



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΑΠΟ ΑΙΜΑ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ ΕΠΕΙΤΑ
ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ CYPERMETHRIN ΚΑΙ PIPERONYL
BUTOXIDE**

**SPECIFICATION OF OXIDATIVE STRESS MARKERS FROM RABBIT BLOOD AFTER
LONG TERM EXPOSURE TO PESTICIDES CYPERMETHRIN AND PIPERONYL
BUTOXIDE**

Τσιμπέρης Χρήστος

Λαρίσα 2015

Τριμελής επιτροπή:

Καθηγητής Κουρέτας Δημήτριος

Λέκτορας Στάγκος Δημήτριος

Καθηγητής Τσατσάκης Αριστείδης

Η μελέτη έγινε στα πλαίσια συνεργασίας με το εργαστήριο Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, του Καθηγητή κ. Αριστείδη Τσατσάκη για τη διδακτορική διατριβή της φοιτήτριας κ. Περσεφόνης Φραγκιαδάκης.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1	ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ.....	8
1.2	ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΠΗΓΕΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ.....	10
	<i>Οξειδωτική Φωσφορυλίωση</i>	10
	<i>Κυτόχρωμα P 450 – Ενζυμικό σύστημα P 450</i>	11
	<i>Υπεροξειδισώματα</i>	12
	<i>Άσκηση</i>	12
	<i>Αιμοσφαιρίνη</i>	12
	<i>Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων</i>	12
	<i>Το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης</i>	13
1.3	ΕΞΩΤΕΡΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ.....	13
1.4	ΒΛΑΒΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ.....	14
1.4.1	Βλάβες στο DNA.....	14
1.4.2	Βλάβες στις πρωτεΐνες	15
1.4.3	Βλάβες στα λιπίδια:	16
1.5	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ.....	17
	<i>Καταλάση (CAT)</i>	17
	<i>Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)</i>	17
	<i>Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)</i>	18
	<i>Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)</i>	18
1.5.2	ΜΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	19
	<i>Γλουταθειόνη</i>	19
	<i>Βιταμίνη C</i>	20
	<i>Βιταμίνη E</i>	20
	<i>Καροτενοειδή</i>	21
	<i>Ουρικό οξύ</i>	21
	<i>Ουβικινόνη ή συνένζυμο Q</i>	21

Σελήνιο	21
1.6 Εντομοκτόνα	22
1.6.1 Cypermethrin:	22
1.6.2 Piperonyl Butoxide:	23
1.7 Κουνέλια ως πειραματόζωα	26
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	26
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
3.1 Πρωτόκολλο ζώων και χορήγησης:.....	27
3.2 Χειρισμός αίματος	28
3.3 Μέθοδοι προσδιορισμού οξειδωτικού στρες.....	29
3.3.1 Πρωτεϊνικά καρβονύλια	29
3.3.2 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)	31
3.3.3 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (MDA)	33
3.3.4 Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)	34
3.3.5 Προσδιορισμός καταλάσης	36
3.4 Στατιστική ανάλυση	37
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	43
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	48

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το Cypermethrin (CYP) είναι ένα πυρεθροειδές φυτοφάρμακο που κατατάσσεται στο παράρτημα VI του κανονισμού 1272/2008/EC (CLP), ενώ το Piperonyl Butoxide (PBO) είναι ένα βιοκτόνο που χρησιμοποιείται για την παραγωγή συνθετικών πυρεθροειδών. Αυτά τα δύο, συνήθως χρησιμοποιούνται μαζί. Στα θηλαστικά, τα συνθετικά πυρεθροειδή μεταβολίζονται μέσω αντιδράσεων υδρόλυσης, οξειδωσης και σύζευξης. Το PBO αποτρέπει τον μεταβολισμό του CYP, και με αυτόν τον τρόπο ενισχύει την επίδραση του φυτοφαρμάκου. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η πρόκληση οξειδωτικού στρες μετά από χορήγηση σε μικρή και σε μεγάλη δόση σε κουνέλια του CYP και του PBO καθώς και του συνδυασμού τους. Οι δείκτες οξειδωτικού στρες έδειξαν ότι στις CYP ομάδες χαμηλής και υψηλής δόσης, η TAC ήταν σημαντικά αυξημένη ($p = 0.01$ και $p = 0.002$ αντίστοιχα) ως και 20% συγκριτικά με τις control ομάδες. Το ίδιο παρατηρούμε και στην χαμηλή δόση του PBO, όπου και εκεί η TAC ήταν αυξημένη ($p = 0.004$), αλλά αντίθετα, στην υψηλή δόση παρατηρήσαμε μια τάση ($p = 0.067$) για μείωση της TAC κατά 20%. Η συγχορήγηση των δύο φαρμάκων σε χαμηλές δόσεις, δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα της TAC, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υπήρχε μια τάση μείωσης ($p = 0.079$) της TAC κατά 20%. Στις ομάδες CYP, τα επίπεδα της GSH δεν επηρεάστηκαν σε καμία δοσολογία συγκριτικά με τις control ομάδες. Ωστόσο, η χορήγηση του PBO σε υψηλές δόσεις μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της GSH ($p = 0.007$) κατά 73% συγκριτικά με τις control ομάδες. Επιπλέον, η συνεργιστική δράση των δύο φαρμάκων σε υψηλές δόσεις μειώνει τα επίπεδα της GSH κατά 65% ($p = 0.013$) συγκριτικά με τις control ομάδες, ενώ σε χαμηλές δόσεις απλά παρατηρούμε μια τάση για μείωση κατά 43% ($p = 0.08$) στην GSH. Οι δραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS), δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στις εξεταζόμενες ομάδες. Η δραστηριότητα της καταλάσης αυξήθηκε σημαντικά κατά 59% ($p = 0.046$) στην CYP ομάδα χαμηλής δόσης συγκριτικά με το control. Επίσης, παρατηρήθηκε τάση για μείωση στην δραστηριότητα της καταλάσης κατά 50% ($p = 0.086$) στην συνεργιστική δράση των CYP και PBO σε υψηλές δόσεις. Στις άλλες ομάδες, η δραστηριότητα της καταλάσης δεν επηρεάστηκε σημαντικά σε σύγκριση με τις control ομάδες. Όσον αφορά τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές, ούτε ανάλογα της δόσης αλλά ούτε με τη συνεργιστική ή ανεξάρτητη δράση των φαρμάκων. Ωστόσο, μια μικρή τάση για αύξηση εμφανίστηκε στις CYP ομάδες χαμηλής δόσης ($p = 0.079$) κατά 25% για αυξημένα πρωτεϊνικά καρβονύλια συγκριτικά με τις control ομάδες. Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα που πήραμε (αν και ο μικρός αριθμός των ζώων ανά ομάδα αποτελεί έναν περιοριστικό παράγοντα για αυτή τη μελέτη) καταλήγουμε στο ότι η συγχορήγηση του παράγοντα PBO με το CYP αυξάνει τα επίπεδα οξειδωτικού στρες.

ABSTRACT

The Cypermethrin (CYP) is a pyrethroid pesticide that is classified in Annex VI of Regulation 1272/2008/ EU (CLP), while Piperonyl Butoxide (PBO) is a biocide used to produce synthetic pyrethroid. These two are usually used together. In mammals, the synthetic pyrethroids are metabolized by reactions of hydrolysis, oxidation and conjugation. The PBO prevents metabolism of CYP, and thereby enhances its effect. The present study examined the induction of oxidative stress after administration to rabbits, of a small and a large dose of CYP and PBO as well as their combination. The oxidative stress markers showed that in CYP groups of low and high dose, the TAC was significantly increased ($p = 0.01$ and $p = 0.002$ respectively) up to 20% as compared to control groups. The same was observed at the low dose of PBO, where the TAC was increased ($p = 0.004$), but in contrast, at the high dose it was observed a trend ($p = 0.067$) for reduction of the TAC by 20%. Co-administration of the two drugs at low doses, did not affect TAC levels, while at high doses there was a trend ($p = 0.079$) for decrease in TAC by 20%. In CYP groups, GSH levels were not affected at any dose compared to the control groups. However, administration of PBO at high doses significantly reduced GSH levels ($p = 0.007$) by 73% compared to control groups. Moreover, the synergistic effect of the two drugs at high doses reduced GSH levels by 65% ($p = 0.013$) compared to the control groups, while at low doses there was just a tendency ($p = 0.08$) to decrease GSH levels by 43%. In the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, there were not significant differences between the different groups. The activity of catalase was increased significantly by 59% ($p = 0.046$) in the CYP low dose group compared to the control. Also, there was a tendency to reduce the activity of the catalase by 50% ($p = 0.086$) after co-administration of CYP and PBO at high doses. In the other groups, the activity of catalase was not significantly affected compared to control groups. Regarding the levels of protein carbonyls, no significant differences were observed between the different groups. However, there was a trend ($p = 0.079$) for increase by 25% in protein carbonyl levels in CYP low dose group compared to control group. In conclusion, the results obtained (although the small number of animals per group was a limiting factor for this study) showed that the co-administration of PBO with CYP increased oxidative stress levels.

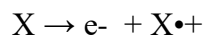
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

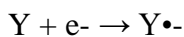
Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα άτομο ή ένα μόριο το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα. (Jenkins, 1988) Στα περισσότερα μόρια τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε στοιβάδα τείνουν να ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις, έτσι το μόριο χαρακτηρίζεται σχετικά σταθερό και λιγότερο δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο αλλάζει ενεργειακή κατάσταση, γίνεται ασταθές και συνεπώς πιο δραστικό από άλλα μόρια. Τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια ασκούν τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων οξείδωσης (απώλεια ηλεκτρονίων,) ή αναγωγής (απόκτηση ηλεκτρονίων) μεταξύ ατόμων ή μορίων. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό.

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με τους παρακάτω τρόπους:

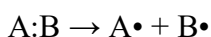
- Απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο:

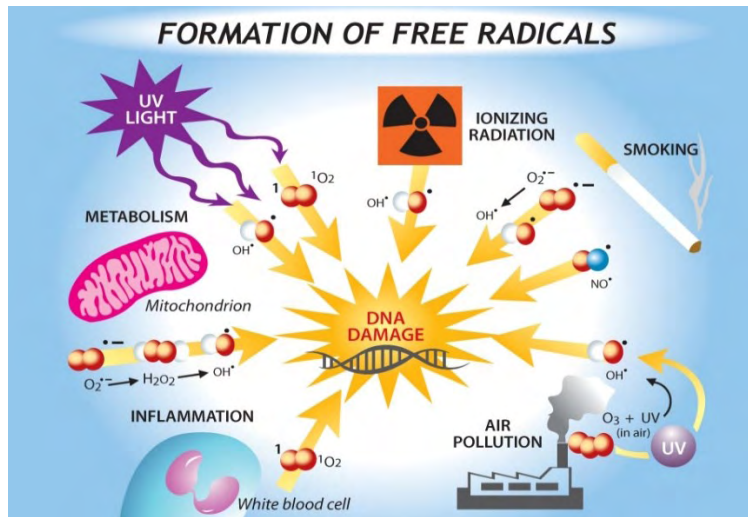


- Λήψη ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο:



- Ομολυτική σχάση ομοιοπολικού δεσμού:





Εικόνα 1: Πηγές ελεύθερων ριζών

Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο H με ένα πρωτόνιο και ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το οξυγόνο αποτελούν τη δραστική ομάδα ελευθέρων ριζών και πιο συγκεκριμένα είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species) όπως του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), του αλκοξυλίου (RO^{\bullet}), του υπεροξειδίου (ROO^{\bullet}) και η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις, που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman, 1993). Στις ROS επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ ($COCl$) αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Halliwell, 2001). Στις ελεύθερες ρίζες συγκαταλέγονται και οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) που προέρχονται από το χλώριο. Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες ριζών μπορούν να προέρθουν από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (Giles & Jacob, 2002).

1.2 ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΠΗΓΕΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Μέρος των ελευθέρων ριζών αποτελούν φυσικά προϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων οι οποίες πρόκειται για χημικά ιδιαίτερα δραστικές ενώσεις. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από το οξυγόνο το οποίο σε συγκεντρώσεις πάνω από 21% είναι τοξικό. Στη τοξικότητά του αυτή στηρίχθηκαν, οι McCord και Fridovich το 1969, ώστε να επιβεβαιώσουν πως η τοξικότητα των δραστικών μορφών του οξυγόνου οφείλεται σε ακριβώς αυτή του την ιδιότητα. (Παπαγεωργίου, 2005)

Αν και κατά βάση οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται επιβλαβείς σε χαμηλές συγκεντρώσεις εξασφαλίζουν τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και εξυπηρετούν συγκεκριμένες διεργασίες όπως για παράδειγμα τη μεταγωγή σήματος για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη φαγοκυττάρωση, την κυτταρική διαφοροποίηση, την αναδίπλωση των νεοσυστατών πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου η διαδικασία αυτή απαιτεί την ύπαρξη ενός οξειδωμένου περιβάλλοντος. Το οξειδωτικό στρες περιγράφει την ανισορροπία μεταξύ των ελευθέρων ριζών (ή οποιονδήποτε άλλων δραστικών μορφών) και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού. Η ύπαρξη οξειδωτικού στρες συνεπάγεται παραγωγή και συσσώρευση οξειδωτικών προϊόντων που εμπλέκονται στη παθογένεια, κατά κύριο λόγο εκφυλιστικών νοσημάτων και φλεγμονών. Χαρακτηρίζεται από τις μεταβολές που προκαλεί στα βιομόρια του οργανισμού (Raymond C.S.Seet, 2010).

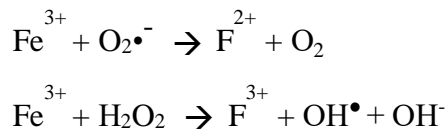
Σε αντίθετη περίπτωση αν η περίσσεια τους δεν αδρανοποιηθεί τότε θα αντιδράσει με τα κυτταρικά στοιχεία του οργανισμού, δηλαδή λίπη – πρωτεΐνες - νουκλεϊκά οξέα, με συνέπεια να προκληθούν μη αναστρέψιμες μεταβολές (Pilar Codo Ner-Franch, 2011).

Οι βασικές ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών είναι οι εξής:

Οξειδωτική Φωσφορυλίωση

Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγεται το μεγαλύτερο μέρος ATP που συνθέτουν οι περισσότεροι οργανισμοί, λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και πιο συγκεκριμένα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων όπου και περιέχονται όλα τα ένζυμα οξείδωσης των λιπαρών οξέων, αμινοξέων, τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέος. Περιλαμβάνει αναγωγή του O_2 σε H_2O με ηλεκτρόνια που προκύπτουν από το NADH και το $FADH_2$. Η

αναγωγή της NADH-ουβικινόνης και η αναγωγή της ουβικινόνης-κυτόχρωμα c είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 . Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και το FADH₂ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $O_2^{\bullet-}$ (Chance et al., 1979). Το $O_2^{\bullet-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD). Μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $O_2^{\bullet-}$ και στο H_2O_2 δημιουργείται OH^{\bullet} :

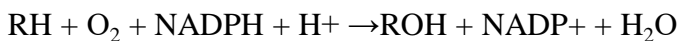


Όπως προκύπτει, κατά την αναγωγή του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια παράγονται δραστικές ελεύθερες ρίζες, επικίνδυνες για τα κύτταρα καθώς προκαλούν βλάβες στα ένζυμα στα μεμβρανικά λιπίδια και στα νουκλεϊνικά οξέα.

Κυτόχρωμα P 450 – Ενζυμικό σύστημα P 450

Το ενζυμικό σύστημα P450 κατέχει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών για τον οργανισμό. Τα ένζυμα συστήματος του αποτελούνται από αιμοπρωτείνες, βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων του ήπατος. Κύριος μηχανισμός λειτουργίας είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και NADPH στο μοριακό οξυγόνο, οξειδώνοντας έτσι το υπόστρωμα.

Η αντίδραση που πραγματοποιείται σε ένα ξενοβιοτικό RH είναι η ακόλουθη:



Η υδροξυλίωση των ξενοβιοτικών τα καθιστά πιο υδατοδιαλυτά και επιτρέπει την απέκκρισή τους στα ούρα, κάποιες φορές όμως η υδροξυλίωση μερικών ενώσεων τις μετατρέπει σε τοξικές ουσίες.

Υπεροξειδισώματα

Είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια που περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα για τη διάσπαση διαφόρων ουσιών επικίνδυνων για το κύτταρο. Επίσης τα υπεροξειδισώματα συμμετέχουν στην αποδόμηση των λιπιδίων μέσω οξείδωσης καθώς και στην αδρανοποίηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2).

Άσκηση

Μελέτες έδειξαν πως η έντονη άσκηση σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών και σε συνδυασμό με αυξημένη ποσότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων σε ανθρώπους μετά από χρόνια άσκηση σε ήπαρ, καρδιά.

Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη μεταφέρει οξυγόνο στα κύτταρα με σκοπό την παραγωγής ενέργειας. Κατά τη διάρκεια, όμως, έντονης άσκησης οι απαιτήσεις για οξυγόνο είναι μεγάλες. Σε τέτοιες συνθήκες, ωστόσο, η αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει σε παραγωγή ROS (Ames, 1981; Thomas, 2000) και συγκεκριμένα σε $O_2^{\bullet-}$ (Cooper, 2002). Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τη μυοσφαιρίνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 (Brandley, 1993). Επίσης, οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορούν να αποτελέσουν πηγή ελεύθερων ριζών, όπως και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα.

Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων

Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, γνωστή και ως αναπνευστική αλυσίδα βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Τα ηλεκτρόνια μετακινούνται διαδοχικά από το ένα σύμπλοκο ενζύμων στο επόμενο καθοδηγούμενα από τις διαδοχικά χαμηλότερες ενέργειες τους. Τελικός σταθμός των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αλυσίδας είναι το O_2 το οποίο προέρχεται από την αναπνοή. Τα ηλεκτρόνια ανάγουν το οξυγόνο και παράγεται νερό με την βοήθεια του συμπλόκου της οξειδάσης του κυτοχρώματος. Κατά την έντονη αερόβια άσκηση, όμως, η συνολική πρόσληψη οξυγόνου είναι αυξημένη κατά 20 φορές και τα επίπεδα οξυγόνου σε μια μυϊκή ίνα είναι αυξημένα κατά 100 φορές (Ji, 1999). Έτσι, άμεσα αυξάνεται

η παραγωγή ριζών οξυγόνου που ξεφεύγουν από την οξειδωτική φωσφορυλίωση και κατά συνέπεια προκαλείται οξειδωτικό στρες (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001).

Το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

Κατά την αναερόβια άσκηση παρατηρείται το φαινόμενο της ισχαιμίας- επαναιμάτωσης. Λόγω της άμεσης ενέργειας που χρειάζεται ο οργανισμός το ATP διασπάται σε ADP και αυτό μετά σε AMP. Τότε, η αφυδρογονάση της ξανθίνης οξειδώνει το AMP σε υποξανθίνη. Μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης, η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Τα επίπεδα της οξειδάσης της ξανθίνης και υποξανθίνης τόσο στο πλάσμα όσο και σε ιστούς αυξάνονται μετά από αναερόβια άσκηση (Radak, 1996; Vina, 2000). Η δράση του ενζύμου αυτού οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και πιο συγκεκριμένα σε $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 (McCord & Fridovich, 1968). Κάτω από αερόβιες συνθήκες το ATP αναπληρώνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ γίνεται μέσω της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης και όχι μέσω της οξειδωμένης της μορφής (XO) (Ji, 1999).

1.3 ΕΞΩΤΕΡΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Οι βασικότεροι εξωγενείς παράγοντες παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι:

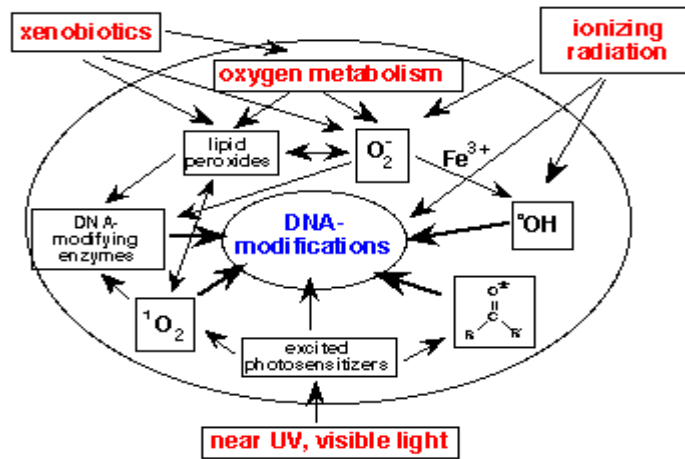
- ❖ Ακτινοβολία (ακτίνες X, υπεριώδης ακτινοβολία)
- ❖ Έκθεση στο όζον
- ❖ Ρυπασμένη ατμόσφαιρα
- ❖ Φλεγμονή
- ❖ Κάπνισμα
- ❖ Υπεροξία
- ❖ Ιόντα βαρέων μετάλλων

1.4 ΒΛΑΒΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Όπως είπαμε οι ελεύθερες ρίζες είναι αρκετά δραστικά μόρια με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν με βασικά δομικά και λειτουργικά στοιχεία του οργανισμού. Προκαλούν μεταλλάξεις στο DNA αλληλεπιδρώντας με τις βάσεις, αλλοιώνουν τις κυτταρικές μεμβράνες, έχουν σχέση σε ένα βαθμό με παθήσεις όπως ο διαβήτης, αρτηριοσκλήρυνση ακόμα και νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Alzheimer, Parkinson) και γήρανση (Halliwell & Gutteridge 1998; Halliwell, 2001).

1.4.1 Βλάβες στο DNA

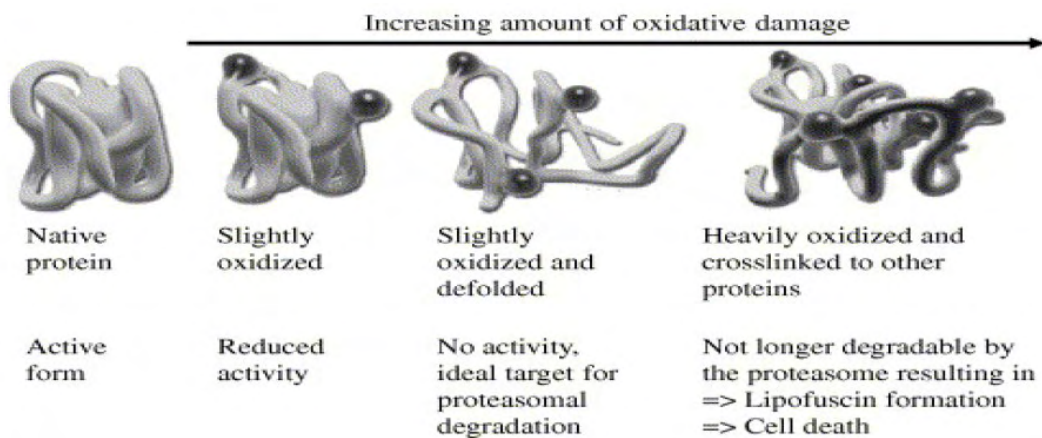
Το μόριο του DNA όπως γνωρίζουμε είναι εξαιρετικά σταθερό και δύσκολα αλλοιώσιμο, ωστόσο οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την φυσιολογική του λειτουργία με καταστροφικά αποτελέσματα. Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν σπασίματα στις αλυσίδες του DNA, αλλαγές στις βάσεις, βλάβες στη δομή του DNA μιας και επιδρούν στη δεοξυριβόζη, στις βάσεις πυριμιδίνη και πουρίνη. (Halliwell, Biochemistry of oxidative stress, 2007), και προκαλούν βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA ενεργοποιώντας τη λειτουργία της πολυμεράσης της ριβόζης. Το ένζυμο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην επισκευή, στη μετάφραση, στην αντιγραφή και στον ανασυνδυασμό του DNA. Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί πάνω από 100 οξειδωτικές τροποποιήσεις έχουν αναγνωριστεί στο DNA έως τώρα (Klaunig & Kamendulis, 2004; Dizdarglu, 2002; Cox, 2001). Όλα αυτά έχουν σαν τελικό αποτέλεσμα την δημιουργία μεταλλάξεων και κατά συνέπεια εμφάνιση καρκινογένεσης. Το διατομικό Οξυγόνο (O_2) δεν έχει την ικανότητα να οξειδώσει άμεσα το DNA στη θερμοκρασία του σώματος των ζωντανών οργανισμών. Ορισμένα όμως οξυγονούχα προϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού, όπως το υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\bullet-}$) και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), μπορούν να αντιδράσουν άμεσα με το DNA όταν οι συγκεντρώσεις τους ξεπεράσουν τα φυσιολογικά επίπεδα (Halliwell B, 1991). Οι περισσότερες όμως οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες (όπως η ρίζα υδροξυλίου, HO^{\bullet}), αζωτούχες ελεύθερες ρίζες και άλλες δραστικές ενώσεις μπορούν να αντιδράσουν και να προκαλέσουν συγκεκριμένες βλάβες στη δομή του DNA, μεταλλάξεις και πρόσθετα-DNA. Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί από πειραματικά αποτελέσματα πάνω από 100 είδη οξειδωτικών μετατροπών στο DNA (Cadet J, 1997).



Εικόνα 2: Βλάβες ROS στο DNA

1.4.2 Βλάβες στις πρωτεΐνες

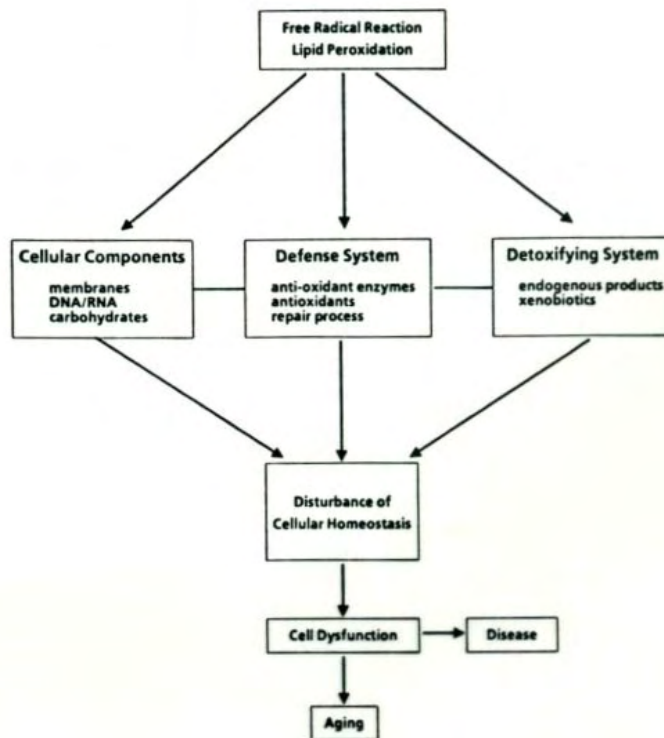
Η οξείδωση των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες προκαλεί αλλοιώσεις και τροποποιήσεις στην δομή τους με αποτέλεσμα την αναστολή της φυσιολογικής τους λειτουργίας. Τα αμινοξέα αποτελούν τις δομικές μονάδες των πρωτεϊνών, όμως όταν ελεύθερες ρίζες [κυρίως υδροξυλικές ρίζες (OH^\bullet)] αντιδρούν με τα αμινοξέα παράγονται οξειδωμένα αμινοξέα και πρωτεϊνικά καρβονύλια τα οποία χρησιμοποιούνται και ως δείκτες οξειδωτικού στρες καθώς και ποσοτικοποίησης της πρωτεϊνικής καταστροφής. Τα αμινοξέα που είναι ευαίσθητα στην οξείδωση είναι η λυσίνη, η αργινίνη, η προλίνη, η θρεονίνη. Επίσης, η αλβουμίνη, ανευρίσκεται στο πλάσμα, και αποτελεί δείκτη οξειδωτικού στρες μιας και δέχεται πολλές διαφορετικές τροποποιήσεις λόγω της οξείδωσης.



Εικόνα 3: Βλάβες ROS στις πρωτεΐνες

1.4.3 Βλάβες στα λιπίδια:

Τα λιπίδια και πιο συγκεκριμένα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν τα δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με τα λιπαρά οξέα των μεμβρανικών λιπιδίων όπου αυτές οι αντιδράσεις μπορεί να καταλήξουν σε λιπιδική υπεροξείδωση. Λιπιδική υπεροξείδωση σημαίνει παραγωγή νέων ριζών με αποτέλεσμα, η κυτταρική μεμβράνη να χάνει την σταθερότητα της, ενώ η αύξηση της ρευστότητάς της αποσταθεροποιεί υποδοχείς και επιπλέον προκαλεί ανοσολογική απάντηση με απόρροια τη μετατροπή των λιπιδίων σε φωσφολιπίδια και σταδιακά μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneny, 2001).



Εικόνα 4: Λιπιδική υπεροξείδωση και γήρανση

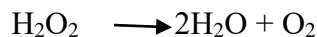
1.5 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Η συνεχής έκθεση στις βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών έχει οδηγήσει τους οργανισμούς στην ανάπτυξη μιας σειράς προστατευτικών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν σε προληπτικούς μηχανισμούς, σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης, σε φυσικά μέτρα προστασίας και σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Χωρίζονται σε ενζυμικούς και μη-ενζυμικούς μηχανισμούς.

1.5.1 ΕΝΖΥΜΙΚΟΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Καταλάση (CAT)

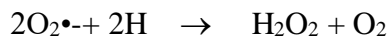
Βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδοσώματα, αλλά και στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Το μεγαλύτερο μέρος εντοπίζεται στα ερυθροκύτταρα, τους νεφρούς και το ήπαρ και λιγότερο στην καρδιά και στον μυϊκό ιστό και στον εγκέφαλο. Η καταλάση καταλύει την διάσπαση του H_2O_2 σε H_2O και O_2 .



Ένα μόριο CAT μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Είναι ένα τετραμερές ένζυμο το οποίο αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge, 1998). Σημαντικό ένζυμο για τον οργανισμό καθώς προστατεύει από τις ROS. Η καταλάση χρησιμοποιεί επίσης το υπεροξειδίου του υδρογόνου για να σπάει τις επιβλαβείς τοξίνες στον οργανισμό και είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά ένζυμα που βρίσκονται στα κύτταρα.

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

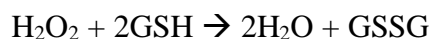
Το ένζυμο αυτό αποτελεί το βιολογικό καταλύτη για την αντίδραση μετατροπής του σουπεροξειδίου σε υπεροξειδίου του υδρογόνου, εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες του $O_2^{\bullet-}$.



Το $O_2^{\bullet-}$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD. Στη φύση απαντώνται τρία είδη SOD. Καθένα ξεχωριστά απαιτεί ένα τουλάχιστον οξειδοαναγωγικό μέταλλο που θα αποτελέσει το ενεργό του κέντρο ώστε να διεκπεραιώνεται επιτυχώς η καταλυτική τους δράση. SODs χαλκού – ψευδαργύρου που βρίσκεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα και πιο συγκεκριμένα στο κυτόπλασμα της πλειοψηφίας των κυττάρων των θηλαστικών. Επιπλέον, υπάρχουν και οι SODs που ανευρίσκονται εξωκυτταρικά γνωστές ως EC – SOD, που η δράση τους αφορά τη μείωση της συγκέντρωσης $O_2^{\bullet-}$ στο πλάσμα του αίματος. SODs μαγγανίου που απαντώνται στα προκαρυωτικά κύτταρα και στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων. SODs του σιδήρου που υπάρχει μόνο στα προκαρυωτικά κύτταρα (Παπαγεωργίου, 2005). Από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Βρίσκεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα και σε μικρότερο βαθμό στον πυρήνα, ενώ απουσιάζει από τα μιτοχόνδρια. Βρίσκεται στα περισσότερα όργανα, σε επιθήλια και σε όλους τους τύπους των φαγοκυττάρων.

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα και τον εξωκυττάριο χώρο και περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο το ιχνοστοιχείο σελήνιο. Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης ανάγουν οργανικά και ανόργανα υπεροξεία προς τις αντίστοιχες αλκοόλες. Η κυριότερη αντίδρασή της αφορά τη μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O με ταυτόχρονη οξείδωση δύο μορίων γλουταθειόνης (GSH).



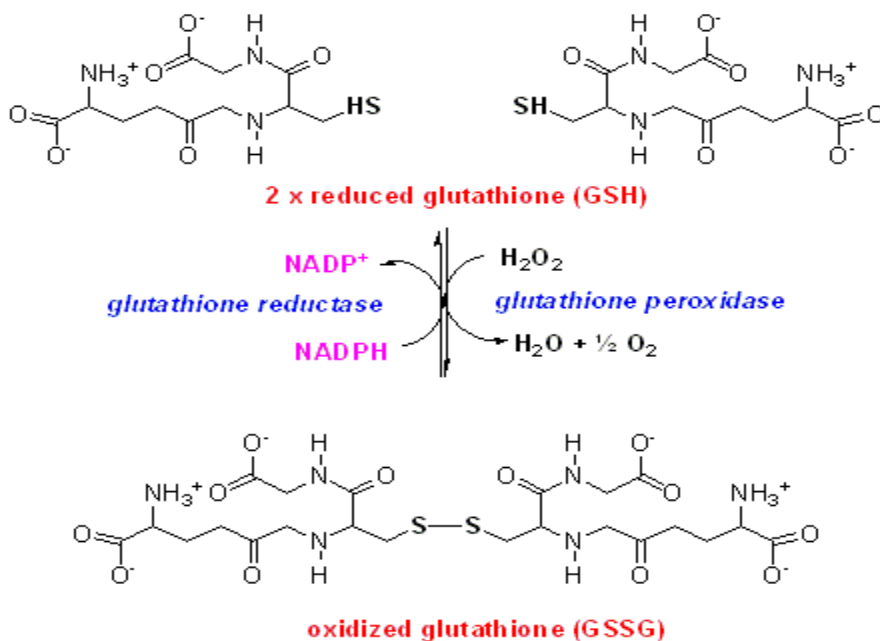
Αναγωγία της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR χρησιμοποιεί σα συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι σχηματίζονται δυο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH.

1.5.2 ΜΗ ENZYMΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο αποτελούμενο από τα αμινοξέα L-γ-γλουτάμυλο-L-κυστεινυλο-γλυκίνη. Θεωρείται η σπουδαιότερη θειόλη και αποτελεί τον σημαντικότερο ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Έχει βρεθεί σε φυτικά και ζωικά κύτταρα, αερόβια βακτήρια και πιο σπάνια σε αναερόβια βακτήρια. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση γλουταθειόνης στα κύτταρα εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και 10% στα μιτοχόνδρια, τα οποία δεν διαθέτουν τα κατάλληλα ένζυμα για την σύνθεση της και έτσι την προσλαμβάνουν από το κυτταρόπλασμα, καθώς και ένα μικρό ποσοστό στον πυρήνα. Η γλουταθειόνη εντοπίζεται στο κύτταρο είτε σε ανηγμένη μορφή (GSH) είτε σε οξειδωμένη (GSSG), δεσμεύει άμεσα την ρίζα υδροξυλίου και το μονήρες οξυγόνο και εξουδετερώνει το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα υπεροξειδία των λιπιδίων με την καταλυτική δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Σε φυσιολογικά κύτταρα που δεν έχουν υποστεί οξειδωτικό στρες η συγκέντρωση της ανοιγμένης γλουταθειόνης είναι περίπου 90%. Ο λόγος GSH/ GSSG αποτελεί δείκτη οξειδωτικού στρες.



Εικόνα 5: Οι δύο καταστάσεις της γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη επιτελεί πολλές λειτουργίες στους ζωντανούς οργανισμούς:

1. Συμμετέχει στη μεταφορά αμινοξέων μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.
2. Επαναφέρει στην ενεργό μορφή το ασκορβικό οξύ και τη βιταμίνη Ε άμεσα ή έμμεσα μέσα από τον λόγο GSH/GSSG.
3. Λειτουργεί και ως συνένζυμο πολυάριθμων ενζύμων που συμμετέχουν στην προστασία του κυττάρου (όπως υπεροξειδάσες, τρανσφεράσες γλουταθειόνης, τρανσφεράσες θειόλης, αφυδρογονάση φορμαλδεΐδης, γλυοξυλάση).
4. Εμποδίζει την οξειδωση των SH- ομάδων στις πρωτεΐνες.
5. Αποτελεί αποθήκη και μεταφορέα του NO και σχετίζεται με την μεταφορά χαλκού στο εσωτερικό του κυττάρου καθώς το δεσμεύει και εμποδίζει ταυτόχρονα την αντίδραση του με τις ελεύθερες ρίζες.
6. Χρησιμεύει ως ραδιοπροστατευτικός παράγοντας.
7. Εμπλέκεται στη νευροπροστατευτική δράση ενάντια σε πληθώρα εξωγενών και ενδογενών νευροτοξινών, ενώ αλλαγές τον μεταβολισμό της έχουν συσχετιστεί με νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Πάρκινσον, και η νόσος Αλτσχάιμερ.

Βιταμίνη C

Κατατάσσεται στους μονοσακχαρίτες και δεν συντίθεται στον ανθρώπινο οργανισμό. Το ασκορβικό οξύ είναι αναγωγικό αντιδραστήριο (δότης ηλεκτρονίων), πράγμα που σημαίνει ότι μπορεί να προμηθεύσει ηλεκτρόνια τόσο σε ένζυμο όσο και σε οξειδωτικές ενώσεις. Έτσι, μπορεί να ανάγει το σουπεροξειδίο, τις υδροξυλικές ρίζες, το υποχλωριώδες οξύ καθώς και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου μέσα και έξω από τα κύτταρα. Το ασκορβικό οξύ είναι εξειδικευμένο, διότι μπορεί να μεταφέρει ένα μόνο ηλεκτρόνιο, λόγω της σταθερότητας του ιόντος του που ονομάζεται σεμιδεΐδρασκορβικό, το οποίο είναι σχετικά αδρανές και δεν προκαλεί κυτταρικές βλάβες.

Βιταμίνη E

Είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Θεωρείται ως η πιο αποτελεσματική λιποδιαλυτή αντιοξειδωτική βιταμίνη. Αποτελείται από 8

δομικά ισομερή τοκοφερολών (α, β, γ, δ) και τοκοτριενολών (α, β, γ, δ) και η πιο δραστική είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυττοπλασματική αλλά και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια από την υπεροξειδωση, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, προστατεύει από την οξειδωση την βιταμίνη Α (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Καροτενοειδή

Είναι φυσικές χρωστικές που βρίσκονται στα φυτά και σε ορισμένους μικροοργανισμούς, δίνοντας στα φρούτα και τα λαχανικά τα χαρακτηριστικά κόκκινα, πορτοκαλί και κίτρινα χρώματα. Πιστεύεται ότι και αυτή μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και το σελήνιο (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ βρίσκεται τόσο στα κύτταρα όσο και σε όλα τα υγρά του σώματος σε μικρές συγκεντρώσεις. Είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Το ουρικό οξύ λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό μέσο, παρέχοντας ηλεκτρόνια και έτσι δρα προστατευτικά ενάντια στις οξειδωτικές βλάβες. (Παπαγεωργίου 2005)

Ουβικινόνη ή συνένζυμο Q

Πρόκειται για ένα λιποδιαλυτό παράγωγο της κινόνης που συντίθεται στα κύτταρα και εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες. βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης κατά την παραγωγή ATP και επιπροσθέτως λειτουργεί και ως αντιοξειδωτικό μέσο. Η ουβικινόνη μπορεί να αναστείλλει τη πρόοδο της υπεροξειδωσης των λιπιδίων καθώς και να αναγεννήσει τη βιταμίνη E από την οξειδωμένη της μορφή.

Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπάρογοντας της υπεροξειδάσης της

γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge, 1998).

1.6 Εντομοκτόνα

1.6.1 Cypermethrin:

Το cypermethrin είναι ένα συνθετικό πυρεθροειδές που χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο σε μεγάλης κλίμακας γεωργικές εφαρμογές καθώς και για οικιακές χρήσεις. Δρα ως ταχείας δράσης νευροτοξίνη στα έντομα μιας και διαπερνά τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό, προκαλώντας υπερδιέγερση του κεντρικού νευρικού συστήματος, τροποποίηση της δραστηριότητας υποδοχέων και αλλαγή στα επίπεδα νευροδιαβιβαστών. Επίσης, προκαλεί καταστροφή του DNA μέσω οξειδωτικού stress στους νευρώνες. Αποικοδομείται εύκολα στο χώμα και στα φυτά μιας και η έκθεση του στον ήλιο, στο νερό ή στο οξυγόνο επιταχύνει την αποσύνθεση του.

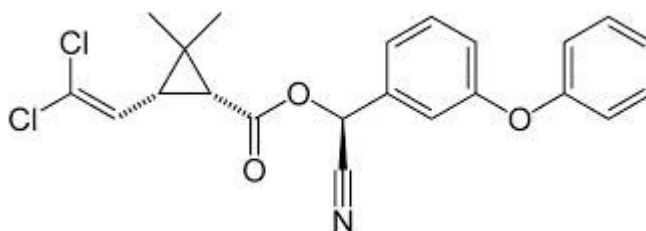
Η υπερβολική έκθεση στον άνθρωπο προκαλεί ναυτία, πονοκέφαλο, μυική αδυναμία, δύσπνοια και σπασμούς. Επίσης, το cypermethrin (όπως γενικότερα τα συνθετικά πυρεθροειδή) επηρεάζει το ενδοκρινικό σύστημα προκαλώντας ορμονικές διαταραχές (Kim , 2005 , Han. 2008). Παρ' όλα αυτά, το cypermethrin στους ανθρώπους απενεργοποιείται μέσω ενζυματικής υδρόλυσης σε διάφορους μεταβολίτες καρβοξυλικών οξέων, οι οποίοι απομακρύνονται μέσω των ούρων (Baselt R. , 2008).

Από μελέτες που έγιναν σε αρσενικούς αρουραίους, το cypermethrin μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα στο αναπαραγωγικό σύστημα, όπου (μετά απο συνεχή δόση για 15 μέρες) τα επίπεδα των υποδοχέων των ανδρογόνων καθώς και της τεστοστερόνης του πλάσματος ήταν εμφανώς μειωμένα. Έτσι, αποδείχθηκε πως το cypermethrin επηρεάζει τα σπερματικά σωληνάρια και την σπερματογένεση σε μεγάλες δόσεις σε αρσενικούς αρουραίους (Hu JX. , Li YF. , Jing Li , Zhen He , 2011) και ότι αυξάνεται η αναλογία του παραμορφωμένου σπέρματος. Ακόμη, εάν το cypermethrin χορηγηθεί σε αρουραίους κατά την εγκυμοσύνη, δίνουν απογόνους με καθυστερημένη ανάπτυξη.

Επίσης, σύμφωνα με μελέτες, η μακράς-διάρκειας έκθεση cypermethrin σε αρουραίους κατα την ενηλικίωση, προκαλεί ντοπαμινεργικό νευροεκφυλισμό και ο εκφυλισμός αυτός

αυξάνεται εάν γίνει χορήγηση cypermethrin σε μεταγεννητικό στάδιο. (Singh AK. , Tiwari MN. , Upadhyay G. , 2012).

Τέλος, το cypermethrin προκαλεί γενετικές βλάβες όπως: χρωμοσωμικές ανωμαλίες στον μυελό των οστών και στα κύτταρα του σπλήνα (Amer S.M., 1993), αύξηση της συχνότητας εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα και αναστέλλει την διακυτταρική επικοινωνία μέσω χασμοσυνδέσμων (που παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη) και συνήθως προκαλείται από καρκινικούς παράγοντες (Tateno C. , Ito S. , Tanaka M. , Yoshitake A. , 1993)



Εικόνα 6: Εντομοκτόνο Cypermethrin

1.6.2 Piperonyl Butoxide:

Το piperonyl butoxide (PBO) είναι μια οργανική χημική ένωση η οποία χρησιμοποιείται ως συστατικό σε σκευάσματα φυτοφαρμάκων. Είναι συνεργιστικό, δηλαδή δεν έχει κάποια παρασιτοκτόνο δραστηριότητα από μόνο του, αλλά ενισχύει την δράση και το δυναμικό άλλων φυτοφαρμάκων όπως καρβαμιδικών, πυρεθρινών, πυρεθροειδών (cypermethrin) κ.α. Είναι ένα ημισυνθετικό παράγωγο της σαφρόλης (Robert L. , 2002).

Όσον αφορά τις χρήσεις του, το PBO κυρίως χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με φυσικές πυρεθρίνες ή συνθετικά πυρεθροειδή, σε αναλογίες (PBO : pyrethrins) 3:1 έως 20:1. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές πριν και μετά την συγκομιδή, σε διάφορων ποικιλιών σοδειές και εμπορεύματα (π.χ. σιτηρά, φρούτα και λαχανικά) σε μικρές δόσεις που δεν ξεπερνούν τις 0,5 λίβρες PBO/στρέμμα.

Επίσης, συχνά χρησιμοποιείται ως:

- Συστατικό εντομοκτόνων για οικιακές χρήσεις

- Σε εγκαταστάσεις χειρισμού τροφίμων
- Σε εφαρμογές στον άνθρωπο και σε ζώα για καταπολέμηση εξωπαρασίτων

Σε κάθε περίπτωση πάντως, λόγω της μειωμένης (εάν υπάρχει) εντομοκτόνης ιδιότητας του PBO, δεν χρησιμοποιείται ποτέ μόνο του (G.J. Devine , Denholm I. , 1998).

Μηχανισμός δράσης

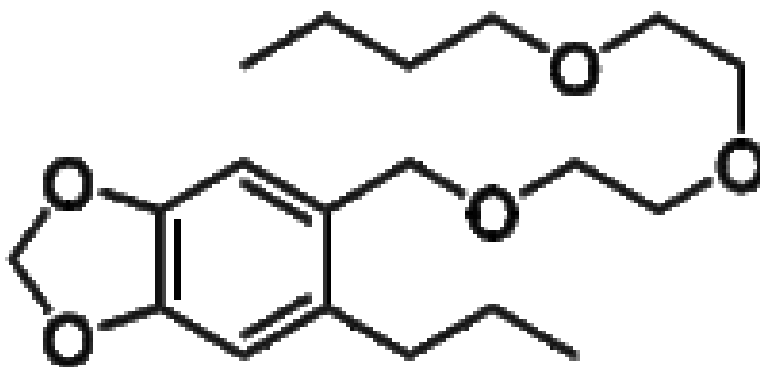
Το PBO συμπεριφέρεται ως συνεργιστικός παράγοντας εντομοκτόνων, μέσω καταστολής των φυσικών μηχανισμών άμυνας του εντόμου. Ο πιο σημαντικός μηχανισμός που καταστέλλει το PBO είναι το σύστημα οξειδασών μικτών λειτουργιών (MFOs), που αλλιώς ονομάζεται σύστημα του P-450 κυτοχρώματος. Το σύστημα αυτό, είναι η κύρια οδός αποτοξίνωσης και μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών. Έτσι, το σύστημα MFO προκαλεί την οξειδωτική διάσπαση εντομοκτόνων όπως πυρεθρινών ή συνθετικών πυρεθροειδών (Casida J.E. , 1970), ειδικά σε έντομα που έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα. Ως αποτέλεσμα, η προσθήκη του PBO, αυξάνει και διατηρεί τα επίπεδα του εντομοκτόνου στο έντομο (μέσω καταστολής των μηχανισμών που προαναφέρθηκαν), ώστε το εντομοκτόνο να ασκήσει την επίδρασή του (Moogres G.D., Philippou D., Borzatta V., 2009). Το PBO δεν φαίνεται να επηρεάζει το MFO σύστημα του ανθρώπου (Conney A.H. , Chang R. , Levin W. M. , Garbut A. , 1972).

Αξιολόγηση επικινδυνότητας

Εδώ και 40 χρόνια, έχουν γίνει πολλές τοξικολογικές μελέτες πάνω στο PBO, εξετάζοντας το εύρος των πιθανών τοξικών επιδράσεων. Αυτές οι μελέτες, που διεξήχθησαν με σκοπό την καταχώριση PBO στα φυτοφάρμακα, αφορούσαν τα παρακάτω θέματα:

- Οξεία τοξικότητα, όπου έγιναν μελέτες για τον προσδιορισμό συμπτωμάτων σε οξεία έκθεση (μια ή πολλές μεγάλες δόσεις σε μικρό διάστημα) στο PBO. Οι μελέτες έδειξαν ότι το PBO έχει μικρή οξεία τοξική δράση μέσω της στοματικής οδού καθώς και μέσω της εισπνοής. Είναι ελαφρώς ερεθιστικό στα μάτια και στο δέρμα.

- Δερματική απορρόφηση, δηλαδή το ποσοστό του φαρμάκου που απορροφάται από το δέρμα. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, συμβαίνει 2-3% απορρόφηση από το δέρμα (πήχης) και 8% απορρόφηση από το δέρμα του κεφαλιού (Wester RC. , Bucks DA , Mailbach HI. , 1994).
- Διαταραχές του ενδοκρινικού συστήματος, μελετώντας τις επιδράσεις του φαρμάκου στο ορμονικό σύστημα των οιστρογόνων, των ανδρογόνων και του θυρεοειδή, σε ανθρώπους και άγρια ζώα. Από τις μελέτες που έγιναν, δεν εντοπίστηκε κάποια επίδραση στην κανονική λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος μετά από χορήγηση του PBO.
- Αναπαραγωγή και γονιμότητα, με σκοπό την εξέταση του PBO στο κατά πόσο μπορεί να μεταβάλλει την αναπαραγωγική επίδοση και λειτουργία σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους. Δεν παρατηρήθηκαν δυσμενείς επιδράσεις ούτε στους γονείς αλλά ούτε και στα έμβρυα που έγιναν οι μελέτες.
- Γονοτοξικότητα, εξετάζοντας την δυνατότητα ενός χημικού μορίου να προκαλέσει μεταλλάξεις, χρωμοσωμικές αλλαγές, καθώς και διαταραχές στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Από τις μελέτες αυτές βρέθηκε ότι το PBO δεν είναι γονοτοξικό.



Εικόνα 7: Piperonyl Butoxide

1.7 Κουνέλια ως πειραματόζωα

Τα κουνέλια, είναι μικρά θηλαστικά της οικογένειας των λαγοειδών (Leporidae), που ζουν σε πολλά σημεία στον κόσμο. Χρησιμοποιούνται συχνά σε πολλές ποικιλίες πειραμάτων, μιας και καλύπτουν πολλούς παράγοντες για να επιλεγθούν ως πειραματόζωα, όπως το κόστος, η τεχνική βιωσιμότητα σε διάφορες διαδικασίες, επιστημονικές αρχές, διαθέσιμη βάση δεδομένων κ.α. Τα κουνέλια που πρόκειται να μελετηθούν, περνάνε πρώτα κάποιες συγκεκριμένες εξετάσεις για τυχόν ασθένειες ή άλλα προβλήματα που θα αλλοιώσουν το πείραμα.

Πλεονεκτήματα από την χρήση κουνελιών ως πειραματικά μοντέλα:

- Έυκολα στον χειρισμό και στην παρατήρηση
- Εύκολη μελέτη σε ένα μεγάλο αριθμό ατόμων
- Οι ζωτικής σημασίας κύκλοι είναι σύντομοι (κύηση, εφηβεία κ.λ.π.)
- Δυνατότητα προσαρμογής στο περιβάλλον
- Ευκολία γενετικής προτυποποίησης

Μειονεκτήματα από την χρήση κουνελιών ως πειραματικά μοντέλα:

- Μεταφορά τους σε ένα εντελώς τεχνητό περιβάλλον σε σχέση με το φυσικό τους
- Έχουν συγκεκριμένη διαίτα
- Ζώα ευαίσθητα σε ασθένειες

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός του πειράματος ήταν να προσδιοριστεί η πιθανή πρόκληση οξειδωτικού στρες των εντομοκτόνων Cypermethrin και Piperonyl Butoxide που παρατηρείται στα κουνέλια έπειτα από την χορήγησή τους, καθώς και η συνεργιστική δραστηριότητα που παρουσιάζουν τα δύο αυτά εντομοκτόνα.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πρωτόκολλο ζώων και χορήγησης:

Σε αυτή την μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν 21 κουνέλια της Νέας Ζηλανδίας βάρους 3,2 έως 3,9 κιλών. Στεγάστηκαν σε ατομικά μεταλλικά κλουβιά, στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις εκτροφής ζώων της σχολής Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, στο Ηράκλειο. Τα κουνέλια, πριν την έναρξη του πειράματος, είχαν αρχικά εγκλιματιστεί στο πλαίσιο ενός κύκλου 12-h σκοτάδι/φως και σε μια σταθερή θερμοκρασία που κυμαινόταν μεταξύ 20 έως 23 °C για περίπου ένα μήνα. Οι συνθήκες αυτές συνεχίστηκαν μέχρι το τέλος του πειράματος. Οι ομάδες διαχωρίστηκαν με την ακόλουθη σειρά:

- Κουνέλια στα οποία χορηγήθηκε το φυτοφάρμακο Cypermethrin (CYP LD) σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης (50mg την ημέρα).
- Κουνέλια στα οποία χορηγήθηκε το φυτοφάρμακο Cypermethrin (CYP HD) σε υψηλά επίπεδα έκθεσης (100mg την μέρα).
- Κουνέλια στα οποία χορηγήθηκε το φυτοφάρμακο Piperonyl Butoxide (PBO LD) σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης (45mg την μέρα).
- Κουνέλια στα οποία χορηγήθηκε το φυτοφάρμακο Piperonyl Butoxide (PBO HD) σε υψηλά επίπεδα έκθεσης (90mg την μέρα).
- Συν-χορήγηση των φυτοφαρμάκων Cypermethrin και Piperonyl Butoxide σε χαμηλές δόσεις (CYP + PBO LD).
- Συν-χορήγηση των φυτοφαρμάκων Cypermethrin και Piperonyl Butoxide σε υψηλές δόσεις (CYP + PBO HD).
- Κουνέλια μάρτυρες (Control) όπου δεν έγινε χορήγηση φυτοφαρμάκων.

Οι χορηγούμενες δόσεις του Cypermethrin και Piperonyl Butoxide αντιστοιχούσαν στο 1/30 και 1/60 της σχετικής θανατηφόρας δόσης (LD50) για την υψηλή και χαμηλή δόση αντίστοιχα, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

LD50 Cypermethrin (3000mg/Kg)	LD50 PBO (2650mg/Kg)
Χαμηλή δόση 1/60: 50mg/kg	Χαμηλή δόση 1/60: 45mg/kg
Υψηλή δόση 1/30: 100mg/kg	Υψηλή δόση 1/30: 90mg/kg
Για ζώα ~3 κιλών	Για ζώα ~3 κιλών
Χαμηλή δόση 150mg/ 3 kg animal	Χαμηλή δόση 135mg/ 3 kg animal
Υψηλή δόση 300mg/ 3kg animal	Υψηλή δόση 270mg/ 3 kg animal

Όλες οι δόσεις χορηγήθηκαν από το στόμα σε συνδυασμό με αραβοσιτέλαιο, 3 φορές την εβδομάδα (Δευτέρα, Τετάρτη, Παρασκευή). Τα κουνέλια θανατώθηκαν από κτηνιάτρους, σε ηλικία 6 μηνών (βάρος 3,7 έως 4,9 κιλά), αφού αρχικά τους χορηγήθηκαν με ένεση τα αναισθητικά Xylapan/Narketan (2/1), και έπειτα με ένεση, το Dolethan, ένας παράγοντας ευθανασίας. Κατά την διάρκεια της μελέτης, όλα τα κουνέλια ήταν κάτω από τακτική παρατήρηση και η κατάστασή τους καταγραφόταν. Καμία κλινική περίπτωση δεν παρατηρήθηκε. Σε μηνιαία βάση, δείγματα ούρων και περιττωμάτων συλλέχθηκαν και κρατήθηκαν σε θερμοκρασία -20 °C, δείγματα αίματος αποθηκεύτηκαν σε ιδανικές θερμοκρασίες (ώστε να μην αλλοιωθεί η σύστασή τους), δείγματα τρίχας κρατήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και στο τέλος έγινε καταγραφή του βάρους τους. Μετά την ευθανασία των ζώων, ιστοί από διάφορα όργανα συλλέχθηκαν (όπως από πνεύμονες, καρδιά, νεφρά, όρχεις, ήπαρ, αδένες κ.α.) και ανάλογα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C, -80 °C και σε φορμαλδεΰδη. Επίσης, γυάλινα πλακίδια με δείγματα ιστών (χρησιμοποιούνται σε τεχνικές κυτταρολογίας) αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Όλες οι διαδικασίες δειγματοληψίας έγιναν με σκοπό να ολοκληρωθούν τα διάφορα τεστ και αναλύσεις που χρειάζεται το πείραμα (Βαρδάβας, 2014).

3.2 Χειρισμός αίματος

Το αίμα συλλέχθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) για την μέτρηση των TAC, TBARS, Crbnls, επίπεδα GSH και δραστικότητα καταλάσης. Τα δείγματα αίματος αμέσως φυγοκεντρήθηκαν στα 1370 g για 10 λεπτά, ώστε να συλλεχθεί το

πλάσμα και να χρησιμοποιηθούν για τις παραπάνω μετρήσεις. Τα ερυθροκύτταρα λύθηκαν σε απεσταγμένο νερό (1:1 v/v), φυγοκεντρήθηκαν στα 4020 g για 15 λεπτά στους 4 °C και τέλος το λύμα των ερυθροκυττάρων συλλέχτηκε για την μέτρηση της δραστικότητας της καταλάσης. Μια μερίδα του λύματος (500μl) επεξεργάστηκε με 5% τριχλωροξικό οξύ (TCA 1:1 v/v) και φυγοκεντρήθηκε στα 28000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και ξαναεπεξεργάστηκε με TCA (1,3:1 v/v) και ξαναφυγοκεντρήθηκε στα 28000 g για 5 λεπτά στους 4 °C και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε σωληνάκια και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της GSH. Το πλάσμα και τα ερυθροκύτταρα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C πριν από τις βιοχημικές αναλύσεις.

3.3 Μέθοδοι προσδιορισμού οξειδωτικού στρες

Οι δείκτες οξειδωτικού στρες μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά και η αρχή προσδιορισμού του καθενός αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω.

3.3.1 Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας δείκτης της οξείδωσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (Pro), της αργινίνης (Arg), της λυσίνης (Lys) και της θρεονίνης (Thr). Είναι ένα αξιόπιστος δείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε μέτριο βαθμό, διασπώνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν υποστούν πολύ δριμυείς βλάβες τότε δεν μπορούν να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους.

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών όχι μόνο επηρεάζει τη δική τους λειτουργία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που επιδιορθώνουν το DNA ή οι DNA πολυμεράσες, το

DNA δε θα επιδιορθώνεται ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη πιστότητα. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δινιτροφαινυλδραζονίου.

Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Σε 50 μl πλάσματος προσθέτουμε 50 μl 20% TCA σε Eppendorfs και αναδεύουμε σε Vortex (για κάθε δείγμα έχουμε και ένα τυφλό).
2. Επώαση στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
3. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
4. Προσθέτουμε 0.5 mL DNPH 14 mM (σε 2.5 N HCL) στο κάθε δείγμα και 0.5 mL 2.5 N HCL για κάθε τυφλό, χειροκίνητη ανάδευση χρησιμοποιώντας πιπέτα και έπειτα στο vortex, επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ανάδευση στο vortex ανά 15 λεπτά. Μετά την 1 ώρα επώασης φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
5. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
6. Προσθέτουμε 1 mL TCA 10%, αναδεύουμε στο vortex (ή χειροκίνητα αν χρειαστεί) και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
7. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
8. Προσθέτουμε 0.5 ml αιθανόλη και 0.5 ml οξικό αιθυλεστέρα (σε αναλογία 1:1 v/v), ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
9. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 7 και 8 δύο ακόμα φορές.
10. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
11. Προσθέτουμε 1 ml 5 M ουρία (ph 2.3), ανάδευση με vortex και επώαση στους 37 °C για 15 λεπτά.
12. Φυγοκέντρηση 15.000 g για 3 λεπτά στους 4 °C.
13. Μεταφέρουμε με πιπέτα 900 ml σε μια καθαρή κυψελίδα και μετράμε την απορόφηση στα 375 nm.

Υπολογισμοί

Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/ml) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1000/50$.

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Η κανονικοποίηση για την συγκέντρωση πρωτεϊνών μπορεί να γίνει με την παρακάτω φόρμουλα:

Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/ml) = συγκέντρωση καρβονυλίων nmol/ml / συγκέντρωση πρωτεϊνών mg/ml

Συγκέντρωση πρωτεϊνών = 70 mg/ml.

3.3.2 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Αρχή της μεθόδου

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του ιστού να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό του ιστού που έχει αντιοξειδωτική δράση συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης.

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο πρώτος και πιο επίπονος τρόπος είναι ο υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας κάθε συστατικού του ιστού ξεχωριστά. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως συνόλου.

Το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι το μόριο που έχει τον πιο ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της τιμής της TAC προκαλώντας μεγάλη αύξησή της όταν η συγκέντρωσή του αυξάνεται. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), οι βιταμίνες E και A και η αλβουμίνη είναι μερικά από τα μόρια που συμβάλλουν επίσης στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ιστού. Ο προσδιορισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszweska και Bartosz, (2002).

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

	Blank	Θετικός control	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μL	495 μL	480 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL	500 μL
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	—	5 μL	—
Πλάσμα	—	—	20 μL

Ανακινούμε τα Eppendorfs μερικές φορές και τα επωάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ορού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη.

Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρουμε 900 mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm. (ΠΡΟΣΟΧΗ: Μηδενίζουμε με αέρα.) Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ,

$$\% \text{ Abs μείωση} = (\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} \times 100$$

ii) μmol DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος = $[(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 50] / 1000$

α) Διαιρούμε με το 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μmol/L της κυψελίδας.

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η αραίωση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-πλάσια (1000 μ L στην κυψελίδα / 20 μ L πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 50).

δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

Παράδειγμα. Αν η % μείωση της απορρόφησης είναι 20, τα μ mol του DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος είναι: $20 / 100 \times 50 \times 50 / 1000 = 0.5$ μ mol DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος ή 0.5 mmol DPPH που απομακρύνθηκαν / L πλάσματος ή 0.5 mmol DPPH/L.

3.3.3 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (MDA)

Αρχή της μεθόδου

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μηλονική διαλδεΰδη (MDA). Η μηλονική διαλδεΰδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Έτσι, τα TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μηλονικής διαλδεΰδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία 1/2 αντίστοιχα.

Η μέτρηση της μηλονικής διαλδεΰδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρά τροποποιημέ η μέθοδος του Keles et al., (2001).

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μ L πλάσματος (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό).
2. Προσθέτουμε 500 μ L TCA 35% και 500 μ L Tris-HCl και αναδεύουμε.
3. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθέτουμε 1 mL Na₂SO₄ – TBA και επωάζουμε στους 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο.

5. Μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min.
6. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε.
7. Μεταφέρουμε 1 mL σε Eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25 °C για 3 min.
8. Μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm. ΠΡΟΣΟΧΗ: Μηδενίζουμε με αέρα.

Υπολογισμοί

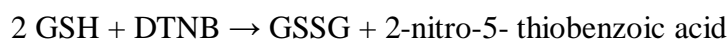
Η συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 × 31, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) (3100 / 100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L το μmol/L.

3.3.4 Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

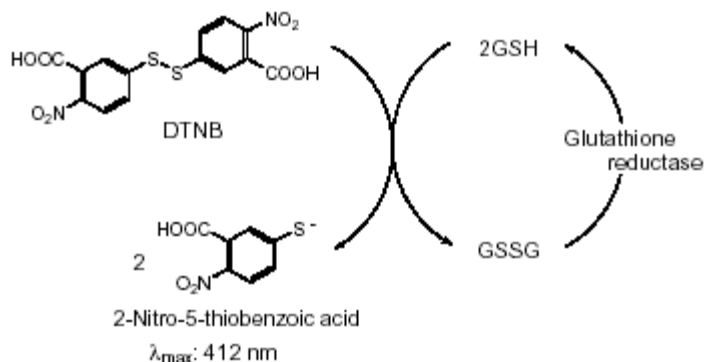
Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειοδυο-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετριέται σε αιμόλυμα. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm.

Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα:



Η GSH παράγεται από την GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.



Εικόνα 8: Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια Eppendorf:

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μL	660 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL	—
Αιμόλυμα	—	20 μL

Αναδεύουμε τα erpendorfs και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm (μηδενίζουμε το φωτόμετρο με αέρα).

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της GSH (mmol/L) = $(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta\text{Abs}_{\text{τυφλού}} / 13.6) \times 262.6$, όπου το 262.6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμόλυματος (20 μL) ($1010 / 20 = 50.5$), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2×1.3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500 μL αιμολ. / 500 μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραίωση

(390 μL / 300 μL ή 260 μL / 200 μL) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

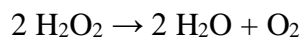
Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10×2 , τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων. Έτσι η συγκέντρωση της GSH εκφράζεται ανά g αιμοσφαιρίνης: GSH (mmol/ g Hb).

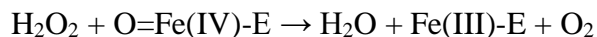
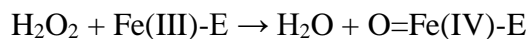
3.3.5 Προσδιορισμός καταλάσης

Αρχή της μεθόδου

Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεδεμένη στο ένζυμο).

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2991 μL

Αιμόλυμα αραιωμένο 1/10	4 μ L
-------------------------	-----------

1. Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση.
2. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV).
3. Προσθέτουμε 5 μ L 30% H₂O₂ στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = (Δ Abs_{sample} per min / 40) \times (750 \times 1000 \times 10 \times 2) / Conc. Hb (mg/mL).

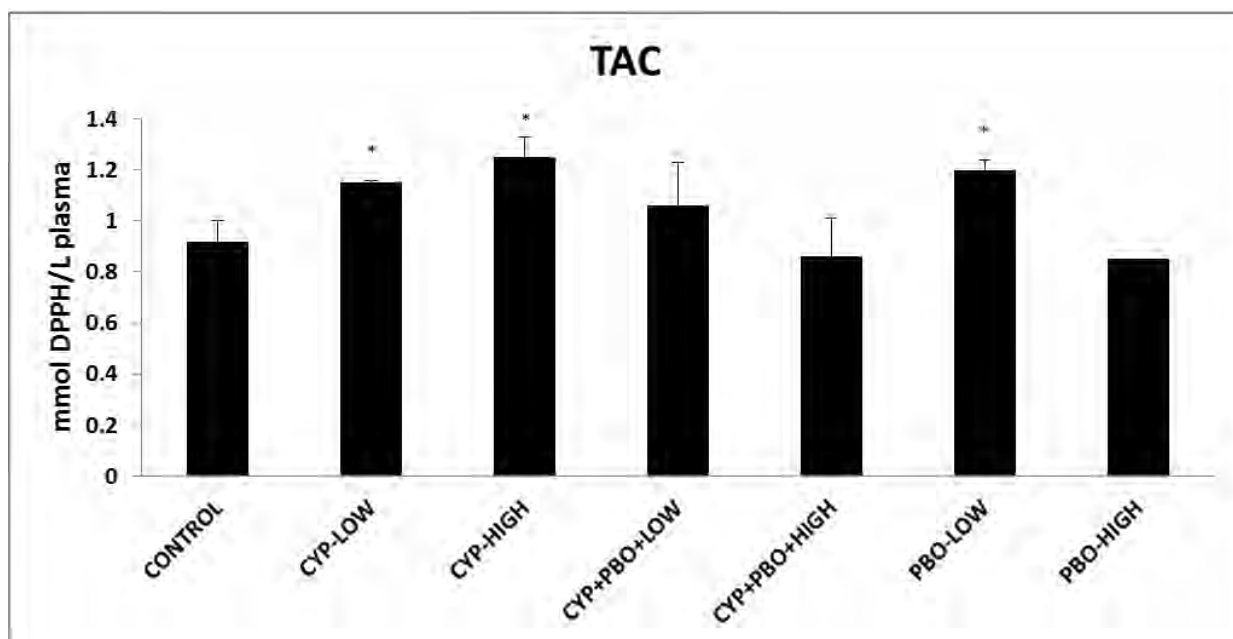
Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μ mol/mL. Το 750 είναι ο παράγοντας αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μ L) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μ L) (3000 / 4 = 750), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραιώση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

3.4 Στατιστική ανάλυση

Η χημική δραστηριότητα και οι μελετημένοι παράμετροι του οξειδωτικού στρες παρουσιάζονται ως mean \pm τυπική απόκλιση (SD). Χρησιμοποιήθηκε μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και έπειτα σύγκριση ζευγών χρησιμοποιώντας LSD post-hoc τεστ. Για την στατιστική ανάλυση και την γραφική αναπαράσταση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα IBM SPSS Statistics. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το P<0,05.

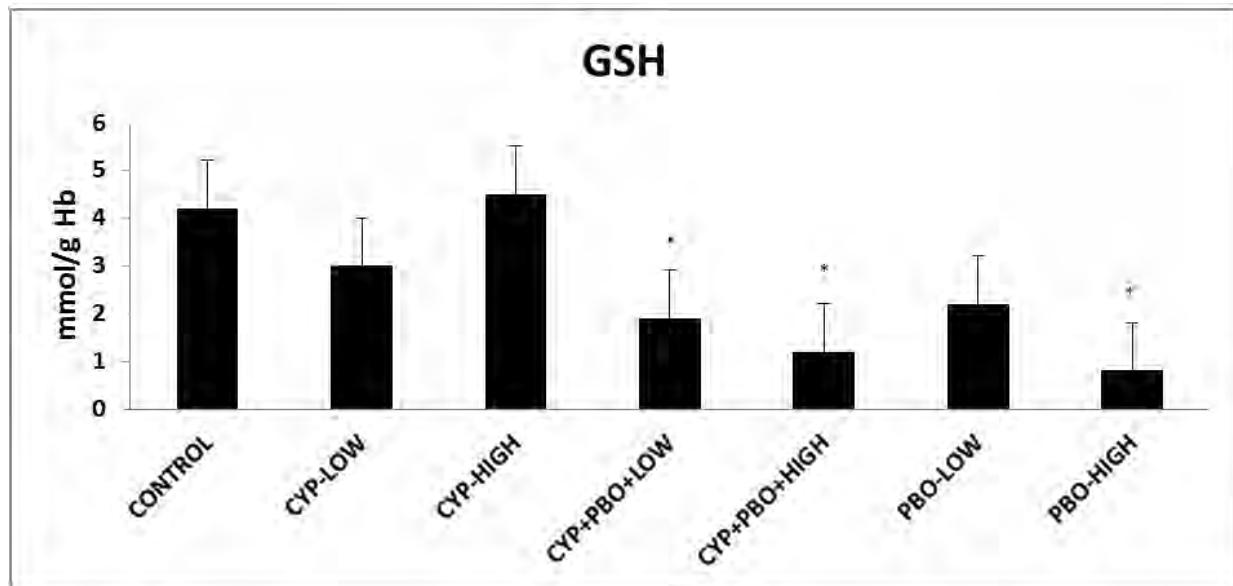
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες για όλες τις ομάδες που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.



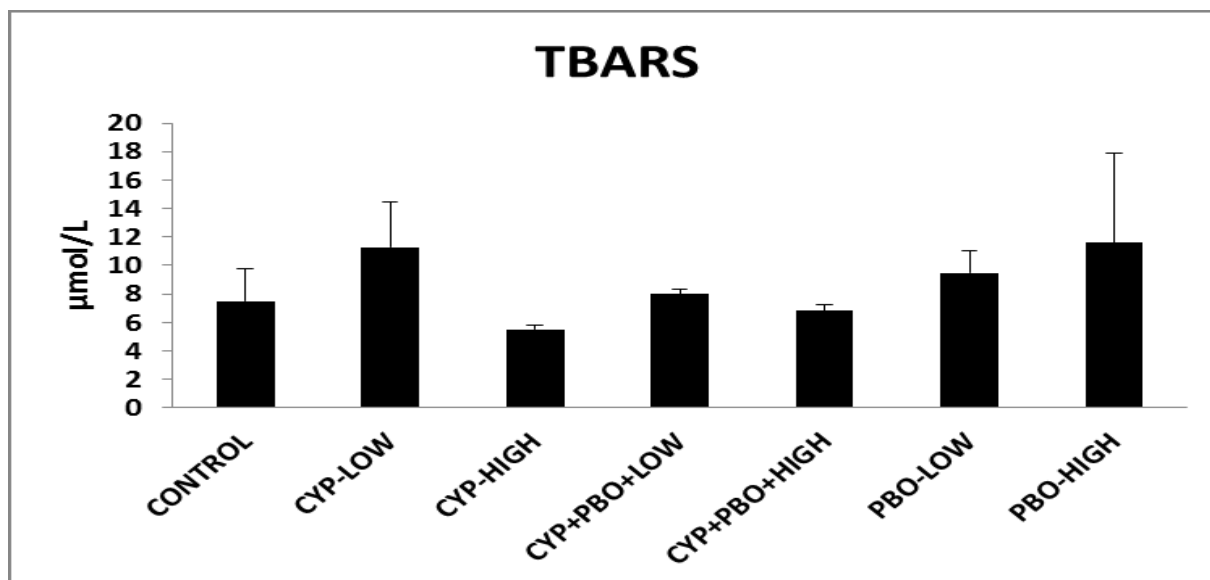
Διάγραμμα 1 : Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας.

Γενικά, στις CYP ομάδες χαμηλής και υψηλής δόσης, η TAC ήταν σημαντικά αυξημένη ($p = 0.01$ και $p = 0.002$ αντίστοιχα) ως και 20% συγκριτικά με τις control ομάδες (Διάγραμμα 1). Το ίδιο παρατηρούμε και στην χαμηλή δόση του PBO, όπου και εκεί η TAC ήταν αυξημένη ($p = 0.004$), αλλά αντίθετα, στην υψηλή δόση παρατηρήσαμε μια τάση ($p = 0.067$) για μείωση της TAC κατά 20% (Διάγραμμα 1). Η συγχορήγηση των δύο φαρμάκων σε χαμηλές δόσεις, δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα της TAC, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υπήρχε μια τάση μείωσης ($p = 0.079$) της TAC κατά 20%.



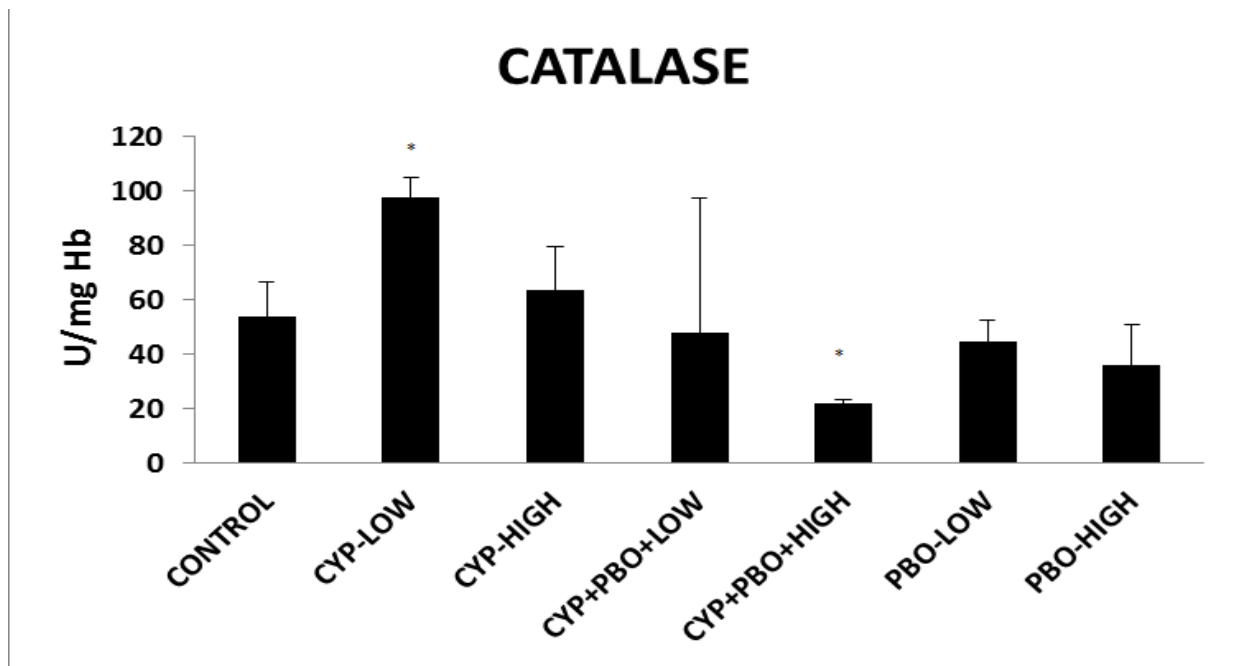
Διάγραμμα 2 : Μέτρηση ανηγμένης γλουταθειόνης

Στις ομάδες CYP, τα επίπεδα της GSH δεν επηρεάστηκαν σε καμία δοσολογία συγκριτικά με τις control ομάδες (Διάγραμμα 2). Ωστόσο, η χορήγηση του PBO σε υψηλές δόσεις μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της GSH ($p = 0.007$) κατά 73% συγκριτικά με τις control ομάδες (Διάγραμμα 2). Επιπλέον, η συνεργιστική δράση των δύο φαρμάκων σε υψηλές δόσεις μειώνει τα επίπεδα της GSH κατά 65% ($p = 0.013$) συγκριτικά με τις control ομάδες, ενώ σε χαμηλές δόσεις απλά παρατηρούμε μια τάση για μείωση κατά 43% ($p = 0.08$) στη GSH (Διάγραμμα 2).



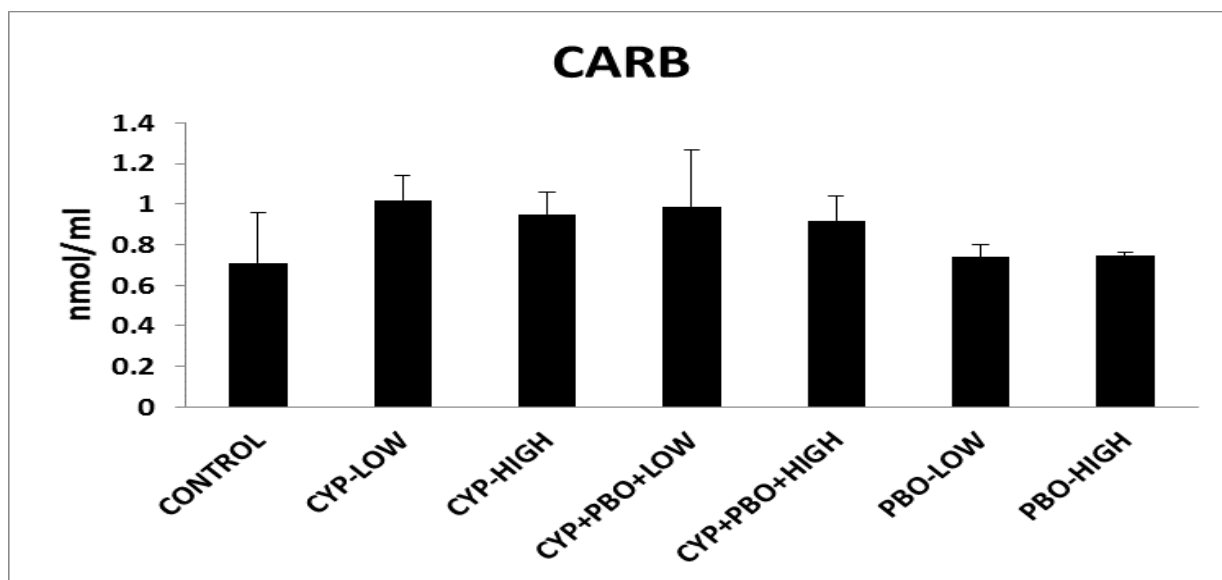
Διάγραμμα 3 : Μέτρηση συγκέντρωσης TBARS

Οι δραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS), δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στις εξεταζόμενες ομάδες. Μόνο το PBO προκάλεσε μία αύξηση, αλλά όχι στατιστικά σημαντική (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4: Μέτρηση ενεργότητας καταλάσης

Η δραστικότητα της καταλάσης αυξήθηκε σημαντικά κατά 59% ($p = 0.046$) στην CYP ομάδα χαμηλής δόσης συγκριτικά με το control (Διάγραμμα 4). Επίσης, παρατηρήθηκε τάση για μείωση στην δραστικότητα της καταλάσης κατά 50% ($p = 0.086$) στην συνεργιστική δράση των CYP και PBO σε υψηλές δόσεις (Διάγραμμα 4). Στις άλλες ομάδες, η δραστικότητα της καταλάσης δεν επηρεάστηκε σημαντικά σε σύγκριση με τις control ομάδες.



Διαγραμμα 5: Μέτρηση πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Όσον αφορά τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές, ούτε ανάλογα της δόσης αλλά ούτε με τη συνεργιστική ή ανεξάρτητη δράση των φαρμάκων. Ωστόσο, μια μικρή τάση για αύξηση εμφανίστηκε στις CYP ομάδες χαμηλής δόσης ($p = 0.079$) κατά 25% για αυξημένα πρωτεϊνικά καρβονύλια συγκριτικά με τις control ομάδες (Διάγραμμα 5).

Με αστεράκι (*), οι στατιστικά σημαντικές τιμές στο κάθε διάγραμμα, με $p < 0.05$.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το CYP και άλλα συνθετικά πυρεθροειδή που χρησιμοποιούνται ως εντομοκτόνα, μεταβολίζονται στο ήπαρ μέσω υδρολυτικής διάσπασης της εστερικής ομάδας και οξειδωτικών μονοπατιών από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P-450, έτσι σχηματίζονται ROS που είναι υπεύθυνες για την πρόκληση οξειδωτικού στρες στα θηλαστικά. Βέβαια, τα πυρεθροειδή είναι πιο τοξικά σε ένα έντομο παρά σε ένα θηλαστικό, εξαιτίας της αυξημένης ευαισθησίας των καναλιών νατρίου στα έντομα και του μικρότερου μεγέθους και θερμοκρασίας του σώματος. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η πρόκληση οξειδωτικού στρες μετά από χορήγηση του CYP σε μικρή και σε μεγάλη δόση σε κουνέλια καθώς και μετά από συν-χορήγηση με PBO. Για τον προσδιορισμό του οξειδωτικού στρες μετρήθηκαν στο αίμα των ζώων διάφοροι δείκτες οξειδωτικού στρες.

Τα TBARS είναι υποπροϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης, κυρίως προϊόντα αποδόμησης του λιπώδους ιστού. Οι ROS μπορούν να προκαλέσουν την οξειδωτική αποικοδόμηση των λιπιδίων προκαλώντας την παραγωγή δραστικών και ασταθών υπεροξειδίων τους. Μια διαδικασία αποικοδόμησης αυτών των ασταθών μορίων (κυρίως ο σχηματισμός μηλονικής διαλδεΐδης) οδηγεί στον σχηματισμό των TBARS. Έτσι, υψηλά επίπεδα σε TBARS σημαίνει αυξημένη λιπιδική υπεροξειδωση και ως εκ τούτου μειωμένα λιπίδια που μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο. Μια μελέτη πάνω σε ποντίκια, έχει δείξει ότι η έκθεση σε CYP επηρεάζει τη ρευστότητα των κυτταρικών μεμβρανών σε συνδυασμό με αυξημένα επίπεδα TBARS (Gabbianelli 2004). Στη μελέτη μας τα TBARS δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στις εξεταζόμενες ομάδες. Μόνο η χορήγηση του PBO έδειξε μία τάση για αύξηση των TBARS αλλά όχι στατιστικά σημαντική.

Το αντιοξειδωτικό σύστημα της γλουταθειόνης (GSH), παίζει ένα βασικό ρόλο στην κυτταρική άμυνα κατά των ελευθέρων ριζών. Ο μη-ενζυμικός δεσμευτής ριζών GSH, δεσμεύει τις υπολειμματικές ελεύθερες ρίζες που προκύπτουν από τον οξειδωτικό μεταβολισμό οι οποίες δεν έχουν εξουδετερωθεί από αντιοξειδωτικά ένζυμα (Leve De , Kaplowitz , 1991). Μελέτες σε ερυθροκύτταρα ποντικών έχουν δείξει ότι η χορήγηση CYP εξαντλεί τα επίπεδα GSH (Kales , 1999), όμως αυτό δεν παρατηρήθηκε στο πείραμά μας. Αντίθετα, το PBO βρέθηκε να εξαντλεί τα επίπεδα της GSH συγκριτικά με τα control δείγματα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Μελέτη σε

ιστούς εγκεφάλου ψαριών (Nevin 2013) έδειξε ότι το PBO ήταν πιο πιθανό να αναστέλλει το κυτόχρωμα P-450 όταν χρησιμοποιούνταν σε δόσεις μικρής διάρκειας. Ωστόσο, σε έκθεση μεγάλης διάρκειας, το PBO φαίνεται να επάγει το κυτόχρωμα P-450, και ως εκ τούτου την πρόκληση οξειδωτικού στρες και τη μείωση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών μορίων όπως η GSH.

Η χρήση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ως βιοδείκτη οξειδωτικού στρες, έχει κάποια πλεονεκτήματα συγκριτικά με την μέτρηση άλλων προϊόντων οξείδωσης εξαιτίας του σχετικά πρώιμου σχηματισμού τους και τη σχετική σταθερότητα των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες πιθανόν συνεισφέρουν στην εμφάνιση οξειδωτικής βλάβης στα κύτταρα αφού συχνά συμπεριφέρονται ως καταλύτες (δηλαδή επιδρούν άμεσα σε λειτουργικά τμήματα του κυττάρου π.χ. ένζυμο) παρά ως στοιχειομετρικοί μεσολαβητές. Τέτοιοι παράγοντες, καθώς και η φύση των ROS, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη ώστε να καθοριστεί ποιον δείκτη οξειδωτικού στρες θα πρέπει να μελετήσουμε. Στην παρούσα μελέτη, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές βασισμένες στην δόση που χρησιμοποιήθηκε, αλλά ούτε στην συνεργιστική ή ανεξάρτητη δράση των φυτοφαρμάκων. Τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων παρουσίασαν μια μικρή τάση αύξησης μόνο στη CYP ομάδα χαμηλής δόσης.

Η καταλάση (CAT) είναι μια αιμοπρωτεΐνη καθώς και ένα σημαντικό κυτταρικό αντιοξειδωτικό ένζυμο. Η βασική λειτουργία της CAT είναι να προστατεύει το κύτταρο από τις τοξικές επιδράσεις των μεγάλων συγκεντρώσεων υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Αυτό το επιτυγχάνει καταλύοντας τη διάσπαση του H_2O_2 σε μοριακό οξυγόνο και νερό, χωρίς την παραγωγή ελεύθερων ριζών. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η λιπιδική υπεροξειδωση μπορεί να συμβάλλει στη μείωση της δραστηριότητας της CAT κατά τη διάρκεια τοξικότητας του CYP σε ποντίκια (Athessahin 2005). Από τα αποτελέσματα του πειράματος, παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση στη δραστηριότητα της CAT μόνο στην ομάδα CYP χαμηλής δόσης συγκριτικά με τα control δείγματα. Η αύξηση της δραστηριότητας της CAT μπορεί να εξηγηθεί ως ένας μηχανισμός διάσωσης ενάντια σε ήπιες συνθήκες οξειδωτικού στρες. Επίσης, η χορήγηση CYP και PBO συνδυασμένα σε υψηλά επίπεδα έκθεσης μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της CAT συγκριτικά με τις ομάδες CYP (υψηλή και χαμηλή δόση). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι όταν τα CYP και PBO συνδυάζονται, προκαλούν πιο σοβαρό οξειδωτικό στρες παρά το καθένα από μόνο του και για αυτό το λόγο μειώνεται η δράση της CAT. Είναι γνωστό ότι μερικές δραστικές

μορφές οξυγόνου (όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου) σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορούν να μειώσουν την δραστικότητα της CAT (Aebi H., 1984).

Τα αντιοξειδωτικά, παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην πρόληψη του σχηματισμού καθώς και στην δέσμευση των ελευθέρων ριζών και άλλων δυνητικά τοξικών οξειδωτικών μορίων. Με τις μεθόδους που προαναφέρθηκαν, έγινε μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) η οποία δίνει πληροφορίες για τις αρνητικές επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες. Παρατηρήσαμε ότι και στις δύο δοσολογίες του CYP (υψηλή και χαμηλή) αυξάνεται η TAC συγκριτικά με τις control ομάδες. Γενικά, αύξηση της TAC σημαίνει ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, έτσι η παρατηρούμενη αύξηση της TAC από το CYP (έναν οξειδωτικό παράγοντα), εξηγείται ως ένας μηχανισμός διάσωσης με σκοπό την αντιμετώπιση του προκαλούμενου οξειδωτικού στρες. Πράγματι, μερικές φορές κάτω από ανεκτές συνθήκες οξειδωτικού στρες ο οργανισμός αυξάνει την παραγωγή αντιοξειδωτικών μορίων ως έναν αντισταθμιστικό μηχανισμό ενάντια στην αύξηση των ελευθέρων ριζών (Douarre 2012, Tchanchou 2004). Σε παλιότερες μελέτες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, έχει επίσης αναφερθεί ότι τα φυτοφάρμακα Diazinon και Proxoxur αύξησαν την TAC, αν και ταυτόχρονα προκαλούσαν οξειδωτικό στρες (Zafirooulos 2014). Επιπλέον, αυτή η αύξηση της TAC μπορεί να ευθύνεται για την απουσία επίδρασης στα επίπεδα των TBARS και CARB μετά την χορήγηση με CYP. Δηλαδή, η έκθεση στο CYP στις δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν μπορεί να προκαλέσει ένα ήπιο οξειδωτικό στρες που με την σειρά του ενεργοποίησε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς οι οποίοι προστάτευσαν τα λιπίδια ή της πρωτεΐνες από οξειδωτική βλάβη. Η παρατηρούμενη αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης μετά από χορήγηση χαμηλής δόσης CYP, επίσης συμφωνεί με την παραπάνω υπόθεση, δηλαδή την αύξηση αντιοξειδωτικών μορίων λόγω πρόκλησης ήπιου οξειδωτικού στρες.

Όπως το CYP, έτσι και το PBO σε χαμηλή δόση αυξάνει τα επίπεδα της TAC συγκριτικά με τις control ομάδες. Αυτή η αύξηση της TAC επίσης μπορεί να εξηγηθεί ως ένας αντισταθμιστικός μηχανισμός για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω για το CYP, αυτή η αύξηση της TAC ίσως να απέτρεψε την αύξηση στα επίπεδα των TBARS και CARBs. Ωστόσο, το PBO σε υψηλές δόσεις παρουσίασε μία τάση για μείωση στα επίπεδα της TAC. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το PBO σε υψηλή δόση προκάλεσε πιο σοβαρό οξειδωτικό στρες συγκριτικά με την χαμηλή δόση, οδηγώντας σε

μείωση των αντιοξειδωτικών μορίων. Η εμφανής μείωση στα επίπεδα της GSH κατά την έκθεση του PBO σε υψηλή δόση υποστηρίζει το έντονο οξειδωτικό στρες που συμβαίνει σε αυτή την περίπτωση.

Η συν-έκθεση στο CYP και PBO σε χαμηλές δόσεις, δεν επηρέασε τα επίπεδα της TAC, προτείνοντας ότι οι δύο αυτές χημικές ενώσεις ίσως να δρουν συνεργιστικά και να προκαλούν πιο έντονο οξειδωτικό στρες παρά το καθένα μόνο του, παρεμποδίζοντας την αύξηση των αντιοξειδωτικών μορίων. Επιπλέον, όπως η έκθεση στο PBO σε υψηλές δόσεις, έτσι και η συν-έκθεση στο CYP και PBO σε υψηλή δόση έδειξαν μία τάση για μείωση της TAC υποδεικνύοντας ότι υπήρχε ένα ακόμα πιο έντονο οξειδωτικό στρες συγκριτικά με τις χαμηλές δόσεις και ως αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών μορίων. Η σημαντική μείωση στα επίπεδα της GSH μετά την συγχορήγηση του CYP και PBO σε υψηλές δόσεις υποστηρίζει την προηγούμενη υπόθεση. Παρόμοια, η εμφανής μείωση στην δραστηριότητα της καταλάσης μετά την συν-έκθεση στα δύο φυτοφάρμακα συγκριτικά με την έκθεση στο CYP μόνο, υποστηρίζει ότι πιο έντονο οξειδωτικό στρες προκαλείται όταν οι δύο χημικές ενώσεις συνδυάζονται εξαιτίας μιας πιθανής συνεργιστικότητας μεταξύ τους.

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα που πήραμε (αν και ο μικρός αριθμός των ζώων ανά ομάδα αποτελεί έναν περιοριστικό παράγοντα για αυτή τη μελέτη) καταλήγουμε στο ότι η συγχορήγηση του παράγοντα PBO με το CYP, αυξάνει τα επίπεδα οξειδωτικού στρες. Άλλωστε η χορήγηση του PBO προκαλεί οξειδωτικό στρες από μόνη της. Διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο χημικών ουσιών θα μπορούσαν να συμβαίνουν, όπως υπόθεσαν οι Rider και Leblank σε μια μελέτη τους (2005) η οποία έδειξε ότι το PBO δρα ως ανταγωνιστής σχετικά με την τοξικότητα άλλων εντομοκτόνων (μαλαθείο και παραθείο) μειώνοντας τη μεταβολική τους ενεργοποίηση. Στην μελέτη μας, η πρόκληση οξειδωτικού στρες μετά τη συν-έκθεση του CYP με το PBO πιθανώς να οφείλεται σε παρόμοιους λόγους με το πείραμα των Rider και Leblank. Παρόλο που το PBO δεν θεωρείται ότι έχει εντομοκτόνες επιδράσεις, παρατηρήσαμε ότι η έκθεση στο PBO έχει την ιδιότητα να προκαλεί οξειδωτικό στρες στα πειραματόζωα. Το PBO είναι γενικά γνωστό ως ένα απλό συνεργιστικό προσθετικό στα εντομοκτόνα, ωστόσο τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι θέτει μια απειλή για την υγεία, αν και επισημαίνεται απλά ως ένα προσθετικό και δεν θεωρείται βασική τοξική ουσία. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για να διευκρινιστεί ακριβώς ποιος είναι ο μηχανισμός δράσης του PBO και ποιές είναι οι κρυμμένες

αρνητικές του επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Για παράδειγμα, Το PBO έχει βρεθεί ότι αποτελεί υπόστρωμα, αναστολέα και επαγωγή ενζύμων του κυτοχρώματος P-450 στα θηλαστικά. Αυτό ίσως δικαιολογεί την αποτελεσματικότητά του ως προσθετικό στα εντομοκτόνα και φυτοφάρμακα, ενώ μπορεί να αποτελεί και ένα πολύ χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο στην τοξικολογία των εντομοκτόνων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. R. Baselt, Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, 8th edition, Biomedical Publications, Foster City, CA, 2008, pp. 389-391.
2. Hu, JX; Li, YF; Li, J; Pan, C; He, Z; Dong, HY; Xu, LC (2011). "Toxic effects of cypermethrin on the male reproductive system: With emphasis on the androgen receptor". Journal of applied toxicology : JAT: n/a. doi:10.1002/jat.1769
3. Singh, AK; Tiwari, MN; Upadhyay, G; Patel, DK; Singh, D; Prakash, O; Singh, MP (2012). "Long term exposure to cypermethrin induces nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in adult rats: Postnatal exposure enhances the susceptibility during adulthood". Neurobiology of Aging 33 (2): 404–15.
4. Amer, S.M. et al. (1993). "Induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchange in vivo and in vitro by the insecticide cypermethrin". Journal of Applied Toxicology 13 (5): 341–345.
5. Tateno, C.; Ito, Seiichi; Tanaka, Mina; Yoshitake, Akira et al. (1993). "Effects of pyrethroid insecticides on gap junctional intercellular communications in Balb/c3T3 cells by dye-transfer assay". Cell biology and toxicology journal 9 (3): 215–222.
6. Robert L. Metcalf "Insect Control" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry" Wiley-VCH, Weinheim, 2002

7. Bulletin of Entomological Research / Volume 88 / Issue 06 / December 1998, pp 601-610 G.J. Devine, I. Denholm
8. Casida, J. E. (1970). MFO involvement in the biochemistry of insecticide synergists. *J. Agric. Food. Chem.* 18, 753–772.
9. Moores, G. D., Philippou, D., Borzatta, V., Trincia, P., Jewess, P., Gunning, R., Bingham, G. (2009). "An analogue of piperonyl butoxide facilitates the characterisation of metabolic resistance". *Pest Manag. Sci.* 65 (2): 150–154.
10. Conney, A. H., Chang, R., Levin, W. M., Garbut, A., Munro-Faure, A. D., Peck, A. W., and Bye, A. (1972). "Effects of piperonyl butoxide on drug metabolism in rodents and man" *Arch. Environ. Health* 24, 97–106.
11. Wester, RC; Bucks, DA; Maibach, HI (1994). "Human in vivo percutaneous absorption of pyrethrin and piperonyl butoxide". *Food and Chemicals Toxicology* 32 (1): 51-53
12. Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5: 156-70.
13. Giles GI, Jacob C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem* 2002; 383: 375-88.

14. Raymond C-S Seet, Chung-Yung J Lee, Erle C H Lim, Amy M L Quek, Shan-Hong Huang, Chin-Meng Khoo, Barry Halliwell “Markers of oxidative damage are not elevated in otherwise healthy individuals with the metabolic syndrome.”, *Diabetes Care*, vol. 33, no. 5, 2010

15. PILAR CODO~NER-FRANCH, VICTORIA VALLS-BELL_ES, ANGELA ARILLA-CODO~NER, and EULALIA ALONSO-IGLESIAS. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. 2011 Database on-line. Available from Scopus

16. Ames BN, Catchcart R, Schwiers E, et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6858-62.

17. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 2000; 16 (7-8): 716-8.

18. 716 8.

19. Brandley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, et al. The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 1993; 268 (10): 6995-7010.

20. Ji LL. 1999. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:283-292.

21. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem.* 2001 Jun;8(7): 829-38.

22. Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, and Ohno, H. (1996). Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhaustive exercise. *Eur. J. Appl. Physiol* 72: 189-194.
23. Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 50:271-277; 2000.
24. McCord, JM, and Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1968. 243: 5753-5760.
25. Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). *Free radicals in biology and chemistry*. New York: Oxford Science Publications.
26. Cadet JI, Berger M, Douki T, Ravanat. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *JL*.1997;131:1-87
27. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29 (2): 358-62.
28. Kim SH, Park KS, Chang MJ, Sung JH. Effects of Panax ginseng extract on exercise-induced oxidative stress. *J Sports Med Phys Fitness*. 2005 Jun;45(2):178-82.

29. Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett*. 2004; 357: 83-86.
30. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest*. 2002 62: 231-236.
31. Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci*. 2001; 28: 141-143.
32. Rosita Gabbianelli, Cinzia Nasuti, Giancarlo Falcioni, Franco Cantalamessa, Lymphocyte DNA damage in rats exposed to pyrethroids: effect of supplementation with Vitamins E and C, *Toxicology*, Volume 203, Issues 1–3, 15 October 2004, Pages 17-26, ISSN 0300-483X, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2004.05.012>.
33. Leve De, L., Kaplowitz, N., 1991. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Therap.* 52, 287–305.
34. M. Kale, N. Rathore, S. John, D. Bhatnagar, Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species, *Toxicology Letters*, Volume 105, Issue 3, 12 April 1999, Pages 197-205, ISSN 0378-4274, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00399-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00399-3).

35. M.I. Yousef, F.M. El-Demerdash, K.I. Kamel, K.S. Al-Salhen, Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by isoflavones and cypermethrin, *Toxicology*, Volume 189, Issue 3, 1 August 2003, Pages 223-234, ISSN 0300-483X, [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00145-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00145-8).
36. Atessahin, A., Yilmaz, S., Karahan, I., Pirinçci, I., Tasdemir, B. The effects of vitamin E and selenium on cypermethrin-induced oxidative stress in rats ahmet (2005) *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29 (2), pp. 385-391.
37. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 1996; 16: 33–50
38. Rider CV, LeBlanc GA. An integrated addition and interaction model for assessing toxicity of chemical mixtures. *Toxicol Sci.* 2005 Oct;87(2):520-8. Epub 2005 Jul 7. PubMed PMID: 16002478.
39. WHO (1989). Cypermethrin Environmental Health Criteria 82
40. H. Aebi, "Catalase in vitro," *Methods in enzymology*, vol. 105, pp. 121-126, 1984.
41. Zafiropoulos A, Tsarouhas K, Tsitsimpikou C, Fragkiadaki P, Germanakis I, Tsardi M, Maravgakis G, Goutzourelas N, Vasilaki F, Kouretas D, Hayes A, Tsatsakis A. Cardiotoxicity in rabbits after a low-level exposure to diazinon, propoxur, and chlorpyrifos. *Hum Exp Toxicol.* 2014 Dec;33(12):1241-52.
42. Douarre C, Sourbier C, Dalla Rosa I, et al. Mitochondrial topoisomerase I is critical for mitochondrial integrity and cellular energy metabolism. *PLoS One* 2012; 7: 41094.

43. Tchantchou F, Graves M, Ashline D, et al. Increased transcription and activity of glutathione synthase in response to deficiencies in folate, vitamin E, and apolipoprotein E. *J Neurosci Res* 2004; 75: 508–515.