδα των TBARS δεν παρουσίασαν καμία σημαντική μεταβολή ως αποτέλεσμα της έκθεσης στα υπό μελέτη ζιζανιοκτόνα (Γράφημα 4A).



Γράφημα 4. Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων της γλυφosatής στις δόσεις ADI, NOAEL, καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba, στην αντίστοιχη δόση ADI, σε δείκτες οξειδωτικής βλάβης στο σπλήνα αρσενικών επίμυων, και πιο συγκεκριμένα των επιπέδων TBARS (A) και CARBS (B). * Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control group) και την ομάδα της γλυφosatής ADI (GLY ADI group).

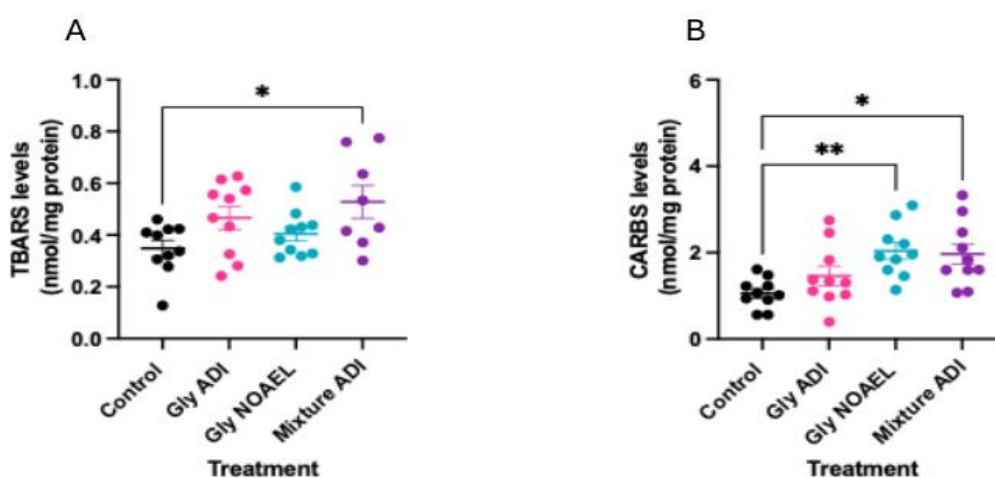
4.3 Επιδράσεις της γλυφosatής και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο σκελετικό μυ θηλυκών επίμυων

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα των βιοδεικτών αντιοξειδωτικής άμυνας στο σκελετικό μυ θηλυκών επίμυων, όπως παρουσιάζονται στο Γράφημα 5, διαφαίνεται ότι η χορήγηση της γλυφosatής στις δύο δόσεις, καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba, δεν προκάλεσε καμία σημαντική διαταραχή στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης, του ρυθμού αποικοδόμησης του H_2O_2 και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Γραφήματα 5A, B, C).



Γράφημα 5. Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων της γλυφοσάτης στις δόσεις ADI, NOAEL, καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba, στην αντίστοιχη δόση ADI, σε δείκτες αντιοξειδωτικής άμυνας στο σκελετικό μυ θηλυκών επίμυων, και πιο συγκεκριμένα (A) στα επίπεδα της GSH, (B) στο ρυθμό αποικοδόμησης του H₂O₂, (C) στα επίπεδα της TAC. Οριζόμενο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0.05$.

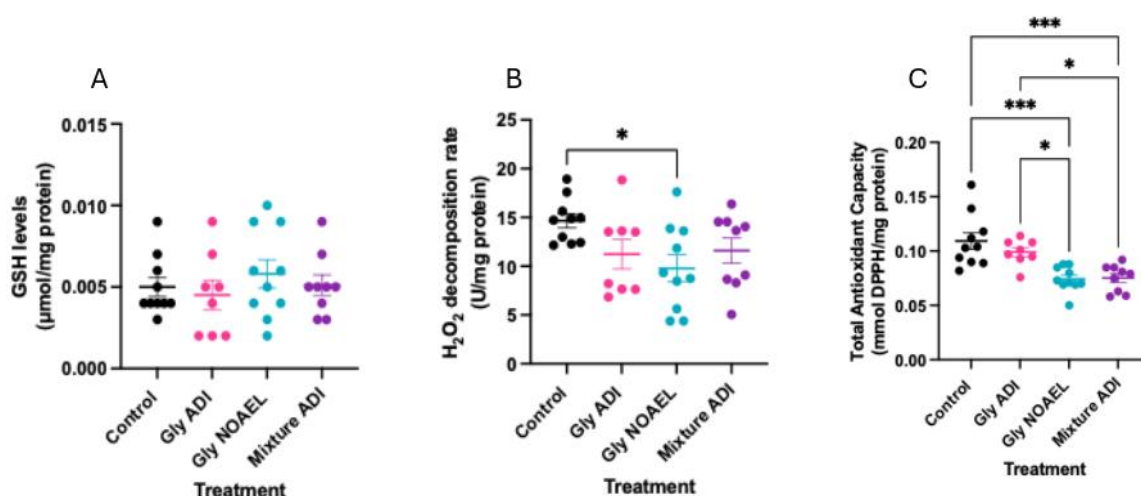
Η εκτίμηση της επίδρασης σε δείκτες οξειδωτικής βλάβης στο σκελετικό μυ έδειξε πως η έκθεση στο μίγμα των ζιζανιοκτόνων στη δόση ADI προκάλεσε αύξηση των επιπέδων λιπιδικής υπεροξείδωσης σε θηλυκούς επίμυες συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Γράφημα 6A). Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση σε επίμυες που έλαβαν τη γλυφοσάτη σε δόση NOAEL και το μίγμα της με 2,4-D και dicamba σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Γράφημα 6B).



Γράφημα 6. Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων της γλυφοσάτης στις δόσεις ADI, NOAEL, καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba, στην αντίστοιχη δόση ADI, σε δείκτες οξειδωτικής βλάβης στο σκελετικό μυ θηλυκών επίμυων, και πιο συγκεκριμένα των επιπέδων TBARS (A) και CARBS (B). * Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control group).

4.4 Επιδράσεις της γλυφοσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο σκελετικό μυ αρσενικών επίμυων

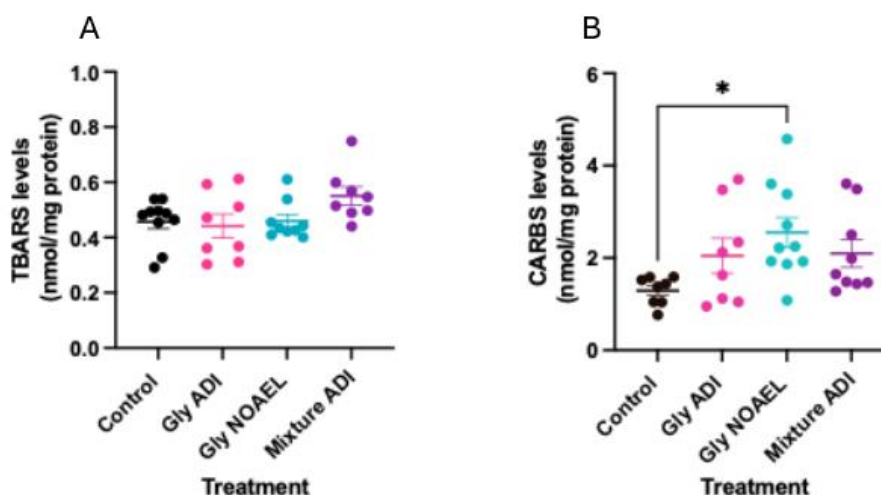
Αξιολογώντας τα αποτελέσματα των βιοδεικτών αντιοξειδωτικής άμυνας στο σκελετικό μυ αρσενικών επίμυων, όπως παρουσιάζονται στο Γράφημα 7, συμπεραίνεται ότι η χορήγηση της γλυφοσάτης σε δόση NOAEL οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων του ρυθμού αποικοδόμησης του H_2O_2 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Γράφημα 7B). Συμπληρωματικά, σημαντική μείωση παρουσιάστηκε και στα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στην περίπτωση του μίγματος και της γλυφοσάτης σε δόση NOAEL σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της γλυφοσάτης σε δόση ADI (Γράφημα 7C), χωρίς να παρατηρείται κάποια περαιτέρω μεταβολή στα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (Γράφημα 7A).



Γράφημα 7. Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων της γλυφοσάτης στις δόσεις ADI, NOAEL, καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba, στην αντίστοιχη δόση ADI,

σε δείκτες αντιοξειδωτικής άμυνας στο σκελετικό μυ αρσενικών επίμυων, και πιο συγκεκριμένα (A) στα επίπεδα της GSH, (B) στο ρυθμό αποικοδόμησης του H₂O₂, (C) στα επίπεδα της TAC. * Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control group) και την ομάδα της γλυφosatής ADI (GLY ADI group).

Η εκτίμηση των επιδράσεων στους δείκτες οξειδωτικής βλάβης στο σκελετικό μυ αρσενικών επίμυων έδειξε πως η έκθεση στο μίγμα των ζιζανιοκτόνων προκάλεσε αύξηση των επιπέδων CARBS σε στατιστικώς σημαντικό επίπεδο, συγκριτικά με τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου (Γράφημα 8B), ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των TBARS (Γράφημα 8A).



Γράφημα 8. Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων της γλυφosatής στις δόσεις ADI, NOAEL, καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba, στην αντίστοιχη δόση ADI, σε δείκτες οξειδωτικής βλάβης στο σκελετικό μυ αρσενικών επίμυων, και πιο συγκεκριμένα των επιπέδων TBARS (A) και CARBS (B). * Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control group).

5. Συζήτηση

Οι ξενοβιοτικές ουσίες είναι ενώσεις συνθετικής προέλευσης, που χρησιμοποιούνται συνήθως για οικιακούς, γεωργικούς και βιομηχανικούς σκοπούς, ενώ στο περιβάλλον υπάρχουν τόσο σε μικρές όσο και σε υψηλές συγκεντρώσεις (με χρήση μονάδων ng/L έως µg/L). Τα ξενοβιοτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με διάφορα κριτήρια, όπως η προέλευση, οι χρήσεις, η φυσική κατάσταση και οι παθοφυσιολογικές επιδράσεις τους.²¹² Οι συνθετικές χημικές ουσίες που αντιμετωπίζονται ως ξενοβιοτικές ενώσεις, όπως υποδεικνύεται από την πρόσφατη βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν ή υπάρχουν σπάνια ως φυσικά προϊόντα ή περιέχουν δομικά στοιχεία που δεν μπορούν να συντεθούν βιοχημικά, στους περισσότερους μικροοργανισμούς. Ως εκ τούτου, κατά την εξέλιξη των καταβολικών ενζύμων και μονοπατιών, οι μικροοργανισμοί δεν εκτίθενται σε αυτές τις δομές, με αποτέλεσμα οι ίδιες να είναι εξωγενείς του φυσιολογικού μεταβολισμού του οργανισμού.²¹³ Η παρατεταμένη έκθεση λοιπόν, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυτών, μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις στους διάφορους οργανισμούς.

Η σύγχρονη καθημερινότητα χαρακτηρίζεται από τη συνεχή έκθεση του ανθρώπου σε πλήθος φυσικών και συνθετικών χημικών ουσιών. Από το νερό και τα τρόφιμα, έως τον αέρα και τα καταναλωτικά προϊόντα, ο πληθυσμός εκτίθεται σε μικρές δόσεις χημικών ουσιών, βαρέων μετάλλων και άλλων ξενοβιοτικών σε καθημερινή ρουτίνα. Ωστόσο, οι περισσότερες τοξικολογικές μελέτες επικεντρώνονται σε υψηλές δόσεις χορήγησης, χωρίς να αντανακλούν τις ρεαλιστικές συνθήκες, με αποτέλεσμα η επιστημονική κοινότητα να στρέφεται όλο και περισσότερο στην ανάγκη διερεύνησης των επιδράσεων από χρόνια έκθεση σε χαμηλές δόσεις μιγμάτων ουσιών, όπως αυτές που εξετάζονται στην παρούσα εργασία.²¹⁴ Η τοξικολογία καθορίζει τα όρια της συγκέντρωσης ή της ποσότητας των χημικών ουσιών που είναι αποδεκτές στο περιβάλλον, μέσω μελετών σχετικά με τις τοξικές επιδράσεις των ουσιών στον οργανισμό και τα οικοσυστήματα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι, η χρήση αγροχημικών ουσιών, όπως τα ζιζανιοκτόνα, έχει προκαλέσει μεγάλη επιβάρυνση στο περιβάλλον, λόγω της ευρείας χρήσης τους, καθίσταται απαραίτητη η εκτίμηση του ακριβέστερου τοξικολογικού κινδύνου αυτών.²¹⁴

Υπό αυτό το πρίσμα, σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της περιγεννητικής έκθεσης, σε χαμηλές δόσεις γλυφοσάτης και μίγματος αυτής με 2,4-D και dicamba, στο οξειδοαναγωγικό προφίλ σπλήνα και σκελετικού μυ επιμύων της φυλής Wistar. Προς αυτή την κατεύθυνση, προσδιορίστηκαν βασικοί βιοδείκτες

ενδεικτικοί της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού, και πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), του ρυθμού αποικοδόμησης του H_2O_2 και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC). Ακόμη, προσδιορίστηκαν βιοδείκτες της οξειδωτικής καταστροφής λιπιδίων και πρωτεϊνών, όπως τα επίπεδα των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS), αντίστοιχα.

Η παρούσα μελέτη αξιολόγησε της επιδράσεις της έκθεσης σε χαμηλές δόσεις ζιζανιοκτόνων, μεμονωμένα και σε μορφή μίγματος, στην οξειδοαναγωγική ισορροπία του σπλήνα και σκελετικού μυός, σε αρσενικούς και θηλυκούς απογόνους. Οι χορηγούμενες δοσολογίες αντιστοιχούσαν σε ρυθμιστικά επιτρεπτά όρια (ADI και NOAEL), προσομοιώνοντας την καθημερινή περιβαλλοντική ή διατροφική έκθεση του γενικού πληθυσμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρά το γεγονός ότι οι συγκεκριμένες δόσεις θεωρούνται ασφαλείς για τον άνθρωπο, δύνανται να επάγουν σημαντικές διαταραχές στη λειτουργία του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, όπως και να προκαλέσουν οξειδωτική καταστροφή σε κρίσιμους ιστούς.

Ο σπλήνας αποτελεί ένα ζωτικής σημασίας όργανο του ανοσοποιητικού και αιμοποιητικού συστήματος, διαδραματίζοντας κομβικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης, την απομάκρυνση παθογόνων μικροοργανισμών από την κυκλοφορία και την παραγωγή κυτοκινών.²¹⁵ Η ικανότητά του να φιλτράρει παθογόνους μικροοργανισμούς από την κυκλοφορία του αίματος τον καθιστά βασικό ιστό για την αξιολόγηση της ανοσολογικής λειτουργίας και της αποτελεσματικότητας των μηχανισμών άμυνας του οργανισμού. Ακόμη, στο σπλήνα μπορεί να εκδηλωθεί άμεση και έμμεση τοξικότητα, ενώ χρησιμεύει και ως στόχος για ορισμένα καρκινογόνα και μετάσταση κακοήθων νεοπλασμάτων που προέρχονται από άλλα σημεία. Πολλά συστηματικά ή γενικευμένα νοσήματα έχουν συμμετοχή του σπληνός²¹⁶. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στο σπλήνα θηλυκών επίμυων, η περιγεννητική έκθεση στο μίγμα των ζιζανιοκτόνων προκάλεσε σημαντική μείωση στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα και στο ρυθμό αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, γεγονός που υποδηλώνει εξασθενημένη αντιοξειδωτική άμυνα. Παρά τη δεδομένη διαταραχή στην εύρυθμη λειτουργία του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα των βιοδεικτών οξειδωτικής βλάβης (TBARS, CARBS). Συνεπώς, η εξασθένιση της αντιοξειδωτικής άμυνας ενδέχεται να αντανάκλα έναν προσαρμοστικό μηχανισμό του αμυντικού συστήματος των θηλυκών επίμυων για την αντιμετώπιση της οξειδωτικής βλάβης, η οποία και τελικά επιτυγχάνεται. Αντίθετα, στους

αρσενικούς επίμυες που εκτέθηκαν στο ίδιο μίγμα, τα μειωμένα επίπεδα αποικοδόμησης υπεροξειδίου του υδρογόνου συνοδεύτηκαν από πρόκληση οξειδωτικού στρες, όπως προκύπτει από τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικής βλάβης στις πρωτεΐνες.

Τα διαφορετικά αποτελέσματα ανάμεσα σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες, στην περιγεννητική έκθεση στο μίγμα των ζιζανιοκτόνων, δείχνουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και μπορεί να οφείλονται σε διάφορους βιολογικούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, η ορμονική προστασία που παρέχουν τα οιστρογόνα στα θηλυκά, μπορεί να συμβάλλει στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, ακόμη και υπό συνθήκες εξασθενημένης αντιοξειδωτικής ικανότητας. Αντιθέτως, στα αρσενικά, η έλλειψη ανάλογης ορμονικής προστασίας και ενδεχομένως η διαφορετική ρύθμιση γονιδίων αντιοξειδωτικής άμυνας, οδηγούν σε αδυναμία αποτροπής της οξειδωτικής βλάβης, όπως εκδηλώνεται από τα αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνικής οξείδωσης. Το φαινόμενο αυτό έχει τεκμηριωθεί και σε προηγούμενες μελέτες, όπου τα αρσενικά παρουσιάστηκαν περισσότερο ευάλωτα στην πρόκληση βλάβης, συγκριτικά με τα θηλυκά.²¹⁷

Ο δεύτερος ιστός που εξετάστηκε ήταν ο σκελετικός μυς. Οι σκελετικοί μύες αποτελούν ένα μεγάλο μέρος της μάζας του σώματος, με πλούσια αιμάτωση και υψηλό μεταβολικό ρυθμό, και γι' αυτό εμφανίζουν υψηλή έκθεση στις χημικές ουσίες που προσβάλλουν τον οργανισμό. Οι διάφορες χημικές ουσίες μπορούν να προκαλέσουν μυοτοξικότητα αλληλοεπιδρώντας με τα μυϊκά οργανίδια, μεταβάλλοντας τα μυϊκά αντιγόνα, προκαλώντας έτσι ανοσολογική ή φλεγμονώδη αντίδραση, καθώς και συστηματικές επιδράσεις, όπως αστάθεια στους ηλεκτρολύτες ή περιορίζοντας την παροχή οξυγόνου για την παραγωγή ενέργειας, επηρεάζοντας δευτερογενώς τη μυϊκή λειτουργία.²¹⁸ Η περιγεννητική έκθεση των επίμυων σε χαμηλές δόσεις της γλυφοσάτης και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba επηρέασε εξίσου το συγκεκριμένο ιστό. Παρόλο που η λειτουργία του αμυντικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού διατηρήθηκε σταθερή, χωρίς μεταβολές στους θηλυκούς επίμυες, προκλήθηκε βλάβη τόσο στα λιπίδια όσο και στις πρωτεΐνες, όπως επιβεβαιώνεται από τα αυξημένα επίπεδα CARBS και TBARS, κυρίως στην ομάδα του μίγματος. Διαφαίνεται συνεπώς, ότι οι ενδογενείς μηχανισμοί στο συγκεκριμένο ιστό δεν επαρκούν για να προλάβουν την πρόκληση βλάβης στα κυτταρικά συστατικά. Όσον αφορά του αρσενικούς επίμυες, η αντιοξειδωτική ικανότητα μεταβλήθηκε δραματικά, καθώς παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στην ομάδα του μίγματος και της γλυφοσάτης NOAEL. Ιδιαίτερα στη δεύτερη, παρατηρήθηκε επιπλέον διαταραχή στα επίπεδα του ρυθμού

αποικοδόμησης του H_2O_2 , γεγονός που υποδηλώνει δυσλειτουργία στην απομάκρυνση των δραστικών ειδών οξυγόνου. Παράλληλα, στην ίδια ομάδα παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων CARBS, υποδηλώνοντας την πρόκληση κυτταρικής βλάβης και οξειδωτικού στρες.

Η διαφορά στην ευπάθεια μεταξύ του σπλήνα και του σκελετικού μυός, πιθανόν να οφείλεται στη διαφορετική φυσιολογία, κυτταρική σύσταση και μεταβολική λειτουργία των δύο ιστών. Ο σπλήνας εμπλέκεται στην ανακύκλωση ερυθρών αιμοσφαιρίων και στην αντιοξειδωτική άμυνα, μέσω των μακροφάγων και της έκκρισης κυτοκινών.²¹⁹ Αντιθέτως, ο σκελετικός μυς είναι εξαιρετικά πλούσιος σε μιτοχόνδρια και παρουσιάζει υψηλές απαιτήσεις σε οξυγόνο και ATP, καθιστώντας τον πιο ευάλωτο στο οξειδωτικό στρες, λόγω του συνεχούς μεταβολισμού.²²⁰

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως οι αρσενικοί επίμυες εμφανίζουν προφανή εξασθένηση της αντιοξειδωτικής άμυνας, ακόμη και σε επίπεδα έκθεσης που θεωρούνται ασφαλή (NOAEL). Η αδυναμία διατήρησης της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, είναι αποτέλεσμα της σημαντικής μείωσης της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, σε συνδυασμό με την μείωση του ρυθμού αποικοδόμησης του H_2O_2 . Παράλληλα, η αύξηση των δεικτών οξειδωτικής βλάβης (CARBS), επιβεβαιώνει την ύπαρξη κυτταρικής βλάβης, ενισχύοντας την άποψη πως, στους αρσενικούς επίμυες οι ενδογενείς προστατευτικοί μηχανισμοί δεν είναι επαρκείς.

Ελάχιστα τοξικολογικά δεδομένα υπάρχουν σχετικά με την επίδραση της περιγεννητικής έκθεσης στο μίγμα της γλυφosatής με 2,4-D και dicamba στη φυσιολογία του αναπτυσσόμενου οργανισμού, υπογραμμίζοντας τη σπουδαιότητα της παρούσας μελέτης. Ευρήματα που προέκυψαν στο πλαίσιο του ερευνητικού έργου, στο οποίο εντάσσεται και η συγκεκριμένη εργασία, ανέδειξαν την πρόκληση οξειδωτικού στρες στο ήπαρ, το κύριο μεταβολικό όργανο αποτοξικοποίησης, καταδεικνύοντας σημαντικές μεταβολές στο οξειδοαναγωγικό προφίλ ως αποτέλεσμα της έκθεσης στο μίγμα των ζιζανιοκτόνων.²²¹ Ακόμη, σε μελέτη αξιολόγησης του καρκινογόνου δυναμικού των ζιζανιοκτόνων glyphosate, 2,4-D και dicamba, χρησιμοποιώντας το σύστημα δοκιμών ToxTracker, αποδείχθηκε η επαγωγή οξειδωτικού στρες, η οποία αποδόθηκε κατά κύριο λόγο στο 2,4-D, ενώ το dicamba ή το glyphosate φάνηκε να ασκούν μικρότερη επίδραση. Το 2,4-D είναι ισχυρός επαγωγέας του οξειδωτικού στρες και της απόκρισης των αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, προκαλώντας περιορισμένη επαγωγή βλάβης του DNA. Το

dicamba προκάλεσε μια ήπια απόκριση οξειδωτικού στρες, ενώ η γλυφοσάτη δεν είχε αποτέλεσμα σε καμία από τις δοκιμές.²²² Συμπληρωματικά, προηγούμενη μελέτη, απέδειξε αρνητικές επιδράσεις στη νεφρική λειτουργία των απογόνων που εκτέθηκαν περιγεννητικά στο μίγμα της γλυφοσάτης με 2,4-D και dicamba. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν αντιανδρογονικές επιδράσεις στους αρσενικούς απογόνους, οι οποίοι παρουσιάζονται να είναι περισσότερο επιρρεπείς στις επιδράσεις περιβαλλοντικών ξеноβιοτικών.²²³ Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν τη θέση ότι, αν και ορισμένες από τις ενώσεις εμφανίζουν χαμηλό τοξικό δυναμικό μεμονωμένα, η συνδυασμένη έκθεσή τους μπορεί να επιφέρει συνεργιστικές ή προσθετικές επιδράσεις, ενισχύοντας τη βιολογική τους δράση και αυξάνοντας τον κίνδυνο βλαβών στους ιστούς.

Παρά το σπουδαίο αμυντικό ρόλο που κατέχει ο σπλήνας στην ανοσολογική άμυνα του οργανισμού, ελάχιστες μελέτες έχουν αξιολογήσει τις επιδράσεις της έκθεσης σε γλυφοσάτη ή σκευάσματα που την περιέχουν. Προηγούμενη μελέτη υποχρόνιας τοξικότητας της γλυφοσάτης σε υψηλή δόση (375 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα) για διάστημα 8 εβδομάδων, απέδειξε ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις σχεδόν σε όλα τα όργανα που εξετάστηκαν, ενώ ο σπλήνας εμφάνισε απονεκρωμένα σπληνικά κύτταρα, τόσο στον ερυθρό όσο και στο λευκό πολφό.²²⁴ Επιπλέον, προγενέστερη μελέτη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, η οποία αξιολόγησε τις επιπτώσεις της μακροχρόνιας έκθεσης σε μίγμα φυτοφαρμάκων με βάση τη γλυφοσάτη στο σπλήνα για 18 μήνες, κατέδειξε πρόκληση οξειδωτικού στρες στο συγκεκριμένο ιστό.²²⁵ Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι ο σπλήνας αποτελεί ευαίσθητο στόχο τοξικότητας κατά την έκθεση σε γλυφοσάτη, ιδιαίτερα σε υψηλές δόσεις και για παρατεταμένο χρονικό διάστημα.

Περιορισμένος αριθμός μελετών υπάρχει και σχετικά με τις επιπτώσεις της έκθεσης της γλυφοσάτης στο σκελετικό μυ. Σε προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε εγκύους θηλυκούς επίμυες της φυλής C57BL/6, χορηγήθηκε δόση 1,85 mg/ml ζιζανιοκτόνου με βάση τη γλυφοσάτη (Roundup®, Monsanto Brazil) μέσω πόσιμου νερού. Οι απόγονοι εμφάνισαν μείωση στο σωματικό βάρος και το μήκος του ρινικού σωλήνα, αύξηση στη λιπώδη μάζα και μείωση νευρομυϊκών συνδέσεων (NMJ). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η γλυφοσάτη μπορεί να προάγει αλλαγές στη σωματική ανάπτυξη των απογόνων, την εναπόθεση λιπώδους πανίδας και οι επιδράσεις της στους μύες μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στη δομή και τη λειτουργία αυτού του ιστού.²²⁶ Ωστόσο, η επίδραση της χρόνιας χρήσης της γλυφοσάτης στις δυναμικές ιδιότητες των σκελετικών μυών παραμένει πρακτικά ανεξερεύνητη. Επιλεγμένες παράμετροι της συστολής του μυός,

αναλύθηκαν μετά από χορήγηση γλυφosatής (10 µg/kg σωματικού βάρους) για 30 ημέρες, αποδεικνύοντας πως η έκθεση στο ζιζανιοκτόνο μπορεί να προκαλέσει σοβαρές λειτουργικές και μεταβολικές βλάβες στο σκελετικό μυ, με κίνδυνο αδυναμίας και ακαμψίας, όπως σημαντική επιβράδυνση της μυϊκής απόκρισης, απώλεια μυϊκής δύναμης και μείωση της συνολικής μυϊκής δραστηριότητας, πιθανόν λόγω ενεργειακής αποδιοργάνωσης.²²⁷

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και πρόσφατα ευρήματα που αποδεικνύουν ότι η έκθεση σε γλυφosatή ή σε εμπορικά σκευάσματα της, μπορεί να επηρεάσει τους επιγενετικούς μηχανισμούς και να προκαλέσει μείωση της συνολικής μεθυλίωσης του DNA, μεταβολές στο πρότυπο μεθυλίωσης συγκεκριμένων περιοχών και τροποποιήσεις των ιστονών. Αυτές οι επιγενετικές μεταβολές φαίνεται να εμπλέκονται σε ποικίλες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες, ενισχύοντας την άποψη ότι η γλυφosatή δύναται να επηρεάσει την κυτταρική λειτουργία σε βάθος χρόνου, ακόμη και σε επίπεδα χαμηλής έκθεσης.²²⁸

Συνολικά, τα ευρήματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας καταδεικνύουν ότι η περιγεννητική έκθεση σε δόση NOAEL γλυφosatής, καθώς και σε μίγμα αυτής με 2,4-D και dicamba, στις αντίστοιχες δόσεις ADI, μπορεί να διαταράξει την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση σε ιστούς όπως ο σπλήνας και ο σκελετικός μυς επίμυων. Οι παρατηρούμενες μεταβολές ενισχύουν την υπόθεση ότι ακόμη και κανονιστικά ασφαλείς δόσεις μπορούν να επάγουν τοξικές επιδράσεις, όταν συνδυαστούν. Ένα ακόμη συμπέρασμα που προέκυψε είναι πως οι αρσενικοί οργανισμοί ενδέχεται να είναι πιο ευάλωτοι σε περιβαλλοντικά οξειδωτικά ερεθίσματα σε σχέση με τους θηλυκούς, πιθανώς λόγω μειωμένης ορμονικής προστασίας, χωρίς όμως τα παρόντα δεδομένα να επαρκούν για να τεκμηριωθεί η φυλοειδικότητα. Τέλος, τα ευρήματα ευθυγραμμίζονται με προηγούμενες μελέτες, που τεκμηριώνουν την ικανότητα της γλυφosatής και άλλων ζιζανιοκτόνων να επηρεάζουν το οξειδωτικό προφίλ, ακόμη και σε χαμηλές δόσεις που θεωρούνται ασφαλείς (ADI, NOAEL), ενισχύοντας έτσι την ανάγκη για πιο αυστηρή αξιολόγηση των επιδράσεων υπό ρεαλιστικές συνθήκες έκθεσης.²²¹

Αξίζει να σημειωθεί πως όσον αφορά την τοξικότητα της γλυφosatής στους ιστούς σπλήνα και σκελετικού μυ, ο αριθμός των ερευνών είναι περιορισμένος. Η παρούσα εργασία αποτελεί μια από τις πρώτες μελέτες που διερευνά την περιγεννητική έκθεση σε χαμηλές δόσεις γλυφosatής και μίγματος αυτής με τα ζιζανιοκτόνα 2,4-D και dicamba.

Σημαντικές πληροφορίες σχετικά την πρόκληση τοξικότητας του μίγματος έχουν προκύψει από τη μελέτη των βιοδεικτών σε άλλα όργανα των επίμυων, όπως το ήπαρ, το παχύ έντερο, ο νεφρός, ο εγκέφαλος και η καρδιά. Τα αποτελέσματα από τους προαναφερόμενους ιστούς συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, σχετικά με τις αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των επίμυων, εντείνοντας την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση και σε άλλα όργανα, ενώ σημαντική κρίνεται και η εξέταση των δεικτών αυτών στο αίμα, ώστε να διαλευκανθεί η επίδραση στη συστηματική κυκλοφορία. Απώτερος σκοπός όλων αυτών, είναι η σαφέστερη εκτίμηση της τοξικότητας της γλυφοσάτης και των μιγμάτων της, ώστε να επαναξιολογηθούν τα επιτρεπτά όρια χρήσης και οι κανόνες ασφαλείας των ζιζανιοκτόνων, για την καλύτερη προστασία της δημόσιας υγείας.

6. Βιβλιογραφία

1. Veskokoukis, A. S., Tsatsakis, A. M. & Kouretas, D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones* **17**, 11–21 (2012).
2. Westlab. (2023).
3. Di Meo, S. & Venditti, P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid Med Cell Longev* **2020**, 9829176 (2020).
4. Martemucci, G. *et al.* Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen* **2**, 48–78 (2022).
5. Kang, X., Li, Y., Yin, S., Li, W. & Qi, J. Reactive Species-Activatable AIEgens for Biomedical Applications. *Biosensors (Basel)* **12**, 646 (2022).
6. Martemucci, G. *et al.* Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen* **2**, 48–78 (2022).
7. SARDARO, N. *et al.* Oxidative Stress and Oral Mucosal Diseases: An Overview. *In Vivo (Brooklyn)* **33**, 289–296 (2019).
8. Sarniak, A., Lipińska, J., Tytman, K. & Lipińska, S. Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation. *Postepy Hig Med Dosw* **70**, 1150–1165 (2016).
9. Venditti, P., Di Stefano, L. & Di Meo, S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion* **13**, 71–82 (2013).
10. Navarro, A. & Boveris, A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **292**, C670–C686 (2007).
11. Mailloux, R. J. An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Antioxidants* **9**, 472 (2020).
12. Allen, L.-A. H. & Aderem, A. Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol* **8**, 36–40 (1996).
13. Robinson, J. M. Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* **131**, 465–469 (2009).
14. Pyne, D. B. Regulation of Neutrophil Function During Exercise. *Sports Medicine* **17**, 245–258 (1994).

15. Meydani, M. *et al.* Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **264**, R992–R998 (1993).
16. del Río, L. A. & López-Huertas, E. ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling. *Plant Cell Physiol* pcw076 (2016) doi:10.1093/pcp/pcw076.
17. Kim, H., Hwang, J., Park, C. & Park, R. Redox system and ROS-related disorders in peroxisomes. *Free Radic Res* **58**, 662–675 (2024).
18. Zeeshan, H., Lee, G., Kim, H.-R. & Chae, H.-J. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *Int J Mol Sci* **17**, 327 (2016).
19. Csordás, G., Weaver, D. & Hajnóczky, G. Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions. *Trends Cell Biol* **28**, 523–540 (2018).
20. ZANGAR, R. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* **199**, 316–331 (2004).
21. Hanukoglu, I. Antioxidant Protective Mechanisms against Reactive Oxygen Species (ROS) Generated by Mitochondrial P450 Systems in Steroidogenic Cells. *Drug Metab Rev* **38**, 171–196 (2006).
22. Albertolle, M. E. & Peter Guengerich, F. The relationships between cytochromes P450 and H₂O₂: Production, reaction, and inhibition. *J Inorg Biochem* **186**, 228–234 (2018).
23. Kanti Das, T., Wati, M. R. & Fatima-Shad, K. Oxidative Stress Gated by Fenton and Haber Weiss Reactions and Its Association With Alzheimer’s Disease. *Arch Neurosci* **2**, (2014).
24. Abdal Dayem, A. *et al.* The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *Int J Mol Sci* **18**, 120 (2017).
25. Kessler, A., Hedberg, J., Blomberg, E. & Odnevall, I. Reactive Oxygen Species Formed by Metal and Metal Oxide Nanoparticles in Physiological Media—A Review of Reactions of Importance to Nanotoxicity and Proposal for Categorization. *Nanomaterials* **12**, 1922 (2022).
26. Liu, P. *et al.* Review of the Mechanisms by Which Transcription Factors and Exogenous Substances Regulate ROS Metabolism under Abiotic Stress. *Antioxidants* **11**, 2106 (2022).

27. Churg, A. Interactions of exogenous or evoked agents and particles: the role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* **34**, 1230–1235 (2003).
28. R. Dias, T., Martin-Hidalgo, D., M. Silva, B., F. Oliveira, P. & G. Alves, M. Endogenous and Exogenous Antioxidants As a Tool to Ameliorate Male Infertility Induced by Reactive Oxygen Species. *Antioxid Redox Signal* **33**, 767–785 (2020).
29. Alkadi, H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Infect Disord Drug Targets* **20**, (2022).
30. Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P. & Victor, V. M. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, (2016).
31. Liu, Z. *et al.* Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Front Physiol* **9**, (2018).
32. Mittal, C. K. & Murad, F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 4360–4364 (1977).
33. Bardaweel, S. K. *et al.* Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. *Eurasian J Med* **50**, 193–201 (2018).
34. Pu, X., Kamendulis, L. M. & Klaunig, J. E. Acrylonitrile-Induced Oxidative Stress and Oxidative DNA Damage in Male Sprague-Dawley Rats. *Toxicological Sciences* **111**, 64–71 (2009).
35. Pizzino, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, (2017).
36. Pala, F. S. & Gürkan, H. The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. *Advances in Molecular Biology* **1**, (2008).
37. Zhu, Z. *et al.* Negative effects of ROS generated during linear sperm motility on gene expression and ATP generation in boar sperm mitochondria. *Free Radic Biol Med* **141**, 159–171 (2019).
38. Lu, N., Chen, W. & Peng, Y.-Y. Effects of glutathione, Trolox and desferrioxamine on hemoglobin-induced protein oxidative damage: Anti-oxidant or pro-oxidant? *Eur J Pharmacol* **659**, 95–101 (2011).
39. Szweda, P. A., Friguet, B. & Szweda, L. I. Proteolysis, free radicals, and aging^{1,2}
 1Guest Editor: Earl Stadtman 2This article is part of a series of reviews on

“Oxidatively Modified Proteins in Aging and Disease.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radic Biol Med* **33**, 29–36 (2002).

40. Amit Kunwar and K.I. Priyadarsini. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical & Allied Sciences* (2011).
41. Mayo, J. C., Tan, D.-X., Sainz, R. M., Lopez-Burillo, S. & Reiter, R. J. Oxidative Damage to Catalase Induced by Peroxyl Radicals: Functional Protection by Melatonin and Other Antioxidants. *Free Radic Res* **37**, 543–553 (2003).
42. Margaritelis, N. V. *et al.* Going retro: Oxidative stress biomarkers in modern redox biology. *Free Radic Biol Med* **98**, 2–12 (2016).
43. Møller, I. M., Rogowska-Wrzesinska, A. & Rao, R. S. P. Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *J Proteomics* **74**, 2228–2242 (2011).
44. Ciacka, K., Tymiński, M., Gniazdowska, A. & Krasuska, U. Carbonylation of proteins—an element of plant ageing. *Planta* **252**, 12 (2020).
45. Gill, S. S. & Tuteja, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 909–930 (2010).
46. Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A. & Jeyasekharan, A. D. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol* **25**, 101084 (2019).
47. Li, Z., Wu, J. & DeLeo, C. J. RNA damage and surveillance under oxidative stress. *IUBMB Life* **58**, 581–588 (2006).
48. Endale, H. T., Tesfaye, W. & Mengstie, T. A. ROS induced lipid peroxidation and their role in ferroptosis. *Front Cell Dev Biol* **11**, (2023).
49. Su, L.-J. *et al.* Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, 1–13 (2019).
50. Johnson, D. R. & Decker, E. A. The Role of Oxygen in Lipid Oxidation Reactions: A Review. *Annu Rev Food Sci Technol* **6**, 171–190 (2015).
51. Ayala, A., Muñoz, M. F. & Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev* **2014**, 1–31 (2014).

52. Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J. & Pérez-Lebeña, E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci* **22**, 4642 (2021).
53. Gutteridge, J. M. C. & Halliwell, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* **393**, 561–564 (2010).
54. Halliwell, B. Antioxidants: The Basics-what they are and how to Evaluate them. in 3–20 (1996). doi:10.1016/S1054-3589(08)60976-X.
55. Omar Mohammed Ahmed and Mustafa Taha Mohammed. OXIDATIVE STRESS: THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) AND ANTIOXIDANTS IN HUMAN DISEASES. *Plant Arch.*
56. Ozougwu, J. C. Ph. D. P. The Role of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Oxidative Stress Ozougwu. (2016).
57. Shahidi, F. & Zhong, Y. Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods* **18**, 757–781 (2015).
58. Marrazzo*, G. *et al.* Role of Dietary and Endogenous Antioxidants in Diabetes. *Crit Rev Food Sci Nutr* **54**, 1599–1616 (2014).
59. Bouayed, J. & Bohn, T. Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxid Med Cell Longev* **3**, 228–237 (2010).
60. Korczowska-Lącka, I. *et al.* Disorders of Endogenous and Exogenous Antioxidants in Neurological Diseases. *Antioxidants* **12**, 1811 (2023).
61. Pei, J., Pan, X., Wei, G. & Hua, Y. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxiation. *Front Pharmacol* **14**, (2023).
62. Korczowska-Lącka, I. *et al.* Disorders of Endogenous and Exogenous Antioxidants in Neurological Diseases. *Antioxidants* **12**, 1811 (2023).
63. Steenvoorden, D. P. T. & Beijersbergen van Henegouwen, G. M. J. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol B* **41**, 1–10 (1997).
64. Ighodaro, O. M. & Akinloye, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their

- fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* **54**, 287–293 (2018).
65. Halliwell, B. Antioxidants: The Basics-what they are and how to Evaluate them. in 3–20 (1996). doi:10.1016/S1054-3589(08)60976-X.
 66. Steenvoorden, D. P. T. & Beijersbergen van Henegouwen, G. M. J. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol B* **41**, 1–10 (1997).
 67. Ighodaro, O. M. & Akinloye, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* **54**, 287–293 (2018).
 68. Abdel-Shafy, E. A. Antioxidant status in pesticides-exposed agricultural workers. in *Toxicology* 43–51 (Elsevier, 2021). doi:10.1016/B978-0-12-819092-0.00005-4.
 69. Piggott, A. M. & Karuso, P. Fluorometric Assay for the Determination of Glutathione Reductase Activity. *Anal Chem* **79**, 8769–8773 (2007).
 70. Bishop, G. M., Dringen, R. & Robinson, S. R. Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radic Biol Med* **42**, 1222–1230 (2007).
 71. Powell, S. R. The Antioxidant Properties of Zinc. *J Nutr* **130**, 1447S-1454S (2000).
 72. Glorieux, C. & Calderon, P. B. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem* **398**, 1095–1108 (2017).
 73. Góth, L., Rass, P. & Páy, A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis* **8**, 141–149 (2004).
 74. Ighodaro, O. M. & Akinloye, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* **54**, 287–293 (2018).
 75. Sáez, G. T. & Están-Capell, N. Antioxidant Enzymes. in *Encyclopedia of Cancer* 288–294 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-662-46875-3_7210.

76. Qadir, S., Bashir, S. & John, R. Saffron—Immunity System. in *Saffron* 177–192 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-818462-2.00015-2.
77. Moskaug, J. Ø., Carlsen, H., Myhrstad, M. C. & Blomhoff, R. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr* **81**, 277S-283S (2005).
78. Liu, T., Sun, L., Zhang, Y., Wang, Y. & Zheng, J. Imbalanced GSH/ROS and sequential cell death. *J Biochem Mol Toxicol* **36**, (2022).
79. Townsend, D. M., Tew, K. D. & Tapiero, H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **57**, 145–155 (2003).
80. Moskaug, J. Ø., Carlsen, H., Myhrstad, M. C. & Blomhoff, R. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr* **81**, 277S-283S (2005).
81. Carr, A. & Maggini, S. Vitamin C and Immune Function. *Nutrients* **9**, 1211 (2017).
82. Padayatty, S. J. *et al.* Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *J Am Coll Nutr* **22**, 18–35 (2003).
83. Miyazawa, T., Burdeos, G. C., Itaya, M., Nakagawa, K. & Miyazawa, T. Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB Life* **71**, 430–441 (2019).
84. Traber, M. G. & Atkinson, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* **43**, 4–15 (2007).
85. MatÉs, J. M., Pérez-Gómez, C. & De Castro, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* **32**, 595–603 (1999).
86. Blaner, W. S., Shmarakov, I. O. & Traber, M. G. Vitamin A and Vitamin E: Will the Real Antioxidant Please Stand Up? *Annu Rev Nutr* **41**, 105–131 (2021).
87. Sautin, Y. Y. & Johnson, R. J. Uric Acid: The Oxidant-Antioxidant Paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **27**, 608–619 (2008).
88. Feig, D. I., Madero, M., Jalal, D. I., Sanchez-Lozada, L. G. & Johnson, R. J. Uric acid and the origins of hypertension. *J Pediatr* **162**, 896–902 (2013).
89. Corrigendum to: Uric Acid and Hypertension: An Update with Recommendations. *Am J Hypertens* **33**, 1150–1150 (2020).
90. Sofia Tsalouhidou, A. P. V. M. Exercise and Antioxidant Capacity of Uric Acid. *Inquiries in Physical Education and Sport* (2007).

91. Glantzounis, G., Tsimoyiannis, E., Kappas, A. & Galaris, D. Uric Acid and Oxidative Stress. *Curr Pharm Des* **11**, 4145–4151 (2005).
92. Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E. & Hochstein, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**, 6858–6862 (1981).
93. URQUIAGA, I. & LEIGHTON, F. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol Res* **33**, (2000).
94. Dragsted. Antioxidant Actions of Polyphenols in Humans. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **73**, 112–119 (2003).
95. Croft, K. D. Dietary polyphenols: Antioxidants or not? *Arch Biochem Biophys* **595**, 120–124 (2016).
96. Mitra, S., Natarajan, R., Ziedonis, D. & Fan, X. Antioxidant and anti-inflammatory nutrient status, supplementation, and mechanisms in patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **78**, 1–11 (2017).
97. Britton, G. Getting to know carotenoids. in 1–56 (2022). doi:10.1016/bs.mie.2022.04.005.
98. Moise, A. R., Bandara, S. & von Lintig, J. Carotenoid modifying enzymes in metazoans. in 405–445 (2022). doi:10.1016/bs.mie.2022.05.005.
99. Palace, V. P., Khaper, N., Qin, Q. & Singal, P. K. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med* **26**, 746–761 (1999).
100. Sies, H., Berndt, C. & Jones, D. P. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem* **86**, 715–748 (2017).
101. Burton, G. J. & Jauniaux, E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **25**, 287–299 (2011).
102. Betteridge, D. J. What is oxidative stress? *Metabolism* **49**, 3–8 (2000).
103. Preiser, J. Oxidative Stress. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **36**, 147–154 (2012).
104. Sies, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Curr Opin Toxicol* **7**, 122–126 (2018).

105. Burton, G. J., Charnock-Jones, S. D. & Jauniaux, E. Working with Oxygen and Oxidative Stress In Vitro. in *Placenta and Trophoblast* 413–426 (Humana Press, New Jersey). doi:10.1385/1-59259-989-3:413.
106. Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P. & Victor, V. M. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, (2016).
107. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal* **5**, 9–19 (2012).
108. Gandhi, S. & Abramov, A. Y. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* **2012**, 1–11 (2012).
109. Ludovico, P. & Burhans, W. C. Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police. *FEMS Yeast Res* **14**, 33–39 (2014).
110. Poljsak, B. Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* **2011**, 1–15 (2011).
111. Calabrese, E. J. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ Toxicol Chem* **27**, 1451–1474 (2008).
112. Karki, R. & Dangol, K. Pesticide Use and Health Effects among Nepalese Farmers: A Cross-Sectional Study in Tokha Municipality. *Indian J Occup Environ Med* **27**, 255–259 (2023).
113. Settimi, L. *et al.* Development of a new categorization system for pesticides exposure to support harmonized reporting between EU Member States. *Environ Int* **91**, 332–340 (2016).
114. Kaur, R., Mavi, G. K., Raghav, S. & Khan, I. Pesticides Classification and its Impact on Environment. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* **8**, 1889–1897 (2019).
115. Kunz, W. When is a parasite species a species? *Trends Parasitol* **18**, 121–124 (2002).
116. European Commission. Food Safety. https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/sustainable-use-pesticides/farm-fork-targets-progress/eu-trends_en?
117. European Food Safety Authority. Pesticide residues in food: latest figures released. <https://www.efsa.europa.eu/en/news/pesticide-residues-food-latest-figures-released?> (2024).

118. Yadav, I. C. *et al.* Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Science of The Total Environment* **511**, 123–137 (2015).
119. Hassaan, M. A. & El Nemr, A. Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *Egypt J Aquat Res* **46**, 207–220 (2020).
120. Khurshed, A. *et al.* Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: A comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects. *Microb Pathog* **173**, 105854 (2022).
121. Mossa, A.-T. H., Mohafrash, S. M. M. & Chandrasekaran, N. Safety of Natural Insecticides: Toxic Effects on Experimental Animals. *Biomed Res Int* **2018**, 1–17 (2018).
122. Pathak, V. M. *et al.* Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. *Front Microbiol* **13**, (2022).
123. Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Nagata, K. & Yeh, J. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Hum Exp Toxicol* **26**, 361–366 (2007).
124. Alavanja, M. C. R. Introduction: Pesticides Use and Exposure, Extensive Worldwide. *Rev Environ Health* **24**, (2009).
125. Carrasco Cabrera, L. & Medina Pastor, P. The 2019 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* **19**, (2021).
126. Kim, K.-H., Kabir, E. & Jahan, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of The Total Environment* **575**, 525–535 (2017).
127. Tudi, M. *et al.* Exposure Routes and Health Risks Associated with Pesticide Application. *Toxics* **10**, 335 (2022).
128. Shruti Salphale. Review of Effect of Pesticides on Human Health. *International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Sciences* (2022).
129. Shruti Salphale. Review of Effect of Pesticides on Human Health. *International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Science* (2022).
130. Salazar-Flores, J. *et al.* Impacts of Pesticides on Oral Cavity Health and Ecosystems: A Review. *Int J Environ Res Public Health* **19**, 11257 (2022).

131. Clippinger, A. J. *et al.* Human-relevant approaches to assess eye corrosion/irritation potential of agrochemical formulations. *Cutan Ocul Toxicol* **40**, 145–167 (2021).
132. Blair, A., Ritz, B., Wesseling, C. & Beane Freeman, L. Pesticides and human health. *Occup Environ Med* **72**, 81–82 (2015).
133. Yasser El-Nahhal, A. A. R. Human Health Risks: Impact of Pesticide Application . *Journal of Environment and Earth Science* (2013).
134. Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P. & Hens, L. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Front Public Health* **4**, (2016).
135. Rani, L. *et al.* An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *J Clean Prod* **283**, 124657 (2021).
136. Zhou, W., Li, M. & Achal, V. A comprehensive review on environmental and human health impacts of chemical pesticide usage. *Emerg Contam* **11**, 100410 (2025).
137. Ahmad, M. F. *et al.* Pesticides impacts on human health and the environment with their mechanisms of action and possible countermeasures. *Heliyon* **10**, e29128 (2024).
138. Current Perspective on Pesticides: Their Classification, Behaviour, Potential Use and Toxic Effects. *Journal of Angiotherapy* **7**, (2023).
139. Moreira, S. *et al.* Pesticides and Male Fertility: A Dangerous Crosstalk. *Metabolites* **11**, 799 (2021).
140. Venkidasamy, B. *et al.* Organopesticides and fertility: where does the link lead to? *Environmental Science and Pollution Research* **28**, 6289–6301 (2021).
141. Karami-Mohajeri, S., Ahmadipour, A., Rahimi, H.-R. & Abdollahi, M. Adverse effects of organophosphorus pesticides on the liver: a brief summary of four decades of research. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **68**, 261–275 (2017).
142. Mohd Ghazi, R. *et al.* Health effects of herbicides and its current removal strategies. *Bioengineered* **14**, (2023).
143. Weldeslassie, T., Naz, H., Singh, B. & Oves, M. Chemical Contaminants for Soil, Air and Aquatic Ecosystem. in *Modern Age Environmental Problems and their Remediation* 1–22 (Springer International Publishing, Cham, 2018). doi:10.1007/978-3-319-64501-8_1.

144. Sarmah, A. K., Müller, K. & Ahmad, R. Fate and behaviour of pesticides in the agroecosystem—a review with a New Zealand perspective. *Soil Research* **42**, 125 (2004).
145. Cilia, N. & Kandris, I. Training in the evaluation of pesticides (plant protection products and active substances) according to Regulation (EC) No 1107/2009. *EFSA Journal* **21**, (2023).
146. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC Text with EEA relevance. *Official Journal of the European Union* (2005).
147. Storck, V., Karpouzas, D. G. & Martin-Laurent, F. Towards a better pesticide policy for the European Union. *Science of The Total Environment* **575**, 1027–1033 (2017).
148. Hüesker, F. & Lepenies, R. Why does pesticide pollution in water persist? *Environ Sci Policy* **128**, 185–193 (2022).
149. Parra-Arroyo, L. *et al.* Highly hazardous pesticides and related pollutants: Toxicological, regulatory, and analytical aspects. *Science of The Total Environment* **807**, 151879 (2022).
150. Geissen, V. *et al.* Cocktails of pesticide residues in conventional and organic farming systems in Europe – Legacy of the past and turning point for the future. *Environmental Pollution* **278**, 116827 (2021).
151. Nechalioti, P.-M. *et al.* Evaluation of perinatal exposure of glyphosate and its mixture with 2,4-D and dicamba on liver redox status in Wistar rats. *Environ Res* **228**, 115906 (2023).
152. Neve, P. *et al.* Current and future glyphosate use in European agriculture. *Weed Res* **64**, 181–196 (2024).
153. Merfield, C. N. Redefining weeds for the post-herbicide era. *Weed Res* **62**, 263–267 (2022).
154. Parven, A., Meftaul, I. M., Venkateswarlu, K. & Megharaj, M. Herbicides in modern sustainable agriculture: environmental fate, ecological implications, and human health concerns. *International Journal of Environmental Science and Technology* **22**, 1181–1202 (2025).

155. eurostat. Pesticide sales.
https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/aei_fm_salpest09/default/bar?lang=en.
156. Duke, S. O. & Powles, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci* **64**, 319–325 (2008).
157. Singh, S. *et al.* Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation. *Int J Environ Res Public Health* **17**, 7519 (2020).
158. Duke, S. O. The history and current status of glyphosate. *Pest Manag Sci* **74**, 1027–1034 (2018).
159. Amrhein, N., Schab, J. & Steinrücken, H. C. The mode of action of the herbicide glyphosate. *Naturwissenschaften* **67**, 356–357 (1980).
160. Van Bruggen, A. H. C. *et al.* Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of The Total Environment* **616–617**, 255–268 (2018).
161. Alan D Baylis. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *SCI* (2000).
162. Johal, G. S. & Huber, D. M. Glyphosate effects on diseases of plants. *European Journal of Agronomy* **31**, 144–152 (2009).
163. Kudsk, P. & Mathiassen, S. K. Pesticide regulation in the European Union and the glyphosate controversy. *Weed Sci* **68**, 214–222 (2020).
164. Behrens, M. R. *et al.* Dicamba Resistance: Enlarging and Preserving Biotechnology-Based Weed Management Strategies. *Science (1979)* **316**, 1185–1188 (2007).
165. Riter, L. S. *et al.* Conversations about the Future of Dicamba: The Science Behind Off-Target Movement. *J Agric Food Chem* **69**, 14435–14444 (2021).
166. Gleason, C., Foley, R. C. & Singh, K. B. Mutant Analysis in Arabidopsis Provides Insight into the Molecular Mode of Action of the Auxinic Herbicide Dicamba. *PLoS One* **6**, e17245 (2011).
167. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 3030, Dicamba. *PubChem* (2025).
168. D’Ordine, R. L. *et al.* Dicamba Monooxygenase: Structural Insights into a Dynamic Rieske Oxygenase that Catalyzes an Exocyclic Monooxygenation. *J Mol Biol* **392**, 481–497 (2009).

169. Henry, J. L. P. author details. Environmental and Human Impacts on Off-Target Movement of Dicamba. *University of Missouri - Columbia ProQuest Dissertations & Theses* (2020).
170. Homa, J., Stachowiak, W., Olejniczak, A., Chrzanowski, Ł. & Niemczak, M. Ecotoxicity studies reveal that organic cations in dicamba-derived ionic liquids can pose a greater environmental risk than the herbicide itself. *Science of The Total Environment* **922**, 171062 (2024).
171. Islam, F. *et al.* Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environ Int* **111**, 332–351 (2018).
172. de Castro Marcato, A. C., de Souza, C. P. & Fontanetti, C. S. Herbicide 2,4-D: A Review of Toxicity on Non-Target Organisms. *Water Air Soil Pollut* **228**, 120 (2017).
173. Song, Y. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *J Integr Plant Biol* **56**, 106–113 (2014).
174. de Castro Marcato, A. C., de Souza, C. P. & Fontanetti, C. S. Herbicide 2,4-D: A Review of Toxicity on Non-Target Organisms. *Water Air Soil Pollut* **228**, 120 (2017).
175. IARC. IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. *IARC Publ* (2018).
176. Outcome of the consultation with Member States, the applicant and EFSA on the pesticide risk assessment for 2,4-D in light of confirmatory data. *EFSA Supporting Publications* **20**, (2023).
177. Docea, A. O. *et al.* Effect of perinatal exposure to glyphosate and its mixture with 2,4-D and dicamba on rat dam kidney and thyroid function and offspring's health. *Environ Res* **237**, 116908 (2023).
178. Joseph, D. D., Marshall, M. W. & Sanders, C. H. Efficacy of 2,4-D, Dicamba, Glufosinate and Glyphosate Combinations on Selected Broadleaf Weed Heights. *Am J Plant Sci* **09**, 1321–1333 (2018).
179. Jens C. Streibig, P. K. J. E. A General Joint Action Model for Herbicide Mixtures. *Wiley Online Library* (1999).
180. Barbieri, G. F. *et al.* Herbicide mixtures: interactions and modeling. *Advances in Weed Science* **40**, (2022).
181. Zhang, J., Hamill, A. S. & Weaver, S. E. Antagonism and Synergism Between Herbicides: Trends from Previous Studies. *Weed Technology* **9**, 86–90 (1995).

182. Hammerton, J. L. Environmental Factors and Susceptibility to Herbicides. *Weeds* **15**, 330 (1967).
183. Kudsk, P. & Streibig, J. C. Herbicides – a two-edged sword*. *Weed Res* **43**, 90–102 (2003).
184. Evans, T. J. Toxicokinetics and Toxicodynamics. in *Small Animal Toxicology* 18–28 (Elsevier, 2006). doi:10.1016/B0-72-160639-3/50005-8.
185. Pollard, K. M., Christy, J. M., Cauvi, D. M. & Kono, D. H. Environmental xenobiotic exposure and autoimmunity. *Curr Opin Toxicol* **10**, 15–22 (2018).
186. Caldwell, J., Gardner, I. & Swales, N. An Introduction to Drug Disposition: The Basic Principles of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion. *Toxicol Pathol* **23**, 102–114 (1995).
187. Croom, E. Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. in 31–88 (2012). doi:10.1016/B978-0-12-415813-9.00003-9.
188. European Commission. EU legislation on MRLs. https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/maximum-residue-levels/eu-legislation-mrls_en? (2018).
189. Review of the existing maximum residue levels for glyphosate according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005 – revised version to take into account omitted data. *EFSA Journal* **17**, (2019).
190. Reasoned opinion on the modification of the MRL for dicamba in genetically modified soybean. *EFSA Journal* **11**, (2013).
191. Dickens, M. J. & Pawluski, J. L. The HPA Axis During the Perinatal Period: Implications for Perinatal Depression. *Endocrinology* **159**, 3737–3746 (2018).
192. Allan, C., Carrick-Sen, D. & Martin, C. R. What is perinatal well-being? A concept analysis and review of the literature. *J Reprod Infant Psychol* **31**, 381–398 (2013).
193. Zhang, C. *et al.* Prenatal xenobiotic exposure and intrauterine hypothalamus–pituitary–adrenal axis programming alteration. *Toxicology* **325**, 74–84 (2014).
194. Gerona, R. R. *et al.* Glyphosate exposure in early pregnancy and reduced fetal growth: a prospective observational study of high-risk pregnancies. *Environmental Health* **21**, 95 (2022).

195. Birnbaum, L. S. Endocrine effects of prenatal exposure to PCBs, dioxins, and other xenobiotics: implications for policy and future research. *Environ Health Perspect* **102**, 676–679 (1994).
196. Nechaloti, P.-M. *et al.* Evaluation of perinatal exposure of glyphosate and its mixture with 2,4-D and dicamba on liver redox status in Wistar rats. *Environ Res* **228**, 115906 (2023).
197. Docea, A. O. *et al.* Effect of perinatal exposure to glyphosate and its mixture with 2,4-D and dicamba on rat dam kidney and thyroid function and offspring's health. *Environ Res* **237**, 116908 (2023).
198. CIRSTEA, A. E. EXPOSURE TO GLYPHOSATE AND ITS MIXTURE WITH DICAMBA AND 2,4-D FROM GESTATIONAL DAY 6 UNTIL WEANING IN RAT DAMS REVEALS SIGNS OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. *Farmacia* **71**, 1156–1164 (2023).
199. Chang, E. T. & Delzell, E. Systematic review and meta-analysis of glyphosate exposure and risk of lymphohematopoietic cancers. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **51**, 402–434 (2016).
200. Barbosa, A. *et al.* Study of muscle fibers of the extensor digitorum longus and soleus muscles of C57BL/6 females exposed to glyphosate during pregnancy and lactation. *Einstein (São Paulo)* **19**, (2021).
201. Valente, L. C. *et al.* A mixture of glyphosate and 2, <scp>4-D</scp> herbicides enhances the deleterious reproductive outcomes induced by Western diet in obese male mice. *Environ Toxicol* **39**, 31–43 (2024).
202. Álvarez, F. *et al.* Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* **21**, (2023).
203. Napkin.
204. Kruger, N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. in *Protein Protocols Handbook, The* 15–22 (Humana Press, New Jersey). doi:10.1385/1-59259-169-8:15.
205. Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Milzani, A., Fanti, P. & Rossi, R. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nat Protoc* **8**, 1660–1669 (2013).
206. Griffith, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* **106**, 207–212 (1980).

207. Cano, A., Maestre, A. B., Hernández-Ruiz, J. & Arnao, M. B. ABTS/TAC Methodology: Main Milestones and Recent Applications. *Processes* **11**, 185 (2023).
208. Liang, N. & Kitts, D. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules* **19**, 19180–19208 (2014).
209. Sroka, Z. & Cisowski, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology* **41**, 753–758 (2003).
210. Puntel, R. L., Nogueira, C. W. & Rocha, J. B. T. Krebs Cycle Intermediates Modulate Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS) Production in Rat Brain In Vitro. *Neurochem Res* **30**, 225–235 (2005).
211. Roberts, C. K. *et al.* A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J Appl Physiol* **98**, 203–210 (2005).
212. Štefanac, T., Grgas, D. & Landeka Dragičević, T. Xenobiotics—Division and Methods of Detection: A Review. *J Xenobiot* **11**, 130–141 (2021).
213. Rieger, P.-G. *et al.* Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. *J Biotechnol* **94**, 101–123 (2002).
214. Aparecida, M., Campos Ventura- Camargo, B. de & Miyuki, M. Toxicity of Herbicides: Impact on Aquatic and Soil Biota and Human Health. in *Herbicides - Current Research and Case Studies in Use* (InTech, 2013). doi:10.5772/55851.
215. Bronte, V. & Pittet, M. J. The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. *Immunity* **39**, 806–818 (2013).
216. Suttie, A. W. Histopathology of the Spleen. *Toxicol Pathol* **34**, 466–503 (2006).
217. Díaz, A. *et al.* Sex Differences in Age-Associated Type 2 Diabetes in Rats—Role of Estrogens and Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, 1–13 (2019).
218. Janssen, L. *et al.* Muscle Toxicity of Drugs: When Drugs Turn Physiology into Pathophysiology. *Physiol Rev* **100**, 633–672 (2020).
219. Mebius, R. E. & Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* **5**, 606–616 (2005).
220. Frontera, W. R. & Ochala, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int* **96**, 183–195 (2015).

221. Nechaloti, P.-M. *et al.* Evaluation of perinatal exposure of glyphosate and its mixture with 2,4-D and dicamba on liver redox status in Wistar rats. *Environ Res* **228**, 115906 (2023).
222. Mesnage, R., Brandsma, I., Moelijker, N., Zhang, G. & Antoniou, M. N. Genotoxicity evaluation of 2,4-D, dicamba and glyphosate alone or in combination with cell reporter assays for DNA damage, oxidative stress and unfolded protein response. *Food and Chemical Toxicology* **157**, 112601 (2021).
223. Docea, A. O. *et al.* Effect of perinatal exposure to glyphosate and its mixture with 2,4-D and dicamba on rat dam kidney and thyroid function and offspring's health. *Environ Res* **237**, 116908 (2023).
224. Tizhe, E. V. *et al.* Influence of zinc supplementation on histopathological changes in the stomach, liver, kidney, brain, pancreas and spleen during subchronic exposure of Wistar rats to glyphosate. *Comp Clin Path* **23**, 1535–1543 (2014).
225. Fountoucidou, P. *et al.* A mixture of routinely encountered xenobiotics induces both redox adaptations and perturbations in blood and tissues of rats after a long-term low-dose exposure regimen: The time and dose issue. *Toxicol Lett* **317**, 24–44 (2019).
226. Barbosa, A. *et al.* Maternal exposure to <scp>glyphosate-based</scp> herbicide promotes changes in the muscle structure of C57BL/6 mice offspring. *Anat Rec* **305**, 3307–3316 (2022).
227. Nozdrenko, D. *et al.* Analysis of Biomechanical Parameters of Muscle Soleus Contraction and Blood Biochemical Parameters in Rat with Chronic Glyphosate Intoxication and Therapeutic Use of C60 Fullerene. *Int J Mol Sci* **22**, 4977 (2021).
228. Rossetti, M. F. *et al.* Epigenetic Changes Associated With Exposure to Glyphosate-Based Herbicides in Mammals. *Front Endocrinol (Lausanne)* **12**, (2021).