

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

«Μέτρηση της δραστηρότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων
στο αίμα κονίκλων έπειτα από τη χορήγηση σε αυτά ξενοβιοτικών
ουσιών»

«Measurement of the activity of antioxidant enzymes
in rabbit erythrocytes
after xenobiotic administration»

Διπλωματική Εργασία

Καπετανοπούλου Θεοδώρα του Κωνσταντίνου

Λάρισα, 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κουρέτας Δημήτριος

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

Βεσκούκης Αριστείδης

Μεταδιδακτορικός Ερευνητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Πανεπιστημιακός Υπότροφος, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τσατσάκης Αριστείδης

Καθηγητής Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ευχαριστίες...

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δημήτριου Κουρέτα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετάσχω στην ερευνητική του ομάδα και να εργαστώ σε ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον πεδίο. Οι συμβουλές και οι παραινέσεις του αποτέλεσαν σημαντικό κίνητρο για την εξέλιξή μου.

Επίσης θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στον μεταδιδακτορικό Ερευνητή Βεσκούκη Αριστεΐδη που με τις υποδείξεις του με καθοδήγησε και με έφερε ένα βήμα πιο κοντά στην επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας μου αυτής, καθώς και τον κύριο Τσατσάκη Αριστεΐδη για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Φυσικά, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στο μεταδιδακτορικό ερευνητή Γκουτζουρέλα Νίκο. Τον ευχαριστώ θερμά γιατί ήταν συνεχώς δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας πτυχιακής εργασίας από τα πειράματα και τις αναλύσεις, ως τη συγγραφή και τη διόρθωση.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άσπογη συνεργασία μας, την υπομονή τους και την προθυμία που έδειξαν να με βοηθήσουν με τις γνώσεις και την εμπειρία τους.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη.....	6
Abstract.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Δραστικές μορφές.....	7
1.2 Ελεύθερες ρίζες.....	8
1.2.1 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	8
1.2.2 Θετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών.....	8
1.2.3 Αρνητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών.....	9
1.2.3.α Λιπιδική υπεροξείδωση.....	9
1.2.3.β Οξειδωση πρωτεϊνών.....	9
1.2.3.γ Οξειδωση νουκλεϊκών οξέων.....	10
1.3 Όρμηση.....	11
1.4 Οξειδωτικό στρες.....	11
1.5 Αντιοξειδωτικά.....	12
1.5.1 Μηχανισμός δράσης.....	12
1.5.2 Επίπεδα αντιοξειδωτικής δραστηριότητας.....	12
1.6 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	13
1.6.1 Ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	13
1.6.1.α Λευκοματίνη (ή αλβουμίνη).....	13
1.6.2 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	13
1.6.2.α Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD).....	13
1.6.2.β Καταλάση (CAT).....	14
1.6.2.γ Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Gpx).....	14
1.6.2.δ Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR).....	14
1.6.3 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	15
1.6.3.α Γλουταθειόνη (GSH).....	15
1.6.3.β Ουρικό οξύ.....	15
1.6.4 Εξωγενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	16
1.6.4.α Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ).....	16
1.6.4.β Βιταμίνη E (Τοκοφερόλη).....	16
1.6.4.γ Πολυφαινόλες.....	16
1.7 Βιοδείκτες.....	17
1.8 Ξενοβιοτικά.....	17
1.9 Ενδοκρινείς διαταράκτες.....	18
1.9.1 Διφαινόλη A (BPA).....	19
1.9.2 Glyphosate & Roundup.....	21
1.9.3 Parabens.....	22

1.9.3.α Μέθυλ-παραβένιο (MePB).....	23
1.9.3.β Πρόπυλ-παραβένιο (PrPB).....	24
1.9.3.γ Βούτυλ-παραβένιο (BuPB).....	25
1.9.4 Τρικλοζάνη (TCS).....	25
1.9.5 Φθαλικός δι-(2-αιθυλοεξυλο) εστέρας (DEHP).....	26
2. ΣΚΟΠΟΣ	27
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
3.1 Πειραματόζωα.....	28
3.2 Μείγματα ξενοβιοτικών.....	28
3.3 Πειραματικός σχεδιασμός.....	30
3.4 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου αναγωγή της γλουταθειόνης.....	30
3.5 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης.....	33
3.6 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου.....	36
3.7 Στατιστική ανάλυση.....	38
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	39
4.1 Δραστηριότητα του ενζύμου αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) σε ιστούς κουνελιών	39
4.2 Δραστηριότητα του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) σε ιστούς κουνελιών.....	40
4.3 Δραστηριότητα του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) σε ιστούς κουνελιών.....	41
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	45

Περίληψη

Είναι γνωστό ότι σε κάθε πτυχή της καθημερινής ζωής ο άνθρωπος έρχεται σε επαφή με μια πληθώρα χημικών ουσιών (ξеноβιοτικών) με άγνωστες επιπτώσεις στην υγεία του. Η εκτεταμένη χρήση αυτών σε ποικίλα προϊόντα (φαρμακευτικά, καλλυντικά κτλ.) πυροδότησε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και οδήγησε στη διεξαγωγή μελετών, αξιολογώντας τόσο την επίδραση αυτών σε υψηλές, μη ρεαλιστικές δόσεις, όσο και την επίδρασή τους σε χαμηλές δόσεις αλλά και ως συστατικά μειγμάτων. Στο πλαίσιο αυτό, η πρόσφατη βιβλιογραφία έρχεται να επιβεβαιώσει την άποψη ότι τα μείγματα των ξеноβιοτικών ουσιών ασκούν μεγαλύτερη τοξική δράση σε σύγκριση με αυτήν που ασκεί κάθε ουσία μεμονωμένα. Επομένως, η στροφή των ερευνών στη μελέτη των μειγμάτων μπορεί κανείς να πει ότι αποτελεί μια ρεαλιστικότερη προσέγγιση για την προσομοίωση της καθημερινής ζωής. Σε αυτή τη λογική, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της μακροχρόνιας επίδρασης (χορήγηση για 12 μήνες) ενός μείγματος 7 ενδοκρινικών διαταρακτών μία μικρή και σε μία υψηλή (κάτω από το NOAEL) δόση, καθώς και του ζιζανιοκτόνου Roundup και του ενεργού συστατικού του γλυφοσάτη, ατομικά σε αντιοξειδωτικά ένζυμα των ερυθροκυττάρων κουνελιών. Η μέτρηση των βιοδεικτών πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτομετρικές μεθόδους. Βρέθηκε ότι η δραστηριότητα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης μειώθηκε μετά από 6, 9 και 12 μήνες χορήγησης σε σύγκριση με τους 6 μήνες ενώ δε βρέθηκαν πρακτικά επιδράσεις στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και την υπεροξειδική δισμουτάση. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, η οποία αποτελεί μέρος μίας μεγάλης διεθνούς διεπιστημονικής προσέγγισης, καταδεικνύουν ότι η χορήγηση μειγμάτων ξеноβιοτικών για μεγάλο χρονικό διάστημα έχουν δυσμενή επίδραση στους ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των ερυθροκυττάρων. Η εργασία αυτή προσομοιάζει το ρεαλιστικό σενάριο εκτίμησης του κινδύνου που προκύπτει από τη χορήγηση μείγματος ξеноβιοτικών.

Abstract

It is well-established that humans are exposed to xenobiotics during their every day routine with unknown health effects. However, the majority of toxicological studies assess the *in vivo* effects of individual substances in unrealistically high doses rather than mixtures. To this end, very recent literature seems to confirm the notion that xenobiotic substances exert greater toxic action when administered combined in mixtures than individually. Thus, the aim of this dissertation was the investigation of the long-term (12 months) low-dose effects of a mixture comprising 7 endocrine disruptors, in low and high (below NOAEL) doses along with the pesticide "Roundup" and its active substance, glyphosate individually on antioxidant enzymes in rabbit erythrocytes. The measurements of the tested biomarkers were performed spectrophotometrically. It was observed that glutathione reductase activity was decreased after 6, 9 and 12 months of administration compared to 3 months whereas glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities were not altered. These findings indicate that the long-term low-dose regimen of a xenobiotic mixture impairs the antioxidant mechanism of erythrocytes. This study simulates a scenario of real-life risk exposure to mixtures of xenobiotics through a long-term low-dose administration regimen.

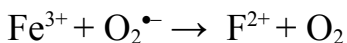
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1) Δραστικές μορφές

Ο όρος δραστική μορφή είναι μία γενικότερη έννοια και αναφέρεται σε μόρια ή άτομα με οξειδωτική δράση, τα οποία χημικά είτε είναι ελεύθερες ρίζες (οι οποίες έχουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο εξωτερικό τους τροχιακό και δυνατότητα ανεξάρτητης ύπαρξης) είτε όχι. Είναι ασταθείς και υψηλά ενεργές δομές. Ο χρόνος ημιζωής τους μπορεί να ποικίλει από μερικά ns έως και δευτερόλεπτα ή ακόμα και ώρες. Προκαλούν αλυσιδωτές αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων οι οποίες οδηγούν σε οξειδώσεις σημαντικά βιομόρια, έως ότου φτάσουν σε μία σταθερή κατάσταση. Οι δραστικές μορφές κατηγοριοποιούνται σε 4 κύριες κατηγορίες ανάλογα με το κεντρικό άτομο της δομής:

- Δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS)
 - Δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS)
 - Δραστικές μορφές θείου (reactive sulphur species, RSS)
 - Δραστικές μορφές χλωρίου (reactive chlorine species, RCS)
- (Halliwell and Gutteridge et al.,2007).

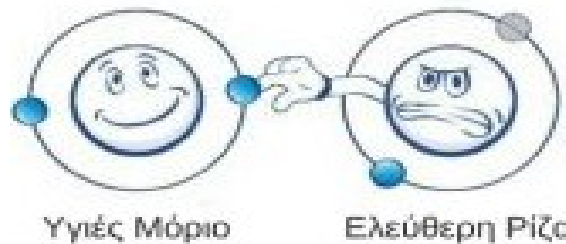
Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου παράγονται φυσιολογικά κατά τη διάρκεια μεταβολικών διαδικασιών και ειδικότερα κατά τη διάρκεια αλυσιδωτών αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων (Di Meo and Venditti et al.,2001). Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι δημιουργούνται ROS κατά την οξειδωτική φωσφορλίωση στα μιτοχόνδρια του σκελετικού μυός (Sjodin et al.,1990), στα υπεροξειδισώματα, από ένζυμα του κυτοχρώματος P450, από την ακτινοβολία UV, από την ατμοσφαιρική ρύπανση, από τον καπνό του τσιγάρου, από το αλκοόλ ή και κατά την άσκηση (Halliwell and Gutteridge et al.,2007). Πέρα από τη σύνδεση των δραστικών μορφών με το οξειδωτικό στρες, η βιολογία τους έχει βρεθεί ότι ακολουθεί το φαινόμενο της όρμησης. Όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις χρησιμοποιούνται στο υποκυτταρικό περιβάλλον για βασικές βιολογικές διαδικασίες. Αν όμως η συγκέντρωσή τους ξεπερνά ένα όριο τότε έχουν δυσμενείς επιδράσεις στα βιομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA). Μία από τις πιο άφθονες δραστικές μορφές είναι το ανιόν σουπεροξειδίου το οποίο παράγεται όταν το οξυγόνο αναχθεί από ένα ηλεκτρόνιο. Η περαιτέρω αναγωγή του οξυγόνου δημιουργεί αντίστοιχα το υπεροξείδιο του υδρογόνου και την ρίζα του υδροξυλίου. Η ρίζα του υδροξυλίου αποτελεί την πιο επιβλαβή δραστική μορφή οξυγόνου και παράγεται από τις αντιδράσεις Fenton & Haber-Weiss (που φαίνονται στις παρακάτω αντιδράσεις) υπό τη παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης (σιδήρου ή χαλκού).



Από την άλλη το υπεροξείδιο του υδρογόνου δεν είναι μια ελεύθερη ρίζα αλλά μπορεί να έχεις σοβαρές επιπτώσεις στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια όταν η συγκέντρωσή του φτάσει τα 10 μM (Halliwell and Gutteridge et al.,2007).

1.2 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε μοριακό άτομο ή μόριο που μπορεί να υπάρξει ανεξάρτητα και έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους. Μερικές ρίζες είναι ασταθείς και υψηλά δραστικές και μπορούν είτε να δανείσουν είτε να δεχθούν ένα ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια και να συμπεριφέρονται σαν αναγωγικά ή σαν οξειδωτικά μόρια. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προσβάλλουν σημαντικά μακρομόρια (Εικόνα 1) και να οδηγήσουν σε καταστροφή και διαταραχή της ομοιόστασης του κυττάρου.



Εικόνα 1: Επίδραση της ελεύθερης ρίζας σε ένα υγιές μόριο

1.2.1 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν:

- 1) από μόρια μέσω της διάσπασης ενός χημικού δεσμού, ώστε κάθε θραύσμα να διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο
- 2) μέσω της διάσπασης μίας ρίζας προς σχηματισμό άλλης ρίζας
- 3) μέσω των αντιδράσεων οξειδοαναγωγής (Pham-Huy et al., 2008).

Η παραγωγή τους μπορεί να γίνει είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς πηγές.

1.2.2 Θετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Για πολλές δεκαετίες, οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνταν επικίνδυνες χημικές δομές, υπεύθυνες για πολυάριθμες παθολογικές διαταραχές, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η φλεγμονή, η γήρανση κ.ά. Ωστόσο, οι δραστικές μορφές συχνά εμφανίζονται να είναι σημαντικές σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες. Η μεταγωγή σήματος ανάμεσα στα κύτταρα απαιτεί την παρουσία $O_2 \cdot -$ και H_2O_2 (Ji et al., 2007) ενώ το $NO \cdot$ έχειδειχθεί ότι αποτελεί έναν νευροδιαβιβαστή σημαντικό για την συστολή των αγγείων (Halliwell and Gutteridge et al., 2007). Επιπλέον οι δραστικές μορφές είναι ιδιαίτερα σημαντικές και για την σύσπαση των μυών (Linnane et al., 2002), την ενζυμική δραστηριότητα (Jenkins et al., 1988), την έκφραση γονιδίων (Ji et al., 2006) και τη δράση μεταγραφικών παραγόντων (Sen et al., 1998). Δεν είναι λίγες οι μελέτες που αναφέρουν ότι συμβάλλουν και στη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω ενεργοποίησης της δράσης των φαγοκυττάρων (Malm et al., 2001). Ακόμα και η απόπτωση συνοδεύεται από ενδοκυτταρικά αυξημένη οξειδωτική δραστηριότητα. Ωστόσο αν αυτή ξεπεράσει ένα όριο οδηγεί σε υπεροξείδωση και απενεργοποίηση κασπασών οπότε η απόπτωση αναστέλλεται (Hampton and Orrenius et al., 1998).

1.2.3 Αρνητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών

1.2.3.α Λιπιδική υπεροξείδωση

Τα λιπίδια εξαιτίας του δομικού και λειτουργικού τους ρόλου ως συστατικά των μεμβρανών έχουν μελετηθεί εκτενώς. Οι δραστικές μορφές οδηγούν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids, PUFA) συχνά σε αλυσιδωτές αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξείδωσης αφού εξαιτίας του γεγονότος ότι οι διπλοί δεσμοί τους βρίσκονται σε συζευγή γεωμετρία (Bergamini et al., 2004), κρίνονται ιδιαίτερα ευαίσθητα. Ειδικότερα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όταν οξειδωθούν παράγουν μια ρίζα η οποία αντιδρά με το οξυγόνο και παράγει ρίζες περοξυλίου. Αυτές τα οξειδώνουν περαιτέρω και δημιουργούνται τα λιπιδικά υπεροξειδία που οδηγούν στη παραγωγή συσσωματωμάτων διενίων όπως η μαλονυλο διαλδεϋδη (Young and McEneny 2001; Mylonas and Kouretas 1999). Γενικότερα η λιπιδική υπεροξείδωση αυξάνει την διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Επίσης, τα γλυκολιπίδια, τα φωσφολιπίδια και η χοληστερόλη αποτελούν στόχους της επιβλαβούς υπεροξειδικής τροποποίησης (Ayala et al., 2014).

Η συνολική διαδικασία της υπεροξείδωσης των λιπιδίων αποτελείται από τρία στάδια: την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό. Κατά το στάδιο της έναρξης, τα (προ)οξειδωτικά, όπως η ρίζα υδροξυλίου, αποσπών το αλλυλικό υδρογόνο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό λιπιδικής ελεύθερης ρίζας άνθρακα ($L\cdot$). Στο στάδιο της διάδοσης, η $L\cdot$ αντιδρά ταχέως με το οξυγόνο, ώστε να σχηματίσει μία λιπιδική ρίζα περοξυλίου ($LOO\cdot$) (Ayala et al., 2014). Εν συνεχεία, η προκύπτουσα $LOO\cdot$ αποσπά ένα άλλο άτομο υδρογόνου από ένα ακόρεστο λιπίδιο προς σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων ($LOOH$) και πολλαπλασιάζει την αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών παράγοντας μια άλλη $L\cdot$ στο δεύτερο λιπαρό οξύ (Johnson & Decker, 2015). Τέλος, κατά την αντίδραση τερματισμού αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη E, δίνουν ένα άτομο υδρογόνου στις $LOO\cdot$ και σχηματίζουν μία αντίστοιχη ρίζα βιταμίνης E που αντιδρά με άλλη $LOO\cdot$ και παράγει ως προϊόντα μη ρίζες. Μόλις ξεκινήσει η υπεροξείδωση των λιπιδίων ακολουθεί πολλαπλασιασμός των αλυσιδωτών αντιδράσεων έως ότου παραχθούν προϊόντα τερματισμού (Ayala et al., 2014).

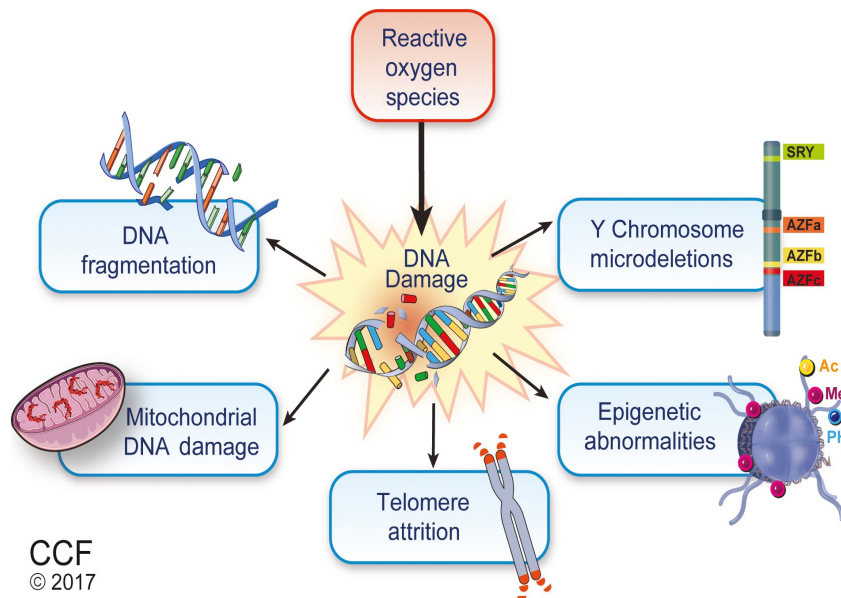
1.2.3.β Οξείδωση πρωτεϊνών

Στο ίδιο πλαίσιο και οι πρωτεΐνες δεν άφησαν αδιάφορη την επιστημονική κοινότητα η οποία μέσω εκτενών ερευνών προσπάθησε να ερμηνεύσει το γεγονός ότι ορισμένες πρωτεΐνες είναι πιο επιρρεπείς στην οξειδωτική στόχευση σε σχέση με άλλες και να ερευνήσει τους παράγοντες που καθορίζουν αυτή την εκλεκτικότητα. Βρέθηκε ότι οι παράγοντες αυτοί είναι η σχετική περιεκτικότητα σε ευαίσθητα στην οξείδωση υπολείμματα αμινοξέων, η παρουσία θέσεων δέσμευσης μετάλλων, η θέση των πρωτεϊνών στο κύτταρο, η μοριακή διαμόρφωση και ο ρυθμός αποικοδόμησης (Avery, 2011). Οι δραστικές μορφές στις πρωτεΐνες οδηγούν στη δημιουργία καρβονυλικών ομάδων σε συγκεκριμένα αμινοξέα όπως η ιστιδίνη, η αργινίνη, η λυσίνη και η προλίνη τα οποία είναι ευαίσθητα σε οξείδωση σε σύγκριση με άλλα. Επιπλέον οδηγούν στη μετατροπή των θειικών ομάδων σε θειικές ρίζες. Γενικότερα η οξείδωση των πρωτεϊνών οδηγεί σε αλλαγές οι οποίες μπορεί να καταλήγουν σε μετατροπή ή ακόμα και σε απώλεια της λειτουργίας της πρωτεΐνης (Halliwell and Gutteridge 2007). Ορισμένοι τύποι οξειδωτικής βλάβης, που επηρεάζουν τα θειούχα αμινοξέα, έχει αποκαλυφθεί ότι είναι αναστρέψιμοι, με αποτέλεσμα να διαφαίνεται η πιθανότητα επισκευής κάποιων οξειδωμένων πρωτεϊνών (Friguet, 2006). Εντούτοις, η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών είναι συνήθως μία μη αναστρέψιμη και μη ενζυμική τροποποίηση (Dalle-Donne et al., 2006).

1.2.3.γ Οξείδωση των νουκλεϊκών οξέων

Παρά το γεγονός ότι το DNA είναι ένα καλά προστατευμένο και σταθερό μόριο διάφορες δραστικές μορφές μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν διάφορους τύπους βλάβης. Τυπικά, η οξειδωτική βλάβη του DNA που προκαλείται από τις ROS σχετίζεται με απώλεια των πουρινών/πυριμιδινών (απουρινικές/απυριμιδινικές περιοχές), με οξείδωση των πουρινών και των πυριμιδινών, καθώς και με τη δημιουργία μονόκλωνων (SSBs) και δίκλωνων (DSB) θραύσεων στην έλικα του DNA (Kryston et al., 2011). Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στη δεοξυριβόζη, συνδέσεις DNA-πρωτεΐνης και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA (Kohen & Nyska, 2002) (Εικόνα 2).

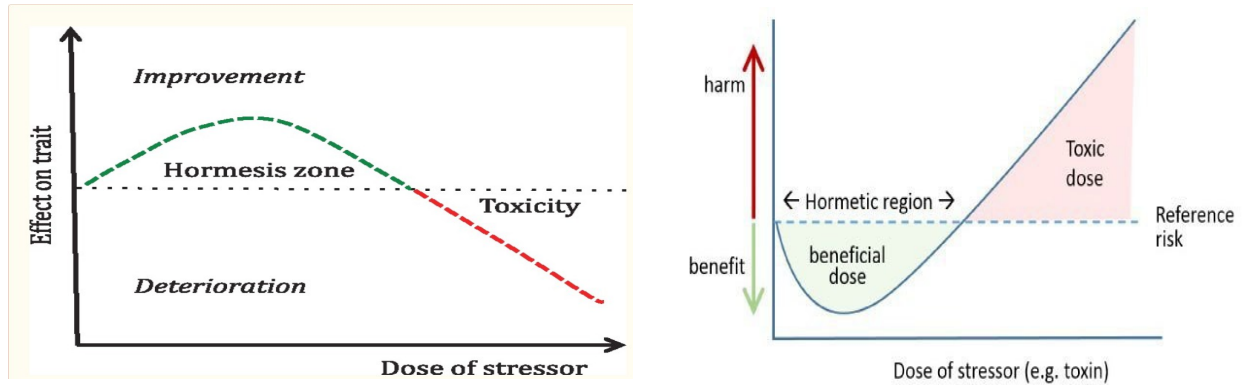
Το κυτταρικό RNA πιθανότατα είναι πιο επιρρεπές στην οξειδωτική βλάβη από το DNA. Ειδικότερα, το RNA είναι κυρίως μονόκλωνο και πιο εύκολα προσβάσιμο από τις ROS, ενώ έχει σχετικά λιγότερη συσχέτιση με τις πρωτεΐνες. Ακόμα, το RNA έχει εκτεταμένη υποκυτταρική κατανομή και το κυτταροπλασματικό RNA βρίσκεται πολύ κοντά στα μιτοχόνδρια, όπου εντοπίζεται η πλειοψηφία των ROS. Τέλος, σε αντίθεση με τους ενεργούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, δεν έχει βρεθεί μηχανισμός επιδιόρθωσης για το RNA που υπόκειται σε οξειδωτική βλάβη (Li et al., 2006).



Εικόνα 2: Επίδραση των ROS στο DNA

1.3 Όρμηση

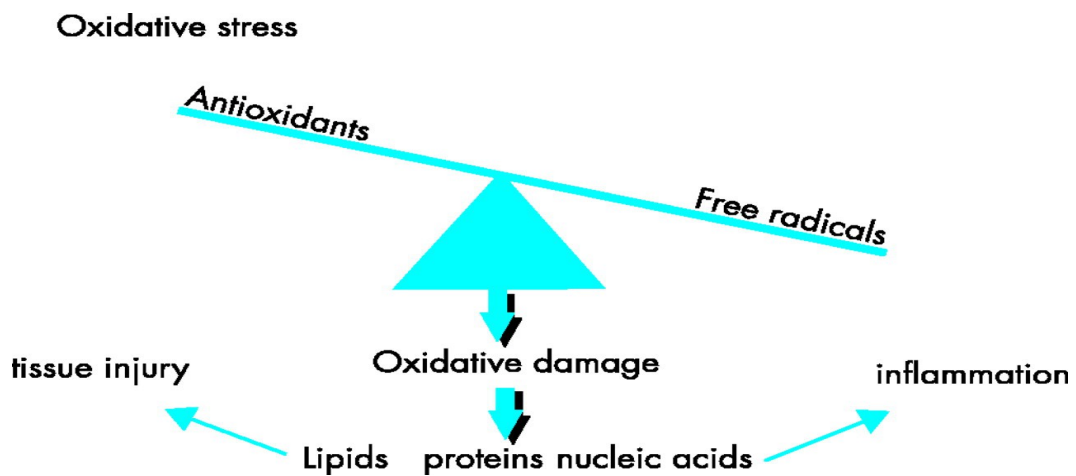
Ο όρος όρμηση χρησιμοποιείται από τους τοξικολόγους προκειμένου να περιγράψουν μια δοσοεξαρτώμενη απόκριση σε ένα παράγοντα (Εικόνα 3 & 4). Όταν οι δραστικές μορφές είναι παρούσες σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι σημαντικές για θεμελιώδεις διαδικασίες στο υποκυτταρικό περιβάλλον. Αν οι συγκεντρώσεις αυτές ξεπεράσουν ένα όριο μπορεί να έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις στα βιομόρια.



Εικόνα 3 & 4: Φαινόμενο της Όρμησης

1.4 Οξειδωτικό στρες

Είναι το αποτέλεσμα μιας ανισορροπίας μεταξύ της παραγωγής των ελευθέρων ριζών και γενικά των δραστικών μορφών και της αντιοξειδωτικής άμυνας με την ισορροπία να τείνει υπέρ των πρώτων (Sies et al., 1991). Επίσης πρόσφατα δόθηκε ένας πιο συγκεκριμένος ορισμός για το οξειδωτικό στρες που αναφέρει ότι πρόκειται και για μια διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης (Εικόνα 5) (Jones et al., 2017). Η βλάβη που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες έχει δειχθεί ότι συνεσφέρει τόσο στην παθογένεση όσο και στη παθοφυσιολογία πολλών χρόνιων ασθενειών όπως οι νευροεκφυλιστικές, οι καρδιαγγειακές ασθένειες, και ο καρκίνος (C. Lopez-Alarcona et al., 2013)



Εικόνα 5: Αποτέλεσμα ανισορροπίας ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών

1.5 Αντιοξειδωτικά

Ο όρος αντιοξειδωτικά αναφέρεται σε μόρια που μπορούν να δανείσουν ένα ηλεκτρόνιο σε ελεύθερες ρίζες και να τις μετατρέψουν σε σταθερά μόρια ή άτομα μειώνοντας την ικανότητά τους να καταστρέψουν τα μακρομόρια. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να καθυστερούν, να προλαμβάνουν ή να παρεμποδίζουν εντελώς την κυτταρική καταστροφή ενώ βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση σε σχέση με το προς οξείδωση υπόστρωμα (Halliwell B et al., 1995). Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών έγκειται στην εξουδετέρωση της περίσσειας των ελευθέρων ριζών, στη δράση τους σαν δότες υδρογόνου, ηλεκτρονίου, σαν αποικοδομητές του υπεροξειδίου ή ακόμα και σαν παρεμποδιστές της δράσης ενζύμων. Τέλος πέρα από την προστασία των κυττάρων είναι γνωστό ότι συνεισφέρουν και στην πρόληψη ασθενειών (Sailaja Rao et al., 2011). Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες ομάδες, τα ενζυμικά και τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά διακρίνονται περαιτέρω σε αυτά της πρωτογενούς και δευτερογενούς ενζυμικής άμυνας. Η πρωτογενής άμυνα αποτελείται από τρία σημαντικά ένζυμα που συμμετέχουν στην παρεμπόδιση του σχηματισμού των ελευθέρων ριζών και την εξουδετέρωσή τους και ειδικότερα, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), την καταλάση (CAT) και την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD). Από την άλλη, η δευτερογενής ενζυμική άμυνα περιλαμβάνει την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και την αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), οι οποίες υποστηρίζουν τα αντιοξειδωτικά της πρωτογενούς άμυνας και δεν εξουδετερώνουν άμεσα τις ελεύθερες ρίζες (Shebis et al., 2013).

Επιπροσθέτως, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την πηγή προέλευσής τους. Μερικά από τα αντιοξειδωτικά παράγονται ενδογενώς και περιλαμβάνουν τα ένζυμα, τα μόρια χαμηλού μοριακού βάρους και τους συμπαραγόντες ενζύμων (Ratnam et al., 2006). Αντίθετα, τα εξωγενή αντιοξειδωτικά προέρχονται από τη διατροφή και περιλαμβάνουν τις φαινόλες, τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τις βιταμίνες, τα καροτενοειδή και τα μεταλλικά στοιχεία (He et al., 2017).

1.5.1 Μηχανισμός δράσης

Το πρώτο βήμα της δράσης των αντιοξειδωτικών είναι ο μηχανισμός που σπάει την αλυσιδωτή αντίδραση που ακολουθείται όταν ένα αντιοξειδωτικό μόριο δώσει ένα ηλεκτρόνιο σε μια ελεύθερη ρίζα. Δεύτερο βήμα συνίσταται η αποδυνάμωση εκείνων των ενζύμων που μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων, καταλύουν το σχηματισμό ROS, RNS κτλ (Krinsky NI 1992).

1.5.2 Επίπεδα αντιοξειδωτικής δραστηριότητας

Σε πρώτο επίπεδο χρησιμοποιούνται ένζυμα που συμμετέχουν στην παρεμπόδιση του σχηματισμού των ελευθέρων ριζών και την εξουδετέρωσή τους. Σε αυτά περιλαμβάνονται η GPx, η CAT και η SOD.

Σε δεύτερο επίπεδο, περιλαμβάνονται αντιοξειδωτικά τα οποία εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και παρεμποδίζουν την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων και/ή εμποδίζουν την εξέλιξή τους όπως η βιταμίνη C, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, η αλβουμίνη, η βιταμίνη E και η ουβικινόλη.

Σε επόμενο επίπεδο λαμβάνει χώρα η επιδιόρθωση στην οποία διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο τα de novo αντιοξειδωτικά. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα, οι πρωτεΐνάσες και οι πεπτιδάσες που υπάρχουν στο κυτοσόλιο και στα μιτοχόνδρια των κυττάρων των θηλαστικών αναγνωρίζουν,

αποικοδομούν και αφαιρούν πρωτεΐνες που έχουν τροποποιηθεί οξειδωτικά ενώ αποτρέπουν και τη συσσώρευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών.

Σε τελικό επίπεδο ακολουθεί η διαδικασία της προσαρμογής, εκεί δηλαδή όπου το σήμα για την παραγωγή και τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών προκαλεί το σχηματισμό και τη μεταφορά των σωστών αντιοξειδωτικών στο σωστό σημείο δράσης (Niki E 1993)

1.6 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

1.6.1 Ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

1.6.1.α Λευκοματίνη (ή αλβουμίνη)

Η λευκοματίνη αποτελεί ένα αρκετά σημαντικό αντιοξειδωτικό καθώς δεσμεύει το σίδηρο και προστατεύει το κύτταρο από το οξειδωτικό στρες που προκαλούν εξωκυτταρικοί στόχοι όπως οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDLs) (Halliwell 1995).

1.6.2 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

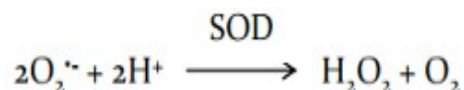
1.6.2.α Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Οι υπεροξειδικές δισμουτάσες αποτελούν ένζυμα της πρώτης γραμμής άμυνας έναντι των ROS και ειδικότερα των ριζών σουπεροξειδίου (Zelko et al., 2002). Δρουν καταλύοντας τη μετατροπή του σουπεροξειδικού ανιόντος σε οξυγόνο και υπεροξείδιο υδρογόνου. Από τη στιγμή που η SOD είναι ένζυμο, απαιτεί έναν μέταλλο ως συμπάραγοντα για τη δραστηριότητα της. Με βάση το είδος του μετάλλου στην ενεργό περιοχή διακρίνονται σε 3 κύριες κατηγορίες SOD:

→Η υπεροξειδική δισμουτάση χαλκού-ψευδαργύρου (Cu/ZnSOD ή SOD1) που υπάρχει στο κυτοσόλιο

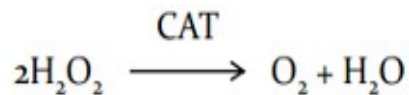
→Η υπεροξειδική δισμουτάση μαγγανίου (MnSOD ή SOD2) που βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μήτρα

→Η εξωκυτταρική υπεροξειδική δισμουτάση (SOD3).
(Wuerges J et al., 2004)



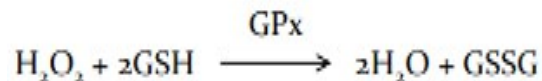
1.6.2.β Καταλάση (CAT):

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε οξυγόνο και νερό. Χρησιμοποιεί ως συμπράγοντα το σίδηρο ή το μαγγάνιο, ολοκληρώνοντας τη διαδικασία αποτοξίνωσης που ξεκίνησε η SOD. Επιπλέον, επιδεικνύει μια πολύ σημαντική δραστηριότητα αποτρέποντας την μετατροπή του υπεροξειδίου σε ρίζα υδροξυλίου (Cutler et al., 1984). Προκειμένου να αποφευχθεί η δράση του υπεροξειδίου θα πρέπει να μετατραπεί σε άλλες λιγότερο δραστικές ουσίες είτε αέριες είτε υγρές (Gaetani G. et al., 1996). Κατά κύριο λόγο εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα και στο κυτταρόπλασμα των ερυθροκυττάρων αποικοδομώντας το H₂O₂ που παράγεται κατά την οξείδωση των λιπαρών οξέων. Τέλος, είναι παρούσα σχεδόν σε όλα τα ζωικά κύτταρα ως προστατευτικό ένζυμο, αλλά τα υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας της καταλάσης μετρώνται στο ήπαρ, τους νεφρούς και τα ερυθρά αιμοσφαίρια.



1.6.2.γ Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx):

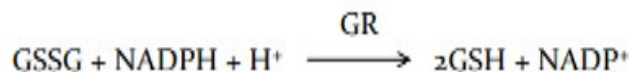
Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης αποτελεί μια γενική ονομασία μιας οικογένειας ενζύμων που καταλύουν την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) ως δότη ηλεκτρονίων (Margis et al., 2008).



Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης στην πλειονότητα των περιπτώσεων απαιτεί το σελήνιο σαν συμπράγοντα και για τον λόγο αυτό συχνά αναφέρεται και ως υπεροξειδάση της σεληνοκυστεΐνης (Ighodaro & Akinloye et al., 2018). Κατά κύριο λόγο εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα και στο κυτταρόπλασμα των ερυθροκυττάρων.

1.6.2.δ Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR):

Η αναγωγή της γλουταθειόνης ανάγει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή (GSH) σύμφωνα με την αντίδραση:

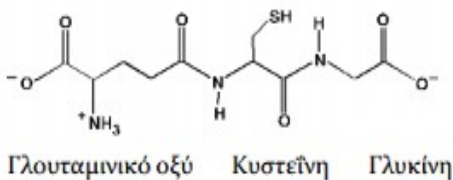


Το NADPH που απαιτείται για αυτή την αντίδραση παρέχεται κυρίως από την οδό των φωσφορικών πεντοζών. Η GR είναι το βασικό ένζυμο για τη διατήρηση του υψηλού λόγου GSH/GSSG που θεωρείται βιοδείκτης του οξειδοαναγωγικού προφίλ του κυττάρου (Can et al., 2010).

1.6.3 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

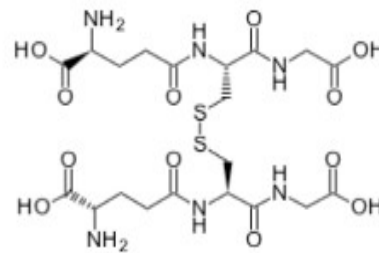
1.6.3.α Γλουταθειόνη (GSH):

Η γλουταθειόνη αποτελεί τον σημαντικότερο αντιοξειδωτικό μεταβολίτη του κυττάρου και την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στις δραστικές μορφές. Είναι ένα τριπεπτίδιο που δομείται από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη και απαιτεί τη διαδοχική δράση δύο ενζύμων, της συνθάσης της γλουταθειόνης και της συνθάσης της γ -γλουταμυλκυστεΐνης (γ -GCS). Η GSH διατηρεί την ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική ομοιόσταση του κυττάρου εξαιτίας της σουλφυδρυλικής ομάδας που φέρει η κυστεΐνη και η οποία δρα σαν υπόστρωμα για την GPx. Σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται σε μια δυναμική ισορροπία η ανηγμένη (Εικόνα 6) με την οξειδωμένη (Εικόνα 7) μορφή της γλουταθειόνης. Ωστόσο η κυρίαρχη μορφή της γλουταθειόνης είναι η ανηγμένη και αποτελεί > 98% της συνολικής. Στο οξειδωτικό στρες, όμως, η γλουταθειόνη συνεργάζεται με την GPx ώστε να αφαιρέσει το ενδοκυτταρικό υπεροξείδιο ενώ η ίδια μετατρέπεται στην οξειδωμένη της μορφή. Η αναγωγή της γλουταθειόνης μετατρέπει την οξειδωμένη στην ανηγμένη μορφή χρησιμοποιώντας το NADPH σαν δότη ηλεκτρονίου. Η αναλογία της GSH/GSSG μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν βιοδείκτης της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (Veskoukis et al. 2011).



Γλουταμινικό οξύ Κυστεΐνη Γλυκίνη

Ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH)



Οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG)

Εικόνα 6: η ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης

Εικόνα 7: η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης

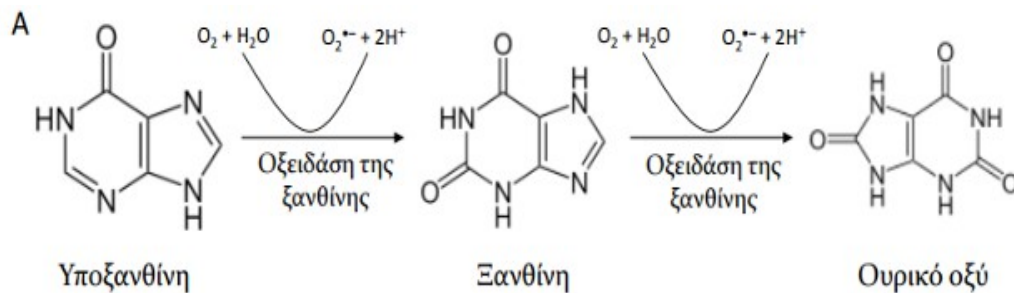
1.6.3.β Ουρικό οξύ:

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν της αποικοδόμησης των πουρινών (Sautin & Johnson et al., 2008). Δύο είναι οι καθοριστικές αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό του και οι οποίες καταλύονται από το ένζυμο οξειδοαναγωγή της ξανθίνης (XOR) (Εικόνα 8) (Glantzounis et al., 2005).

→ Η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη

→ Η μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ εντοπίζεται ενδοκυτταρικά και σε όλα τα σωματικά υγρά, αλλά συνήθως σε χαμηλότερα επίπεδα από ό,τι στο πλάσμα (Glantzounis et al., 2005). Μπορεί να αντιδράσει με μια ποικιλία οξειδωτικών, τη ρίζα σουπεροξειδίου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, τη ρίζα υδροξυλίου και κατά προτίμηση με το υπεροξυνιτρώδες ανιόν.



Εικόνα 8: η μετατροπή της υποξανθίνης σε ουρικό οξύ

1.6.4 Εξωγενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

1.6.4.α Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)

Η βιταμίνη C είναι ένα αντιοξειδωτικό μόριο που συναντάται τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα. Στους ανθρώπους δεν μπορεί να συντεθεί και για το λόγο αυτό αποκτάται από τροφές φυτικής προέλευσης (Smirnoff N., 2001). Στα κύτταρα διατηρείται στην ανηγμένη της μορφή και αντιδρά με τη γλουταθειόνη, μια αντίδραση η οποία καταλύεται από τη πρωτεϊνική δισουλφιδική ισομεράση και τις γλουταρεδοξίνες (Meister A., 1994). Βρίσκεται κυρίως στο κυτοσόλιο και στο εξωκυττάριο υγρό διακόπτοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις. Το ασκορβικό οξύ είναι ένας αναγωγικός παράγοντας και μπορεί να εξουδετερώσει τις ROS. Ωστόσο, πέρα από την άμεση αντιοξειδωτική του δράση λειτουργεί και σαν υπόστρωμα για την ασκορβική υπεροξειδάση (ένας σημαντικός μηχανισμός ώστε να αποφευχθεί το στρες στα φυτά).

1.6.4.β Τοκοφερόλη (βιταμίνη E)

Ο όρος βιταμίνη E συμπεριλαμβάνει μια συλλογή 4 τοκοφερολών και 4 τοκοτριενολών λιποδιαλυτών βιταμινών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Heffera E et al., 2001). Μεταξύ των 8 μελών της οικογένειας μόνο η α-τοκοφερόλη έχει μελετηθεί περαιτέρω διότι έχει την υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα και το σώμα επιλέγει να την απορροφά και να την μεταβολίζει (Brigelius-Flohe R et al. 1999). Η α-τοκοφερόλη είναι το σημαντικότερο λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό και προστατεύει τις μεμβράνες από οξείδωση με το να αντιδρά με τις ρίζες λιπιδίων που παράγονται κατά την αλυσιδωτή αντίδραση λιπιδικής υπεροξειδωσης (Traber MG et al. 2007). Η α-τοκοφερόλη αφαιρεί τα ενδιάμεσα των ελευθέρων ριζών και παρεμποδίζει την εξέλιξη των αντιδράσεων παραγωγής τους. Η αντίδραση αυτή παράγει οξειδωμένες α-τοκοφερολοξικές ρίζες οι οποίες μπορούν να ανακυκλωθούν ξανά στην ενεργή ανηγμένη τους μορφή μέσω αναγωγής άλλων αντιοξειδωτικών όπως το ασκορβικό οξύ, η ρετινόλη ή η ουβικινόλη (Wang X et al., 1999).

1.6.4.γ Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία φυσικών ουσιών φυτικής προέλευσης και υπάρχουν σε πληθώρα τόσο στα φρούτα και στα λαχανικά όσο και σε δημητριακά ολικής άλεσης ή σε ποτά όπως το τσάι ή το κρασί. Πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι έχουν έναν αρωματικό δακτύλιο στο μόριο τους και συνήθως υπάρχουν με την μορφή γλυκοσιδίων.

Οι πολυφαινόλες προστατεύουν τα φυτά από τις επιβλαβείς περιβαλλοντικές συνθήκες ή από παθογόνους μικροοργανισμούς ενώ συμβάλλουν και στην ανάπτυξη κάποιων χαρακτηριστικών όπως το χρώμα. Διαχωρίζονται σε 2 κύριες κατηγορίες: στα μη φλαβονοειδή και στα φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή έχουν 2 αρωματικούς βενζοϊκούς δακτυλίους συνδεδεμένους με 3 άνθρακες. Στα φυτά οι πολυφαινόλες επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δράση καθώς απενεργοποιούν ελεύθερες ρίζες δίνοντάς τους ένα άτομο υδρογόνου και ένα ηλεκτρόνιο. Επιπλέον κάνουν κάποια μέταλλα χηλικά και τους επιτρέπουν να ξεκινήσουν αντιδράσεις Fenton & Haber-Weiss. Τέλος, παρεμποδίζουν τη δραστηριότητα ενζύμων όπως η οξειδάση της ξανθίνης, οι κυκλοοξυγενάσες και η λιποοξυγενάση (Nijveldt et al., 2001).

1.7 Βιοδείκτες

Η πρώτη ερμηνεία που δόθηκε στον όρο "βιοδείκτες" έγινε από το Biomarkers Definition Working Group το 2001 και αναφέρει ότι πρόκειται "για ένα χαρακτηριστικό το οποίο έχει μετρηθεί και αξιολογηθεί ως ένας δείκτης βιολογικών διαδικασιών, παθογενετικών καταστάσεων ή φαρμακευτικών αποκρίσεων απέναντι σε μια θεραπευτική παρέμβαση". Ωστόσο αρκετά αργότερα έγινε προσπάθεια να οριστεί ο όρος βιοδείκτης συγκεκριμένα στο πλαίσιο της οξειδοαναγωγικής βιολογίας και θεωρήθηκε μια βιολογική ποσότητα η οποία μπορεί με ακρίβεια να μετρηθεί και αυτή μπορεί να είναι "είτε ένα αντιοξειδωτικό μόριο (γλουταθειόνη, καταλάση) του οποίου η συγκέντρωση, η δραστηριότητα και/ή η δομή μπορούν να τροποποιηθούν αν αλληλεπιδράσουν με κάποια δραστική μορφή είτε το αποτέλεσμα των δραστικών μορφών στα βιομόρια (πρωτεϊνικά καρβονύλια, μαλονδιαλδεΐδη) είτε και οι ίδιες οι δραστικές μορφές" (Veskoukis et al., 2019).

1.8 Ξενοβιοτικά

Οι άνθρωποι σήμερα εκτίθενται καθημερινά σε διάφορες χημικές ουσίες μέσω της εισπνοής, της δερματικής επαφής με αυτές, μέσω της κατανάλωσης φαγητού και ποτών. Πρόκειται για ξενοβιοτικές ουσίες που δεν υπάρχουν φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό και οι οποίες εντοπίζονται στα πλαστικά ή σε άλλα βιομηχανικά προϊόντα, στη γεωργία σαν προϊόντα προστασίας των φυτών όπως τα εντομοκτόνα, στην παραγωγή, στην αποθήκευση αλλά και στην κατανάλωση τροφίμων και ποτών σαν συντηρητικά κτλ. Όσον αφορά τα εντομοκτόνα γνωρίζουμε ότι είναι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται κατά κόρον στην γεωργία και σε άλλους τομείς της βιομηχανίας με αποτέλεσμα οι άνθρωποι να έρχονται σε επαφή μαζί τους τόσο στο εργασιακό τους περιβάλλον όσο και μέσω κατανάλωσης φυτικών και ζωικών προϊόντων. Έχει αποδειχθεί επίσης, ότι τα εντομοκτόνα προκαλούν υψηλά επίπεδα τοξικότητας και κρίνονται επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία. Αυτό που μοιάζει ενδιαφέρον όμως, είναι το γεγονός ότι πρόσφατα έγιναν μελέτες που αναφέρονται στη βιοσυσσώρευση τους τόσο στους ζωικούς όσο και στους ιστούς του ανθρώπινου σώματος (Tsatsakis et al., 2017). Η βιοσυσσώρευσή τους τα συσχετίζει με σοβαρές παθολογικές καταστάσεις καθώς μοιάζουν να καταστρέφουν τη νεφρική (Georgiadis et al., 2018a) και την καρδιακή (Georgiadis et al., 2018b) λειτουργία, να εμπλέκονται στον καρκίνο (Gangemi et al., 2016), στην αμυοτροφική σκλήρυνση (Vinceti et al., 2017; Dardiotis et al., 2018) και γενικότερα σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Baltazar et al., 2014). Επιπλέον έχουν χαρακτηριστεί και ως ενδογενείς διαταράκτες διότι μπορούν να συσχετιστούν με την εκδήλωση παχυσαρκίας (Petraakis et al., 2017) και ουρογεννητικών ανωμαλιών (Michalakis et al., 2014; Kalliora et al., 2018) τα οποία φαίνονται να επηρεάζουν την ανδρική γονιμότητα (Mehrour et al., 2014) και τη φυσιολογική εμβρυακή ανάπτυξη (Koutroulakis et al., 2014). Το 2016 η ΕΕ ξεκίνησε ένα συντονισμένο πρόγραμμα ελέγχου στο οποίο πάρθηκαν και αναλύθηκαν 165 εντομοκτόνα εκ των οποίων τα 157 βρέθηκαν σε τροφές φυτικής προέλευσης και τα υπόλοιπα 22 σε τροφές ζωικής προέλευσης (EFSA, 2018). Πέρα από τα εντομοκτόνα, όμως, τις τελευταίες δεκαετίες ολοένα και

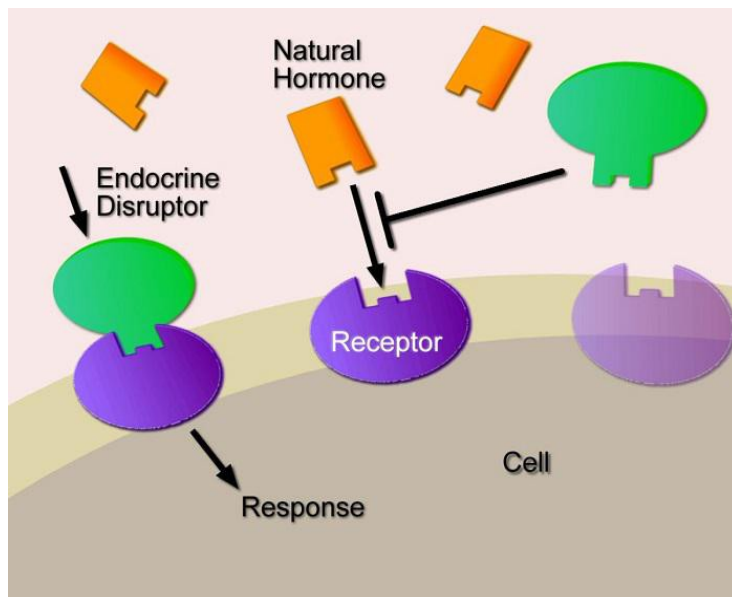
αυξάνονται οι προστιθέμενες ουσίες στις τροφές είτε πρόκειται για γλυκαντικές ουσίες είτε για σταθεροποιητές είτε για αρωματικές ουσίες ή για συντηρητικά που βοηθούν την αποθήκευση και τη μεταφορά των τροφίμων, γεγονός που επιτείνει την ανάγκη για περαιτέρω μελέτες της τοξικότητας τους μιας και οι άνθρωποι εκτίθενται σε αυτές στο νερό που πίνουν, στη τροφή τους αλλά και μέσω άμεσης επαφής (Martyn et al., 2016; Zhang et al., 2016). Στο πλαίσιο αυτό η ΕΕ προκειμένου να θέσει τα όρια πάνω από τα οποία μια χημική ουσία μπορεί να θεωρηθεί τοξική θέσπισε τους όρους ADI (acceptable daily intake) και TDI (tolerable daily intake). Η μεν ADI είναι η ασφαλής δόση της ουσίας που μπορεί να λαμβάνεται καθημερινά χωρίς να προκαλέσει κάποιο πρόβλημα στον οργανισμό, η δε TDI αποτελεί την ανεκτή δόση της ουσίας που μπορεί να παρέχεται καθημερινά και είναι στο όριο πρόκλησης τοξικότητας στον άνθρωπο. Με τους όρους αυτούς, ωστόσο, καλύπτονται τα όρια τοξικότητας που αφορούν μόνο μια ουσία μεμονωμένα και όχι την τοξικότητα της ουσίας αυτής σαν μέρος ενός μίγματος. Το γεγονός αυτό μπορεί να επηρεάσει αρκετά, καθώς αν το άτομο καθημερινά έρχεται σε επαφή με ένα μείγμα και όχι με την ουσία μεμονωμένα τότε δεν μπορεί να καθοριστεί η τοξικότητά της (Tsatsakis et al., 2019a; Goumenou and Tsatsakis, 2019). Σύμφωνα με μελέτες, ένα ξενοβιοτικό αν χορηγηθεί σε πολύ χαμηλές δόσεις μπορεί να μην προκαλέσει κάποιο τοξικό αποτέλεσμα. Αν όμως χορηγηθεί στις ίδιες δόσεις σαν μέρος ενός μίγματος, τότε το αποτέλεσμα αυτό μπορεί και να μην ισχύει (Kostoff et al., 2018). Τέλος, πέρα από τη δόση κρίσιμο ρόλο στην έκφραση τοξικότητας αποτελεί και ο χρόνος έκθεσης στην συγκεκριμένη ουσία (Tsatsakis et al., 2019a; Dekant and Colnot., 2013; Fountoucidou et al., 2019).

1.9 Ενδοκρινείς διαταράκτες

Πρόκειται για ουσίες εξωγενούς προέλευσης οι οποίες μπορεί να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στο ενδοκρινικό σύστημα αν βρίσκονται σε συγκεκριμένες δόσεις. Ο όρος ενδοκρινής διαταράκτης (endocrine disruptor, EDC) αναφέρεται σε κάθε παράγοντα που παρεμποδίζει τη σύνθεση, την έκκριση και τη μεταφορά ορμονών ή έχει άλλες δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία ενός οργανισμού και/ή των απογόνων του. Η έκθεση στους ενδοκρινείς διαταράκτες μπορεί να συμβεί μέσω του πλακούντα, του μητρικού γάλακτος, της αναπνοής, της κατάποσης ή και μέσω διαδερμικής επαφής και μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση του μεταβολισμού και της ισορροπίας στεροειδών ορμονών αλλάζοντας την διαδικασία σύνθεσής τους ή και διάσπασής τους. Ανάμεσα σε αυτές τις ορμόνες συμπεριλαμβάνονται η FSH, η LH, η τεστοστερόνη ή άλλες που επηρεάζουν τη φυσιολογία των γαμετών, τη γονιμότητα, το αποτέλεσμα της κύησης κτλ. Οι EDCs μιμούνται (εν μέρει ή ολικώς) τις φυσικά απαντώμενες ορμόνες στο σώμα, όπως τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα και τις ορμόνες του θυρεοειδούς, προκαλώντας δυνητικά υπερδιέγερση. Επίσης, οι EDCs λειτουργούν ως ανταγωνιστές των ορμονών, καθότι δεσμεύονται στους υποδοχείς των ενδογενών ορμονών εντός του κυττάρου. Έτσι, η φυσιολογική ενδογενής ορμόνη δεν μπορεί να δεσμευτεί στους υποδοχείς της και δεν επιτελείται η σηματοδότηση (Εικόνα 9). Σήμερα γνωρίζουμε ότι βιομηχανικά προϊόντα, εντομοκτόνα, πλαστικοποιητές, πλαστικά προϊόντα καθημερινής χρήσης, φυτοοιστρογόνα, βαρέα μέταλλα κ.ά. μπορούν να παίξουν το ρόλο των διαταρακτών (Tsatsakis et al., 2017).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα μείγμα 7 ενδοκρινικών διαταρακτών. Το μείγμα αποτελούνταν από 1 ζιζανιοκτόνο, 4 συντηρητικά τροφίμων ή προϊόντα του καθημερινού τρόπου ζωής, καθώς και από 2 συνθετικά συστατικά. Ειδικότερα, στην πρώτη κατηγορία υπάγεται το χημικό γλυφοσάτη (glyphosate). Στη δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται τα χημικά μεθυλ παραβένιο (methylparaben, MePB), βουτυλ-παραβένιο (butylparaben, BuPB), προπυλ-παραβένιο (propylparaben, PrPB) και τρικλοζάνη (triclosan, TCS). Τέλος, στην τρίτη κατηγορία ανήκουν το συνθετικό συστατικό διφαινόλη Α (bisphenol A, BPA) και φθαλικός δι-(2-αιθυλοεξυλο) εστέρας (di-2 ethylhexylphthalate, DEHP). Επίσης, αξιολογήθηκε η επίδραση του εντομοκτόνου roundup,

καθώς και του ενεργού συστατικού του, γλυφοσάτη.



Εικόνα 9: Φυσιολογική ενδοκρινική σηματοδότηση και μηχανισμοί δράσης ενδοκρινικών διαταρακτών

1.9.1 Διφαινόλη Α (BPA)

Η διφαινόλη Α (4,4'-διϋδροξυ-2,2-διφαινυλοπροπάνιο) είναι μια οργανική συνθετική ένωση της ομάδας των φαινολών, η οποία παράγεται με την αντίδραση φαινόλης με ακετόνη, παρουσία μίας ισχυρά όξινης ιοντοανταλλακτικής ρητίνης ως καταλύτη (Mikołajewska et al., 2015). Είναι πρόδρομος πολλών χημικών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία και χρησιμοποιείται ευρύτατα στη παραγωγή διάφορων προϊόντων όπως πολυανθρακικά πλαστικά, θερμικό χαρτί κτλ (Vandenberg et al., 2007). Το BPA είναι δομικά όμοιο με την διέθυλστυλβεστρόλη (DES) και έχει οιστρογονικό χαρακτήρα, ωστόσο μοιάζει να είναι πιο αδύναμο από αυτά (Fang et al., 2000; Rochester, 2013). Ο αδύναμος οιστρογονικός χαρακτήρας του BPA μπορεί να μεταβολιστεί σε BPA γλυκουρονίδιο (BPAG) ή BPA θειϊκό άλας (BPAS) και να απομακρυνθεί μέσω της ούρησης (Domoradzki et al., 2004; Volkel et al., 2002). Το ελεύθερο BPA κυκλοποιείται στο σώμα (Vandenberg et al., 2012a, Vandenberg et al., 2013) και ακόμα και σε χαμηλές δόσεις μπορεί να λειτουργήσει σαν ενδοκρινής διαταράκτης. Το BPA προσδέεται και ενεργοποιεί οιστρογονικούς υποδοχείς α και β (Marino et al., 2012, Welshons et al., 2006, Wetherill et al., 2007). Όταν προσδεθεί στους υποδοχείς αυτούς αλλάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους και τροποποιεί τις μεταγραφικές τους δραστηριότητες παρότι έχει μικρότερη συγγένεια για αυτούς από την οιστραδιόλη ή από άλλα οιστρογόνα που δεν παράγονται στον οργανισμό (Acconcia et al., 2015, Ascenzi et al., 2006, Bolli et al., 2010, Bolli et al., 2008, Marino et al., 2012, Singleton et al., 2006, Wetherill et al., 2007).

Ενώ η πλειοψηφία του BPA μετατρέπεται σε λιγότερο τοξικές μορφές BPAG & BPAS, το εναπομείναν κομμάτι του ενεργοποιεί την παραγωγή ROS τόσο από ενζυμικές όσο και από μη ενζυμικές αντιδράσεις σχηματισμού ρίζας φαινοξυλίου (Atkinson and Roy, 1995a, Babu et al., 2013, Sakuma et al., 2010, Yoshida et al., 2001). Οι ROS που παράγονται από τις μεταβολικές διεργασίες του BPA μπορεί να υπερβαίνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου και έτσι να διαταράσσεται η οξειδοαναγωγική ομοιόστασή του ή να αυξάνονται οι δραστικές μορφές που παράγονται από την αλυσίδα ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων, από τις NADPH οξειδάσες, τις

οξειδάσες της ξανθίνης ή από το κυτόχρωμα P450 (Valko et al., 2007). Μόρια-εξουδετερωτές των ελευθέρων ριζών όπως η GSH, το ασκορβικό οξύ, οι θειορεδοξίνες και η α-τοκοφερόλη ή ένζυμα όπως η δισμουτάση του σουπεροξειδίου, η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης παίζουν σημαντικό ρόλο στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις εντός του κυττάρου. Οι συγκεντρώσεις των μορίων και τα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω ενζύμων καθορίζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου. Μελέτες έδειξαν ότι η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις BPA οδηγούν σε ελαφρά μείωση της γλουταθειόνης και παρατηρούμενη αύξηση των ROS.

Μελέτες στις οποίες χορηγήθηκαν διαφορετικές δόσεις BPA (0,1, 1, 10, 50 mg / kg /ημέρα) έδειξαν ότι ανεξαρτήτου δόσης το BPA μείωσε σημαντικά τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα διαφόρων ιστών και οργάνων των ζώων συμπεριλαμβανομένου του παγκρέατος, του ήπατος και των όρχεων (Hassan et al., 2012, Kalb et al., 2016, Moghaddam et al., 2015) ενώ μείωσε και την δραστηριότητα ενζύμων όπως η SOD, η CAT και η GPx στον εγκέφαλο, στο ήπαρ, στους νεφρούς, στο πάγκρεας, στους όρχεις και στα σπερματικά κύτταρα (Aydogan et al., 2008, Bindhumol et al., 2003, Chitra et al., 2003, Hassan et al., 2012, Jain et al., 2011, Kabuto et al., 2004, Kabuto et al., 2003, Kalb et al., 2016, Moghaddam et al., 2015, Moon et al., 2012, Tiwari et al., 2012, Wu et al., 2013). Επιπλέον, τα επίπεδα των TBARS έδειξαν να αυξάνονται στο ήπαρ και στους όρχεις μετά την έκθεση σε BPA (Bindhumol et al., 2003, Kabuto et al., 2003, Kalb et al., 2016, Wu et al., 2013). Η παρατηρούμενη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κυττάρων μπορεί να συσχετιστεί με την παραγωγή ROS που πυροδοτείται από το BPA και οι οποίες οδηγούν σε καταστροφή κυτταρικά μακρομόρια, προκαλούν λύση των αλυσίδων και έλλειψη βάσεων στο DNA γεγονότα που ενισχύονται περαιτέρω από την εξασθένηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Επιπλέον, μελέτες δείχνουν πως δόσεις του BPA σε επίπεδο mM είναι ικανές να εξαντλήσουν το ενδοκυτταρικό ATP εμποδίζοντας τη συνδεόμενη με NAD- & FAD- αναπνευστική και ασύζευκτη οξειδωτική φωσφορυλίωση (Nakagawa and Tayama, 2000). Τέλος, έχει επίσης φανεί ότι nM και μM δόσεις του BPA είναι ικανές να συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων και να προκαλούν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Chepelev et al., 2013, Ooe et al., 2005, Pfeifer et al., 2015).

Μελέτες που έγιναν στον άνθρωπο αναφέρουν ότι το BPA επηρεάζει τη γονιμότητα στις γυναίκες, προκαλεί σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και ενδομητρίωση (Kandaraki et al., 2011; Caserta et al., 2014; Souter et al., 2013). Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας 2002-2012 έγιναν μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι άτομα που είχαν υποστεί έκθεση σε υψηλές δόσεις BPA (το οποίο εμφανιζόταν τόσο στο πλάσμα όσο και στα ούρα τους) εμφάνιζαν φτωχή ανταπόκριση ωοθηκών, μειωμένο αριθμό ώριμων και γονιμοποιημένων ωοκυττάρων, μειωμένη πιθανότητα γονιμοποίησης ακόμα και υπογονιμότητα (Ehrlich et al., 2012a,b; Mok-Lin et al., 2010; Bloom et al., 2011; Fujimoto et al., 2011; Ehrlich et al., 2012b; Caserta et al., 2013). Επιπλέον η συγκέντρωση της φυλετικής ορμόνης προλακτίνης εμφάνιζε υψηλότερα επίπεδα σε γυναίκες που είχαν εκτεθεί στο BPA. Πέραν όμως των ίδιων των γυναικών που δείχνουν να επηρεάζονται αισθητά, το BPA επηρεάζει και το βάρος του εμβρύου, οδηγεί σε πρόωρο τοκετό ή ακόμα και σε αποβολή (Sugiura Ogasawara et al., 2005; Philippat et al., 2012). Τέλος, επηρεάζει και τη συγκέντρωση της τεστοστερόνης στο πλάσμα ανδρών αλλά και γυναικών. Η εμφάνισή του στα ούρα δείχνει να συσχετίζεται με μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων, αλλαγή της μορφολογίας τους, της κίνησης τους αλλά και καταστροφή του DNA που περιέχουν (Meeker et al., 2010).

1.9.2 Γλυφοσάτη & Roundup

Η γλυφοσάτη (N-φωσφονομεθυλ-γλυκίνη) είναι ένα ζιζανιοκτόνο που χρησιμοποιείται για την καταστροφή των αγριοχόρτων σε καλλιέργειες αραβόσιτου, σόγιας και ρυζιού (Smith & Oehme, 1992; Coutinho et al., 2005). Η γλυφοσάτη επεμβαίνει στο μονοπάτι shikimate (παράγει τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και θρυπτοφάνη στα φυτά και στους μικροοργανισμούς αλλά όχι και στα θηλαστικά (συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων), και το μπλοκάρει, παρεμποδίζοντας το ένζυμο EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) το οποίο καταλύει την αντίδραση του S3P και του phosphoenolpyruvate σε EPSP οδηγώντας σε ανεπάρκεια πρωτεϊνών και τελικά θάνατο του φυτού (Funke et al., 2006).

Το Roundup είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο προϊόν το οποίο εμπεριέχει τη γλυφοσάτη και έχει πολλάκις χαρακτηριστεί ως εξαιρετικά επικίνδυνο για το περιβάλλον. Το Roundup περιέχει ένα μείγμα από 15% πολυοξυαιθυλενική αμίνη (POEA) με άλλες επιφανειοδραστικές ουσίες που δεν έχουν ακόμα χαρακτηριστεί (Howe et al., 2004). Αποτελέσματα ερευνών καταδεικνύουν πως το glyphosate-Roundup μπορεί να επηρεάσει τον ηπατικό μεταβολισμό, να προκαλέσει σημαντικές αιματολογικές τροποποιήσεις και οξειδωτική καταστροφή στον ηπατικό ιστό αφού οδηγεί σε σημαντική αύξηση των επιπέδων των ενζύμων (ALT, AST, γ-GT) τόσο σε αρσενικούς όσο και σε θηλυκούς αρουραίους.

Ωστόσο είναι αρκετά δύσκολο να διαχωριστούν οι μηχανισμοί τοξικότητας των σκευασμάτων που εμπεριέχουν γλυφοσάτη καθώς η μόλυνση δεν προκαλείται από την ίδια την ενεργή ουσία αλλά από τις διάφορες ουσίες του μείγματός του εκάστοτε ζιζανιοκτόνου. Άλλωστε το POEA προκαλεί μεγαλύτερη τοξικότητα όχι μόνο από την γλυφοσάτη αλλά ακόμα και από το ίδιο το σύμπλοκο ουσιών π.χ roundup.

Το glyphosate-roundup έχει την ικανότητα να προκαλέσει οξειδωτικό στρες ακόμα και σε χαμηλές δόσεις (50 mg/kg) αφού οδηγεί τόσο σε λιπιδική υπεροξείδωση, σε μειωμένα επίπεδα μη πρωτεϊνικών θιολών του ηπατικού ιστού και παραγωγή ROS μια διαδικασία που μάλλον συσχετίζεται με την υψηλή δραστηριότητα των κασπασών 3 & 7 υπεύθυνες για την κυτταρική απόπτωση (Lioi et al., 1998; Astiz et al., 2009). Σύμφωνα με μελέτες, η λιπιδική υπεροξείδωση μπορεί να συμβεί μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης των οργανοφωσφορικών με την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Hazarika et al., 2003, Kavitha and Rao., 2007). Ωστόσο, η χορήγηση των αντιοξειδωτικών βιταμινών C & E (100μM) δείχνει να προστατεύει από τον κυτταρικό θάνατο και να μειώνει την λιπιδική υπεροξείδωση που προκαλεί το glyphosate-roundup (Gehin et al., 2006).

Έρευνες που διεξήχθησαν πρόσφατα σε επίμυες που εγκυμονούσαν έδειξαν ότι έπειτα από μακροχρόνια έκθεση στο χημικό, παρατηρούνταν ανεπάρκεια στην ανάπτυξη των οστών στο έμβρυο (Dallegrave., 2003), αλλαγές στο κυτταρικό μεταβολισμό (Marc et al., 2004a; 2004b), δερματολογικές αλλοιώσεις (Amerio et al., 2004) και αυξημένα ποσοστά εμφάνισης λεμφώματος non-Hodgkin's (De Ross et al., 2003). Επιπλέον το χημικό προκαλούσε σημαντικές ηπατικές αλλαγές και ρινική αιμορραγία (Benedetti et al., 2004; Neiva et al., 2010). Τέλος βρέθηκε και μειωμένη δραστηριότητα του κυτοχρώματος P-450 και της ηπατικής μονοοξυγενάσης στους επίμυες έπειτα από χορήγηση glyphosate-roundup®. Μελέτες σε επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε δόση 500 mg/kg σωματικού βάρους έδειξαν σοβαρές αιματολογικές αλλαγές, πρόκληση ανεμίας και μείωση του αριθμού των ερυθροκυττάρων γεγονός το οποίο μπορεί άμεσα να συσχετιστεί με την ύπαρξη POEA στο χημικό.

Επιπρόσθετα άλλες μελέτες που διεξήχθησαν σε υδρόβιους οργανισμούς αυτή τη φορά επιβεβαίωσαν την υπόθεση ότι οι τοξικές επιδράσεις της γλυφοσάτης σχετίζονται με την παραγωγή ROS. Το ζιζανιοκτόνο βρέθηκε ότι προκαλεί αυξημένη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων GPx, GR, SOD, CAT και GST με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων της GSH και αυξημένη λιπιδική υπεροξείδωση (Contardo-Jara et al., 2009; Lushchak et al., 2009; Guilherme et al., 2010; Puértolas et al., 2010; Ortiz-Ordoñez et al., 2011).

Από την άλλη μεριά όσον αφορά τον άνθρωπο, η οξεία και η χρόνια τοξικότητα που προκαλείται από χημικά που περιέχουν γλυφosatη δείχνει να είναι δόσοεξαρτώμενη. Έπειτα από έκθεση του δέρματος σε αυτά έχουν γίνει αναφορές για πρόκληση ερεθισμών και δερματίτιδα ενώ σπανιότερα και για εγκαύματα. Επιπλέον, αν το χημικό εισέλθει στον οργανισμό έπειτα από ψεκάσμο ή εισπνοή φαίνεται να προκαλεί τόσο ρινική δυσφορία, ανεπιθύμητη γεύση στο στόμα, τσούξιμο και ενόχληση ακόμα και στον λάρυγγα. Ωστόσο, θάνατος από τέτοιου είδους σκευάσματα που εμπεριέχουν γλυφosatη έχουν αναφερθεί μονάχα σε περιπτώσεις οικειοθελούς υπερέκθεσης στο χημικό. Περιπτώσεις αναφέρουν ότι κατάποση 85-200 ml roundup έχουν οδηγήσει στο θάνατο τον άνθρωπο μέσα σε λίγες ώρες ενώ άλλες αναφέρουν ότι ακόμα και ποσότητες μεγαλύτερες των 500 ml μπορούν να προκαλέσουν μέτρια ή ακόμα και ήπια συμπτώματα (Bradberry SM.,2004).

1.9.3 Παραβένια

Τα παραβένια αποτελούν μια κατηγορία ευρέως χρησιμοποιούμενων συντηρητικών τόσο σε καλλυντικά όσο και σε φαρμακευτικά προϊόντα από το 1930. Χημικά ανήκουν σε μια κατηγορία αλκυλεστέρων του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος (γνωστού και ως 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ). Τα παραβένια είναι παρόντα και στη φύση (π.χ σε blueberries, cloudberry, yellow passion fruit) αλλά σε πολύ μικρές ποσότητες (Cashman A L et al.,2005). Όσον αφορά τα μέθυλ και πρόπυλ parabens γνωρίζουμε ότι συχνά χρησιμοποιούνται μαζί λόγω της συνέργιας που εμφανίζουν (Pozzo & Pastori, 1996; Eriksson et al., 2008; Nunez et al., 2008)

Τα παραβένια είναι δραστικά εναντίον μιας πληθώρας μικροοργανισμών. Παρ'όλα αυτά η αντιβακτηριακή τους δράση δεν έχει ακόμα κατανοηθεί πλήρως. Πιστεύεται ωστόσο ότι δρουν κυρίως εμποδίζοντας μεμβρανικές διαδικασίες μεταφοράς και πυροδοτώντας μια “διαρροή” ενδοκυτταρικών συστατικών (Freese E et al.,1973) ή παρεμποδίζοντας τη σύνθεση του DNA & του RNA (Nes I F and T Eklund., 1983) ή κάποιων ενζύμων “κλειδιά”, όπως οι ΑΤΡάσες και οι φωσφοτρανσφεράσες, σε κάποια βακτηριακά είδη.

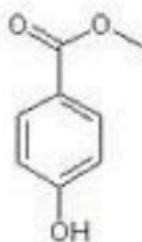
Επιπλέον η εξαιρετικά υψηλή λιπιδιακή τους διαλυτότητα διαταράσσει τη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα της μεμβράνης των κυττάρων με αποτέλεσμα τα παραβένια να επεμβαίνουν στις βακτηριακές διαδικασίες μεταφοράς συστατικών και πιθανόν στη διαρροή ενδοκυτταρικών συστατικών (Valkova N.,2001). Τα παραβένια πιστεύεται ότι πρώτα απορροφώνται από το έντερο, έπειτα ακολουθεί υδρόλυση σε πάρα-ύδροξυβενζοϊκό οξύ (PHBA) στο ήπαρ και τέλος εκκρίνονται στα ούρα (Dabre P.,2004 ,Shaw J.,2009). Άξιο να αναφερθεί ότι το propylparaben έχει βρεθεί να είναι πιο δραστικό και οιστρογονικό σε πολλά είδη βακτηρίων σε σχέση με τα υπόλοιπα (Daughton CG.,1999). Πολλές μελέτες αναφέρουν πως υπάρχει συσχέτιση του μεγέθους της αλυσίδας των αλκυλίων των παραβενίων και της τοξικότητάς τους. Όσο η αλυσίδα μεγαλώνει τόσο η τοξικότητα αυξάνεται, κάτι που θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός πως χημικά με υψηλή λιποφιλικότητα έχουν μεγαλύτερη δυναμική να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες, οδηγώντας σε υψηλότερη τοξικότητα (Gao et al., 2016).

Μελέτες σε είδη ζώων πρότειναν ότι ένας πιθανός μηχανισμός της τοξικής δράσης των παραβενίων σε ασπόνδυλα και ψάρια θα μπορούσε να είναι η νάρκωση (μη ειδική διαταραχή της μεμβρανικής ακεραιότητας και υποκυτταρική δράση του χημικού) (Escher and Hermens, 2002). Η νάρκωση μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της κινητικότητας των οργανισμών ή ακόμα και θάνατο του ζώου. Επιπλέον τα παραβένια έχουν μεγάλη πιθανότητα να προκαλέσουν οιστρογονικές αποκρίσεις και οξειδωτικό στρες σε υδρόβιους οργανισμούς σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες αυτών που ως γνωστόν προκαλούν οξεία τοξικότητα (Brausch and Rand, 2011; Comeche et al., 2017; Yamamoto et al., 2011). Έρευνες στη Nile tilapia έδειξαν πως τα παραβένια προκάλεσαν μετατροπές στην ενζυμική και μη ενζυμική αντιοξειδωτική δραστηριότητα στα βράγχια και στο ήπαρ του ζώου ώστε να εξισορροπήσει με κάποιο τρόπο η παραγωγή ROS που προκλήθηκε σε

αυτά. Επίσης υπήρξε αύξηση στα επίπεδα των ενζύμων SOD, GPx, GR & GSH-t ως μηχανισμός προστασίας του ζώου, ενώ δεν φάνηκε κανένα ίχνος λιπιδικής υπεροξειδωσής στους ιστούς που αναλύθηκαν.

Εξαιτίας της χαμηλής τους τοξικότητας αλλά και της αντιμικροβιακής τους δράσης τα παραβένια χρησιμοποιούνταν στο φαγητό για πάνω από 60 χρόνια. Τα παραβένια αυτά μεταβολίζονται ολοκληρωτικά καθώς ένζυμα του πεπτικού σωλήνα τα διασπούν σε μικρότερα μόρια τα οποία αποβάλλονται με τα ούρα (Lakeram M.,2007). Από την άλλη τα παραβένια που περιέχονται σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας απορροφώνται από το δέρμα και μιας και τα ένζυμα του δέρματος δεν μπορούν να τα επεξεργαστούν ολοκληρωτικά, κάποια τείνουν να παραμένουν στους ιστούς (Dabre P.,2004, Ishiwatari S.,2007). Είναι γνωστό ότι οι γυναίκες οι οποίες χρησιμοποιούν τέτοια προϊόντα σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό από τους άντρες εμφανίζουν 4 φορές μεγαλύτερα επίπεδα παραβενίων στα ούρα τους. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι η τοξικότητα των παραβενίων μπορεί να συνδέεται με μιτοχονδριακή ανεπάρκεια, που μπορεί να προκληθεί λόγω αλλαγής της μεμβρανικής διαπερατότητας και να συνοδεύεται από αποπόλωση των μιτοχονδρίων και μείωση του κυτταρικού ATP. Τέλος, έχει βρεθεί ότι έπειτα από δερματική έκθεση σε αυτά μπορεί να προκληθεί τοπική δερματίτιδα σε κάποιους ανθρώπους ή ακόμα και διαταραχή του ενδοκρινικού συστήματος.

1.9.3.α Μεθυλ-παραβένιο (MePB)



Methylparaben

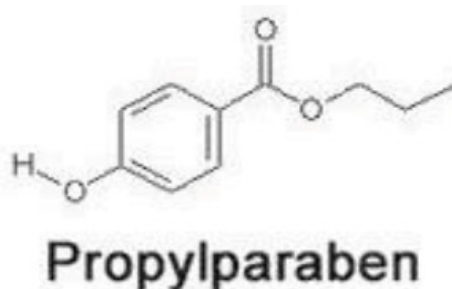
Το μέθυλ-παραβένιο είναι ένας μεθυλεστέρας του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος που χρησιμοποιείται ευρύτατα ως συντηρητικό σε καλλυντικά, τρόφιμα και φάρμακα (Soni et al., 2002). Γνωρίζεται ότι είναι το λιγότερο δραστικό από όλα τα υπόλοιπα παραβένια αφού η αντιμικροβιακή δράση αυξάνεται με την αύξηση του μήκους της αλυσίδας. Παρ'όλα αυτά η δράση του μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά αν συνδυαστεί με άλλα παραβένια. Όπως και τα υπόλοιπα έτσι και αυτό έχει ασθενή οιστρογονική δράση η οποία in vivo μειώνεται κατά τρεις τάξεις μεγέθους σε σχέση με την in vitro δράση (Monneret, 2017).

Το MP απορροφάται γρήγορα και ολοκληρωτικά από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Υδρολύεται σε p-υδροξυβενζοϊκό οξύ από τις εστεράσες και έπειτα συζευγνύεται με p-hydroxyhippuric οξύ, αιθέρα και άλλα αιθερικά γλυκουρονίδια και αιθερικάθειικά άλατα (Soni MG.,2002). Στα δερματικά κύτταρα μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες έπειτα από τη μετατροπή του σε συζεύγματα γλουταθειόνης-υδροκινόνης (Nishizawa C., 2006) Επιπλέον έχει δειχθεί πως η λιπιδική υπεροξειδωσής αυξάνεται σημαντικά σε ανθρώπινα δερματικά κερατινοκύτταρα τα οποία έχουν εκτεθεί σε MP μόνο έπειτα από έκθεση σε ακτινοβολία UVB (Handa O., 2006).

Η ερευνητική ομάδα των (Popa et al., 2011) μελέτησε την επίδραση της διφαινόλης A (50

mg/kg) και του MePB (250 mg/kg), ξεχωριστά και σε συνδυασμό, στην πρόκληση οξειδωτικού στρες σε θηλυκούς επίμυες της φυλής Wistar για 10 ημέρες και διαπίστωσε την επαγωγή οξειδωτικού στρες λόγω της αυξημένης λιπιδικής υπεροξειδωσης σε όλες τις περιπτώσεις. Επιπλέον, η έκθεση αρσενικών ψαριών του είδους *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) σε MePB (4 mg/L), για 6 και 12 ημέρες, προκάλεσε αύξηση της δράσης της CAT και μείωση της ολικής GSH στο ήπαρ στις 6 ημέρες, ενώ στις 12 ημέρες προκάλεσε αύξηση της δράσης της SOD, της GR και της ολικής GSH. Από την άλλη, προκάλεσε αύξηση της δράσης της GPx στα βράγχια στις 6 ημέρες (Silva et al., 2018).

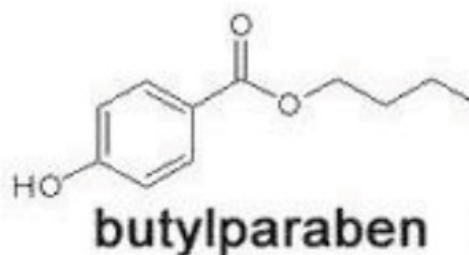
1.9.3.β Προπυλ-παραβένιο (ProPB)



Το πρόπυλ-παραβένιο είναι ένας εστέρας του p υδροξυβενζοϊκού οξέος, ο οποίος παράγεται από την εστεροποίηση του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος με τη n-προπανόλη, με τη χρήση ενός όξινου καταλύτη, όπως το θειικό οξύ και περίσσεια προπανόλης (Soni et al., 2001). Χρησιμοποιείται και αυτό ως αντιμικροβιακό συντηρητικό σε καλλυντικά, προϊόντα διατροφής και φαρμακευτικά σκευάσματα.

Παρά το γεγονός, ότι το PrPB θεωρείται πρακτικά ένα μη τοξικό συστατικό, ένας διαρκώς αυξανόμενος αριθμός μελετών υποδεικνύει την εμφάνιση πιθανών ανεπιθύμητων δράσεων από την χρόνια έκθεση σε αυτό. Έπειτα από έρευνες που διεξήχθησαν σε ηπατοκύτταρα επιμύων βρέθηκε πως το PB προκαλούσε σε αυτά μια τόσο βάσει συγκέντρωσης (0,5-2,0 mM) όσο και χρονοεξαρτώμενη θανάτωση των κυττάρων. Χορήγηση με 1 mM PB προκάλεσε μείωση του επιπέδου του ATP και του συνολικού περιεχομένου νουκλεοτιδίων αδερίνης μετά από 1-1,5 ώρα επώασης, ενώ μετά από 1,5 ώρα διαπιστώθηκε και μια σημαντική θανάτωση κυττάρων επίσης. Σε ένα δεύτερο χρόνο τα ίδια κύτταρα επώαστηκαν τόσο με PB όσο και με διαζινόνη (έναν αναστολέα εστερασών) γεγονός που επιτάχυνε τόσο τη θανάτωση των κυττάρων όσο και τη μείωση του κυτταρικού ATP και της ολικής αδερίνης. Η αιφνίδια εξάντληση του ATP οδήγησε σε μια ταυτόχρονη και παροδική αύξηση των επιπέδων του ADP & AMP στη πρώτη 1 ώρα, ενώ με τη πάροδο του χρόνου η συγκέντρωσή τους μειωνόταν σταθερά. Τέλος, άξιο να αναφερθεί είναι και το γεγονός ότι και τα επίπεδα της γλουταθειόνης δεν έμειναν ανεπηρέαστα αφού να μειώθηκαν ήδη από τη πρώτη 0,5 ώρα (Nakawaga Y., 1998).

1.9.3.γ Βουτυλ-παραβένιο



Το βούτυλ-παραβένιο, είναι επίσης ένας εστέρας του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος, ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως ως αντιμικροβιακό συντηρητικό σε καλλυντικά και φαρμακευτικά σκευάσματα, είτε μόνος του είτε σε συνδυασμό με άλλους εστέρες παραβενίων ή αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Έπειτα από μία *in vitro* μελέτη, οι επιστήμονες κατέληξαν στο συμπέρασμα πως το BP προκαλεί μείωση του ATP, της δεξαμενής αδενίνης του κυττάρου και μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης. Επιπλέον, έπειτα από στοματική χορήγηση BP για 30 μέρες φάνηκε μια σημαντική αύξηση των επιπέδων της μηλονικής διαλδεΐδης (του τελικού προϊόντος της υπεροξειδωσής των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων) είτε λόγω ενσωμάτωσης του ημίσεως της ποσότητας του BP στη μεμβράνη των κυττάρων είτε λόγω καταστολής του αντιοξειδωτικού συστήματος του κυττάρου μιας και το BP έχει φανεί πως οδηγεί σε αλλαγή της οξειδοαναγωγικής ικανότητας του κυττάρου να προκαλεί λιπιδική υπεροξειδωση οδηγώντας τελικά σε ηπατικό οξειδωτικό στρες. Άλλες έρευνες αναφέρουν ότι η χορήγηση του BP μειώνει αισθητά τα επίπεδα της GSH και της θειοακεταμίδης πιθανόν λόγω υπέρμετρης παραγωγής ελευθέρων ριζών. Πιθανολογείται, επίσης, ότι οι μειωμένες ενεργότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων προήλθαν λόγω του ότι το BP προκαλεί οξείδωση των πρωτεϊνών. Επιπλέον η αλληλεπίδραση των προϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσης με ενζυμικά μόρια οδηγεί σε αλλαγή των καταλοίπων ιστιδίνης και σε παραγωγή προϊόντων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Kwon H.Y.,2000).

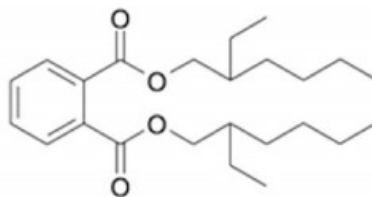
1.9.4 Τρικλοζάνη (Triclosan)

Η τρικλοζάνη είναι ένας διφαινυλικός αιθέρας με ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητά του να διαπερνά το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και να στοχεύει πολλαπλές θέσεις του κυτταροπλάσματος και της μεμβράνης (Russell et al.,2004). Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας όπως οδοντόκρεμες, στοματικά διαλύματα, αποσμητικά, σαπούνια, κρέμες αλλά μπορεί να βρεθεί ακόμα και σε υφάσματα, υγρά πιάτων, παιχνίδια κ.ά. (Bhargava & Leonard., 1996). Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι η τρικλοζάνη αλλάζει τα επίπεδα θυροξίνης στον ορό και μειώνει τα επίπεδα τεστοστερόνης αλλά και την δραστηριότητα συγκεκριμένων στερεοειδών ενζύμων. Επίσης, αναστέλλει τη σύνθεση των βακτηριακών λιπαρών οξέων, η οποία είναι πολύ σημαντική για την κυτταρική ανάπτυξη και λειτουργία, στο στάδιο της ενουλ-ACP αναγωγάσης (enoyl-acyl carrier protein reductase) (Zorrilla et al.,2009).

Η έκθεση μυδίων του είδους *Dreissena polymorpha* σε TCS (1nM, 2 nM & 3 nM), για 96 ώρες, από την ερευνητική ομάδα των (Binelli et al., 2010), οδήγησε σε αλλαγές στη δραστηριότητα των CAT, SOD και GPx στην υψηλότερη δόση, αλλά και της GST σε όλες τις δόσεις. Ακόμη, η ερευνητική ομάδα των (Lin et al., 2010) διαπίστωσε ότι η έκθεση σκωλήκων του είδους *Eisenia*

fetida σε TCS (1, 10, 50, 100, 300 mg/kg εδάφους) για 3 περιόδους έκθεσης (2, 7 & 14 ημέρες) προκάλεσε αύξηση της δράσης της CAT (100, 300 mg/kg εδάφους) στις 2 ημέρες, η οποία μειώθηκε στις 14 ημέρες, αύξηση της δράσης της GST στις 2 ημέρες (300 mg/kg εδάφους), η οποία μειώθηκε στις 14 ημέρες (100, 300 mg/kg εδάφους), αλλά και αύξηση των επιπέδων της MDA στις 7 (50, 100, 300 mg/kg εδάφους) και 14 ημέρες (100, 300 mg/kg εδάφους).

1.9.5 Φθαλικός δι-(2-αιθυλοεξυλο) εστέρας (DEHP)



Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)

Ο φθαλικός δι-(2-αιθυλοεξυλο) εστέρας (DEHP) συντίθεται από φθαλικό οξύ, το οποίο εστεροποιείται με 2-αιθυλοεξανόλη και χρησιμοποιείται, κατά κύριο λόγο, ως πλαστικοποιητής για την παραγωγή χλωριούχου πολυβινυλίου (PVC) (Erythropel et al., 2014; Koch et al., 2006). Επίσης, αποτελεί κύριο συστατικό σε επενδύσεις, τάπητες, ταπετσαρίες, περιβλήματα καλωδίων, ρουχισμό, συσκευασίες και παιχνίδια, ενώ βρίσκει εφαρμογές και σε πεδία εκτός του PVC, όπως σε απορρυπαντικά, βιομηχανικούς διαλύτες, παράγοντες διαβροχής ή λιπαντικά έλαια. Για πολλά χρόνια η επιστημονική κοινότητα υπέθετε πως ο DEHP είναι ιδιαίτερα καρκινογόνος για τους ανθρώπους. Πρόσφατα μέσω διαφόρων μελετών αξιολογήθηκε ξανά και έγινε σαφές ότι δεν είναι ορθή η ένταξή του στην λίστα των καρκινογόνων ουσιών. Στο πλαίσιο αυτό έγινε γνωστό ότι για δεκαετίες πιστευόταν ότι είναι ιδιαίτερα τοξικό και επηρεάζει την αναπαραγωγή (Thomas et al., 1984) χωρίς ωστόσο να μπορούν με σιγουριά να το εντάξουν σε αυτή την κατηγορία. Σήμερα είναι γνωστό ότι ο DEHP βλάπτει το αναπαραγωγικό σύστημα εξαιτίας του αντιανδρογονικού του χαρακτήρα (Gray et al., 2000) και για το λόγο αυτό πλέον θεωρείται ένα συστατικό που μειώνει τη γονιμότητα και μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα και να επηρεάσει την ανάπτυξη στον άνθρωπο (EC., 2001).

Ο DEHP, ο οποίος ανήκει στην τάξη των πολλαπλασιαστών υπεροξειδισωμάτων, φαίνεται ότι έχει ιδιότητες ενδοκρινικού διαταράκτη, ανταγωνιζόμενος τις επιδράσεις των φυλετικών ορμονών ή μεταβάλλοντας τις δράσεις των ενδογενών στεροειδών ορμονών, σε ζωικά μοντέλα (Latini et al., 2004). Η ερευνητική ομάδα των (Seo et al., 2004) διαπίστωσε ότι η χορήγηση DEHP με καθετήρα (50, 200, 1000 mg/kg) σε αρσενικούς επίμυες της φυλής Sprague-Dawley, για 14 ημέρες, προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων της MDA στο ήπαρ, αλλά και αύξηση των επιπέδων του 8-OHdG στο ηπατικό DNA, στη δόση των 1000 mg/kg. Επίσης, η ενδογαστρική χορήγηση DEHP (1000 mg/kg) με καθετήρα σε αρσενικούς επίμυες της φυλής Sprague-Dawley 3 εβδομάδων, για 10 ημέρες, προκάλεσε την επαγωγή οξειδωτικού στρες στον νεφρό, όπως προέκυψε από την σημαντική μείωση στις δράσεις των GPx και SOD, των επιπέδων της GSH, της περιεκτικότητας σεθειόλη, αλλά και από την σημαντική αύξηση των επιπέδων των TBARS (Erkekoglu et al., 2012). Τέλος, η επεξεργασία νευρικών βλαστικών κυττάρων μύος NE-4C με DEHP (5, 10 & 20 μM), προκάλεσε την επαγωγή οξειδωτικού στρες, μέσω της σημαντικής αύξησης

των επιπέδων της MDA (10 & 20 μ M), της σημαντικής μείωσης της GSH (5, 10 & 20 μ M), αλλά και της σημαντικής μείωσης της δράσης των SOD (10 & 20 μ M) και GPx (5, 10 & 20 μ M) (Wu et al., 2019).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Αποτελεί κοινή γνώση πλέον ότι σε κάθε πτυχή της καθημερινότητάς του ο άνθρωπος εκτίθεται σε μια πληθώρα χημικών ουσιών, μεμονωμένων ή σε μορφή μειγμάτων με άγνωστες κατά κύριο λόγο συνέπειες για την υγεία του. Προϊόντα καθημερινής φροντίδας, φάρμακα, τρόφιμα κ.ά. εμπεριέχονται στον τεράστιο κατάλογο των πηγών έκθεσης σε χημικές ουσίες σε δόσεις που πολλές φορές βρίσκονται γύρω ή και κάτω από τα ασφαλή όρια. Το ζήτημα αυτό έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία 4 χρόνια. Στο πλαίσιο αυτό είναι άξιο να τονιστεί ότι η παρουσία 2 ή περισσότερων χημικών ουσιών μπορεί να ασκεί συνεργιστική, συνδυαστική ή ανταγωνιστική δράση ενισχύοντας ή αναστέλλοντας μηχανισμούς προστασίας και πολλές φορές καταλήγοντας να αυξάνουν την τοξικότητα που θα ασκούσε στην αντίστοιχη περίπτωση κάθε χημικό μεμονωμένα. Η πλειονότητα των μελετών της βιβλιογραφίας έχει ασχοληθεί με τη μελέτη της επίδρασης των χημικών ατομικά σε υψηλές, μη ρεαλιστικές δόσεις. Οι έρευνες αυτές να μεν έχουν κατορθώσει να φωτίσουν την δράση των εκάστοτε ουσιών κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και δόσεις, ωστόσο δεν μπορούν να παρέχουν μια ολοκληρωμένη εικόνα για τα ποια είναι τα όρια ασφαλούς δόσης της ουσίας αυτής και των πολλαπλών κινδύνων που ενέχονται αν χορηγηθεί σαν συστατικό ενός μείγματος ή υπο στρεσογόνες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ήταν σημαντικό λοιπόν να διεξαχθούν μελέτες οι οποίες θα προσομοιώνουν τα πραγματικά σενάρια έκθεσης στην ουσία, σε δόσεις γύρω από την ADI (Tsatsakis et al., 2017).

Υπό το πρίσμα της αξιολόγησης του κινδύνου που ενέχει η μακροχρόνια έκθεση σε χαμηλές δόσεις χημικών μειγμάτων, από διαφορετικές πηγές, για την ανθρώπινη υγεία, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της μακροχρόνιας επίδρασης μείγματος ενδοκρινικών διαταρακτών, του εντομοκτόνου roundup και του ενεργού συστατικού του γλυφοσάτη, στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών κουνελιών χρησιμοποιώντας μια μπαταρία βιοδεικτών όπως είχε προταθεί (Veskoukis et al., 2019).

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πειραματόζωα

Για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 20 κλινικά υγιή κουνέλια ηλικίας 2-3 μηνών της φυλής New Zealand. Η χρήση των κουνελιών ως οργανισμού μοντέλου είναι ευρύτερα διαδεδομένη, καθότι παρουσιάζουν μια σειρά σημαντικών πλεονεκτημάτων. Αρχικά, είναι πολύ υπάκουα και μη επιθετικά και επομένως καθίσταται εύκολος ο χειρισμός και η παρατήρησή τους. Επίσης, η εκτροφή τους είναι οικονομική σε σύγκριση με το κόστος των μεγαλύτερων ζώων. Ακόμα, τα κουνέλια έχουν σύντομους ζωτικούς κύκλους (κύηση, γαλουχία και εφηβεία), ενώ εμπίπτουν στην κατηγορία των μικρών ζώων και ως εκ τούτου υπάγονται στην τοπική επιτροπή δεοντολογίας. Μάλιστα, η φυλή New Zealand προτιμάται συχνά για ερευνητικές δραστηριότητες λόγω της μειωμένης επιθετικότητας και των λιγότερων προβλημάτων υγείας σε σύγκριση με άλλες φυλές (Marpara et al., 2012). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 10 αρσενικά κουνέλια με μέσο βάρος 2,94 kg (κυμαινόμενο από 2,5 έως 3,25 kg) και 10 θηλυκά κουνέλια με μέσο βάρος 3,015 kg (κυμαινόμενο από 2,75 έως 3,3 kg). Η εκτροφή των κουνελιών πραγματοποιήθηκε σε ειδικό χώρο (ζωοκομείο), υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας (23-24°C) και σχετικής υγρασίας. Η θανάτωση των πειραματοζώων έγινε με χορήγηση του ενέσιμου διαλύματος Dolethal (1 ml/kg σωματικού βάρους). Όλες οι διαδικασίες ήταν σύμφωνες με την οδηγία 2010/63/EE της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για πειράματα σε ζώα.

3.2 Μείγματα ξеноβιοτικών

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χορηγήθηκε ένα μείγμα 7 ενδοκρινικών διαταρακτών σε δόσεις $1 \times \text{ADI}$ και $10 \times \text{ADI}$, γλυφοσάτη σε δόση $10 \times \text{ADI}$ και roundup σε δόση $10 \times \text{ADI}$, όπου ADI ορίζεται η αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (acceptable daily intake) εκφρασμένη σε mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα. Ειδικότερα, το μείγμα περιείχε γλυφοσάτη, μεθυλ-, βουτυλ- και προπυλ-παραβένιο, τρικλοζάνη, διφαινόλη Α και φθαλικό δι-(2-αιθυλοεξυλο) εστέρα. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA), η ADI για τη διφαινόλη Α καθορίζεται ως 0,004 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, για το βουτυλ-παραβένιο 0,5 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, για το μεθυλ- και το προπυλ-παραβένιο 5 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, για τους φθαλικούς εστέρες ως 0,05 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα και για τη γλυφοσάτη 0,5 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα (αντίστοιχα και για την εμπορική εκδοχή roundup). Τέλος, για την τρικλοζάνη η ADI καθορίστηκε από την κυβέρνηση του Καναδά ως 0,08 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι πειραματικές ομάδες, τα μείγματα και οι δόσεις που χορηγήθηκαν στην εκάστοτε πειραματική ομάδα.

Πειραματική ομάδα	Ξενοβιοτικά	Δόση (mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα) (* ADI)
1 (Ομάδα ελέγχου)	-	-
2 (Χαμηλή δόση)	Γλυφοσάτη	1 * 0,5
	Μεθυλ-παραβένιο	1 * 0,5
	Βουτυλ-παραβένιο	1 * 5
	Προπυλ-παραβένιο	1 * 5
	Διφαινόλη Α	1 * 0,004
	Τρικλοζάνη	1 * 0,08
	Φθαλικός δι-(2-αιθυλοαξυλο) εστέρας	1 * 0,05
3 (Υψηλή δόση)	Γλυφοσάτη	10 * 0,5
	Μεθυλ-παραβένιο	10 * 0,5
	Βουτυλ-παραβένιο	10 * 5
	Προπυλ-παραβένιο	10 * 5
	Διφαινόλη Α	10 * 0,004
	Τρικλοζάνη	10 * 0,08
	Φθαλικός δι-(2-αιθυλοαξυλο) εστέρας	10 * 0,05
4 (Υψηλή δόση)	Γλυφοσάτη	10 * 0,5
5 (Υψηλή δόση)	Roundup	10 * 0,5

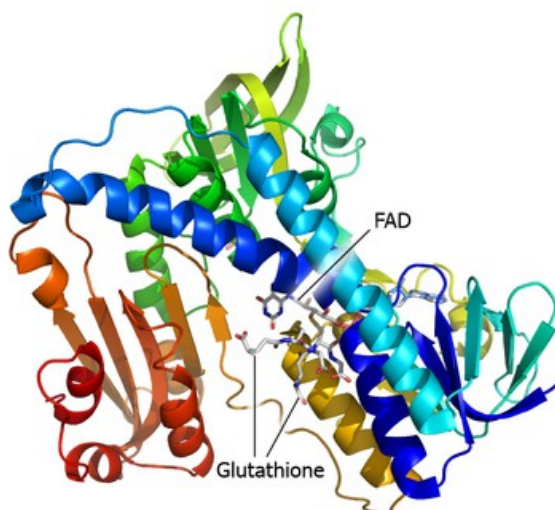
3.3 Πειραματικός σχεδιασμός

Τα πειραματόζωα της μελέτης χωρίστηκαν τυχαία σε 5 ομάδες και η εκάστοτε ομάδα περιελάμβανε 2 αρσενικά και 2 θηλυκά κουνέλια. Στην ομάδα 1 (ομάδα ελέγχου) χορηγήθηκε νερό, χωρίς την προσθήκη χημικού, καθώς και αραβοσιτέλαιο. Στην ομάδα 2 χορηγήθηκε χαμηλή δόση του μείγματος των ενδοκρινικών διαταρακτών (ίση με $1 \times \text{ADI}$), ενώ στην ομάδα 3 υψηλή δόση του μείγματος (ίση με $10 \times \text{ADI}$). Στην ομάδα 4 χορηγήθηκε υψηλή δόση γλυφοσάτης (ίση με $10 \times \text{ADI}$) και τέλος στην ομάδα 5 χορηγήθηκε υψηλή δόση roundup (ίση με $10 \times \text{ADI}$). Η χορήγηση των χημικών διήρκεσε 12 μήνες και στο τέλος του πειράματος τα πειραματόζωα θανατώθηκαν. Στη συνέχεια, λήφθηκε το αίμα των ζώων και με κατάλληλη διαδικασία απομονώθηκε το πλάσμα και το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των παρακάτω αντιοξειδωτικών ενζύμων.

3.4 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase)

Βιοχημικό υπόβαθρο...

Η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) (Εικόνα 10) η οποία είναι γνωστή και ως “δισουλφιδική αναγωγάση της γλουταθειόνης” είναι ένα κρίσιμο αντιοξειδωτικό ένζυμο το οποίο δρα σαν διμερές και χρησιμοποιεί το FAD σαν προσθετική ομάδα και το NADPH ώστε να μετατρέψει την GSSG σε GSH. Η GSH κατέχει ρόλο κλειδί στην αντιοξειδωτική άμυνα αφού εξουδετερώνει τις ρίζες υδροξυλίου, το O₂ και άλλα ηλεκτρόφιλα την ίδια στιγμή που συμμετέχει στη ρύθμιση του μεταβολισμού και στην εκκαθάριση του υποκυτταρικού περιβάλλοντος από ξενοβιοτικές ουσίες. Δρα σαν συμπάραγοντας συγκεκριμένων αποτοξινωτικών ενζύμων ενώ αναγεννά βασικά αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη E και C έτσι ώστε να επανέλθουν στις βιολογικές ενεργές τους μορφές. Ωστόσο ο σπουδαιότερος ρόλος της GR είναι η διατήρηση της αναλογίας της GSH/GSSG αφού η γλουταθειόνη βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στην ανηγμένη της μορφή (GSH) και η GR την επαναφέρει στην οξειδωμένη της (GSSG). Στη πραγματικότητα, η αναλογία GSH/GSSG εντός των κυττάρων, χρησιμοποιείται ως μέτρο κυτταρικής τοξικότητας.

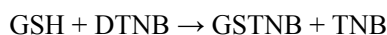


Εικόνα 10: Αναγωγάση της γλουταθειόνης

Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μέτρησης της δραστηριότητας της GR βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) βάσει των παρακάτω αντιδράσεων:

GR



Η GR καταλύει την παραγωγή της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) μέσω αναγωγής της οξειδωμένης της μορφής (GSSG). Τότε η GSH αντιδρά με το DTNB και παράγει TNB το οποίο έχει μέγιστη απορρόφηση τα 412 nm. Η ενζυμική δραστηριότητα της GR αξιολογείται μετρώντας την αλλαγή της απορρόφησης στα 412 nm για 1 λεπτό.

Αντιδραστήρια

> Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 200 mM, 1 mM EDTA (pH 7,5)

-KH₂PO₄ MB: 136 g/mol

-K₂HPO₄ MB: 174 g/mol

-EDTA άνυδρο MB: 292.24 g/mol

-EDTA disodium dihydrate salt MB: 372,24 g/mol

Για 500 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών απαιτείται η παρασκευή 250 mL KH₂PO₄ και 250 mL K₂HPO₄. Για το πρώτο ζυγίστηκαν 13,6 gr KH₂PO₄ και διαλύθηκαν σε 250 mL νερό. Για το ζυγίστηκαν 17,4 gr K₂HPO₄ και διαλύθηκαν σε 250 mL νερό. Στη συνέχεια, τα διαλύματα αναμείχθηκαν σε ένα γυάλινο ποτήρι ζέσεως υπό θέρμανση, προσθέτοντας 146 mg EDTA άνυδρο ή 186 mg EDTA ένυδρο. Αν είναι απαραίτητο γινόταν διόρθωση του pH με NaOH ή HCL μέχρι pH=7,8

>DTNB MB: 396,35 g/mol, 3mM σε 10 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών

Για 10 mL DTNB διαλύθηκαν 11,9 mg DTNB σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. Το DTNB είναι ένα φωτοευαίσθητο διάλυμα.

>β-NADPH MB: 833,35 g/mol, 2 mM

Για 1 mL β-NADPH διαλύθηκαν 1,49 mg σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών.

>GSSG MB: 612,6 g/mol, 20 mM

Για 1 mL GSSG διαλύθηκαν 50 mg GSSG σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.

>Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Για 1 U/mL διαλύματος GR διαλύθηκαν 5 μL του stock (500 U/280 μL) σε 154,4 μL νερό. Η

δραστικότητα της GR στη κυψελίδα είναι 0,026 U/mL.

Μέθοδος

	Δείγμα ελέγχου	Πειραματικό δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών	700 μL	700 μL
DTNB	250 μL	250 μL
β-NADPH	50 μL	50 μL

Προστέθηκαν οι ακόλουθοι όγκοι σε πλαστικούς σωλήνες και κάθε σωλήνας αναδεύτηκε σε vortex σε μέτρια ταχύτητα.

Για το δείγμα ελέγχου, μεταφέρθηκε το περιεχόμενο του πλαστικού σωλήνα σε μια κυψελίδα χαλαζία UV. Στη κυψελίδα προστέθηκαν 50 μL GSSG. Ανακινήθηκε χρησιμοποιώντας ένα πλαστικό κομμάτι parafilm στη κορυφή της. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 412 nm για 1 λεπτό.

Για το κάθε δείγμα, μεταφέρθηκε το περιεχόμενο του πλαστικού σωλήνα σε μια κυψελίδα, προστέθηκαν 50 μL GSSG και 25 μL από το RBCL (αραιωμένο 1/100). Η κυψελίδα ανακινήθηκε χρησιμοποιώντας ένα πλαστικό κομμάτι parafilm στη κορυφή της. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 412 nm για 1 λεπτό.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της GR (U/g Hb) = $[\Delta\text{abs}(\text{δείγμα}) \times 0,026 / \Delta\text{abs}(\text{control}) \times 38 \times 100 \times 2] / \text{Hb} \text{ (g/L)}$

Δabs = μέτρηση της αλλαγής στην απορρόφηση για 1 min

38 είναι ο συντελεστής αραιώσης δείγματος στη κυψελίδα (950 μL/25 μL δείγμα)

2 είναι η 1/2 αραιώση του RBCL

100 είναι η 1/100 αραιώση του RBCL

0,026 U/mL είναι η τελική δραστηριότητα της GR στη κυψελίδα

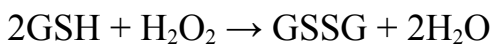
Η τιμή της ενζυμικής κατάλυσης υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση και εκφράζεται σε μmol TNB/min:

$$V = \frac{\text{Volume of reaction} \times \Delta\text{abs} / \text{min}}{\text{Molecular coefficient (NADPH)}} \times 1000$$

3.5 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)

Βιοχημικό υπόβαθρο

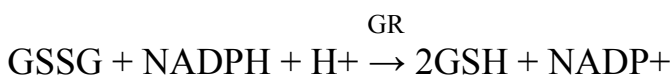
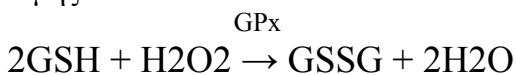
Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι ένα τετραμερές ένζυμο, μέλος μιας οικογένειας ενζύμων που στο ενεργό της κέντρο έχουν μια σεληνοκυστεΐνη. Εμφανίζει αντιοξειδωτική ικανότητα διότι παρεμποδίζει την λιπιδική υπεροξειδωση ανάγοντας τα λιπιδικά υπεροξειδία στις αντίστοιχες αλκοόλες τους. Η κυριότερη αντίδραση στην οποία συμμετέχει είναι η εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω αναγωγής του νερού όπως φαίνεται στη παρακάτω αντίδραση:



Το κατάλοιπο της σεληνοκυστεΐνης δανείζει ένα ηλεκτρόνιο στο υπόστρωμα του υπεροξειδίου και το ίδιο οξειδώνεται. Το ένζυμο τότε ανάγει τη γλουταθειόνη χρησιμοποιώντας την ως δότη υδρογόνου και αναγεννά την σεληνοκυστεΐνη με την ταυτόχρονη οξείδωση της GSH σε GSSG. Στα ερυθροκύτταρα, τα οποία στερούνται οργανιδίων, το ένζυμο εντοπίζεται στο κυτοσόλιο. Όταν το υπεροξειδίο του υδρογόνου παράγεται σε φυσιολογικούς και χαμηλούς ρυθμούς μέσω της αυτοοξειδωσης της αιμοσφαιρίνης και της δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης τότε η GPx καταφέρνει να το ουδετεροποιήσει. Όταν τα επίπεδά του όμως είναι αυξημένα, η καταλάση (στα ερυθροκύτταρα, εντοπίζεται και αυτή στο κυτοσόλιο) γίνεται αυτό το βασικό ένζυμο το οποίο το απομακρύνει.

Αρχή της μεθόδου

Η μέτρηση της δραστηριότητας της GPx βασίζεται στη παρατήρηση της οξείδωσης του NADPH. Πιο συγκεκριμένα, η GSSG παράγεται μέσω της αναγωγής ενός οργανικού υδροϋπεροξειδίου από την Gpx. Από την περίσσεια της GR η GPx ανάγεται, προμηθεύοντας το κύτταρο συνεχώς με GSH. Η ταυτόχρονη οξείδωση του NADPH σε NADP⁺ παρατηρείται φασματοφωτομετρικά στα 340 nm. Η διαδικασία ξεκινά με την μετατροπή της αιμοσφαιρίνης σε κυανομεθοσφαιρίνη αφού πρώτα έχει προηγηθεί επώαση ερυθρών αιμοσφαιρίων με 1.2- fold περίσσειας ferricyanide και με περίσσεια 12-fold cyanide σε συγκέντρωση μεγαλύτερη αυτής της αίμης.



Αντιδραστήρια

> Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM και pH=7

-KH₂PO₄ MB: 136 g/mol

-K₂HPO₄ MB: 174 g/mol

Για 500 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών χρησιμοποιήθηκαν 250 mL KH₂PO₄ & 250 mL K₂HPO₄. Ζυγίστηκαν 6,8 gr KH₂PO₄ σε 250 mL dH₂O & 8,7 gr K₂HPO₄ σε 250 mL dH₂O. Τα διαλύματα αναμίχθηκαν σε ένα γυάλινο ποτήρι ζέσεως το οποίο θερμάνθηκε και προστέθηκαν 186 mg di-sodium EDTA. Αν είναι απαραίτητο γινόταν διορθώση με NaOH ή HCL 1 N μέχρι να φτάσει το pH=7.

>Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) MB:307,3 g/mol

Προετοιμάστηκε ένα 10 mM διάλυμα διαλύοντας 31 mg GSH σε 10 mL H₂O.

>NADPH MB: 744,41 g/mol

Προετοιμάστηκε διάλυμα 1,5 mM NADPH σε 0,1 % NaHCO₃ διαλύοντας 11,2 mg NADPH και 10 mg NaHCO₃ σε 10 mL H₂O.

>Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Για 2,4 U/ml διάλυμα GR διαλύθηκαν 10 μL από το stock (500 U, 5 mg/ml, 120 U/mg πρωτεΐνη) σε 4990 μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

>tert-βουτυλ-υδροπεροξειδίο (t-BuOOH)

Για 12 mM διάλυμα t-BuOOH, διαλύθηκαν 5 μL t-BuOOH από το stock σε 2495 μL H₂O.

Μέθοδος

	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών	500 μL
RBCL αραιωμένο (1/100)	100 μL
GR	100 μL
GSH	100 μL

- 1) Προστέθηκαν οι ακόλουθοι όγκοι σε πλαστικούς σωλήνες
- 2) Κάθε σωλήνας αναδεύτηκε σε vortex σε μέτρια ταχύτητα
- 3) Όλοι οι σωλήνες επώαστηκαν για 10 λεπτά
- 4) Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα προστέθηκε σε μια κυψελίδα χαλαζία UV
- 5) Προστέθηκαν έπειτα 100 μL διαλύματος NADPH στην κυψελίδα και ακολούθησε επώαση για 3 λεπτά
- 6) Έπειτα προστέθηκαν 100 μL t-BuOOH και καταγράφηκε η μείωση της απορρόφησης στα 340 nm για 3 λεπτά

Υπολογισμοί

Δραστικότητα GPx (U/g ολικής πρωτεΐνης) =

$$0,868 \times \Delta_{\text{abs}} \text{NADPH}_{2.5\text{min}} / 10 \times 10 \times 100 \times 2 / \text{ολικής πρωτεΐνης}$$

-διαιρεμένο διά 10 είναι η συγκέντρωση της GSH (10 mM)

-πολλαπλασιασμένο επί 10 είναι ο συντελεστής αραίωσης του δείγματος στην αντίδραση (1000 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$)

-πολλαπλασιασμένο επί 100 είναι το αραιωμένο δείγμα 1/100

-πολλαπλασιασμένο επί 2 είναι η πρώτη αραίωση σε νερό κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων. Έπειτα διαιρείται με την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης.

Η ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης καθορίζεται χρησιμοποιώντας την μέθοδο Bradford και εκφράζεται σε mg/mL.

$$V = \frac{\text{Volume of reaction} \times \Delta_{\text{abs}} / \text{min}}{\text{Molecular coefficient (NADPH)}} \times 1000$$

3.6 Προσδιορισμός της δραστηκότητας της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου (SOD)

Βιοχημικό υπόβαθρο

Η SOD μετατρέπει τη ρίζα του σουπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και μοριακό οξυγόνο (O₂).

Αρχή της μεθόδου

Αρικά, η ξανθίνη και η οξειδάση της ξανθίνης παράγουν O₂^{•-}. Ταυτόχρονα η αναγωγή του NBT θα αποτελέσει δείκτη για τη παραγωγή του O₂^{•-}. Το SOD ανταγωνίζεται με το NBT για το O₂^{•-} και το ποσοστό παρεμπόδισης της αναγωγής του NBT αποτελεί τον δείκτη για το ποσό του SOD που είναι παρόν.

Αντιδραστήρια

> Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0,05 M, pH=7,8)

-8.7 g K₂HPO₄ σε 1000 ml dH₂O

-0.68 g σε 100 ml dH₂O

Για 1 λίτρο ρυθμιστικό διάλυμα αναμείχθηκαν 908 mL K₂HPO₄ με 92 mL KH₂PO₄ και το pH προσαρμόστηκε στο 7,8.

> Ρυθμιστικό διάλυμα DETAPAC

Διαλύθηκαν 0,2653 γ DETAPAC σε 500 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών

> NBT (2,24 mM)

Διαλύθηκαν 0,1832 g NBT σε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. Το NBT είναι φωτοευαίσθητο.

> Ξανθίνη

Θερμάνθηκαν 0,0045 g ξανθίνης σε 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών

>Οξειδάση της ξανθίνης (60 mU)

Για μία αντίδραση χρειάστηκαν 2,4 μL οξειδάση της ξανθίνης τα οποία αναμείχθηκαν με 97,6 μL DETAPAC ρυθμιστικό διάλυμα

>Ρυθμιστικό διάλυμα Mastermix (για 20 αντιδράσεις απαιτήθηκε η ανάμειξη)

- 13,8 mL DETAPAC ρυθμιστικό διάλυμα
- 0,5 mL NBT (2,24 mM)
- 1,7 mL ξανθίνη

Μέθοδος

	Δείγμα ελέγχου	Πειραματικό δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα mastermix	800 μl	800 μl
RBCL(αραιωμένο 1/100)	-	100 μl
DETAPAC	100 μl	-

- 1) Προστέθηκαν οι ακόλουθοι όγκοι σε πλαστικούς σωλήνες
- 2) Για το τυφλό το περιεχόμενο του σωλήνα μεταφέρθηκε σε μια κυψελίδα χαλαζία UV τοποθετήθηκε στο φωτόμετρο και μηδενίσαμε
- 3) Για το δείγμα, το περιεχόμενο κάθε σωλήνα μεταφέρθηκε επίσης σε μία κυψελίδα χαλαζία UV
- 4) Προστέθηκαν 100 μL οξειδάση της ξανθίνης στην κυψελίδα και ανακινήθηκε 3 φορές χρησιμοποιώντας ένα πλαστικό κομμάτι parafilm στη κορυφή της.
- 5) Υπολογίστηκε η απορρόφηση στα 560 nm για 1,5 λεπτό

Υπολογισμοί

$$>\Delta Abs_{560 \text{ nm}}/\lambda\epsilon\pi\tau\acute{o} \text{ δ\epsilon\iota\gamma\mu\alpha} = (A_{560\text{nm}}(3\lambda\epsilon\pi\tau\acute{\alpha}) - A_{560\text{nm}}(0 \lambda\epsilon\pi\tau\acute{\alpha}))/1,5 \lambda\epsilon\pi\tau\acute{o}$$

$$>\Delta Abs_{560 \text{ nm}}/\lambda\epsilon\pi\tau\acute{o} \text{ τυφλό} = (A_{560\text{nm}}(3\lambda\epsilon\pi\tau\acute{\alpha}) - A_{560\text{nm}}(0 \lambda\epsilon\pi\tau\acute{\alpha}))/1,5 \lambda\epsilon\pi\tau\acute{o}$$

>Υπολογίζουμε την επί % παρεμπόδιση του NBT σύμφωνα με την εξίσωση:

$$[(\Delta A_{560 \text{ nm}}/\lambda\epsilon\pi\tau\acute{o} \text{ τυφλό} - \Delta A_{560 \text{ nm}}/\lambda\epsilon\pi\tau\acute{o} \text{ δ\epsilon\iota\gamma\mu\alpha})/\Delta A_{560 \text{ nm}}/\lambda\epsilon\pi\tau\acute{o} \text{ τυφλό}]$$

>Διαιρούμε με g/L αιμοσφαιρίνης σε κάθε δείγμα σύμφωνα με την εξίσωση:

$[(\Delta A_{560} \text{ nm/λεπτό τυφλό} - \Delta A_{560} \text{ nm/λεπτό δείγμα}) / \Delta A_{560} \text{ nm/λεπτό τυφλό}] \times 100 / \text{g/L Hb}$

> Η δραστηριότητα του SOD υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

SOD δραστηριότητα = 100 - % αναστολή του NBT

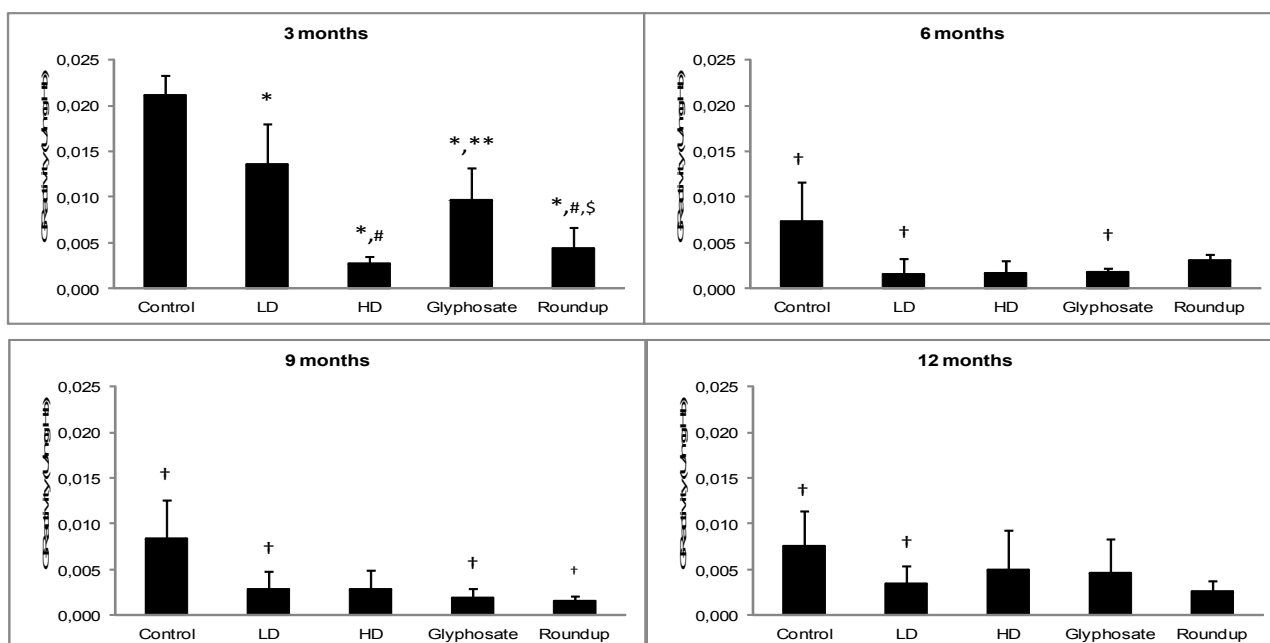
3.7 Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες (two-way ANOVA) (δόση × χρόνος) ακολουθούμενη από το Turkey's post hoc test για τις ζευγαρωτές συγκρίσεις. Η στάθμη στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0.05$. Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσο ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS software, version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Η δραστηριότητα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR)

Κατά τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της GR, βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου, της χορήγησης και του συνδυασμού τους. Στους 3 μήνες, η δραστηριότητα της GR μειώθηκε μετά από κάθε χορήγηση σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, η χορήγηση του Roundup αύξησε τη δραστηριότητα του ενζύμου σε σύγκριση με την HD και τη μείωσε σε σύγκριση με την LD ενώ η γλυφοσάτη τη μείωσε σε σύγκριση με την LD. Αναφορικά με τις συγκρίσεις στο χρόνο και συγκεκριμένα συγκριτικά με τους 3 μήνες, η δραστηριότητα της GR μειώθηκε στην ομάδα ελέγχου και την LD σε όλες τις υπόλοιπες χρονικές στιγμές (6, 9 και 12 μήνες), ενώ στην ομάδα της γλυφοσάτης μειώθηκε στους 6 και στους 9 μήνες και στην ομάδα του roundup μόνο στους 9 μήνες. μειώθηκε επίσης. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 11: Η επίδραση των ξενοβιοτικών στη δραστηριότητα της GR

*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου στην ίδια χρονική στιγμή

#: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την LD

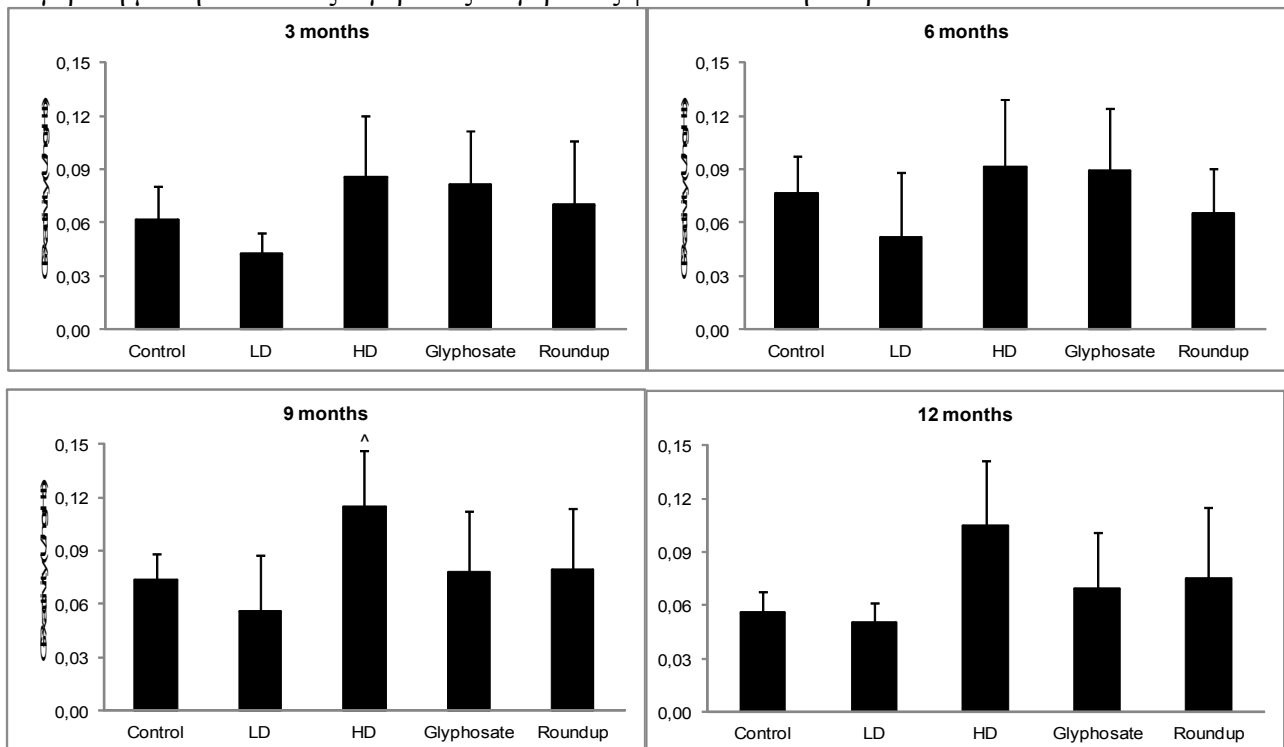
** : Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την HD

\$: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την LD

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους 3 μήνες

4.2 Η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)

Κατά τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της GPx βρέθηκε κύρια επίδραση της χορήγησης. Στους 9 μήνες, η δραστηριότητα της GPx παρουσίασε μία τάση αύξησης στην HD σε σύγκριση με την LD. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.

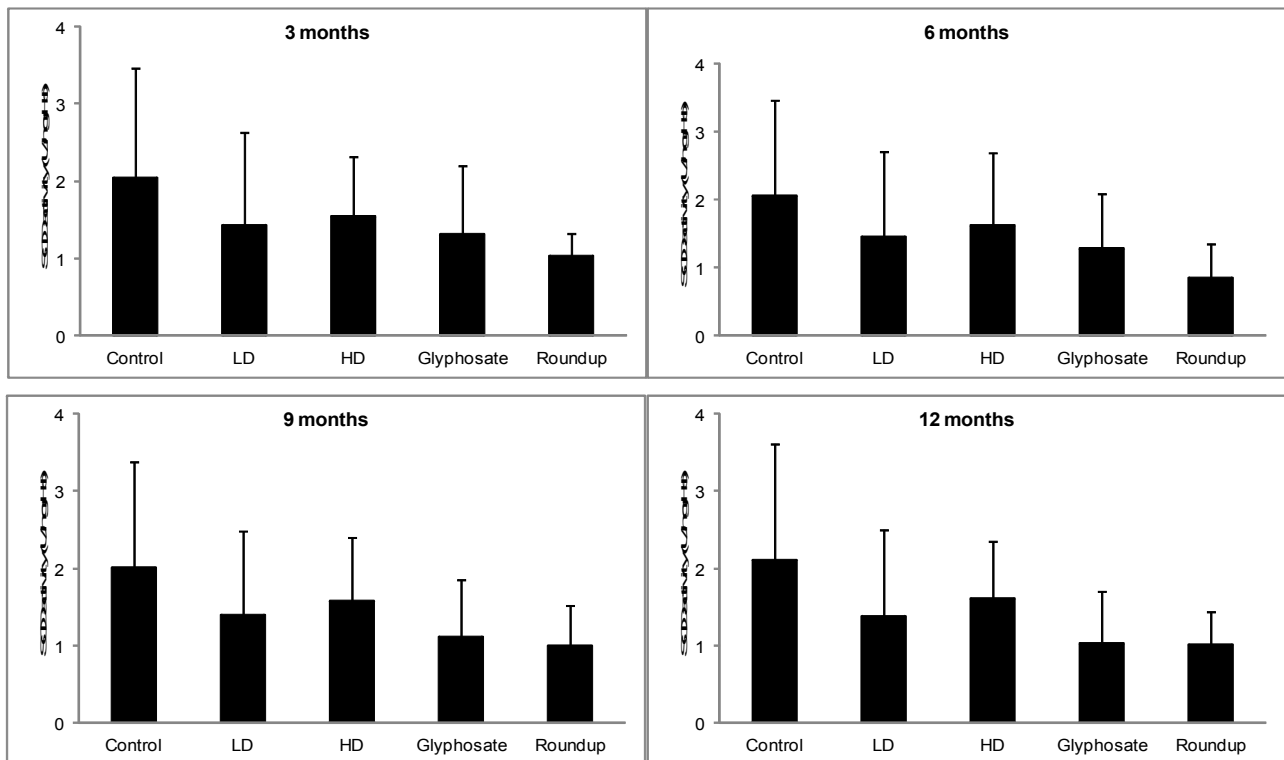


Εικόνα 12: Η επίδραση των ξενοβιοτικών στη δραστηριότητα της GPx.

^: Τάση αύξησης της GPx στην HD σε σύγκριση με την LD.

4.3 Η δρατικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD)

Κατά τον προσδιορισμό της δρατικότητας της SOD δε βρέθηκε καμία επίδραση.



Εικόνα 13: Η επίδραση των ξενοβιοτικών στη δρατικότητα της SOD.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πρόσφατη βιβλιογραφία καταδεικνύει ότι οι ξενοβιοτικές ουσίες μπορούν να είναι περισσότερο επιβλαβείς όταν αποτελούν συστατικά ενός χημικού μείγματος σε σχέση με όταν χορηγούνται ξεχωριστά (Kostoff et al., 2018) και συνεπώς η μελέτη των χημικών μειγμάτων αποτελεί μια ρεαλιστικότερη προσέγγιση της καθημερινής ζωής (Tsatsakis et al., 2016; Veskoukis et al., 2020). Υπό αυτό το πρίσμα, στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η επίδραση ενός χημικού μείγματος ενδοκρινικών διαταρακτών, της γλυφοσάτης και του ζιζανιοκτόνου roundup σε αντιοξειδωτικά ένζυμα στα ερυθροκύτταρα κουνελιών. Η χορήγηση του μείγματος έγινε σε δόσεις ίσες με $1 \times \text{ADI}$ (χαμηλή δόση) και $10 \times \text{ADI}$ (υψηλή δόση), της γλυφοσάτης σε δόση ίση με $10 \times \text{ADI}$ (υψηλή δόση) και του roundup σε δόση ίση με $10 \times \text{ADI}$ (υψηλή δόση), για 12 μήνες. Τα αποτελέσματα της διπλωματικής εργασίας υποδεικνύουν ότι η χορήγηση της υψηλής δόσης του χημικού μείγματος και του roundup, για 12 μήνες, προκαλεί αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του ήπατος των κουνελιών. Έτσι λοιπόν, η χορήγηση της χαμηλής δόσης του χημικού μείγματος προκάλεσε σημαντική μείωση της δραστηριότητας της GR σε σχέση με τους 3 πρώτους μήνες ενώ δεν φάνηκε να είχε κάποια επίδραση στη δραστηριότητα της GPx και της SOD. Από την άλλη, η χορήγηση της υψηλής δόσης του χημικού μείγματος προκάλεσε σημαντική μείωση της δραστηριότητας της GR σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, μια τάση αύξησης της δραστηριότητας της GPx σε σχέση με την χορήγηση της χαμηλής δόσης του μείγματος ενώ δεν είχε καμία επίδραση στη δραστηριότητα της SOD.

Μία πληθώρα μελετών έχει διερευνήσει μεμονωμένα την επίδραση των συστατικών του χημικού μείγματος στην οξειδοαναγωγική κατάσταση, συνήθως για σύντομο χρονικό διάστημα και σε υψηλές δόσεις. Η χορήγηση γλυφοσάτης (10 mg/kg) σε αρσενικούς επίμυες της φυλής Wistar για 5 εβδομάδες προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας της SOD και καμία επίδραση τόσο στη δραστηριότητα της GPx όσο και στην συνολική συγκέντρωση της γλουταθειόνης (GSH + GSSG) (Astiz et al., 2009). Ακόμα, η χορήγηση 1% γλυφοσάτης ($0,4 \text{ ml/20 ml}$ νερού) σε θηλυκούς επίμυες της φυλής Wistar κατά την περίοδο της κύησης (21 ημέρες) οδήγησε σε αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσής και της δραστηριότητας της GPx χωρίς όμως να παρατηρηθεί καμία επίδραση στη δραστηριότητα της SOD (Beuret et al., 2005). Επίσης η χορήγηση παραβενίων έχει μεγάλη πιθανότητα να προκαλέσει οιστρογονικές αποκρίσεις και οξειδωτικό στρες σε υδρόβιους οργανισμούς σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες αυτών που ως γνωστόν προκαλούν οξεία τοξικότητα (Brausch and Rand, 2011; Comeche et al., 2017; Yamamoto et al., 2011). Έρευνες στη Nile tilapia έδειξαν πως τα παραβένια προκάλεσαν μετατροπές στην ενζυμική και μη ενζυμική αντιοξειδωτική δραστηριότητα στα βράγχια και στο ήπαρ του ζώου ώστε να εξισορροπήσει με κάποιο τρόπο η παραγωγή ROS που προκλήθηκε σε αυτά. Επίσης, υπήρξε αύξηση στα επίπεδα των ενζύμων SOD, GPx και GR ως μηχανισμός προστασίας του ζώου, ενώ δεν φάνηκε κανένα ίχνος λιπιδικής υπεροξειδωσής στους ιστούς που αναλύθηκαν. Σε ότι αφορά την τρικλοζάνη, η χορήγησή της σε ενήλικους κωπηπόδες του είδους *Tigriopus japonicas* σε TCS ($50 \text{ \& } 100 \text{ }\mu\text{g/L}$), για 12 και 24 ώρες οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων των ROS και της δράσης της GSH, καθώς και σε επαγωγή των ενζυμικών δράσεων των GPx και SOD, στις δόσεις των 50 και $100 \text{ }\mu\text{g/L}$, στις 12 και 24 ώρες (Park et al., 2017). Στην ίδια λογική η χορήγηση BPA ($0,2 \text{ }\mu\text{g/kg}$, $2 \text{ }\mu\text{g/kg}$ και $20 \text{ }\mu\text{g/kg}$) σε αρσενικούς επίμυες της φυλής Wistar, για 30 ημέρες, οδήγησε σε μία δοσοεξαρτώμενη μείωση της δραστηριότητας των GR, SOD και GPx (Bindhumol et al., 2003). Η χορήγηση BPA (100 ng/g /ημέρα) σε θηλυκούς εγκύους μύες της φυλής ICR προκάλεσε στους αρσενικούς απογόνους μείωση της δραστηριότητας της GPx, της SOD και της συγκέντρωσης της GSH στο ήπαρ (Meng et al., 2019). Τέλος, η χορήγηση DEHP (500 mg/kg) σε αρσενικούς επίμυες της φυλής Sprague-Dawley για 9 εβδομάδες, προκάλεσε μείωση της συγκέντρωσης της GSH στο ήπαρ, καθώς και μείωση της δραστηριότητας της SOD (Zhao et al., 2019).

Οι προαναφερόμενες μελέτες συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ειδικότερα, η χορήγηση της υψηλής δόσης του χημικού

μείγματος οδήγησε σε σημαντική μείωση της δραστηριότητας της GR, μια τάση αύξησης της δραστηριότητας της GPx ενώ δεν είχε καμία επίδραση στη δραστηριότητα της SOD. Όπως είναι γνωστό, η GR είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της ισορροπίας του λόγου GSH/GSSG ανάγοντας ένα μόριο GSSG σε δύο μόρια GSH. Η γλουταθειόνη κατέχει κυρίαρχο ρόλο στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του κυττάρου δρώντας και ως συμπαράγοντας αντιοξειδωτικών ενζύμων. Από την άλλη και η GPx είναι ένα καίριας σημασίας ένζυμο μιας και μετατρέπει το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό και τα λιπιδικά υπεροξειδία στις αντίστοιχες αλκοόλες παρεμποδίζοντας τη λιπιδική υπεροξειδωση. Παρά το γεγονός ότι το H₂O₂ δεν οξειδώνει απευθείας υποστρώματα μέσω της αντίδρασης Fenton μπορεί να συνεισφέρει στην παραγωγή ισχυρών δραστικών μορφών όπως η OH•.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα εμπορικά σκευάσματα της γλυφosatής, όπως το roundup, ασκούν μεγαλύτερη τοξική επίδραση, σε διάφορους οργανισμούς, σε σχέση με τη γλυφosatή. Αυτό το μοτίβο φαίνεται να οφείλεται στην τοξικότητα της πολυαιθοξυλιωμένης στεατικής αμίνης (POEA), η οποία προστίθεται ως επιφανειοδραστική ουσία, προκειμένου να αυξηθεί η απορρόφηση της γλυφosatής από τα φυτά (Adam et al., 1997; Janssens & Stoks, 2017). Υπό αυτή την οπτική, αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει την επίδραση του roundup στην οξειδοαναγωγική κατάσταση. Η χορήγηση του φυτοφαρμάκου roundup full II (0,7 mg/L & 7 mg/L) σε αρσενικούς επίμυες της φυλής Wistar, για 90 ημέρες, προκάλεσε αύξηση της συνολικής συγκέντρωσης της γλουταθειόνης (GSH + GSSG) και του λόγου GSH/GSSG, καθώς και αύξηση της δραστηριότητας της GPx (Larsen et al., 2014). Από την άλλη, η χορήγηση roundup® (500 mg/kg) σε επίμυες Wistar, για 120 ημέρες, οδήγησε στην επαγωγή οξειδωτικού στρες στο ήπαρ μέσω της μείωσης της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και GPx και της επακόλουθης αύξησης της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Dar et al., 2018). Αντίστοιχα, η χορήγηση roundup® TURBO (269,9 mg/kg) σε αρσενικούς επίμυες της φυλής Wistar, για 30 μέρες, επήγαγε οξειδωτικό στρες στο ήπαρ, μέσω της μείωσης της συγκέντρωσης της GSH, της μείωσης της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων (CAT, GPx, SOD) (Djaber et al., 2020).

Τα ευρήματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας συμφωνούν με τα αποτελέσματα των Larsen et al (2014), καθώς η χορήγηση της υψηλής δόσης του roundup, για 12 μήνες, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου της GSH/GSSG άρα και κατ' επέκταση τη μείωση της δραστηριότητας της GR καθώς και αύξηση της δραστηριότητας της GPx. Η GPx φέρει στο ενεργό της κέντρο μια σεληνοκυστεΐνη που δρα ως δότης ηλεκτρονίων στο υπεροξειδίο ενώ το ίδιο οξειδώνεται. Το ένζυμο χρησιμοποιεί την GSH ως δότη H⁺ για να παραχθεί ξανά η σεληνοκυστεΐνη με ταυτόχρονη όμως οξείδωση της GSH σε GSSG. Από τη στιγμή που αυξάνεται ο λόγος GSH/GSSG μάλλον η αύξηση της δραστηριότητας της GPx σχετίζεται αφού το ένζυμο χρησιμοποιώντας ως δότη της GSH προσπαθεί να ελαττώσει την συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται εξαιτίας του roundup.

Συμπερασματικά, η 12μηνη χορήγηση του μείγματος των ξενοβιοτικών τόσο σε υψηλή όσο και σε χαμηλή δόση οδήγησε σε μείωση της δραστηριότητας της GR του αίματος των κουνελιών, εξαιτίας της βιοσυσσωρευσης τους και πιθανόν της επαναλαμβανόμενης παραγωγής ποσοτήτων ελευθέρων ριζών, όπως βρέθηκε και σε προηγούμενη εργασία (Fountoucidou et al. 2019). Οι χαμηλές συγκεντρώσεις των ελευθέρων ριζών οδηγούν σε μια προσαρμογή του οργανισμού του ζώου ώστε να προστατευτούν το αίμα και οι ιστοί του, από τις επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών όταν βρεθούν σε μεγάλη συγκέντρωση (Fountoucidou et al. 2019). Αντίθετα, η μακροχρόνια έκθεση στο μείγμα των ξενοβιοτικών έδειξε να προκαλεί αλλαγή στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος των κουνελιών, γεγονός που υποδεικνύει ότι η αυξανόμενη συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών επηρέασε με τέτοιο τρόπο τον αντιοξειδωτικό αμυντικό μηχανισμό του ζώου ώστε να μην μπορεί να αντιμετωπίσει τις ελεύθερες ρίζες. Στο πλαίσιο αυτό, τίθεται ένα κρίσιμο ζήτημα που αφορά την καθημερινή ζωή, μιας και ο άνθρωπος έρχεται σε επαφή καθημερινά με μείγματα ξενοβιοτικών ουσιών από διαφορετικές πηγές και σε δόσεις κάτω του NOAEL. Η υιοθέτηση παρόμοιων προσεγγίσεων και η προσομοίωση τέτοιων πειραμάτων στην καθημερινή ζωή θα

μπορέσουν να συνεισφέρουν σε μια καλή εκτίμηση των κινδύνων που ελλοχεύουν τόσο για τους ανθρώπους όσο και για το ίδιο το περιβάλλον. Επιπλέον θα μπορέσουν να κινητοποιήσουν τις αρμόδιες αρχές και τους εκάστοτε οργανισμούς να προβούν σε μια επανεκτίμηση των δοκιμών ασφαλείας και να καθιερώσουν μελλοντικούς κανόνες για την αξιολόγηση του κινδύνου.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acconcia F, Pallottini V, Marino M. Molecular Mechanisms of Action of BPA. Dose Response. 2015; 13 1559325815610582
- Adam, A., Marzuki, A., Abdul Rahman, H., Abdul Aziz, M., 1997. The oral and intratracheal toxicities of ROUNDUP and its components to rats. *Veterinary and Human Toxicology*, 39(3), 147-151.
- Afanas'ev. I. B., 2007. Signaling Functions of Free Radicals Superoxide & Nitric Oxide under Physiological & Pathological Conditions. *Molecular Biotechnology*, 37(1), 2-4.
- Amerio P, Motta A, Toto P, Pour SM, Pajand R, Feliciani C, Tulli A. (2004). Skin toxicity from glyphosate-surfactant formulation. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 42(3): 317–319.
- Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med.* 2006; 27:299–402. [PubMed: 16914190]
- Astiz M, de Alaniz MJT, Marra CA. (2009). Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72:2025–2032
- Astiz, M., de Alaniz, M. J. T., Marra, C. A., 2009. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(3), 465-473.
- Atkinson A, Roy D. In vitro conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol A to DNA binding metabolite(s). *Biochem Biophys Res Commun.* 1995a; 210:424–433. [PubMed: 7755618]
- Avery, S. V., 2011. Molecular targets of oxidative stress. *Biochemical Journal*, 434(2), 201-210.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S., 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-31.
- Aydogan M, Korkmaz A, Barlas N, Kolankaya D. The effect of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced brain damages of male rats. *Toxicology.* 2008; 249:35–39. [PubMed: 18508178]
- Babu S, Uppu S, Claville MO, Uppu RM. Prooxidant actions of bisphenol A (BPA) phenoxyl radicals: implications to BPA-related oxidative stress and toxicity. *Toxicology mechanisms and methods.* 2013; 23:273–280. [PubMed: 23193990]
- Baltazar, M.T., Dinis-Oliveira, R.J., de Lourdes Bastos, M., Tsatsakis, A.M., Duarte, J.A., Carvalho, F., 2014. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—a mechanistic approach. *Toxicol. Lett.* 230 (2), 85–103
- Benedetti AL, Vituri C de L, Trentin AG, Domingues MA, Alvarez-Silva M. (2004). The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. *Toxicol Lett.* 153(2): 227–232.
- Bergamini, C., M., Gambetti, S., Dondi, A., Cervellati, C., 2004. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Current Pharmaceutical Design*, 10(14), 1611-1626.
- Beuret, C., Zirulnik, F., Gimenez, M., 2005. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reproductive Toxicology*, 19(4), 501-504.
- Bhargava HN, Leonard PA. Triclosan: applications and safety. *Am J Infect Control.* 1996;24(3):209-218. doi:10.1016/s0196-6553(96)90017-6
- Bindhumol V, Chitra KC, Mathur PP. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology.* 2003; 188:117–124. [PubMed:12767684]
- Binelli, A., Parolini, M., Pedriali, A., Provini, A., 2010. Antioxidant Activity in the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) in Response to Triclosan Exposure. *Water, Air, & Soil Pollution*, 217(1-4), 421-430.
- Biomarkers Definitions Working Group: Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69:89–95.
- Bloom, M.S., Kim, D., Vom Saal, F.S., Taylor, J.A., Cheng, G., Lamb, J.D., Fujimoto, V.Y., 2011.

Bisphenol A exposure reduces the estradiol response to gonadotropin stimulation during in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 96, 672–677.

-Bolli A, Galluzzo P, Ascenzi P, Del Pozzo G, Manco I, Vietri MT, Marino M. Laccase treatment impairs bisphenol A-induced cancer cell proliferation affecting estrogen receptor alpha-dependent rapid signals. *IUBMB Life.* 2008; 60:843–852. [PubMed: 18767177]

-Bolli A, Bulzomi P, Galluzzo P, Acconcia F, Marino M. Bisphenol A impairs estradiol-induced protective effects against DLD-1 colon cancer cell growth. *IUBMB Life.* 2010; 62:684–687. [PubMed: 20836126]

-Bradberry SM, Proudfoot AT, Vale JA (2004). "Glyphosate poisoning". *Toxicological Reviews.* 23(3): 159–67

-Brausch, J.M., Rand, G.M., 2011. A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 82 (11),1518–1532.

-Brigelius-Flohe R, Traber M. Vitamin E: Function and metabolism. *FASEB J* 1999;13:1145-55

-Can, B., Kulaksiz Erkmen, G., Dalmizrak, O., Ogun, I. H., Ozer, N., 2010. Purification and Characterisation of Rat Kidney Glutathione Reductase. *The Protein Journal*, 29(4), 250-256.

-Caserta, D., Di Segni, N., Mallozzi, M., Giovanale, V., Mantovani, A., Marci, R., Moscarini, M., 2014. Bisphenol A and the female reproductive tract: an overview of recent laboratory evidence and epidemiological studies. *Reprod.Biol. Endocrinol.* 12, 37.

-Cashman A L and E M. Warshaw, Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity and hormonal properties. *Dermatitis*, 16(2):57-66, 2005.

- Chepelev NL, Enikanolaiye MI, Chepelev LL, Almohaisen A, Chen Q, Scoggan KA, Willmore WG. Bisphenol A activates the Nrf1/2-antioxidant response element pathway in HEK 293 cells. *Chem Res Toxicol.* 2013; 26:498–506. [PubMed:23360430]

- Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology.* 2003; 185:119–127. [PubMed: 12505450]

- C. Lopez-Alarcón, A. Denicola, Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays, *Anal. Chim. Acta* 763 (2013) 1e10

-Comeche, A., Martín-Villamil, M., Picó, Y., Varó, I., 2017. Effect of methylparaben in *Artemia franciscana*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 199, 98–105.

-Contardo-Jara V, Klingelmann E, Wiegand C. (2009). Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environ. Pollut.* 157:57–63.

-Coutinho CFB, Tanimoto ST, Galli AG, Gustavo S, Takayama MA, Raquel B, Mazo LH. (2005). Pesticides: action mechanism, degradation and toxicity. *Pesticidas*5: 65–72.

-Cutler RG (1984) In: Johnson JE Jr (ed) *Aging and cell function*. Plenum Press, New York, pp 1 148

-Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., 2006. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(2), 389-406.

-Dallegrave E, Mantese FD, Coelho RS, Pereira JD, Dalsenter PR, Langeloh A. (2003). The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. *Toxicol Lett.* 142(1–2): 45–52

-Dar, M. A., Sultana, M., Mir, A. H., Raina, R., Prawez, S., 2018. Effect of Repeated Oral Administration of Roundup® and Ammonium Nitrate on Liver of Wistar Rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 89(2).

-Darbre P. Concentrations of parabens in human breast tumours. *Journal of applied Toxicology*, 24(1):5-13, 2004.

-Dardiotis, E., Siokas, V., Sokratous, M., Tsouris, Z., Michalopoulou, A., Andravizou, A., Dastamani, M., Ralli, S., Vinceti, M., Tsatsakis, A., Hadjigeorgiou, G.M., 2018. Genetic polymorphisms in amyotrophic lateral sclerosis: evidence for implication in detoxification pathways

of environmental toxicants. *Environ. Int.* 116, 122–135.

-Daughton CG, Ternes TA. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect.* 1999;107 (Suppl6):907–938.

-Dekant, W., Colnot, T., 2013. Endocrine effects of chemicals: aspects of hazard identification and human health risk assessment. *Toxicol. Lett.* 223, 280–286.

-De Roos AJ, Zahm SH, Cantor KP, Weisemburger DD, Holmes FF, Burmeister LF, Blair A. (2003). Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occup. Environ. Med.* 60(9): E11.

-Di Meo S, Venditti P (2001) Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 10:125–140

-Djaber, N., Ounaceur, L. S., Moubine, B. N., Khaldi, T., Rouag, M., Berrouague, S., Amara, H., Taibi, F., Boumendjel, M., Boumendjel, A. Messarah, M., 2020. Roundup-induced biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of rats: the ameliorative effects of *Linum usitatissimum* oil. *Acta Biochim Polonica*, 67(1), 53-64.

-Domoradzki JY, Thornton CM, Pottenger LH, Hansen SC, Card TL, Markham DA, Waechter JM Jr. Age and dose dependency of the pharmacokinetics and metabolism of bisphenol A in neonatal sprague-dawley rats following oral administration. *Toxicol Sci.* 2004; 77:230–242. [PubMed:14691203]

-EC (2001): Commission Directive 2001/59/EC adapting to technical progress for the 28 the time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. European Community.

-EFSA–European Food Safety Authority, 2018. The 2016 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J* 16 (7), e05348. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5348>

-Ehrlich, S., Williams, P.L., Missmer, S.A., Flaws, J.A., Berry, K.F., Calafat, A.M., Ye, X., Petrozza, J.C., Wright, D., Hauser, R., 2012a. Urinary bisphenol A concentrations and implantation failure among women undergoing in vitro fertilization. *Environ. Health Perspect.* 120, 978–983.

-Ehrlich, S., Williams, P.L., Missmer, S.A., Flaws, J.A., Ye, X., Calafat, A.M., Petrozza, J.C., Wright, D., Hauser, R., 2012b. Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Hum. Reprod.* 27, 3583–3592

-Eriksson E, Andersen HR & Ledin A. (2008) Substance flow analysis of parabens in Denmark complemented with a survey of presence and frequency in various commodities. *J Hazard Mater* 156, 240–259

-Erkekoglu, P., Giray, B. K., Kızilgün, M., Rachidi, W., Hininger-Favier, I., Roussel, A.-M., Favier, A., Hincal, F., 2012. Di (2-ethylhexyl) phthalate-induced renal oxidative stress in rats and protective effect of selenium. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(6), 415-423.

-Erythropel, H. C., Maric, M., Nicell, J. A., Leask, R. L., Yargeau, V., 2014. Leaching of the plasticizer di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) from plastic containers and the question of human exposure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(24), 9967-9981.

-Escher, B.I., Hermens, J.L., 2002. Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs and mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* 36 (20), 4201–4217.

-Fang H, Tong W, Perkins R, Soto AM, Prechtel NV, Sheehan DM. Quantitative comparisons of in vitro assays for estrogenic activities. *Environ Health Perspect.* 2000; 108:723–729. [PubMed:10964792]

- Fountoucidou P, Veskoukis AS, Kerasioti E, Docea AO, Taitzoglou IA, Liesivuori J, Tsatsakis A, Kouretas D. A mixture of routinely encountered xenobiotics induces both redox adaptations and perturbations in blood and tissues of rats after a long-term low-dose exposure regimen: The time and dose issue. *Toxicol Lett.* 2019 Dec 15;317:24-44.

- Freese E, C W Sheu and E Galliers. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives.

Nature, 241(5388):321, 1973.

-Friguet, B., 2006. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Letters*, 580(12), 2910-2916.

-Fujimoto, V.Y., Kim, D., vom Saal, F.S., Lamb, J.D., Taylor, J.A., Bloom, M.S., 2011. Serum unconjugated bisphenol A concentrations in women may adversely influence oocyte quality during in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 95, 1816–1819.

-Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M. L., Fischer, M., & Schonbrunn, E. (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13010–13015.

-Gaetani G, Ferraris A, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman H. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 1996;87:1595-9

-Gangemi, S., Gofita, E., Costa, C., Teodoro, M., Briguglio, G., Nikitovic, D., Tzanakakis, G., Tsatsakis, A.M., Wilks, M.F., Spandidos, D.A., Fenga, C., 2016. Occupational and environmental exposure to pesticides and cytokine pathways in chronic diseases (Review). *Int. J. Mol. Med.* 38 (4), 1012–1020.

-Gao, Y., Ji, Y., Li, G., An, T., 2016. Theoretical investigation on the kinetics and mechanisms of hydroxyl radical-induced transformation of parabens and its consequences for toxicity: influence of alkyl-chain length. *Water Res.* 91, 77–85.

-Gehin A, Guyon C, Nicod L. (2006). Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 22: 27–34

-Georgiadis, G., Mavridis, C., Belantis, C., Zisis, I.E., Skamagkas, I., Fragkiadoulaki, I., Heretis, I., Tzortzis, V., Psathakis, K., Tsatsakis, A., Mamoulakis, C., 2018a. Nephrotoxicity issues of organophosphates. *Toxicology* 406–407, 129–136

-Georgiadis, N., Tsarouhas, K., Tsitsimpikou, C., Vardavas, A., Rezaee, R., Germanakis, I., Tsatsakis, A., Stagos, D., Kouretas, D., 2018b. Pesticides and cardiotoxicity. Where do we stand? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 353, 1–14.

-Glantzounis, G., Tsimoyiannis, E., Kappas, A., Galaris, D., 2005. Uric Acid and Oxidative Stress. *Current Pharmaceutical Design*, 11(32), 4145-4151.

-Goumenou, M., Tsatsakis, A., 2019. Proposing new approaches for the risk characterisation of single chemicals and chemical mixtures: the source related Hazard Quotient (HQS) and Hazard Index (HI) and the adversity specific Hazard Index (HIA). *Toxicol. Rep.* 6, 632–636

-Guilherme S, Gaivão I, Santos MA, Pacheco M. (2010). European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup® – a glyphosate based herbicide. *Mutagenesis*. 25(5):523–530

-Halliwell B, Gutteridge JMC (1995) The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 18:125–126

-Halliwell B. How to characterize an antioxidant- An update. *Biochem Soc Symp* 1995;61:73-101.

-Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in biology and medicine*, 4th edn. Clarendon, Oxford

-Hampton MB, Orrenius S (1998) Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* 18:1–5

-Handa O, Kokura S, Adachi S, Takagi T, Naito Y, Tanigawa T, Yoshida N, Yoshikawa T. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. *Toxicology*. 2006;227(1-2):62-72

-Hassan ZK, Elobeid MA, Virk P, Omer SA, ElAmin M, Daghestani MH, AlOlayan EM. Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxid Med Cell Longev*. 2012; 2012:194829. [PubMed: 22888396]

-Hazarika A, Sarkar SN, Hajare S, Kataria M, Malik JK. (2003). Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicol.* 185: 1–8

- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., Ma, X., 2017. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2), 532-553.
- Herrera E, Barbas C. Vitamin E: Action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem* 2001;57:43-56.
- Howe CM, Berrill M, Pauli DB, Helbing CC, Werr K, Veldhoen N. (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 1928–1938.
- Ighodaro, O. M., Akinloye, O. A., 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287-293.
- Ishiwatari S. Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *Journal of Applied Toxicology*, 27(1):1-9, 2007.
- Jain S, Kumar CH, Suranagi UD, Mediratta PK. Protective effect of N-acetylcysteine on bisphenol A-induced cognitive dysfunction and oxidative stress in rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association.* 2011; 49:1404–1409. [PubMed:21440025]
- Janssens, L., Stoks, R., 2017. Stronger effects of Roundup than its active ingredient glyphosate in damselfly larvae. *Aquatic Toxicology*, 193, 210-216.
- Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J (2006) Exercise and hormesis:activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci* 1067:425–435
- Ji LL (2007) Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review.*Exp Gerontol* 42:582–593
- Johnson, D. R., Decker, E. A., 2015. The Role of Oxygen in Lipid Oxidation Reactions: A Review. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 171-190.
- Kabuto H, Hasuike S, Minagawa N, Shishibori T. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environ Res.* 2003; 93:31–35. [PubMed: 12865045]
- Kabuto H, Amakawa M, Shishibori T. Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life Sci.* 2004; 74:2931–2940. [PubMed: 15051418]
- Kalb AC, Kalb AL, Cardoso TF, Fernandes CG, Corcini CD, Junior AS, Martinez PE. Maternal Transfer of Bisphenol A During Nursing Causes Sperm Impairment in Male Offspring. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2016; 70:793–801. [PubMed:26250451]
- Kalliora, C., Mamoulakis, C., Vasilopoulos, E., Stamatiades, G.A., Kalafati, L., Barouni, R., Karakousi, T., Abdollahi, M., Tsatsakis, A., 2018. Association of pesticide exposure with human congenital abnormalities. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 346, 58–75.
- Kandaraki, E., Chatzigeorgiou, A., Livadas, S., Palioura, E., Economou, F., Koutsilieris, M., Palimeri, S., Panidis, D., Diamanti-Kandarakis, E., 2011. Endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome (PCOS): elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E480–E484.
- Kavitha P, Rao V. (2007). Oxidative stress and locomotor behavior response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pest. Biochem. Physiol.* 87: 182–188
- Koch, H. M., Preuss, R., Angerer, J., 2006. Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure - an update and latest results1. *International Journal of Andrology*, 29(1), 155-165.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650.
- Kostoff, R.N., Goumenou, M., Tsatsakis, A., 2018. The role of toxic stimuli combinations in determining safe exposure limits. *Toxicol. Rep.* 5, 1169–1172.
- Koutroulakis, D., Sifakis, S., Tzatzarakis, M.N., Alegakis, A.K., Theodoropoulou, E., Kavvalakis,

- M.P., Kappou, D., Tsatsakis, A.M., 2014. Dialkyl phosphates in amniotic fluid as a biomarker of fetal exposure to organophosphates in Crete, Greece; association with fetal growth. *Reprod. Toxicol.* 46, 98–105.
- Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:248-54
- Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., Georgakilas, A. G., 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1-2), 193-201.
- Kwon H.Y., Choi S.Y., Won M.H., Kang T.,Kang J.H.: *Biochim. Biophys. Acta* 1543, 69 (2000).
- Lakeram M. Paraben transport and metabolism in the biomimetic artificial membrane permeability assay (BAMPA) and 3-day and 21-day Caco-2 cell systems. *Journal of Biomolecular Screening*, 12(1): 84-91, 2007.
- Larsen, K., Najle, R., Lifschitz, A., Maté, M. L., Lanusse, C., Virkel, G. L., 2014. Effects of Sublethal Exposure to a Glyphosate-Based Herbicide Formulation on Metabolic Activities of Different Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Rats. *International Journal of Toxicology*, 33(4), 307-318.
- Latini, G., Verrotti, A., De Felice, C., 2004. Di-2-Ethylhexyl Phthalate and Endocrine Disruption: A Review. *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 4(1), 37-40.
- Li, Z., Wu, J., DeLeo, C., 2006. RNA damage and surveillance under oxidative stress. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 58(10), 581-588.
- Lin, D., Zhou, Q., Xie, X., Liu, Y., 2010. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, 81(10), 1328-1333.
- Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N, Kopsidas G, Kovalenko S, Papakostopoulos P, Eastwood H, Graves S, Richardson M (2002) Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad Sci* 959:396–411
- Lioi MB, ScarfiMR, Santoro A, Barbieri R, Zeni O, Bernardino DD, Ursini MV. (1998). Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticides exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. *Mutat. Res.* 403: 13–20
- Lushchak OV, Kubrak OI, Storey JM, Lushchak VI. (2009). Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76: 932–937.
- Malm C (2001) Exercise-induced muscle damage and inflammation:fact or fiction. *Acta Physiol Scand* 171:233–239
- Mapara, R., Thomas, B. S., Bhat, K. M., 2012. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dental Research Journal*, 9(1), 111-118.
- Marc J, Bellé R, Morales J, Cornier P, Mulner-Lorillon O. (2004a). Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. *Toxicol. Sci.* 82(2): 436–242.
- Marc J, Mulner-Lorillon O, Bellé R. (2004b). Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biol. Cell.* 96(3): 245–249.
- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., Margis-Pinheiro, M., 2008. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS Journal*, 275(15), 3959-3970.
- Marino M, Pellegrini M, La Rosa P, Acconcia F. Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: Physiological outcomes. *Steroids.* 2012; 77:910–917. [PubMed: 22410438]
- Martyn, D.M., Nugent, A.P., McNulty, B.A., O'Reilly, E., Tlustos, C., Walton, J., Flynn, A., Gibney, M.J., 2016. Dietary intake of four artificial sweeteners by Irish pre-school children. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 33 (4), 592–602
- Meeker, J.D., Ehrlich, S., Toth, T.L., Wright, D.L., Calafat, A.M., Trisini, A.T., Ye, X., Hauser, R., 2010. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod. Toxicol.* 30, 532–539.
- Mehrpour, O., Karrari, P., Zamani, N., Tsatsakis, A.M., Abdollahi, M., 2014. Occupational

- exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: a review. *Toxicol.Lett.* 230 (2), 146–156.
- Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 1994;269:9397-400.
- Meng, Z., Tian, S., Yan, J., Jia, M., Yan, S., Li, R., Zhang, R., Zhu, W., Zhou, Z., 2019. Effects of perinatal exposure to BPA, BPF and BPAF on liver function in male mouse offspring involving in oxidative damage and metabolic disorder. *Environmental Pollution*, 247, 935-943.
- Michalakis, M., Tzatzarakis, M.N., Kovatsi, L., Alegakis, A.K., Tsakalof, A.K., Heretis, I., Tsatsakis, A., 2014. Hypospadias in offspring is associated with chronic exposure of parents to organophosphate and organochlorine pesticides. *Toxicol. Lett.* 230 (2),139–145.
- Mikolajewska, K., Stragierowicz, J., Gromadzińska, J., 2015. Bisphenol A –Application, sources of exposure and potential risks in infants, children and pregnant women. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 28(2), 209-241.
- Moghaddam HS, Samarghandian S, Farkhondeh T. Effect of bisphenol A on blood glucose, lipid profile and oxidative stress indices in adult male mice. *Toxicology mechanisms and methods.* 2015; 25:507–513. [PubMed: 26376105]
- Mok-Lin, E., Ehrlich, S., Williams, P.L., Petrozza, J., Wright, D.L., Calafat, A.M., Ye, X., Hauser, R., 2010. Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF. *Int. J. Androl.* 33, 385–393.
- Monneret, C., 2017. What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus Biologies*, 340(9-10), 403-405.
- Moon MK, Kim MJ, Jung IK, Koo YD, Ann HY, Lee KJ, Park YJ. Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level. *J Korean Med Sci.* 2012; 27:644–652. [PubMed: 22690096]
- Nakagawa Y, Moldéus P. Mechanism of p-hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 1998;55(11):1907-1914. doi:10.1016/s0006-2952(98)00097-5
- Nakagawa Y, Tayama S. Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol.* 2000; 74:99–105. [PubMed:10839477]
- Neiva TJC, Moraes ACR, Schwyzer R, Rocha TRF, Fries DM, Silva AM, Benedetti AL. (2010). In vitro effect of the herbicide glyphosate on human blood platelet aggregation and coagulation. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 32(4): 291–294.
- Nes I F and T Eklund. The effect of parabens on DNA, RNA and protein synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*, 54(2):237-242, 1983.
- Niki E. Antioxidant defenses in eukaryotic cells. In: Poli G, Albano E, Dianzani MU, editors. *Free radicals: From basic science to medicine.* Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag; 1993. p. 365-73.
- Nijveldt R, Van Nood E, Van Hoorn ECP, Boelens G, Van Norren K, Van Leeuwen PAM (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am Soc Clin Nutr* 74:48–25
- Nishizawa C, Takeshita K, Ueda J, Nakanishi I, Suzuki KT, Ozawa T. Reaction of parahydroxybenzoic acid esters with singlet oxygen in the presence of glutathione produces glutathione conjugates of hydroquinone, potent inducers of oxidative stress. *Free Radic Res.* 2006;40(3):233-240.
- Nunez L, Tadeo J, Garcia-Valcárcel A & Turiel E. (2008) Determination of parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1214, 178–182.
- Ortiz-Ordoñez E, Uría-Galicia E, Ruiz-Picos RA, Duran AGS, Trejo YH. (2011). Effect of Yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1(3): 443–452.

- Park, J. C., Han, J., Lee, M.-C., Seo, J. S., Lee, J.-S., 2017. Effects of triclosan (TCS) on fecundity, the antioxidant system, and oxidative stress-mediated gene expression in the copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology*, 189, 16-24.
- Petrakis, D., Vassilopoulou, L., Mamoulakis, C., Psycharakis, C., Anifantaki, A., Sifakis, S., Docea, A.O., Tsiaoussis, J., Makriganakis, A., Tsatsakis, A.M., 2017. Endocrine disruptors leading to obesity and related diseases. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14 (10) pii: E1282.
- Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89-96
- Philippat, C., Mortamais, M., Chevrier, C., Petit, C., Calafat, A.M., Ye, X., Silva, M.J., Brambilla, C., Pin, I., Charles, M.A., Cordier, S., Slama, R., 2012. Exposure to phthalates and phenols during pregnancy and offspring size at birth. *Environ. Health Perspect.* 120, 464–470
- Pozzo A & Pastori N. (1996) Percutaneous absorption of parabens from cosmetic formulations. *Int J Cosmet Sci* 18, 57–66.
- Puértolas L, Damásio J, Barata CA, Soares MVM, Narcís P. (2010). Evaluation of side-effects of glyphosate mediated control of giant reed (*Arundo donax*) on the structure and function of a nearby Mediterranean river ecosystem. *Environ. Res.* 110(6): 556–564.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., Kumar, M. N. V. R., 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113(3), 189-207.
- Russell AD. Whither triclosan?. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(5):693-695. doi:10.1093/jac/dkh171
- Sailaja Rao, P., Kalva, S., Yerramilli, A., Mamidi, S., 2011. Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free Radicals and Antioxidants*, 1(4), 2-7.
- Sakuma S, Nakanishi M, Morinaga K, Fujitake M, Wada S, Fujimoto Y. Bisphenol A 3,4-quinone induces the conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase in vitro. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association.* 2010; 48:2217–2222. [PubMed:20594952]
- Santos JB, Ferreira EA, Kasuya MCM, Silva AA, Procópio SO. (2005). Tolerance of *Bradyrhizobium* strains to glyphosate formulations. *Crop Protect.* 24: 543–547.
- Sautin, Y. Y., Johnson, R. J., 2008. Uric Acid: The Oxidant-Antioxidant Paradox. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 27(6-7), 608-619.
- Seo, K. W., Kim, K. B., Kim, Y. J., Choi, J. Y., Lee, K. T., Choi, K. S., 2004. Comparison of oxidative stress and changes of xenobiotic metabolizing enzymes induced by phthalates in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 42(1), 107-114.
- Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-Tahan, Y., Dubinsky, Z., Yehoshua, Y., 2013. Natural Antioxidants: Function and Sources, *Food and Nutrition Sciences*, 4(6), 643-649.
- Sies H (1991) *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Academic, New York
- Sies H, Berndt C, Jones DP (2017) Oxidative stress. *Annu Rev Biochem.* 2017 Jun 20;86:715-748. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037. Epub 2017 Apr 24.
- Silva, D. C., Serrano, L., Oliveira, T. M. A., Mansano, A. S., Almeida, E. A., Vieira, E. M., 2018. Effects of parabens on antioxidant system and oxidative damages in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 85-91.
- Singleton DW, Feng Y, Yang J, Puga A, Lee AV, Khan SA. Gene expression profiling reveals novel regulation by bisphenol-A in estrogen receptor-alpha-positive human cells. *Environ Res.* 2006; 100:86–92. [PubMed: 16029874]
- Sjodin B, Hellsten Westing Y, Apple FS (1990) Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 10:236–254 Sen CK (1998) Redox signalling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem Pharmacol* 55:1747–1758
- Smirnoff N. L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam Horm* 2001;61:241-66

- Smith EA, Oehme FW. (1992). The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. *Vet. Hum. Toxicol.* 34(6): 531–43.
- Soni, M. G., Burdock, G. A., Taylor, S. L., Greenberg, N. A., 2001. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*, 39(6), 513-532.
- Soni, M. G., Taylor, S. L., Greenberg, N. A., Burdock, G. A., 2002. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*, 40(10), 1335-1373.
- Soni MG, Taylor SL, Greenberg NA, Burdock GA. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem Toxicol.* 2002;40(10):1335-1373
- Sugiura–Ogasawara, M., Ozaki, Y., Sonta, S., Makino, T., Suzumori, K., 2005. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum.Reprod.* 20, 2325–2329.
- Souter, I., Smith, K.W., Dimitriadis, I., Ehrlich, S., Williams, P.L., Calafat, A.M., Hauser, R., 2013. The association of bisphenol-A urinary concentrations with antral follicle counts and other measures of ovarian reserve in women undergoing infertility treatments. *Reprod. Toxicol.* 42, 224–231.
- Sturgill, M. G., Lambert, G. H., 1997. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clinical Chemistry*, 43(8), 1512-1526.
- Thomas JA, Thomas MJ (1984): Biological effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate and other phthalic acid esters, vol 13, issue 4, 83-317. In: Goldberg (ed.) *Critical Reviews in Toxicology* CRC Press. Florida USA
- Tiwari D, Kamble J, Chilgunde S, Patil P, Maru G, Kawle D, Vanage G. Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: an endocrine disruptor. *Mutat Res.* 2012; 743:83–90. [PubMed: 22245107]
- Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007;43:4-15.
- Tsatsakis, A.M., Kouretas, D., Tzatzarakis, M.N., Stivaktakis, P., Tsarouhas, K., Golokhvast, K.S., Rakitskii, V.N., Tutelyan, V.A., Hernandez, A.F., Rezaee, R., Chung, G., Fenga, C., Engin, A.B., Neagu, M., Arsene, A.L., Docea, A.O., Gofita, E., Calina, D., Taitzoglou, I., Liesivuori, J., Hayes, A.W., Gutnikov, S., Tsitsimpikou, C., 2017. Simulating real-life exposures to uncover possible risks to human health: a proposed consensus for a novel methodological approach. *Hum. Exp. Toxicol.* 36 (6), 554–56
- Tsatsakis, A., Goumenou, M., Liesivuori, J., Dekant, W., Hernández, A.F., 2019a. Toxicology for real-life risk simulation - editorial preface to this special issue. *Toxicol. Lett.* 309, 33–34
- Valkova N. Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* strain EM. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6): 2404-2409, 2001.
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol.* 2007; 24:139–177. [PubMed: 17825522]
- Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJ, Schoenfelder G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Cien Saude Colet.* 2012a; 17:407–434. [PubMed: 22267036]
- Vandenberg LN, Hunt PA, Myers JP, Vom Saal FS. Human exposures to bisphenol A: mismatches between data and assumptions. *Rev Environ Health.* 2013; 28:37–58. [PubMed: 23612528]
- Vinceti, M., Violi, F., Tzatzarakis, M., Mandrioli, J., Malagoli, C., Hatch, E.E., Fini, N., Fasano, A., Rakitskii, V.N., Kalantzi, O.I., Tsatsakis, A., 2017. Pesticides, polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients: a case-control study. *Environ. Res.* 155,261–267.
- Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol.* 2002; 15:1281–1287.

[PubMed: 12387626]

- Wang X, Quinn P. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res* 1999;38:309-36.
- Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*. 2006; 147:S56–S69. [PubMed: 16690810]
- Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Belcher SM. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*. 2007; 24:178–198. [PubMed: 17628395]
- Williams GM, Kroes R, Munro IC. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31(2): 117–65
- Wuerges J, Lee JW, Yim YI, Yim HS, Kang SO, Djinic Carugo K. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:8569-74
- Wu HJ, Liu C, Duan WX, Xu SC, He MD, Chen CH, Chen Y. Melatonin ameliorates bisphenol A-induced DNA damage in the germ cells of adult male rats. *Mutat Res*. 2013; 752:57–67. [PubMed: 23402883]
- Wu, M., Xu, L., Teng, C., Xiao, X., Hu, W., Chen, J., Tu, W., 2019. Involvement of oxidative stress in di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)-induced apoptosis of mouse NE-4C neural stem cells. *Neurotoxicology*, 70, 41-47.
- Yamamoto, H., Tamura, I., Hirata, Y., Kato, J., Kagota, K., Katsuki, S., Yamamoto, A., Kagami, Y., Tatarazako, N., 2011. Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: individual and additive approach. *Sci. Total Environ.* 410, 102–111.
- Yoshida M, Ono H, Mori Y, Chuda Y, Onishi K. Oxidation of bisphenol A and related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001; 65:1444–1446. [PubMed:11471753]
- Young IS, McEneny J (2001) Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 29(2):358–362
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., Folz, R. J., 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337-349.
- Zhang, T., Gan, Z., Gao, C., Ma, L., Li, Y., Li, X., Sun, H., 2016. Occurrence of artificial sweeteners in human liver and paired blood and urine samples from adults in Tianjin, China and their implications for human exposure. *Environ. Sci. Process. Impacts* 18 (9), 1169–1176
- Zhao, Z., Ji, K., Shen, X., Zhang, W., Wang, R., Xu, W., Wei, W., 2019. Di(2-ethylhexyl) phthalate promotes hepatic fibrosis by regulation of oxidative stress and inflammation responses in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 68, 109-119.
- Zorrilla LM, Gibson EK, Jeffay SC, et al. The effects of triclosan on puberty and thyroid hormones in male Wistar rats. *Toxicol Sci*. 2009;107(1):56-64. doi:10.1093/toxsci/kfn225