



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

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

ΓΩΤΤΑ ΠΟΛΥΜΝΙΑ ,BSc Βιολόγος

ΛΑΡΙΣΑ, 2025

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

Γώττα Πολύμνια

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 the rat brain»

Gotta Polymnia

Supervisor: Tekos Fotios

Laboratory of Animan Physiology

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τέκος Φώτιος (Επιβλέπων): Διδάσκων ΠΜΣ Τοξικολογία του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κουρέτας Δημήτριος: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γιαννούλη Περσεφόνη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το χειμερινό εξάμηνο του ακαδημαϊκού έτους 2024-2025.

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη στον διδάσκοντα κο. Τέκο Φώτιο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, δίνοντάς μου την ευκαιρία να συμμετάσχω ενεργά στην παρούσα ερευνητική προσπάθεια. Η καθοδήγησή του, η ακαδημαϊκή του εμπειρία και η διαρκής υποστήριξή του συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Ιδιαίτερη μνεία αξίζει να γίνει στην διδάκτορα Παρασκευή-Μαρία Νεχαλιώτη, υπεύθυνη καθοδήγησής μου στο εργαστήριο. Η υπομονή, η συνέπειά της και η πολύτιμη βοήθειά της, τόσο σε πρακτικό όσο και σε επιστημονικό επίπεδο, αποτέλεσαν για μένα στήριγμα καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας. Η συμβολή της στην επιστημονική και προσωπική μου εξέλιξη υπήρξε καθοριστική.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κο. Κουρέτα Δημήτριο και την κα. Γιαννούλη Περσεφόνη για την αποδοχή τους να συμμετάσχουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου, καθώς συνέβαλε στην ομαλή και ευχάριστη διεξαγωγή της διπλωματικής μου, και ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Θωμά Καραμπατζάκη για τη συνεχή συμβολή του στη διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής αλλά και τον συνάδελφο και φίλο Δημήτρη Μαναό για τη βοήθεια στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον αδερφό μου για τη συνεχή στήριξη στον ακαδημαϊκό στίβο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	9
1.2 Δραστικές Μορφές.....	10
1.2.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου	10
1.2.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου.....	11
1.2.3 Δραστικές Μορφές Θείου	12
1.2.4 Δραστικές Μορφές Χλωρίου.....	13
1.3 Παραγωγή ελεύθερων ριζών	14
1.3.1 Ενδογενείς πηγές	15
1.3.2 Εξωγενείς παράγοντες.....	18
1.4 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών.....	18
1.4.1 Θετικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών	19
1.4.2 Αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών.....	20
1.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	24
1.5.1 Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί.....	26
1.5.2 Μη Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί.....	29
1.6 Οξειδωτικό στρες	32
1.7 Φυτοφάρμακα – Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα.....	37
1.7.1 Ιστορική αναδρομή της χρήσης φυτοφαρμάκων	38
1.7.2 Κατηγοριοποίηση φυτοφαρμάκων	39
1.7.3 Επιδράσεις των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον και στους οργανισμούς	43
1.7.4 Νομοθετικό πλαίσιο για τη χρήση των φυτοφαρμάκων.....	45
1.7.5 Ζιζανιοκτόνα	46
1.7.6 Διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας από τα ζιζανιοκτόνα	52
1.7.7 Περιγεννητική έκθεση σε ζιζανιοκτόνα.....	53
ΣΚΟΠΟΣ	55
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	56
3.1 Εργαστηριακά ζώα.....	56
3.2 Δοσολογία και τρόπος χρήσης ζιζανιοκτόνων	56

3.3 Πειραματικός σχεδιασμός.....	57
3.4 Συλλογή και προετοιμασία ιστού	58
3.5 Εκτίμηση δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης	59
3.5.1 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης ιστού	59
3.5.2 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)	60
3.5.3 Προσδιορισμός των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH).....	61
3.5.6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS)	64
3.5.7 Στατιστική ανάλυση.....	66
4.2 Επιδράσεις της γλυφωσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στον εγκέφαλο θηλυκών επίμυων	68
5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	70
6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	79

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διαρκής και πολυπαραγοντική ανθρώπινη έκθεση σε φυτοφάρμακα, ακόμη και σε χαμηλές δόσεις καθιστά αναγκαία τη διερεύνηση των μακροπρόθεσμων επιπτώσεών τους στη φυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού, ιδίως κατά την περιγεννητική περίοδο έκθεσης. Η παρούσα μελέτη εξέτασε τις επιδράσεις της περιγεννητικής έκθεσης σε χαμηλές δόσεις γλυφοσάτης και μίγματος της με 2,4-D και dicamba σε επίμυες Wistar, αξιολογώντας την οξειδοαναγωγική κατάσταση του εγκεφάλου. Προς αυτή την κατεύθυνση, 80 απόγονοι (40 αρσενικοί και 40 θηλυκοί) κατανεμήθηκαν σε 4 πειραματικές ομάδες και εκτέθηκαν μέσω του πόσιμου νερού σε γλυφοσάτη στο επίπεδο της ημερήσιας αποδεκτής πρόσληψης (ADI) και το επίπεδο μη παρατηρούμενων δυσμενών επιδράσεων (NOAEL), καθώς και στο μίγμα της με 2,4-D και dicamba, στις αντίστοιχες δόσεις ADI, από την 6η ημέρα κύησης έως την πρώιμη ενήλικη ζωή. Για την εκτίμηση του οξειδοαναγωγικού προφίλ, προσδιορίστηκαν με φασματοφωτομετρία βασικοί δείκτες όπως η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ο ρυθμός αποδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) και η παρουσία οξειδωτικής βλάβης στα λιπίδια μέσω της ποσοτικοποίησης των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και στις πρωτεΐνες μέσω των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στους αρσενικούς απογόνους παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων TBARS και CARBS έπειτα από έκθεση σε γλυφοσάτη σε δόση NOAEL και το μίγμα της, υποδεικνύοντας λιπιδική και πρωτεϊνική οξείδωση. Αντιθέτως, στους θηλυκούς απογόνους καταγράφηκε ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής άμυνας, όπως προέκυψε από την αύξηση των επιπέδων GSH στις συγκεκριμένες ομάδες έκθεσης, ενώ αυξημένα επίπεδα TBARS παρατηρήθηκαν μόνο στην ομάδα μίγματος ADI, υποδεικνύοντας ηπιότερη οξειδωτική επιβάρυνση. Η καταγραφή αυτών των μεταβολών υποδηλώνει ότι η περιγεννητική έκθεση σε χαμηλές δόσεις γλυφοσάτης και μίγματος της μπορεί να διαταράσσει την οξειδοαναγωγική ισορροπία του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου, ιδιαίτερα στην περίπτωση των αρσενικών. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αναδεικνύουν την ανάγκη για μακροχρόνια παρακολούθηση και αξιολόγηση της συνδυαστικής δράσης των ζιζανιοκτόνων, ιδίως κατά την κρίσιμη περίοδο της ανάπτυξης, ώστε να διαμορφωθεί ένα ακριβέστερο τοξικολογικό προφίλ και να ενισχυθεί η ασφάλεια της δημόσιας υγείας.

ABSTRACT

The continuous and multifactorial human exposure to pesticides, even at low doses, highlights the need to investigate their long-term effects on human physiology, especially during the perinatal period. The present study examined the effects of perinatal exposure to low doses of glyphosate and its mixture with 2,4-D and dicamba in Wistar rats, evaluating the redox state of the brain. Towards this end, 80 offspring (40 males and 40 females) were divided into 4 experimental groups and exposed via drinking water to glyphosate at the acceptable daily intake (ADI) and no observed adverse effect level (NOAEL), and its mixture with 2,4-D and dicamba, at respective ADI doses, from day 6 of gestation to early adulthood. To assess the redox profile, key redox biomarkers were determined spectrophotometrically, such as reduced glutathione (GSH), the decomposition rate of hydrogen peroxide (H_2O_2), total antioxidant capacity (TAC) and the presence of lipid and protein oxidative damage through the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyls (CARBS). According to the results, male offspring presented a significant increase in TBARS and CARBS levels after exposure to glyphosate at NOAEL dose and its mixture, indicating oxidative damage to lipids and proteins. In contrast, female offspring enhanced their antioxidant defense, as evidenced by the increased GSH levels in the same experimental groups, while lipid peroxidation was detected only in the ADI mixture group, suggesting greater resistance to oxidative stress. The observed alterations suggest that perinatal exposure to low doses of glyphosate and its mixture can disrupt the redox balance of the developing brain, especially in male offspring. This study highlights the need for long-term monitoring and evaluation of the combined action of herbicides, particularly during the critical period of development, in order to establish a more accurate toxicological profile and enhance public health safety.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε άτομο, μόριο ή ιόν με τουλάχιστον ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στοιβάδα, γεγονός που το καθιστά ιδιαίτερα ασταθές και ως εκ τούτου άκρως δραστικό (Halliwell B., 2007). Οι ελεύθερες ρίζες έχουν σύντομο χρόνο ημιζώης και προκύπτουν είτε ως παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού είτε ως αποτέλεσμα της επίδρασης εξωγενών παραγόντων. Ωστόσο, παρά τη βραχύβια φύση τους, μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τη φυσιολογία και παθοφυσιολογία της κυτταρικής λειτουργίας (Seis H. et al., 2017). Η χημική τους αστάθεια ωθεί τις ελεύθερες ρίζες να αποσπούν ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια, προκειμένου να μεταβούν σε πιο σταθερή ενεργειακή κατάσταση. Με αυτό τον τρόπο, τα μόρια-στόχοι μετατρέπονται με τη σειρά τους σε νέες ελεύθερες ρίζες (Santo et al., 2016 ; Phaniedra et al., 2015). Έτσι, προκαλείται ένα αυτοτροφοδοτούμενο μονοπάτι αλυσιδωτών αντιδράσεων, το οποίο επάγει βλάβες σε κρίσιμα κυτταρικά συστατικά και οδηγεί στην αποδιοργάνωση της κυτταρικής ακεραιότητας και τελικά σε καταστροφή.

Ωστόσο, παρά τη σημαντική πρόοδο στην κατανόηση της δράσης των ελευθέρων ριζών, πολλές πτυχές της βιολογίας παραμένουν άγνωστες, καθιστώντας τις αντικείμενο έρευνας στις βιοεπιστήμες (Bozidarka I. et al., 2023). Ο βασικός λόγος για αυτό είναι η πολυπλοκότητα των μηχανισμών παραγωγής, εξουδετέρωσης και δράσης των ελευθέρων ριζών μέσα στον οργανισμό. Οι ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) παράγονται συνεχώς ως παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού, ιδίως στα μιτοχόνδρια, και εμπλέκονται σε φυσιολογικές διεργασίες όπως η σηματοδότηση και η απόπτωση, καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις όταν υπερπαράγονται (Sies et al., 2017). Η διττή φύση των ROS, ως μόρια που μπορούν να είναι ωφέλιμα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά κυτταροτοξικά όταν συσσωρεύονται, δυσχεραίνει τη σαφή κατανόηση του ρόλου τους.

Επιπλέον, το οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο κάθε κυττάρου είναι εξαιρετικά δυναμικό και εξαρτάται από πολλαπλούς παράγοντες, όπως ο κυτταρικός τύπος, η αναπτυξιακή φάση, η διατροφή, η ηλικία και η έκθεση σε εξωτερικούς παράγοντες (π.χ. ρύποι, φάρμακα). Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί (ενζυμικοί και μη ενζυμικοί) επίσης διαφέρουν σημαντικά μεταξύ ιστών και ειδών, δημιουργώντας μια ιδιαίτερα ετερογενή και πολυπαραγοντική εικόνα (Sies et al., 2017; Bozidarka et al., 2023).

Παράλληλα, η τεχνολογική δυσκολία στον ακριβή προσδιορισμό των ελεύθερων ριζών *in vivo* –λόγω της αστάθειας και του πολύ μικρού χρόνου ημιζωής τους– περιορίζει την κατανόηση των άμεσων βιολογικών τους επιδράσεων (Sies et al., 2017). Έτσι, η μελέτη των ROS συνεχίζει να απαιτεί την ανάπτυξη ευαίσθητων και εξειδικευμένων μεθόδων, όπως είναι η φασματοσκοπία ESR και οι μοριακοί ανιχνευτές.

1.2 Δραστικές Μορφές

Οι δραστικές μορφές χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με το κεντρικό τους άτομο (Agarwal et al., 2006; Perrone et al., 2010):

- Δραστικές Μορφές Οξυγόνου - Reactive Oxygen Species (ROS), με κεντρικό άτομο το οξυγόνο
- Δραστικές Μορφές Αζώτου - Reactive Nitrogen Species (RNS), με κεντρικό άτομο το άζωτο
- Δραστικές Μορφές Θείου - Reactive Sulfur Species (RSS), με κεντρικό άτομο το θείο
- Δραστικές Μορφές Χλωρίου - Reactive Chlorine Species (RCS), με κεντρικό άτομο το χλώριο

Στις δραστικές μορφές περιλαμβάνονται και μη ριζικά μόρια, τα οποία ενώ δεν περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια, μπορεί να είναι εξίσου δραστικά ή και περισσότερο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το όζον (O_3) και το μονήρες οξυγόνο (O_2) (Jiangfang Yu et al., 2022).

1.2.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) είναι οι πιο κοινές ελεύθερες ρίζες στα βιολογικά συστήματα και παράγονται κατά κύριο λόγο κατά την αερόβια αναπνοή που αξιοποιεί το οξυγόνο (Buonocore et al., 2010). Οι ROS περιλαμβάνουν μερικώς αναγωγικά προϊόντα του μοριακού οξυγόνου, όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), το μονήρες οξυγόνο

($^1\text{O}_2$) και η ρίζα υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$), καθώς και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το όζον (O_3) και το μονήρες οξυγόνο (O_2), που είναι μη ριζικά παράγωγα (Bedard and Krause, 2007). Το $\text{O}_2^{\bullet-}$ είναι η πιο κοινή ROS που παράγεται ως παραπροϊόν της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Bolisetty and Jaimes, 2013), ενώ το H_2O_2 είναι ένα ουδέτερο μόριο που διαπερνά εύκολα την πλασματική μεμβράνη και χρησιμεύει ως πρόδρομο μόριο για σχηματισμό πιο δραστικών χημικών προϊόντων σε συνθήκες κανονικού pH και θερμοκρασίας (Halliwell, 2006).

1.2.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου

Οι δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) αποτελούν μια κατηγορία εξαιρετικά δραστικών μορίων που περιλαμβάνουν ουσίες όπως το μονοξειδίο του αζώτου (NO), το υπεροξυνιτρώδες ανιόν (ONOO^-), το διοξειδίο του αζώτου (NO_2), καθώς και ανόργανα ανιόντα όπως το νιτρώδες (NO_2^-) και το νιτρικό (NO_3^-) ιόν. Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι RNS δρουν ως σηματοδοτικά μόρια, συμμετέχοντας σε κρίσιμες βιολογικές λειτουργίες όπως η αγγειοδιαστολή, η ρύθμιση της νευροδιαβίβασης και η φλεγμονώδης απόκριση (Griffo et al., 2024). Ωστόσο, όταν παράγονται σε πλεόνασμα, μπορούν να προκαλέσουν νιτροζωτικό στρες, προκαλώντας αλλοιώσεις στις πρωτεΐνες, τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και το γενετικό υλικό, έχοντας ως αποτέλεσμα την παθογένεση διαφόρων ασθενειών, όπως νευροεκφυλιστικές νόσοι, καρδιαγγειακές παθήσεις και καρκίνος (Shen et al., 2019).

Οι RNS παράγονται μέσω ποικίλων ενζυμικών και μη ενζυμικών μηχανισμών, τόσο σε ζωικούς όσο και σε φυτικούς οργανισμούς. Το σημαντικότερο πρόδρομο μόριο των RNS είναι το μονοξειδίο του αζώτου (NO), το οποίο συντίθεται ενδογενώς από το αμινοξύ L-αργινίνη, μέσω της δράσης των ενζύμων συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (Nitric Oxide Synthases – NOS). Υπάρχουν τρεις κύριες ισομορφές αυτών των ενζύμων: η ενδοθηλιακή (eNOS), η νευρωνική (nNOS) και η επαγωγίμη (iNOS), η οποία ενεργοποιείται κυρίως σε μακροφάγα υπό την επίδραση φλεγμονωδών παραγόντων, όπως η ιντερφερόνη- γ και τα λιποπολυσακχαρίδια (Lind et al., 2017; Hosseini et al., 2022).

Το παραγόμενο NO συμμετέχει σε διάφορες αντιδράσεις, με πιο χαρακτηριστική την αλληλεπίδρασή του με το υπεροξειδικό ανιόν ($\text{O}_2^{\bullet-}$), οδηγώντας

στο σχηματισμό υπεροξυνιτρώδους (ONOO^-), ενός εξαιρετικά δραστικού και επιβλαβούς μορίου. Το υπεροξειδικό ανιόν παράγεται κυρίως από το ένζυμο NADPH οξειδάση κατά την οξειδωτική έκρηξη σε φαγοκύτταρα. Η αντίδραση μεταξύ NO και $\text{O}_2^\bullet$ είναι εξαιρετικά ταχεία και καταλήγει στο σχηματισμό ONOO^- , το οποίο μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένη οξειδωτική και νιτροζωτική βλάβη σε κυτταρικά συστατικά, όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA (Radi, 2018).

Πέρα από αυτήν την κύρια οδό, οι RNS μπορούν να σχηματιστούν και μέσω άλλων βιοχημικών διεργασιών. Το NO είναι δυνατόν να υποστεί αυτοοξειδωση, οδηγώντας στο σχηματισμό διοξειδίου του αζώτου (NO_2) και τριοξειδίου του διαζώτου (N_2O_3), τα οποία είναι επίσης δραστικά μόρια και συμμετέχουν σε νιτροποιητικές και νιτροζυλιωτικές αντιδράσεις (Pacher et al., 2007). Επιπλέον, σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, ένζυμα όπως η μυελοϋπεροξειδάση (MPO) μπορούν να οξειδώσουν το νιτρώδες ανιόν (NO_2^-), παράγοντας NO_2 και ενισχύοντας τη συγκέντρωση RNS σε παθολογικές καταστάσεις (Radi, 2018).

1.2.3 Δραστικές Μορφές Θείου

Οι δραστικές μορφές θείου (Reactive Sulfur Species, RSS) είναι ιδιαίτερα ασταθείς, καθώς τα άτομα θείου δίνουν και αποσπούν ηλεκτρόνια (Lau and Pluth, 2019). Τα πιο κοινά δραστικά είδη θείου είναι το υδρόθειο (H_2S), οι πρωτεινικέςθειόλες, οιθειόλες μικρού μοριακού βάρους κ.α. Το H_2S ασκεί αντιοξειδωτικές δράσεις μέσω της δέσμευσης ROS, προστατεύοντας τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω τηςθειωδρίωσης πρωτεϊνών-στόχων, μιας τροποποίησης που ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα των πρωτεϊνών αυτών (Zhang and Bian, 2014). Δρα κυρίως στο αγγειακό σύστημα, όπου ρυθμίζει τον αγγειακό τόνο και προάγει την αγγειογένεση, συμβάλλοντας στην αποκατάσταση ιστών. Επιπλέον, προστατεύει τον εγκέφαλο και το νευρικό σύστημα από οξειδωτική βλάβη, ενώ μειώνει τη φλεγμονή και την απόπτωση σε παθολογικές καταστάσεις (Kimura, 2015). Η παραγωγή H_2S λαμβάνει χώρα μέσω ενζύμων, που βρίσκονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα (Shibuya et al., 2013). Στα μιτοχόνδρια, το H_2S διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και την προστασία από την οξειδωτική βλάβη.

Η παραγωγή των δραστικών μορφών θείου πραγματοποιείται μέσω ενζυμικών και μη ενζυμικών μηχανισμών. Το H_2S παράγεται ενδογενώς μέσω του καταβολισμού της L-κυστεΐνης, καθώς και από τα ένζυμα κυστεαθειονίνη-β-συνθάση (CBS), κυστεαθειονίνη-γ-λυάση (CSE) και 3-μερκαπτοπυροσταφυλική θειοτρανσφεράση (3-MST), τα οποία απαντώνται σε διάφορους ιστούς των θηλαστικών (Kimura, 2020; Olson, 2021). Στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό, το H_2S υφίσταται οξείδωση από ένζυμα όπως η σουλφιδική κινάση (SQR), οδηγώντας στο σχηματισμό θειοθειικού ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) και θειικού (SO_4^{2-}), με τη διαδικασία αυτή να συμμετέχει επίσης στη ρύθμιση του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού ισοζυγίου (Paul & Snyder, 2015). Κατά την οξείδωση του H_2S , παράγονται ενδιάμεσα προϊόντα, όπως το γλουταθειονικό περσουλφίδιο (RSSH), που θεωρούνται δραστικά είδη θείου και δρουν ως σηματοδοτικά μόρια (Greiner et al., 2013). Τα περσουλφίδια (RSSH) και τα πολυσουλφίδια (RS_nH , $n \geq 2$) σχηματίζονται τόσο ενζυμικά όσο και μη ενζυμικά. Έχει αποδειχθεί ότι η συνθετάση του κυστεΐνυλο-tRNA (CARS) μπορεί να καταλύσει τη μετατροπή της L-κυστεΐνης σε περσουλφίδια, μέσω μιας διαδικασίας που έχει αναγνωριστεί ως βασική για την παραγωγή των RSS στα θηλαστικά (Akaike et al., 2017). Παράλληλα, μη ενζυμικοί μηχανισμοί παραγωγής RSS περιλαμβάνουν αντιδράσεις μεταξύ H_2S και ROS, οδηγώντας στο σχηματισμό οξειδωμένων μορφών όπως θειώδη, σουλφινικά και σουλφονικά οξέα (Ida et al., 2014). Αυτές οι αντιδράσεις είναι ιδιαίτερα έντονες σε περιβάλλοντα φλεγμονής ή οξειδωτικού στρες.

1.2.4 Δραστικές Μορφές Χλωρίου

Οι δραστικές μορφές χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RCS) περιλαμβάνουν ενώσεις όπως το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), το διοξείδιο του χλωρίου (ClO_2), το ατομικό χλώριο ($\text{Cl}\cdot$) και η ρίζα διχλωρίου ($\text{Cl}_2\cdot^-$). Το HOCl είναι ένα ιδιαίτερα ισχυρό οξειδωτικό, ικανό να προσβάλλει πληθώρα κυτταρικών μακρομορίων.

Στην ατμόσφαιρα, οι RCS σχηματίζονται κυρίως μέσω φωτοχημικών αντιδράσεων. Η φωτοδιάσπαση ενώσεων όπως το Cl_2 , το HOCl και το ClNO_2 οδηγεί στην παραγωγή ριζών $\text{Cl}\cdot$, οι οποίες συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξείδωσης οργανικών ενώσεων και συμβάλλουν στην αποδόμηση του όζοντος της τροπόσφαιρας. Θαλάσσια

αερολύματα, πλούσια σε ιόντα χλωρίου, αποτελούν σημαντική πηγή απελευθέρωσης αυτών των ενώσεων μέσω φωτοχημικών διεργασιών (Wang et al., 2023).

Σε βιολογικά συστήματα, οι RCS παράγονται ως μέρος της ανοσολογικής απόκρισης. Τα ουδετερόφιλα κύτταρα παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο, παρουσία ιόντων χλωρίου και του ενζύμου μυελοϋπεροξειδάση (MPO), μετατρέπεται σε υποχλωριώδες οξύ (HOCl). Το HOCl είναι ισχυρό οξειδωτικό και συμμετέχει στην εξουδετέρωση παθογόνων μικροοργανισμών (Winterbourn et al., 2016).

Οι ανθρώπινες δραστηριότητες συμβάλλουν σημαντικά στην παραγωγή RCS. Η χλωρίωση του νερού για απολύμανση, η χρήση χλωριωμένων ενώσεων σε βιομηχανικές διεργασίες και η καύση οργανικών υλικών με περιεκτικότητα σε χλώριο οδηγούν στην απελευθέρωση δραστικών μορφών χλωρίου στο περιβάλλον (Gonzalez et al., 2020).

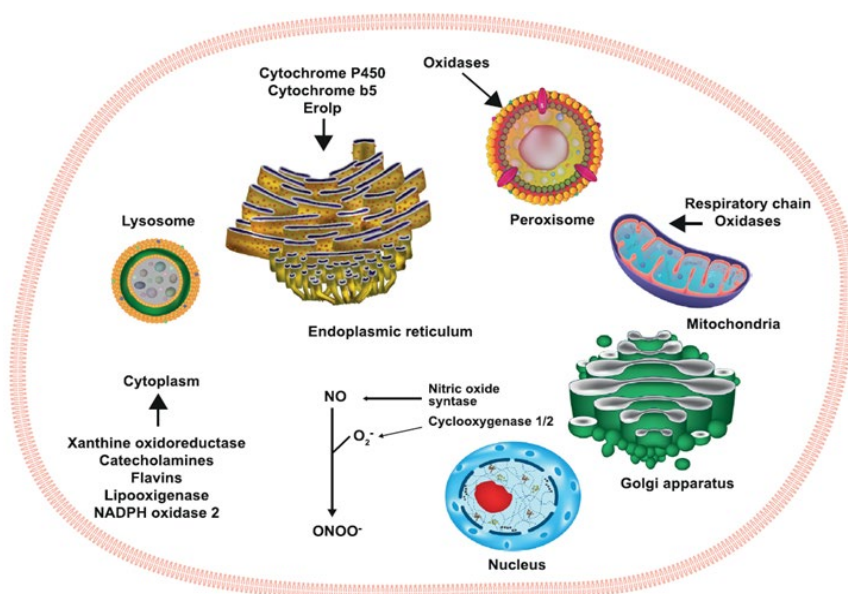
Όσον αφορά τις τεχνολογικές εφαρμογές, οι RCS παράγονται μέσω ηλεκτροχημικών διεργασιών, όπως η ηλεκτρολυτική οξείδωση διαλυμάτων χλωριούχου νατρίου, και μέσω φωτοκαταλυτικών αντιδράσεων υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Οι διεργασίες αυτές χρησιμοποιούνται για την αποδόμηση οργανικών ρύπων σε λύματα και την απολύμανση νερού (Zhou et al., 2024).

1.3 Παραγωγή ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν τόσο ενδογενώς όσο και με την επίδραση εξωγενών παραγόντων. Οι ενδογενείς πηγές περιλαμβάνουν διάφορα κυτταρικά οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξειδιοσώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι ενζυμικές αντιδράσεις, ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων και η φαγοκυττάρωση (Halliwell B. et al., 2015). Ακόμη, εξωγενείς παράγοντες δύνανται να συμβάλλουν στην παραγωγή ελεύθερων ριζών όπως η έκθεση σε διάφορους τύπους ακτινοβολίας (π.χ. ακτίνες X, γ-ακτινοβολία, UV-A), η παρουσία βαρέων ή μεταβατικών μετάλλων (π.χ. κάδμιο, υδράργυρος, μόλυβδος, αρσενικό, σίδηρος και χαλκός), η έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους, όπως αρωματικοί υδρογονάνθρακες, φυτοφάρμακα, πολυχλωριωμένα διφαινύλια και διοξίνες (Pham-Huy et al, 2008). Επιπλέον, μικροβιακές λοιμώξεις,

καθώς και φαρμακευτικές ουσίες έχουν συνδεθεί με την ενίσχυση της παραγωγής ελευθέρων ριζών (Santo et.al.,2015).

1.3.1 Ενδογενείς πηγές



Εικόνα 1 : Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) παράγονται από διάφορα οργάνδια μέσα στο κύτταρο, όπως τα υπεροξειδισώματα, τα μιτοχόνδρια, τα λυσοσώματα, τον πυρήνα και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Επιπλέον, ένζυμα που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα αποτελούν επίσης πηγή παραγωγής ROS (Bozidarka L. et al.,2023).

Παραγωγή ROS κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση και οι μηχανισμοί ρύθμισης

Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS), διάφορα μιτοχονδριακά ένζυμα εμπλέκονται σε αντιδράσεις που παράγουν δραστικά είδη οξυγόνου (ROS). Η αναπνευστική αλυσίδα (ETC) αποτελεί την κύρια πηγή παραγωγής ROS στα θηλαστικά (Bindoli et al., 2008), καθώς βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και συμμετέχει στη μετατροπή της ενέργειας που προκύπτει από τον καταβολισμό πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων μέσω διαδοχικών αντιδράσεων οξειδοαναγωγής (Poyton et al., 2009; Murphy, 2009). Κατά τη λειτουργία της ETC, η οξείδωση της γλυκόζης παράγει περίπου 32 μόρια ATP, ενώ το O₂ μετατρέπεται σε νερό

(Physiology and Triphosphate, 2021). Η δημιουργία ηλεκτροχημικής διαβάθμισης πρωτονίων επιτρέπει τη σύνθεση ATP μέσω της δράσης των πρωτεϊνικών συμπλοκών της ETC, τα οποία σχηματίζουν υπερσύμπλοκο με την ATP συνθάση (Iwata et al., 1998).

Το σύμπλοκο I (NADH-ουβικινόνη οξειδοοδουκτάση) είναι η μεγαλύτερη πολυπρωτεϊνική μονάδα της ETC και βασική πηγή υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) στα μιτοχόνδρια (Lenaz, 2001; Finkel and Holbrook, 2000). Περιλαμβάνει NADH δεϋδρογενάση, φλαβομονονουκλεοτίδιο (FMN) και συστάδες σιδήρου-θείου, μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NADH στην ουβικινόνη (UQ) και σχηματίζοντας ουβικινόλη (QH_2) (Hunte et al., 2010). Η παραγωγή ROS στο σύμπλοκο I συνδέεται με το μηχανισμό της αντίστροφης μεταφοράς ηλεκτρονίων (RET), κατά τον οποίο η υπερμείωση της UQ οδηγεί σε επιστροφή ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο I, ενισχύοντας την παραγωγή $O_2^{\bullet-}$ (Schönfeld et al., 2010; Chouchani et al., 2014). Το σύμπλοκο II (ηλεκτρική αφυδρογονάση) συνεισφέρει έμμεσα στην παραγωγή ROS, καθώς παρέχει ηλεκτρόνια στην UQ από τη μετατροπή του ηλεκτρικού οξέος σε φουμαρικό. Υπό υψηλές συγκεντρώσεις ηλεκτρικού οξέος, παρατηρείται ενίσχυση του RET και αυξημένη παραγωγή ROS στο σύμπλοκο I (Hadrava Vanova et al., 2020). Επιπλέον, το σύμπλοκο II διαθέτει δύο περιοχές παραγωγής υπεροξειδίου (IIF και IIQ), με την κύρια παραγωγή να συμβαίνει στο IIF (Quinlan et al., 2012; Paranagama et al., 2010). Το σύμπλοκο III (κυτοχρωμική αναγωγή CoQ) μεταφέρει ηλεκτρόνια από την ουβικινόλη στο κυτόχρωμα c και λειτουργεί επίσης ως θέση παραγωγής ROS, απελευθερώνοντας $O_2^{\bullet-}$ στη μιτοχονδριακή μήτρα και το διαμεμβρανικό χώρο (Tirichen et al., 2021; Turrens, 2003). Το σύμπλοκο IV (κυτοχρωμική οξειδάση c) είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c στο O_2 , το οποίο μετατρέπεται σε νερό, ενώ συμβάλλει στη δημιουργία διαβάθμισης πρωτονίων (Zhao et al., 2019). Το σύμπλοκο V (ATP συνθάση) χρησιμοποιεί τη ροή πρωτονίων για τη φωσφορυλίωση ADP σε ATP (Jonckheere et al., 2012).

Ωστόσο, ένα ποσοστό 0.2-2% των ηλεκτρονίων της ETC διαφεύγει, σχηματίζοντας $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 και OH^- (Cadenas and Davies, 2000). Τέλος, τα μιτοχόνδρια διαθέτουν αντιοξειδωτικά συστήματα που ελέγχουν τη συγκέντρωση των ROS. Η υπεροξειδική δισμουτάση μετατρέπει το $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 , το οποίο αποδομείται περαιτέρω από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Zhao et al., 2019; Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001; Eren and Selami, 2020).

Παραγωγή ελευθέρων ριζών από κυτταρικά οργανίδια

Τα λυσοσώματα είναι κυτταρικά οργανίδια που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διάσπαση οργανικών ενώσεων (Bainton, 1981). Εκτός από τη συμμετοχή τους στο μεταβολισμό, είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση μεμβρανών, καθώς και τη διακυτταρική επικοινωνία (Perera & Zoncu, 2016). Επιπλέον, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε χαμηλού μοριακού βάρους σίδηρο, τα λυσοσώματα είναι ευάλωτα σε οξειδωτική βλάβη, που δύνανται να προκύψει μέσω της αντίδρασης Fenton. Η αντίδραση Fenton πραγματοποιείται μεταξύ του H_2O_2 και του σιδήρου, οδηγώντας στην παραγωγή δραστικών ριζών υδροξυλίου (Di Meo et al., 2016; Kurz et al., 2008).

Τα υπεροξειδιοσώματα είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια, τα οποία διαδραματίζουν βασικό ρόλο σε σημαντικές μεταβολικές διεργασίες, όπως η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και η αποτοξίνωση διαφόρων ενώσεων. Αποτελούν μία από τις κυριότερες ενδοκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS, όπως $O_2^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$, και H_2O_2 (Garikapati & Colasante, 2022). Περιέχουν μεταλλοένζυμα που φέρουν χαλκό και σίδηρο, τα οποία μπορούν να συμμετέχουν στην αντίδραση Fenton, η οποία οδηγεί στην παραγωγή οξειδωτικών μορίων και τελικά σε κυτταρική βλάβη (Bacon & Britton, 1989). Ωστόσο, τα υπεροξειδιοσώματα διαθέτουν και ενδογενείς μηχανισμούς προστασίας από την οξειδωτική βλάβη, κυρίως μέσω ενζύμων όπως η καταλάση και πρωτεΐνες με αντιοξειδωτική δράση που προσφέρουν προστασία από την οξειδωτική βλάβη (Lismont et al., 2015).

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) είναι ένα βασικό οργανίδιο στην πρωτεϊνική σύνθεση και αναδίπλωση. Η διαδικασία σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών από το ένζυμο ισομεράση δισουλφιδίων (PDI) παράγει H_2O_2 , το οποίο υπό συνθήκες κυτταρικού στρες μπορεί να συσσωρευτεί και να προκαλέσει οξειδωτική καταπόνηση (Scriven et al., 2007; Haynes et al., 2004). Το ένζυμο ERO1 συμβάλλει επίσης στην παραγωγή H_2O_2 μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων (Pollard et al., 1998). Οξειδάσες όπως η Nox4 προάγουν την παραγωγή $O_2^{\bullet-}$ στο ER, ενώ το σύστημα μικροσωματικής μονοξυγονάσης (MMO) ενισχύει περαιτέρω την παραγωγή ROS (Bedard et al., 2007; Davydov, 2011).

Ο πυρήνας έχει υψηλότερα επίπεδα ROS σε σύγκριση με το κυτταρόπλασμα, αν και η προέλευσή τους δεν είναι πλήρως κατανοητή (Provost et al., 2010). Η κυκλοοξυγενάση (COX-1) παράγει $O_2^{\bullet-}$ στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα, ενώ η COX-2 συμβάλλει στην παραγωγή ROS μέσα στον πυρηνική μήτρα (Parfenova et al.,

2001). Τα ROS που παράγονται στον πυρήνα μπορούν να λειτουργήσουν ως αισθητήρες κυτταρικού στρες και να επηρεάσουν την απόκριση του κυττάρου σε φλεγμονή και απόπτωση (Chittiboyina et al., 2018).

1.3.2 Εξωγενείς παράγοντες

Air & water pollution	Ultraviolet light
Alcohol	Cooking (smoked meat, used oil, fat)
Tobacco smoke	Drugs such as
Transition metals- Cd, Hg, Pb, As	Halothene, Paracetamol,
Heavy metals- Fe, Cu, Co, Cr	Bleomycine, Doxorubicin,
Industrial solvents	Metrenidazole, Ethanol.
Pesticides	CCl ₄
High temperature	

Εικόνα 2 : Εξωγενείς παράγοντες παραγωγής ελεύθερων ριζών (Phaniendra, A. et. al., 2015).

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών δεν περιορίζεται μόνο σε ενδογενείς μηχανισμούς, αλλά ενισχύεται σημαντικά και από πλήθος εξωγενών παραγόντων, που σχετίζονται με το σύγχρονο τρόπο ζωής και τη ρύπανση του περιβάλλοντος (Valko et al., 2007). Η έκθεση σε υπεριώδη (UV) και ιονίζουσα ακτινοβολία αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους επαγωγείς της παραγωγής ROS, προκαλώντας οξειδωτικές βλάβες σε λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA, με πιθανές επιπτώσεις την καρκινογένεση και τη φωτογήρανση (Cadet et al., 2015; Sies et al., 2022).

Επιπλέον, ατμοσφαιρικοί ρύποι που προέρχονται από την καύση ορυκτών καυσίμων, τις βιομηχανικές εκπομπές, τα σωματίδια PM_{2.5} και τον καπνό τσιγάρου αποτελούν σημαντικούς επαγωγείς παραγωγής ROS, είτε άμεσα είτε μέσω της ενεργοποίησης ενδοκυτταρικών μηχανισμών (Valavanidis et al., 2013). Οι ρύποι αυτοί έχουν συνδεθεί με φλεγμονώδεις αποκρίσεις και αυξημένο κίνδυνο καρδιοαναπνευστικών νοσημάτων (Brook et al., 2010; Kelly & Fussell, 2012). Επιπρόσθετα, ορισμένα χημικά πρόσθετα τροφίμων, φυτοφάρμακα, διαλύτες, βαρέα μέταλλα όπως μόλυβδος και υδράργυρος, καθώς και η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ και η κακή διατροφή συντελούν στη δημιουργία οξειδωτικού φορτίου μέσω διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών (Reuter et al., 2010; Lobo et al., 2010).

1.4 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παρουσιάζουν διττό ρόλο στα βιολογικά συστήματα, με τις επιδράσεις τους να εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωσή τους. Σε χαμηλά και φυσιολογικά επίπεδα, οι ROS και RNS συμμετέχουν σε θεμελιώδεις κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική σηματοδότηση (Carroll and Conte, 2013; Winterbourn, 2015), η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση και η άμυνα έναντι παθογόνων, λειτουργώντας ως σηματοδοτικά μόρια (Ghosh et al., 2023).

Ωστόσο, όταν η παραγωγή τους υπερβαίνει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών να τις εξουδετερώσουν, προκαλείται οξειδωτικό στρες, το οποίο σχετίζεται με βλάβες σε λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA. Αυτές οι βλάβες μπορούν να οδηγήσουν σε δυσλειτουργία των κυττάρων, φλεγμονή και ανάπτυξη χρόνιων νοσημάτων, όπως νευροεκφυλιστικές διαταραχές, καρδιαγγειακές παθήσεις και καρκίνο (Yang et al., 2024). Επομένως, η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής και της απομάκρυνσης των ROS και RNS αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την κυτταρική ομοιόσταση και την προστασία του οργανισμού από παθολογικές καταστάσεις. Αυτή η ισορροπία επιτυγχάνεται μέσω πολύπλοκων μηχανισμών κυτταρικής προσαρμογής και αντιοξειδωτικής ρύθμισης, που βρίσκονται στο επίκεντρο σύγχρονων θεραπευτικών προσεγγίσεων (Oliveira et al., 2024).

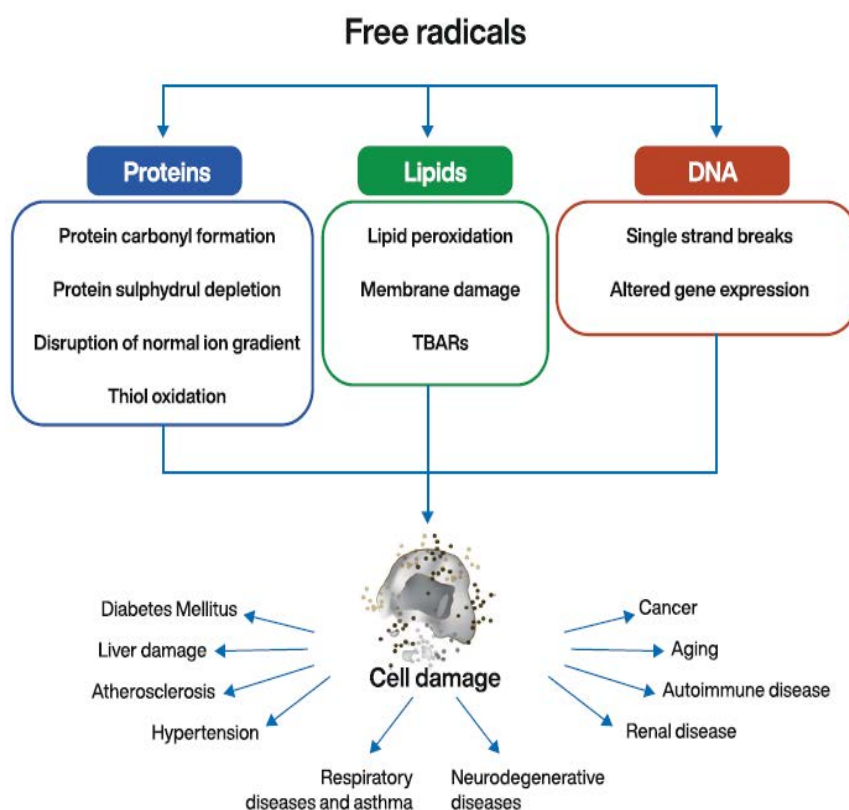
1.4.1 Θετικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

Σε χαμηλές έως μέτριες συγκεντρώσεις, οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται σε κυτταρικές διεργασίες και προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση, τη γονιδιακή έκφραση, καθώς και την ενδοκυτταρική επικοινωνία. Συγκεκριμένα, μέσω της ελεγχόμενης δράσης τους, επηρεάζουν μονοπάτια όπως MAPK, NF-κB και PI3K/Akt, συμβάλλοντας στην κυτταρική προσαρμογή και επιβίωση. Ιδιαίτερα στον τομέα της άσκησης, έχει τεκμηριωθεί ότι η παροδική αύξηση της παραγωγής ROS οδηγεί σε ευεργετικές προσαρμογές, όπως μιτοχονδριακή βιογένεση, ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας μέσω ενεργοποίησης του Nrf2, καθώς και βελτιωμένη μυϊκή λειτουργία (Margaritelis et al., 2023; Zhao et al., 2024). Επιπλέον, οι ROS ενισχύουν την αγγειογένεση μέσω ενεργοποίησης του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), προάγοντας την αποκατάσταση ιστών μετά από τραυματισμό ή ισχαιμία (Lee et al., 2023).

Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, οι ROS και RNS συμβάλλουν επίσης στη ρύθμιση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη και της μεταβολικής ομοιόστασης, μέσω σηματοδοτικών αλληλεπιδράσεων που ενισχύουν τη δράση της στο σκελετικό μυ (Chen et al., 2024). Επιπρόσθετα, συμμετέχουν σε μηχανισμούς κυτταρικής ανανέωσης όπως η αυτοφαγία, η οποία αποτελεί κρίσιμο μηχανισμό για την απομάκρυνση κατεστραμμένων κυτταρικών συστατικών και τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας (Kourtidis et al., 2023).

Ιδιαίτερα, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) λειτουργεί ως σημαντικός διακυτταρικός αγγειοφόρος, εμπλεκόμενος στη ρύθμιση της αγγειοδιαστολής, της θρομβογένεσης και της νευροδιαβίβασης (Förstermann & Sessa, 2012; Garthwaite, 2021). Το NO, παράγεται κυρίως από το ενδοθήλιο μέσω της ενδοθηλιακής συνθάσης του NO (eNOS), ρυθμίζοντας τον αγγειακό τόνο και την αιματική ροή, ενώ στον εγκέφαλο συμμετέχει στη συναπτική πλαστικότητα και στην επεξεργασία της μνήμης (Steinert et al., 2020). Στο πλαίσιο της φυσικής ανοσολογικής απόκρισης, οι ROS παράγονται μαζικά κατά την «αναπνευστική έκρηξη» από τα φαγοκύτταρα, κυρίως ουδετερόφιλα και μακροφάγα, με σκοπό την εξουδετέρωση παθογόνων παραγόντων μέσω οξειδωτικών μηχανισμών (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013; Paiva & Bozza, 2014). Η διαδικασία αυτή αποτελεί κεντρικό στοιχείο της έμφυτης ανοσίας, συμβάλλοντας καθοριστικά στην απομάκρυνση βακτηρίων, ιών και μυκήτων. Συνολικά, υπό φυσιολογικές συγκεντρώσεις και αυστηρή ενζυμική ρύθμιση, οι ελεύθερες ρίζες είναι θεμελιώδη μόρια για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, της ακεραιότητας των ιστών και της αποτελεσματικής αμυντικής λειτουργίας του οργανισμού (Sies & Jones, 2020; D'Autréaux & Toledano, 2007).

1.4.2 Αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών



Εικόνα 3 : Οι μηχανισμοί δράσης των ελεύθερων ριζών οδηγούν σε κυτταρικές παθοφυσιολογικές μεταβολές. Ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες σε βασικά συστατικά των κυττάρων, όπως το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Αυτές οι βλάβες αλλοιώνουν τη δομή και τη λειτουργία των κυττάρων, διαταράσσοντας τις φυσιολογικές λειτουργίες τους και συμβάλλοντας στην ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων(Bozidarka L. et.al.,2023).

Οξειδωτικές βλάβες στα νουκλεϊκά οξέα

Το DNA και το RNA είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε βλάβες που προκαλούνται από τις επιθέσεις ελευθέρων ριζών (Lobo et al., 2010). Παρόλο που το DNA είναι κρίσιμο για τη βιωσιμότητα του κυττάρου, υπάρχουν ενδείξεις ότι δεν είναι το πρώτο μόριο που πλήττεται από τις ελεύθερες ρίζες. Αυτό οφείλεται στην προστασία που παρέχουν οι ιστόνες και οι σχετικές πρωτεΐνες της χρωματίνης. Το DNA, λόγω της δίκλωνης δομής του, είναι πιο σταθερό σε σχέση με το RNA έναντι των οξειδωτικών παραγόντων (Gebicki, 2016). Ακόμη, το μιτοχονδριακό DNA θεωρείται πιο ευάλωτο στις επιθέσεις των ROS σε σχέση με το πυρηνικό, γεγονός που έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών (Lobo et al., 2010). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι βρίσκεται σε

άμεση γειτνίαση με τις κύριες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών (Poyton et al., 2009). Γενικότερα, η υδροξυλική ρίζα είναι ο κύριος παράγοντας πρόκλησης βλαβών στο DNA, οδηγώντας σε τροποποιήσεις των βάσεων και της δεοξυριβόζης. Οι συνέπειες περιλαμβάνουν μεταλλάξεις, θραύσεις των ελίκων, αλλοιώσεις στις πουρίνες και δυσλειτουργία των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, επηρεάζοντας την αντιγραφή, τη μεταγραφή και τη μετάφραση (Pizzino et al., 2017).

Η οξείδωση του DNA συχνά οδηγεί στο σχηματισμό τροποποιημένων βάσεων όπως η 8-οξογουανίνη, η 2-υδροξυαδενίνη και η 5-υδροξυκυστεΐνη (Liguori et al., 2018). Ένας κοινός δείκτης για την ανίχνευση οξειδωτικής βλάβης είναι η συγκέντρωση της 8-υδροξυγουανοσίνης (8-OH-dG), που έχει συνδεθεί με μεταλλαξιογένεση και διαταραχές στην επιγενετική ρύθμιση, όπως η μεθυλίωση των νησίδων CpG (Poyton et al., 2009).

Επιπτώσεις της οξείδωσης στα λιπίδια

Η οξείδωση των λιπιδίων μπορεί να οδηγήσει σε αλυσιδωτές αντιδράσεις υπεροξείδωσης, επηρεάζοντας τη σταθερότητα και τη λειτουργικότητα των μεμβρανών (Gebicki, 2016). Οι ελεύθερες ρίζες επιτίθενται κυρίως σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), λόγω της υψηλής περιεκτικότητας διπλών δεσμών άνθρακα. Τα PUFAs, ως βασικά δομικά συστατικά των φωσfolιπιδίων, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρευστότητα και τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Η οξειδωτική καταστροφή τους οδηγεί σε αποδιοργάνωση της μεμβράνης, δυσλειτουργία των ιόντων ασβεστίου και πρωτονίων, καθώς και σε ανεπάρκεια των ενζύμων των μεμβρανών (Agmon et al., 2018). Οι πιο δραστικές ρίζες έναντι των λιπιδίων είναι οι OH• και ONOO•.

Η λιπιδική υπεροξείδωση περιλαμβάνει τρία στάδια: έναρξη, προαγωγή και τερματισμό, οδηγώντας στο σχηματισμό ενδιάμεσων προϊόντων όπως οι αλδεϋδες και οι ισοπροσάνες, που σχετίζονται με νευρολογικές διαταραχές και μεταβολικά νοσήματα (Santo et al., 2016; Lobo et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα στο στάδιο της έναρξης, ένα δραστικό μόριο, συνήθως μια ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου (•OH), επιτίθεται σε ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ της μεμβράνης, αποσπώντας ένα άτομο υδρογόνου και δημιουργώντας μία ρίζα λιπιδίου (L•) (Ayala et al., 2014). Το στάδιο αυτό είναι κρίσιμο, καθώς σηματοδοτεί την έναρξη της αλυσιδωτής αντίδρασης. Κατά το στάδιο της προαγωγής, η ρίζα λιπιδίου αντιδρά με οξυγόνο, σχηματίζοντας ρίζα

υπεροξειδίου λιπιδίου (LOO•), η οποία με τη σειρά της επιτίθεται σε γειτονικά λιπαρά οξέα, συνεχίζοντας το φαύλο κύκλο παραγωγής νέων ριζών (Gaschler & Stockwell, 2017). Το στάδιο του τερματισμού επέρχεται όταν δύο ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους ή όταν μηχανισμοί όπως η αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης E ή της γλουταθειόνης (GSH) διακόψουν την αλυσιδωτή αντίδραση, σταθεροποιώντας τα ενδιάμεσα προϊόντα (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Κατά τη διάρκεια της λιπιδικής υπεροξειδωσης σχηματίζονται πολυάριθμα ενδιάμεσα προϊόντα, τα οποία χρησιμεύουν ως δείκτες λιπιδικής βλάβης. Οι βασικότεροι εξ αυτών είναι:

- Η μαλονδιαλδεΐδη (MDA), που αποτελεί προϊόν αποικοδόμησης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, που συχνά ανιχνεύεται μέσω της μεθόδου TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) και αποτελεί κλασικό δείκτη οξειδωτικής βλάβης (Del Rio et al., 2005).
- Η 4-υδροξυνωοναλική (4-HNE), που είναι μια εξαιρετικά δραστική αλδεΐδη που αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες και DNA, διαταράσσοντας σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες και θεωρείται βιοδείκτης νευροεκφυλιστικών νοσημάτων (Zarkovic et al., 2021).
- Οι ισοπροστάνες (IsoPs), σταθερά προϊόντα της μη ενζυμικής υπεροξειδωσης του αραχιδονικού οξέος, τα οποία θεωρούνται εξαιρετικά αξιόπιστοι δείκτες *in vivo* οξειδωτικού στρες και έχουν συσχετιστεί με καρδιοπάθειες και σακχαρώδη διαβήτη (Milne et al., 2015).

Η αυξημένη παρουσία των παραπάνω βιοδεικτών έχει συνδεθεί με πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, όπως νευρολογικές διαταραχές, φλεγμονώδη νοσήματα και μεταβολικές δυσλειτουργίες (Santo et al., 2016; Lobo et al., 2010; Gaschler & Stockwell, 2017).

Οξειδωτικές τροποποιήσεις στις πρωτεΐνες

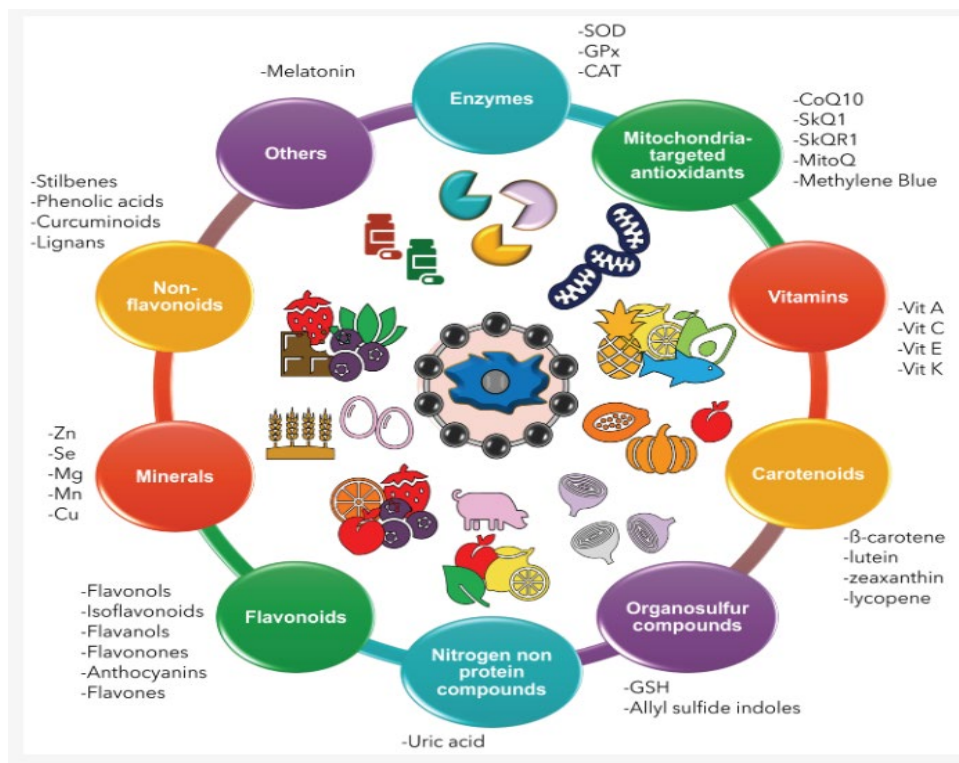
Οι πρωτεΐνες είναι εξίσου ευάλωτες στις επιθέσεις των ROS, με τη ρίζα OH• να αποτελεί τον κυριότερο οξειδωτικό παράγοντα (Gebicki, 2016). Οι βλάβες στις πρωτεΐνες συμβαίνουν μέσω οξείδωσης συγκεκριμένων αμινοξέων, ιδιαίτερα μεθειονίνης, κυστεΐνης, αργινίνης και ιστιδίνης, διάσπασης των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και σχηματισμού συμπλεγμάτων μεταξύ των πρωτεϊνών και των προϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Santo et al., 2016).

Η οξείδωση των πρωτεϊνών συχνά οδηγεί στο σχηματισμό καρβονυλίων και άλλων τροποποιημένων αμινοξέων, όπως των σουλφιδίων μεθειονίνης και των πρωτεϊνικών περοξειδίων. Η συσσώρευση αυτών των αλλοιωμένων πρωτεϊνών προκαλεί δυσλειτουργία στο πρωτεάσωμα, μεταβάλλοντας την ενζυμική δραστηριότητα και διαταράσσοντας τους μηχανισμούς κυτταρικής σηματοδότησης (Lobo et al., 2010).

Για την ανίχνευση της οξειδωτικής βλάβης στις πρωτεΐνες, χρησιμοποιείται ως αντιπροσωπευτικός δείκτης τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν μέσω αντίδρασης με 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH) (Royton et al., 2009). Οι καρβονυλικές τροποποιήσεις προκαλούνται κυρίως μέσω της αντίδρασης Fenton, κατά την οποία τα οξειδωτικά μόρια αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα λυσίνη, αργινίνη, προλίνη και θρεονίνη (Liguori et al., 2018).

1.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ο οργανισμός διαθέτει διάφορους αμυντικούς μηχανισμούς, οι οποίοι περιλαμβάνουν προληπτικούς μηχανισμούς, συστήματα επιδιόρθωσης, φυσικούς αμυντικούς παράγοντες και αντιοξειδωτικά συστήματα (Valko et al., 2007). Ιδιαίτερα, ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει ένα πολυεπίπεδο σύστημα άμυνας έναντι της οξειδωτικής βλάβης, το οποίο ενισχύεται και από εξωγενή αντιοξειδωτικά, που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής, ώστε να προστατεύει τα κύτταρα από τη βλάβη (Rahman, 2007).



Εικόνα 4 : Το σχήμα απεικονίζει τις κύριες κατηγορίες αντιοξειδωτικών: ένζυμα, αντιοξειδωτικά που στοχεύουν στα μιτοχόνδρια, βιταμίνες, καροτενοειδή, οργανοθειούχες ενώσεις, αζωτούχες μη πρωτεϊνικές ενώσεις, φλαβονοειδή, ανόργανα άλατα, μη φλαβονοειδή και άλλα (Varesi A. et.al.,2022).

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες είναι μόρια, φυσικά ή συνθετικά, που έχουν την ικανότητα να καθυστερούν ή εμποδίζουν την οξείδωση των υποστρωμάτων, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες ή αναστέλλοντας την αλυσίδα οξειδωτικών αντιδράσεων. Λειτουργούν είτε μέσω άμεσης απομάκρυνσης των ROS/RNS είτε μέσω ενίσχυσης ενζυμικών συστημάτων αποτοξίνωσης, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) (Halliwell & Gutteridge, 2015). Σύμφωνα με τον Sies et al. (2017), ο ορισμός των αντιοξειδωτικών είναι «οποιαδήποτε ουσία μπορεί να καθυστερήσει σημαντικά ή εμποδίσει την οξείδωση ενός υποστρώματος ή να απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη». Τα αντιοξειδωτικά κατηγοριοποιούνται σε ενδογενή, όπως η γλουταθειόνη, τα ένζυμα και το ουρικό οξύ, και εξωγενή, που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής, όπως οι βιταμίνες C και E, τα φλαβονοειδή και τα καροτενοειδή (Pisoschi & Pop, 2015). Διαθέτουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού ισοζυγίου, τη διατήρηση

της κυτταρικής ακεραιότητας και την προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες (Lobo et al., 2010; Reuter et al., 2010).

Με βάση τους μηχανισμούς δράσης, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε πέντε κύριες κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αντιοξειδωτικά τα οποία εξουδετερώνουν άμεσα τις ελεύθερες ρίζες προσφέροντας ηλεκτρόνια, διακόπτοντας έτσι την αλυσιδωτή αντίδραση. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν μόρια όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E και τα φλαβονοειδή (Pham-Huy et al., 2008; Pisoschi & Pop, 2015). Στη δεύτερη συμπεριλαμβάνονται ενώσεις που μπορούν να σταθεροποιούν δραστικά μόρια με την παροχή πρωτονίων, μετατρέποντάς τα σε λιγότερο δραστικά ή αδρανή, τα οποία δεν μπορούν πλέον να συμμετέχουν στην επέκταση της οξειδωτικής διαδικασίας (Sies et al., 2017). Ακόμη, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να αναστέλλουν τη δράση ενζύμων που εμπλέκονται στην παραγωγή ROS, όπως η NADPH οξειδάση και η μυελοϋπεροξειδάση, καθώς και να περιορίζουν τη διαθεσιμότητα μεταβατικών μετάλλων (π.χ. Fe^{2+} , Cu^{+}) που δρουν ως καταλύτες στις οξειδωτικές διεργασίες (Pham-Huy et al., 2008). Τέλος, μπορούν να συμβάλλουν στην αποκατάσταση βλαβών που έχουν ήδη προκληθεί σε βασικά συστατικά του κυττάρου όπως το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, ενεργοποιώντας επιδιορθωτικούς μηχανισμούς και ενισχύοντας την κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό (Reuter et al., 2010).

Ακόμη, ανάλογα με τον τρόπο δράσης διακρίνονται σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά παρέχουν ηλεκτρόνια, ώστε να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες, ενώ τα μη ενζυμικά αναστέλλουν την αλυσιδωτή αντίδραση οξείδωσης (Nimse & Pal, 2015). Λοιπές ταξινομήσεις αφορούν τη διαλυτότητά, όπου διακρίνονται σε υδατοδιαλυτά και λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά, και το μέγεθος, κατά το οποίο ταξινομούνται σε μικρομοριακά και μακρομοριακά. Τέλος, τα αντιοξειδωτικά κατηγοριοποιούνται με βάση την προέλευσή τους, διαχωριζόμενα σε ενδογενή, τα οποία συντίθενται στον οργανισμό, και σε εξωγενή, τα οποία προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής (Nimse & Pal, 2015).

1.5.1 Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Στους ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς περιλαμβάνονται η υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD), η καταλάση (Catalase, CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR).

Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD)

Τα ένζυμα της υπεροξειδικής δισμουτάσης αποτελούν μια ομάδα ενζύμων που καταλύουν τη μετατροπή των σουπεροξειδικών ιόντων σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και μοριακό οξυγόνο. Είναι παρόντα σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς και διακρίνονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, ανάλογα με το μεταλλικό στοιχείο που περιέχουν ως συμπράγοντα: Cu/Zn, Fe και Mn, ενώ υπάρχει και μία επιπλέον μορφή που περιέχει νικέλιο (Ni-SOD). Το ένζυμο MnSOD βρίσκεται κυρίως στα μιτοχόνδρια και στα υπεροξειδιοσώματα, η FeSOD στα υπεροξειδιοσώματα, ενώ η CuZnSOD εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τα υπεροξειδιοσώματα (Valko et al., 2007). Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί τρεις βασικές μορφές του ενζύμου στα κύτταρα: SOD1 - που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, SOD2 - η οποία βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, και SOD3 - που απαντάται στον εξωκυττάριο χώρο. Οι SOD1 και η SOD3 περιέχουν χαλκό και ψευδάργυρο, ενώ η SOD2 περιέχει μαγγάνιο ως συμπράγοντα στο ενεργό της κέντρο (Obeagu et al., 2018).



Καταλάση (CAT)

Η αποικοδόμηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου επιτυγχάνεται μέσω διαφορετικών ενζυμικών μηχανισμών, στους οποίους συμμετέχουν η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και οι περοξειρεδοξίνες.

Η καταλάση είναι ένζυμο που απαντάται σε όλους τους οργανισμούς που χρησιμοποιούν το οξυγόνο και η βασική της λειτουργία είναι η μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο. Εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς, με τη μεγαλύτερη συγκέντρωσή της να ανιχνεύεται στο ήπαρ (Lobo et al., 2010). Γενικότερα, χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλή ικανότητα αποδόμησης H_2O_2 και μπορεί να αποδομήσει εκατομμύρια μόρια H_2O_2 ανά δευτερόλεπτο. Ωστόσο, έχει χαμηλή συγγένεια (affinity) για το υπόστρωμά της, καθώς η τιμή K_m της κυμαίνεται γύρω στο 1 mM ή και υψηλότερα, γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι λειτουργικά ενεργή κυρίως

όταν οι ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις του H_2O_2 είναι αυξημένες, όπως συμβαίνει σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Chelikani et al., 2004; Sies, 2017).

Η αντίδραση που καταλύει είναι η εξής: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Σύστημα Γλουταθειόνης (Glutathione System)

Το σύστημα της γλουταθειόνης περιλαμβάνει τρία κύρια ένζυμα: την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και τη S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Αυτό το ενζυμικό σύστημα έχει εντοπιστεί τόσο σε ζωικούς όσο και σε φυτικούς οργανισμούς, καθώς και σε μικροοργανισμούς (Obeagu et al., 2018). Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο ήπαρ, όπου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αποτοξίνωσης του οργανισμού (Lobo et al., 2010).

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι ένζυμο που περιέχει τέσσερα άτομα σεληνίου και καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου και άλλων οργανικών υπεροξειδίων σε μη δραστικά προϊόντα. Υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερα ισοένζυμα της GPx, με την υπεροξειδάση I να είναι η πιο κοινή και να δρα κυρίως έναντι του H_2O_2 , ενώ η υπεροξειδάση IV εμφανίζει μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι οξειδωμένων λιπιδίων (Deponte, 2013). Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα και παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για το H_2O_2 , με τιμές K_m που κυμαίνονται από 10 έως 50 μM , υποδηλώνοντας ότι λειτουργεί αποδοτικά ακόμη και σε χαμηλές ή φυσιολογικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος. Η ικανότητά της να αποδομεί το H_2O_2 είναι σημαντικά μικρότερη από εκείνη της καταλάσης, αλλά ο ρόλος της είναι κρίσιμος στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης σε συνθήκες βασικού κυτταρικού μεταβολισμού (Flohé & Günzler, 1984).

Η ενζυματική αντίδραση που καταλύει είναι: $2 \text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$

Η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) είναι ένζυμο που εμφανίζει έντονη δραστικότητα έναντι οξειδωμένων λιπιδίων και καταλύει την παραγωγή ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) μέσω της αλληλεπίδρασής της με ηλεκτρονιόφιλα άτομα αζώτου, άνθρακα και θείου (Oakley, 2005).

Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) αποτελεί ένα ομοδιμερές ένζυμο που περιέχει αιμοπρωτεΐνη και διαθέτει δύο ενεργά κέντρα. Στη μία πλευρά, το FAD συνδέεται με το NADPH, επιτρέποντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων προς τη δισουλφιδική γέφυρα, ενώ στην άλλη πλευρά υπάρχει ένα δεύτερο μόριο FAD, το οποίο εμπλέκεται στη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο ρόλος της αναγωγής είναι να μετατρέπει την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) στην ανηγμένη μορφή της (GSH), διατηρώντας έτσι την αντιοξειδωτική ισορροπία του κυττάρου (Deponte, 2013).



2 Μη Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Γλουταθειόνη (GSH)

Η γλουταθειόνη αποτελεί τη σημαντικότερη μη ενζυμική αντιοξειδωτική ουσία στους ζωντανούς οργανισμούς και είναι η πιο διαδεδομένη θειόλη. Είναι μία μικρού μοριακού βάρους ένωση, η οποία δεν προσλαμβάνεται από τη διατροφή, αλλά παράγεται εξ' ολοκλήρου από τον οργανισμό μέσω της σύνθεσης τριών αμινοξέων: γλυκίνης, κυστεΐνης και γλουταμινικού οξέος. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η γλουταθειόνη (GSH) εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, όπου συγκεντρώνεται σε ποσοστό 80-85%. Ωστόσο, σημαντικές ποσότητες απαντώνται επίσης στα μιτοχόνδρια (10-15%), καθώς και στον πυρήνα και το ενδοπλασματικό δίκτυο.

Στη φυσιολογική της κατάσταση απαντάται κυρίως σε ανηγμένη μορφή (GSH), αλλά μπορεί να μεταβεί στην οξειδωμένη μορφή (GSSG), με τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ των δύο μορφών να ρυθμίζεται από τα ένζυμα GPx και GR. Ο λόγος GSH/GSSG παραμένει σταθερός υπό φυσιολογικές συνθήκες, και οποιαδήποτε διαταραχή του αποτελεί ένδειξη μεταβολών στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση. Η αντιοξειδωτική της δράση αποδίδεται στην παρουσία της σουλφυδρυλικής ομάδας, η οποία της επιτρέπει να δωρίζει ηλεκτρόνια σε ελεύθερες ρίζες, εξουδετερώνοντάς τις. Επιπλέον, η κατάσταση οξείδωσης της γλουταθειόνης επηρεάζει σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η σηματοδότηση και η ανάπτυξη των κυττάρων (Lobo et al., 2010).

Βιταμίνες A, C, E

Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι ένα υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό που λαμβάνεται αποκλειστικά μέσω της διατροφής, καθώς ο ανθρώπινος οργανισμός, όπως και αυτός άλλων ανώτερων θηλαστικών, δεν μπορεί να τη συνθέσει λόγω έλλειψης του ενζύμου οξειδάση της L-γουλono-1,4-λακτόνης (Lobo et al., 2010). Συμμετέχει σε πολλές βιοχημικές διεργασίες, ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά, και λειτουργεί ως συμπαραγόντας για διάφορες υδροξυλάσες. Η βιταμίνη C δρα απομακρύνοντας δραστικά είδη οξυγόνου σε υδατικά περιβάλλοντα και ενισχύει την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, προστατεύοντας τις κυτταρικές μεμβράνες, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια από την οξειδωτική καταστροφή. Επιπλέον, συμβάλλει στην αναγέννηση της βιταμίνης E, ανακτώντας τη μη οξειδωμένη μορφή της μέσω αναγωγής των ριζών τοκοφεροξυλίου, ενισχύοντας έτσι τη συνολική κυτταρική προστασία από τις ελεύθερες ρίζες. Στην κυκλοφορία του αίματος και στους ιστούς βρίσκεται κυρίως σε ανηγμένη μορφή, καθώς αλληλεπιδρά με τη γλουταθειόνη (Obeagu et al., 2018).

Η βιταμίνη E είναι λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό, το οποίο περιλαμβάνει δύο βασικές κατηγορίες μορίων: τις τοκοφερόλες και τις τοκονιетроλές. Η σημαντικότερη από αυτές είναι η α-τοκοφερόλη, καθώς εμφανίζει την υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα στον οργανισμό και έχει μελετηθεί εκτενώς. Ο κύριος ρόλος των τοκοφερολών έγκειται στην αναστολή της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, διαδικασία κατά την οποία αντιδρά με ρίζες υπεροξυλίου ($\text{ROO}\cdot$) διακόπτοντας την αλυσιδωτή αντίδραση της λιπιδικής υπεροξειδωσής. Με αυτό τον τρόπο, συμβάλλει στη διατήρηση της ακεραιότητας των κυτταρικών μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Obeagu et al., 2018).

Η βιταμίνη A, επίσης λιποδιαλυτή, μπορεί να ληφθεί είτε άμεσα μέσω της διατροφής είτε με τη μορφή του β-καροτενίου, το οποίο λειτουργεί ως πρόδρομο για τη σύνθεσή της. Αποτελεί βασικό στοιχείο για διάφορες βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης και της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος (Grune et al., 2010).

Ουρικό Οξύ

Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών και δρα ως ισχυρό αντιοξειδωτικό στο πλάσμα του αίματος. Θεωρείται ότι κατά τη διάρκεια της εξέλιξης υποκατέστησε τη δράση του ασκορβικού οξέος, καθώς παρουσιάζει

παρόμοια ικανότητα εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών (Obeagu et al., 2018). Συμβάλλει στην πρόληψη της οξείδωσης των αιμοσφαιρινών και τον περιορισμό της παραγωγής υπεροξειδίων από τα μακροφάγα. Επιπλέον, προστατεύει τις κυτταρικές μεμβράνες των ερυθροκυττάρων από την οξείδωση των λιπιδίων, εξουδετερώνοντας δραστικές ρίζες όπως το μονήρες οξυγόνο, τις ρίζες υπεροξυλίων και υδροξυλίου (Piroschi et al., 2015).

Καροτενοειδή

Η αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στη χαρακτηριστική μοριακή τους δομή, η οποία περιλαμβάνει εναλλασσόμενους απλούς και διπλούς δεσμούς. Αυτή η διαμόρφωση επιτρέπει στα καροτενοειδή να δρουν ως δότες ηλεκτρονίων, εξουδετερώνοντας αποτελεσματικά τις ελεύθερες ρίζες (Rahman, 2007). Το β-καροτένιο είναι το πιο σημαντικό μόριο αυτής της κατηγορίας, καθώς αποτελεί πρόδρομο της βιταμίνης Α και διαθέτει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, προστατεύοντας κυρίως το δέρμα από οξειδωτικές βλάβες (Piroschi et al., 2015).

Φαινολικές Ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια ευρεία κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που συναντώνται στα φυτά και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνά τους έναντι περιβαλλοντικών στρεσογόνων παραγόντων. Τα φλαβονοειδή, συγκεκριμένα, είναι παράγωγα των γ-βενζοπυρενίων και χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός βενζοϊκού δακτυλίου με συνδεδεμένη φαινολική ομάδα. Κατά το μεταβολισμό τους, υφίστανται διεργασίες όπως μεθυλίωση, γλυκουρονιδίωση και θειολυτική τροποποίηση. Η αντιοξειδωτική τους δράση επηρεάζεται από τον αριθμό, τη θέση και τη φύση των υδροξυλομάδων που περιέχουν (Rahman, 2007).

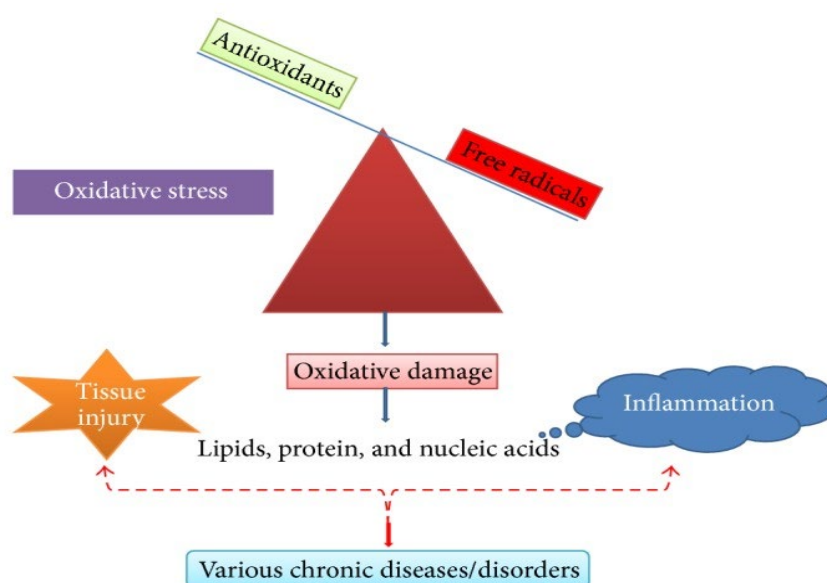
Μελατονίνη

Η μελατονίνη είναι μια φυσική ορμόνη που απαντάται σε ζώα και άλλους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των άλγεων. Λειτουργεί ως ισχυρό αντιοξειδωτικό, ικανό να διαπεράσει εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και τον

αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Σε αντίθεση με άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις, δεν μπορεί να αναγεννηθεί μετά την οξείδωσή της, γεγονός που την καθιστά μη ανακυκλώσιμη (Lobo et al., 2010).

1.6 Οξειδωτικό στρες

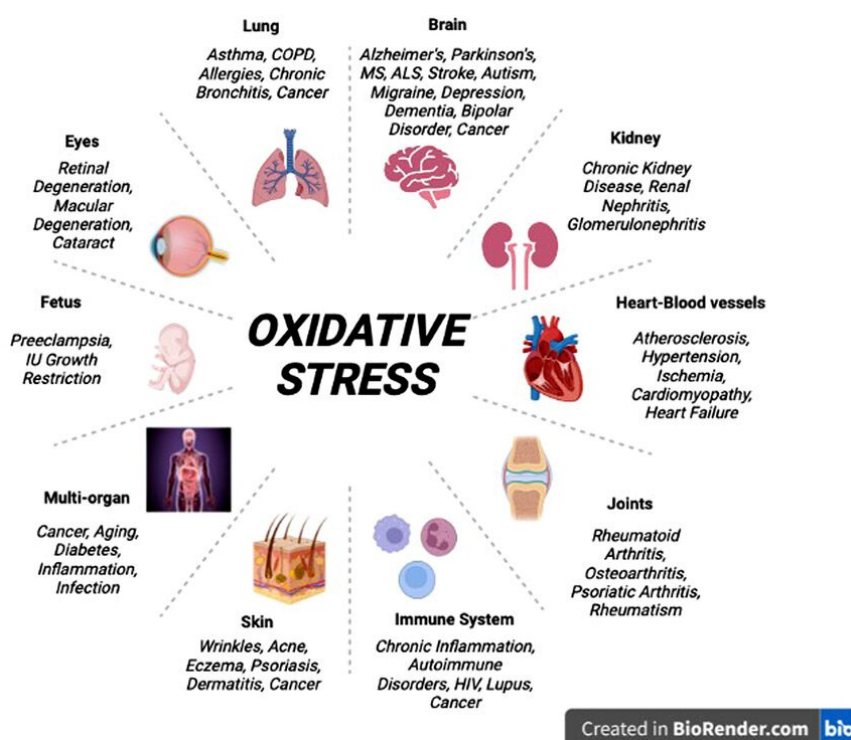
Το οξειδωτικό στρες έχει απασχολήσει έντονα την επιστημονική κοινότητα τις τελευταίες δεκαετίες. Ο πρώτος ορισμός αυτού του βιολογικού φαινομένου δόθηκε από τον Helmut Sies στα μέσα της δεκαετίας του '80 ως «μια διαταραχή στην ισορροπία προοξειδωτικών-αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων» (Sies, 1985). Ο Sies συνδύασε το οξειδωτικό στρες κυρίως με τους προοξειδωτικούς και αντιοξειδωτικούς παράγοντες, αν και ο ορισμός του θεωρείται πλέον αόριστος και παρωχημένος, καθώς αναφέρεται σε μια ισορροπία που είναι δύσκολο να υπολογιστεί στα κύτταρα, λόγω της αδυναμίας εκτίμησης των επιπέδων όλων των προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών (Sies, 1985; Jones, 2006). Το οξειδωτικό στρες επανακαθορίστηκε από τον Dean Jones 21 χρόνια αργότερα ως «μια διαταραχή στην ισορροπία προοξειδωτικών/αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών, οδηγώντας σε διατάραξη της σηματοδότησης και ελέγχου των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων και/ή μοριακή βλάβη» (Jones, 2006). Ο τελευταίος ορισμός συνδέει το οξειδωτικό στρες με τη σηματοδότηση των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, μια σημαντική βιολογική διαδικασία για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων.



Εικόνα 5 : Χρόνιες παθήσεις ως αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες: ανισορροπία αντιοξειδωτικών και ελεύθερων ριζών (Arulselvan P. et.al.,2016).

Οι βιοδείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης περιλαμβάνουν τόσο αντιοξειδωτικά μόρια, των οποίων η συγκέντρωση ή δραστηριότητα επηρεάζεται από τις ελεύθερες ρίζες, όσο και δείκτες οξειδωτικής βλάβης σε κυτταρικά συστατικά (Veskoukis et al., 2019). Αυτοί οι βιοδείκτες χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση πιθανών αλλαγών στο οξειδοαναγωγικό προφίλ των ιστών, που προκαλούνται από ερεθίσματα, όπως η άσκηση, η διατροφή, η γήρανση, οι ασθένειες και διάφορα ξеноβιοτικά (Veskoukis et al., 2012a,b; Ghezzi et al., 2017; Docea et al., 2018).

Σχετικά με την παθοφυσιολογία, ερευνητικά δεδομένα συσχετίζουν το οξειδωτικό στρες με πολλά χρόνια νοσήματα (Halliwell and Gutteridge, 2015; Poprac et al., 2017), όπως καρκίνο, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες νόσοι και μεταβολικά νοσήματα (Briyal S. et.al.,2023, Rhodes L.V. et.al.,2011).



Εικόνα 6: Ασθένειες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες στον άνθρωπο (Kiran T., et.al.,2023)

Το οξειδωτικό στρες προάγει την ογκογένεση μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού NF-κΒ, το οποίο ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση, τη φλεγμονή και τον πολλαπλασιασμό. Παράλληλα, ενεργοποιεί τη MAPK/ERK οδό, που ενισχύει τη μετάβαση κυττάρων από φυσιολογικά σε καρκινικά (Reuter et al., 2010). Επιπλέον, η αύξηση των ROS απενεργοποιεί την πρωτεΐνη p53, διαταράσσοντας τη λειτουργία της, που είναι ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, προκαλώντας ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και συνεπώς καρκίνο (Valko et al., 2007).

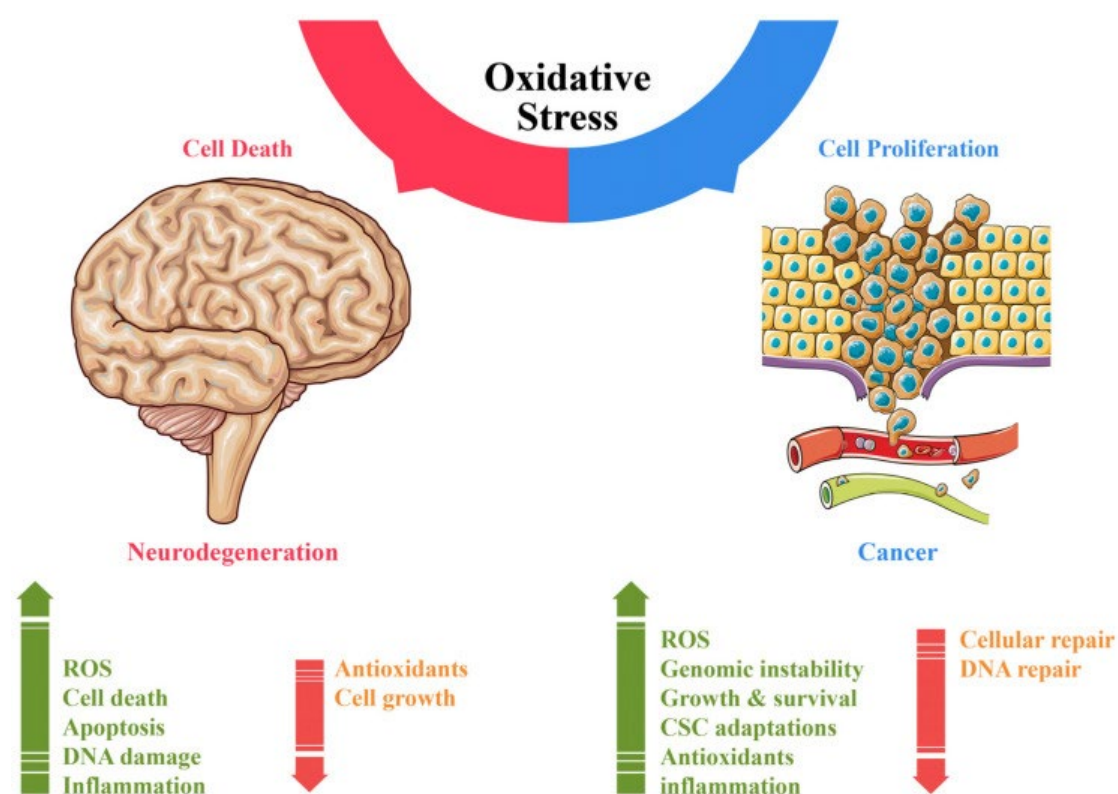
Όσον αφορά τις νευροεκφυλιστικές παθήσεις, εμφανίζουν ως κοινό παθολογικό χαρακτηριστικό τη συσσώρευση παθολογικών πρωτεϊνικών μορφών στον εγκέφαλο. Η διεργασία αυτή επηρεάζεται από πολλούς ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες και καταλήγει σε νευρωνική εκφύλιση και κυτταρικό θάνατο. Σε ιστολογικές αναλύσεις εγκεφαλικών ιστών από ασθενείς με νόσο Alzheimer ή νόσο Parkinson, παρατηρείται παρουσία αυξημένων δεικτών οξειδωτικής βλάβης. Τα ευρήματα αυτά περιλαμβάνουν αλλοιώσεις σε πρωτεΐνες, είτε ως άμεσο αποτέλεσμα της δράσης των ROS, είτε ως συνέπεια της επίδρασης δευτερογενών μεταβολιτών από την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Έχει επίσης τεκμηριωθεί πως διαταράσσεται η λειτουργία του μονοπατιού Nrf2/ARE, μειώνοντας την έκφραση ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων (Uttara et al., 2009; Poprac et al., 2017).

Το οξειδωτικό στρες έχει ακόμη κεντρικό ρόλο στην εμφάνιση των μεταβολικών νοσημάτων, ιδίως στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (T2DM), την παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο. Η υπερβολική παραγωγή ROS επηρεάζει βασικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με τη ρύθμιση της γλυκόζης, τη φλεγμονή και τη λιπιδιακή ομοιόσταση (Houstis et al., 2006; Ceriello & Motz, 2004). Ένα από τα σημαντικότερα είναι το μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης, όπου καταστέλλεται η φυσιολογική σηματοδότηση, με αποτέλεσμα να οδηγεί σε αντίσταση στην ινσουλίνη, βασικό παθοφυσιολογικό χαρακτηριστικό του T2DM (Evans et al., 2002).

Παράλληλα, σε παχύσαρκα άτομα, το υπερβολικό λίπος στο ήπαρ και στους μύες οδηγεί σε διαταραχή της μιτοχονδριακής ομοιόστασης και ενίσχυση της NADPH οξειδάσης, επιτείνοντας το οξειδωτικό στρες (Furukawa et al., 2004). Επιπλέον, η λιποτοξικότητα, η δυσλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος, καθώς και η χρόνια υποκλινική φλεγμονή, ενισχύονται από την υπεροξείδωση των λιπιδίων και την

ενεργοποίηση του μονοπατιού NF-κΒ, οδηγώντας σε έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως TNF-α και IL-6 (Prasad et al., 2017).

Ακόμη, στις φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες νόσους, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA), η πολλαπλή σκλήρυνση (MS) και η νόσος του Crohn, το οξειδωτικό στρες επιδεινώνει την ανοσολογική δυσλειτουργία, ενισχύοντας τη φλεγμονή και προκαλώντας περαιτέρω ιστική βλάβη. Ο βασικός μοριακός μηχανισμός περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος, που όταν διεγείρεται από ROS ενεργοποιεί την κασπάση-1, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην ενεργοποίηση των IL-1β και IL-18, που είναι ισχυρές φλεγμονώδεις κυτοκίνες (Tschopp & Schroder, 2010). Σε πολλές περιπτώσεις, λόγω του οξειδωτικού στρες, παρατηρείται απώλεια της ανοσολογικής ανοχής, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση αυτοαντιδραστικών T-κυττάρων και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων (Villacorta et al., 2007).



Εικόνα 7 : Συσχέτιση του οξειδωτικού στρες με τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και το καρκίνο.(Nikhil R.S. et.al.,2025).

Για πολλές δεκαετίες, οι ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά είδη θεωρούνταν συνώνυμα με βλαπτικές επιδράσεις, καθώς συνδέονταν στενά με το οξειδωτικό στρες, που με τη σειρά του θεωρήθηκε ένδειξη παθολογίας (Halliwell and Gutteridge, 1984;

Fridovich, 1978). Ωστόσο, πρόσφατα ευρήματα ανέτρεψαν αυτή την παραδοχή, αποδεικνύοντας ότι τα δραστικά είδη δεν είναι πάντα επιβλαβή, αλλά εμπλέκονται σε βασικές βιολογικές διαδικασίες (Carroll and Conte, 2013; Winterbourn, 2015), υποστηρίζοντας λειτουργίες όπως η μεταγωγή σημάτων, η γονιδιακή έκφραση (Ji et al., 2006) και οι προσαρμογές που προκύπτουν από επαναλαμβανόμενη φυσική άσκηση (Radak et al., 2001; Margaritelis et al., 2018). Αυτή η ανακάλυψη, βασισμένη σε περιορισμένα δεδομένα από τη δεκαετία του 1970 (Mittal and Murad, 1977) και 1990 (Sundaresan et al., 1995; Bae et al., 1997), έφερε επανάσταση στην οξειδοαναγωγική βιολογία, οδηγώντας την επιστημονική κοινότητα σε νέα κατεύθυνση. Ενδογενώς παραγόμενα ROS είναι φυσιολογικά παρόντα στο κυτταρικό περιβάλλον σε συγκεκριμένες ποσότητες, απαραίτητες για την επιβίωση των κυττάρων. Όταν όμως τα επίπεδά τους αποκλίνουν από το βέλτιστο εύρος—είτε λόγω μειωμένης παραγωγής είτε υπερβολικής συσσώρευσης—ενδέχεται να διαταράξουν τις φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες και να προκαλέσουν βλαπτικές επιδράσεις.

Ο όρος όρμιση (hormesis), ο οποίος εισήχθη για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία από τους Southam και Ehrlich στον τομέα της φυσιολογίας φυτών (Southam and Ehrlich, 1943), εφαρμόζεται ιδανικά στη φαρμακολογία και την τοξικολογία, περιγράφοντας τη σχέση δόσης-απόκρισης, όπου μικρές δόσεις φαρμάκων είναι ευεργετικές, ενώ υψηλές δόσεις έχουν αρνητικές επιδράσεις (Calabrese, 2005; Tsatsakis et al., 2018). Η άσκηση και η γήρανση είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα που επάγουν την παραγωγή ROS, με τις επιπτώσεις να εξαρτώνται από τις συγκεντρώσεις τους (Radak et al., 2005, 2017). Η άσκηση, ειδικότερα, αποτελεί εξαιρετικό μοντέλο για τη μελέτη τόσο των φυσιολογικών όσο και των παθολογικών ρόλων αυτών των ειδών (Veskoukis et al., 2012b, 2016b, 2018b). Ωστόσο, η υπερβολική ή ανεπαρκής παραγωγή δραστικών ειδών μπορεί να προκαλέσει βλάβες, οδηγώντας σε οξειδωτικό ή αναγωγικό στρες αντίστοιχα (Spanidis et al., 2018).

Η διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας δεν περιορίζεται όμως μόνο στην υπεροχή των οξειδωτικών παραγόντων. Σε περιπτώσεις υπερβολικής συσσώρευσης αναγωγικών μορίων, προκαλείται αναγωγικό στρες (reductive stress), το οποίο μπορεί να είναι εξίσου επιβλαβές (Xiao & Loscalzo, 2020). Σε συνθήκες αναγωγικού στρες, παρατηρείται υπερπαραγωγή αναγωγικών μορίων, όπως η NADH, NADPH και γλουταθειόνη σε αναγμένη μορφή (GSH), η οποία μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή της φυσιολογικής σηματοδότησης των ROS, πρωτεϊνικές αλλοιώσεις,

ενεργοποίηση μηχανισμών αποπτωτικών ή παθολογικών σηματοδοτικών μονοπατιών και συμβολή στην ανάπτυξη ασθενειών (Rajasekaran et al., 2007).

Έτσι, προκύπτει ότι υπάρχει μια βέλτιστη συγκέντρωση αυτών των ειδών, η οποία είναι ευεργετική, ενώ τιμές κάτω ή πάνω από αυτό το επίπεδο μπορεί να έχουν αρνητικές συνέπειες. Η ιδέα της όρμησης ενδέχεται να ισχύει και για χρόνιες ασθένειες, περιπλέκοντας τον εντοπισμό συγκεκριμένων δραστικών ειδών ως αιτίες παθολογιών (Spanidis et al., 2018).

1.7 Φυτοφάρμακα – Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα

Η χρήση ενός ευρέος φάσματος χημικών ουσιών αποτελεί πλέον αναπόσπαστο στοιχείο της σύγχρονης γεωργικής πρακτικής, τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Στόχος της πρακτικής αυτής είναι η αποτελεσματική αντιμετώπιση παρασίτων, ζιζανίων και άλλων επιβλαβών οργανισμών, συμβάλλοντας καθοριστικά στην αύξηση της απόδοσης των καλλιεργειών και τη μείωση των απωλειών μετά τη συγκομιδή.

Ως φυτοπροστατευτικά προϊόντα ορίζονται ετερογενείς ομάδες χημικών ενώσεων ή μιγμάτων, που προορίζονται για την πρόληψη, την εξάλειψη ή τον έλεγχο οποιουδήποτε οργανισμού προκαλεί βλάβες ή διαταράσσει με οποιονδήποτε τρόπο την παραγωγή, την επεξεργασία, την αποθήκευση, τη μεταφορά ή την εμπορία γεωργικών προϊόντων και τροφίμων φυτικής προέλευσης. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται βακτηριοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα και τρωκτικοκτόνα (R. Jayaraj et al., 2016).

Τα παράσιτα περιλαμβάνουν φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς που μπορούν να προκαλέσουν ζημιές τόσο στις καλλιέργειες όσο και στην ανθρώπινη υγεία (Kaur et al., 2019). Η χρήση των φυτοφαρμάκων έχει συμβάλει σημαντικά στη βελτίωση της αποτελεσματικότητας, της παραγωγικότητας και της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων, προσφέροντας πολλαπλά οφέλη. Συγκεκριμένα, προστατεύουν τις καλλιέργειες και τους φυτικούς οργανισμούς από επιβλαβείς παράγοντες, συμβάλλοντας στη συντήρηση των φυτικών προϊόντων (Pogacean & Gavrilescu, 2009).

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η ετήσια χρήση φυτοφαρμάκων εκτιμάται σε περίπου 2 εκατομμύρια τόνους. Η Κίνα αποτελεί τη μεγαλύτερη παραγωγό χώρα φυτοφαρμάκων, ακολουθούμενη από τις Ηνωμένες Πολιτείες και την Αργεντινή (A. Sharma, et al.,2019). Η συνεχώς αυξανόμενη παγκόσμια πληθυσμιακή ανάπτυξη έχει οδηγήσει σε αύξηση της ζήτησης για γεωργικά προϊόντα, μεταξύ των οποίων και τα φυτοφάρμακα (S. Medithi, et al.,2020).

1.7.1 Ιστορική αναδρομή της χρήσης φυτοφαρμάκων

Κατά την αρχαιότητα, λόγω της περιορισμένης κατανόησης των χημικών διαδικασιών, όλα τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα προέρχονταν αποκλειστικά από φυσικές πηγές, όπως φυτά, ζώα και μέταλλα (Tudi et al., 2021). Οι Σουμέριοι χρησιμοποίησαν ενώσεις του θείου για την καταπολέμηση εντόμων, αποτελώντας έτσι την πρώτη καταγεγραμμένη χρήση παρασιτοκτόνων, περίπου 4.500 χρόνια. Στα μέσα του 1800, οι γεωργοί στις Ηνωμένες Πολιτείες άρχισαν να εφαρμόζουν συγκεκριμένες χημικές ενώσεις —όπως νικοτινικά σουλφίδια, χαλκό με αρσενικό και ενώσεις του θείου— για την προστασία των καλλιεργειών, ωστόσο, παρουσίασαν περιορισμένη αποτελεσματικότητα και υψηλή τοξικότητα (Kaur et al., 2019).

Η περίοδος γύρω και μετά τον Β' Παγκόσμιο Πόλεμο ήταν ιδιαίτερα κομβική για τον τομέα των φυτοφαρμάκων, καθώς αναπτύχθηκαν και κυκλοφόρησαν μαζικά αποτελεσματικά και οικονομικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Delaplane, 2000). Παρ' όλα αυτά, από το 1962 και μετά, η ανάπτυξη νέων παρασιτοκτόνων επιβραδύνθηκε, καθώς αυξήθηκαν οι ανησυχίες της κοινής γνώμης σχετικά με τις πιθανές περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Προς το τέλος της δεκαετίας του 1960, εισήχθη μια νέα στρατηγική καταπολέμησης παρασίτων, γνωστή ως Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παρασίτων (Integrated Pest Management – IPM), η οποία βασίζεται στη χρήση βιολογικών οργανισμών για την καταπολέμηση επιβλαβών ειδών (Mahmood et al., 2016).

Στο πλαίσιο της σύγχρονης γεωργίας, η ερευνητική κατεύθυνση έχει στραφεί προς την ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων φυτών, τα οποία θα διαθέτουν εγγενή ανθεκτικότητα απέναντι σε προσβολές από παράσιτα και δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (M.Tudi et al., 2021).

1.7.2 Κατηγοριοποίηση φυτοφαρμάκων

Παρακάτω ακολουθούν οι τρόποι με τους οποίους τα παρασιτοκτόνα κατηγοριοποιούνται με βάση τη χημική δομή, τον τρόπο δράσης και το βαθμό τοξικότητάς τους. Πρέπει να σημειωθεί πως παρόμοια χημική δομή μεταξύ παρασιτοκτόνων συνεπάγεται συνήθως και σε παρόμοιο τρόπο δράσης.

Οργανισμός στόχος

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

Τάξη	Οργανισμός στόχος	Παραδείγματα
Ακαρεοκτόνα (Acaricides)	Ουσίες που χρησιμοποιούνται για να σκοτώσουν ακάρεα και τσιμπούρια ή για να διαταράξουν την ανάπτυξή τους	DDT, dicofol, chlorpyrifos, permethrin, κ.α.
Βακτηριοκτόνα (Bactericides)	Ενώσεις που απομονώθηκαν από ή παράγονται από έναν μικροοργανισμό ή παράγεται τεχνητά και χρησιμοποιούνται για να σκοτώσουν ή να αναστείλουν τα βακτήρια σε φυτά ή έδαφος	Streptomycin, tetracycline, κ.α.
Μυκητοκτόνα (Fungicides)	Χημικά που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη, θεραπεία και εξάλειψη των μύκητων	Cymoxanil, thiabendazole, Bordeaux mixture κ.α.
Ζιζανιοκτόνα (Herbicides)	Ουσίες που χρησιμοποιούνται για να σκοτώσουν τα ανεπιθύμητα φυτά ή να αναστείλουν την ανάπτυξή τους	Alachlor, paraquat, 2,4-D, κ.α.
Εντομοκτόνα (Insecticides)	Φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται για να σκοτώσουν έντομα ή να διακόψουν την ανάπτυξή τους	Azadirachtin, DDT, chlorpyrifos, malathion, κ.α.
Νηματωδοκτόνα (Nematicides)	Χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των νηματωδών	Carbofuron, chlorpyrifos, methyl bromide, κ.α.
Τρωκτικοκτόνα (Rodenticides)	Ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη θανάτωση αρουραίων και συναφών ζώων	Strychnine, Warfarin, zinc phosphide, κ.α.

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση των φυτοφαρμάκων βάσει του οργανισμού-βλαβερών παρασίτων που εξοντώνουν και της λειτουργίας του φυτοφαρμάκου (Χρήση)(Megha M. Akashe et.al.,2018).

Χημική Δομή

Τα φυτοφάρμακα αποτελούν μια ομάδα χημικών ουσιών, καθώς και ορισμένων μικροοργανισμών, όπως ιοί, που χρησιμοποιούνται για την εξάλειψη εντόμων, ζιζανίων, μυκήτων και βακτηρίων (R. Jayaraj et.al.,2016, N. Georgiadis et al.,2018) και έτσι κατηγοριοποιούνται σε 3 ομάδες:

- I. Ανόργανες ενώσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν κυρίως άλατα μετάλλων, όπως ο θειικός χαλκός και οξειδωτικούς παράγοντες που παρεμποδίζουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες των οργανισμών-στόχων.
- II. Οργανικές ενώσεις φυτικής ή μικροβιακής προέλευσης, οι οποίες αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία φυτοφαρμάκων. Περιλαμβάνουν φυσικές τοξίνες, αλκαλοειδή, πυρεθρίνες και άλλα φυσικά προϊόντα ή ημισυνθετικά παράγωγά τους, με στοχευμένη δράση κατά συγκεκριμένων βιολογικών απειλών.
- III. Οργανομεταλλικές ενώσεις, δηλαδή χημικές ενώσεις στις οποίες ένα μέταλλο (π.χ. μόλυβδος, υδράργυρος, κασσίτερος) συνδέεται με οργανικά μόρια.

Τρόπος εισαγωγής

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό των φυτοφαρμάκων είναι ο τρόπος εισαγωγής του στον οργανισμό-στόχο (Yadav & Devi, 2017). Με βάση αυτό μπορούν να χωριστούν σε 5 κατηγορίες:

- I. Συστημικά: Διεισδύουν στους οργανισμούς μέσω της απορρόφησης από φυτά ή ζώα και κατανέμονται στους ιστούς. Έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα και να κυκλοφορήσουν ανάμεσα σε διαφορετικά συστήματα, συμβάλλοντας στην εξουδετέρωση των παρασίτων.
- II. Μη συστημικά (επαφής): Ασκούν τη δράση τους άμεσα επί του στοχευμένου παρασίτου κατά την επαφή, διεισδύοντας μέσω της εξωτερικής επιφάνειας του σώματός του και επιφέροντας θάνατο λόγω τοξικής επίδρασης.
- III. Δηλητήρια στομάχου: Διεισδύουν στον οργανισμό του παρασίτου μέσω της πρόσληψης τροφής, εισερχόμενα από τη στοματική κοιλότητα και το πεπτικό σύστημα, όταν καταναλώνονται επιμολυσμένα φύλλα ή άλλα φυτικά μέρη.

- IV. Υποκαπνιστικά: Ασκούν τη δράση τους μέσω εισπνοής αερολυμάτων ή καπνού, διεισδύοντας στον οργανισμό του παρασίτου από την τραχειακή του οδό υπό μορφή μικροσκοπικών σωματιδίων, τα οποία οδηγούν σε τοξική επίδραση και θάνατο.
- V. Απωθητικά: Δεν επιφέρουν το θάνατο των παρασίτων, αλλά λειτουργούν αποτρεπτικά, επηρεάζοντας τη συμπεριφορά τους ώστε να τα απομακρύνουν ή να τα αποθαρρύνουν από το να προσεγγίσουν μια καθορισμένη περιοχή.

Τρόποι δράσης παρασιτοκτόνων

Κατηγορία	Μηχανισμός δράσης
Φυσικά τοξικά συστατικά	Καταστρέφουν τα παράσιτα εξαιτίας της φυσικής τους τοξικότητας
Τοξίνες που προσβάλλουν το κύτταρο	Προκαλούν αποδιοργάνωση των κυτταρικών οργανιδίων, οδηγώντας σε δυσλειτουργία και κυτταρικό θάνατο.
Αναπνευστικά τοξικά	Προκαλούν αποδιοργάνωση των κυτταρικών οργανιδίων, οδηγώντας σε δυσλειτουργία και κυτταρικό θάνατο
Νευροτοξικά	Επηρεάζουν τη μετάδοση των νευρικών σημάτων είτε μέσω αναστολής είτε μέσω αλλοίωσης της διαδικασίας.
Αναστολείς σύνθεσης χιτίνης	Εμποδίζουν την παραγωγή χιτίνης, μιας βασικής ουσίας για τη δομική ακεραιότητα του κυττάρου

Πίνακας 2 : Κατηγορίες παρασιτοκτόνων και μηχανισμοί δράσης τους

Τοξικότητα

Με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) τα φυτοφάρμακα κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες με βάση την τοξικότητα τους.

Κατηγορία WHO	Επίπεδο Τοξικότητας	LD ₅₀ για τον αρουραίο (mg/kg σωματικού βάρους)	Παραδείγματα

Τάξη Ia	Εξαιρετικά επικίνδυνα	Από του στόματος: < 5 Διαδερμικά: < 50	Parathion, Dieldrin
Τάξη Ib	Ιδιαίτερα επικίνδυνα	Από του στόματος: 5–50 Διαδερμικά: 50–200	Eldrin, Dichlorvos
Τάξη II	Μέτρια επικίνδυνα	Από του στόματος: 50–2000 Διαδερμικά: 200–2000	DDT, Chlordane
Τάξη III	Ελαφρώς επικίνδυνα	Από του στόματος: > 2000 Διαδερμικά: > 2000	Malathion
Τάξη IV	Απίθανο να προκαλέσουν οξεία τοξικότητα σε φυσιολογική χρήση	Από του στόματος: ≥ 5000	Carbetamide, Cycloprothrin

Πίνακας 3: κατάταξη φυτοφαρμάκων με βάση την τοξικότητά τους, σύμφωνα με τον WHO (Yadav & Devi, 2017).

Εκλεκτικότητα

Εκτός από την τοξικολογική τους επίδραση, τα φυτοφάρμακα ταξινομούνται και βάσει του φάσματος δράσης τους σε εκλεκτικά και μη εκλεκτικά (γενικής δράσης). Τα εκλεκτικά φυτοφάρμακα δρουν στοχευμένα, επηρεάζοντας μόνο συγκεκριμένα είδη παρασίτων ή παθογόνων, περιορίζοντας την επίδρασή τους σε μη στόχους οργανισμούς και στο ίδιο το φυτό. Αυτή η επιλεκτικότητα προκύπτει από τη μοριακή αλληλεπίδραση του δραστικού συστατικού με έναν ειδικό βιολογικό στόχο (όπως τα ένζυμα ALS, ACCase ή EPSPS), τον οποίο δεν διαθέτουν οι μη στόχοι οργανισμοί (Zelaya & Owen, 2023). Η εκλεκτικότητα αυτή βασίζεται είτε σε φυσιολογικές διαφορές των οργανισμών στόχων (π.χ. σε μεταβολικά μονοπάτια ή σε ένζυμα-στόχους) είτε στον τρόπο εφαρμογής και απορρόφησης του φυτοφαρμάκου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα εκλεκτικά μυκητοκτόνα ή εντομοκτόνα, που περιορίζουν τις παράπλευρες απώλειες και συμβάλλουν στη διατήρηση της οικολογικής ισορροπίας στις γεωργικές εκτάσεις (Kumar et al., 2018). Έτσι, η χρήση τους κρίνεται ιδιαίτερα χρήσιμη όταν απαιτείται στοχευμένη φυτοπροστασία, αποφεύγοντας τις περιττές παρεμβάσεις στο υπόλοιπο οικοσύστημα.

Αντίθετα, τα μη εκλεκτικά φυτοφάρμακα χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα δράσης και προσβάλλουν μεγάλο αριθμό ειδών, ανεξαρτήτως ταξινομικής ομάδας ή λειτουργίας στο οικοσύστημα (Mesnage & Antoniou, 2018). Τα ζιζανιοκτόνα αυτής της κατηγορίας χρησιμοποιούνται συνήθως για την πλήρη απομάκρυνση ανεπιθύμητης χλωρίδας, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου απαιτείται πλήρης καθαρισμός καλλιεργήσιμων εκτάσεων ή βιομηχανικών περιοχών. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η γλυφοσάτη (glyphosate), ένα μη εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο που αναστέλλει τη σύνθεση αρωματικών αμινοξέων μέσω της αναστολής του ενζύμου EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase), οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο όλα τα φυτά ανεξαιρέτως (Van Bruggen et al., 2018). Η εκτεταμένη χρήση τέτοιων ουσιών εγείρει ανησυχίες όχι μόνο για την τοξικότητα σε μη-στόχους οργανισμούς, αλλά και για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε ορισμένα είδη ζιζανίων, καθώς και για τη μεταβολή της βιοποικιλότητας των αγροοικοσυστημάτων.

1.7.3 Επιδράσεις των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον και στους οργανισμούς

Η εκτεταμένη χρήση των φυτοφαρμάκων έχει σημαντικές επιπτώσεις στο περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία. Τα φυτοφάρμακα αποτελούν βασικό εργαλείο προστασίας των γεωργικών και εμπορικών προϊόντων, με περίπου 1,8 δισεκατομμύρια άτομα να εργάζονται στον αγροτικό τομέα παγκοσμίως (P.Kumar et.al.,2023). Η χρήση τους συμβάλλει στον έλεγχο ζιζανίων, εντόμων και παρασίτων, αποτρέποντας παραγωγικές απώλειες έως και 78 % στα φρούτα, 54 % στα λαχανικά και 32 % στα δημητριακά (M.Tudi et.al.,2021). Ωστόσο, λόγω της μη ειδικής τους δράσης, τα φυτοφάρμακα ενέχουν κινδύνους για μη στοχευμένους οργανισμούς και το περιβάλλον, καθώς μπορούν να μεταφερθούν μέσω του αέρα, του νερού ή να προσβάλουν άμεσα τα φυτά μέσω πτητικότητας ή απορρόφης.

Η ανθρώπινη έκθεση στα φυτοφάρμακα μπορεί να είναι άμεση ή έμμεση και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η διάρκεια έκθεσης, η δόση, ο τύπος της ουσίας και οι περιβαλλοντικές συνθήκες. Η τοξικότητα των φυτοφαρμάκων ενισχύεται από τη λιποδιαλυτότητά τους και το μικρό μοριακό βάρος τους, χαρακτηριστικά που

τους επιτρέπουν να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και να συσσωρεύονται στους ιστούς (S. C. Cortés-Iza and A. I. Rodríguez, 2018).

Οι κύριες οδοί έκθεσης περιλαμβάνουν τη δερματική, εκ του στόματος, την αναπνευστική και την οφθαλμική οδό (C.A. Damalas, et al., 2011). Ανάλογα με την οδό, η τοξικότητα και οι επιπτώσεις μπορεί να ποικίλλουν, ενώ ιδιαίτερα ευάλωτες είναι ομάδες όπως οι γυναίκες κατά την περίοδο της κύησης και τα παιδιά. Ετησίως, περίπου 385 εκατομμύρια άτομα –το 44 % του αγροτικού πληθυσμού– επηρεάζονται από δηλητηριάσεις, με περίπου 18.000 θανάτους να καταγράφονται στις αναπτυσσόμενες χώρες λόγω σοβαρής έκθεσης (J. Min et al., 2017).

Οι επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων στην υγεία διακρίνονται σε οξείες και χρόνιες. Οι οξείες περιλαμβάνουν ερεθισμούς, πονοκεφάλους και αναπνευστικά προβλήματα, ενώ οι χρόνιες αφορούν σοβαρές παθήσεις όπως καρκίνο (L.M. Brown, et al., 1990), συγγενείς ανωμαλίες, νευρολογικές και αναπαραγωγικές διαταραχές (M.C. Alavanja, et al., 2004), καθώς και ενδοκρινικές δυσλειτουργίες. Ενώσεις όπως η νικοτίνη, η DDT και το 2,4-διχλωροφαινοξυοξικό οξύ (2,4-D) έχουν συσχετιστεί με λευχαιμίες, λεμφώματα και όγκους του εγκεφάλου. Παρόλο που η γενική έκθεση του πληθυσμού γίνεται σε χαμηλά επίπεδα μέσω του πόσιμου νερού, του αέρα, της σκόνης και των τροφίμων (A. L. Wani et al., 2015), η χρόνια συσσώρευση τους σε λιπώδεις ιστούς, το ήπαρ και τους νεφρούς εγείρει σοβαρές ανησυχίες [I. A. Hundekari et al., 2013]. Οι εργαζόμενοι στον αγροτικό τομέα, και ιδίως όσοι χειρίζονται φυτοφάρμακα, εκτίθενται σε υψηλότερα επίπεδα κινδύνου (G. D. Coronado et al., 2011), ενώ επιδημιολογικές μελέτες τονίζουν την αυξημένη συσχέτιση με διάφορους τύπους καρκίνου, καρδιοπάθειες, διαβήτη, νόσος Parkinson και αναπαραγωγικές δυσλειτουργίες (R. K. Kori et al., 2018; A. Sabarwal et al., 2018).

Η ρύπανση των υδάτων από φυτοφάρμακα αποτελεί επίσης σοβαρό περιβαλλοντικό και υγειονομικό ζήτημα σε παγκόσμια κλίμακα (I. K. Konstantinou et al., 2006), ενώ η χρήση τους σε δημόσιους χώρους ενισχύει την πιθανότητα έκθεσης του γενικού πληθυσμού. Παρά το γεγονός ότι ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν πως μικρές δόσεις δεν προκαλούν μόνιμες βλάβες σε υγιείς ενήλικες (S. Gangemi et al., 2016), η μακροχρόνια έκθεση ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις παραμένει επικίνδυνη. Έτσι, η αύξηση στη χρήση των φυτοφαρμάκων καθιστά αναγκαία την περαιτέρω έρευνα για την κατανόηση των μακροπρόθεσμων επιπτώσεων τους και την ανάπτυξη πολιτικών για τον περιορισμό των σχετικών κινδύνων (C. A. Damalas & I. G. Eleftherohorinos, 2011).

1.7.4 Νομοθετικό πλαίσιο για τη χρήση των φυτοφαρμάκων

Το κανονιστικό πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (ΦΠΠ) είναι ένα από τα αυστηρότερα διεθνώς και αποσκοπεί στη διασφάλιση της υγείας των καταναλωτών, της προστασίας των οικοσυστημάτων και της βιώσιμης αγροτικής παραγωγής. Ήδη από το 1991, η ΕΕ εφάρμοσε κοινοτική πολιτική για την έγκριση, κυκλοφορία και χρήση των φυτοφαρμάκων, προωθώντας την ορθολογική χρήση τους και περιορίζοντας τους κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον (European Commission, 2020).

Ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 396/2005 θεσπίστηκε για να καθορίσει τα ανώτατα επιτρεπτά επίπεδα υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων (MRLs) σε τρόφιμα και ζωοτροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης. Τα επίπεδα αυτά υπολογίζονται βάσει αξιολόγησης κινδύνου και λαμβάνουν υπόψη την τοξικοκινητική συμπεριφορά της ουσίας και τα διατροφικά πρότυπα κατανάλωσης των πολιτών της ΕΕ (EFSA, 2023). Η συμμόρφωση με τα MRLs θεωρείται κρίσιμη για την ασφάλεια των καταναλωτών και για την ομαλή λειτουργία της εσωτερικής αγοράς της ΕΕ (European Commission, 2005). Παράλληλα, ο Κανονισμός (ΕΚ) 1107/2009 αντικατέστησε το προηγούμενο νομικό πλαίσιο, εισάγοντας αυστηρότερα επιστημονικά και περιβαλλοντικά κριτήρια για την έγκριση των δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στα ΦΠΠ. Η έγκριση δίνεται μόνο εφόσον αποδειχθεί, μέσω αξιολόγησης από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) και τις αρμόδιες εθνικές αρχές, ότι οι ουσίες δεν προκαλούν μη αποδεκτές επιπτώσεις στην ανθρώπινη ή ζωική υγεία, ούτε έχουν σοβαρές αρνητικές επιδράσεις στο περιβάλλον, ιδιαίτερα στους υδρόβιους οργανισμούς, τα πουλιά και τις επικονιαστές (European Commission, 2009; EFSA, 2022).

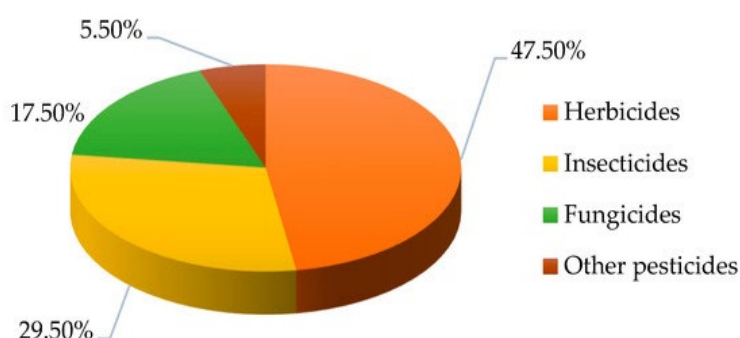
Επιπλέον, το πλαίσιο συνδυάζεται με την Οδηγία 2009/128/ΕΚ, που εισάγει την έννοια της ολοκληρωμένης διαχείρισης επιβλαβών οργανισμών (IPM) και στοχεύει στη μείωση της χρήσης φυτοφαρμάκων με την ενίσχυση εναλλακτικών μεθόδων, όπως οι βιολογικές ή μη-χημικές παρεμβάσεις. Η στρατηγική αυτή υπογραμμίζει τη μετάβαση της ΕΕ σε πιο βιώσιμα συστήματα γεωργίας και ευθυγραμμίζεται με την Πράσινη Συμφωνία και την πρωτοβουλία «Από το Αγρόκτημα στο Πιάτο» (European Commission, 2020).

Παρά την αυστηρότητα των κανονισμών, συνεχίζει να υφίσταται έντονος επιστημονικός και κοινωνικός προβληματισμός αναφορικά με την ασφάλεια της έκθεσης σε υπολείμματα φυτοφαρμάκων, ειδικά κατά την εμβρυϊκή και πρώιμη μεταγεννητική ανάπτυξη. Για τον λόγο αυτό, η τοξικολογική αξιολόγηση των φυτοπροστατευτικών ουσιών απαιτεί συνεχείς αναθεωρήσεις, λαμβάνοντας υπόψη νέες επιστημονικές μελέτες και ευρήματα.

1.7.5 Ζιζανιοκτόνα

Τα ζιζανιοκτόνα αποτελούν μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες φυτοπροστατευτικών προϊόντων, που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση ανεπιθύμητης βλάστησης, δηλαδή ζιζανίων, τα οποία ανταγωνίζονται τις καλλιέργειες για φως, νερό, θρεπτικά συστατικά και χώρο.

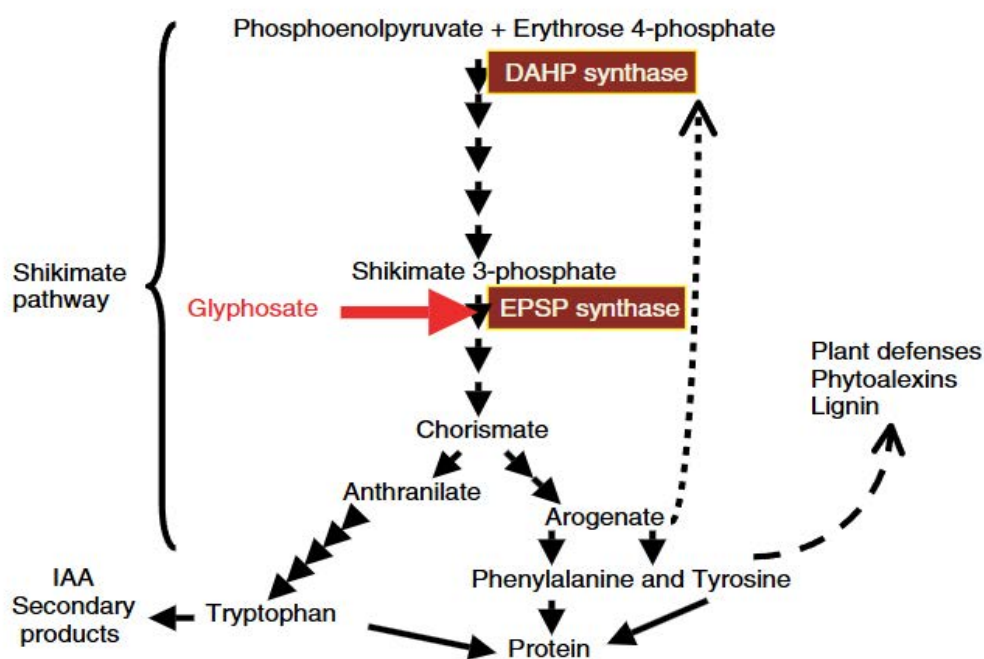
Ο έλεγχος των ζιζανίων είναι κρίσιμος για τη διατήρηση της παραγωγικότητας και της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων, καθώς σε πολλές περιπτώσεις μπορούν να μειώσουν σημαντικά τις αποδόσεις ή ακόμα και να οδηγήσουν σε πλήρη απώλεια της σοδειάς. Η χρήση ζιζανιοκτόνων έχει αυξηθεί ραγδαία τις τελευταίες δεκαετίες, φτάνοντας να αντιπροσωπεύει περίπου το 47,5% της συνολικής παγκόσμιας κατανάλωσης φυτοφαρμάκων, γεγονός που υπογραμμίζει τον κρίσιμο ρόλο τους στη σύγχρονη γεωργία (Baćmaga M. et.al.,2024).



Εικόνα 8: Ποσοστό χρήσης κάθε ομάδας φυτοφαρμάκων παγκοσμίως το 2022 (Baćmaga M. et.al.,2024).

Γλυφοσάτη

Η γλυφοσάτη (Glyphosate, Gly), με τη χημική ονομασία κατά IUPAC *N*-(*phosphonomethyl*)glycine, είναι ένα μη εκλεκτικό, ευρέος φάσματος οργανοφωσφορικό ζιζανιοκτόνο, το οποίο δρα μπλοκάροντας ένα κρίσιμο στάδιο της οδού του σικιμικού οξέος (Amrhein et al., 1980). Σε μοριακό επίπεδο, αναστέλλει ειδικά τη δράση του ενζύμου EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase), το οποίο είναι κρίσιμο για τη σύνθεση των αρωματικών αμινοξέων τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και τρυπτοφάνη, οδηγώντας τελικά στο θάνατο του φυτικού κυττάρου (Duke & Powles, 2008).



Εικόνα 9: Το μονοπάτι του σικιμικού και το σημείο αναστολής του από τη γλυφοσάτη. Παρουσιάζονται τα προϊόντα της οδού και η ρυθμιστική αναστολή της ανατροφοδότησης (διακεκομμένο βέλος) (Duke & Powles, 2008).

Η χρήση της γλυφοσάτης ξεκίνησε τη δεκαετία του 1970 με το προϊόν Roundup® από την εταιρεία Monsanto και εξαπλώθηκε ραγδαία με την εισαγωγή γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών ανθεκτικών στη δραστική ουσία, παρά το υψηλότερο κόστος των σπόρων αυτών (Szekacs & Darvas, 2012). Μετά την εκπνοή της πατέντας της Monsanto, κυκλοφόρησαν γενόσημα σκευάσματα με μεταβλητή χημική σύνθεση και διαφοροποιημένο τοξικολογικό προφίλ. Όμως, η υπερβολική και συνεχής χρήση της οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικών ζιζανίων, κυρίως σε χώρες όπως η Αργεντινή, η Αυστραλία, η Βραζιλία, ο Καναδάς και οι ΗΠΑ (Heap & Duke, 2018). Η εξελικτική αυτή πίεση αναδεικνύει την επιτακτική ανάγκη εφαρμογής στρατηγικών

ολοκληρωμένης διαχείρισης ζιζανίων για τη βιώσιμη και αποτελεσματική αντιμετώπιση του προβλήματος (Mortensen et al., 2012). Επιπλέον, τις τελευταίες δεκαετίες έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στη γενετική τροποποίηση φυτικών ειδών, με σκοπό τη δημιουργία καλλιεργειών ανθεκτικών σε πολλαπλά ζιζανιοκτόνα. Συγκεκριμένα, έχουν αναπτυχθεί γενετικά τροποποιημένα (GM) φυτά που φέρουν συνδυασμένα γονίδια ανθεκτικότητας σε διαφορετικές δραστικές ουσίες, όπως η γλυφοσάτη και το 2,4-D, επιτρέποντας την ταυτόχρονη ή διαδοχική εφαρμογή ζιζανιοκτόνων με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης (Duke & Powles, 2009; Green & Owen, 2011).

Η απουσία της οδού του σικιμικού οξέος στους ζωικούς οργανισμούς αποτέλεσε τη βάση για τον αρχικό χαρακτηρισμό της γλυφοσάτης ως χημικής ένωσης χαμηλής τοξικότητας για τον άνθρωπο και τα ζώα (Duke & Powles, 2008). Ωστόσο, νεότερα ερευνητικά δεδομένα έχουν αμφισβητήσει αυτήν την εκτίμηση, καθώς έχουν τεκμηριωθεί ποικίλες τοξικολογικές επιδράσεις της γλυφοσάτης, καθιστώντας την αντικείμενο συνεχούς επιστημονικής παρακολούθησης για τις επιπτώσεις της τόσο στην υγεία όσο και στο περιβάλλον.. Συγκεκριμένα, έχουν αποδειχθεί επιπτώσεις στο μεταβολισμό των ηπατικών κυττάρων, την ισορροπία οξειδοαναγωγής, καθώς και σε παραμέτρους ενδοκρινικής τοξικότητας ή και νευροτοξικότητας (Myers et al., 2016; Mesnage & Antoniou, 2017). Ταυτόχρονα, εργαστηριακές έρευνες και *in vivo* μελέτες σε ζώα ξεκίνησαν να καταγράφουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις στον εντερικό βλεννογόνο, ανασταλτικές αλλαγές στο ηπατικό μεταβολισμό και δυναμικές αλλαγές στην μικροβιακή σύνθεση του εντέρου (Mesnage et al., 2015).

Η εφαρμογή της σε ανθεκτικές καλλιέργειες έχει άμεσες και έμμεσες επιπτώσεις στη βιοποικιλότητα, ιδίως μέσω της προώθησης μονοκαλλιεργειών, που μειώνουν τη διαθεσιμότητα τροφής για επικονιαστές (Rolando et al., 2017). Επιπλέον, η γλυφοσάτη μπορεί να λειτουργήσει ως χηλικός παράγοντας, σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα με δισθενή ιόντα μετάλλων, επηρεάζοντας έτσι τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών στο έδαφος (Hansen & Roslev, 2016). Παρά το γεγονός ότι παραμένει στο έδαφος, η γλυφοσάτη και ο κύριος μεταβολίτης της, AMPA, έχουν ανιχνευτεί σε υδάτινα οικοσυστήματα και παρουσιάζουν αντίστοιχες οικοτοξικολογικές ανησυχίες (Van Bruggen et al., 2018).

Σε επίπεδο δημόσιας υγείας, αυξανόμενες ενδείξεις συσχετίζουν τη χρόνια έκθεση στη γλυφοσάτη με ανεπιθύμητες επιπτώσεις. Οι Hoy & Swanson (2016) αναφέρουν ενδεχόμενες συσχετίσεις της χρήσης της με αναπτυξιακές και

νευρολογικές διαταραχές. Ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer, IARC) ταξινόμησε τη γλυφosatή, το 2015 ως πιθανώς καρκινογόνο για τον άνθρωπο (ομάδα 2^A), με βάση δεδομένα από μελέτες σε πειραματόζωα και περιορισμένες αποδείξεις συσχέτισης με εμφάνιση καρκίνου σε ανθρώπου (Guyton et al., 2015). Ωστόσο, αυτή η αξιολόγηση δεν έγινε αποδεκτή από τις Ευρωπαϊκές Αρχές, ούτε από την κοινή επιτροπή του FAO και του WHO, η οποία ανέλαβε την επανεξέταση του ζητήματος.

Στη βιβλιογραφία αποδεικνύεται ότι η γλυφosatή είναι τοξική ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, προκαλώντας τερατογένεση, ηπατονεφρικές βλάβες και πιθανή καρκινογένεση (Mesnage et al., 2015). Οι Myers et al. (2016) τονίζουν την ανάγκη για επανεκτίμηση των ορίων ασφαλείας, καθώς αυτά βασίζονται σε δεδομένα παρελθοντικών ερευνών, ενώ επίσης σημαντικό εύρημα αποτελεί και η ρύπανση πηγών πόσιμου νερού σε αγροτικές περιοχές. Η ανάγκη για επαναξιολόγηση κινδύνου είναι επιτακτική, όχι μόνο για τις άμεσες επιπτώσεις στις καλλιέργειες, αλλά και για τις έμμεσες επιπτώσεις μέσω της τροφικής αλυσίδας και της ανθρώπινης έκθεσης. Η πρόσφατη μελέτη των Gillezeau et al. (2019) αναδεικνύει την έλλειψη δεδομένων σχετικά με τα επίπεδα έκθεσης του ανθρώπου στη γλυφosatή, ιδίως για ευάλωτους πληθυσμούς, όπως τα παιδιά αλλά και αυτούς που εκτίθενται λόγω του επαγγέλματος τους, όπως οι αγρότες.

2,4-D (2,4-διχλωροφαινοξυοξικό οξύ)

Το 2,4-D είναι ένα από τα παλαιότερα και πιο διαδεδομένα ζιζανιοκτόνα, το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως για την καταπολέμηση πλατύφυλλων ζιζανίων σε καλλιέργειες δημητριακών, χλοοτάπητες και δασικές περιοχές. Πρόκειται για μία συνθετική ένωση που μιμείται τη φυσική φυτική ορμόνη αυξίνη, προκαλώντας ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη και τελικά το θάνατο του φυτού (Gianessi, 2013).

Παρότι η αρχική του χρήση βασίστηκε στην εκλεκτική του δράση απέναντι στα ζιζάνια, τα τελευταία χρόνια πληθαίνουν οι ενδείξεις για την πιθανή τοξικότητα του 2,4-D σε οργανισμούς που δεν αποτελούν στόχο του ζιζανιοκτόνου αυτού, συμπεριλαμβανομένων και των θηλαστικών. Η ουσία έχει συσχετιστεί με οξειδωτικό στρες, αυξημένα επίπεδα ελευθέρων ριζών και κυτταρικές βλάβες στο ήπαρ, τους νεφρούς και τον εγκέφαλο (Nwani et al., 2013). Επιπλέον, πειράματα σε ιχθύες και τρωκτικά έχουν δείξει εμφάνιση νευροτοξικότητας και καταστολή της αντιοξειδωτικής

άμυνας, στοιχείο που προκαλεί ανησυχία για πιθανές επιπτώσεις στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας (Gutiérrez et al., 2010).

Σημαντικό ζήτημα αποτελεί και η ενδοκρινική διαταραχή που φαίνεται να προκαλεί το 2,4-D, με δεδομένα να υποδεικνύουν αλληλεπιδράσεις της ουσίας με τους θυρεοειδικούς και στεροειδικούς υποδοχείς (Mnif et al., 2011). Επιπλέον, παρουσιάζει αντοχή στη βιοαποδόμηση, γεγονός που οδηγεί σε παρατεταμένη παραμονή στο έδαφος και στο νερό, αυξάνοντας την πιθανότητα βιοσυσώρευσης σε ανθρώπους και ζώα (Meffaul et al., 2020). Με βάση τα παραπάνω, ο IARC το κατέταξε ως "πιθανώς καρκινογόνο για τον άνθρωπο" (Group 2B) (IARC, 2018).

Η ανησυχία εντείνεται ακόμη περισσότερο λόγω της αυξανόμενης χρήσης γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών ανθεκτικών στο 2,4-D έχει συμβάλει στην εκτεταμένη εφαρμογή του σε παγκόσμια κλίμακα, γεγονός που εντείνει τις ανησυχίες για την ανάπτυξη ανθεκτικών πληθυσμών ζιζανίων και την περιβαλλοντική ρύπανση (Mortensen et al., 2012).

Dicamba (3,6 διχλωρο-2-μεθοξυβενζοϊκό οξύ)

Το dicamba είναι εκλεκτικό συνθετικό ζιζανιοκτόνο της κατηγορίας των βενζοϊκών οξέων, που χρησιμοποιείται από τη δεκαετία του 1960 για την καταπολέμηση πλατύφυλλων ζιζανίων και ξυλωδών φυτών (Agency UEP, 2006). Συγκεκριμένα, δρα ως ανάλογο των αυξινών, προκαλώντας υπερδιέγερση της φυτικής ανάπτυξης και τελικά θάνατο των πλατύφυλλων φυτών. Η εφαρμογή του αυξάνεται διαρκώς, κυρίως λόγω της ανάπτυξης γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών ανθεκτικών στο dicamba, επιτρέποντας την αποτελεσματική καταπολέμηση ζιζανίων ακόμη και σε προχωρημένα στάδια ανάπτυξης (Gaines et al., 2020).

Ωστόσο, το dicamba χαρακτηρίζεται από υψηλή πτητικότητα και μπορεί εύκολα να μεταφερθεί σε γειτονικές περιοχές μέσω φαινομένων drift, επηρεάζοντας μη στοχευμένες καλλιέργειες και φυσικά οικοσυστήματα (Mortensen et al., 2012). Οι περιβαλλοντικές του επιπτώσεις είναι ήδη εμφανείς σε αγροκτήματα όπου καλλιέργειες όπως ντομάτες, σταφύλια ή βαμβάκι έχουν υποστεί ζημιές χωρίς να έχουν εκτεθεί άμεσα στο ζιζανιοκτόνο.

Έρευνες με χρήση πλατφορμών υψηλής ευαισθησίας, όπως το σύστημα ToxTracker, κατέδειξαν ενεργοποίηση γονιδιακής απόκρισης στο οξειδωτικό στρες και

τη βλάβη στο DNA, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις συνδυαστικής έκθεσης με άλλα ζιζανιοκτόνα (Kleinstreuer et al., 2022). Επίσης, υπάρχουν στοιχεία που συνδέουν την έκθεση σε dicamba με δυσλειτουργία των νεφρών και του ήπατος, ενώ μελέτες σε μύες δείχνουν μεταβολικές διαταραχές και ενδοκρινική διαταραχή (Mink et al., 2011). Οι μακροχρόνιες επιπτώσεις στον άνθρωπο παραμένουν ακόμη υπό μελέτη, ωστόσο η συστηματική παρακολούθηση και αξιολόγηση της ασφάλειας είναι κρίσιμη.

Μίγματα γλυφοσάτης

Η αυξανόμενη ανθεκτικότητα των ζιζανίων στη γλυφοσάτη έχει οδηγήσει στην ανάγκη διαφοροποίησης των μηχανισμών δράσης των ζιζανιοκτόνων. Μία από τις κύριες γεωργικές πρακτικές που εφαρμόζεται σήμερα είναι ο συνδυασμός της γλυφοσάτης με ζιζανιοκτόνα που μιμούνται τις αυξίνες, όπως τα 2,4-διχλωροφαινοξυοξικό οξύ (2,4-D) και dicamba (3,6 διχλωρο-2-μεθοξυβενζοϊκό οξύ), που δρουν με διαφορετικό μηχανισμό προκαλώντας ανεξέλεγκτη ανάπτυξη στα φυτικά κύτταρα και οδηγώντας το φυτό στον θάνατο μέσω ενδογενούς καταρράκτη απορρύθμισης (Todd et al., 2020).

Η γλυφοσάτη αποτελεί τη δραστική ουσία σε εκατοντάδες εμπορικά ζιζανιοκτόνα παγκοσμίως. Τα εμπορικά σκευάσματα περιλαμβάνουν και άλλες ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τους κατασκευαστές ως αδρανείς, με περιορισμένο έλεγχο τοξικότητας από τις εθνικές ρυθμιστικές αρχές. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι τα βοηθητικά συστατικά των σκευασμάτων που βασίζονται στη γλυφοσάτη είναι συχνά πολύ πιο τοξικά από την ίδια την ουσία (Mesnage et al., 2015). Ωστόσο, υπάρχουν σοβαρά κενά γνώσης σχετικά με τις επιπτώσεις στην υγεία από τη χρήση ζιζανιοκτόνων σε συνδυασμό με γλυφοσάτη.

Παράλληλα, η χρήση μιγμάτων ενισχύθηκε περαιτέρω με την ανάπτυξη νέων γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών ανθεκτικών σε συνδυασμό δραστικών ουσιών, όπως γλυφοσάτη και dicamba ή γλυφοσάτη και 2,4-D. Οι ποικιλίες αυτές προσφέρουν τη δυνατότητα πολλαπλών εφαρμογών με διαφορετικά ζιζανιοκτόνα, προσφέροντας μεγαλύτερη ευελιξία και καλύτερο έλεγχο ζιζανίων που είχαν ήδη αναπτύξει ανθεκτικότητα σε ένα μόνο δραστικό συστατικό (Waltz, 2015).

Ως αποτέλεσμα αυτής της σύνθετης και πολυχημικής έκθεσης, η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί, τα τελευταία χρόνια, στη εκτίμηση τοξικολογικού κινδύνου σε μίγματα. Οι συνέργειες μεταξύ διαφόρων χημικών ενώσεων, ακόμη και σε πολύ

χαμηλές δόσεις, μπορεί να οδηγήσουν σε τοξικές επιδράσεις, ακόμα και όταν οι συγκεντρώσεις αυτές θεωρούνται αποδεκτές από κανονιστικές αρχές (Hernández et al., 2020b; Mesnage et al., 2021b; Tsatsakis et al., 2016, 2017). Επιπλέον, μελέτες χρόνιας χαμηλής δόσης σε εργαστηριακά ζώα με ρεαλιστικά μίγματα φυτοφαρμάκων χημικών που χρησιμοποιούνται στην καθημερινότητα έχουν δείξει βλαπτικές επιδράσεις στην υγεία, όπως διαταραχές στο ενδοκρινικό και το ηπατικό σύστημα (Docea et al., 2019; Sergievich et al., 2020; Tsatsakis et al., 2019a, 2019b; Vardakas et al., 2022).

1.7.6 Διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας από τα ζιζανιοκτόνα

Αν και δεν υπάρχει σαφής κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα φυτοφάρμακα στοχεύουν διαφορετικές δομές και σηματοδοτικές οδούς των κυττάρων, υπάρχουν ενδείξεις ότι κάποια από αυτά προκαλούν εκτεταμένες βλάβες σε πολλά όργανα. Για παράδειγμα, το paraquat έχει συνδεθεί με δυσλειτουργία των νεφρών, των πνευμόνων, της καρδιάς, του γαστρεντερικού συστήματος, του νευρικού συστήματος και του ανοσοποιητικού (J. Chen, et al., 2021, Q. Li, et al., 2007, W. Ge, et al., 2010). Παράλληλα, άλλες μελέτες έχουν συνδέσει την έκθεση σε φυτοφάρμακα με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Συγκεκριμένα, το DDT και οι μεταβολίτες του έχουν σχετιστεί με καρκίνο του ήπατος, του μαστού και των όρχεων (B. A. Cohn, et al., 2007, K. A. McGlynn, et al., 2008). Παρά την έλλειψη εξειδικευμένων μελετών για την επίδραση των φυτοφαρμάκων σε συγκεκριμένους ιστούς, η επιστημονική έρευνα δείχνει ότι ένας κοινός μηχανισμός τοξικότητας αφορά την πρόκληση οξειδωτικού στρες.

Το οξειδωτικό στρες αναγνωρίζεται ως ένα κρίσιμο τελικό τοξικολογικό σημείο στην αξιολόγηση της ασφάλειας των ζιζανιοκτόνων, δεδομένης της συσχέτισής του με πλήθος κυτταρικών δυσλειτουργιών. Η υπερπαραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε φυτοπροστατευτικές χημικές ουσίες, μπορεί να απορρυθμίσει την κυτταρική οξειδοαναγωγική ισορροπία και να οδηγήσει σε οξειδωτική βλάβη λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων, ενεργοποιώντας τελικά σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν στην απόπτωση ή νέκρωση (J. Mele, et al., 2006). Ειδικότερα, η έκθεση σε φυτοφάρμακα συσχετίζεται συχνά με την υπερβολική παραγωγή ROS, υπερβαίνοντας τις ικανότητες των ενδογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων και διαταράσσοντας την κυτταρική οξειδοαναγωγική ομοιόσταση.

Ερευνητικά δεδομένα καταδεικνύουν ότι το φυτοφάρμακο Diquat (1,1'-ethylene-2,2'-bipyridinium ion) μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή της ομοιόστασης όχι μόνο μέσω της παραγωγής ROS αλλά και μέσω της αυξημένης παραγωγής RNS, ειδικά του υπεροξυνιτρώδους ανιόντος (ONOO-) (Y. Fu, et al.,2001). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για την περμεθρίνη και την κυπερμεθρίνη, που προκαλούν αύξηση της έκφρασης της επαγόμενης συνθάσης του NO (iNOS) και αύξηση των νιτρικών βλαβών στο DNA (Y. Jin, et al.,2010, D. Fedeli, et al., 2013, O. K. Afolabi, et al., 2019). Η παρουσία αυξημένων επιπέδων NO και των μεταβολιτών του στο αίμα μπορεί να οδηγήσει σε γενικευμένη οξειδωτική και νιτρική βλάβη, προκαλώντας δυσλειτουργία πολλών οργάνων (D. A. Drechsel and M. Patel,2008).

1.7.7 Περιγεννητική έκθεση σε ζιζανιοκτόνα

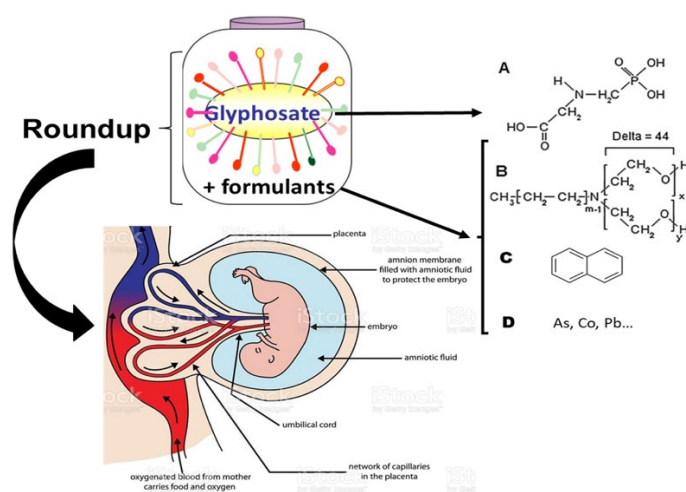
Η περιγεννητική έκθεση αναφέρεται στην έκθεση ενός οργανισμού σε χημικούς, φυσικούς ή βιολογικούς παράγοντες κατά τη διάρκεια της περιγεννητικής περιόδου, η οποία περιλαμβάνει το προγεννητικό στάδιο (ενδομήτρια ζωή), τον τοκετό και την άμεση μεταγεννητική περίοδο (τις πρώτες ημέρες, εβδομάδες ή και μήνες ζωής). Αυτή η περίοδος θεωρείται ιδιαίτερα ευαίσθητη, καθώς κατά τη διάρκειά της πραγματοποιούνται κρίσιμες διεργασίες ανάπτυξης και διαφοροποίησης των οργάνων και συστημάτων του σώματος. Η έκθεση σε τοξικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου μπορεί να έχει μακροχρόνιες ή και μόνιμες επιδράσεις στην υγεία του ατόμου, που περιλαμβάνουν αυξημένο κίνδυνο για νευροαναπτυξιακές διαταραχές, μεταβολικά σύνδρομα, ανοσολογικές δυσλειτουργίες, καθώς και καρκινογένεση, επειδή το αναπτυσσόμενο έμβρυο και το νεογνό έχουν ανεπαρκείς αμυντικούς μηχανισμούς (Manzano-Salgado, Cyntia B., et al.,2015 , Di Renzo GC et.al.,20215).

Η έκθεση σε ζιζανιοκτόνα κατά τα πρώιμα στάδια της ζωής έχει συνδεθεί με την εμφάνιση αναπνευστικών παθήσεων όπως το άσθμα και οι αλλεργίες. Συγκεκριμένα, κατά τον πρώτο χρόνο ζωής σχετίστηκε με αυξημένες πιθανότητες διάγνωσης άσθματος πριν από την ηλικία των πέντε ετών (Salam et al., 2004). Επίσης, έχει αποδειχθεί πως η έκθεση σε 2,4-D κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης αλλεργικής ρινίτιδας στα παιδιά (Weselak et al., 2007). Ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί το γεγονός ότι ο ταχύτατα αναπτυσσόμενος

εγκέφαλος του εμβρύου μπορεί να είναι ευάλωτος σε μακροχρόνιες συνέπειες από την περιγεννητική έκθεση σε ζιζανιοκτόνα. Ωστόσο, ο αριθμός των μελετών που έχουν εξετάσει την πιθανή νευροαναπτυξιακή επίδραση τέτοιων εκθέσεων είναι πολύ περιορισμένος (Garry et al., 2002; Gunier et al., 2017; Mora et al., 2018).

Η έκθεση έγκυων γυναικών σε φυτοφάρμακα όπως η γλυφοσάτη, το paraquat και το imidacloprid έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο συγγενών ανωμαλιών. Από το 2002 έως το 2006, μελέτη στη Βρετανία διερεύνησε την επίδραση της έκθεσης σε γεωργικά φυτοφάρμακα κατά την εγκυμοσύνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι βρέφη μητέρων που ζούσαν σε αγροτικές περιοχές είχαν μικρότερη περίμετρο κεφαλής και αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης συγγενούς καρδιακής ανεπάρκειας (SHC) (C. Petit et.al., 2010). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η περιγεννητική έκθεση σε OPPs επηρεάζει την ανάπτυξη των όρχεων στους απογόνους, οδηγώντας σε αύξηση του αριθμού των σωληναρίων, μείωση της διαμέτρου του επιθηλίου και των σπερματικών σωληναρίων, ακόμα κι αν δεν παρατηρείται μεταβολή στη λειτουργία των όρχεων (C.F. Samprai et.al., 2019).

Τέλος, υπάρχει πληθώρα επιδημιολογικών δεδομένων που καταδεικνύουν σύνδεση μεταξύ γεωργικής απασχόλησης των γονέων και επιπλοκών κύησης, όπως χαμηλό βάρος γέννησης, πρόωρος τοκετός, συγγενείς ανωμαλίες, αποβολές και θνησιγένεια. Αν και τα διαθέσιμα στοιχεία δεν αποτυπώνουν πάντοτε σαφείς μεταβολές στα επίπεδα σεξουαλικών ορμονών, υπάρχει εντεινόμενη επιστημονική ένδειξη ότι η επαγγελματική έκθεση σε φυτοφάρμακα σχετίζεται με μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα και αυξημένες δυσκολίες σύλληψης (W.Hanke et.al., 2004).



Εικόνα 10 : Διάγραμμα διαπλακουντιακής μεταφοράς γλυφοσάτης. Απεικονίζεται η δυνατότητα της γλυφοσάτης, ιδιαίτερα όταν περιέχεται σε εμπορικά σκευάσματα όπως το Roundup, διαπερνά τον πλακούντα και φθάνει στο έμβρυο. Αυτό υποδεικνύει τον άμεσο κίνδυνο περιγεννητικής έκθεσης και τις πιθανές επιπτώσεις στην εμβρυϊκή ανάπτυξη (Mesnage R, Antoniou MN,2017).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση των επιπτώσεων της μακροχρόνιας έκθεσης σε χαμηλές δόσεις της γλυφοσάτης και του μίγματος αυτής με τις ενώσεις 2,4-διχλωροφαινοξυοξικό οξύ (2,4-D) και dicamba (3,6 διχλωρο-2-μεθοξυβενζοϊκό οξύ) στο οξειδοαναγωγικό προφίλ εγκεφάλου επίμυων. Η έκθεση πραγματοποιήθηκε από την 6η ημέρα της κύησης έως και την πρώιμη ενήλικη ζωή των απογόνων, προσομοιώνοντας ρεαλιστικές συνθήκες περιβαλλοντικής έκθεσης, καθώς εξετάζει μίγμα ζιζανιοκτόνων σε επιτρεπτές δόσεις από τις ρυθμιστικές αρχές της Ευρωπαϊκής Ένωσης: ημερήσια αποδεκτή πρόσληψη (Acceptable Daily Intake, ADI) και επίπεδο μη παρατηρούμενης ανεπιθύμητης επίδρασης (Non-observed Adverse Effect Level, NOAEL).

Για την εκτίμηση της επίδρασης αυτής, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός κρίσιμων βιοδεικτών της οξειδοαναγωγικής κατάστασης στον εγκέφαλο, με σκοπό την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής άμυνας και της παρουσίας επαγόμενης οξειδωτικής βλάβης. Ειδικότερα, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC), καθώς και ο ρυθμός αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Παράλληλα, εκτιμήθηκαν δείκτες οξειδωτικής βλάβης, όπως οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), ως δείκτες λιπιδικής υπεροξειδωσης, και οι πρωτεϊνικές καρβονυλικές ομάδες (PCARBs), ως δείκτες πρωτεϊνικής οξείδωσης.

Τα ευρήματα της παρούσας έρευνας αναμένεται να εμπλουτίσουν τη διαθέσιμη βιβλιογραφία σχετικά με τις νευροτοξικές επιδράσεις των φυτοφαρμάκων και να προσφέρουν πολύτιμα δεδομένα στις ρυθμιστικές αρχές για την επανεξέταση των μεθοδολογιών εκτίμησης κινδύνου και την ανάπτυξη πιο αυστηρών προσεγγίσεων στην αξιολόγηση της ασφάλειας χημικών μιγμάτων.



ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Εργαστηριακά ζώα

Στο πλαίσιο της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 20 ενήλικοι έγκυοι θηλυκοί επίμυες της φυλής Wistar, κλινικά υγιείς, με μέσο σωματικό βάρος περίπου 300 g. Τα ζώα εγκλιματίστηκαν για κατάλληλο χρονικό διάστημα πριν την έναρξη της δοκιμής και στεγάστηκαν σε ειδικά σχεδιασμένα κλουβιά με ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού (κύκλος 12 ώρες φως / 12 ώρες σκοτάδι), θερμοκρασίας (19–23°C), και σχετικής υγρασίας (35–55%). Η διατροφή τους περιλάμβανε τυποποιημένη τροφή για τρωκτικά (παραγωγής Cantacuzino Institute, Βουκουρέστι) και πρόσβαση σε φιλτραρισμένο πόσιμο νερό, που λάμβαναν κατά βούληση.

Όλες οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Οδηγίας 2010/63/EE σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς και εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Ηθικής του Πανεπιστημίου Ιατρικής και Φαρμακευτικής της Κραϊόβα (Ρουμανία).

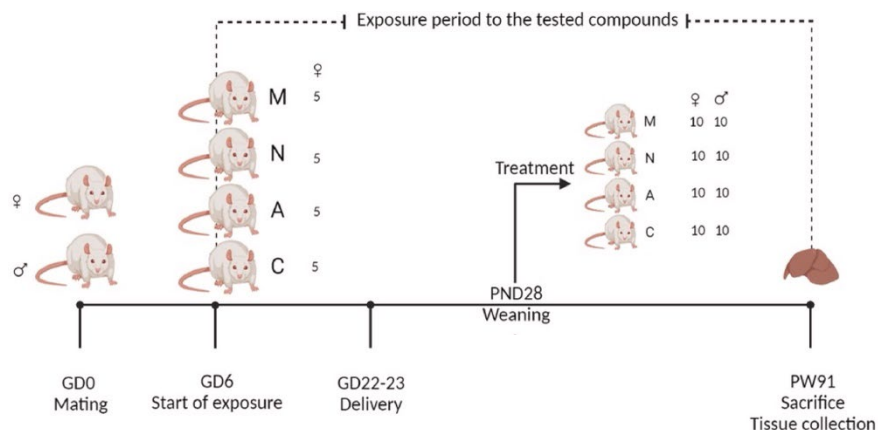
3.2 Δοσολογία και τρόπος χρήσης ζιζανιοκτόνων

Για την εκτίμηση των επιδράσεων της γλυφosatής, επιλέχθηκαν δύο επίπεδα δόσεων: ημερήσια αποδεκτή πρόσληψη (Acceptable Daily Intake, ADI) και επίπεδο μη παρατηρούμενης ανεπιθύμητης επίδρασης (Non-observed Adverse Effect Level, NOAEL), που αντιστοιχούν σε 0,5 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα και 50 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα European Food Safety Authority (EFSA), 2015). Για το μίγμα των ζιζανιοκτόνων, το οποίο περιλάμβανε γλυφosatή, 2,4-διχλωροφαινοξυξικό οξύ (2,4-D) και dicamba (3,6-διχλωρο-2-μεθοξυβενζοϊκό οξύ), οι χορηγούμενες δόσεις

βασίστηκαν στις αντίστοιχες τιμές ADI των επιμέρους ουσιών, δηλαδή 0,5 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, 0,3 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα (European Food Safety Authority (EFSA), 2014), και 0,02 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, European Food Safety Authority (EFSA), 2013), αντίστοιχα. Όλες οι δόσεις ήταν εναρμονισμένες με τις επίσημες κατευθυντήριες γραμμές της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA).

3.3 Πειραματικός σχεδιασμός

Το πειραματικό πρωτόκολλο περιελάμβανε τέσσερις πειραματικές ομάδες, καθεμία από τις οποίες αποτελούνταν από πέντε εγκύους θηλυκούς επίμυες Wistar. Η πρώτη ομάδα αποτέλεσε την ομάδα αναφοράς (Control) και δεν εκτέθηκε σε καμία χημική ουσία. 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), ενώ η τέταρτη ομάδα έλαβε το μίγμα γλυφοσάτης, 2,4-D και dicamba, στην αντίστοιχη δόση ADI του κάθε ζιζανιοκτόνου (Mixture ADI). Η έναρξη της χορήγησης των ουσιών έγινε την έκτη ημέρα της κύησης, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες OECD TG 414, και συνεχίστηκε καθ' όλη τη διάρκεια της κυοφορίας και του θηλασμού, μέχρι και τον απογαλακτισμό των νεογνών, 28 ημέρες μετά τη γέννηση. Μετά τον απογαλακτισμό, οι απόγονοι διαχωρίστηκαν από τις μητέρες τους και εξακολούθησαν να λαμβάνουν το ίδιο σχήμα δόσεων, για διάστημα 13 επιπλέον εβδομάδων, καλύπτοντας έτσι το χρονικό πλαίσιο υποχρόνιας έκθεσης 90 ημερών, σύμφωνα με τα κριτήρια τοξικολογικής αξιολόγησης. Κάθε πειραματική ομάδα αποτελούνταν από 20 απογόνους (10 αρσενικοί και 10 θηλυκοί).



Εικόνα 11 : Πειραματικός σχεδιασμός: Η έκθεση των μητέρων ξεκίνησε την 6η ημέρα κύησης (GD6) και συνεχίστηκε καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της περιόδου γαλουχίας, μέχρι την 28η ημέρα μετά τη γέννηση (PND28). Συνολικά 80 νεογνά συνέχισαν να λαμβάνουν την ουσία ή μίγμα ουσιών που αντιστοιχούσε στην αρχική ομάδα από την οποία προέρχονταν, για επιπλέον 13 εβδομάδες μετά τον απογαλακτισμό. Αντίθετα, τα υπόλοιπα τρέφονταν με τυπική τροφή για τρωκτικά, χωρίς περαιτέρω έκθεση σε ουσίες. Οι πειραματικές ομάδες περιλάμβαναν:

- **C:** ομάδα ελέγχου (χωρίς έκθεση),
- **A:** ομάδα με δόση αντίστοιχη της Αποδεκτής Ημερήσιας Πρόσληψης (ADI) γλυφωσάτης,
- **N:** ομάδα με δόση ίση με το Επίπεδο Μη Παρατηρούμενης Ανεπιθύμητης Ενέργειας (NOAEL) γλυφωσάτης,
- **M:** ομάδα που εκτέθηκε σε μείγμα ζιζανιοκτόνων: glyphosate, dicamba και 2,4-D. (Nechaloti, P. M et.al.,2023)

3.4 Συλλογή και προετοιμασία ιστού



Μετά την ολοκλήρωση της περιόδου χορήγησης, οι απόγονοι υπέστησαν ευθανασία υπό βαθιά αναισθησία με ενδοπεριτοναϊκή ένεση συνδυασμού ξυλαζίνης και κεταμίνης (9,1 mg/kg σωματικού βάρους). Ακολούθησε συλλογή του εγκεφαλικού ιστού, ο οποίος εκπλύθηκε με ισοτονικό διάλυμα φυσιολογικού ορού (NaCl 0,9%) για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αίματος. Εν συνεχεία, έγινε σε υγρό άζωτο και αποθήκευση σε περιβάλλον -80°C, έως την έναρξη των βιοχημικών αναλύσεων.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ακριβής ζύγιση ορισμένης ποσότητας ιστού δείγματος, και κατόπιν προσθήκη φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS), με ειδικούς αναστολείς πρωτεασών (Complete™ Mini,

Roche), σε αναλογία 1:4. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε κατάλληλα σωληνάρια ομογενοποίησης και υποβλήθηκαν σε μηχανική ομογενοποίηση υψηλής ταχύτητας (Bertin Technologies), για 30 δευτερόλεπτα στην πλήρη ένταση.

Αμέσως μετά την ομογενοποίηση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στους 15.000 g για 5 λεπτά στους 5°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε προσεκτικά και αποθηκεύτηκε εκ νέου στους -80°C έως τη διεξαγωγή των επιμέρους βιοχημικών αναλύσεων, οι οποίες αφορούσαν την αξιολόγηση οξειδοαναγωγικών δεικτών.

3.5 Εκτίμηση δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης

3.5.1 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης ιστού

Ο προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης βόειου ορού, με χρήση του αντιδραστήριου Bradford (Bradford, M. M., 1976).

Πειραματική διαδικασία

	Blank	Δείγμα
Αντιδραστήριο Bradford	1ml	1ml
Ομογενοποιημένος ιστός	-	20μl
PBS	20μl	-

Πίνακας 5: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε διαδοχική για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με το αντιδραστήριο Bradford

Ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά και καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στα 595 nm.

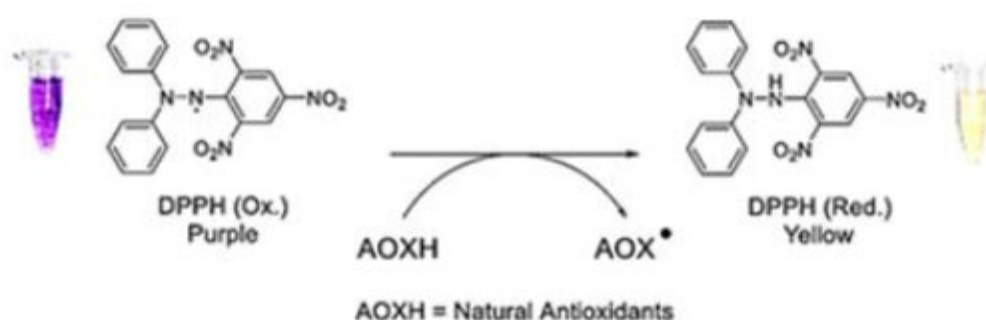
Υπολογισμοί

Η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης, υπολογίστηκε σύμφωνα με τους συντελεστές που προέκυψαν από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης σε mg/ml.

3.5.2 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Αρχή της μεθόδου

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αναφέρεται στην ικανότητα όλων των συστατικών του ιστού να ανάγουν την τεχνητή ρίζα DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine), η μετατροπή της οποίας υπολογίζεται με μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 520 nm.



Εικόνα 12: Μέθοδος ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) (Ioana, Rugina, and Socaciu 2012).

Πειραματική διαδικασία

	Blank	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500μl	460μl
DPPH 0.1 mM	500μl	500μl
Ομογενοποιημένος ιστός	-	40μl

Πίνακας 6: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε διαδοχική για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας TAC

Ακολούθησε επώαση για 60 λεπτά στο σκοτάδι, φυγοκέντρηση (15000g, 3 min, RT) και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 520 nm.

Υπολογισμοί

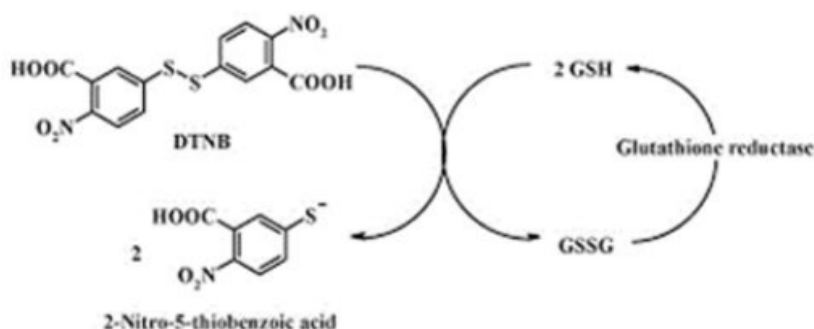
$$\begin{aligned} & \mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL ιστού} = \\ & [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 25 \times 4 \times 5] / 1000 \end{aligned}$$

όπου: διαίρεση με το 100 για τη ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης, πολλαπλασιασμός με το 50 για τη συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα (50 μmol/L), πολλαπλασιασμός με το 25 για την 25πλάσια αραίωση του ιστού στην κυψελίδα, πολλαπλασιασμός με το συντελεστή ομογενοποίησης (4), πολλαπλασιασμός με το συντελεστή αραίωσης που έγινε στον ιστό για τη μέθοδο (5) 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.

3.5.3 Προσδιορισμός των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειοδυο-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB), παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ, το οποίο έχει απορρόφηση στα 412 nm (Reddy et al, 2004).



Εικόνα 13: Αντίδραση της GSH με το DTNB (Araujo et al, 2008).

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάμιξη με 35 μl ομογενοποιημένου ιστού και 35 μl TCA 5% (1:1) και ακολούθησε φυγοκέντρηση (15,000 g, 5 min, 5 °C). Συλλέχθηκε το υπερκείμενο και ακολούθησαν τα παρακάτω:

	Blank	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μl	660 μl
PBS	20 μl	-

Ομογενοποιημένος ιστός	-	20 μl
DTNB 1 mM	330 μl	330 μl

Πίνακας 7: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε διαδοχική προσθήκη, για τον προσδιορισμό των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

Ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά στο σκοτάδι και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 412 nm.

Υπολογισμοί

Επίπεδα GSH (μmol/mg total prot.) =

$$(\text{Absδείγματος} - \text{Δαβστυφλού}/13,6) \times 2 \times 50,5 \times 4 / \text{Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL)}$$

Όπου 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% (1:1). Ακόμη συνυπολογίστηκε ο συντελεστής ομογενοποίησης (4). Τέλος, η τιμή διαιρέθηκε με τα mg της ολικής πρωτεΐνης και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της GSH σε μmol/mg ολικής πρωτεΐνης.

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

Αρχή της μεθόδου

Η καταλάση ανήκει στα ένζυμα που αποικοδομούν το υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) σε νερό και οξυγόνο. Στη συγκεκριμένη μέθοδο το υπεροξειδίο λειτουργεί ως υπόστρωμα και υπολογίζεται η μείωση της απορρόφησης στα 240 nm (Aebi, 1984).

Πειραματική διαδικασία

	Δείγμα
Ομογενοποιημένος ιστός	15 μl
Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (67 mM, pH = 7.4)	2980 μl

Πίνακας 8: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε διαδοχική για τον προσδιορισμό του ρυθμού αποικοδόμησης του H₂O₂

Έγινε προσθήκη των αντιδραστηρίων σε δοκιμαστικούς σωλήνες σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα και 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

Δραστικότητα καταλάσης (U/mg total protein) =

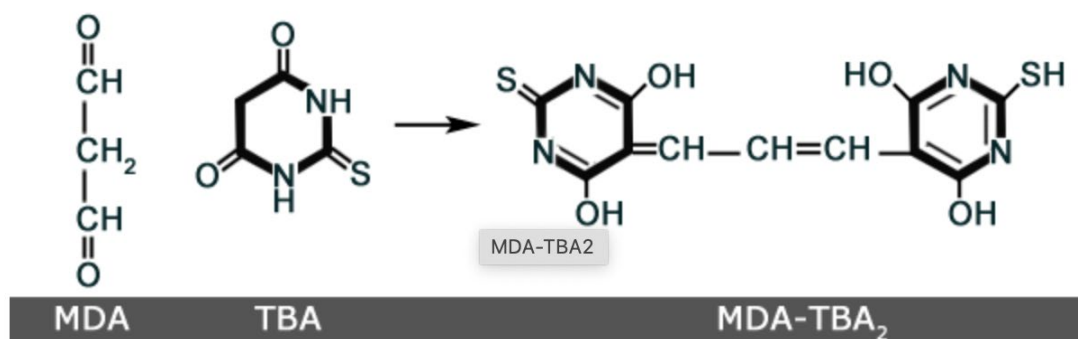
$$(\Delta \text{Abs}_{\text{sample}} / \text{min} / 40) \times (200 \times 1000 \times 4) / \text{Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL)}$$

Όπου το 40 αντιστοιχεί στο συντελεστή μοριακής απορρόφησης του H_2O_2 (mol/L), ο οποίος έχει μετατραπεί σε $\mu\text{mol/mL}$ μέσω πολλαπλασιασμού με τον παράγοντα 1000, ενώ το 200 στο συντελεστή αραίωσης, όπως προέκυψε από τη διαίρεση του τελικού όγκου του αντιδραστήριου (3000 μl) με τον όγκο δείγματος που χρησιμοποιήθηκε (15 μl). Ακόμη, συμπεριλήφθηκε ο πολλαπλασιασμός με το συντελεστή ομογενοποίησης (4) και η τελική τιμή διαιρέθηκε με τα mg της ολικής πρωτεΐνης.

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

Αρχή της μεθόδου

Η μαλονδιαλδεϋδη (MDA), ένα ιδιαίτερα δραστικό και ασταθές τελικό προϊόν της υπεροξειδωσής πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης οξειδωτικής βλάβης στα λιπίδια. Ο προσδιορισμός της πραγματοποιείται φωτομετρικά μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), σχηματίζοντας ένα ροζ χρωματικό σύμπλοκο με αναλογία 1:2 (MDA:TBA), το οποίο εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 530 nm (Keles et al., 2001).



Εικόνα 14: Αντίδραση του TBA με το MDA για τον προσδιορισμό της λιπιδικής υπεροξειδωσής (Sochor et al. 2012).

Πειραματική διαδικασία

	Blank	Δείγμα
Ομογενοποιημένος ιστός	-	100 µl
PBS	100 µl	-
TCA 35%	500 µl	500 µl
Tris-HCl (200 mM, pH = 7.4)	500 µl	500 µl

Επώαση για 10 λεπτά σε RT

Na ₂ SO ₄ – TBA	1ml	1ml
---------------------------------------	-----	-----

Επώαση για 45 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 95°C

TCA 70%.	1ml	1ml
----------	-----	-----

Μεταφορά 1 mL του σε νέα eppendorf tubes, φυγοκέντρηση (11,200 g, 3 min, 25 °C) και φωτομέτρηση στα 530 nm.

Πίνακας 9: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε διαδοχική για τον προσδιορισμό της λιπιδικής υπεροξειδωσης

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg total protein) =

$$(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0.156 \times 31 \times 4 \times 2 / \text{Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL)}$$

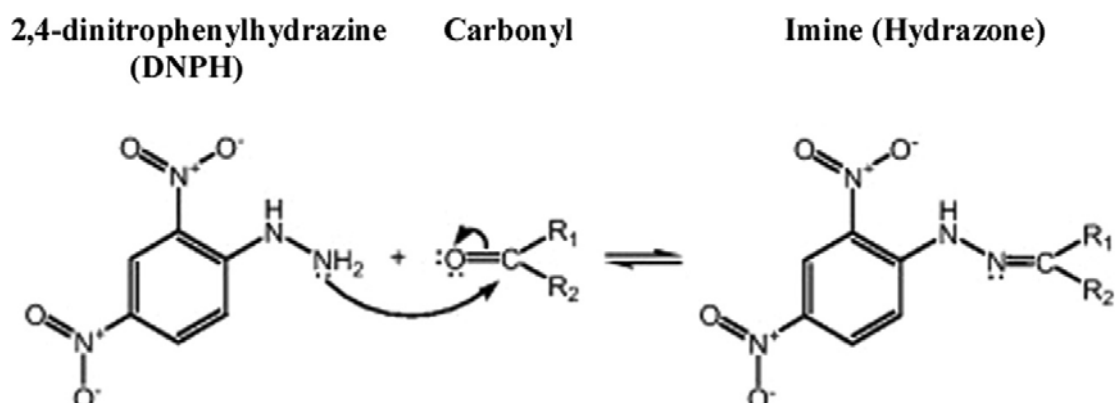
Όπου το 0.156 αντιστοιχεί στο συντελεστή της μοριακής απόσβεσης της MDA (156.000/10⁶ για μετατροπή των mol/L σε µmol/L), το 31 στο συντελεστή αραίωσης (διαίρεση του τελικού όγκου με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού - 3100 µL προς 100 µL). Ακόμη, συνυπολογίστηκε ο συντελεστής ομογενοποίησης (4) και ο συντελεστής αραίωσης που έγινε για τη μέθοδο (2). Τέλος, η τιμή διαιρέθηκε με τα mg της ολικής πρωτεΐνης.

3.5.6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS)

Αρχή της μεθόδου

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αποτελούν γενικό δείκτη της οξειδωσης των πρωτεϊνών και είναι αξιόπιστος δείκτης οξειδωσης των πρωτεϊνών, καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους

με το DNPH (2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4-δινιτροφαινυλδραζονίου) (G. Colombo et.al.,20219).



Εικόνα 15: Αντίδραση DNPH με καρβονυλικά είδη. Το DNPH αντιδρά εύκολα με αλδεϋδες και κετόνες μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης για την παραγωγή της αντίστοιχης υδραζίνης (G. Colombo et.al.,20219).

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

Διάλυση pellet, επώαση 15 λεπτά σε πάγο, φυγοκέντρηση (15,000 g, 5 min, 4 °C), απομάκρυνση υπερκειμένου

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

Διάλυση pellet, επώαση σε RT για 60 λεπτά, ανάδευση κάθε 15 λεπτά

Φυγοκέντρηση (15,000 g, 5 min, 4 °C) και απομάκρυνση υπερκειμένου

10% TCA	500 μl	500 μl
---------	--------	--------

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

Ethanol / Ethyl acetate (1:1)	500 μl	500 μl
-------------------------------	--------	--------

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

Επανάληψη 3 φορές

Ουρία (5 M, pH = 2.3)	500 μl	500 μl
-----------------------	--------	--------

--	--	--

Ανάδευση και επώαση για 15 λεπτά στους 37 °C

Φυγοκέντρωση (15,000 g, 3 min, 4 °C)

Καταγραφή οπτικής πυκνότητας στα 375 nm

Πίνακας 10 : Ποσότητες αντιδραστηρίων σε διαδοχική για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Υπολογισμοί

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

$$[(\text{Αδείγματος} - \text{Ατυφλού}) / 0.022] \times 1000 / 50 \times 4 \times 2 / \text{Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL)}$$

Όπου 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 (4) και ο συντελεστής αραίωσης που έγινε για τη μέθοδο (2). Τέλος, η τιμή διαιρέθηκε με τα mg της ολικής πρωτεΐνης.

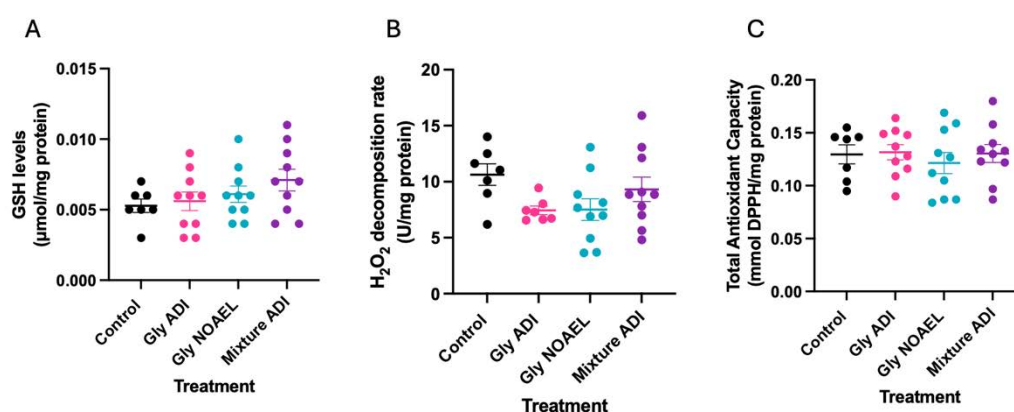
3.5.7 Στατιστική ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος $\pm$ SEM (τυπικό σφάλμα του μέσου) με 95% διάστημα αξιοπιστίας ($p < 0.05$), χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 10.4.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) και τα outliers αποκλείστηκαν χρησιμοποιώντας το εργαλείο του GraphPad 'Identification of Outliers'. Για τη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε one-way ANOVA που ακολουθήθηκε από τη δοκιμή post hoc τεστ Turkey για τη σύγκριση των μέσων μεταξύ των πειραματικών ομάδων χορήγησης σε θηλυκούς και αρσενικούς επίμυες ξεχωριστά.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

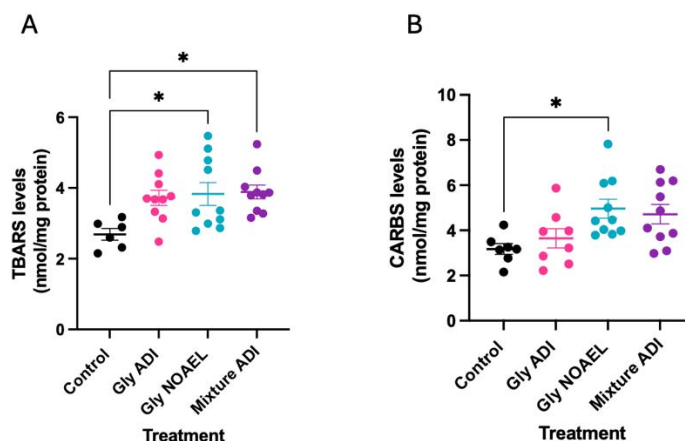
4.1 Επιδράσεις της γλυφοσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στον εγκέφαλο αρσενικών επίμυων

Η περιγεννητική έκθεση σε δύο διαφορετικά επίπεδα δόσης γλυφosatής, καθώς και στο μίγμα αυτής με τα ζιζανιοκτόνα 2,4-D και dicamba, δεν οδήγησε σε στατιστικώς σημαντικές μεταβολές στους δείκτες της αντιοξειδωτικής άμυνας, όπως απεικονίζεται στο Γράφημα 1. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), ο ρυθμός αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), καθώς και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), παρέμειναν αμετάβλητα σε όλες τις πειραματικές ομάδες (Γραφήματα 1A, 1B, 1C)



Γράφημα 1. Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων της γλυφosatής σε δόσεις ADI, NOAEL, καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba, σε δόση αντίστοιχη των ADI, σε δείκτες αντιοξειδωτικής άμυνας στον εγκέφαλο αρσενικών επίμυων, και ειδικότερα σε Α) ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), Β) ρυθμό αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), C) ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Οριζόμενο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0.05$.

Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε το ίδιο μοτίβο επίδρασης στους δείκτες οξειδωτικής βλάβης στους αρσενικούς επίμυες, όπως προκύπτει από το Γράφημα 2. Συγκεκριμένα, η έκθεση στη γλυφosatή σε δόση NOAEL, καθώς και στο μίγμα της με τα ζιζανιοκτόνα 2,4-D και dicamba, προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξείωσης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Γράφημα 2Α). Επιπλέον, η ομάδα που εκτέθηκε στη γλυφosatή στη δόση NOAEL εμφάνισε αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ένδειξη εντονότερης κυτταρικής βλάβης (Γράφημα 2Β).

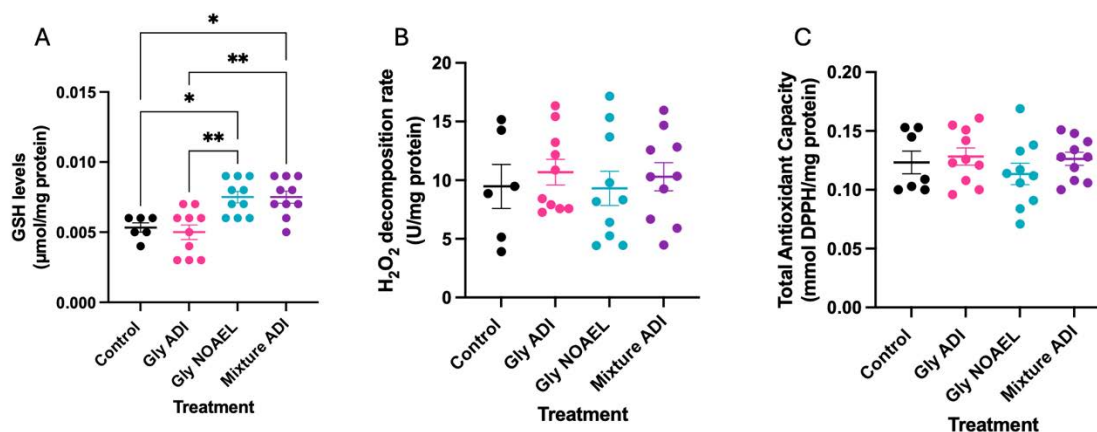


Γράφημα 2. Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων της γλυφοσάτης σε δόσεις ADI, NOAEL, καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba, σε δόση αντίστοιχη των ADI, σε δείκτες οξειδωτικής βλάβης στον εγκέφαλο αρσενικών επίμυων, και ειδικότερα σε D) επίπεδα ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), E) επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλικών ομάδων (CARBS).

* Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control group).

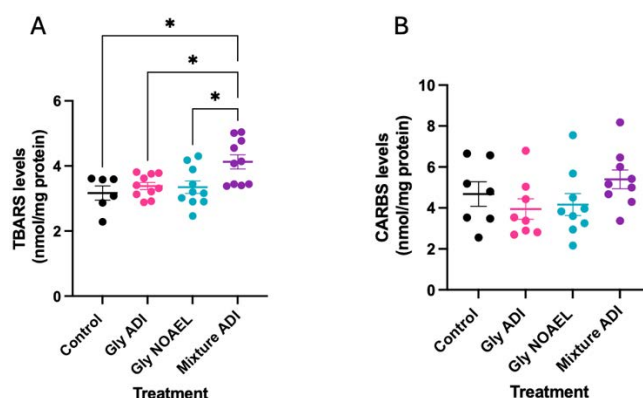
4.2 Επιδράσεις της γλυφοσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στον εγκέφαλο θηλυκών επίμυων

Τα αποτελέσματα της έκθεσης της γλυφοσάτης στις δόσεις ADI και NOAEL, καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba, στις αντίστοιχες δόσεις ADI, στον εγκέφαλο θηλυκών επίμυων απεικονίζονται στο Γράφημα 3. Τα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης εμφανίστηκαν στατιστικώς σημαντικά 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 και την ομάδα της γλυφοσάτης σε δόση ADI (Γράφημα 3A). Ωστόσο, καμία μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα του ρυθμού αποικοδόμησης του H_2O_2 , καθώς και τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Γράφηματα 3B, 3C).



Γράφημα 3. Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων της γλυφοσάτης σε δόσεις ADI, NOAEL, καθώς και του μίγματος της με 2,4-D και dicamba, σε δόση αντίστοιχη των ADI, σε δείκτες οξειδωτικής βλάβης στον εγκέφαλο θηλυκών επίμυων, και ειδικότερα σε Α) ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), Β) ρυθμό αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), C) ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). * Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control group) και την ομάδα της γλυφοσάτης ADI (GLY ADI group).

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα των βιοδεικτών αντιοξειδωτικής άμυνας στον εγκέφαλο θηλυκών επίμυων, όπως παρουσιάζονται στο Γράφημα 4, συμπεραίνεται ότι η περιγεννητική έκθεση στο μίγμα της γλυφοσάτης με 2,4-D και dicamba προκάλεσε αύξηση των επιπέδων των TBARS σε στατιστικώς σημαντικό επίπεδο συγκριτικά με τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου, της ομάδας γλυφοσάτης ADI και NOAEL, αποδεικνύοντας την πρόκληση οξειδωτικής βλάβης στα λιπίδια (Γράφημα 4Α), χωρίς να υπάρχει το ίδιο μοτίβο στις πρωτεΐνες (Γράφημα 4Β).



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

ADI, σε δείκτες οξειδωτικής βλάβης στον εγκέφαλο θηλυκών επίμυων, και ειδικότερα σε D) επίπεδα ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), E) επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλικών ομάδων (CARBS).

* Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control group), την ομάδα της γλυφοσάτης ADI (GLY ADI group) και την ομάδα της γλυφοσάτης NOAEL (GLY NOAEL group).

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Η ανθρώπινη έκθεση σε χημικές ουσίες είναι συνεχής και πολυπαραγοντική, καθώς καθημερινά ερχόμαστε σε επαφή με εκατοντάδες ξеноβιοτικά άμεσα και έμμεσα μέσω του αέρα, των τροφίμων και του νερού. Αυτή η έκθεση δεν περιορίζεται αποκλειστικά σε περιβαλλοντικές πηγές, αλλά επηρεάζεται ουσιαστικά και από παράγοντες που σχετίζονται με τον επαγγελματικό χώρο, τις διατροφικές και καταναλωτικές συνήθειες (Richardson et al., 2019). Ανάμεσα στις πιο διαδεδομένες και προβληματικές χημικές ομάδες είναι τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία εφαρμόζονται σε μεγάλες ποσότητες προκειμένου να καταπολεμήσουν επιβλαβείς οργανισμούς, όπως έντομα, ζιζάνια και μικροοργανισμούς. Η χρήση τους εκτείνεται τόσο στη γεωργία όσο και σε βιομηχανικούς τομείς, γεγονός που ενισχύει τις ανησυχίες σχετικά με τις πιθανές επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον (Ferguson et al., 2022; Bjorling-Poulsen et al., 2008).

Η έντονη εξάρτηση της σύγχρονης γεωργίας από τα φυτοφάρμακα έχει ιστορική βάση, καθώς η ανάγκη για αύξηση της αγροτικής παραγωγής, προκειμένου να καλυφθούν οι διατροφικές απαιτήσεις του διαρκώς αυξανόμενου πληθυσμού, ενίσχυσε τη χρήση τέτοιων χημικών σκευασμάτων κατά τον 20ό αιώνα (Carvalho et al., 2017). Ωστόσο, η πλειονότητα των φυτοφαρμάκων δεν διατίθεται στην αγορά ως

μεμονωμένες χημικές ουσίες, αλλά ως σύνθετα εμπορικά μίγματα, τα οποία περιλαμβάνουν, τη δηλωμένη δραστική ουσία, και διάφορους βοηθητικούς παράγοντες (π.χ. διαλυτικά, σταθεροποιητές ή επιφανειοδραστικά), των οποίων η ακριβής σύνθεση συνήθως παραμένει μερικώς άγνωστη (Mesnage et al., 2014).

Η παραδοσιακή αξιολόγηση του τοξικολογικού κινδύνου των φυτοφαρμάκων επικεντρώνεται αποκλειστικά στη δραστική ουσία, παραβλέποντας το εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα, γεγονός που δημιουργεί σημαντικούς περιορισμούς στην εκτίμηση του πραγματικού κινδύνου. Έρευνες έχουν δείξει ότι τα εμπορικά σκεύασματα παρουσιάζουν συχνά ισχυρότερη τοξική δράση συγκριτικά με τη μεμονωμένη δραστική ουσία, υποδηλώνοντας πως οι συνοδευτικές χημικές ενώσεις μπορούν να ενισχύσουν ή να μεταβάλουν την τοξικότητα του προϊόντος (Guyton et al., 2015).

Η συσσωρευτική έκθεση στα φυτοφάρμακα έχει συνδεθεί με σοβαρές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, καθώς πολλές ουσίες έχουν την τάση να βιοσυσσωρεύονται σε ιστούς και όργανα, επάγοντας τοξική επίδραση μετά από χρόνια έκθεση, ακόμη και αν χορηγούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Tsatsakis et al., 2017). Μελέτες έχουν τεκμηριώσει την πιθανή συσχέτισή τους με την ανάπτυξη διαφόρων μορφών καρκίνου (Zhang et al., 2019), καθώς και με νευροεκφυλιστικά νοσήματα όπως η νόσος του Πάρκινσον (Tanner et al., 2011) και η νόσος Αλτσχάιμερ (Yan et al., 2016). Παράλληλα, υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκθεση σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα επηρεάζει τη γονιμότητα, τη σπερματογένεση και την ανάπτυξη του εμβρύου (Mehrpoor et al., 2014; Koutroulakis et al., 2014), ενώ σχετίζεται και με δυσλειτουργίες στο μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης, οδηγώντας σε μεταβολικά σύνδρομα και διαβήτη τύπου 2 (Petrakis et al., 2017).

Ιδιαίτερα, έχουν αναφερθεί σημαντικές επιπτώσεις στη φυσιολογία του αναπτυσσόμενου οργανισμού, που αποτελεί και το αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Η περιγεννητική έκθεση σε φυτοφάρμακα, και ιδιαίτερα σε χημικά μίγματα που περιλαμβάνουν τη γλυφοσάτη, έχει συσχετιστεί με σοβαρές επιπτώσεις στην ανάπτυξη και υγεία του απογόνου. Μελέτη των Garry et al. (2002) ανέδειξε τη σχέση μεταξύ περιγεννητικής έκθεσης γλυφοσάτης και αυξημένης πιθανότητας εμφάνισης ΔΕΠΥ (ADHD). Επίσης, άλλες μελέτες σε θηλαστικά, όπως των Manservisi et al. (2019) και Docea et al. (2023), τεκμηρίωσαν διαταραχές της ηπατικής λειτουργίας και ενδοκρινικές αποκλίσεις στους απογόνους μετά από περιγεννητική έκθεση σε μίγματα glyphosate–2,4-D–dicamba, ακόμα και σε δόσεις κάτω από τα θεσπισμένα όρια (ADI). Οι αλλαγές

περιελάμβαναν επαγωγή οξειδωτικού στρες, τροποποιήσεις σε θυρεοειδικές και αναπαραγωγικές ορμόνες, καθώς και λειτουργικές διαταραχές στα νεφρά και τον θυρεοειδή των μητέρων.–Παρόμοια ευρήματα καταγράφηκαν και σε μη θηλαστικά μοντέλα (zebrafish), όπου παρατηρήθηκαν καθυστερήσεις ανάπτυξης, καρδιαγγειακές δυσπλασίες και νευροαναπτυξιακές ανωμαλίες (Roy et al., 2016). Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν την ανάγκη περαιτέρω ερευνών για τις επιπτώσεις της περιγεννητικής έκθεσης στα συστήματα του αναπτυσσόμενου οργανισμού.

Τις τελευταίες δεκαετίες, τα ζιζανιοκτόνα αποτελούν βασικό στοιχείο της εντατικοποίησης της αγροτικής παραγωγής, τα οποία εφαρμόζονται σε μεγάλες ποσότητες για την αποτελεσματική αντιμετώπιση των ζιζανίων και την εξασφάλιση της απόδοσης των καλλιεργειών. Από όλα τα διαθέσιμα ζιζανιοκτόνα, η γλυφοσάτη είναι η κυρίαρχη δραστική ουσία σε παγκόσμιο επίπεδο, αποτελώντας το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο μη εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο, χάρη στο ευρύ φάσμα δράσης της και τη δυνατότητα ξήρανσης των σιτηρών (Duke & Powles, 2008). Σήμερα, περισσότερα από το 50% των προϊόντων που διακινούνται στην παγκόσμια αγορά των ζιζανιοκτόνων βασίζονται στη γλυφοσάτη (IBABA, 2014; IARC, 2015).

Ωστόσο, η υπερβολική και επαναλαμβανόμενη εφαρμογή της γλυφοσάτης σε αγροτικά συστήματα οδήγησε στην ανάπτυξη ζιζανίων ανθεκτικών σε αυτή, γεγονός που ανάγκασε τους παραγωγούς να καταφεύγουν σε πιο εντατικές εφαρμογές και σε υψηλότερες δόσεις του ίδιου σκευάσματος (Office of Chemical Safety, 2017). Η συνεχής αυτή πίεση του οικοσυστήματος είχε τελικά το αντίθετο αποτέλεσμα, καθώς ανέδειξε ζιζάνια με πολλαπλή ανθεκτικότητα στη γλυφοσάτη, οδηγώντας σε μια αλυσιδωτή αναζήτηση για νέα σχήματα φυτοπροστασίας (Heap & Duke, 2008).

Μία από τις κυριότερες προσεγγίσεις που υιοθετήθηκαν για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος ήταν η συνδυαστική εφαρμογή ζιζανιοκτόνων με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Ο συνδυασμός της γλυφοσάτης με ουσίες όπως το 2,4-D και το dicamba, επιδιώκει να περιορίσει την εξάπλωση ανθεκτικών ζιζανίων, προσφέροντας ένα ευρύτερο φάσμα αποτελεσματικότητας (Wright et al., 2010). Η χρήση τέτοιων μιγμάτων αναμένεται να ενταθεί περαιτέρω τα επόμενα χρόνια, αντανακλώντας τη συνεχιζόμενη ανάγκη για αποτελεσματικές λύσεις ενάντια στην ανθεκτικότητα των ζιζανίων (Mesnage & Antoniou, 2021).

Παρά την εκτεταμένη χρήση τους, οι δυνητικές επιπτώσεις μιγμάτων ζιζανιοκτόνων δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως. Ο σύγχρονος τρόπος ζωής έχει οδηγήσει σε συνεχή, χαμηλού επιπέδου έκθεση σε ένα πλήθος ξενοβιοτικών

ουσιών, η αλληλεπίδραση των οποίων παραμένει εν πολλοίς απρόβλεπτη (Fenga et al., 2017). Ακόμα και αν μεμονωμένα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, οι ουσίες αυτές δεν παρουσιάζουν τοξικότητα, η χρόνια και συνδυαστική τους δράση μπορεί να προκαλέσει βλαπτικές επιδράσεις (Bulka et al., 2019).

Ειδικότερα, η τοξικότητα της γλυφοσάτης αποτελεί αντικείμενο έντονης επιστημονικής αντιπαράθεσης, καθώς οι απόψεις δίστανται σχετικά με την επικινδυνότητά της, ιδιαίτερα σε μακροχρόνια ή χαμηλού επιπέδου έκθεση (Mesnage & Zaller, 2021). Η συζήτηση εντάθηκε σημαντικά μετά την απόφαση του Διεθνούς Οργανισμού Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) να κατατάξει τη γλυφοσάτη στην κατηγορία 2Α, δηλαδή ως «πιθανώς καρκινογόνο για τον άνθρωπο» (Guyton et al., 2015). Σύμφωνα με τον Myers και τους συνεργάτες του (2016), η διαρκώς αυξανόμενη έκθεση του πληθυσμού στη γλυφοσάτη και τα μίγματα της, θέτει υπό αμφισβήτηση την επάρκεια των υφιστάμενων ρυθμιστικών μηχανισμών.

Ένα από τα βασικά βιολογικά αποτελέσματα που εξετάζονται στο πλαίσιο της τοξικότητας των φυτοφαρμάκων είναι το οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες αξιολογείται ως τελικό τοξικολογικό σημείο, καθώς μπορεί να προκαλέσει διαταραχές στην κυτταρική ομοιόσταση και να επηρεάσει τη λειτουργία βασικών βιομορίων (Docea et al., 2018). Παράγοντες όπως η χρονική διάρκεια της έκθεσης και η δοσολογία, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των οργανισμών (Lee et al., 2017; Cortez-Iza & Rodriguez, 2018). Ιδιαίτερα η γλυφοσάτη έχει συσχετιστεί με την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), οδηγώντας σε βλάβες σε επίπεδο πρωτεϊνών, λιπιδίων και γενετικού υλικού (Larsen et al., 2012).

Επιστημονικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι, εκτός της γλυφοσάτης, το 2,4-D έχει ισχυρή συμβολή στην επαγωγή οξειδωτικού στρες, με ενδεχόμενες τοξικές επιδράσεις (IARC, 2018). Το 2,4-D έχει χαρακτηριστεί ως σημαντικός οξειδωτικός παράγοντας, με μεγαλύτερη τοξική δράση συγκριτικά με τη γλυφοσάτη και το dicamba, όπως αξιολογήθηκαν με το πρωτόκολλο του ToxTracker (Mesnage et al., 2021a). Ωστόσο, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα παρουσιάζουν αντιφατικά ευρήματα. Συγκεκριμένα, μελέτη έδειξε ότι έκθεση σε μίγμα dicamba και γλυφοσάτης προκάλεσε επαγωγή του οξειδωτικού στρες, ενώ το 2,4-D δεν φάνηκε να προκαλεί παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) στο ίδιο πλαίσιο. Η διαφοροποίηση αυτή αποδόθηκε εν μέρει στη μειωμένη ευαισθησία του τεστ ανίχνευσης (Ferguson et al., 2022). Παράλληλα, γενοτοξικές δοκιμές στον οργανισμό *Cnesterodon decemmaculatus* έδειξαν ότι

εμπορικά σκευάσματα γλυφosatής με 2,4-D εμφανίζουν είτε συνεργιστικές είτε ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις, αποτυπώνοντας την πολυπλοκότητα των βιοχημικών επιδράσεων των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον (Carvalho et al., 2020).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διερεύνηση των επιδράσεων στο οξειδοαναγωγικό προφίλ του εγκεφάλου, όπου διαταραχή της ομοιόστασης μπορεί να διαταράξει κρίσιμες λειτουργίες, όπως η νευρωνική πλαστικότητα και η συναπτική μεταβίβαση. Χαρακτηριστικά, μελέτη σε *Oreochromis niloticus* (νιλοτίλο) έδειξε ότι η έκθεση σε εμπορικό μίγμα γλυφosatής σε 5 συγκεντρώσεις 0.035, 0.07, 0.14, 0.21 και 0.28 ml/l για 96 ώρες προκάλεσε σημαντική μείωση στα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης και αύξηση των προϊόντων υπεροξειδωσής λιπιδίων στον εγκέφαλο (Ayoola & Ajani, 2020). Επιπλέον, σε *Danio rerio* (ψάρι zebrafish), η έκθεση σε dicamba σε συγκεντρώσεις 4.5, 18, 72, και 288 mg/L οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα οξειδωτικής βλάβης στον εγκέφαλο, όπως φάνηκε από τα υψηλά επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσής και πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Felisbio K. et al., 2023). Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας ενζύμων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η καταλάση (CAT), αποδεικνύοντας διαταραχή της ενδογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας.

Ένα σημαντικό ζήτημα που εξακολουθεί να παραμένει ασαφές αφορά την κατανόηση των πιθανών επιδράσεων που μπορεί να έχουν οι χημικές ουσίες όταν απαντώνται σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από εκείνες που ορίζονται ως NOAEL (No Observed Adverse Effect Level). Ο σύγχρονος τρόπος ζωής εκθέτει τους ανθρώπους σε ποικίλες και συχνά ανεπαρκώς μελετημένες χημικές ενώσεις. Αν και αυτές οι ουσίες απαντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η ταυτόχρονη παρουσία και η συνεχής επαφή με αυτές ενδέχεται να προκαλέσουν βλαπτικές επιδράσεις στην υγεία (Fenga et al., 2017), ακόμη κι όταν εξετάζονται σε φαινομενικά μη επικίνδυνες δόσεις (Bulka et al., 2019).

Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αποσκοπεί στη μελέτη των επιδράσεων της περιγεννητικής έκθεσης σε χαμηλές δόσεις γλυφosatής και μίγματος αυτής με 2,4-D και dicamba στο οξειδοαναγωγικό προφίλ του εγκεφάλου του αναπτυσσόμενου οργανισμού. Ειδικότερα, αξιολογήθηκε η έκθεση από την έκτη ημέρα κύησης έως την πρώιμη ενηλικίωσή, καθώς αποτελεί κρίσιμη περίοδο ανάπτυξης και ευαισθησίας σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, επιλέχθηκαν βασικοί βιοδείκτες της αντιοξειδωτικής άμυνας, όπως η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ο ρυθμός αποικοδόμησης του

υπεροξειδίου του υδρογόνου και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Παράλληλα, για την αξιολόγηση της οξειδωτικής βλάβης προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ουσίων που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARBS), ως δείκτες οξειδωτικής βλάβης σε λιπίδια και πρωτεΐνες, αντίστοιχα. Οι δείκτες αυτοί προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη βλάβη που μπορεί να προκαλέσει η έκθεση σε φυτοφάρμακα σε μοριακό επίπεδο και συμβάλλουν στην ολιστική αξιολόγηση της τοξικότητας των υπό μελέτη ενώσεων.

Ο εγκέφαλος, λόγω του υψηλού μεταβολικού ρυθμού, της έντονης κατανάλωσης οξυγόνου, και της πλούσιας περιεκτικότητάς του σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στην υπεροξείδωση των λιπιδίων, θεωρείται από τα πλέον ευάλωτα όργανα στην πρόκληση οξειδωτικής βλάβης (Halliwell, 2006). Ως εκ τούτου, η μελέτη του αποτελεί κρίσιμο πεδίο διερεύνησης για τις επιπτώσεις της περιβαλλοντικής έκθεσης σε τοξικούς παράγοντες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η προγεννητική έκθεση σε γλυφΟΣάτη και το μίγμα της με 2,4-D και dicamba προκάλεσε διαταραχές στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, με παρατηρούμενες διαφορές στα δύο εξεταζόμενα φύλα. Συνολικά, τα αυξημένα επίπεδα δεικτών υπεροξείδωσης λιπιδίων και οξείδωσης πρωτεϊνών, αποτελεί ένδειξη ότι ο εγκεφαλικός ιστός βρέθηκε υπό σημαντική οξειδωτική επιβάρυνση, ήδη από πρώιμα στάδια της ανάπτυξης. Η περιγεννητική περίοδος είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, καθώς κατά το διάστημα αυτό πραγματοποιούνται σημαντικές διαδικασίες νευρογένεσης, συναπτικής διαμόρφωσης και μυελινοποίησης (Rice & Barone, 2000). Τοξικές επιδράσεις κατά την περίοδο αυτή ενδέχεται να έχουν μακροχρόνιες ή και μη αναστρέψιμες συνέπειες, επηρεάζοντας μόνιμα τη λειτουργικότητα του εγκεφάλου. Έτσι, τα παρατηρούμενα ευρήματα υποδηλώνουν βλάβη, που πιθανόν οφείλεται είτε σε άμεση επίδραση των φυτοφαρμάκων στις νευρικές κυτταρικές μεμβράνες, είτε στην ενεργοποίηση φλεγμονωδών ή αποπτωτικών μηχανισμών μέσω της ανισορροπίας ROS/αντιοξειδωτικών (Gress et al., 2015). Η απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών σε δείκτες όπως η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και ο ρυθμός αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου, συνδυαστικά με την αύξηση στα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (σε συγκεκριμένες ομάδες), υποδηλώνει την ενεργοποίηση μιας επιλεκτικής, αλλά ενδεχομένως ανεπαρκούς, αντιοξειδωτικής απόκρισης. Η GSH αποτελεί βασικό μόριο στην άμυνα του εγκεφάλου έναντι των ROS, ενώ τα χαμηλά επίπεδα TAC και ενζυμικής

δραστικότητας πιθανώς οφείλονται είτε σε εξάντληση πόρων, είτε σε ρύθμιση των σχετικών ενζύμων από τα φυτοφάρμακα (Franco et al., 2009).

Συγκεκριμένα, στους αρσενικούς επίμυες, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των δεικτών οξειδωτικής βλάβης TBARS και CARBS έπειτα από έκθεση σε γλυφosat σε δόση NOAEL και το μίγμα της σε δόση ADI, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, χωρίς να ενεργοποιείται κάποιος αμυντικός προσαρμοστικός μηχανισμός. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως στους θηλυκούς επίμυες, η οξειδωτική επιβάρυνση εμφανίστηκε πιο περιορισμένη, με στατιστικά σημαντική αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης μόνο στην ομάδα που εκτέθηκε στο μίγμα των ζιζανιοκτόνων. Ακόμη, παρουσιάστηκε ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής άμυνας, όπως διαφαίνεται από την αύξηση των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης στις ομάδες έκθεσης σε γλυφosat NOAEL και στο μίγμα ADI, μοτίβο που δεν ακολουθείται σε αρσενικούς επίμυες. Η δεδομένη ενεργοποίηση του προσαρμοστικού μηχανισμού ήταν ικανή να αποτρέψει την πρόκληση βλάβης στην ομάδα γλυφosates NOAEL, η οποία δεν εμφάνισε κάποια μεταβολή στα επίπεδα δεικτών οξειδωτικής καταστροφής. Διαφαίνεται έτσι, ότι τα αρσενικά άτομα είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στην πρόκληση οξειδωτικού στρες, καθώς εμφανίζουν εντονότερες ενδείξεις βλάβης χωρίς ανάλογη ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας. Αντίθετα, οι θηλυκοί επίμυες, φάνηκε να ενεργοποιούν αμυντικούς μηχανισμούς, κυρίως μέσω αύξησης της GSH, οι οποίοι πιθανώς περιόρισαν τη βλάβη.

Η φυλοειδική διαφοροποίηση στις αποκρίσεις πιθανώς αποδίδεται στην ενδογενή επίδραση των ορμονών φύλου, ιδιαίτερα των οιστρογόνων, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν αντιοξειδωτικές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες (Vina et al., 2005). Οι θηλυκοί οργανισμοί φαίνεται να διαθέτουν υψηλότερη βασική αντιοξειδωτική άμυνα, γεγονός που ενδεχομένως εξηγεί την καλύτερη διαχείριση του οξειδωτικού στρες (Borras et al., 2003). Επιπλέον, γνωστές διαφορές στη φαρμακοκινητική, τη μεταβολική δραστηριότητα και την έκφραση αποτοξινωτικών ενζύμων μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων (Soldin & Mattison, 2009) ενισχύουν περαιτέρω την ανάγκη ενσωμάτωσης της φυλοειδικότητας ως κρίσιμης βιολογικής παραμέτρου στην τοξικολογική αξιολόγηση.

Περαιτέρω ενδείξεις για τη στοχευμένη τοξική δράση των υπό μελέτη ουσιών αναφέρονται σε άλλους ιστούς. Στον ηπατικό ιστό, η περιγεννητική έκθεση σε γλυφosat και στο σχετικό μίγμα προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα δεικτών λιπιδικής υπεροξειδωσης, με ταυτόχρονη ενεργοποίηση της ενδογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας,

χωρίς όμως να επιτευχθεί αποτελεσματική αναχαίτιση της βλάβης (Nechalioti P.M. et.al.,2023).

Μελλοντικές προσεγγίσεις

Η διαρκώς αυξανόμενη ανησυχία για τις επιδράσεις της χρόνιας έκθεσης σε ζιζανιοκτόνα, όπως η γλυφοσάτη και το μίγμα της με 2,4-D και dicamba, σε χαμηλές δόσεις και ευαίσθητες περιόδους όπως η περιγεννητική, δημιουργεί την ανάγκη για πιο ολοκληρωμένες και εστιασμένες ερευνητικές προσεγγίσεις. Η διερεύνηση των μακροπρόθεσμων συνεπειών αυτών των ουσιών σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, με έμφαση στην οξειδοαναγωγική ισορροπία και την επιγενετική ρύθμιση, αποτελεί κρίσιμο επόμενο βήμα.

Σε μοριακό επίπεδο, η μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να επικεντρωθεί στην αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες, της απόπτωσης και της κυτταρικής επιβίωσης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της ενεργοποίησης της οδού Nrf2–Keap1, η οποία αποτελεί βασικό ρυθμιστή της κυτταρικής αντιοξειδωτικής απόκρισης (Kensler et al., 2007). Τα γονίδια που ενεργοποιούνται μέσω αυτής της οδού, όπως τα HO-1, NQO1, SOD1/2, GPx, και CAT, καθώς και γονίδια απόπτωσης όπως τα Caspase-3, Bax, Bcl-2, και το p53, θα μπορούσαν να αναλυθούν μέσω τεχνικών όπως RT-qPCR και Western blotting, ώστε να αποκαλυφθεί εάν η έκθεση στα παραπάνω φυτοφάρμακα επάγει βιοχημικές αλλαγές με πιθανές νευροτοξικές επιπτώσεις (Larsen et al., 2012; Mesnage et al., 2021a).

Παράλληλα, οι επιγενετικές τροποποιήσεις όπως η μεθυλίωση του DNA ή η αλλοίωση της έκφρασης των microRNA μπορούν να συνεισφέρουν στην εξήγηση των μακροπρόθεσμων και πιθανώς κληρονομούμενων-μεταβιβάσιμων συνεπειών της έκθεσης αυτής. Η επιγενετική ανάλυση σε αυτή την περίπτωση θα μπορούσε να εστιάσει σε ιστούς του εγκεφάλου, ιδίως σε περιοχές όπως ο ιππόκαμπος, όπου αναπτύσσονται κρίσιμες γνωστικές λειτουργίες (Kim et al., 2014; Cavalli & Heard, 2019).

Μελέτες σε άλλους οργανισμούς, όπως *zebrafish* και *C. elegans*, έδειξαν ότι η έκθεση σε μίγματα που περιέχουν γλυφοσάτη μπορεί να οδηγήσει σε νευροαναπτυξιακές και συμπεριφορικές διαταραχές, συσχετιζόμενες με οξειδωτική

βλάβη και αλλοιώσεις στην έκφραση των γονιδίων του άξονα HPA (hypothalamic–pituitary–adrenal) (Bai & Ogbuehi, 2021; Burchfield et al., 2022). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η χρήση πειραματικών μοντέλων άλλων ειδών μπορεί να προσφέρει συγκριτικά δεδομένα και να ενισχύσει την κατανόηση των μηχανισμών. Επιπλέον, για την καλύτερη αποτύπωση της συστημικής κατάστασης, προτείνεται η ταυτόχρονη ανάλυση δειγμάτων αίματος ώστε να αποτυπωθεί συνολικά η συστημική οξειδωτική επιβάρυνση και να συσχετιστεί με την τοπική δράση στους ιστούς (Fenga et al., 2017).

Τέλος, η μακροχρόνια έκθεση σε χαμηλές δόσεις και η διερεύνηση διαγενεακών επιδράσεων (F1, F2 γενεές) αποτελούν σημαντικό πεδίο μελέτης, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι η περιγεννητική έκθεση μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη και τη λειτουργία του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου με μεταβολές που διατηρούνται ή και μεταφέρονται στις επόμενες γενεές (Garry et al., 2002; Gunier et al., 2017; Mora et al., 2018).

Η συνδυασμένη αξιολόγηση μοριακών, επιγενετικών και οξειδοαναγωγικών παραμέτρων, σε συνδυασμό με συμπεριφορικές δοκιμασίες και μεταβολωμικές/λιπιδωμικές αναλύσεις, θα προσφέρει μια πολύπλευρη και επιστημονικά θεμελιωμένη προσέγγιση για την κατανόηση των πραγματικών επιπτώσεων αυτών των χημικών μιγμάτων. Επιπλέον, τα νέα αυτά δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επανεκτίμηση των κανονιστικών ορίων ασφαλείας και για την προσαρμογή των μεθοδολογιών αξιολόγησης κινδύνου από ξеноβιοτικές ουσίες (Tsatsakis et al., 2017; Kostoff et al., 2018; Mesnage & Antoniou, 2021).

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- A. Damalas and I. G. Eleftherohorinos, “Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators,” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 8, no. 5, pp. 1402–1419, 2011.
- A. Hundekari, A. N. Suryakar, and D. B. Rathi, “Acute organo-phosphorus pesticide poisoning in North Karnataka, India: oxidative damage, haemoglobin level and total leukocyte,” *African Health Sciences*, vol. 13, no. 1, pp. 129–136, 2013.
- A. Hundekari, A. N. Suryakar, and D. B. Rathi, “Acute organo-phosphorus pesticide poisoning in North Karnataka, India: oxidative damage, haemoglobin level and total leukocyte,” *African Health Sciences*, vol. 13, no. 1, pp. 129–136, 2013.
- A. Mamane, C. Raheison, J. Tessier, I. Baldi, G. Bouvier, *Environmental exposure to pesticides and respiratory health*, *Eur. Respir. Rev.* 24 (137) (2015) 462–473, <https://doi.org/10.1183/16000617.00006114>.

- A. Sabarwal, K. Kumar, R.P. Singh, Hazardous effects of chemical pesticides on human health–cancer and other associated disorders, *Environ. Toxicol.Pharmacol.* 63 (2018) 103–114, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.018>.
- A.F. Hern´andez, T. Parr´on, R. Alarc´on, Pesticides and asthma, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 11 (2) (2011) 90–96, <https://doi.org/10.1097/aci.0b013e3283445939>.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Akashe, M. M., Pawade, U. V., & Nikam, A. V. (2018). Classification of pesticides: A review. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm*, 9(4), 144-150.
- Alhasawi, F. Legendre, S. Jagadeesan, V. Appanna, and V. Appanna, “Chapter 10 - biochemical strategies to counter nitrosative stress: nanofactories for value-added products,” in *Microbial Diversity in the Genomic Era*, S. Das and H. R. Dash, Eds., pp. 153–169, Academic Press, 2019.
- Amrhein, N., Deus, B., Gehrke, P., Steinrücken, H.C., 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiol.* 66, 830–834. <https://doi.org/10.1104/pp.66.5.830>.
- Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E., & Kumar, S. S. (2016). Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 5276130. <https://doi.org/10.1155/2016/5276130>
- Astiz, M., de Alaniz, M. J. T., & Marra, C. A. (2009). Pesticide-induced decrease in rat brain antioxidant capacity and glutathione-related enzyme activity. *Toxicology Letters*, 190(1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.015>
- Auger, J. Lemire, D. Cecchini, A. Bignucolo, and V. D. Appanna, “The metabolic reprogramming evoked by nitrosative stress triggers the anaerobic utilization of citrate in *Pseudomonas fluorescens*,” *PLoS One*, vol. 6, no. 12, article e28469, 2011.
- Ayoola, S. O. & Ajani, E. O. (2020). Neurotoxic and oxidative stress effects of glyphosate-based herbicides in *Oreochromis niloticus*. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 30(3), 198–207.

- B. A. Cohn, M. S. Wolff, P. M. Cirillo, and R. I. Sholtz, “DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure,” *Environmental Health Perspectives*, vol. 115, no. 10, pp. 1406–1414, 2007.
- B. K. Binukumar, A. Bal, and K. D. Gill, “Chronic dichlorvos exposure: microglial activation, proinflammatory cytokines and damage to nigrostriatal dopaminergic system,” *Neuromolecular Medicine*, vol. 13, no. 4, pp. 251–265, 2011.
- Baćmaga, M., Wyszowska, J., & Kucharski, J. (2024). Environmental Implication of Herbicide Use. *Molecules*, 29(24), 5965. <https://doi.org/10.3390/molecules29245965>
- Bai, S., & Ogbuehi, K. C. (2021). Neurobehavioral toxicity of glyphosate-based herbicides in zebrafish. *Environmental Pollution*, 272, 115990. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115990>
- Benbrook, C.M., 2012. Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the U.S. – the first sixteen years. *Environ. Sci. Eur.* 24, 1–13.
- Birben, E., et al. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
- Briyal, S., Ranjan, A. K., & Gulati, A. (2023). Oxidative stress: a target to treat Alzheimer's disease and stroke. *Neurochemistry International*, 165, 105509.
- Burchfield, S. L., Bailey, D. C., Todt, C. E., & Gill, S. S. (2022). Long-term impacts of glyphosate exposure in *C. elegans*. *Toxicology Reports*, 9, 1347–1355. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.06.020>
- C. A. Damalas and I. G. Eleftherohorinos, “Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators,” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 8, no. 5, pp. 1402–1419, 2011.

- C. Auger, J. Lemire, D. Cecchini, A. Bignucolo, and V. D. Appanna, “The metabolic reprogramming evoked by nitrosative stress triggers the anaerobic utilization of citrate in *Pseudomonas fluorescens*,” *PLoS One*, vol. 6, no. 12, article e28469, 2011.
- C. Uchendu, S. F. Ambali, J. O. Ayo, and K. A. N. Esiebo, “Chronic co-exposure to chlorpyrifos and deltamethrin pesticides induces alterations in serum lipids and oxidative stress in Wistar rats: mitigating role of alpha-lipoic acid,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, no. 20, pp. 19605–19611, 2018.
- C.A. Damalas, I.G. Eleftherohorinos, Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8 (5) (2011) 1402–1419
- Carvalho, W. F. et al. (2020). Genotoxic effects of herbicide mixtures in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 198, 110634.
- Cattani, D., de Liz Oliveira Cavalli, V. L., Heinz Rieg, C. E., et al. (2014). Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology*, 320, 34–45.
- Cavalli, G., & Heard, E. (2019). Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*, 571(7766), 489–499. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1411-0>
- Chlorpyrifos Facts 2002, Environmental Protection Agency, 2002, EPA 738-F-01-006.
- Colombo, G., Clerici, M., Garavaglia, M. E., Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., & Dalle-Donne, I. (2016). A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 1019, 178–190.
- Cortez-Iza, S., & Rodriguez, V. M. (2018). The redox state as a mediator of developmental toxicity of environmental pollutants. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 36–41.

- Crumpton, T. L., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2000). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: Cellular mechanisms. *Environmental Health Perspectives*, 108(Suppl 3), 429–437. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3429>
- D. Lee, P.M. Lind, D.R. Jacobs, S. Salihovic, B. Van Bavel, L. Lind, Association between background exposure to organochlorine pesticides and the risk of cognitive impairment: a prospective study that accounts for weight change, *Environ. Int.* 89–90 (2016) 179–184, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.001>.
- Di Renzo GC , Conry JA , Blake J , DeFrancesco MS , DeNicola N , Martin JNJr , et al . International Federation of Gynecology and Obstetrics opinion on reproductive health impacts of exposure to toxic environmental chemicals . *Int J Gynaecol Obstet* 2015 ; 131 : 219 – 25 .
- Docea, A. O., Calina, D., Goumenou, M., Neagu, M., Gofita, E., & Tsatsakis, A. M. (2018). A new threat from an old enemy: Re-emergence of glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 59, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.007>
- Docea, A. O., Calina, D., Goumenou, M., Neagu, M., Gofita, E., Tsatsakis, A. M., & Drakoulis, N. (2019). *Study designs for the assessment of long-term health effects of exposure to chemical mixtures*. *Toxicology Letters*, 313, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.05.014>
- Docea, A. O., Cirstea, A. E., Cercelaru, L., Drocas, A. I., Dinca, V., Mesnage, R., ... & Calina, D. (2023). 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. *Environmental Research*, 237, 116908.
- Docea, A. O., et al. (2018). A new threat from an old enemy: Re-emergence of measles. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(3), 2490–2495.
- Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: A once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4), 319–325. <https://doi.org/10.1002/ps.1518>
- Duke, S. O., & Powles, S. B. (2009). Glyphosate-resistant crops and weeds: Now and in the future. *AgBioForum*, 12(3&4), 346–357. <http://agbioforum.org/v12n34/v12n34a10-duke.htm>

- EFSA. (2022). *Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate*. EFSA Journal, 20(7), e07230. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7230>
- EFSA. (2023). *Reasoned opinion on the modification of the existing maximum residue levels for several active substances*. EFSA Journal, 21(2), e07719. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7719>
- European Commission. (2005). *Regulation (EC) No 396/2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin*. Official Journal of the European Union. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32005R0396>
- European Commission. (2009). *Regulation (EC) No 1107/2009 concerning the placing of plant protection products on the market*. Official Journal of the European Union. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32009R1107>
- European Commission. (2020). *From Farm to Fork Strategy: For a fair, healthy and environmentally-friendly food system*. https://food.ec.europa.eu/horizontal-topics/farm-fork-strategy_en
- Fedeli, M. Carloni, C. Nasuti, A. Gambini, V. Scocco, and R. Gabbianelli, “Early life permethrin exposure leads to hypervitaminosis D, nitric oxide and catecholamines impairment,” *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 107, no. 1, pp. 93–97, 2013.
- Felisbino, K., Kirsten, N., da Silva Milhorini, S., Marçal, I. S., Bernert, K., Schiessl, R., ... & Guiloski, I. C. (2023). Teratogenic effects of the dicamba herbicide in Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Pollution*, 334, 122187.
- Fenga, C., Gangemi, S., Costa, C., & Caccamo, D. (2017). Toxicological effects of pesticide mixtures: A review. *Environmental Research*, 156, 630–638. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.03.045>
- Ferguson, S. A., et al. (2022). Oxidative stress response to herbicide mixtures in mammalian cells. *Toxicology Reports*, 9, 540–548.
- G. D. Coronado, S. Holte, E. Vigoren et al., “Organophosphatepesticide exposure and residential proximity to nearby Fields,” *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, vol. 53, no. 8, pp. 884–891, 2011.
- G. Pezzoli, E. Cereda, Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease, *Neurology* 80 (22) (2013) 2035–2041, <https://doi.org/10.1212/wnl.0b013e318294b3c8>.
- Garry, V. F., et al. (2002). Pesticide applicers, biocides, and birth defects in rural Minnesota. *Environmental Health Perspectives*, 110(Suppl 3), 441–449.

- Garry, V. F., Harkins, M. E., Erickson, L. L., Long-Simpson, L. K., Holland, S. E., & Burroughs, B. L. (2002). Birth defects and pesticide exposure in Minnesota. *Environmental Health Perspectives*, 110(Suppl 3), 441–449. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s3441>
- Gilbert, R., MD PhD. (2019, April 29). The relationship between pesticides and Parkinson's. American Parkinson Disease Association. <
<https://www.apdaparkinson.org/article/the-relationship-between-pesticides-and-parkinsons/>> .
- Gillezeau, C., Van Gerwen, M., Shaffer, R.M., Rana, I., Zhang, L., Sheppard, L., Taioli, E., 2019
- Green, J. M., & Owen, M. D. K. (2011). Herbicide-resistant crops: Utilities and limitations for herbicide-resistant weed management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 5819–5829. <https://doi.org/10.1021/jf104389m>
- Gunier, R. B., Bradman, A., Harley, K. G., Kogut, K., Eskenazi, B., & Holland, N. T. (2017). Prenatal residential proximity to agricultural pesticide use and IQ in 7-year-old children. *Environmental Health Perspectives*, 125(5), 057002. <https://doi.org/10.1289/EHP504>
- Gunier, R. B., et al. (2017). Prenatal residential proximity to agricultural pesticide use and IQ in 7-year-old children. *Environmental Health Perspectives*, 125(5), 057002.
- Guyton, K. Z., et al. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology*, 16(5), 490–491.
- H. Jung, J. H. K. Choi, Y. Y. Chung, G. L. Lim, Y. N. Park, and S. W. Park, “Predominant Activation of JAK/STAT3 Pathway by Interleukin-6 Is Implicated in Hepatocarcinogenesis ,”*Neoplasia*, vol. 17, no. 7, pp. 586–597, 2015..
- Hajhashemi, G. Vaseghi, M. Pourfarzam, and A. Abdollahi, “Are antioxidants helpful for disease prevention?,” *Research in Pharmaceutical Sciences*, vol. 5, no. 1, pp. 1–8, 2010.

- Halliwell and J. M. Gutteridge, “Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview,” *Methods in Enzymology*, vol. 186, pp. 1–85, 1990.
- Hansen, L.R., Roslev, P., 2016. Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes. *Aquat. Toxicol.* 179, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.010>.
- Heap, I. (2023). International survey of herbicide-resistant weeds. www.weedscience.org
- Heap, I., Duke, S.O., 2018. Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Manag. Sci.* 74, 1040–1049. <https://doi.org/10.1002/ps.4760>.
- Hoy, J., Swanson, N., 2016. The high cost of pesticides: human and animal diseases. *Poult. Fish. Wildl. Sci.* 3, 1–18. <https://doi.org/10.4172/2375-446x.1000132>
- IARC. (2018). *Some organophosphate insecticides and herbicides* (Vol. 112). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. <https://monographs.iarc.who.int/iarc-monographs-on-the-identification-of-carcinogenic-hazards-to-humans/>
- J. Chen, Y. Su, F. Lin et al., “Effect of paraquat on cytotoxicity involved in oxidative stress and inflammatory reaction: a review of mechanisms and ecological implications,” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 224, article 112711, 2021.
- J. Mele, H. V. Remmen, J. Vijg, and A. Richardson, “Characterization of transgenic mice that overexpress both copper zinc superoxide dismutase and catalase,” *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 8, no. 3-4, pp. 628–638, 2006.
- J. Min, J. Han, K. Kim et al., “Human cholestatic hepatitis owing to polyoxyethylene nonylphenol ingestion,” *Medicine*, vol. 96, no. 32, article e7737, 2017.
- J. Noworyta-Glowacka, M. Beresinska, R. Bankowski, B. Wiadrowska, J. Siennicka, and J. K. Ludwicki, “Effect of chlorpyrifos on the profile of subpopulations immunocompetent cells B, T and NK in in vivo model,” *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, vol. 65, no. 4, pp. 311–316, 2014.

- J. Shi, B. Sun, W. Shi et al., “Decreasing GSH and increasing ROS in chemosensitivity gliomas with IDH1 mutation,” *Tumour Biology*, vol. 36, no. 2, pp. 655–662, 2015.
- J.A. Hoppin, D.M. Umbach, S.J. London, P.K. Henneberger, G.J. Kullman, J. Coble, M.C.R. Alavanja, L.E.B. Freeman, D.P. Sandler, Pesticide use and adult-onset asthma among male farmers in the Agricultural Health Study, *Eur. Respir. J.* 34 (6) (2009) 1296–1303, <https://doi.org/10.1183/09031936.00005509>
- K. A. McGlynn, C. C. Abnet, M. Zhang et al., “Serum concentrations of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT) and 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) and risk of primary liver cancer,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 98, no. 14, pp. 1005–1010,
- K. A. McGlynn, C. C. Abnet, M. Zhang et al., “Serum concentrations of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT) and 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) and risk of primary liver cancer,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 98, no. 14, pp. 1005–1010, 2006..
- K. A. McGlynn, S. M. Quraishi, B. I. Graubard, J. P. Weber, M. V. Rubertone, and R. L. Erickson, “Persistent organochlorine pesticides and risk of testicular germ cell tumors,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 100, no. 9, pp. 663–671, 2008.
- K. Konstantinou, D. G. Hela, and T. A. Albanis, “The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels,” *Environmental*
- K. Konstantinou, D. G. Hela, and T. A. Albanis, “The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels,” *Environmental Pollution*, vol. 141, no. 3, pp. 555–570, 2006.
- Kaltwasser, J. (2022, January 31). Study: Workplace pesticide exposure linked with COPD risk. *AJMC*. <https://www.ajmc.com/view/study-workplace-pesticide-exposure-linked-with-copd-risk> .

- Kim, K. H., Jahan, S. A., & Kabir, E. (2014). Neurodevelopmental toxicity of environmental chemicals. *Neurotoxicology*, 43, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.12.002>
- Kiran, T., Otlu, O. & Karabulut, A. (2023). Oxidative stress and antioxidants in health and disease. *Journal of Laboratory Medicine*, 47(1), 1–11. <https://doi.org/10.1515/labmed-2022-0108>
- Kostoff, R. N., Lau, C. G. Y., & Briggs, M. B. (2018). Combined toxic exposures and human health: A review. *Toxicology Reports*, 5, 1169–1172. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.10.016>
- Kumar, S., Kaushik, G., Dar, M. A., Nimesh, S., López-Chuken, U. J., & Villarreal-Chiu, J. F. (2018). Microbial degradation of organophosphate pesticides: A review. *Pedosphere*, 28(2), 190–208. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60017-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60017-7)
- L. Wani, A. Ara, and J. A. Usmani, “Lead toxicity: a review,” *Interdisciplinary Toxicology*, vol. 8, no. 2, pp. 55–64, 2015.
- L. Wani, A. Ara, and J. A. Usmani, “Lead toxicity: a review,” *Interdisciplinary Toxicology*, vol. 8, no. 2, pp. 55–64, 2015.
- L.M. Brown, A. Blair, R. Gibson, G.D. Everett, K.P. Cantor, L.M. Schuman, L. F. Burmeister, V.L.S. F, F. Dick, Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in iowa and minnesota, *Am. Assoc. Cancer Res.* (1990).
- Larsen, K. E., et al. (2012). Pesticide-induced oxidative stress in rat brain: regional differences. *Neurotoxicology*, 33(3), 615–624.
- Larsen, K. E., Lifschitz, A. L., Lanusse, C. E., & Virkel, G. L. (2012). Glyphosate induces oxidative stress in rats. *Toxicology Letters*, 215(2), 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.09.009>
- Lee, D. H., et al. (2017). Low dose of persistent organic pollutants and oxidative stress: A systematic review and meta-analysis. *Environment International*, 99, 212–223.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., et al. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186, 464–478.

- M. Amizadeh, and H. Reihani-Kermani, “Pesticide exposure and head and neck cancers: a case-control study in an agricultural region,” *Iranian Journal of Otorhinolaryngology*, vol. 29, no. 94, pp. 275–285, 2017.
- M. C. Alavanja, M. K. Ross, and M. R. Bonner, “Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure,” *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, vol. 63, no. 2, pp. 120–142, 2013.
- M. C. Martínez and R. Andriantsitohaina, “Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease,” *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 11, no. 3, pp. 669–702, 2009.
- M. Schieber and N. S. Chandel, “ROS function in redox signaling and oxidative stress,” *Current Biology: CB*, vol. 24, no. 10, pp. R453–R462, 2014.
- M. Xu, F. Yang, Integrated gender-related effects of profenofos and paclobutrazol on neurotransmitters in mouse, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 190 (2020) 110085, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110085>.
- M.C. Alavanja, J.A. Hoppin, F. Kamel, Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity, *Annu. Rev. Public Health* 25 (1) (2004) 155–197,
- M.E. Ch´avez-Pichardo, D.Y. Reyes-Bravo, M.S. Mendoza-Trejo, A.G. Marín-L´opez, M. Giordano, N. Hern´andez-Chan, K. Domínguez-Marchan, L.C. Ortega-Rosales, V.M. Rodríguez, Brain alterations in GABA, glutamate and glutamine markers after chronic atrazine exposure in the male albino rat, *Arch. Toxicol.* 94 (9)(2020) 3217–3230, <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02806-2>.
- Mañas, F. et al. (2022). Sublethal neurotoxicity in zebrafish brain following co-exposure to glyphosate and dicamba. *Aquatic Toxicology*, 246, 106122.
- Manservigi, F., Lesseur, C., Panzacchi, S., Mandrioli, D., Falcioni, L., Bua, L., ... & Belpoggi, F. (2019). *Prenatal exposure to a glyphosate-based herbicide, with or without an added POEA surfactant, alters maternal behavior and affects female offspring development and endocrine system in rats*. *Toxicology*, 415, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.01.004>
- Mesnage, R. et al. (2021a). ToxTracker-based mechanism-of-action analysis of glyphosate and its formulated products. *Archives of Toxicology*, 95(2), 395–416.

- Mesnage, R., & Antoniou, M. N. (2017). *Facts and fallacies in the debate on glyphosate toxicity*. *Frontiers in Public Health*, 5, 316. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00316>
- Mesnage, R., & Antoniou, M. N. (2018). Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides. *Frontiers in Public Health*, 5, Article 361. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00361>
- Mesnage, R., & Antoniou, M. N. (2021). Molecular effects of pesticide mixtures. *Frontiers in Genetics*, 12, 682577. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.682577>
- Mesnage, R., & Zaller, J. G. (2021). Herbicides and plant protection products: The unseen effects of mixtures. *Science of The Total Environment*, 774, 145643.
- Mesnage, R., Defarge, N., de Vendômois, J. S., & Seralini, G. E. (2015). *Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles*. *BioMed Research International*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/371456>
- Mesnage, R., et al. (2021). Insights into the molecular mechanisms of the neurotoxicity of glyphosate-based herbicides. *Cell Biology and Toxicology*, 37(3), 313–330.
- Mesnage, R., Renney, G., Seralini, G. E., Ward, M., & Antoniou, M. N. (2021a). ToxTracker-based assessment of herbicide mixtures. *Archives of Toxicology*, 95, 2609–2623. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03059-7>
- Mora, A. M., Eskenazi, B., Huen, K., Harley, K. G., Bradman, A., & Holland, N. (2018). Prenatal exposure to organophosphate pesticides and neurodevelopment. *Environmental Research*, 165, 598–606. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.04.019>
- Mora, A. M., et al. (2018). Prenatal exposure to organophosphate pesticides and neurobehavioral development of children at 7 years of age: A prospective study. *Environmental Health*, 17(1), 1–12.
- Mortensen, D.A., Egan, J.F., Maxwell, B.D., Ryan, M.R., Smith, R.G., 2012. Navigating a critical juncture for sustainable weed management. *Bioscience* 62, 75–84. <https://doi.org/10.1525/bio.2012.62.1.12>.
- Myers, J. P., Antoniou, M. N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L. G., ... Benbrook, C. M. (2016). *Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: A consensus statement*. *Environmental Health*, 15, 19. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>

- Myers, J. P., et al. (2016). Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: A consensus statement. *Environmental Health*, 15, 19.
- Myers, J.P., Antoniou, M.N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L.G., Hansen, M., Landrigan, P.J., Lanphear, B.P., Mesnage, R., Vandenberg, L.N., Vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Benbrook, C.M., 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source* 15, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>.
- Myers, M.S., Johnson, L.L., Olson, O.P., Stehr, C.M., Horness, B.H., Collier, T.K., McCain, B.B., 1998. Toxicopathic hepatic lesions as biomarkers of chemical contaminant exposure and effects in marine bottomfish species from the northeast and Pacific coasts, USA. *Mar.Pollut.Bull.* 37, 92–113.
- N. Georgiadis, K. Tsarouhas, C. Tsitsimpikou et al., “Pesticides and cardiotoxicity. Where do we stand?,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 353, pp. 1–14, 2018.
- N. Magalhães, F. Carvalho, and R. J. Dinis-Oliveira, “Human and experimental toxicology of diquat poisoning: Toxicokinetics, mechanisms of toxicity, clinical features, and treatment,” *Human & Experimental Toxicology*, vol. 37, no. 11, pp. 1131–1160, 2018.
- N. Soundararajan, D. Mohan, R. Abbu, and T. Devasena, “Evaluation of cytotoxicity, oxidative stress, nuclear changes and pro-inflammatory cytokines induced by monocrotophos in human keratinocyte cells in vitro,” *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 7, no. 1, 2014.
- N.K. Singh, B.D. Banerjee, K. Bala, M. Basu, N. Chhillar, Polymorphism in cytochrome P450 2D6, glutathione S-Transferases PI 1 genes, and organochlorine pesticides in Alzheimer disease, *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 27 (2) (2014) 119–127, <https://doi.org/10.1177/0891988714522698>.
- Nandula, V. K. (2019). *Herbicide resistance in crops and weeds: Biology and management* (2nd ed.). Wiley.
- Nechalioti, P. M., Karampatzakis, T., Mesnage, R., Antoniou, M. N., Ibragim, M., Tsatsakis, A., ... & Kouretas, D. (2023). Evaluation of perinatal exposure of

glyphosate and its mixture with 2, 4-D and dicamba on liver redox status in Wistar rats. *Environmental Research*, 228, 115906.

- Nechalioti, P. M., Karampatzakis, T., Mesnage, R., Antoniou, M. N., Ibragim, M., Tsatsakis, A., ... & Kouretas, D. (2023). Evaluation of perinatal exposure of glyphosate and its mixture with 2, 4-D and dicamba on liver redox status in Wistar rats. *Environmental Research*, 228, 115906.
- O. K. Afolabi, F. A. Aderibigbe, D. T. Folarin, A. Arinola, and A. D. Wusu, "Oxidative stress and inflammation following sub-lethal oral exposure of cypermethrin in rats: mitigating
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358.
- Ojha and Y. K. Gupta, "Evaluation of genotoxic potential of commonly used organophosphate pesticides in peripheral blood lymphocytes of rats," *Human & Experimental Toxicology*, vol. 34, no. 4, pp. 390–400, 2015.
- Ojha and Y. K. Gupta, "Evaluation of genotoxic potential of commonly used organophosphate pesticides in peripheral blood lymphocytes of rats," *Human & Experimental Toxicology*, vol. 34, no. 4, pp. 390–400, 2015.
- P. D. Dwivedi, M. Das, and S. K. Khanna, "Role of cytochrome P-450 in quinalphos toxicity: effect on hepatic and brain antioxidant enzymes in rats ITRC communication no," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 36, no. 5, pp. 437–444, 1998.
- P. Kumar, R. Kumar, K. Thakur, D. Mahajan, B. Brar, D. Sharma, A.K. Sharma, Impact of pesticides application on aquatic ecosystem and biodiversity: A review, *Biology Bulletin* 50 (6) (2023) 1362–1375.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30, 11-26.
- Pollution, vol. 141, no. 3, pp. 555–570, 2006.
- potential of epicatechin," *Heliyon*, vol. 5, no. 8, article e02274, 2019.
- D. A. Drechsel and M. Patel, "Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 44, no. 11, pp. 1873–1886, 2008.

- Prakasam, S. Sethupathy, and S. Lalitha, "Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers," *Clinica Chimica Acta*, vol. 310, no. 2, pp. 107–112, 2001.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- Q. Li, X. Yang, N. Sreejayan, and J. Ren, "Insulin-like growth factor I deficiency prolongs survival and antagonizes paraquat-induced cardiomyocyte dysfunction: role of oxidative stress," *Rejuvenation Research*, vol. 10, no. 4, pp. 501–512, 2007.
- R. Jayaraj, P. Megha, and P. Sreedev, "Review Article. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment," *Interdisciplinary Toxicology*, vol. 9, no. 3-4, pp. 90–100, 2016.
- R. K. Kori, M. K. Singh, A. K. Jain, and R. S. Yadav, "Neurochemical and behavioral dysfunctions in pesticide exposed farm workers: a clinical outcome," *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, vol. 33, no. 4, pp. 372–381, 2018.
- R. Li, Z. Jia, and M. A. Trush, "Defining ROS in biology and medicine," *Reactive oxygen species*, vol. 1, no. 1, pp. 9–21, 2016.
- R. Ravula and S. Yenugu, "Pyrethroid based pesticides -chemical and biological aspects," *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 51, no. 2, pp. 117–140, 2021.
- R. Ravula and S. Yenugu, "Pyrethroid based pesticides -chemical and biological aspects," *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 51, no. 2, pp. 117–140, 2021.
- Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1(6), 3159–3165
- Ranjbar, P. Pasalar, A. Sedighi, and M. Abdollahi, "Induction of oxidative stress in paraquat formulating workers," *Toxicology Letters*, vol. 131, no. 3, pp. 191–194, 2002.
- Reregistration eligibility decision for prometryn, U.S. Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 1996.

- Rolando, C.A., Baillie, B.R., Thompson, D.G., Little, K.M., 2017. The risks associated with glyphosate-based herbicide use in planted forests. *Forests* 8. <https://doi.org/10.3390/f8060208>.
- Roy, N. M., Carneiro, B., & Ochs, J. (2016). *Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.01.006>
- Roy, N. M., et al. (2016). Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42, 45–54.
- S. Ayub, J. Verma, and N. Das, “Effect of endosulfan and malathion on lipid peroxidation, nitrite and TNF-alpha release by rat peritoneal macrophages,” *International Immunopharmacology*, vol. 3, no. 13-14, pp. 1819–1828, 2003.
- S. C. Cortés-Iza and A. I. Rodríguez, “Oxidative stress and pesticide disease: a challenge for toxicology,” *Revista de la Facultad de Medicina*, vol. 66, pp. 261–267, 2018.
- S. Chakraborty, S. Mukherjee, S. Roychoudhury, S. Siddique, T. Lahiri, M.R. Ray, Chronic exposures to cholinesterase-inhibiting pesticides adversely affect respiratory health of agricultural workers in India, *J. Occup. Health* 51 (6) (2009) 488–497, <https://doi.org/10.1539/joh.19070>.
- S. Gangemi, E. Gofita, C. Costa et al., “Occupational and environmental exposure to pesticides and cytokine pathways in chronic diseases (Review),” *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 38, no. 4, pp. 1012–1020, 2016.
- S. Medithi, Y. D. Kasa, B. Jee, V. Kodali, and P. R. Jonnalagadda, “Organophosphate pesticide exposure among farm women and children: Status of micronutrients, acetylcholinesterase activity, and oxidative stress,” *Archives of Environmental & Occupational Health*, vol. 75, pp. 1–16, 2020.
- S. Pinlaor, B. Sripa, N. Ma et al., “Nitrate and oxidative DNA damage in intrahepatic cholangiocarcinoma patients in relation to tumor invasion,” *World Journal of Gastroenterology*, vol. 11, no. 30, pp. 4644–4649, 2005.
- S. Sifakis, M. Mparmpas, O. P. A. Tsatsakis, Pesticide exposure and health related issues in male and female reproductive system, *InTech eBooks* (2011), <https://doi.org/10.5772/15845>.

- S.P. Moran, J. Maksymetz, P.J. Conn, Targeting muscarinic acetylcholine receptors for the treatment of psychiatric and neurological disorders, *Trends Pharmacol. Sci.* 40 (12) (2019) 1006–1020, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.10.007>.
- Sabarwal, K. Kumar, and R. P. Singh, “Hazardous effects of chemical pesticides on human health-Cancer and other associated disorders,” *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 63, pp. 103–114, 2018.
- Sabarwal, K. Kumar, and R. P. Singh, “Hazardous effects of chemical pesticides on human health-Cancer and other associated disorders,” *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 63, pp. 103–114, 2018.
- Salam, M.T., Li, Y.F., Langholz, B., Gilliland, F.D., 2004. Early-life environmental risk factors for asthma: findings from the children's health study. *Environ. Health Perspect.* 112, 760–765.
- Sharma, V. Kumar, B. Shahzad et al., “Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem,” *SN Applied Sciences*, vol. 1, no. 11, p. 1446, 2019.
- Sharma, V. Kumar, B. Shahzad et al., “Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem,” *SN Applied Sciences*, vol. 1, no. 11, p. 1446, 2019.
- Silva, L. et al. (2021). Neurodevelopmental alterations in frogs exposed to herbicides. *Environmental Pollution*, 286, 117217.
- Szekacs, A., Darvas, B., 2012. Forty years with glyphosate, herbicides - properties. *Synthesis Control Weeds* <https://doi.org/10.5772/32491>
- T. Finkel, “Signal transduction by reactive oxygen species,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 194, no. 1, pp. 7–15, 2011.
- T. Hariri, S. A. Moallem, M. Mahmoudi, B. Memar, and H. Hosseinzadeh, “Sub-acute effects of diazinon on biochemical indices and specific biomarkers in rats: protective effects of crocin and safranal,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 10, pp. 2803–2808, 2010.
- T. P. Brown, P. C. Rumsby, A. C. Capleton, L. Rushton, and L. S. Levy, “Pesticides and Parkinson’s disease—is there a link?,” *Environmental Health Perspectives*, vol. 114, no. 2, pp. 156–164, 2006.
- Tsatsakis, A. M., Docea, A. O., Calina, D., Tsitsimpikou, C., & Liesivuori, J. (2017). Safety evaluation of chemical mixtures. *Toxicology Reports*, 4, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.12.009>

- Tsatsakis, A. M., Docea, A. O., Calina, D., Tsoukalas, D., Zamfira, L. M., Mitrut, R., ... & Kouretas, D. (2016). *New challenges in risk assessment of chemicals when simulating real exposure scenarios; simultaneous multi-chemicals' low dose exposure*. Food and Chemical Toxicology, 96, 174–176. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.011>
- Tsatsakis, A. M., Kouretas, D., Tzatzarakis, M. N., Stivaktakis, P. D., Tsarouhas, K., Hernandez, A. F., ... & Rezaee, R. (2017). *Simulating real-life exposures to uncover possible risks to human health: A proposed consensus for a novel methodological approach*. Human & Experimental Toxicology, 36(6), 554–564. <https://doi.org/10.1177/0960327116681652>
- V. Snezhkina, A. V. Kudryavtseva, O. L. Kardymon et al., “ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells,” Oxidative Medicine and Cellular Longevity, vol. 2019, Article ID 6175804, 17 pages, 2019.
- V. Snezhkina, A. V. Kudryavtseva, O. L. Kardymon et al., “ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells,” Oxidative Medicine and Cellular Longevity, vol. 2019, Article ID 6175804, 17 pages, 2019.
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. Science of the Total Environment, 616–617, 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>
- Vardakas, D., Stivaktakis, P. D., Tzatzarakis, M. N., Kouretas, D., Docea, A. O., & Tsatsakis, A. M. (2022). *Real-life exposure to multiple chemicals: A pathophysiological approach using in vivo experimental models*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 92, 103856. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103856>
- Varesi, A., Chirumbolo, S., Campagnoli, L. I. M., Pierella, E., Piccini, G. B., Carrara, A., Ricevuti, G., Scassellati, C., Bonvicini, C., & Pascale, A. (2022). The Role of Antioxidants in the Interplay between Oxidative Stress and Senescence. Antioxidants, 11(7), 1224. <https://doi.org/10.3390/antiox11071224>

- Vittorio, R. Sultana, G. Scapagnini et al., “Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer’s disease,” *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 8, no. 11-12, pp. 1975–1986, 2006.
- W. Ge, Y. Zhang, X. Han, and J. Ren, “Cardiac-specific overexpression of catalase attenuates paraquat-induced myocardial geometric and contractile alteration: role of ER stress,” *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 49, no. 12, pp. 2068–2077, 2010.
- Weydert, C. J., & Cullen, J. J. (2010). Measurement of oxidative stress. In *Methods in Enzymology* (Vol. 474, pp. 343–357). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)74020-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)74020-8)
- Weydert, C. J., & Cullen, J. J. (2019). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*, 5(1), 51–66.
- X. Lu and C. Yu, “Enantiomer-specific profenofos-induced cytotoxicity and DNA damage mediated by oxidative stress in rat adrenal pheochromocytoma (PC12) cells,” *Journal of Applied Toxicology*, vol. 34, no. 2, pp. 166–175, 2014.
- X. Wang, M. A. Martínez, M. Dai et al., “Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review,” *Environmental Research*, vol. 149, pp. 86–104, 2016.
- Y. Fu, H. Sies, and X. G. Lei, “Opposite roles of selenium-dependent glutathione peroxidase-1 in superoxide generator diquat- and peroxynitrite-induced apoptosis and signaling,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 46, pp. 43004–43009, 2001.
- Y. Hiraku, “Formation of 8-nitroguanine, a nitrative DNA lesion, in inflammation-related carcinogenesis and its significance,” *Environmental Health and Preventive Medicine*, vol. 15, no. 2, pp. 63–72, 2010.
- Y. Jin, R. Chen, W. Liu, and Z. Fu, “Effect of endocrine disrupting chemicals on the transcription of genes related to the innate immune system in the early developmental stage of zebrafish (*Danio rerio*),” *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 28, no. 5-6, pp. 854–861, 2010.
- Y. Wu, X. Weng, S. Liu, Y. Tan, H. Liang, Y. Li, L. Wen, Q. Chen, C. Jing, Associations of single and multiple organophosphate pesticide exposure with female infertility in the USA: data from the 2015–2018 National Health and

Nutrition Examination Survey, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 30 (9) (2022) 23411–23421, <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23624-2>.

- Y. Yurumez, M. Cemek, Y. Yavuz, Y. O. Birdane, and M. E. Buyukokuroglu, “Beneficial effect of N-acetylcysteine against organophosphate toxicity in mice,” *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 30, no. 3, pp. 490–494, 2007.
- Yu, J., Tang, L., Pang, Y., Liang, X., Lu, Y., Feng, H., ... & Tang, J. (2022). Non-radical oxidation in environmental catalysis: Recognition, identification, and perspectives. *Chemical Engineering Journal*, 433, 134385.
- Zelaya, I. A., & Owen, M. D. K. (2023). Herbicide resistance is complex: A global review of cross-resistance in weeds within herbicide groups. *Weed Science*, 72(5), 465–486. <https://doi.org/10.1017/wsc.2024.33>