



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Μελέτη της επίδρασης πολυφαινολικών ενώσεων και ξενοβιοτικών ουσιών στην in vitro και in vivo οξειδοαναγωγική κατάσταση με τη βοήθεια βιοδεικτών.”

“Study of the effect of polyphenolic compounds and xenobiotics on in vitro and in vivo redox status with the help of biomarkers”

ΠΑΠΑΖΑΧΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΓΙΑ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2021

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Στάγκος Δημήτριος: Επίκουρος καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Βεσκούκης Αριστείδης: Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Δημήτριο Κουρέτα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να αναλάβω μια τόσο σημαντική και ενδιαφέρουσα πτυχιακή εργασία.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Αριστείδη Βεσκούκη, για όλη την βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτορα Σκαπέρδα Ζωή για τον χρόνο που αφιέρωσε, για τις πολύτιμες διευκρινίσεις καθώς και την καθοριστική βοήθεια που μου παρείχε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου που με στήριξαν σε αυτή μου την προσπάθεια και ήταν πάντα πρόθυμοι να δώσουν τη συμβουλή τους.

Polyphenols

Xenobiotics

IN VITRO

IN VIVO

Primary cells/cell lines

Humans

Blood

Animal models

Dosage

Measurement of Biomarkers

- Validity
- Accuracy
- Fast/cost effective

Antioxidant activity

Prooxidant activity

Graphical Abstract – Γραφική περίληψη

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 11 |
| 1.1 Ελεύθερες ρίζες | 11 |
| 1.2 Παραγωγή ROS | 12 |
| 1.3 Οξειδωτικό στρες | 14 |
| 1.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί - βιοδείκτες..... | 15 |
| 2. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ | 22 |
| 2.1 Επικατεχίνη | 27 |
| 2.1.1 Αντιοξειδωτικός χαρακτήρας επικατεχίνης..... | 28 |
| 2.2 Κερκετίνη | 33 |
| 2.2.1 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης..... | 33 |
| 2.3 Ρεσβερατρόλη..... | 37 |
| 2.3.1 Αντιοξειδωτικός χαρακτήρας ρεσβερατρόλης | 38 |
| 2.4 Τυροσόλη/Υδροξυτυροσόλη | 42 |
| 2.4.1 Σχηματισμός, απορρόφηση, μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα | 42 |
| 2.4.2 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης..... | 43 |
| 3.ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΑ..... | 49 |
| 3.1 GLYPHOSATE..... | 49 |
| 3.1.1 Μηχανισμός δράσης..... | 49 |
| 3.2 Parabens..... | 55 |
| 3.2.2 Methyl/Ethyl Parabens | 56 |
| 3.2.3Methyl Parathion (MP)..... | 57 |
| 3.3 Bisphenol A..... | 59 |
| 4. REAL LIFE EXPOSURE SCENARIO – ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΣΕΝΑΡΙΟ ΕΚΘΕΣΗΣ | 63 |
| Συζήτηση | 64 |
| Βιβλιογραφία | 67 |
| Βιβλιογραφία Εικόνων | 80 |

Εικόνες και πίνακες

Εικόνα 1. Ισορροπία (steady state) και οξειδωτικό στρες

Εικόνα 2: Ο αριθμός των αναζητήσεων ανά 10000 χτυπήματα (A) και η κατανομή αυτών ανά ασθένεια σύμφωνα με το μέγεθος του κύκλου (B)

Εικόνα 3: Υποδιαίρεση μεταξύ ενδογενών και εξωγενών αντιοξειδωτικών.

Εικόνα 4 : Χημική δομή πολυφαινολών.

Εικόνα 5 : Προστατευτικές δράσεις πολυφαινολών.

Εικόνα 6 : Χημική Δομή Φλαβονοειδών

Εικόνα 7 : Κατηγοριοποίηση Πολυφαινολών

Εικόνα 8 : Χημική δομή επικατεχίνης

Εικόνα 9 : Αντιοξειδωτικές δράσεις κατεχινών

Εικόνα 10 : Άμεσοι μηχανισμοί δράσης κατεχινών

Εικόνα 11 : Ενεργοποίηση του NF – Kβ σε πολλαπλά επίπεδα από τις κατεχίνες

Εικόνα 12 : Χημική δομή κερκετίνης

Εικόνα 13 : Μηχανισμοί μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT) και μεταφοράς μονήρες ηλεκτρονίου (SET) των φαινολικών αντιοξειδωτικών ενώσεων και η ταξινόμησή τους. Όπου X : εσωτερικές ελεύθερες ρίζες, AH : αντιοξειδωτικό, M : μέταλλο, C6 : αρωματικός δακτύλιος, C1, C2 ή C3 : αναφέρεται σε πλευρικές αλυσίδες ή ενδιάμεσες αλυσίδες.

Εικόνα 14 : Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δράσης φαινολών: (1) HAT, (2) SPLET, (3) SET – PT. ArOH - : φαινολικό αντιοξειδωτικό, X - ● : ελεύθερο

Εικόνα 15 : Χημική δομή ρεσβερατρόλης

Εικόνα 16 : Χημική δομή trans και cis ρεσβερατρόλης

Εικόνα 17 : Αντιοξειδωτικό δυναμικό ρεσβερατρόλης

Εικόνα 18: Κύριοι στόχοι της ρεσβερατρόλης που σχετίζονται με τις αντιοξειδωτικές επιδράσεις της, διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες, γονίδια-στόχοι και αποτελέσματα.

Εικόνα 19 : Χημικές δομές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης.

Εικόνα 20 : Εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών από υδρόξυ-τυροσόλη.

Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση των πιθανών μηχανισμών προστασίας της υδροξυτυροσόλης έναντι οξειδωτικής βλάβης προκαλούμενης από τριτ-βούτυλ-υδροϋπεροξειδίο (t-BHP).

Εικόνα 22 : Χημική δομή glyphosate

Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες ως κεντρικός μηχανισμός της τοξικότητας του glyphosate και Round up, καθώς και των αντισταθμιστικών διεργασιών που επηρεάζονται. Τα μπλε κείμενα απεικονίζουν τα μονοπάτια σηματοδότησης καθώς και τις λειτουργικές ομάδες γονιδίων που επηρεάζονται από κάθε διαδικασία.

Εικόνα 24: Δομή paraben

Πίνακας 1 : Παραδείγματα ενδοκυτταρικών ενζυμικών αντιοξειδωτικών παραγόντων

Πίνακας 2 : Παραδείγματα ενδοκυτταρικών μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών παραγόντων

Πίνακας 3: Παραδείγματα εξωκυτταρικών αντιοξειδωτικών παραγόντων

Πίνακας 4 : Πηγές και χαρακτηριστικά φλαβονοειδών

Πίνακας 5 : Αποτελέσματα θεραπείας με τυροσόλη έπειτα από χορήγηση αιθανόλης σε κυτταρικές σειρές.

Συντομογραφίες

ROS = Reactive oxygen species

RNS = Reactive nitrogen species

ATP = Adenosine triphosphate

ER = Endoplasmic reticulum

NF = Nuclear factor

WHO = World Health Organization

SOD = Superoxide Dismutase

CAT = Catalase

GSH = Glutathione

LDL = Low density lipoprotein

HAT = Hydrogen atom transfer

PDE = Proton dissociation enthalpy

BDE = Bond dissociation enthalpy

SET-PT = Single Electron Transfer followed by Proton Transfer

SPLET = Sequential Proton Loss Electron Transfer

ETE = Electron transfer enthalpy

Tyr = Tyrosol

HTyr/ HT = Hydroxy-tyrosol

LPS = Lipopolysaccharides

Gly = Glyphosate

TNF = Tumor Necrosis Factor

MDA = Malondialdehyde

MP = Methyl Parathion

BPA = Bisphenol A

DES= diethylstilbestrol

ARE = Antioxidant response elements

NOAEL = No Observed Adverse Effect

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως μία κατάσταση κατά την οποία παρατηρείται ανισορροπία μεταξύ παραγωγής και συσσώρευσης ελευθέρων ριζών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος υπέρ των πρώτων με ταυτόχρονη διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης. Ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το οξυγόνο ή το άζωτο που επάγουν το οξειδωτικό στρες προκαλούν βλάβες σε όλα τα κυτταρικά βιομόρια (λιπίδια, σάκχαρα, πρωτεΐνες και DNA).

Σημαντική κατηγορία αντιοξειδωτικών είναι οι πολυφαινόλες. Κατά την αντιοξειδωτική τους δράση, οι πολυφαινόλες προστατεύουν τα συστατικά των κυττάρων απέναντι στην οξειδωτική βλάβη. Πέραν της αντιοξειδωτικής τους δράσης, εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιγηραντικές και καρδιοπροστατευτικές δράσεις.

Τα ξеноβιοτικά είναι χημικές ενώσεις που δεν παράγονται από τον οργανισμό αλλά τις προσλαμβάνει μέσω του περιβάλλοντος στο οποίο ζει. Τα ξеноβιοτικά συμβάλλουν σημαντικά στην αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών, προκαλώντας έτσι την ανισορροπία που οδηγεί σε βλάβη των κυττάρων και των ιστών (οξειδωτικό στρες).

Στην παρούσα μελέτη θα γίνει αναφορά σε σημαντικές πολυφαινόλες όπως η επικατεχίνη, η τυροσόλη, η υδρόξυ-τυροσόλη, η κερκετίνη και η ρεσβερατρόλη. Αναλυτικά, θα εξεταστούν διάφοροι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δράσης αυτών καθώς και πώς επηρεάζονται οι διάφοροι βιοδείκτες ανάλογα με τη δόση και το όργανο-στόχο. Επιπλέον, θα γίνει ανάλυση των τρόπων δράσης ξеноβιοτικών όπως γλυφοσάτη, parabens και διφαινόλη Α και πώς αυτοί επάγουν το οξειδωτικό στρες και επηρεάζουν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού και τη δράση σημαντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων. Τέλος, θα γίνει αναφορά στη σημασία της έκθεσης υπό πραγματικές συνθήκες (real life exposure scenario) και στα αποτελέσματα μελετών που χρησιμοποίησαν μείγματα ουσιών που, ενώ μεμονωμένα σε αυτές τις συγκεντρώσεις δεν δύνανται να προκαλέσουν τοξικότητα, μακροπρόθεσμα αποδεικνύεται πως διαταράσσεται η ισορροπία (steady state). Συμπερασματικά, υπάρχει η ανάγκη για δοκιμές που στοχεύουν στην αξιολόγηση μακροπρόθεσμης, συνδυαστικής έκθεσης σε χαμηλές δόσεις

μιγμάτων καθώς προσεγγίζουν πιο ολοκληρωμένα την αξιολόγηση τοξικότητας μίας ουσίας και τον κίνδυνο που προκύπτει από την έκθεση σε αυτή.

ABSTRACT

Oxidative stress refers to a condition in which an imbalance is observed between the production and accumulation of active species and the antioxidant capacity of a biological system. Reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) that result from oxidative stress cause damage to all cell biomolecules (lipids, proteins and polynucleotides).

Polyphenols are an important category of antioxidants. During their antioxidant action, protect cell components against oxidative damage, thus reducing the risk of various diseases associated with oxidative stress.

Xenobiotics are chemical compounds that are not produced by the (human) body, but are absorbed through the environment. Environmental xenobiotics contribute significantly to the increase in ROS production, thus causing an imbalance that leads to cell and tissue damage (oxidative stress).

The present study concerns important polyphenols such as epigallocatechin gallate, tyrosol, hydroxy – tyrosol, quercetin and resveratrol. We will examine various antioxidant mechanisms of action as well as how the various biomarkers are affected depending on the dose and the organ -target. In addition, we will analyze xenobiotics such as glyphosate, parabens and bisphenol A, as well as how they induce oxidative stress and affect the body's antioxidant mechanisms and enzymes.

Finally, we will refer to the importance of real life exposure and to studies that have shown that, although have used mixtures of substances which individually at these concentrations do not cause toxicity, in the long run disturb the steady state. In conclusion, there is a need for studies that aim to evaluating long – term, combined exposure to low doses of mixture. That is because they approach more fully the evaluation of toxicity of a substance and the risk arising from exposure.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή άτομο που διαθέτει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους, και έχει τη δυνατότητα αυτοδύναμης ύπαρξης (Halliwell, 2007). Κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού μεταβολισμού, το οξυγόνο χρησιμοποιείται στα μιτοχόνδρια για παραγωγή ενέργειας. Το οξυγόνο που δε συμβάλλει σε αυτή τη διαδικασία επάγει την παραγωγή δραστικών μορίων με κέντρο το οξυγόνο, γνωστών ως «δραστικές μορφές οξυγόνου» (Reactive Oxygen Species, ROS). Ταυτόχρονα, όταν τα δραστικά μόρια έχουν σαν κεντρικό άτομο το άζωτο, ονομάζονται «δραστικές μορφές αζώτου» (Reactive Nitrogen Species, RNS).

Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κυτταρικής λειτουργίας. Μπορούν να δράσουν τόσο ως ευεργετικές όσο και ως τοξικές ενώσεις για τον οργανισμό. Σε περίπτωση υπερπαραγωγής ελευθέρων ριζών, τόσο ώστε να μην μπορούν να εξουδετερωθούν, καθώς και σε περίπτωση μειωμένης φυσικής αντιοξειδωτικής άμυνας, αυτές συσσωρεύονται στον οργανισμό με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός φαινομένου που είναι γνωστό ως «οξειδωτικό στρες» (Simioni et al., 2018).

Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται κατά τις κυτταρικές διεργασίες από ενδογενείς φυσιολογικούς μηχανισμούς ή υπό την επίδραση εξωτερικών επιδράσεων. Οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες του οργανισμού είναι η ρίζα του υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$), του μονοξειδίου του αζώτου ($\text{NO}\cdot$), του αλκοξυλίου ($\text{RO}\cdot$), του υπεροξειδίου ($\text{ROO}\cdot$), του τριχλωρομεθυλίου ($\text{CCl}_3\cdot$) και οιθειούχες ρίζες ($\text{RS}\cdot$). Στις ROS επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ (COCl), αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ο σχηματισμός της ελεύθερης ρίζας επηρεάζεται από το πόσο σταθερή είναι. Συγκεκριμένα, όσο πιο σταθερή είναι μία ρίζα, τόσο ευκολότερος είναι και ο σχηματισμός της. Η εξουδετέρωσή της πραγματοποιείται είτε μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες ρίζες είτε με άλλα συστατικά του κυττάρου. Όταν μία ρίζα αλληλοεπιδρά με μία μη ρίζα, τότε το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στην τελευταία με αποτέλεσμα το σχηματισμό νέας ρίζας. Στην περίπτωση αλληλεπίδρασης δύο ριζών, τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια δημιουργούν ένα ζεύγος, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μίας ένωσης που δεν είναι ελεύθερη ρίζα (Βαλαβανίδης, 2006).

1.2 Παραγωγή ROS

Οι ROS παράγονται μέσω της δραστηριότητας συγκεκριμένων ενζυματικών συμπλόκων ή προκύπτουν ως υποπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού. Το πρώτο βήμα στην παραγωγή ROS είναι η μείωση του μοριακού οξυγόνου (O_2) προς το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), το οποίο είναι ο πρόδρομος των άλλων δραστικών μορφών. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) παράγεται μέσω αυτοξειδοαναγωγής (μια χημική διαδικασία που παράγει οξειδωμένα μόρια) του σουπεροξειδίου. Το H_2O_2 μετατρέπεται σε ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot}) ή νερού. Το OH^{\cdot} είναι εξαιρετικά δραστικό και αποσπώντας ηλεκτρόνια από άλλα μόρια, μετατρέποντάς τα σε νέες ρίζες και διαδίδοντας το σχηματισμό ROS σε αλυσιδωτή αντίδραση. Το H_2O_2 έχει χαμηλότερη δραστικότητα, και αυτή η κατάσταση επιτρέπει στο μόριο να διαχέεται στο κυτταρόπλασμα και τελικά να φτάνει στον πυρήνα για να αλληλοεπιδρούν με το DNA (Beckhauser, Francis-Oliveira and De Pasquale, 2016).

- Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια είναι μία σημαντική πηγή ROS λόγω του πρωταρχικού ρόλου τους στην παραγωγή ATP. Σε αυτήν τη διαδικασία, το μοριακό οξυγόνο (O_2) ανάγεται σε νερό στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η ρίζα υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) παράγεται σε έναν αριθμό θέσεων στα μιτοχόνδρια, συμπεριλαμβανομένων συμπλόκου I (θέσεις IQ και IF), σύμπλοκο III (τοποθεσία IIIQo), γλυκερόλη αφυδρογονάση 3-φωσφορικής, Q οξειδοαναγωγή, πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, και 2-οξογλουταρική αφυδρογονάση. Όλες οι τοποθεσίες απελευθερώνουν ρίζα υπεροξειδίου στο μιτοχονδριακό πλέγμα και δύο από αυτές, το σύμπλοκο III (θέση IIIQo) και η αφυδρογονάση 3-φωσφορικής γλυκερόλης, δημιουργούν επίσης ROS στο διαμεμβρανικό μιτοχονδριακό χώρο (Snezhkina et al., 2019).

- Ενδοπλασματικό δίκτυο

Το υπεροξείδιο μπορεί επίσης να δημιουργηθεί μέσω διαρροής ηλεκτρονίων από τη βραχύτερη αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων εντός του ενδοπλασματικού δικτύου (ER). Το ενδοπλασματικό δίκτυο έχει πολλές γενικές κυτταρικές λειτουργίες όπως αναδίπλωση πρωτεϊνών, σύνθεση, μεταφορά και μεταβολισμό λιπιδίων. Ο σχηματισμός των δισουλφιδικών δεσμών κατά τη διάρκεια της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών είναι μία οξειδωτική διαδικασία, και περίπου 25% του $O_2^{\cdot-}$ των κυττάρων δημιουργείται εντός του ER (Burton and Jauniaux, 2011).

- Σχηματισμός ROS με οξειδοαναγωγικό κύκλο

Οξειδοαναγωγικός κύκλος συμβαίνει όταν η αναγωγή του O₂ με ένα ηλεκτρόνιο, από ένα δότη ηλεκτρονίων, συνοδεύεται από ένα ταχεία ανακύκλωση του δότη από ένα αναγωγικό σύστημα του κυττάρου. Σε αυτόν τον κύκλο η αναγωγή του O₂ με ένα ηλεκτρόνιο επάγεται συνήθως από εξωγενείς ουσίες (ξеноβιοτικά). Σε πρώτο στάδιο, οι ουσίες αυτές ανάγονται από τις NAD(P)H – αναγωγάσες ενός ηλεκτρονίου και στη συνέχεια, έπειτα από αντίδραση με το O₂ παράγουν το σουπεροξειδίο (Παπαγεωργίου,2005).

- Εξωγενείς παράγοντες

Οι εξωγενείς παράγοντες που οδηγούν στη δημιουργία ελευθέρων ριζών είναι μεταξύ άλλων :

Ιονίζουσα ακτινοβολία

Η ιονίζουσα ακτινοβολία, υπό την παρουσία O₂ , μετατρέπει τη ρίζα υδροξυλίου, υπεροξειδίου, και οργανικές ρίζες σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και οργανικά υδροϋπεροξειδία. Αυτά τα είδη υδροϋπεροξειδίου αντιδρούν με οξειδοαναγωγικά ιόντα ενεργού μετάλλου, όπως Fe και Cu, μέσω αντιδράσεων Fenton προκαλώντας συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Καρκινογόνες ουσίες, παρασιτικές ασθένειες, φλεγμονώδεις καταστάσεις

Καπνός τσιγάρου

Ο καπνός τσιγάρου περιέχει πολλά οξειδωτικά και ελεύθερες ρίζες και οργανικές ενώσεις, όπως το υπεροξειδίο και το μονοξειδίο του αζώτου. Επιπλέον, η εισπνοή καπνού τσιγάρου στον πνεύμονα ενεργοποιεί επίσης ορισμένους ενδογενείς μηχανισμούς, όπως συσσώρευση ουδετερόφιλων και μακροφάγων, οι οποίοι αυξάνουν περαιτέρω τον οξειδωτικό τραυματισμό (Birben et al., 2012).

Οξειδωτικά αέρια της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (οξειδία αζώτου, αιωρούμενα εισπνεόμενα σωματίδια καυσαερίων)

Η έκθεση στο όζον μπορεί να προκαλέσει υπεροξειδωση των λιπιδίων και να προκαλέσει εισροή ουδετερόφιλων στο επιθήλιο των αεραγωγών.

Οξειδώσεις φαρμάκων

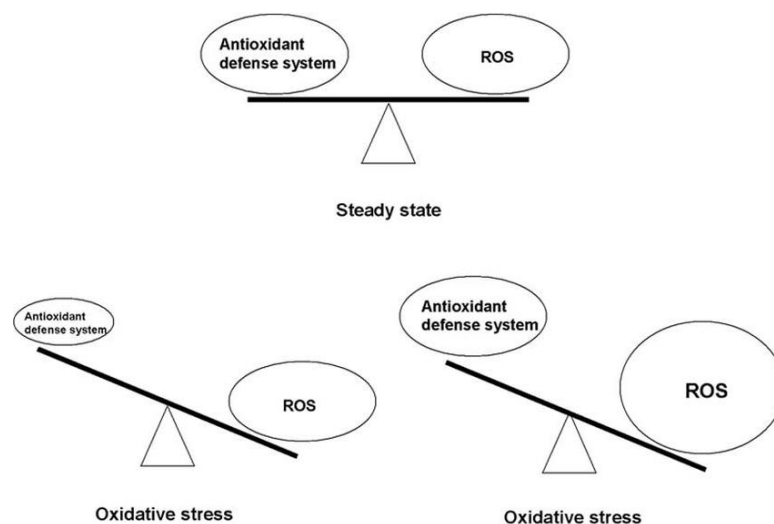
Ουσίες που παράγουν οξειδοαναγωγικές ανακυκλώσεις (Βαλαβανίδης,2006)

1.3 Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες αφορά την διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού και της παραγωγής ελευθέρων ριζών με ταυτόχρονη διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης (Εικόνα 1). Αυτό συμβαίνει είτε λόγω της εξάντλησης των αντιοξειδωτικών, είτε λόγω της συσσώρευσης των δραστικών μορφών. Ως αντιοξειδωτικά μόρια ορίζονται οι ενώσεις που αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και τις εξουδετερώνουν. Η έννοια της ισορροπίας προ-οξειδωτικού / αντιοξειδωτικού παίζει σημαντικό ρόλο στην κατανόηση του οξειδωτικού στρες. Αρχικά, υπογραμμίζει πως η διαταραχή μπορεί να προκληθεί από αλλαγές που υφίστανται και οι δύο πλευρές της ισορροπίας. Παραδείγματος χάριν, ο οργανισμός θα οδηγηθεί σε κατάσταση οξειδωτικού στρες είτε με ασυνήθιστα υψηλή παραγωγή ROS, είτε με αδυναμίες στην αντιοξειδωτική άμυνα. Δεύτερον, υπογραμμίζει τη σημασία της ύπαρξης των ελευθέρων ριζών. Όταν οι αντιοξειδωτικές άμυνες είναι αρκετά αποτελεσματικές για να εξουδετερώσουν την επιβλαβή επίδραση των οξειδωτικών μορίων, η παρουσία ROS είναι θεμελιώδης για πολλές φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες. Χαρακτηριστικά, οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνταν δυνητικά επιβλαβή υποπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού, πλέον όμως έχει αναγνωρισθεί πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές ενδοκυτταρικές οδούς σηματοδότησης (Burton and Jauniaux, 2011). Αρκετές μελέτες παρέχουν στοιχεία ότι οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν ως μόρια σηματοδότησης σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών λειτουργιών. Σε μια ποικιλία βιολογικών μηχανισμών, οι ROS ρυθμίζουν τις ενδοκυτταρικές οδούς μεταγωγής σήματος και τους μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση και στην ωρίμανση των κυττάρων (Beckhauser et al., 2016).

Το οξειδωτικό στρες επηρεάζει τη μείωση των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού και οδηγώντας στην οξείδωση μορίων όπως λιπίδια, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και DNA. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί πως η υπερπαραγωγή ROS συμβάλλει στη γονιδιωματική αστάθεια και την καρκινογένεση, μέσω της προώθησης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, της απόπτωσης και της ανεξέλεγκτης κυτταρικής ανάπτυξης (Simioni et al., 2018). Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να οξειδώσουν πρωτεΐνες βλάπτοντας τη δομή τους, επηρεάζοντας τη λειτουργική τους δραστηριότητα και επίσης επηρεάζοντας τη μεταγραφή γονιδίων. Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες συμβάλλει σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως καρκίνος, νευρολογικές διαταραχές, αθηροσκλήρωση, υπέρταση, ισχαιμία / επαναιμάτωση, διαβήτης, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, χρόνια αποφρακτική

πνευμονοπάθεια και άσθμα. Έχει αναφερθεί πως όσον αφορά τη σηματοδότηση, ο πυρηνικός παράγοντας (NF) -κΒ μπορεί να ενεργοποιηθεί από τις ελεύθερες ρίζες και είναι γνωστό ότι παίζει κρίσιμο ρόλο στη μεσολάβηση ανοσολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων και απόπτωσης. Ο παράγοντας NF-κΒ ρυθμίζει την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων πολλών από αυτά που συνδέονται με επιπλοκές του διαβήτη. Στην πραγματικότητα, η παρεκκλίνουσα ρύθμιση του NF-κΒ σχετίζεται με έναν αριθμό χρόνιων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του διαβήτη και της αθηροσκλήρωσης (Birben et al., 2012).



Εικόνα 1. Ισορροπία (steady state) και οξειδωτικό στρες

1.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί - βιοδείκτες

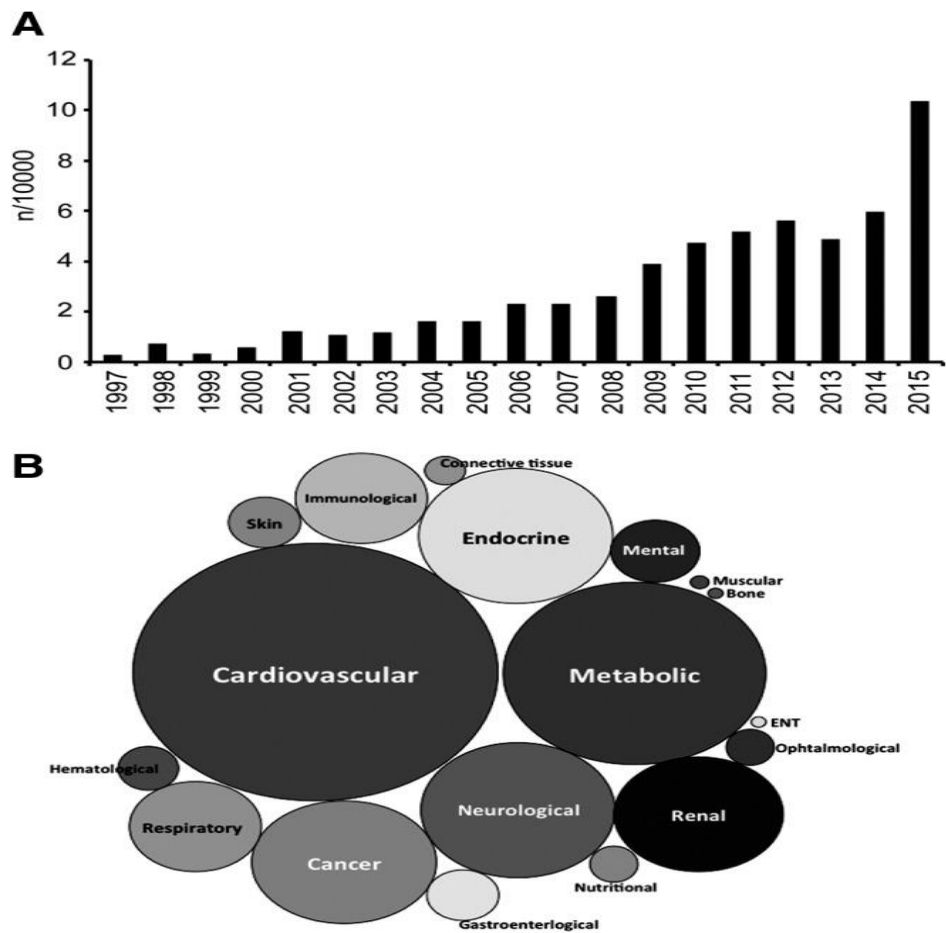
Οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν ενσωματωμένα αντιοξειδωτικά συστήματα, τα οποία περιλαμβάνουν ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά που είναι συνήθως αποτελεσματικά στην παρεμπόδιση των επιβλαβών επιδράσεων των ROS. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και αντιμετωπίζουν τα εξωγενή ξеноβιοτικά που δημιουργούν οξειδωτικές βλάβες στα διάφορα βιομόρια (Βαλαβανίδης, 2006).

Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα που μπορεί να χαρακτηρίσει την έννοια «βιοδείκτης». Ως «βιοδείκτης οξειδοαναγωγής» θεωρείται μία βιολογική οντότητα που μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια και επαναληψιμότητα και η οποία μπορεί να είναι: i) αντιοξειδωτικό μόριο (π.χ. GSH, CAT), του οποίου η συγκέντρωση, η δραστηριότητα ή/και η δομή του μεταβάλλεται μετά από αλληλεπίδραση με ελεύθερες ρίζες, ii) τα προϊόντα των επιβλαβών επιδράσεων δραστικών

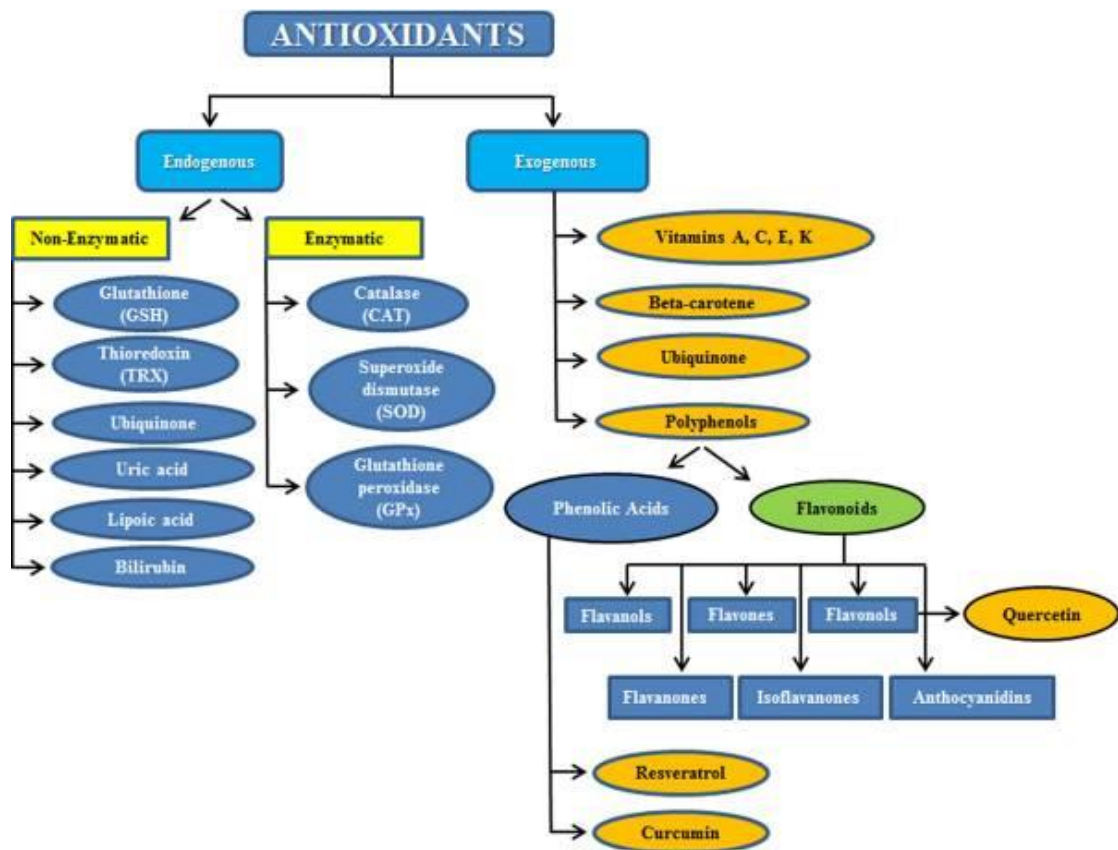
μορφών σε βιομόρια (π.χ., καρβονύλια πρωτεϊνών, μαλονδιαλδεϋδη ως προϊόν οξειδωσης λιπιδίων), iii) τα ίδια τα δραστικά είδη (Veskoukis et al. 2019).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει ορίσει έναν βιοδείκτη ως οποιαδήποτε ουσία, δομή ή διαδικασία μπορεί να μετρηθεί στο σώμα ή τα προϊόντα του και να επηρεάσει ή να προβλέψει την επίπτωση του αποτελέσματος ή της νόσου (WHO,2011). Οι δείκτες οξειδωτικού στρες πληρούν συχνά το πρώτο μέρος των κριτηρίων (είναι μετρήσιμοι). Συνοπτικά, ένας κλινικά χρήσιμος βιοδείκτης πρέπει να μπορεί να πληροί ένα από τα ακόλουθα κριτήρια: (i) να δείχνει την ειδικότητα για μια συγκεκριμένη ασθένεια (διαγνωστικός), (ii) να έχει προγνωστική αξία και (iii) να συσχετίζεται με τη δραστηριότητα της νόσου. Αυτό επιτρέπει στη συνέχεια την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Για να είναι κλινικά χρήσιμο, ένας βιοδείκτης πρέπει επίσης να είναι εύλογα σταθερός, να υπάρχει σε έναν εύκολα προσβάσιμο ιστό και οικονομικά αποδοτικός για να μετράται με δυνατότητα αναπαραγωγής σε μεγάλη κλίμακα (Frijhoff et al., 2015).

Οι μελέτες οι οποίες σχετίζονται με τους δείκτες οξειδωτικού στρες και αφορούν ολόκληρο το φάσμα των ανθρώπινων ασθενειών είναι ολοένα αυξανόμενες. Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται η αύξηση των αναζητήσεων που αφορούν ασθένειες για τα έτη 2005-2015 στον ιστότοπο Web of Science (εικόνα 2).



Εικόνα 2 : Ο αριθμός των αναζητήσεων ανά 10000 χτυπήματα (A) και η κατανομή αυτών ανά ασθένεια σύμφωνα με το μέγεθος του κύκλου (B)



Εικόνα 3: Υποδιαίρεση μεταξύ ενδογενών και εξωγενών αντιοξειδωτικών.

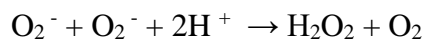
Ενδογενείς Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Παράγοντες

Πίνακας 1 : Παραδείγματα ενδοκυτταρικών ενζυμικών αντιοξειδωτικών παραγόντων

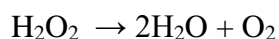
| Αντιοξειδωτικά ένζυμα | Λειτουργία |
|--|--|
| Υπεροξειδική Δισμουτάση (Superoxide Dismutase-SOD) | Η SOD των ερυθροκυττάρων απομακρύνει καταλυτικά το υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\cdot-}$). Επίσης, διατηρεί τις μεταβολικές διεργασίες και περιορίζει τις βλάβες στο DNA. |
| Καταλάση (CAT) | Απομάκρυνση υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω της αποσύνθεσης του σε οξυγόνο και νερό. |

| | |
|--------------------------------------|---|
| Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) | Απομάκρυνση υπεροξειδίου του υδρογόνου (H ₂ O ₂) με ταυτόχρονη οξείδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH). |
|--------------------------------------|---|

Υπεροξειδική δισμουτάση



Καταλάση



Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης



Ενδογενείς Μη Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Παράγοντες

Πίνακας 2 : Παραδείγματα ενδοκυτταρικών μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών παραγόντων

| Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά | Λειτουργία |
|----------------------------|---|
| Ουρικό Οξύ | Προστασία απέναντι στη λιπιδική υπεροξείδωση, εξουδετέρωση υπεροξειδικών ριζών, σχηματισμός χηλικών ενώσεων με μεταλλικά ιόντα (σίδηρος/χαλκός), οι οποίες καταλύουν αντιδράσεις σχηματισμού ελευθέρων ριζών. Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα (Green& Fraser,1988). Έπειτα διαχέεται στα |

| | |
|--------------------|---|
| | μυϊκά κύτταρα και τα προστατεύει από τις ROS. |
| Γλουταθειόνη (GSH) | Τριπεπτίδιο (γλουταμικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη). Διαθέτει σημαντικές αναγωγικές ιδιότητες, με επίδραση σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια. Επίσης, λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Η γλουταθειόνη συναντάται σε δυο μορφές. Η πρώτη αφορά την ανηγμένη (GSH), ενώ η δεύτερη την οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο) της γλουταθειόνης, GSSG). Η ανηγμένη μορφή, συναντάται συχνότερα σε σχέση με την οξειδωμένη και συνήθως η GSSG είναι το 10% της GSH. Ειδικότερα, ο λόγος GSH/GSSG στα κύτταρα χρησιμοποιείται συχνά ως βιοδείκτης οξειδοαναγωγής. |

Εξωγενείς Μη Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Παράγοντες

Πίνακας 3: Παραδείγματα εξωγενών αντιοξειδωτικών παραγόντων

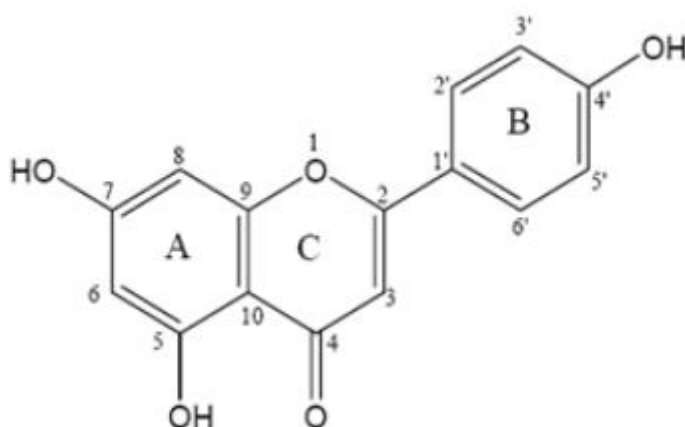
| Εξωγενή αντιοξειδωτικά | Λειτουργία |
|-------------------------|---|
| Βιταμίνη E (Τοκοφερόλη) | Σημαντικότερη ομάδα λιποδιαλυτών αντιοξειδωτικών στον οργανισμό. Η βιταμίνη E δίνει ηλεκτρόνιο σε ρίζα υπεροξυλίου, η οποία παράγεται κατά τη διάρκεια της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο δραστική μορφή βιταμίνης E και το |

| | |
|----------------------------|---|
| | <p>κύριο αντιοξειδωτικό που συνδέεται με τη μεμβράνη στα κύτταρα. Η βιταμίνη E ενεργοποιεί την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και αναστέλλει τους σχηματισμούς των ελεύθερων ριζών. Επίσης, αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση.</p> |
| Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ) | <p>Δότης ηλεκτρονίων. Προμηθεύει ηλεκτρόνια σε ένζυμα και σε οξειδωτικές ενώσεις. Αναγωγή σουπεροξειδίου, ($O^{\bullet-}$), τις υδροξυλικές ρίζες (OH^{\bullet}) και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου.</p> |
| Συνένζυμο Q | <p>Προστασία από λιπιδική υπεροξειδωση.</p> |
| Καροτενοειδή | <p>Φυσικές χρωστικές, βιολογικοί απενεργοποιητές του μονήρες οξυγόνου, αντίδραση με λιπιδικές ρίζες, προστασία από τη λιπιδική υπεροξειδωση. Κατά κύριο λόγο, το β-καροτένιο έχει βρεθεί ότι αντιδρά με ρίζες υπεροξυλίου (ROO^{\bullet}), υδροξύλιου (OH^{\bullet}), και δισμουτάσης. Τα καροτενοειδή εμφανίζουν αντιοξειδωτικά αποτελέσματα σε μερική πίεση χαμηλού οξυγόνου, αλλά μπορεί να έχουν προοξειδωτικά αποτελέσματα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις οξυγόνου. (“Παπαγεωργίου,2005”, “Βαλαβανίδης,2006”)</p> |

Άλλες ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες είναι τα φλαβονοειδή, οι πολυφαινόλες και το λυκοπένιο. Οι πολυφαινόλες είναι μία πολύ σημαντική κατηγορία αντιοξειδωτικών, στην οποία θα γίνει εκτενής αναφορά παρακάτω.

2. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών που περιέχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, και βοηθούν στην προστασία χρόνιων παθήσεων από βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες. Οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών και πολλές από αυτές έχουν βρεθεί σε φυτικά τρόφιμα, ιδίως μήλα, μούρα, εσπεριδοειδή, δαμάσκηνα, μπρόκολο, κακάο, τσάι, κρασί, καφέ και πολλά άλλα. Υπάρχουν σημαντικές επιδημιολογικές ενδείξεις ότι μια δίαιτα πλούσια σε πολυφαινόλες προστατεύει από την ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων και διαβήτη τύπου 2 (Williamson, 2017). Αναφορικά με τη δομή τους, η ύπαρξη αρωματικού δακτυλίου του βενζολίου στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες, αποτελεί βασική τους ιδιότητα (εικόνα 4).

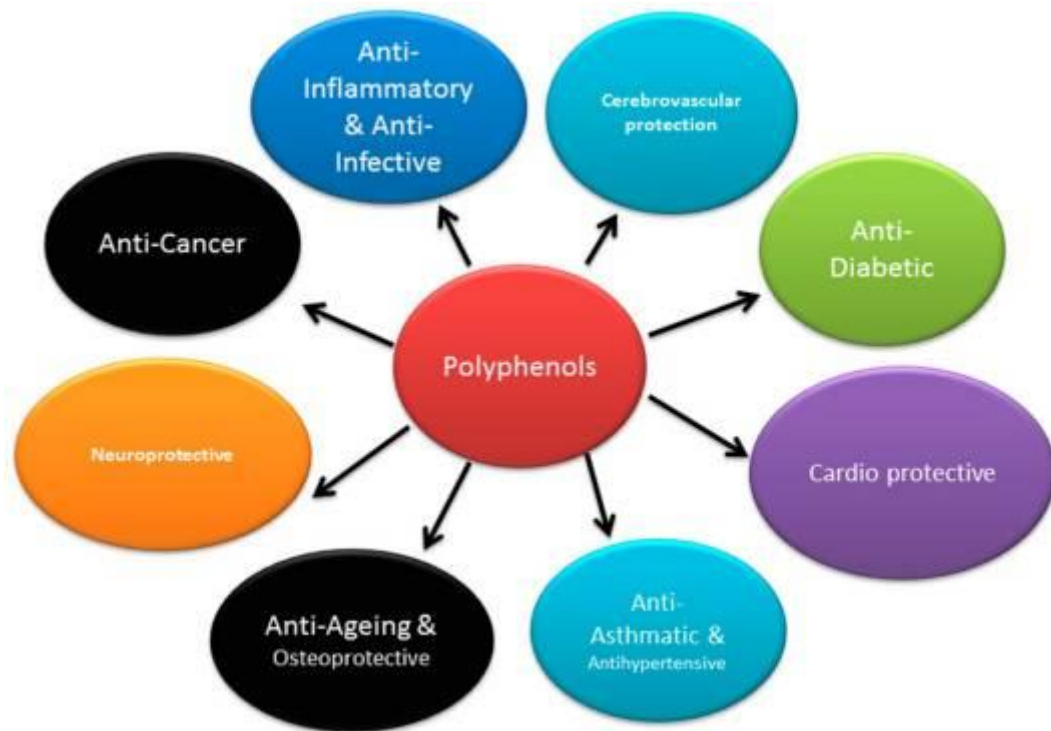


Εικόνα 4 : Χημική δομή πολυφαινολών.

Κατά την αντιοξειδωτική τους δράση, οι πολυφαινόλες προστατεύουν τα συστατικά των κυττάρων απέναντι στην οξειδωτική βλάβη, με αποτέλεσμα τον περιορισμό του κινδύνου εμφάνισης διαφόρων ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Scalbert et al., 2005).

Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί η ευεργετική δράση αυτών έναντι ασθενειών όπως οστεοπόρωση, διαβήτης, καρδιαγγειακές νόσοι, νευροεκφυλιστικές νόσοι, καρκίνος. Οι πολυφαινόλες έχουν την δυνατότητα να καταστέλλουν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών, εμποδίζοντας το σχηματισμό τους ή απενεργοποιώντας τον, μειώνοντας έτσι τον ρυθμό οξείδωσης βιολογικών μορίων. Συχνά πραγματοποιείται άμεση εξουδετέρωση των ριζών, που μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων οδηγούν σε λιπιδική υπεροξείδωση. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσφορά ενός ηλεκτρονίου ή ενός ατόμου υδρογόνου, με αποτέλεσμα να καθίστανται οι ίδιες σταθερές ρίζες (λιγότερο δραστικές), διακόπτοντας έτσι τις αλυσιδωτές αντιδράσεις (Chenetal., 2009). Επίσης είναι γνωστές ως χηλικοί παράγοντες μετάλλων, καθώς δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο δισθενής σίδηρος Fe^{2+} , σταματώντας την αντίδραση Fenton και εμποδίζοντας την οξείδωση που συμβαίνει από τις πολύ δραστικές ρίζες $OH\cdot$ (“Pietta, 2000;”, “Perron and Brumaghim, 2009”). Τέλος, δρουν επάγοντας την *in vivo* έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Croft, 2016). Τέτοια ένζυμα είναι η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση.

Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν αγγειοδιασταλτικές δράσεις και είναι σε θέση να βελτιώσουν το λιπιδικό προφίλ και να εξασθενήσουν την οξείδωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL χοληστερίνη). Επιπλέον, παρουσιάζουν σαφείς αντιφλεγμονώδεις δράσεις και μπορούν να επάγουν αποπτωτικές διεργασίες στο αγγειακό ενδοθήλιο. Κάτω από ορισμένες συνθήκες ωστόσο, για παράδειγμα υψηλή συγκέντρωση πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών ουσιών, παρουσία μεταβατικών μετάλλων (σιδήρου, χαλκού), υψηλό pH, μπορούν να δράσουν προ-οξειδωτικά.



Εικόνα 5 : Προστατευτικές δράσεις πολυφαινολών.

Σύμφωνα με τον αριθμό των φαινολικών ομάδων οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες.

- 1) Φαινολικά οξέα
- 2) Φλαβονοειδή
- 3) Στιλβένια
- 4) Λιγνάνες

Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα είναι μη-φλαβονοειδείς πολυφαινολικές ενώσεις που μπορούν περαιτέρω να χωριστούν σε δύο κύριους τύπους, το βενζοϊκό οξύ και τα παράγωγα κινναμικού οξέος. Απαντώνται στα σιτηρά, στα όσπρια, στο ελαιόλαδο, σε βότανα και καρυκείματα και σε διάφορες άλλες πηγές (Παπαγεωργίου,2005).

Στιλβένια

Τα στιλβένια είναι φυσικές ενώσεις που απαντώνται σε διάφορα είδη φυτών που διαθέτουν αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές δράσεις κατά των φυτοπαθογόνων. Η ρεσβερατρόλη (3,5,4'-τριϋδροξυ-trans-στιλβένιο) είναι μια πολύ γνωστή πολυφαινόλη φυτοαλεξίνη που βρίσκεται κυρίως στο δέρμα των σταφυλιών. Έχει προσελκύσει εκτεταμένη επιστημονική

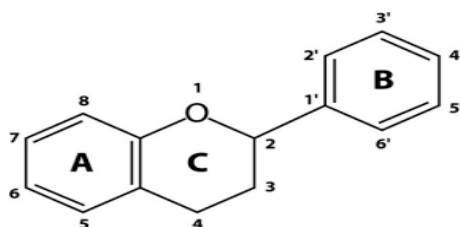
προσοχή λόγω των πιθανών οφελών για την υγεία που σχετίζονται με τις καρδιαγγειακές, τις χημειοπροληπτικές, αντιδιαβητικές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες (Reinisalo et al., 2015).

Λιγνάες

Οι λιγνάες είναι πολυφαινολικές, φυτοοιστρογονικές ενώσεις που είναι γνωστό ότι εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων οιστρογονικών και καρδιοπροστατευτικών δραστηριοτήτων, καθώς και αντιοιστρογονικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινογόνες ιδιότητες. Βρίσκονται σε υψηλότερη συγκέντρωση στο λιναρόσπορο και σουσάμι και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε άλλους σπόρους, φρούτα και λαχανικά (“Brito and Zang, 2018”; “Peterson et al., 2010”).

Φλαβονοειδή

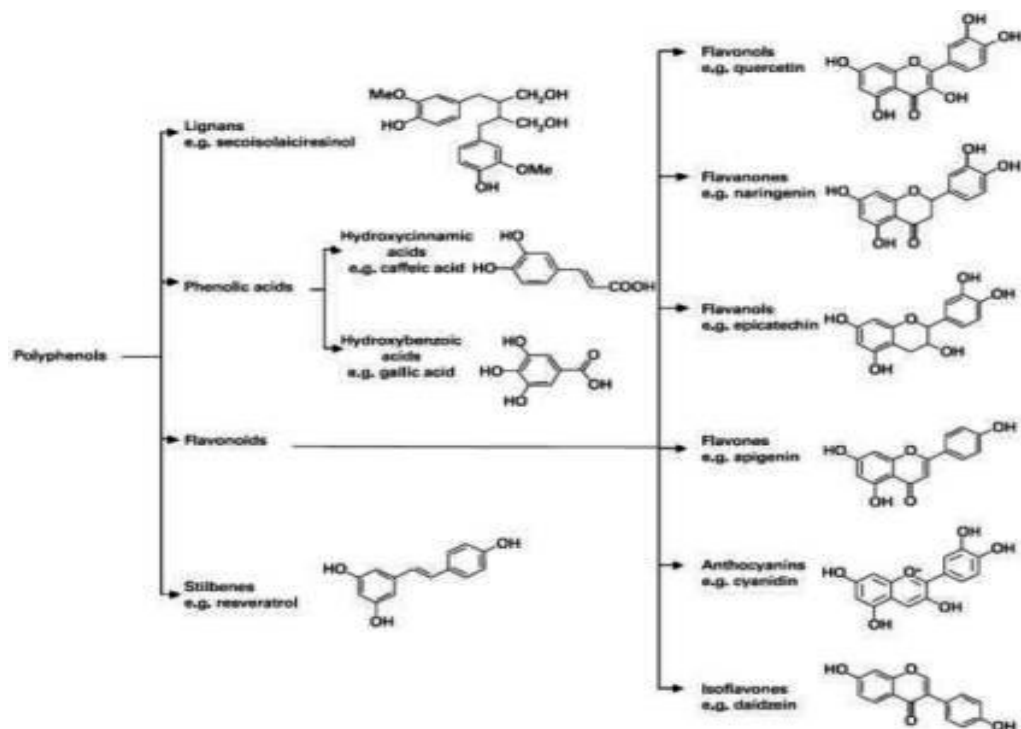
Τα φλαβονοειδή είναι μία αρκετά μεγάλη τάξη ενώσεων και αποτελούνται από μια δομή τριών δακτυλίων. Τα φλαβονοειδή μπορούν να υποδιαιρεθούν ανάλογα με την παρουσία μιας καρβονυλομάδας στη θέση 4, ενός διπλού δεσμού μεταξύ ατόμων άνθρακα 2 και 3, ή μιας ομάδας υδροξυλίου στη θέση 3 του C (μεσαίου) δακτυλίου (Tangney and Rasmussen, 2013). Λόγω του σχήματος υδροξυλίωσης και των παραλλαγών στον δακτύλιο χρωμανίου (δακτύλιος C), τα φλαβονοειδή μπορούν περαιτέρω να χωριστούν σε διαφορετικές υποομάδες όπως ανθοκυανίνες, φλαβον-3-όλες, φλαβόνες, φλαβονόνες και φλαβονόλες. Ενώ η συντριπτική πλειονότητα των φλαβονοειδών συνδέεται με το δακτύλιο B στη θέση C2 του δακτυλίου C, ορισμένα φλαβονοειδή όπως οι ισοφλαβόνες και τα νεοφλαβονοειδή, των οποίων ο δακτύλιος B συνδέεται στη θέση C3 και C4 του δακτυλίου C, αντίστοιχα, βρίσκονται επίσης στα φυτά. Οι χαλκόνες, αν και δεν έχουν τον ετεροκυκλικό δακτύλιο C, εξακολουθούν να κατηγοριοποιούνται ως μέλη της οικογένειας των φλαβονοειδών (Tsao, 2010).



Εικόνα 6 : Χημική Δομή Φλαβονοειδών

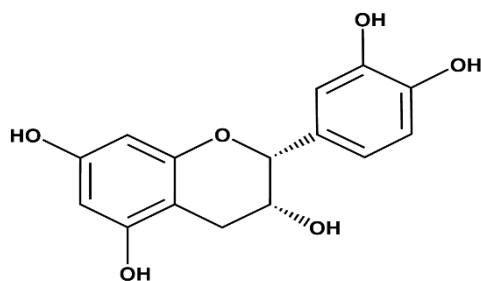
| Τάξη Φλαβονοειδών | Χαρακτηριστικά παραδείγματα κάθε τάξης | Διατροφικές Πηγές |
|-------------------|---|--|
| Φλαβανόλες | Κατεχίνη Επικατεχίνη Επιγαλλοκατεχίνη | Τσάι Κόκκινο κρασί |
| Φλαβόνες | Χρυσίνη Απιγενίνη Λουτεολίνη | Φρούτα Σέλινο Κόκκινο πιπέρι |
| Φλαβονόλες | Καμφερόλη, Κερκετίνη Μυρικετίνη | Μαύρο τσάι, Μπρόκολο Κρεμμύδια, καφές |
| Φλαβονόνες | Ναρινγενίνη, Εσπεριδίνη | Κίτρο, Πορτοκάλι |
| Ισοφλαβόνες | Γενιστίνη, Γενιστεΐνη | Σόγια |
| Ανθοκυανιδίνες | Κυανιδίνη | Κεράσι, Φράουλα, Βατόμουρο |

Πίνακας 4 : Πηγές και χαρακτηριστικά φλαβονοειδών



Εικόνα 7 : Κατηγοριοποίηση Πολυφαινολών

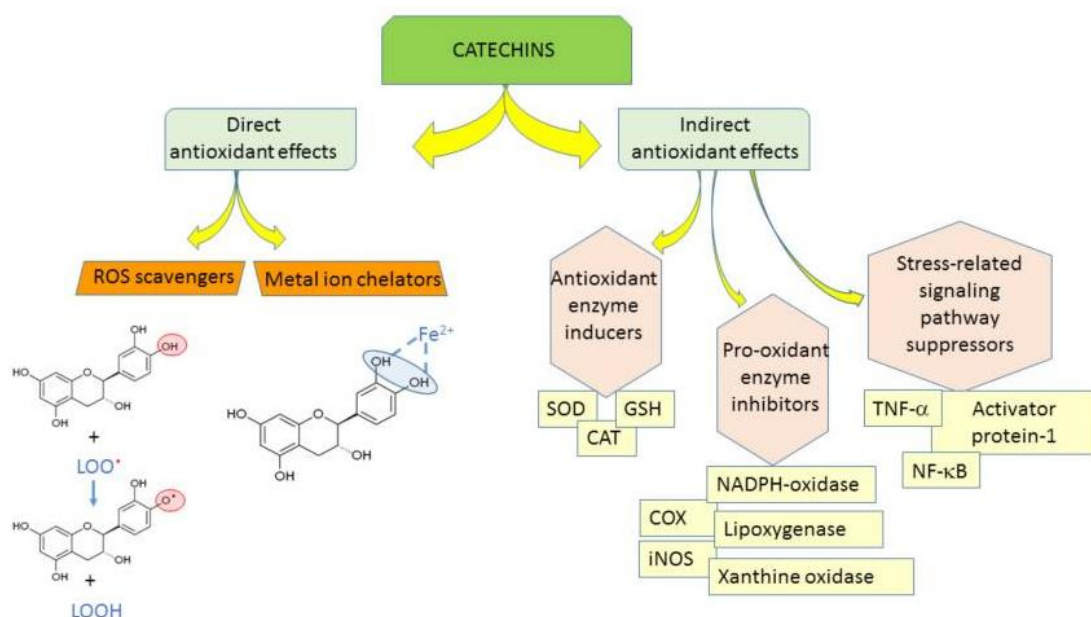
2.1 Επικατεχίνη



Εικόνα 8 : Χημική δομή επικατεχίνης

Η επικατεχίνη ανήκει στις φλαβανόλες, μία ομάδα φαινολικών ενώσεων που η χημική τους δομή αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους [Α και Β], οι οποίοι συνδέονται μέσω τριών ανθράκων που σχηματίζουν ένα οξυγονωμένο ετεροκύκλιο. [Δακτύλιος C] (Álvarez Cilleros et al., 2020). Υψηλές συγκεντρώσεις κατεχίνης βρίσκονται στα φρέσκα φύλλα τσαγιού, στα τριαντάφυλλα, φασόλια, κόκκινο κρασί, μαύρα σταφύλια. Επίσης, στο κακάο, στις φράουλες και στα βερίκοκα. Η κύρια διαιτητική πηγή κατεχινών είναι το πράσινο τσάι. Έχει αναφερθεί πως πάνω από το 80% των φλαβανολών που καταναλώνονται στη διατροφή μεταβολίζεται από τη μικροβιακή χλωρίδα του παχέως εντέρου και παράγει αρκετούς φαινολικούς μεταβολίτες (Bernatoniene and Kopustinskiene, 2018).

2.1.1 Αντιοξειδωτικός χαρακτήρας επικατεχίνης



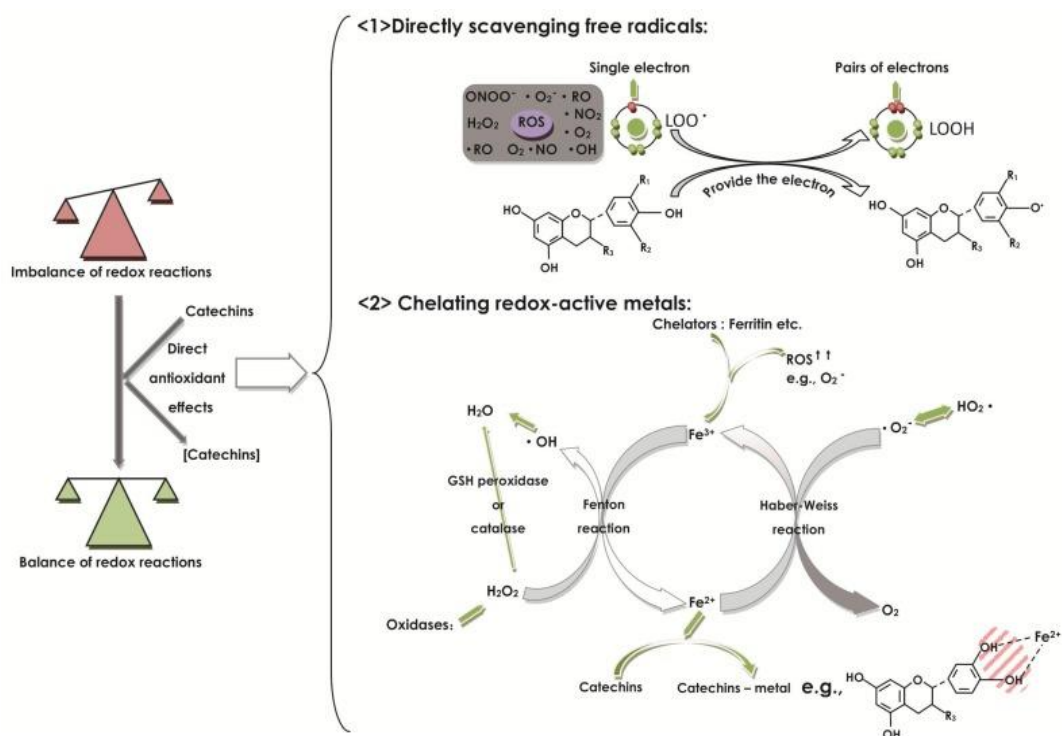
Εικόνα 9 : Αντιοξειδωτικές δράσεις των κατεχινών

Οι κατεχίνες δρουν είτε μέσω άμεσων είτε μέσω έμμεσων μηχανισμών. Οι άμεσοι μηχανισμοί δράσης διακρίνονται σε αυτούς που προκαλούν την καταστροφή ελεύθερων ριζών και σε αυτούς που εξουδετερώνουν τα μεταλλικά ιόντα. Ταυτόχρονα, ως έμμεσες αντιοξειδωτικές ουσίες, οι κατεχίνες ρυθμίζουν τις δραστηριότητες πρωτεϊνικής σύνθεσης και τις στρατηγικές σηματοδότησης, όπως τη μεσολάβηση της ιδιότητας των προ-οξειδωτικών ενζύμων.

Άμεσοι μηχανισμοί δράσης

A) Διάσπαση ελεύθερων ριζών

Οι κατεχίνες απαντώνται σε διάφορους τύπους διαστερεοϊσομερών όπως EC, ECG, EGC και EGCG. Η σχετική ιεραρχία της αποτελεσματικότητας των κατεχινών ως σαρωτών ριζών είναι η εξής: EGCG > ECG > EGC > EC > C. Η κατεχίνη και τα διαστερεοϊσομερή της έχουν κοινές χημικές δομές, φαινολικές υδροξυλικές ομάδες που είναι σε θέση να σταθεροποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες. Σε αυτή τους την ιδιότητα οφείλεται η αντιοξειδωτική τους δράση και η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Οι φαινολικές υδροξυλικές ομάδες κατεχινών αντιδρούν με τις ROS και RNS και προκαλούν μία αντίδραση τερματισμού, η οποία σταματά τον κύκλο δημιουργίας νέων ριζών. Οι κατεχίνες είναι ικανές να αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες για να διαταράξουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών, όπως και η κοινή οξειδωτική αντίδραση της οξείδωσης των λιπιδίων.



Εικόνα 10 : Άμεσοι μηχανισμοί δράσης κατεχινών

Οι κατεχίνες προσφέρουν ένα ηλεκτρόνιο φαινολικής υδροξυλομάδας, προς μείωση των ελεύθερων ριζών (για παράδειγμα: $LOO \cdot + EC = LOOH + EC \cdot$). Η αρωματική ομάδα διατηρείται σταθερή μέσω του συντονισμού των παραγόμενων ριζών υδροξυλίου. Προς επεξήγηση, η ελεύθερη ρίζα ($LOO \cdot$) με υψηλότερη E° θα πάρει το ηλεκτρόνιο των κατεχινών με χαμηλότερο E° , με αποτέλεσμα να σταματήσει την αλυσιδωτή αντίδραση σχηματισμού ελευθέρων ριζών (π.χ. $LOO \cdot + POH = LOOH + RO \cdot$). Συνεπώς, παράγεται μια ριζική μορφή του αντιοξειδωτικού, η οποία σταθεροποιείται με τη μετεγκατάσταση φορτίου που προκαλείται από την αλληλεπίδραση των φαινολικών υδροξυλομάδων. Η ισχύς της αρχικής πολυφαινόλης να διαταράξει την αλυσιδωτή αντίδραση ελεύθερης ρίζας εξαρτάται από τη σταθερότητα του παραγόμενου $RO \cdot$. Όσο πιο σταθερή είναι η $RO \cdot$, τόσο ισχυρότερη είναι η μητρική πολυφαινόλη. Το αντιοξειδωτικό δυναμικό, η ικανότητα δηλαδή των φαινολικών ενώσεων να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, εξαρτάται από τον αριθμό και τη διάταξη των ομάδων υδροξυλίου και από την έκταση της σύζευξης της δομής. Ο αριθμός των υδροξυλομάδων στο μόριο συσχετίζεται θετικά με την αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων.

B) Καταστροφή ιόντων μετάλλου

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων αποδίδεται επίσης στην ικανότητά τους να διασπούν ιόντα μετάλλων που εμπλέκονται στην παραγωγή ελεύθερων ριζών. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω των αντιδράσεων Fenton μπορεί να παράγει Fe^{3+} , και με αντίδραση με Fe^{3+} στην αντίδραση Haber-Weiss, το υπεροξειδίο παράγει Fe^{2+} , οδηγώντας έτσι σε κύκλωμα οξειδοαναγωγής. Οι κατεχίνες μπορούν να δεσμεύονται με σίδηρο, δημιουργώντας χηλικές ενώσεις, αναστέλλοντας έτσι την δραστικότητα του ευαίσθητου στην οξειδοαναγωγή μεταλλικού στοιχείου και μειώνοντας την αντίδραση παραγωγής ελεύθερων ριζών. Τέλος, η βασική μορφή αυτού του είδους αντιοξειδωτικού αποτελέσματος εξαρτάται από το E° κάθε συμπλέγματος πολυφαινόλης-μετάλλου. Για να είναι αντιοξειδωτικό, το σύμπλοκο πολυφαινόλης-μετάλλου πρέπει να έχει χαμηλότερη ισχύ στο σχηματισμό ριζών, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά μεταλλικά σύμπλοκα (“Fan et al., 2017”; “Bernatoniene and Korustinskiene, 2018”).

Έμμεσοι μηχανισμοί δράσης

A) Επαγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων

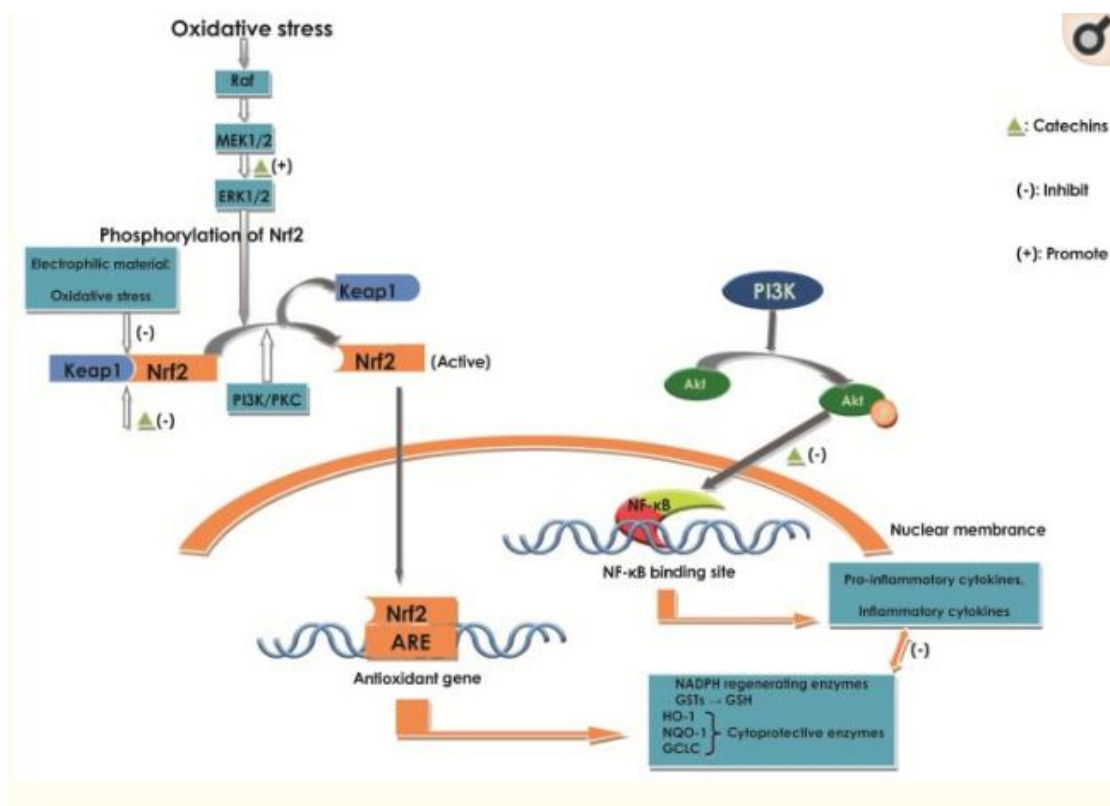
Έχει αποδειχθεί πως οι κατεχίνες μπορούν να συμβάλλουν στη δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων. Σε μελέτη όπου ποντίκια έλαβαν 0,2% κατεχίνες στο πόσιμο νερό έδειξαν σημαντικά αυξημένη δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), καταλάσης (CAT) και υπεροξειδάσης γλουταθειόνης (GPx), που παίζουν βασικούς ρόλους στην απομάκρυνση των ROS (Khan SG, et al 1992). Επιπλέον, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κατεχινών οδήγησε σε ισχυρή μείωση στα επίπεδα της GPx και σημαντική αύξηση των επιπέδων SOD (Yannis V Simos et al, 2012).

B) Αναστολή ενζυμικής δραστικότητας

Οι κατεχίνες, όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, έχουν έμμεση αντιοξειδωτική ικανότητα για την αναστολή της διαμόρφωσης των ενζύμων που παράγουν οξειδωτικά όπως η NADPH-οξειδάση (NOX) και μεταβάλλουν την παραγωγή οξειδωτικού αναστέλλοντας την πρόσδεση με υποδοχείς όπως TNP- α προς TNP- α K, σε κύτταρα εντέρου. Έχει προταθεί ότι η επικατεχίνη και οι μεταβολίτες της θα μπορούσαν να αναστείλουν το NOX, με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής υπεροξειδίου. Ένας από τους μεταβολίτες της επικατεχίνης, ο O-μεταβολίτης, έχει παρόμοια δομή με την αποκυνίνη, έναν κλασσικό αναστολέα NOX. Η επικατεχίνη μπορεί να αναστέλλει τις NOX με την ακόλουθη μέθοδο:

- άμεσος συνδυασμός επικατεχίνης – NOX
- η επικατεχίνη μεταβάλλει την εισροή ασβεστίου και έπειτα αναστέλλει την ενεργοποίηση του NOX(
- η επικατεχίνη ρυθμίζει την ανοδική σηματοδότηση του NOX παρεμποδίζοντας τον συνδυασμό προσδεμάτων με υποδοχείς που μπορούν να προωθήσουν το NOX.

Γ) Επίδραση κατεχινών σε μεταβολικά μονοπάτια



Εικόνα 11 : Ενεργοποίηση του NF – Κβ σε πολλαπλά επίπεδα από τις κατεχίνες

Ο Nrf2 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από τις δυσμενείς επιδράσεις του οξειδωτικού στρες. Συνήθως, ο Nrf2 παραμένει σε αδρανή κατάσταση στο κυτταρόπλασμα και είναι συνδεδεμένος με την πρωτεΐνη Keap1 σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο. Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, η σύνδεση του Nrf2 με την Keap1 θα χαθεί, με αποτέλεσμα τη μετατόπισή του στον πυρήνα και τη σύνδεσή του με αλληλουχίες εκκινητών που ονομάζονται «αντιοξειδωτικά στοιχεία απόκρισης» (AREs), ρυθμίζοντας την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων τα οποία μπορούν να κωδικοποιήσουν πρωτεΐνες με

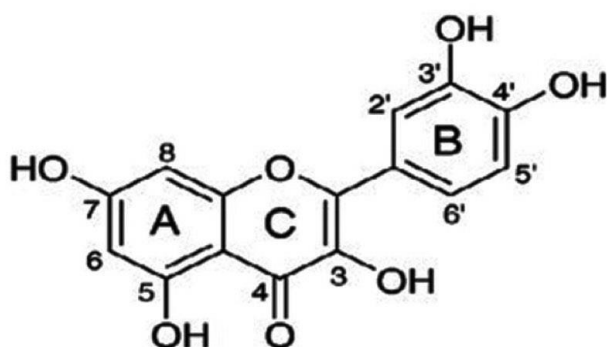
κυτταροπροστατευτικές λειτουργίες, όπως ένζυμα αναγέννησης NADPH (Cesar G.Fraga et al 2011). Οι κατεχίνες του τσαγιού αποκλείουν την ενεργοποίηση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση του IκΒ (αναστολέας της ΚΒ). Αυτή η δράση εμποδίζει τον NF-κΒ να αναστείλει τους ενεργοποιημένους από τον πολλαπλασιαστή υπεροξειδάσης υποδοχείς (PPARs) που είναι σημαντικοί παράγοντες μεταγραφής για το μεταβολισμό των λιπιδίων. Έτσι, επάγεται η έκφραση mRNA των ενζύμων που μεταβολίζουν τα λιπίδια όπως η ακυλο-ΟοΑ οξειδάση και η μέση αλυσίδα ακυλική-ΟοΑ αφυδρογονάση (MCAD), αυξάνοντας τη δραστηριότητά τους (Hursel and Westerterp-Plantenga, 2013).

2.2 Κερκετίνη

2.2.1 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης

Αντιοξειδωτικός χαρακτήρας κερκετίνης

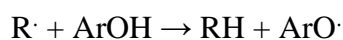
1. Η κερκετίνη ανήκει στην κατηγορία των φλαβονολών και χαρακτηρίζεται από την παρουσία 5 ομάδων υδροξυλίων στις θέσεις 3, 5, 7, 3' και 4'. Έχει κίτρινο χρώμα, είναι ελάχιστα διαλυτή σε ζεστό νερό, αρκετά διαλυτή σε αλκοόλ και λιπίδια και αδιάλυτη σε κρύο νερό. Βρίσκεται στα φρούτα (κυρίως σε εσπεριδοειδή), στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά καθώς και σε πολλούς σπόρους. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν σε λαχανικά, όπως κρεμμύδια και μπρόκολα, φρούτα, όπως μήλα, κεράσια και μούρα, καθώς και ποτά όπως τσάι και κόκκινο κρασί (Parasuraman et al., 2016). Η αντιοξειδωτική ικανότητα της κερκετίνης προκύπτει από την δυνατότητα να καταλύει τις ελεύθερες ρίζες και να δεσμεύει ιόντα μεταβατικών μετάλλων. Έτσι, αναστέλλεται η υπεροξειδωση των λιπιδίων χαμηλής πυκνότητας (LDL). Η κερκετίνη και οι δεσμευμένες σε ζάχαρη ή γλυκοζυλιωμένες μορφές της αντιπροσωπεύουν το 60-75% της πρόσληψης φλαβονοειδών (Bouktaib et al. 2002).



Εικόνα 12 : Χημική δομή κερκετίνης

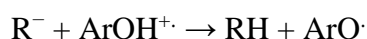
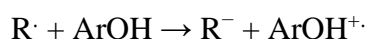
Κύριοι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

1) HAT = Hydrogen Atom Transfer



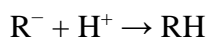
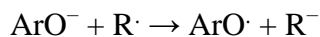
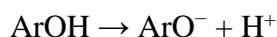
Ο μηχανισμός HAT είναι ένας κύριος μηχανισμός κατά τον οποίο το άτομο υδρογόνου με διάσπαση ομολυτικού δεσμού μεταφέρεται από το αντιοξειδωτικό στην ελεύθερη ρίζα, διακόπτοντας την αλυσιδωτή οξειδωτική αντίδραση. Η ενθαλπία διάσπασης δεσμών (BDE - Bond dissociation enthalpy) είναι η αριθμητική παράμετρος που σχετίζεται με τον μηχανισμό HAT και χαρακτηρίζει τη σταθερότητα της αντίστοιχης ομάδας υδροξυλίου. Η χαμηλότερη τιμή BDE υποδεικνύει ότι η σταθερότητα του αντίστοιχου δεσμού O-H είναι χαμηλότερη και ο αντίστοιχος δεσμός O-H μπορεί εύκολα να σπάσει. οι OH ομάδες στον B-δακτύλιο και τον C-δακτύλιο συμβάλλουν κυρίως στις αντιοξειδωτικές δραστηριότητες της κερκετίνης και των γλυκοζιτών της, ενώ οι OH ομάδες στο A-δακτύλιο παίζουν σχετικά μικρό ρόλο στο μηχανισμό HAT.

2) SET-PT = Single Electron Transfer followed by Proton Transfer

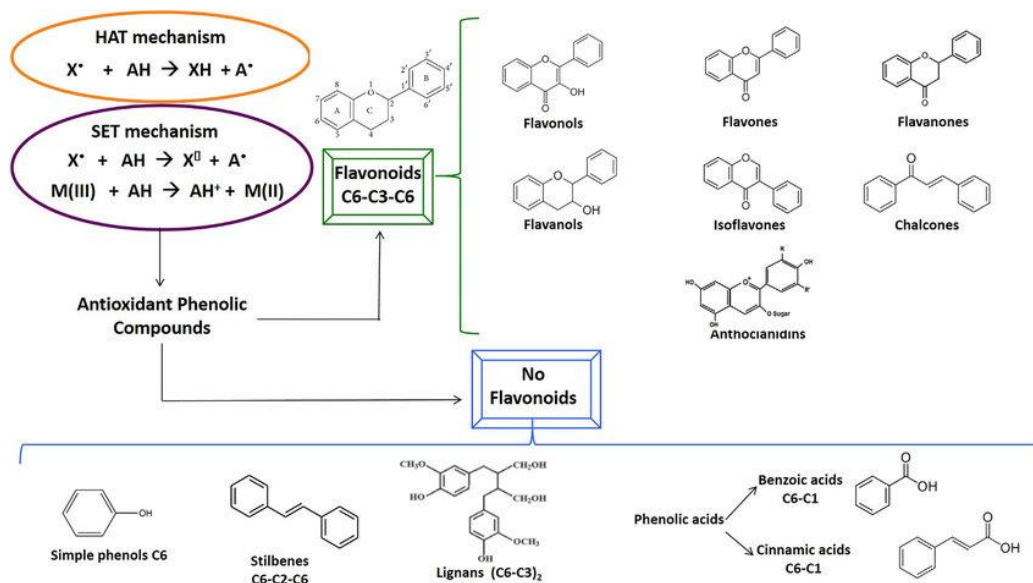


Η σάρωση των ελεύθερων ριζών μπορεί επίσης να επιτευχθεί με τη δωρεά ενός μόνο ηλεκτρονίου από το φυσικό φλαβονοειδές. Η ικανότητα ενός φλαβονοειδούς να δίνει ηλεκτρόνια σχετίζεται με εκτεταμένη ηλεκτρονική απομετακίνηση σε ολόκληρο το μόριο. Η ενθαλπία διάσπασης πρωτονίων (PDE) χαρακτηρίζει το δεύτερο στάδιο του μηχανισμού SET-PT και μπορεί να υποδεικνύει τη θερμοδυναμικά προτιμώμενη OH ομάδα για αποπρωτονίωση από τη ρίζα κατιόντων. Οι ομάδες OH στον B-δακτύλιο και στον C-δακτύλιο συνεισφέρουν σημαντικά στο δεύτερο στάδιο του μηχανισμού SET-PT, ενώ οι OH ομάδες στο A-δακτύλιο παίζουν σχετικά μικρό ρόλο.

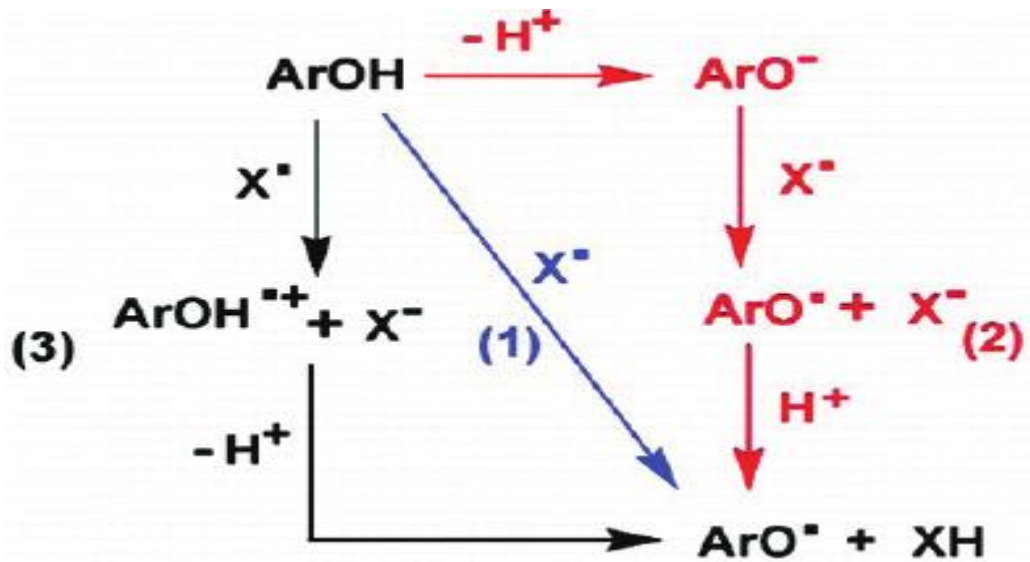
3) SPLET = Sequential Proton Loss Electron Transfer



Σύμφωνα με τον μηχανισμό του SPLET, ο σχηματισμός φλαβονοειδούς ανιόντος είναι το πρώτο βήμα, το οποίο διέπεται από την οξύτητα της ομάδας OH στο φλαβονοειδές. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό όχι μόνο στο πρώτο στάδιο του μηχανισμού SPLET, αλλά επίσης συνδέεται με δράση χηλικών μετάλλων φλαβονοειδών. Ο σχηματισμός φλαβονοειδούς ρίζας είναι το δεύτερο βήμα, το οποίο διέπεται από την ενθαλπία μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETE). Οι υδροξυλικές ομάδες στο B-δακτύλιο και στον C-δακτύλιο συνεισφέρουν σημαντικά στο δεύτερο στάδιο του μηχανισμού SPLET, ενώ οι OH ομάδες στον A-δακτύλιο παίζουν σχετικά μικρό ρόλο (Zheng et al., 2017).



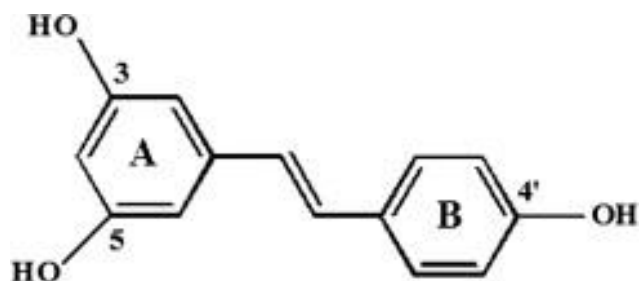
Εικόνα 13 : Μηχανισμοί μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT) και μεταφοράς μονήρες ηλεκτρονίου (SET) των φαινολικών αντιοξειδωτικών ενώσεων και η ταξινόμησή τους. Όπου X : εσωτερικές ελεύθερες ρίζες, AH : αντιοξειδωτικό, M : μέταλλο, C6 : αρωματικός δακτύλιος, C1, C2 ή C3 : αναφέρεται σε πλευρικές αλυσίδες ή ενδιάμεσες αλυσίδες.



Εικόνα 14 : Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δράσης φαινολών: (1) HAT, (2) SPLET, (3) SET – PT. ArOH - : φαινολικό αντιοξειδωτικό, X[•] : ελεύθερο

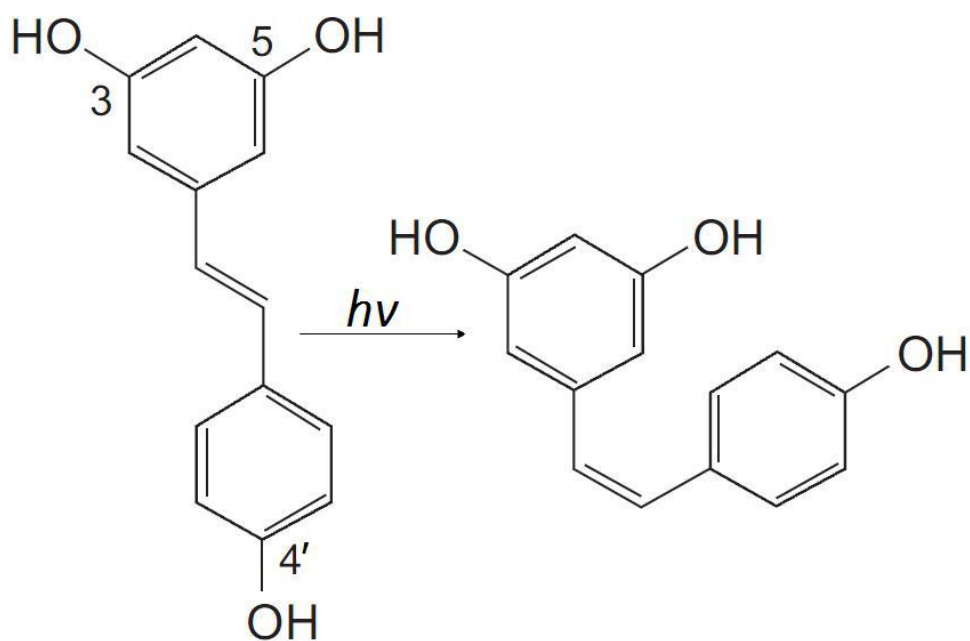
2.3 Ρεσβερατρόλη

(3,4,5-trihydroxystilbene)



Εικόνα 15 : Χημική δομή ρεσβερατρόλης

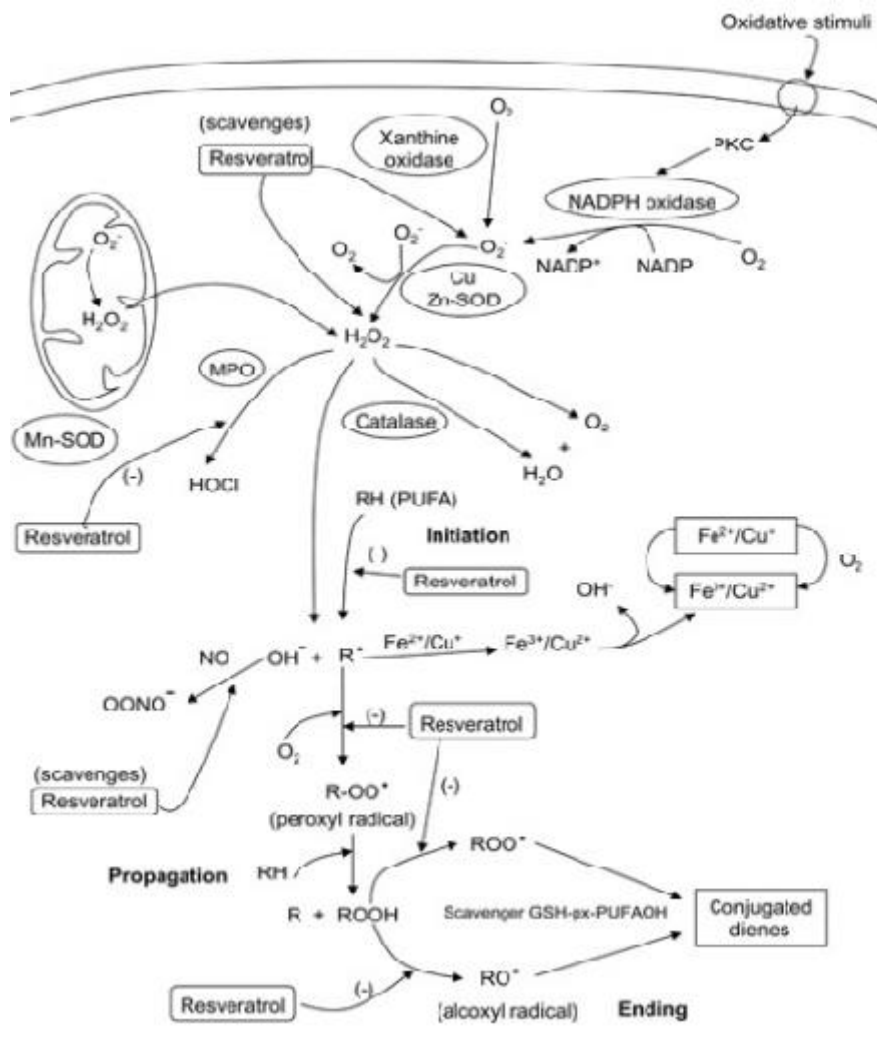
Η ρεσβερατρόλη (3,4', 5-τριυδροξυστυλβένιο) είναι μία πολυφαινόλη η οποία συγκαταλέγεται στην οικογένεια των στυλβενίων. Βρίσκεται σε διάφορα φυτά, συμπεριλαμβανομένων των σταφυλιών, των μούρων και των φιστικιών. Είναι επίσης παρούσα στα κρασιά, ειδικά στα ερυθρά κρασιά (de la Lastra and Villegas, 2007).



Εικόνα 16 : Χημική δομή trans και cis ρεσβερατρόλης

2.3.1 Αντιοξειδωτικός χαρακτήρας ρεσβερατρόλης

Η ρεσβερατρόλη αναφέρεται ως ένα από τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά έναντι των ROS και του οξειδωτικού στρες. Αυτή η ιδιότητα σχετίζεται με την παρουσία τριών ομάδων υδροξυλίου στις θέσεις 3,4 ' και 5, καθώς και την παρουσία αρωματικών δακτυλίων και ενός διπλού δεσμού στο μόριο. Εμφανίζεται σε δύο μορφές, trans και cis ισομερή, με την trans-resveratrol να είναι η στερεοχημική μορφή που συναντάται περισσότερο. Η θέση των ομάδων υδροξυλίου είναι περισσότερο ευνοϊκή για την χηλικοποίηση του χαλκού στο trans- ισομερές παρά στο cis-ισομερές. Έχει αναφερθεί πως λόγω της υδροξυλιωμένης δομής της ρεσβερατρόλης, είναι δυνατόν να σχηματιστεί ένα ριζικό παράγωγο σταθεροποιημένο με την μετεγκατάσταση δύο ηλεκτρονίων μεταξύ των δύο αρωματικών κύκλων και τη γέφυρα μεθυλενίου που συνδέει τους δύο αυτούς κύκλους. Παρατηρήθηκε πως η απομάκρυνση ομάδων υδροξυλίου ή η αντικατάστασή τους με ομάδες -OCH₃ οδηγεί σε απώλεια αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της ένωσης. Η ρεσβερατρόλη έχει την ικανότητα τόσο να καταστρέφει ελεύθερες ρίζες όσο και να λειτουργεί ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, επάγοντας τη δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων. Η ικανότητα μίας πολυφαινόλης να δρα ως αντιοξειδωτικό εξαρτάται από τις οξειδοαναγωγικές ιδιότητες των φαινολικών υδρόξυ-ομάδων και τη δυνατότητα απομάκρυνσης ηλεκτρονίων σε όλη τη χημική της δομή. Η ρεσβερατρόλη αυξάνει την έκφραση ορισμένων ενζύμων υπεύθυνων για τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας σε ένα κύτταρο, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η καταλάση. Επίσης, ελαττώνει τη δραστικότητα ενζύμων που παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην παραγωγή των ROS, όπως η οξειδάση την ξανθίνης ("Pandey and Rizvi, 2011"; "Gerszon et al., 2014").

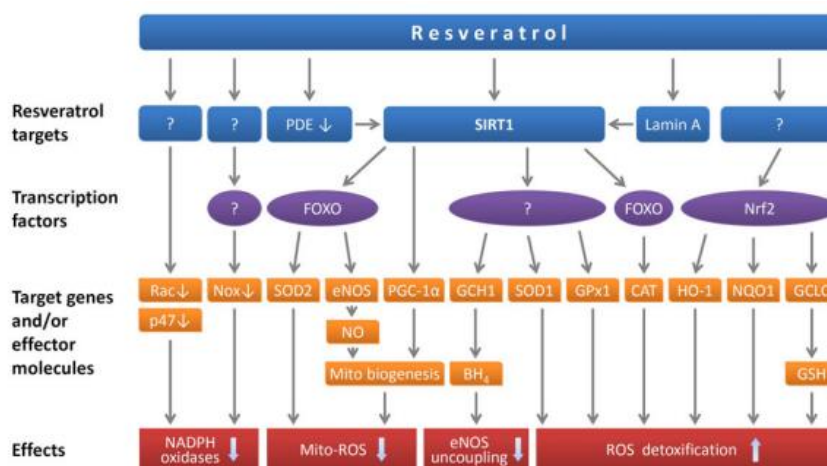


Εικόνα 17 : Αντιοξειδωτικό δυναμικό ρεσβερατρόλης

Αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης

Η οξείδωση της LDL είναι το κύριο επεισόδιο στην έναρξη του ενδοθηλιακού τραυματισμού και της επαγωγικής έκφρασης προ-φλεγμονωδών μορίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έπειτα από κατανάλωση ρεσβερατρόλης ή συστηματικής διατροφής πλούσιας σε ρεσβερατρόλη, παρατηρήθηκε αύξηση στα αντιοξειδωτικά επίπεδα του πλάσματος καθώς και μειωμένη υπεροξειδωση λιπιδίων. Η αναστολή της οξείδωσης της LDL πραγματοποιείται κυρίως με την απομάκρυνση υπεροξειδίων λιπιδίων που παράγονται στη μεμβράνη (Colica et al., 2018). Επιπλέον, η ρεσβερατρόλη μειώνει τις ROS ενδοκυτταρικά και προλαμβάνει την οξείδωση της LDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η οξείδωση που προκαλείται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα επηρεάζεται άμεσα από τα λιπο-υπεροξειδία που παράγονται ενδοκυτταρικά και έπειτα

μεταφέρονται στην LDL. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως η ρεσβερατρόλη αναστέλλει λιποξυγενάσες. Συγκεκριμένα, σε ανθρώπινα ουδετερόφιλα, η ρεσβερατρόλη αναστέλλει κυτταρικές λιποξυγενάσες (LO), όπως οι 5-LO και οι 15-LO, οι οποίες είναι γνωστές για την παραγωγή φλεγμονωδών προϊόντων (Maccarrone et al., 1999).



Εικόνα 18: Κύριοι στόχοι της ρεσβερατρόλης που σχετίζονται με τις αντιοξειδωτικές επιδράσεις της, διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες, γονίδια-στόχοι και αποτελέσματα.

Η ρεσβερατρόλη αναστέλλει την παραγωγή ROS με τη μεσολάβηση της NADPH οξειδάσης διαμέσου της καθοδικής ρύθμισης των καταλυτικών υπομονάδων (πρωτεΐνες NOX), αναστολή της φωσφορυλίωσης του p47phox και αναστολή της μεμβράνης του Rac1.

Sirtuin 1 = Επίσης γνωστή ως NAD-εξαρτώμενη δυακετυλάση sirtuin-1, είναι μια πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο SIRT1. Το SIRT1 είναι ένα ένζυμο που αποακετυλιώνει πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην κυτταρική ρύθμιση (Fusco, Maulucci and Pani, 2012).

Η ρεσβερατρόλη απενεργοποιεί άμεσα το SIRT1 σε ορισμένα υποστρώματα. Μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει το SIRT1 έμμεσα ενισχύοντας την δέσμευση του με το έλασμα A (laminA), το οποίο είναι ένας πρωτεϊνικής φύσεως ενεργοποιητής του SIRT1. Ένας άλλος τρόπος έμμεσης ενεργοποίησης είναι μέσω μίας αλληλουχίας σηματοδότησης που περιλαμβάνει την αναστολή PDE και επακόλουθη ανύψωση του κυτταρικού NAD⁺.

FOXO1: μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζεται από το SIRT1

Μεταξύ των στόχων του SIRT1, βρίσκονται και οι μεταγραφικοί παράγοντες FOXO. Αυτοί οι παράγοντες συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης μέσω ρύθμισης αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως SOD2, καταλάση, OAT, eNOS.

Επιπλέον, η ρεσβερατρόλη διεγείρει τη μιτοχονδριακή βιογένεση, συνεπώς αυξάνει τη μιτοχονδριακή μάζα και ελαττώνεται η παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια. Αυτό συμβαίνει διότι ο πολλαπλασιασμός των μιτοχονδρίων μειώνει τη ροή ηλεκτρονίων ανά μονάδα μιτοχονδρίων. Στη μιτοχονδριακή βιογένεση εμπλέκονται η SIRT1, η εξαρτώμενη παραγωγή NO και η αποακετυλίωση της PGC-1α. Τα επίπεδα των μιτοχονδριακών ROS δε μειώνονται μόνο μέσω της ελάττωσης της παραγωγής, αλλά και με την αύξηση της ρύθμισης αντιοξειδωτικών συστημάτων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την επιτάχυνση της απομάκρυνσης των ROS.

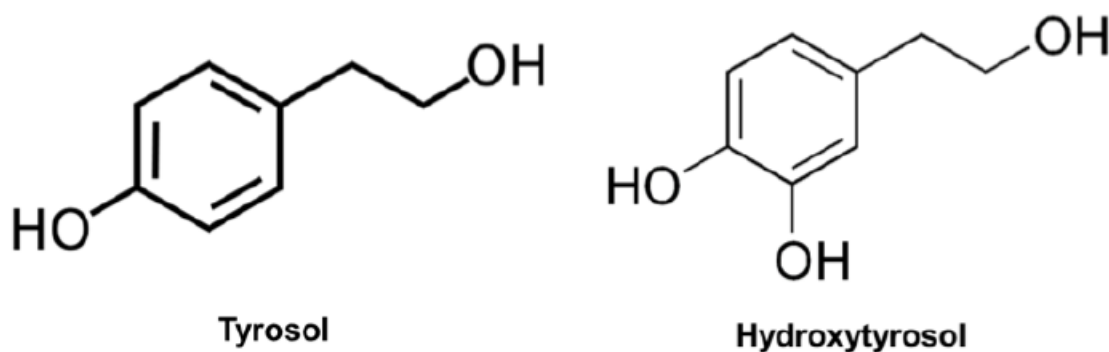
SOD: Ένζυμα που καταλύουν τη διάσπαση του $O_2^{\bullet-}$ σε υπεροξειδίο του υδρογόνου, με αποτέλεσμα ένα βασικό αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα.

Η έκφραση του SOD2 ενισχύεται από την ρεσβερατρόλη με τρόπο εξαρτώμενο από το SIRT1. Συγκεκριμένα, μία ρύθμιση προς τα πάνω (up-regulation) του SOD2 αυξάνει την μιτοχονδριακή παραγωγή του H_2O_2 , το οποίο διεισδύει εύκολα στις μιτοχονδριακές μεμβράνες και διαχέεται στο κυτταρόπλασμα.

GPx1 = Οι πρωτεΐνες υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης μετατρέπουν το υπεροξειδίο υδρογόνου σε νερό και τα υπεροξειδία λιπιδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες τους. Η GSHυπεροξειδάση (GPx1) είναι η πιο άφθονη και είναι ένα βασικό αντιοξειδωτικό ένζυμο σε πολλούς τύπους κυττάρων (Lubos et al., 2011).

Η χορήγηση ρεσβερατρόλης έχει δείξει πως οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα κυτταροπλασματικού H_2O_2 . Αυτό μπορεί να προκύψει είτε από αυξημένη αποτοξίνωση του H_2O_2 που προκαλείται από το GPx1 στα μιτοχόνδρια, είτε με ενισχυμένη απενεργοποίηση H_2O_2 από το GPx1 και την καταλάση στο κυτταρόπλασμα. Τόσο η καταλάση, όσο και το GPx1 ρυθμίζονται από την ρεσβερατρόλη.

2.4 Τυροσόλη/Υδροξυτυροσόλη



Εικόνα 19 : Χημικές δομές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης.

Η υδροξυτυροσόλη (HT) και η τυροσόλη (T) αποτελούν φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται κυρίως στο λάδι και στο κρασί, ενώ η υδροξυτυροσόλη συγκαταλέγεται στις πιο μεγάλες ενώσεις στα φύλλα ελιάς. Επίσης, μπορεί να πραγματοποιηθεί και ενδογενής σύνθεση αυτών στον ανθρώπινο οργανισμό ως υποπροϊόντα του μεταβολισμού της ντοπαμίνης και της τυραμίνης αντίστοιχα (Rodríguez-Morató et al., 2016). Παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιδιαβητικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Επίσης, εμφανίζουν ευεργετικά αποτελέσματα σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

2.4.1 Σχηματισμός, απορρόφηση, μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα

Η τυροσόλη και η υδρόξυ-τυροσόλη παρουσιάζουν πανομοιότυπη δομή, με τη διαφορά πως η HT διαθέτει μία επιπλέον ομάδα -OH, η οποία σχηματίζει μία ομάδα κατεχόλων. Σε αυτή την ομάδα αποδίδεται η υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση της HT συγκριτικά με την T, καθώς σταθεροποιεί τις ελεύθερες ρίζες μέσω του σχηματισμού διαμοριακών δεσμών υδρογόνου (Warleta et al., 2011).

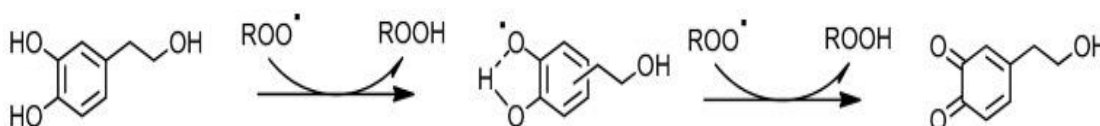
Η τυροσόλη αποτελεί πρόδρομο μόριο της υδροξυτυροσόλης, διότι μελέτες έχουν δείξει πως έπειτα από χορήγηση της πρώτης σε επίμυες αυξήθηκε η απέκκριση της τελευταίας μέσω των ούρων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Εξετάζεται η πιθανότητα να εμπλέκεται το κυτόχρωμα P450 και πιο συγκεκριμένα τα ισοένζυμα CYP2A6 και CYP2D6 (Rodríguez-Morató et al., 2016). Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε, τόσο η υδροξυτυροσόλη όσο και η τυροσόλη αποτελούν προϊόντα του μεταβολισμού της ντοπαμίνης και της τυραμίνης αντίστοιχα. Έχει αναφερθεί πως υπήρξε αυξημένος σχηματισμός των προαναφερθεισών ενώσεων έπειτα από χορήγηση αιθανόλης, καθώς εκείνη επιδρά στο μεταβολικό μονοπάτι της ντοπαμίνης και της τυραμίνης. (“I and M, 1970”; “Tacker, McIsaac and Creaven, 1970”).

Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη επιδρούν στον οργανισμό σε σχέση με την ενεργή βιοδιαθέσιμη ποσότητά τους και όχι με την ποσότητα που καταναλώθηκε αρχικά (Holst and Williamson, 2008). Για αυτό το λόγο, σε κάποιες περιπτώσεις, ενώ εμφανίζουν υψηλή απορρόφηση, η βιοδιαθεσιμότητα είναι μειωμένη (Vissers et al., 2002). Το γεγονός αυτό έχει αποδοθεί στο μεταβολισμό που υφίσταται η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη στο ήπαρ και στο έντερο (Rodriguez-Morato et al., 2016).

2.4.2 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης

- **Εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών**

Η υδροξυτυροσόλη καταστρέφει τις ελεύθερες ρίζες και ταυτόχρονα δρα ως χηλικός παράγοντας μετάλλων. Η υψηλή αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα της HT αποδίδεται στην παρουσία του τμήματος *ο*-διυδροξυφαινυλίου. Ο τρόπος λειτουργίας του είναι η διακοπή της αλυσίδας με την παροχή ενός ατόμου υδρογόνου σε υπεροξυλικές ρίζες (ROO[•]). Με τον τρόπο αυτό η αρκετά δραστική ROO[•] αντικαθίσταται με ρίζα HT[•], η οποία δεν είναι δραστική λόγω της παρουσίας ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου στην ρίζα φαινοξυλίου (Karkonić et al., 2019).



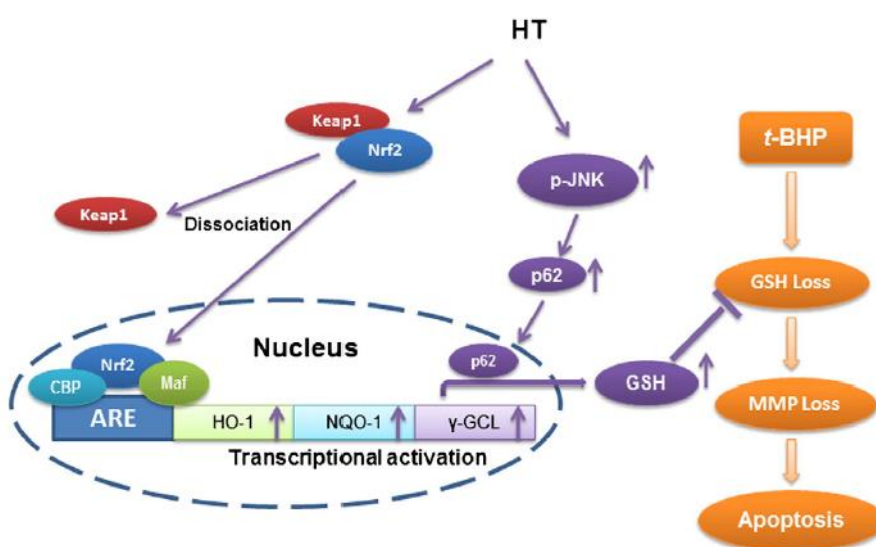
Εικόνα 20 : Εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών από υδροξυτυροσόλη.

- **Κυτταρική σηματοδότηση**

Η HT παρέχει πρόσθετη αντιοξειδωτική προστασία με την αύξηση των ενδογενών αμυντικών συστημάτων έναντι του οξειδωτικού στρες. Αυτό επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση διαφόρων κυτταρικών ειδών σηματοδότησης.

Στο ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα συγκαταλέγονται μόρια που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού και αντιοξειδωτικά ένζυμα. Ο πυρηνικός παράγοντας Nrf2 (nuclear factor-erythroid-2-related factor 2) ελέγχει τη βασική δραστηριότητα και την επαγωγή 200 περίπου γονιδίων μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται αντιοξειδωτικά και φάσης II ένζυμα και σχετιζόμενες πρωτεΐνες όπως η καταλάση,

υπεροξειδική δισμουτάση (Παπαγαλάνης, 2015). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο Nrf2 βρίσκεται ανενεργός στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένος με την πρωτεΐνη Keap1. Η πρωτεΐνη Keap1 προκαλεί την αποδόμηση του Nrf2 στα πρωτεοσώματα. Μελέτες σχετικές με τη διαμόρφωση οδών σηματοδότησης με σκοπό την πρόληψη βλάβης λόγω οξειδωτικού στρες, έχουν δείξει πως η νευροπροστασία που παρέχει η Htyr σχετίζεται άμεσα με το Nrf2, καθώς με την ενεργοποίηση της οδού Keap1-Nrf2 ενεργοποιείται ένας αριθμός κυτταροπροστατευτικών ενζύμων, όπως η λιγάση της γ-γλουταμινικής-κυστεΐνης, τα HO-1, NQO1 και η αναγωγή της θειορεδοξίνης. Συνεπώς, η HT προστατεύει τα κύτταρα από θάνατο προκαλούμενο από υπεροξείδιο του υδρογόνου και τα προστατεύει από βλάβη προκαλούμενη από 6-υδροξυδοπαμίνη. Αυτή η προστασία είναι άμεσα συνδεδεμένη με τον Nrf2, διότι μείωση του Nrf2 απέκλεισε τις νευροπροστατευτικές ιδιότητες της HT (Peng et al., 2015). Επιπροσθέτως, η HT ενεργοποιεί δύο πρωτεΐνες σηματοδότησης που σχετίζονται με τη μετατόπιση του Nrf2, την πρωτεϊνική κινάση B και τις εξωκυττάρειες ρυθμιζόμενες κινάσες. Αυτές οι δύο οδοί είναι σημαντικές όσον αφορά την πυρηνική μετατόπιση του Nrf2, την αυξημένη έκφραση και δραστηριότητα του ενζύμου και την ευεργετική επίδραση κατά του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από την HT. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη, σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2 με βλάβες προκληθείσες από τριτ-βούτυλ-υδροϋπεροξείδιο (t-BHP) χορηγήθηκε HT με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης και δραστηριότητας των σχετιζόμενων με τη γλουταθειόνη ενζύμων όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η αναγωγή της γλουταθειόνης και η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (Martín et al., 2010).



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση των πιθανών μηχανισμών προστασίας της υδροξυτυροσόλης έναντι οξειδωτικής βλάβης προκαλούμενης από τριτ-βούτυλ-υδροϋπεροξειδίο (t-BHP).

Επιπλέον, η HT δρα προστατευτικά έναντι της κυτταρικής απόπτωσης προκαλούμενης από t-BHP. Το t-BHP ελαττώνει την GSH και προκαλεί απώλεια MMP και απόπτωση. Η υδροξυτυροσόλη αυξάνει τα επίπεδα GSH αντισταθμίζοντας την απώλεια που προκλήθηκε από t-BHP. Επιπλέον όμως, προκαλεί παραγωγή GSH μέσω ενεργοποίησης Nrf2. Η ενεργοποίηση του Nrf2 από την HT οδηγεί στην παραγωγή συγκεκριμένων κυτταροπροστατευτικών γονιδίων, όπως η οξυγενάση της αίμης (HO-1), οξειρεκτουδάση κινόνης-1 (NQO-1) και λιγάση της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης (γ-GCL), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ως θετικοί μάρτυρες για την ενεργοποίηση του Nrf2. Τέλος, η HT ενεργοποίησε τις οδούς PI3/Akt και Mtor/p70S6-κινάσης, οι οποίες συμβάλλουν στη σηματοδότηση στα στρεσογόνα κύτταρα (Zou et al., 2012).

Η τυροσόλη αποτελεί έναν αποτελεσματικό κυτταρικό αντιοξειδωτικό παράγοντα, μια φαινολική ένωση που βρίσκεται στο παρθένο ελαιόλαδο, ενώ μετά την κατάποση υφίσταται εκτεταμένο εντερικό / ηπατικό μεταβολισμό πρώτης διέλευσης. Οι γνωστές τρεις κύριες μεταβολικές τροποποιήσεις της Tyr είναι γλυκουρονίωση, θείωση και μεθυλίωση. Η τυροσόλη παρέχει ασθενή αντιοξειδωτική δράση. Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης. Η τυροσόλη συγκαταλέγεται στις σταθερές ενώσεις, συνεπώς υπόκειται πολύ λιγότερο σε αυτοοξειδωση συγκριτικά με άλλες πολυφαινόλες, ενώ διατηρεί την αντιοξειδωτική της δράση ακόμη και σε κρίσιμες συνθήκες. Συγκεκριμένα, παρουσία οξειδωμένης LDL και ενώ είχαν ξεκινήσει φαινόμενα αυτοοξειδωσης, η τυροσόλη διατήρησε ανέπαφη την αντιοξειδωτική της δράση. Στην ίδια περίπτωση, σε άλλα πιο δραστικά φυσικά φλαβονοειδή, η αντιοξειδωτική τους δράση μειώθηκε, ενώ άλλα έγιναν ακόμη και προ-οξειδωτικά (Perona et al, 2006).

Προστασία από οξειδωτικό στρες.

Η τυροσόλη αναστέλλει την οξειδωτική βλάβη των μυϊκών κυττάρων L6 με μερική αναστολή του επαγόμενου από H₂O₂ κυτταρικό θάνατο. Η αναστολή επιτυγχάνεται μέσω ρύθμισης των ERK, JNK και p38 MAPκινάσης, καθώς και μέσω της αύξησης παραγωγής ATP. Συγκεκριμένα, η βιωσιμότητα των κυττάρων κατά την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από το H₂O₂ αυξήθηκε με τη χρήση θεραπείας τυροσόλης (Lee et al., 2018).

Επιπλέον, ένα από τα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά της τυροσόλης που αφορούν την παραγωγή ROS είναι το χρονικό διάστημα που επιδρά. Ενώ άλλες πολυφαινόλες εμποδίζουν την αύξηση των ριζών που σχετίζονται με την οξειδωτική διαδικασία σε κάθε χρονικό σημείο που δοκιμάζονται, η τυροσόλη αντισταθμίζει την άνοδο μόνο αργότερα. Συγκεκριμένα, σε σύγκριση με την υδροξυτυροσόλη, ενώ και οι δύο ενσωματώνονται στα κύτταρα, ενδοκυτταρικά φέρονται διαφορετικά. Η υδροξυτυροσόλη μεταβολίζεται απευθείας, επομένως εξαφανίζεται, ενώ η τυροσόλη συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά και προστατεύει μακροχρόνια τον οργανισμό. Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί πως η τυροσόλη είναι αποτελεσματική σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από ότι η υδροξυτυροσόλη στην προκειμένη. Τέτοιου είδους ευρήματα δικαιολογούν τον ισχυρισμό πως η τυροσόλη, ενώ διαθέτει ακατάλληλη χημική δομή για να δράσει ως αντιοξειδωτικό, προκαλεί ισχυρά αντιοξειδωτικά αποτελέσματα στα κυτταρικά συστήματα (Roberta Di Benedetto et al, 2006).

Λιπιδική υπεροξείδωση

Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, ένα από τα πρώτα στάδια είναι η υπεροξείδωση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα. Η ευαισθησία της LDL σε οξειδωτικές τροποποιήσεις επηρεάζεται από τα οξειδωτικά (ενδοκυτταρικά ή μη) και τη σύνθεση λιπαρών οξέων (Esterbauer et al., 1992). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην κυτταρική σειρά Caco-2 με σκοπό την αξιολόγηση της βλάβης από οξειδωμένη LDL, καθώς και την προστατευτική δράση της τυροσόλης, παρατηρήθηκε πως η τελευταία δρα τόσο πριν την οξείδωση, όσο και κατά τη διάρκεια. Συγκεκριμένα, η τυροσόλη έδρασε προστατευτικά έναντι της κυτταροτοξικής βλάβης και της απόπτωσης των κυττάρων και εμφάνισε ενδοκυτταρική αντιοξειδωτική ικανότητα, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως μπορεί να αντισταθμίσει ενδοκυτταρικά τα επαγόμενα από το ox-LDL αποτελέσματα τροποποιώντας το δυναμικό οξειδοαναγωγής των κυττάρων (Giovannini et al., 1999).

Κυτταρική σηματοδότηση

Η οξυγενάση της αίμης (HO-1) είναι ένα αντιφλεγμονώδες και αντιοξειδωτικό ένζυμο φάσης II που ρυθμίζεται από τον παράγοντα Nrf2. Το HHO-1/Nrf2 μεταβολικό μονοπάτι έχει άμεση σχέση με το οξειδωτικό στρες. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια με σκοπό τη διερεύνηση της δράσης της τυροσόλης στην οξεία πνευμονική βλάβη που προκαλείται από λιποπολυσακχαρίτη, παρατηρήθηκε πως ενισχύθηκε η έκφραση της καταλάσης (CAT) και της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), ένζυμα τα οποία προσφέρουν προστασία στους

πνευμονικούς ιστούς κατά της οξειδωτικής βλάβης. Επιπλέον, η χορήγηση της τυροσόλης πριν τη θεραπεία ενίσχυσε την έκφραση HO-1 και την ενεργοποίηση του Nrf2. Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) είναι προ-φλεγμονώδης παράγοντας αντίδρασης. Κατά τη χορήγηση LPS πραγματοποιείται ενεργοποίηση και διήθηση των κύριων φλεγμονωδών κυττάρων σε πνευμονικούς ιστούς ώστε να γίνει μαζική απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOs, με σκοπό την ενίσχυση της φλεγμονώδους αντίδρασης. Η τυροσόλη μείωσε σημαντικά τις συγκεντρώσεις των παραπάνω, μειώνοντας την έκφρασή τους (Wang et al., 2017).

Επίσης, έρευνα η οποία πραγματεύεται τις ανεπιθύμητες αλλαγές που προκαλούνται από οξεία έκθεση κυττάρων HepG2 σε αιθανόλη, καθώς και το ρόλο της τυροσόλης όσον αφορά την ανατροπή, τη μείωση ή τον ανταγωνισμό αυτών των αλλαγών, έδειξε ένα φάσμα επιδράσεων της τελευταίας στους μοριακούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, η οξεία χορήγηση αιθανόλης οδηγεί σε αναστολή ανάπτυξης των κυττάρων σε ποσοστό 50% με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Μετά από θεραπεία με τυροσόλη, το ποσοστό της αναστολής ανάπτυξης μειώθηκε στο 10%.

Η ERK1 / 2 είναι μία οδός σηματοδότησης η οποία καταλύει τη φωσφορυλίωση εκατοντάδων κυτταροπλασματικών και πυρηνικών υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων ρυθμιστικών μορίων και παραγόντων μεταγραφής. Επιπλέον, έχει άμεση σχέση με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την επιβίωση και την ομοιόσταση (Caraglia et al., 2011). Η θεραπεία με τυροσόλη είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των φωσφορυλιωμένων ισομορφών ERK 1/2, συγκαταλέγοντάς το στις προστατευτικές δράσεις που πυροδοτεί η τυροσόλη.

Ο καταστολέας όγκου p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που επηρεάζει διάφορες διαδικασίες, όπως η διακοπή του κυτταρικού κύκλου, η γήρανση και η απόπτωση. Παρόλα αυτά, ο ρόλος που διαδραματίζει στις κυτταρικές αποκρίσεις είναι εξαρτώμενος από το περιβάλλον. Σε χαμηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες, το p53 εμφανίζει αντιοξειδωτικές δράσεις και βοηθά στην επιβίωση και την επιδιόρθωση των κυττάρων με μικρούς τραυματισμούς, ενώ σε υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες, το p53 εμφανίζει υπεροξειδωτικές δραστηριότητες και προκαλεί κυτταρική απόπτωση. Η απόπτωση που προκαλείται από την αιθανόλη απαιτεί την ενεργοποίηση του p53, ενώ η γενετική απομάκρυνση του p53 απομακρύνει την ηπατική βλάβη που προκαλεί η αιθανόλη. Στη συγκεκριμένη μελέτη αυξήθηκε η έκφραση του p53/p21 μετά τη χορήγηση αιθανόλης, ενώ η έκθεση σε τυροσόλη μείωσε την έκφραση του p21 και ενίσχυσε

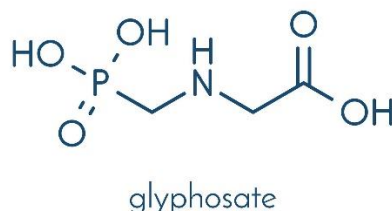
την έκφραση των Cas3, Cas9, με αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής απόπτωσης (Stiuso et al., 2016).

| Κυτταρική σειρά / Μεταγραφικός παράγοντας | Επίδραση οξείας χορήγησης αιθανόλης | Αποτέλεσμα ευεργετικής δράσης της τυροσόλης |
|--|--|---|
| HepG2 | Νέκρωση-κυτταρικός θάνατος | Αναστολή ανάπτυξης περίπου 50% |
| HepG2 / ERK1/2 | Οξεία κυτταροτοξικότητα | Αύξηση των φωσφορυλιωμένων ισομορφών ERK1 / 2 |
| HepG2/ p53, p21, κασπάση 3,9 | Απόπτωση / Ηπατική βλάβη | Εμποδίζει την οδό p53 / p21, ενίσχυση Cas 3,9 με επακόλουθη αναστολή απόπτωσης. |

Πίνακας 5 : Αποτελέσματα θεραπείας με τυροσόλη έπειτα από χορήγηση αιθανόλης σε κυτταρικές σειρές.

3.ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΑ

3.1 GLYPHOSATE



Εικόνα 22 : Χημική δομή glyphosate

Η γλυφοσάτη (Gly) είναι ένα ζιζανιοκτόνο ευρέος φάσματος, το οποίο βρίσκεται στην αγορά προς πώληση από το 1974 και έκτοτε έγινε γρήγορα το κορυφαίο φυτοφάρμακο στην παγκόσμια αγορά αγροχημικών. Διατίθεται σε διάφορες χημικές μορφές, όπως άλας ισοπροπυλαμίνης, άλας αμμωνίου, άλας διαμμωνίου, άλας διμεθυλαμμωνίου και άλας καλίου. Το Glyphosate αναμιγνύεται με άλλες χημικές ουσίες που είναι γνωστές ως «αδρανή συστατικά» και αποτελούν ζιζανιοκτόνα με βάση το glyphosate, τα οποία περιλαμβάνουν τα δημοφιλή προϊόντα «Roundup®» και «RangerPro®» που χρησιμοποιούνται σε γεωργικούς αγρούς και κήπους (Tarazona et al., 2017). Σε τοξικολογικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί με αντικείμενο μελέτης μοντέλα τρωκτικών, έχει παρατηρηθεί πως ζιζανιοκτόνα με βάση το Gly οδηγούν σε τοξικότητα μέσω επαγωγής οξειδωτικού στρες στο νευρικό, αναπαραγωγικό σύστημα και στο ήπαρ. Το οξειδωτικό στρες στο ήπαρ είναι πιο συχνό φαινόμενο, διότι εκεί παρατηρείται αυξημένα το φαινόμενο της λιπιδικής υπεροξειδωσης και μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) (Soudani et al., 2019).

3.1.1 Μηχανισμός δράσης

Οι συνθήκες στρες οδηγούν στην υπερπαραγωγή ROS, με συνέπεια την οξειδωτική καταστροφή των κυττάρων. Τα φυτά, όπως και όλοι οι οργανισμοί, στοχεύουν στην διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης μέσω αντιοξειδωτικών μηχανισμών που ελέγχουν τα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου. Η έκθεση σε χρήση ζιζανιοκτόνων διεγείρει την παραγωγή αντιοξειδωτικών μορίων ως απάντηση στο οξειδωτικό στρες. Τα συνηθισμένα αντιοξειδωτικά όπως καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και υπεροξειδική δισμουτάση τροποποιούνται μετά από έκθεση σε γλυφοσάτη, συνοδευόμενα από λιπιδική υπεροξειδωση.

Επιπλέον, επηρεάζεται η γονιδιακή έκφραση και η σύνθεση πρωτεϊνών. Μελετώντας τους μηχανισμούς δράσης σε φυτά, έχει αποδειχθεί πως σε περίπτωση που αποτυγχάνει το αντιοξειδωτικό σύστημα, οδηγούμαστε σε συσσώρευση ROS, με το επόμενο βήμα να είναι η λιπιδική υπεροξειδωση και η μεμβρανική βλάβη. Η εκκίνηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης ξεκινά με την αφαίρεση υδρογόνου ή την προσθήκη μίας ρίζας οξυγόνου, με αποτέλεσμα την οξειδωτική βλάβη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA). Η έναρξη περιλαμβάνει μεταβατικά σύμπλοκα μετάλλων όπως Fe και Cu. Εκκινητές αντιδράσεων είναι το $O_2^{\cdot -}$ και το H_2O_2 . Το πιο δραστικό μόριο είναι το OH^{\cdot} , για αυτό και μπορεί να ξεκινήσει λιπιδική υπεροξειδωση με την αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου σε μια ακόρεστη λιπαρή αλυσίδα ενός υπολείμματος PUFA. Υπό αερόβιες συνθήκες, τα λιπαρά οξέα δημιουργούν μία ομάδα λιπιδικού υπεροξειδίου, ($ROO \cdot$), η οποία έπειτα πολλαπλασιάζεται, με την αφαίρεση ατόμου υδρογόνου από παρακείμενες πλευρικές αλυσίδες PUFA. Το υδροϋπεροξειδίο των λιπιδίων που προκύπτει μπορεί να αποσυντίθεται σε αρκετά δραστικά προϊόντα όπως αλδεϋδες (μηλονική διαλδεϋδη), αλκάνια, λιπιδικές αλκοξυλικές ρίζες και αλκοόλες. Για αυτό το λόγο, η λιπιδική υπεροξειδωση συγκαταλέγεται στις πιο καταστροφικές διεργασίες στους ζωντανούς οργανισμούς με αποτέλεσμα την μεταβολή της ρευστότητας και της διαπερατότητας της μεμβράνης, την απενεργοποίηση των υποδοχέων, ενζύμων και ιόντων, καθώς και τη βλάβη στα νουκλεϊκά οξέα. Μετά το LPO, μπορεί να προκληθεί βλάβη στα νουκλεϊκά οξέα, συμπεριλαμβανομένων των διαλείψεων χρωματοειδών και άλλων μεταλλάξεων, απώλεια της λειτουργίας των οργανιδίων, μείωση της μεταβολικής αποτελεσματικότητας, διαρροή ηλεκτρολυτών και, στη συνέχεια, κυτταρικός θάνατος.

Τα ζιζανιοκτόνα στοχεύουν σε μία συγκεκριμένη τοποθεσία, που ορίζεται ως μηχανισμός δράσης. Συνήθως, αναστέλλεται ένα ένζυμο ή πρωτεΐνη σε μοριακό επίπεδο με αποτέλεσμα την διακοπή μίας ζωτικής βιολογικής διαδικασίας. Η γλυφοσάτη αναστέλλει το ένζυμο 3-φωσφορική συνθάση 5-ενολυπυλοσυλικίτη (EPSPS), οδηγώντας σε αναστολή της οδού του σικιμικού οξέος και στη βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων (φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη), συσσώρευση σικιμικού οξέος και μείωση της ισχύος ($NADPH + H$), παραγωγή ROS και οξειδωτικό στρες. Ο τρόπος δράσης των ζιζανιοκτόνων περιλαμβάνει σε κάποιες περιπτώσεις τη δημιουργία ROS ως δευτερεύουσα επίδραση μετά την αναστολή του συγκεκριμένου στόχου. Στην περίπτωση της γλυφοσάτης, η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι δευτερεύουσα συνέπεια της αναστολής της οδού σικιμικού οξέος. Μετά την απόφραξη του μονοπατιού του σικιμικού οξέος, εμφανίζεται η συσσώρευση αναγωγικής ισχύος στους χλωροπλάστες. Επίσης, η έλλειψη τυροσίνης αναστέλλει τη σύνθεση της πλαστοκινόνης, η

οποία είναι ένας δέκτης ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς φωτοσυνθετικών ηλεκτρονίων στο φωτοσύστημα II (PSII). Η μη αναγέννηση της πλαστοκινόνης στο PSII διακόπτει τη μεταφορά ηλεκτρονίων, οδηγώντας σε συσσώρευση ενέργειας. Επομένως, και οι δύο διαδικασίες, η μείωση της συσσώρευσης ισχύος και η απόφραξη PSII, οδηγούν σε παραγωγή ROS, βλάβη κυττάρων και θάνατο φυτών (Caverzan et al,2019).

Λιπιδική υπεροξείδωση

Η μηλονική διαλδεϋδη του ήπατος (MDA) είναι ένας δείκτης υπεροξείδωσης λιπιδίων και χρησιμοποιείται σε πολλές μελέτες ως δείκτης οξειδωτικού στρες. Η έκθεση σε Gly οδηγεί σε υπερπαραγωγή MDA. Στο ήπαρ επιμύων έπειτα από χορήγηση Gly, τα επίπεδα MDA αυξήθηκαν κατά 69% (Soudani et al,2018). Επιπλέον, η έκθεση σε Gly διά του στόματος σε επίμυες σε κατάσταση κήσης οδηγεί σε λιπιδική υπεροξείδωση και υπερφόρτωση των αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων (Beuret et al, 2005).

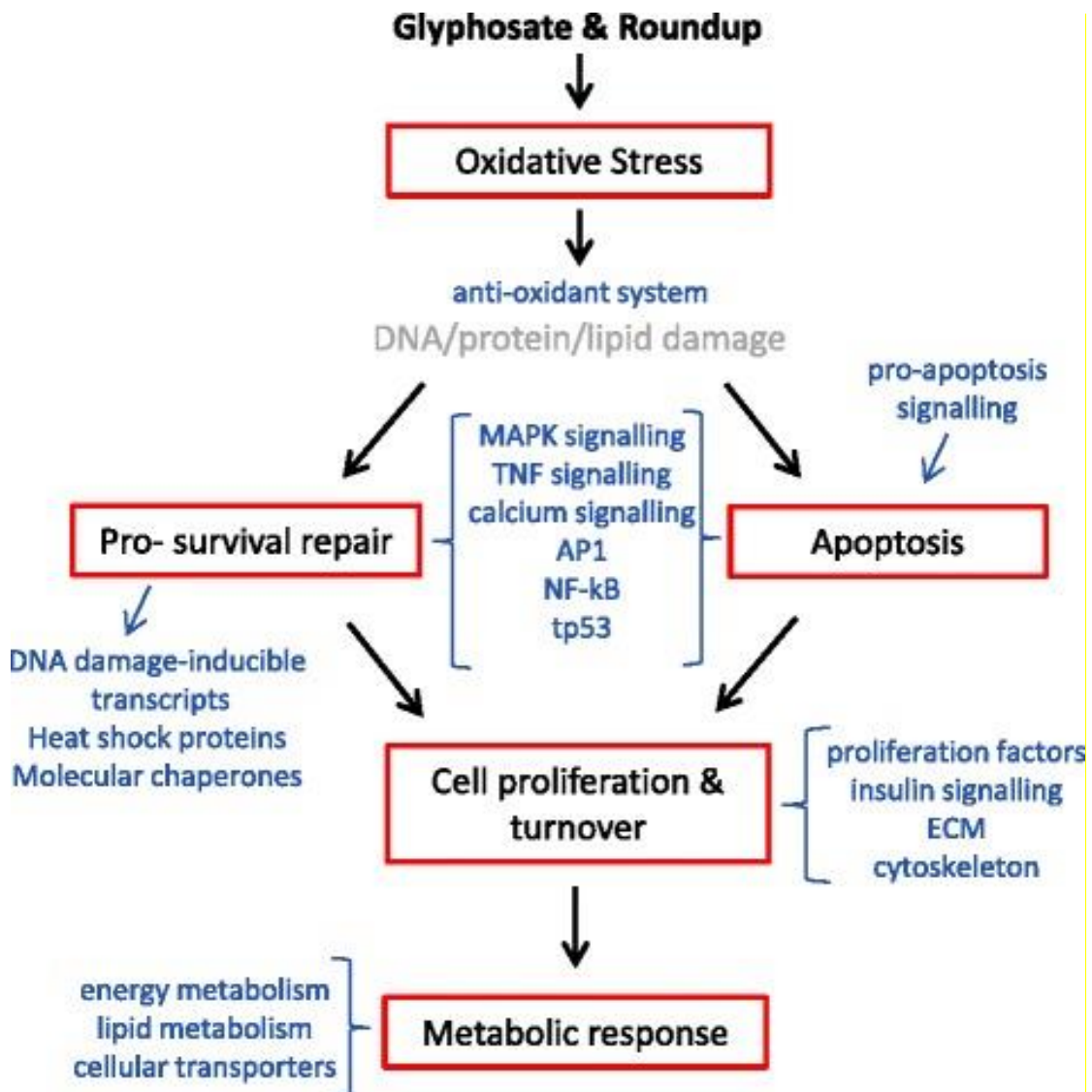
Παραγωγή ελεύθερων ριζών

Η έκθεση σε Gly μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου όπως ανιόν υπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου, ρίζες υδροξυλίου, ρίζες υπεροξυλίου και μονήρους οξυγόνου. Συγκεκριμένα, σε δύο μελέτες παρατηρήθηκε αύξηση H₂O₂, η μία στο ήπαρ επιμύων σε ποσοστό 44% (Soudani et al,2018) και η άλλη σε σκουλήκια, έπειτα από θεραπεία με Gly (Bailey et al., 2018). Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μέχρι την εμφάνιση οξειδωτικού στρες διαφέρει ανάλογα με το ζιζανιοκτόνο. Στη περίπτωση του Gly, τα πρώτα ορατά συμπτώματα στα φυτά μπορούν να εμφανιστούν σε περίπου 5 ημέρες, ενώ ο θάνατος στη περίπτωση ευπαθών ειδών σε 7 έως 15 ημέρες (Caverzan et al,2019).

Ενδοκυτταρική σηματοδότηση

Η ενδοκυτταρική σηματοδότηση Ca²⁺ ρυθμίζει πολλές κυτταρικές διαδικασίες όπως την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την έκκριση, τη γονιδιακή ενεργοποίηση και τον κυτταρικό θάνατο, ενώ η τροποποίηση της ιονισμένης ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης Ca²⁺ έχει συσχετιστεί με την παραγωγή ειδών αντιδραστικού οξυγόνου. Σε μελέτη που χρησιμοποιήθηκαν κερατινοκύτταρα ανθρώπινου δέρματος, HaCaT, ως *in vitro* μοντέλο για να αξιολογηθεί η σχέση δόσης απόκρισης Gly στην ανάπτυξη των προαναφερθεισών κυττάρων,

τα ευρήματα ήταν τα εξής: Τα κύτταρα HaCaT που έλαβαν glyphosate παρουσίασαν διαφορές όσον αφορά το οξειδωτικό στρες. Τα επίπεδα παραγωγής ROS ήταν αρκετά πιο υψηλά σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Επιπλέον, τα κύτταρα ελέγχου διατήρησαν τα επίπεδα $[Ca_2^+]$ σταθερά, ενώ στα κύτταρα που έλαβαν Gly μειώθηκαν τα επίπεδα $[Ca_2^+]$ με χρονοεξαρτώμενο τρόπο σε δόση που προκαλεί πολλαπλασιασμό για τα κύτταρα HaCaT. Συνεπώς, η γλυφοσάτη πολλαπλασιάζει τα κύτταρα HaCaT με ενεργοποίηση Ca_2^+ , με σκοπό τη διαταραχή της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης Ca_2^+ και μείωση παραγωγής SOD1 με σκοπό την αύξηση παραγωγής ROS (George and Shukla, 2013).



Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες ως κεντρικός μηχανισμός της τοξικότητας του glyphosate και Round up, καθώς και των αντισταθμιστικών διεργασιών που επηρεάζονται. Τα μπλε κείμενα απεικονίζουν τα μονοπάτια σηματοδότησης καθώς και τις λειτουργικές ομάδες γονιδίων που επηρεάζονται από κάθε διαδικασία.

Πρωτεΐνες απόκρισης

- Η γλυφωσάτη ενεργοποιεί το γονίδιο Hig1 που προκαλείται από υποξία καθώς και την αντίστοιχη πρωτεΐνη Hyou1 που σχετίζεται με την υποξία, παρουσιάζοντας αυξημένες τάσεις.
- Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins), οι οποίες δεσμεύουν, σταθεροποιούν και απομακρύνουν τις κατεστραμμένες πρωτεΐνες παρουσίασαν αυξητικές τάσεις. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από τα γονίδια hsp5, hsp13, hspb2, dnajb11, dnajb9, dnajc3.

Μεταγραφικός παράγοντας p53

Όπως έχει προαναφερθεί, ο καταστολέας όγκου p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο, την έναρξη μηχανισμών επιδιόρθωσης DNA και την απόπτωση, με τρόπο δράσης που εξαρτάται από το περιβάλλον. Στη συγκεκριμένη μελέτη, ο p53 επηρεάστηκε ανοδικά από την χορήγηση γλυφωσάτης (Webster and Santos, 2015).

Οδοί σηματοδότησης

Η έκθεση στη γλυφωσάτη επιπλέον αύξησε την έκφραση αρκετών ρυθμιστικών μονοπατιών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση της κυτταρικής απόπτωσης. Συγκεκριμένα, υπερεκφράστηκαν οι πρωτεΐνες mapk12a, mapk14b και mapk3k6 οι οποίες σχετίζονται με τη σηματοδότηση της MAPKκινάσης (μιτογόνας πρωτεϊνική κινάση). Επιπλέον, παρουσιάστηκε αύξηση της έκφρασης παραγόντων (tnfr2, cd40, traf3, traf2b, tnfr14, tnip3, optn, sqstm1) που σχετίζονται με τη σηματοδότηση TNF, όπου TNF ο παράγοντας νέκρωσης όγκου. Τέλος, η σηματοδότηση ασβεστίου είτε αυξήθηκε σημαντικά είτε είχε αυξανόμενες τάσεις, ανάλογα με την ομάδα θεραπείας.

Στην ίδια μελέτη, ένας παράγοντας που εκκινεί την διαδικασία της απόπτωσης και σχετίζεται με το μιτοχόνδριο aifm2 είτε υπερεκφράστηκε είτε είχε αυξητικές τάσεις, ενώ όσον αφορά τον εξωγενή έλεγχο αποπτωτικής σηματοδότησης, δύο παράγοντες που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη 2 μεταγωγής λεμφοκυττάρων G0 / G1 (G0S2) ήταν από τα πιο έντονα ρυθμιζόμενα αντίγραφα. Αυτό το γονίδιο προάγει σε μεγάλο βαθμό την απόπτωση δεσμεύοντας το Bcl-2 και αναστέλλοντας την αντι-αποπτωτική του δράση, μέσω επαγωγής με TNF σηματοδότηση και δραστηριότητα NF-kB (Webster and Santos, 2015).

Αξίζει να σημειωθεί πως αν και οι οδοί που επηρεάζουν την απόπτωση επηρεάστηκαν από την έκθεση σε γλυφosatη, διαφορετικές συγκεντρώσεις επάγουν αλλαγές στην έκφραση των προαναφερθεισών παραγόντων, με συνέπεια χαμηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες.

3.2 Parabens

Ο χαρακτηρισμός Parabens δίνεται σε μία ομάδα εστέρων ρ-υδροξυβενζοϊκού οξέος που χρησιμοποιούνται σε καλλυντικά ως συντηρητικά. Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το επιτρεπόμενο περιεχόμενο parabens στα καλλυντικά προϊόντα είναι 0,4% για τον ενιαίο εστέρα και 0,8% για τα μείγματα όλων των parabens. Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται το methyl-paraben, ethyl-paraben, propyl-paraben, isopropyl-paraben, butyl-paraben, isobutyl-paraben και benzyl-paraben (International Journal of Toxicology, 2008).

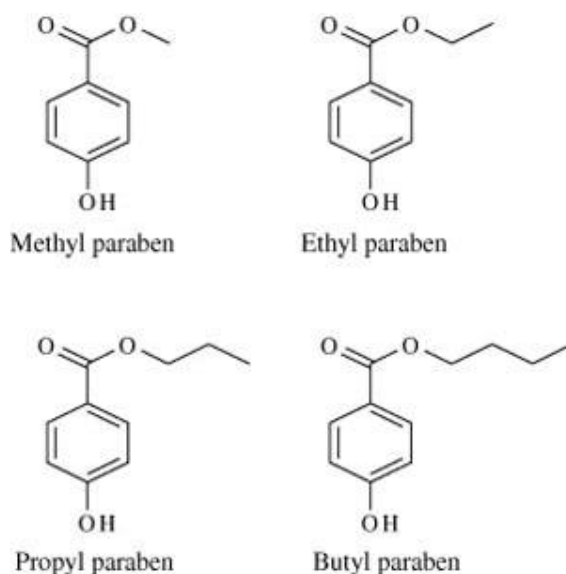
Parabens και τοξικότητα

Οι εστέρες του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος, που ονομάζονται επίσης parabens, χρησιμοποιούνται ευρέως ως αντιμικροβιακοί παράγοντες σε μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων, φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων λόγω των εξαιρετικών αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων και της χαμηλής τους τοξικότητας. Είναι σταθερές, αποτελεσματικές σε ένα ευρύ φάσμα pH και ενεργές ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών. Ωστόσο, ο τρόπος δράσης τους δεν είναι καλά κατανοητός. Υποτίθεται ότι δρουν διακόπτοντας τις διεργασίες μεταφοράς μεμβράνης ή αναστέλλοντας τη σύνθεση DNA και RNA ή ορισμένων βασικών ενζύμων, όπως ATPases και φωσφοτρανσφεράσες, σε ορισμένα βακτηριακά είδη (Valkova et al., 2001).

Ο μηχανισμός κυτταροτοξικής δράσης των Parabens ενδέχεται να συνδέεται με μιτοχονδριακή ανεπάρκεια που εξαρτάται από την πρόκληση μετάβασης διαπερατότητας μεμβράνης, η οποία συνοδεύεται από μιτοχονδριακή αποπόλωση και εξάντληση του κυτταρικού ATP μέσω αποσύνδεσης οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Τα Parabens μπορούν να προκαλέσουν δερματίτιδα εξ επαφής, όταν φάρμακα που τα περιέχουν εφαρμόζονται σε κατεστραμμένο ή σπασμένο δέρμα. Σε κύτταρα του δέρματος, μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες μετά από τη μετατροπή σε συζυγή γλουταθειόνης υδροκινολόνης με αντίδραση με οξυγόνο και γλουταθειόνη (Chen et al., 2016).

Επιπλέον, έχουν αναφερθεί αλλεργικές αντιδράσεις έπειτα από κατάποση paraben, χωρίς να υπάρχουν αυστηρές ενδείξεις για την αλλεργιογένεση της κατάποσής τους (International Journal of Toxicology, 2008).



Εικόνα 24: Δομή paraben

3.2.2 Methyl/Ethyl Parabens

Το μέθυλ-πάραμπεν είναι ένας μεθυλεστέρας του ρ-υδροξυβενζοϊκού οξέος. Είναι μία σταθερή, μη πτητική ένωση που χρησιμοποιείται ως αντιμικροβιακό συντηρητικό σε τρόφιμα, καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα. Απορροφάται εύκολα και πλήρως από το δέρμα και από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Υδρολύεται σε ρ-υδροξυβενζοϊκό οξύ, συζευγμένο και τα συζυγή απεκκρίνονται γρήγορα στα ούρα. Το μεθυλ-παράμπεν δεν εμφανίζει στοιχεία συσσώρευσης. Οι διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δείχνουν πως το μεθυλ-παράμπεν είναι μη τοξικό τόσο από του στόματος όσο και από την παρεντερική οδό. Επιπλέον, δεν είναι καρκινογόνο ή μεταλλαξιγόνο (Soni et al., 2002).

Το αιθυλ-παράμπεν είναι ένας αιθυλεστέρας που προκύπτει από τη συμπύκνωση της καρβοξυλομάδας του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος με αιθανόλη. Απαντάται ως αντιμικροβιακό συντηρητικό τροφίμων, αντιμυκητιακός παράγοντας, φυτικός μεταβολίτης και φυτοοιστρογόνο. Αποτελείται από ένα paraben και έναν αιθυλεστέρα. Το αιθυλ-παράμπεν υδρολύεται σε ρ-υδροξυβενζοϊκό οξύ, ενώ το μη υδρολυμένο απαντάται μόνο στον εγκέφαλο. Αποβάλλεται εντελώς έπειτα από 48ώρες (Bingham et al., 2001).

Parabens και παραγωγή ROS

Σε έρευνα που δημοσιεύτηκε το 2018, η οποία εξέταζε την επίδραση των parabens σε ανθρώπινα σπερματοζώαρια, αξιολογήθηκε η επαγωγή οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε τόσο η επίδραση μείγματος paraben όσο και η επίδραση μόνο του μεθυλ-

παραμπεν. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το μείγμα πάραμπεν διέγειρε την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στα μιτοχόνδρια, αναστέλλοντας την κινητικότητα και τη βιωσιμότητα του σπέρματος με τρόπο δόσοεξαρτώμενο. Η ικανότητα των μεμονωμένων parabens να ενεργοποιήσουν την παραγωγή ROS και να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη DNA σχετίζεται με το μήκος αλυσίδας αλκυλίου. Στη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε κλινικά, το μεθυλ-παραμπεν ανέστειλε την κινητικότητα του σπέρματος μετά από έκθεση 2 και 5 ωρών και επηρέασε τη βιωσιμότητα των κυττάρων ενώ αύξησε την παραγωγή ROS και την οξειδωτική βλάβη του DNA. Μεταγενέστερη ανάλυση απομονωμένων parabens έδειξε ότι η επαγωγή μιτοχονδριακών ROS, η απώλεια δυνατοτήτων μιτοχονδριακής μεμβράνης, η μείωση της κινητικότητας του σπέρματος, η απώλεια βιωσιμότητας των κυττάρων και η οξειδωτική βλάβη του DNA αυξήθηκαν όλα με αύξηση του μήκους αλυσίδας αλκυλίου (Samarasinghe et al., 2018). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι λιπόφιλοι ρύποι είναι πιο ισχυροί για να διεισδύσουν στην κυτταρική μεμβράνη, οδηγώντας σε μεγαλύτερη τοξικότητα (Kristensen et al., 2011).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2016, αξιολογήθηκαν οι πιθανές πρόσθετες τοξικές επιδράσεις του μείγματος μεθυλ-παραμπεν και αιθυλ-παραμπεν στη διάρκεια ζωής και την περίοδο ανάπτυξης προγενέστερων *D.melanogaster*. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα parabens επηρεάζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε μείγμα paraben, μεθυλ-παραμπεν και αιθυλ-παραμπεν, το οποίο μείωσε τη δραστηριότητα της SOD των πειραματόζωων συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, μελετήθηκαν τα επίπεδα Malondialdehyde (MDA), το οποίο χρησιμοποιείται ως δείκτης υπεροξειδωσης λιπιδίων, όπου παρατηρήθηκε πως το μείγμα μεθυλ/αιθυλ-παραμπεν μπορεί να αυξήσει τη συγκέντρωση MDA συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Chen et al., 2016). Συμπληρωματικά, έρευνα που δημοσιεύτηκε το 2011 και μελέτησε την επαγωγή οξειδωτικού στρες μετά από έκθεση σε μεθυλ-παραμπεν, έδωσε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία οξειδωτικού στρες λόγω υπεροξειδωσης λιπιδίων (Pop et al., 2011).

3.2.3 Methyl Parathion (MP)

Τα οργανοφωσφορικά είναι εστέρες φωσφορικού οξέος και υπάρχουν σε δύο μορφές, το Thion και το Oxon. Τα Parathions (μεθύλιο και αιθύλιο) είναι τοξικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται εκτενώς σε γεωργικές καλλιέργειες. Το μεθυλ-παραθειό είναι ένα ευρέως φάσματος γεωργικό εντομοκτόνο οργανοφωσφόρου με εντομοκτόνες ιδιότητες, οι οποίες προκύπτουν από την

ανεπανόρθωτη αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης, ενός ενζύμου υπεύθυνου για την αποικοδόμηση του χολινεργικού νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνης. Είναι ιδιαίτερα τοξικό για τους ανθρώπους, καθώς η δηλητηρίαση με MP οδηγεί σε χολινεργική υπερδιέγερση (Garcia et al., 2003). Η απελευθέρωσή του στο περιβάλλον πραγματοποιείται κυρίως μέσω ψεκασμού με αεροσκάφη ή εξοπλισμό εδάφους. Το MP απομακρύνεται άμεσα από την ατμόσφαιρα με υγρή και ξηρή εναπόθεση και σχηματίζει δεσμευμένα υπολείμματα που περιορίζουν την κίνησή του στο έδαφος. Κατά την εισαγωγή του στο περιβάλλον πραγματοποιείται αποικοδόμηση με υδρόλυση, φωτόλυση ή μέσω μικροοργανισμών (Tabassum et al., 2014). Η οξεία ή χρόνια έκθεση μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη μνήμη και συγκέντρωση, αποπροσανατολισμό, σοβαρή κατάθλιψη, ευερεθιστότητα, σύγχυση, κεφαλαλγία, δυσκολίες στην ομιλία, καθυστερημένος χρόνος αντίδρασης, εφιάλτης και υπνηλία.

Σε έρευνα που διενεργήθηκε σχετικά με την εμπλοκή του οξειδωτικού στρες στην τοξικότητα προκαλούμενη από MP, χρησιμοποιήθηκαν HepG2 κύτταρα (HepG ανθρώπινου ήπατος καρκινώματος 2) ως μοντέλο δοκιμής. Στη δοκιμασία υπεροξειδωσης λιπιδίων που πραγματοποιήθηκε, εξετάστηκαν τα επίπεδα MDA με αυξανόμενες συγκεντρώσεις MP (Edwards et al., 2011).

Επίσης, έχει εξεταστεί η επίδραση του MP στη μείωση της έκφρασης του γονιδίου PON1 σε κύτταρα HepG2. Η παραοξονάση 1 (PON1) είναι μια συνθετική εστεράση που εξαρτάται από ασβέστιο, παράγεται κυρίως στο ήπαρ και εκκρίνεται στο πλάσμα, όπου σχετίζεται με λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL). Η μείωση της έκφρασης του γονιδίου PON1 μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία σε δηλητηρίαση από OP και τον κίνδυνο ασθενειών που σχετίζονται με φλεγμονή και οξειδωτικό στρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το MP ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του PON1 μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την επαγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών όπως TNF α , IL6 και IL1 β (Medina-Díaz et al., 2016).

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως το MP, μόνο του ή και σε συνδυασμό με άλλα φυτοφάρμακα μπορεί να διαταράξει την ομοιόσταση της γλουταθειόνης σε ιστούς επιμύων. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της GSH μειώθηκαν, ενώ αυξήθηκαν τα επίπεδα GSSG, με αποτέλεσμα την μείωση της αναλογίας GSH/GSSG. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι οι λόγοι NADPH / NADP (+) και NADH / NAD (+) μειώθηκαν επίσης στους ιστούς επιμύων, ενώ αυξήθηκαν οι δραστηριότητες της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (Ojha and Srivastava, 2012).

3.3 Bisphenol A

Η διφαινόλη Α (BPA) είναι μια πρόδρομη βιομηχανική χημική ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή καταναλωτικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των πολυανθρακικών πλαστικών και εποξικών ρητινών, τα οποία βρίσκονται στην προστατευτική επένδυση πλαστικών δοχείων τροφίμων, χαλύβδινων βαρελιών και σωλήνων. Το BPA είναι επίσης ένα πρόσθετο στην κατασκευή πλαστικών πολυβινυλοχλωριδίου, τα οποία έχουν ευρείες εφαρμογές σε αναλώσιμα υγειονομικής περίθαλψης, σωληνώσεις, μόνωση καλωδίων και δομικά υλικά. Η παγκόσμια παραγωγή της είναι υψηλότερη από την παραγωγή οποιασδήποτε άλλης χημικής ουσίας (Wazir and Mokbel, 2019). Μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2003-2004 στις ΗΠΑ έδειξε πως το 93% του πληθυσμού ηλικίας 6 ετών και άνω παρουσιάζει ανιχνεύσιμα επίπεδα BPA στα ούρα του (Calafat et al., 2008). Όταν καταναλώνεται, το BPA απορροφάται γρήγορα και διασπάται στους μεταβολίτες του. Αυτό είναι ανησυχητικό, διότι η δομή του είναι παρόμοια με τη διαιθυλοστυλβεστρόλη (DES) και έχει οιστρογονικό χαρακτήρα, αν και ασθενέστερο από το DES ή από την οιστραδιόλη (Rochester, 2013). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι παρά τον περιορισμένο χρόνο ημιζωής του, το BPA συσσωρεύεται στο λιπώδη ιστό στην ενεργή μη συζευγμένη μορφή του και ακόμη και χαμηλές δόσεις μπορούν να προκαλέσουν ισχυρή ενδοκρινική διαταραχή.

Το BPA μπορεί να διεγείρει κυτταρικές αποκρίσεις σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις μέσω διαφόρων οδών. Ο μοριακός μηχανισμός που εμπλέκεται συχνότερα στην επίσημη δράση του BPA είναι η δέσμευσή του στους υποδοχείς οιστρογόνου α και β (ERα και ERβ αντίστοιχα και η ενεργοποίηση αυτών (“Gassman, 2017”; “Kobayashietal., 2020”).

Προ οξειδωτικός χαρακτήρας διφαινόλης A.

Αυξημένος ενδοκυτταρικός σχηματισμός H₂O₂.

Οι ρίζες φαινοξυλίου μπορούν να δημιουργηθούν *in situ* από την οξείδωση 1-ηλεκτρονίου της αντίστοιχης φαινόλης και έπειτα αντέδρασαν με μειωμένο διנוκλεοτιδικό φωσφορικό νικοτιναμίδιοαδενίνης (NADPH) και ριφαμπικίνη.

1. Οι ρίζες φαινοξυλίου BPA αντιδρούν με NADPH και οδηγούν στο σχηματισμό ριζών πυριδινυλίου NAD(P) (NADPH[•]). Έπειτα, το NAD(P)[•] σχηματισμένο με αυτό τον τρόπο, μειώνει το O₂ σε O₂⁻.
2. Οι ρίζες φαινοξυλίου αντιδρούν με GSH σχηματίζοντας ρίζες γλουταθειόνης (GS[•]). Έπειτα, το GS[•] σε συνδυασμό με το GS⁻ αντιδρά με το O₂ και σχηματίζει O₂⁻.

Και στις δύο περιπτώσεις, το σχηματισμένο O₂⁻ υφίσταται περαιτέρω διάσπαση σε H₂O₂ και O₂ από κυτταρικές δισμουτάσες σουπεροξειδίου.

Μείωση αντιοξειδωτικής ικανότητας

Τα αντιοξειδωτικά μειώνουν την κυτταρική βλάβη προκαλούμενη από την αλληλεπίδραση μεταξύ λιπιδίων, πρωτεϊνών και μορίων DNA με τις ROS. Ανεξάρτητα από την παρουσία αυτού του αντιοξειδωτικού συστήματος, η υπερβολική ή μη ισορροπημένη παραγωγή ROS λόγω επαφής με χημικά, είναι ικανή να οδηγήσει σε κλινικές διαταραχές. Η διφαινόλη μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες διαταράσσοντας την αντιοξειδωτική/προ οξειδωτική ισορροπία στα κύτταρα (Hassan et al., 2012).

Επιπλέον, η χορήγηση BPA έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας εξουδετέρωσης των ROS στο πλάσμα και στον υπόκαμπο, με αποτέλεσμα τη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Στον υπόκαμπο, οι επαγόμενες από BPA ελεύθερες ρίζες προκάλεσαν οξειδωτικό στρες στον εγκέφαλο και αύξησαν σημαντικά τις αναλογίες oxDJ-1/DJ-1 μετά από οκτώ βδομάδες θεραπείας. Το DJ-1 είναι μία πολυλειτουργική, ευαίσθητη στην οξειδοαναγωγή, πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο λόγω οξειδωτικού στρες. Το DJ-1 παρέχει νευροπροστασία σε πολλαπλές οδούς, κυρίως με την αναστολή του μιτοχονδριακού οξειδωτικού στρες (Kobayashi et al., 2020). Συμπληρωματικά, αντίστοιχη μελέτη που αφορά την έκφραση και τα οξειδωτικά επίπεδα του DJ-1 έπειτα από χορήγηση BPA, διαπίστωσε πως η έκφραση του DJ-1 επηρεάστηκε από την παραγωγή ROS προκαλούμενων από BPA, με ταυτόχρονη οξείδωση του DJ-1. Επίσης, η διφαινόλη A έθεσε σε κίνδυνο τα μιτοχόνδρια, με αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας του μιτοχονδριακού συμπλόκου 1, αν και

ακολουθήθηκε από αυξημένη έκφραση DJ-1 για την αποκατάσταση της δραστηριότητας του συμπλέγματος 1. Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων βλάπτει το μεταβολισμό των λιπιδίων και επηρεάζει την οξειδωτική κατάσταση του κυττάρου, προωθώντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων και τη φλεγμονή (Huc et al., 2012). Έπειτα από τον εντοπισμό του DJ-1 στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια σε διάφορους τύπους κυττάρων, καθώς και τη μετατόπιση του στα μιτοχόνδρια έπειτα από οξειδωτικό στρες, θεωρείται πως επηρεάζει τις ελεύθερες ρίζες που προκαλούνται από τη χορήγηση/έκθεση σε BPA (Ooe et al., 2005).

Τα ανθρώπινα σπερματοζωάρια είναι ικανά να παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου και αυτή η ικανότητα επιταχύνεται σημαντικά σε περιπτώσεις ελαττωματικής λειτουργίας του σπέρματος (JohnAitken et al., 1989). Έχει αποδειχθεί πως η δυσφαινόλη οδηγεί σε μειωμένη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, αναγωγάση γλουταθειόνης και υπεροξειδάση γλουταθειόνης. Επίσης, οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), προκαλώντας οξειδωτικό στρες στο επιδιδυμικό σπέρμα επιμύων (Chitra, 2003).

Σύμφωνα με έρευνα του 2012, η δυσφαινόλη προκάλεσε σημαντική μείωση στα επίπεδα της GSH με ταυτόχρονη μείωση της δραστηριότητας του SOD. Η SOD προστατεύει τους ιστούς από το οξειδωτικό στρες, καταλύοντας τη μετατροπή του $O_2^{\cdot-}$ στο H_2O_2 , μία πιο σταθερή μορφή ROS. Οι βλάβες στο κυτταρικό επίπεδο προκαλούμενες από τα οξειδωτικά, εξασθενούνται επίσης από τα ένζυμα GPx, GSP, CAT και GR. Η καταλάση και η GPx καταλύουν τη διάσπαση του ανιόντος υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο έπειτα μετατρέπεται σε νερό, μέσω της καταλάσης, παρέχοντας προστασία από τις ελεύθερες ρίζες. Στη συγκεκριμένη μελέτη αποδείχθηκε πως υπήρξε μείωση των προαναφερθέντων ενζύμων (Hassan et al., 2012).

Η δυσφαινόλη A δρα ως αντιοξειδωτικό και ως προ-οξειδωτικό, διότι έχει αντιοξειδωτικές ικανότητες δομικά, αλλά εμφανίζει προ-οξειδωτική δραστηριότητα μέσω υποδοχέων οιστρογόνου, ή οι μεταβολίτες της εμφανίζουν προ-οξειδωτική συμπεριφορά. (Kabuto et al., 2003). Επίσης, η δομή επισημαίνει τη δυνατότητα να δρα ως αντιοξειδωτικό. Θεωρείται ασθενές αντιοξειδωτικό λόγω της ενέργειας διαχωρισμού (BDE) του δεσμού O-H (Ponniah et al., 2015).

Τα αντιοξειδωτικά και τα ένζυμα μεταβολισμού φάσης II προστατεύουν τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες και ενεργοποιούνται μεταγραφικά από τους παράγοντες Nrf1 και Nrf2 μέσω των ρυθμιστικών αντιοξειδωτικών στοιχείων απόκρισης που διαθέτουν (Antioxidant Response Elements, ARE) . Το Nrf2 είναι ένας κύριος ρυθμιστής γονιδιακής έκφρασης που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες. Το Nrf1 από την άλλη, είναι απαραίτητο για την επιβίωση των κυττάρων υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες. Έχει αποδειχθεί πως η δισφαινόλη A ενεργοποιεί τα μονοπάτια Nrf1-2/ARE σε συγκεντρώσεις άνω των 10 Mm. Η δισφαινόλη A επίσης μειώνει τον κυτταρικό θάνατο, τα επίπεδα της γλουταθειόνης και την υποξία και εμφανίζει μία εγγενή αντιοξειδωτική δραστηριότητα για την απομάκρυνση των ROS (Chepelev et al., 2013).

4. REAL LIFE EXPOSURE SCENARIO – ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΣΕΝΑΡΙΟ ΕΚΘΕΣΗΣ

Είναι γεγονός ότι η πλειοψηφία των τοξικολογικών μελετών αναφορικά με τις επιδράσεις διαφόρων ουσιών εστιάζει στην αξιολόγηση των *in vivo* επιδράσεων μεμονωμένων ουσιών και όχι μιγμάτων. Παρόλα αυτά, η ανθρώπινη έκθεση είναι πιο σύνθετη, καθώς ο άνθρωπος συνήθως εκτίθεται σε μίγματα ξενοβιοτικών από διαφορετικές πηγές, μακροχρόνια. Για αυτό το λόγο, έχει γίνει προσπάθεια αξιολόγησης της εν λόγω έκθεσης σε μίγματα χημικών ουσιών, σε χαμηλές δόσεις, με σκοπό να προσομοιάσει τον κίνδυνο στην ανθρώπινη καθημερινότητα.

Συγκεκριμένα, σε εξάμηνη μελέτη στην οποία αξιολογήθηκαν βιοχημικές παράμετροι και βιοδείκτες οξειδοαναγωγής, χρησιμοποιήθηκε μίγμα συνηθισμένων ξενοβιοτικών το οποίο χορηγήθηκε σε επίμυες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως επηρεάστηκε η λειτουργία του ήπατος και αυξήθηκε το βάρος έπειτα από έκθεση σε μίγμα χημικών στο οποίο τα επίπεδα των μεμονωμένων ξενοβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κάτω του αποδεκτού επιπέδου (Docea et al., 2018).

Επιπλέον, σε αντίστοιχη μελέτη, εφαρμόστηκε δωδεκάμηνη και δεκαοκτάμηνη έκθεση ποντικών σε τρεις διαφορετικές δόσεις (χαμηλή, μεσαία και υψηλή) αρκετά χαμηλότερες του NOAEL (= το ανώτατο όριο για το οποίο δεν παρατηρούνται αρνητικές επιπτώσεις). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως στους 12 μήνες προκλήθηκαν σημαντικές προσαρμογές και ενεργοποιήθηκαν μηχανισμοί άμυνας συμβάλλοντας στο οξειδοαναγωγικό προφίλ των ποντικών και στις τρεις εφαρμοσμένες δόσεις. Στους 18 μήνες λήφθηκαν αντίστοιχα αποτελέσματα όσον αφορά τις χαμηλές και τις μεσαίες δόσεις. Αντίθετα, όσον αφορά την υψηλότερη χορηγούμενη δόση, προκλήθηκαν σημαντικές διαταραχές οξειδοαναγωγής και οξειδωτικό στρες στο αίμα και στους ιστούς των επιμύων (Fountoucidou et al., 2019).

Οι παραπάνω αναφορές τονίζουν την αναγκαιότητα δοκιμών που στοχεύουν στην αξιολόγηση μακροπρόθεσμης, συνδυαστικής έκθεσης σε χαμηλές δόσεις μιγμάτων καθώς προσεγγίζουν πιο ολοκληρωμένα την αξιολόγηση τοξικότητας μίας ουσίας και τον κίνδυνο που προκύπτει από την έκθεση σε αυτή.

Συζήτηση

Οι πολυφαινόλες μπορούν να αναστείλουν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών, εμποδίζοντας τον σχηματισμό τους ή απενεργοποιώντας τον, μειώνοντας έτσι το ρυθμό οξειδωσης βιολογικών μορίων. Συχνά πραγματοποιείται άμεση εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών που οδηγούν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξειδωσης (Chen et al., 2009). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην κυτταρική σειρά Caco-2 με σκοπό την αξιολόγηση της βλάβης που προκαλεί η οξειδωμένη LDL, καθώς και την προστατευτική δράση της τυροσόλης, παρατηρήθηκε ότι η τελευταία δρα τόσο πριν την οξειδωση, όσο και κατά τη διάρκεια. Επιπλέον, οι πολυφαινόλες δρουν και ως χηλικές ενώσεις, καθώς δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο δισθενής σίδηρος Fe^{2+} , αναστέλλοντας τις αντιδράσεις Fenton και εμποδίζοντας την οξειδωση που συμβαίνει από τις πολύ δραστικές $OH\bullet$ (Pietta, 2000). Τέλος, δρουν επάγοντας την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων *in vivo* (Croft, 2016).

Έχει αποδειχθεί ότι οι κατεχίνες συμβάλλουν στο αυξημένη ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Οι ποντικοί που έλαβαν 0,2% κατεχίνες στο πόσιμο νερό έδειξαν σημαντικά αυξημένες δραστηριότητες SOD, CAT και GPx, που παίζουν βασικούς ρόλους στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών (Khan SG, et al 1992). Επιπλέον, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κατεχινών οδήγησε σε ισχυρή μείωση των επιπέδων της GPx και σημαντική αύξηση των επιπέδων της SOD (Yannis V Simos et al, 2012).

Η τυροσόλη αναστέλλει την οξειδωτική βλάβη των μυϊκών κυττάρων L6 με μερική αναστολή του κυτταρικού θανάτου επαγόμενου από H_2O_2 . Η αναστολή επιτυγχάνεται μέσω ρύθμισης των ERK, JNK και p38 MAPκινάσης, καθώς και μέσω της αυξημένης παραγωγής ATP. Συγκεκριμένα, η βιωσιμότητα των κυττάρων κατά την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από το H_2O_2 , αυξήθηκε με τη χορήγηση τυροσόλης (Lee et al., 2018). Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες, σηματοδοτεί την δυνατότητα αυτών να αποκτήσουν προ-οξειδωτική ικανότητα σε αυξημένες συγκεντρώσεις, υψηλό pH ή παρουσία μεταβατικών μετάλλων. Τα ξενοβιοτικά, από την άλλη πλευρά, διεγείρουν την παραγωγή ROS, τα οποία μπορούν από μόνα τους να ασκήσουν άμεση τοξικότητα, όπως π.χ. οξειδωτική βλάβη του DNA ή μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης.

Σε μελέτη του 2018, μείγμα πάραμπεν διέγειρε την παραγωγή ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια, αναστέλλοντας την κινητικότητα και τη βιωσιμότητα του σπέρματος με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Samarasinghe et al., 2018). Επιπλέον, η έκθεση σε ορισμένα ξενοβιοτικά οδηγεί σε λιπιδική υπεροξειδωση και διαταραχή των αντιοξειδωτικών συστημάτων

άμυνας. Επίσης, μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου όπως το ανιόν υπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου, ρίζες υδροξυλίου, ρίζες υπεροξυλίου και μονήρους οξυγόνου.

Σε έρευνα που δημοσιεύτηκε το 2011 και μελέτησε την επαγωγή οξειδωτικού στρες μετά από έκθεση σε μεθυλ-παραμπεν, έδωσε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία οξειδωτικού στρες λόγω υπεροξείδωσης λιπιδίων (Pop et al., 2011). Τέλος, το μεθυλ-παραμπεν επηρεάζει την ενδοκυτταρική σηματοδότηση αυξάνοντας την έκφραση αρκετών ρυθμιστικών μονοπατιών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση του κυτταρικού στρες και στην απόπτωση.

Για να μπορεί να αξιολογηθεί κατάλληλα ένα ξενοβιοτικό ή μία πολυφαινόλη, χρησιμοποιούνται οι βιοδείκτες. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, έρευνες αποκάλυψαν μια ευρεία συμμετοχή του οξειδωτικού στρες σε διάφορες ασθένειες, όπως καρκίνο, καρδιαγγειακές παθήσεις (CVD), αθηροσκλήρωση, διαβήτης, αρθρίτιδα, νευροεκφυλιστικές διαταραχές και πνευμονικές, νεφρικές και ηπατικές ασθένειες. Αυτές οι παθολογικές καταστάσεις έχουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης με την πάροδο της ηλικίας, και το οξειδωτικό στρες πιστεύεται ότι είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τη γήρανση και τις ασθένειες που σχετίζονται με αυτή. Έτσι, οι δείκτες οξειδωτικού στρες είναι σημαντικά εργαλεία για την εκτίμηση της βιολογικής οξειδοαναγωγικής κατάστασης, της κατάστασης και της εξέλιξης της νόσου, καθώς και των επιδράσεων των αντιοξειδωτικών που βελτιώνουν την ανθρώπινη υγεία (Marrocco et al., 2017). Όπως είναι κατανοητό, δεν είναι πάντα ξεκάθαρο πότε μία ουσία δρα αντιοξειδωτικά ή προ οξειδωτικά. Για αυτό το λόγο, είναι απαραίτητο να τοποθετηθούν κάποιες παράμετροι κατά την αξιολόγηση. Η δόση στην οποία χορηγείται η κάθε ουσία παίζει σημαντικό ρόλο στην δράση αυτής, καθώς και το βιολογικό δείγμα στο οποίο γίνεται η μέτρηση, με δεδομένο πως κάθε ουσία έχει κάποια όργανα ή μηχανισμούς – στόχους. Επιπλέον, θα πρέπει να αξιολογείται και ο ίδιος ο βιοδείκτης, καθώς διαφέρουν ως προς την ακρίβεια και την εγκυρότητα τους. Σημαντικό είναι επίσης όταν συγκρίνουμε βιοδείκτες, να λαμβάνεται υπόψιν και ο τρόπος που μετρήθηκαν αυτοί. Τέλος, πολύ σημαντικό είναι το real life exposure scenario. Η έκθεση στην οποία ο άνθρωπος έρχεται σε επαφή, είναι πολλές φορές διαφορετική από την έκθεση στην οποία υπόκεινται τα πειραματόζωα, καθώς στην πραγματικότητα εκτίθεται σε συνδυασμό ουσιών, των οποίων οι μεμονωμένες δόσεις είναι κάτω του αποδεκτού ορίου, για μεγάλο χρονικό διάστημα. Μελέτη του 2019 με θέμα την δωδεκάμηνη και δεκαοχτάμηνη έκθεση πειραματόζωων σε τρεις διαφορετικές δόσεις κάτω του NOAEL έδειξε πως στους 12 μήνες προκλήθηκαν σημαντικές προσαρμογές και ενεργοποιήθηκαν αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας και στις τρεις εφαρμοσμένες δόσεις.

Στους 18 μήνες λήφθηκαν αντίστοιχα αποτελέσματα όσον αφορά τις χαμηλές και τις μεσαίες δόσεις. Αντίθετα, όσον αφορά την υψηλότερη χορηγούμενη δόση, προκλήθηκαν σημαντικές διαταραχές οξειδοαναγωγής και οξειδωτικό στρες στο αίμα και στους ιστούς των επιμύων (Fountoucidou et al., 2019). Για αυτό το λόγο οι μελέτες πρέπει να επικεντρωθούν στο να στήνονται με τρόπο πιο ανθρωποκεντρικό, προσεγγίζοντας πιο ρεαλιστικά την έκθεση στην οποία έρχεται αντιμέτωπος ο άνθρωπος σε καθημερινή βάση.

Συμπερασματικά, αποδεικνύεται πως η διατροφική πρόσληψη πολυφαινόλων συσχετίζεται ευεργετικά με την πρόληψη και χημειοπροφύλαξη έναντι του οξειδωτικού στρες ενώ ξενοβιοτικά όπως τα οργανοφωσφορικά μπορεί να το επάγουν. Η πλειοψηφία των δεδομένων προέρχεται από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με μοντέλα ζώων και κυτταρικών καλλιιεργειών με αποτέλεσμα η μέτρηση της άμεσης αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων *in vitro* να λειτουργεί ως προγνωστικός παράγοντας *in vivo*. Για την πλήρη κατανόηση του τρόπου δράσης μίας πολυφαινόλης ή ενός ξενοβιοτικού, θα πρέπει να προταθούν μοντέλα που εμπεριέχουν μια ολοκληρωμένη προσέγγιση του αντιοξειδωτικού/προοξειδωτικού προφίλ.

Βιβλιογραφία

1. Birben, E., Sahiner, U., Sackesen, C., Erzurum, S. and Kalayci, O., 2012. *Oxidative Stress And Antioxidant Defense*. [online] World Allergy Organ J. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3488923/>>**In-text:** (Birben et al., 2012)
2. Burton, G. and Jauniaux, E., 2011. Oxidative stress. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, [online] 25(3), pp.287-299. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3101336/>>**In-text:** (Burton and Jauniaux, 2011)
3. Simioni, C., Zauli, G., Martelli, A., Vitale, M., Sacchetti, G., Gonelli, A. and Neri, L., 2018. Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget*, [online] 9(24), pp.17181-17198. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5908316/>>**In-text:** (Simioni et al., 2018)
4. Snezhkina, A., Kudryavtseva, A., Kardymon, O., Savvateeva, M., Melnikova, N., Krasnov, G. and Dmitriev, A., 2019. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, [online] 2019, pp.1-17. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6701375/#B37>>**In-text:** (Snezhkina et al., 2019)
5. Beckhauser, T., Francis-Oliveira, J. and De Pasquale, R., 2016. Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity. *Journal of Experimental Neuroscience*, [online] 10s1, p.JEN.S39887. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5012454/>>**In-text:** (Beckhauser, Francis-Oliveira and De Pasquale, 2016)
6. Williamson, G., 2017. The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutrition Bulletin*, [online] 42(3), pp.226-235. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5601283/>**In-text:** (Williamson, 2017)
7. Reinisalo, M., Kårlund, A., Koskela, A., Kaarniranta, K. and Karjalainen, R., 2015. Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, [online] 2015,

- pp.1-24. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4477219/>>**In-text:** (Reinisalo et al., 2015)
8. Brito, A. and Zang, Y., 2018. A Review of Lignan Metabolism, Milk Enterolactone Concentration, and Antioxidant Status of Dairy Cows Fed Flaxseed. *Molecules*, [online] 24(1), p.41. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6337492/>>**In-text:** (Brito and Zang, 2018)
 9. Peterson, J., Dwyer, J., Adlercreutz, H., Scalbert, A., Jacques, P. and McCullough, M., 2010. Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition Reviews*, [online] 68(10), pp.571-603. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2951311/>>**In-text:** (Peterson et al., 2010)
 10. Tangney, C. and Rasmussen, H., 2013. Polyphenols, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Current Atherosclerosis Reports*, [online] 15(5). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3651847/>**In-text:** (Tangney and Rasmussen, 2013)
 11. Frijhoff, J., Winyard, P., Zarkovic, N., Davies, S., Stocker, R., Cheng, D., Knight, A., Taylor, E., Oettrich, J., Ruskovska, T., Gasparovic, A., Cuadrado, A., Weber, D., Poulsen, H., Grune, T., Schmidt, H. and Ghezzi, P., 2015. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Στρεξ. *Antioxidants & Redox Signaling*, [online] 23(14), pp.1144-1170. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4657513/>>**In-text:** (Frijhoff et al., 2015)
 12. Soni, M., Taylor, S., Greenberg, N. and Burdock, G., 2002. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*, [online] 40(10), pp.1335-1373. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12387298/>>**In-text:** (Soni, Taylor, Greenberg and Burdock, 2002)
 13. Samarasinghe, S., Krishnan, K., Naidu, R., Megharaj, M., Miller, K., Fraser, B. and Aitken, R., 2018. Parabens generate reactive oxygen species in human spermatozoa. *Andrology*, [online] 6(4), pp.532-541. Available at: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/andr.12499>>**In-text:** (Samarasinghe et al., 2018)

14. Chen, Q., Pan, C., Li, Y., Zhang, M. and Gu, W., 2016. The Combined Effect of Methyl- and Ethyl-Paraben on Lifespan and Preadult Development Period of *Drosophilamelanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Insect Science*, [online] 16(1), p.15. Available at: <https://academic.oup.com/jinsectscience/article/16/1/15/2726616>**In-text:** (Chen et al., 2016)
15. Valkova, N., Lépine, F., Valeanu, L., Dupont, M., Labrie, L., Bisailon, J., Beaudet, R., Shareck, F. and Villemur, R., 2001. Hydrolysis of 4-Hydroxybenzoic Acid Esters (Parabens) and Their Aerobic Transformation into Phenol by the Resistant *Enterobacter cloacae* Strain EM. *Applied and Environmental Microbiology*, [online] 67(6), pp.2404-2409. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92888/>**In-text:** (Valkova et al., 2001)
16. Garcia, S., Abu-Qare, A., Meeker-O'Connell, W., Borton, A. and Abou-Donia, M., 2003. Methyl Parathion: A Review of Health Effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, [online] 6(2), pp.185-210. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12554434/> **In-text:** (Garcia et al., 2003)
17. Tabassum, N., Rafique, U., Balkhair, K. and Ashraf, M., 2014. Chemodynamics of Methyl Parathion and Ethyl Parathion: Adsorption Models for Sustainable Agriculture. *BioMed Research International*, [online] 2014, pp.1-8. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3932840/>**In-text:** (Tabassum, Rafique, Balkhair and Ashraf, 2014)
18. Edwards, F., Yedjou, C. and Tchounwou, P., 2011. Involvement of oxidative stress in methyl parathion and parathion-induced toxicity and genotoxicity to human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environmental Toxicology*, [online] 28(6), pp.342-348. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768275/> **In-text:** (Edwards, Yedjou and Tchounwou, 2011)
19. WAZIR, U. and MOKBEL, K., 2019. Bisphenol A: A Concise Review of Literature and a Discussion of Health and Regulatory Implications. *In Vivo*, [online] 33(5), pp.1421-1423. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6755007/>**In-text:** (WAZIR and MOKBEL, 2019)
20. Calafat, A., Ye, X., Wong, L., Reidy, J. and Needham, L., 2008. Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003–2004. *Environmental Health Perspectives*, [online] 116(1), pp.39-44. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18197297/>**In-text:** (Calafat et al., 2008)

21. Rochester, J., 2013. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, [online] 42, pp.132-155. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23994667/>> **In-text:** (Rochester, 2013)
22. Gassman, N., 2017. Induction of oxidative στρες by bisphenol A and its pleiotropic effects. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, [online] 58(2), pp.60-71. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5458620/>>**In-text:** (Gassman, 2017)
23. John Aitken, R., Clarkson, J. and Fishel, S., 1989. Generation of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, and Human Sperm Function. *Biology of Reproduction*, [online] 41(1), pp.183-197. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/279973288_Generation_of_reactive_oxygen_species_lipid_peroxidation_and_human_sperm_function>**In-text:** (John Aitken, Clarkson and Fishel, 1989)
24. Bernatoniene, J. and Kopustinskiene, D., 2018. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Στρες. *Molecules*, [online] 23(4), p.965. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6017297/>>**In-text:** (Bernatoniene and Kopustinskiene, 2018)
25. Fan, F., Sang, L. and Jiang, M., 2017. Catechins and Their Therapeutic Benefits to Inflammatory Bowel Disease. *Molecules*, [online] 22(3), p.484. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6155401/>>**In-text:** (Fan, Sang and Jiang, 2017)
26. Khan SG, Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H. Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. *Cancer Res.* 1992 Jul 15;52(14):4050-2. PMID: 1617681.
27. Yannis V Simos, Ioannis I Verginadis, Ioannis K Toliopoulos, Anastasia P Velalopoulou, Ilias V Karagounis, Spyridon C. Karkabounas&Angelos M Evangelou (2012) Effects of catechin and epicatechin on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity, in vivo, *Redox Report*, 17:5, 181-186, DOI: 10.1179/1351000212Y.0000000020
28. Fraga, C. and Oteiza, P., 2011. Dietary flavonoids: Role of (–)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, [online] 51(4), pp.813-823. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584911003601?via%3Dihub> . **In-text:** (Fraga and Oteiza, 2011)

29. Wang, Z., Litterio, M., Müller, M., Vauzour, D. and Oteiza, P., 2020. (-)-Epicatechin and NADPH oxidase inhibitors prevent bile acid-induced Caco-2 monolayer permeabilization through ERK1/2 modulation. *Redox Biology*, [online] 28, p.101360. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6920094/>>**In-text:** (Wang et al., 2020)
30. Hursel, R. and Westerterp-Plantenga, M., 2013. Catechin- and caffeine-rich teas for control of body weight in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, [online] 98(6), pp.1682S-1693S. Available at: <<https://academic.oup.com/ajcn/article/98/6/1682S/4577486>>**In-text:** (Hursel and Westerterp-Plantenga, 2013)
31. Bentz, A.B. (2017). A Review of Quercetin: Chemistry, Antioxidant Properties, and Bioavailability. *Journal of Young Investigators*.
32. Zheng, Y., Deng, G., Liang, Q., Chen, D., Guo, R. and Lai, R., 2017. Antioxidant Activity of Quercetin and Its Glucosides from Propolis: A Theoretical Study. *Scientific Reports*, [online] 7(1). Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5548903/>>**In-text:** (Zheng et al., 2017)
33. Parasuraman, S., Anand David, A. and Arulmoli, R., 2016. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*, [online] 10(20), p.84. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5214562/>>. **In-text:** (Parasuraman, Anand David and Arulmoli, 2016)
34. Procházková, D., Boušová, I. and Wilhelmová, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, [online] 82(4), pp.513-523. Available at: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X11000396?via%3Dihub>>**In-text:** (Procházková, Boušová and Wilhelmová, 2011)
35. Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C. and Hernández-Carlos, B., 2019. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *Antioxidants*, [online] Available at: <<https://www.intechopen.com/books/antioxidants/antioxidant-compounds-and-their-antioxidant-mechanism>>**In-text:** (Hursel and Westerterp-Plantenga, 2013)
36. de la Lastra, C. and Villegas, I., 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, [online]

- 35(5), pp.1156-1160. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17956300/>>**In-text:** (de la Lastra and Villegas, 2007)
37. Pandey, K. and Rizvi, S., 2011. Anti-oxidative action of resveratrol: Implications for human health. *Arabian Journal of Chemistry*, [online] 4(3), pp.293-298. Available at: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535210001012>>**In-text:** (Pandey and Rizvi, 2011)
38. Fabris, S., Momo, F., Ravagnan, G. and Stevanato, R., 2008. Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophysical Chemistry*, 135(1-3), pp.76-83. **n-text:** (Fabris, Momo, Ravagnan and Stevanato, 2008)
39. Vlachogianni, I., Fragopoulou, E., Kostakis, I. and Antonopoulou, S., 2015. *In vitro* assessment of antioxidant activity of tyrosol, resveratrol and their acetylated derivatives. *Food Chemistry*, 177, pp.165-173. **In-text:** (Vlachogianni, Fragopoulou, Kostakis and Antonopoulou, 2015)
40. Chen, C., Jang, J., Li, M. and Surh, Y., 2005. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(4), pp.993-1000. **In-text:** (Chen, Jang, Li and Surh, 2005)
41. Maccarrone, M., Lorenzon, T., Guerrieri, P. and Agro, A., 1999. Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. *European Journal of Biochemistry*, 265(1), pp.27-34. **In-text:** (Maccarrone, Lorenzon, Guerrieri and Agro, 1999)
42. Xia, N., Daiber, A., Förstermann, U. and Li, H., 2016. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*, 174(12), pp.1633-1646.**In-text:** (Xia, Daiber, Förstermann and Li, 2016)
43. Pan, Y., Zhang, H., Zheng, Y., Zhou, J., Yuan, J., Yu, Y. and Wang, J., 2017. Resveratrol Exerts Antioxidant Effects by Activating SIRT2 To Deacetylate Prx1. *Biochemistry*, [online] 56(48), pp.6325-6328. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29125735/>>**In-text:** (Pan et al., 2017)
44. Fusco, S., Maulucci, G. and Pani, G., 2012. Sirt1: Def-eating senescence?. *Cell Cycle*, [online] 11(22), pp.4135-4146. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3524209/>>**In-text:** (Fusco, Maulucci and Pani, 2012)

45. Lubos, E., Loscalzo, J. and Handy, D., 2011. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, [online] 15(7), pp.1957-1997. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3159114/>>**In-text:** (Lubos, Loscalzo and Handy, 2011)
46. KarkovićMarković, A., Torić, J., Barbarić, M. and JakobušićBrala, C., 2019. Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules*, [online] 24(10), p.2001. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6571782/#molecules-24-02001-sch001>>**In-text:** (KarkovićMarković, Torić, Barbarić and JakobušićBrala, 2019)
47. Warleta, F., Quesada, C., Campos, M., Allouche, Y., Beltrán, G. and Gaforio, J., 2011. Hydroxytyrosol Protects against Oxidative DNA Damage in Human Breast Cells. *Nutrients*, [online] 3(10), pp.839-857. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3257739/>>**n-text:** (Warleta et al., 2011)
48. ΠΑΠΑΓΑΛΑΝΗΣ, Ν., 2015. Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα ΙΙΙ. Η τοξικότητα των ελεύθερων ριζών. *ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΑ*, 27(1), pp.17-50. **In-text:** (ΠΑΠΑΓΑΛΑΝΗΣ, 2015)
49. Peng, S., Zhang, B., Yao, J., Duan, D. and Fang, J., 2015. Dual protection of hydroxytyrosol, an olive oil polyphenol, against oxidative damage in PC12 cells. *Food & Function*, [online] 6(6), pp.2091-2100. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26037629/>>**n-text:** (Peng et al., 2015)
50. Martín, M., Ramos, S., Granado-Serrano, A., Rodríguez-Ramiro, I., Trujillo, M., Bravo, L. and Goya, L., 2010. Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxificant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, [online] 54(7), pp.956-966. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20166143/>>**In-text:** (Martín et al., 2010)
51. Zou, X., Feng, Z., Li, Y., Wang, Y., Wertz, K., Weber, P., Fu, Y. and Liu, J., 2012. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative στρες-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, [online] 23(8), pp.994-1006. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21937211/>>**In-text:** (Zou et al., 2012)

52. Rodríguez-Morató, J., Boronat, A., Kotronoulas, A., Pujadas, M., Pastor, A., Olesti, E., Pérez-Mañá, C., Khymenets, O., Fitó, M., Farré, M. and de la Torre, R., 2016. Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: hydroxytyrosol and tyrosol. *Drug Metabolism Reviews*, 48(2), pp.218-236. **In-text:** (Rodríguez-Morató et al., 2016)
53. Vissers, M., Zock, P., Roodenburg, A., Leenen, R. and Katan, M., 2002. Olive Oil Phenols Are Absorbed in Humans. *The Journal of Nutrition*, 132(3), pp.409-417. **In-text:** (Vissers et al., 2002)
54. Holst, B. and Williamson, G., 2008. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), pp.73-82. **In-text:** (Holst and Williamson, 2008)
55. I, V. and M, M., 1970. Alcohol, Amines, and Alkaloids: A Possible Biochemical Basis for Alcohol Addiction. *Science*, 167(3920), pp.1005-1007. **In-text:** (I and M, 1970)
56. Tacker, M., McIsaac, W. and Creaven, P., 1970. Metabolism of tyramine-1-14C by the rat. *Biochemical Pharmacology*, 19(10), pp.2763-2773. **In-text:** (Tacker, McIsaac and Creaven, 1970)
57. PERONA, J., CABELLOMORUNO, R. and RUIZGUTIERREZ, V., 2006. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(7), pp.429-445. **In-text:** (Perona et al, 2006)
58. Lee, K., Hur, J., Lee, Y., Yoon, B. and Choi, S., 2018. Protective Effects of Tyrosol Against Oxidative Damage in L6 Muscle Cells. *Food Science and Technology Research*, 24(5), pp.943-947. **In-text:** (Lee et al., 2018)
59. Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H. and Jürgens, G., 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine*, 13(4), pp.341-390. **In-text:** (Esterbauer, Gebicki, Puhl and Jürgens, 1992)
60. Giovannini, C., Straface, E., Modesti, D., Coni, E., Cantafora, A., De Vincenzi, M., Malorni, W. and Masella, R., 1999. Tyrosol, the Major Olive Oil Biophenol, Protects Against Oxidized-LDL-Induced Injury in Caco-2 Cells. *The Journal of Nutrition*, 129(7), pp.1269-1277. **In-text:** (Giovannini et al., 1999)
61. Wang, W., Xia, Y., Yang, B., Su, X., Chen, J., Li, W. and Jiang, T., 2017. Protective Effects of Tyrosol against LPS-Induced Acute Lung Injury *via* Inhibiting NF- κ B and AP-1 Activation and Activating the HO-1/Nrf2 Pathways. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 40(5), pp.583-593. **In-text:**

62. Caraglia, M., Giuberti, G., Marra, M., Addeo, R., Montella, L., Murolo, M., Sperlongano, P., Vincenzi, B., Naviglio, S., Prete, S., Abbruzzese, A. and Stiuso, P., 2011. Oxidative stress and ERK1/2 phosphorylation as predictors of outcome in hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib plus octreotide LAR. *Cell Death & Disease*, 2(4), pp.e150-e150. **In-text:** (Caraglia et al., 2011)
63. Stiuso, P., Bagarolo, M., Ilisso, C., Vanacore, D., Martino, E., Caraglia, M., Porcelli, M. and Cacciapuoti, G., 2016. Protective Effect of Tyrosol and S-Adenosylmethionine against Ethanol-Induced Oxidative Stress of Hepg2 Cells Involves Sirtuin 1, P53 and Erk1/2 Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), p.622. **In-text:** (Stiuso et al., 2016)
64. Tarazona, J., Court-Marques, D., Tiramani, M., Reich, H., Pfeil, R., Istace, F. and Crivellente, F., 2017. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Archives of Toxicology*, 91(8), pp.2723-2743. **In-text:** (Tarazona et al., 2017)
65. Soudani, N., Chaâbane, M., Ghorbel, I., Elwej, A., Boudawara, T. and Zeghal, N., 2019. Glyphosate disrupts redox status and up-regulates metallothionein I and II genes expression in the liver of adult rats. Alleviation by quercetin. *General physiology and biophysics*, 38(02), pp.123-134. **In-text:** (Soudani et al., 2019)
66. BEURET, C., ZIRULNIK, F. and GIMENEZ, M., 2005. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reproductive Toxicology*, 19(4), pp.501-504. **In-text:** (BEURET, ZIRULNIK and GIMENEZ, 2005)
67. Bailey, D., Todt, C., Burchfield, S., Pressley, A., Denney, R., Snapp, I., Negga, R., Traynor, W. and Fitsanakis, V., 2018. Chronic exposure to a glyphosate-containing pesticide leads to mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species production in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, [online] 57, pp.46-52. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5803312/>> **In-text:** (Bailey et al., 2018)
68. George, J. and Shukla, Y., 2013. Emptying of Intracellular Calcium Pool and Oxidative Stress Imbalance Are Associated with the Glyphosate-Induced Proliferation in Human Skin Keratinocytes HaCaT Cells. *ISRN Dermatology*, [online] 2013, pp.1-12. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3773425/>> **In-text:** (George and Shukla, 2013)

69. Uren Webster, T. and Santos, E., 2015. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative στρεξ and of compensatory cellular στρεξ responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics*, [online] 16(1). Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4318436/>> **In-text:** (Uren Webster and Santos, 2015)
70. Caverzan, A., Piasecki, C., Chavarria, G., Stewart, C. and Vargas, L., 2019. Defenses Against ROS in Crops and Weeds: The Effects of Interference and Herbicides. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] 20(5), p.1086. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6429093/>> **In-text:** (Caverzan et al., 2019)
71. Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 1988; 20(2): 55-9
72. *International Journal of Toxicology*, 2008. Final Amended Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in Cosmetic Products. 27(4), pp.1-82. (Final Amended Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in Cosmetic Products, 2008)
73. Bingham, E.; Cochrane, B.; Powell, C.H.; Patty's Toxicology Volumes 1-9 5th ed. John Wiley & Sons. New York, N.Y. (2001)., p. V6 668 4
74. Pop, A., Kiss, B., Vlase, L., Popa, D., Paltinean, R., Iepure, R. and Loghin, F., 2011. Study of oxidative στρεξ induction after exposure to bisphenol a and methylparaben in rats. *Toxicology Letters*, [online] 205, p.S224. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/215738504_Study_of_oxidative_στρεξ_induction_after_exposure_to_bisphenol_a_and_methylparaben_in_rats> [Accessed 14 October 2020]. **n-text:** (Pop et al., 2011)
75. Ojha, A. and Srivastava, N., 2012. Redox imbalance in rat tissues exposed with organophosphate pesticides and therapeutic potential of antioxidant vitamins. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [online] 75, pp.230-241. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21864906/>> **[In-text:** (Ojha and Srivastava, 2012)].
76. Medina-Díaz, I., Ponce-Ruiz, N., Ramírez-Chávez, B., Rojas-García, A., Barrón-Vivanco, B., Elizondo, G. and Bernal-Hernández, Y., 2016. Downregulation of human paraoxonase 1 (PON1) by organophosphate pesticides in HepG2 cells. *Environmental*

- Toxicology*, [online] 32(2), pp.490-500. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26948828/>> **In-text:** (Medina-Díaz et al., 2016)
77. Kobayashi, K., Liu, Y., Ichikawa, H., Takemura, S. and Minamiyama, Y., 2020. Effects of Bisphenol A on Oxidative Στρες in the Rat Brain. *Antioxidants*, [online] 9(3), p.240. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7139612/>> **In-text:** (Kobayashi et al., 2020)
78. Ooe, H., Taira, T., Iguchi-Ariga, S. and Ariga, H., 2005. Induction of Reactive Oxygen Species by Bisphenol A and Abrogation of Bisphenol A-Induced Cell Injury by DJ-1. *Toxicological Sciences*, 88(1), pp.114-126. **In-text:** (Ooe, Taira, Iguchi-Ariga and Ariga, 2005)
79. Chitra, K., 2003. Induction of oxidative στρες by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology*, [online] 185(1-2), pp.119-127. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12505450/>> **In-text:** (Chitra, 2003)
80. Huc, L., Lemarié, A., Guéraud, F. and Héliès-Toussaint, C., 2012. Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, [online] 26(5), pp.709-717. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22515966/>> **n-text:** (Huc, Lemarié, Guéraud and Héliès-Toussaint, 2012)
81. Hassan, Z., Elobeid, M., Virk, P., Omer, S., ElAmin, M., Daghestani, M. and AlOlayan, E., 2012. Bisphenol A Induces Hepatotoxicity through Oxidative Στρες in Rat Model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, [online] 2012, pp.1-6. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3409570/>> **In-text:** (Hassan et al., 2012)
82. Kabuto, H., Hasuike, S., Minagawa, N. and Shishibori, T., 2003. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environmental Research*, [online] 93(1), pp.31-35. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12865045/>> **In-text:** (Kabuto, Hasuike, Minagawa and Shishibori, 2003)
83. Ponniah, M., Billett, E. and De Girolamo, L., 2015. Bisphenol A Increases BeWo Trophoblast Survival in Στρες-Induced Paradigms through Regulation of Oxidative Στρες and Apoptosis. *Chemical Research in Toxicology*, 28(9), pp.1693-1703. **In-text:** (Ponniah, Billett and De Girolamo, 2015)
84. Sang, S., Cheng, X., Stark, R., Rosen, R., Yang, C. and Ho, C., 2002. Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins: analysis of radical reaction products of catechin and epicatechin with 2,2-Diphenyl-1-

- picrylhydrazyl. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10(7), pp.2233-2237. **In-text:** (Sangetal., 2002)
85. Colica, C., Milanović, M., Milić, N., Aiello, V., De Lorenzo, A. and Abenavoli, L., 2018. A Systematic Review on Natural Antioxidant Properties of Resveratrol. *Natural Product Communications*, 13(9), pp.1934578X1801300. **In-text:** (Colica et al., 2018)
86. Gerszon, J., Rodacka, A. and Puchała, M., 2014. Antioxidant Properties of Resveratrol and its Protective Effects in Neurodegenerative Diseases. *Advances in Cell Biology*, 4(2), pp.97-117. **In-text:** (Gerszon, Rodacka and Puchała, 2014)
87. Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), pp.1147-1150. **In-text:** (C)
88. Βαλαβανίδης
89. Παπαγεωργίου 2005
90. Tsao, R., 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, [online] 2(12), pp.1231-1246. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3257627/>> **In-text:** (Tsao, 2010)
91. Kristensen, D., Skalkam, M., Audouze, K., Lesné, L., Desdoits-Lethimonier, C., Frederiksen, H., Brunak, S., Skakkebaek, N., Jégou, B., Hansen, J., Junker, S. and Leffers, H., 2011. Many Putative Endocrine Disruptors Inhibit Prostaglandin Synthesis. *Environmental Health Perspectives*, [online] 119(4), pp.534-541. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3080937/>> **In-text:** (Kristensen et al., 2011)
92. Chepelev, N., Enikanolaiye, M., Chepelev, L., Almohaisen, A., Chen, Q., Scoggan, K., Coughlan, M., Cao, X., Jin, X. and Willmore, W., 2013. Bisphenol A Activates the Nrf1/2-Antioxidant Response Element Pathway in HEK 293 Cells. *Chemical Research in Toxicology*, [online] 26(3), pp.498-506. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23360430/>> **In-text:** (Chepelev et al., 2013)
93. Scalbert, A., Johnson, I. and Saltmarsh, M., 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, [online] 81(1), pp.215S-217S. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15640483/>> (Scalbert, Johnson and Saltmarsh, 2005)
94. Chen, Y., Xiao, P., Ou-Yang, D., Fan, L., Guo, D., Wang, Y., Han, Y., Tu, J., Zhou, G., Huang, Y. and Zhou, H., 2009. SIMULTANEOUS ACTION OF THE FLAVONOID QUERCETIN ON CYTOCHROME P450 (CYP) 1A2, CYP2A6, N-ACETYLTRANSFERASE AND XANTHINE OXIDASE ACTIVITY IN HEALTHY

- VOLUNTEERS. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, [online] 36(8), pp.828-833. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19215233/>>**In-text:** (Chen et al., 2009)
95. Perron, N. and Brumaghim, J., 2009. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, [online] 53(2), pp.75-100. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19184542/>>(Perron and Brumaghim, 2009)
96. Pietta, P., 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, [online] 63(7), pp.1035-1042. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19184542/>>**In-text:** (Pietta, 2000)
97. Croft, K., 2016. Dietary polyphenols: Antioxidants or not?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, [online] 595, pp.120-124. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27095227/>>**In-text:** (Croft, 2016)
98. Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C., Kuča, K. and Musilek, K., 2015. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology*, [online] 90(1), pp.1-37. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26343967/>>**In-text:** (Valko et al., 2015)
99. Bouktaib, M et al. (2002) Regio- and stereoselective synthesis of the major metabolite of quercetin, quercetin-3-O-b-D-glucuronide. *Tetrahedron Letters* 43: 6263-6266.
100. Álvarez Cilleros, D., López-Oliva, M., Martín, M. and Ramos, S., 2020. (-)-Epicatechin and the colonic metabolite 2,3-dihydroxybenzoic acid protect against high glucose and lipopolysaccharide-induced inflammation in renal proximal tubular cells through NOX-4/p38 signalling. *Food & Function*, 11(10), pp.8811-8824.
101. Fountoucidou, P., Veskoukis, A., Kerasioti, E., Docea, A., Taitzoglou, I., Liesivuori, J., Tsatsakis, A. and Kouretas, D., 2019. 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. *Toxicology Letters*, 317, pp.24-44.
102. Docea, A., Gofita, E., Goumenou, M., Calina, D., Rogoveanu, O., Varut, M., Oлару, C., Kerasioti, E., Fountoucidou, P., Taitzoglou, I., Zlatian, O., Rakitskii, V., Hernandez, A., Kouretas, D. and Tsatsakis, A., 2018. Six months exposure to a real life mixture of 13 chemicals' below individual NOAELs induced non monotonic sex-dependent biochemical and redox status changes in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 115, pp.470-481.

103. Marrocco, I., Altieri, F. and Peluso, I., 2017. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, pp.1-32.

Βιβλιογραφία Εικόνων

1. Higashi, Y., Jitsuiki, D., Chayama, K. and Yoshizumi, M., 2006. Edaravone (3-Methyl-1-Phenyl-2-Pyrazolin-5-one), A Novel Free Radical Scavenger, for Treatment of Cardiovascular Diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*, 1(1), pp.85-93.
2. Frijhoff, J., Winyard, P., Zarkovic, N., Davies, S., Stocker, R., Cheng, D., Knight, A., Taylor, E., Oettrich, J., Ruskovska, T., Gasparovic, A., Cuadrado, A., Weber, D., Poulsen, H., Grune, T., Schmidt, H. and Ghezzi, P., 2015. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, [online] 23(14), pp.1144-1170. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4657513/>>
3. Simioni, C., Zauli, G., Martelli, A., Vitale, M., Sacchetti, G., Gonelli, A. and Neri, L., 2018. Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget*, [online] 9(24), pp.17181-17198. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5908316/>
4. Tsao, R., 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, [online] 2(12), pp.1231-1246. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3257627/>
5. Ganesan, K. and Xu, B., 2017. A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans. *Nutrients*, 9(5), p.455.
6. Tsao, R., 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, [online] 2(12), pp.1231-1246. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3257627/>
7. Beconcini, D., Felice, F., Fabiano, A., Sarmento, B., Zambito, Y. and Di Stefano, R., 2020. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Cherry Extract: Nanosystems-Based Strategies to Improve Endothelial Function and Intestinal Absorption. *Foods*, 9(2), p.207.
8. Bernatoniene, J. and Kopustinskiene, D., 2018. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules*, [online] 23(4), p.965. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6017297/>>**In-text:** (Bernatoniene and Kopustinskiene, 2018)
9. Bernatoniene, J. and Kopustinskiene, D., 2018. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules*, [online] 23(4), p.965. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6017297/>>**In-text:** (Bernatoniene and Kopustinskiene, 2018)

10. Fan, F., Sang, L. and Jiang, M., 2017. Catechins and Their Therapeutic Benefits to Inflammatory Bowel Disease. *Molecules*, [online] 22(3), p.484. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6155401/>>**In-text:** (Fan, Sang and Jiang, 2017)
11. Fan, F., Sang, L. and Jiang, M., 2017. Catechins and Their Therapeutic Benefits to Inflammatory Bowel Disease. *Molecules*, [online] 22(3), p.484. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6155401/>>**In-text:** (Fan, Sang and Jiang, 2017)
12. Zheng, Y., Deng, G., Liang, Q., Chen, D., Guo, R. and Lai, R., 2017. Antioxidant Activity of Quercetin and Its Glucosides from Propolis: A Theoretical Study. *Scientific Reports*, [online] 7(1). Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5548903/>>**In-text:** (Zheng et al., 2017)
13. Tapia-Hernández, J., Rodríguez-Felix, F., Juárez-Onofre, J., Ruiz-Cruz, S., Robles-García, M., Borboa-Flores, J., Wong-Corral, F., Cinco-Moroyoqui, F., Castro-Enríquez, D. and Del-Toro-Sánchez, C., 2018. Zein-polysaccharide nanoparticles as matrices for antioxidant compounds: A strategy for prevention of chronic degenerative diseases. *Food Research International*, 111, pp.451-471.
14. Urbaniak, A., Molski, M. and Szeląg, M., 2012. Quantum-chemical Calculations of the Antioxidant Properties of trans-p-coumaric Acid and trans-sinapinic Acid. *Computational Methods in Science and Technology*, 18(2), pp.117-128.
15. Jarosova, V., Vesely, O., Doskocil, I., Tomisova, K., Marsik, P., Jaimes, J., Smejkal, K., Kloucek, P. and Havlik, J., 2020. Metabolism of cis- and trans-Resveratrol and Dihydroresveratrol in an Intestinal Epithelial Model. *Nutrients*, 12(3), p.595.
16. Jarosova, V., Vesely, O., Doskocil, I., Tomisova, K., Marsik, P., Jaimes, J., Smejkal, K., Kloucek, P. and Havlik, J., 2020. Metabolism of cis- and trans-Resveratrol and Dihydroresveratrol in an Intestinal Epithelial Model. *Nutrients*, 12(3), p.595.
17. de la Lastra, C. and Villegas, I., 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, [online] 35(5), pp.1156-1160. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17956300/>>**In-text:** (de la Lastra and Villegas, 2007)

18. Xia, N., Daiber, A., Förstermann, U. and Li, H., 2016. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*, 174(12), pp.1633-1646. **In-text:** (Xia, Daiber, Förstermann and Li, 2016)
19. Rodríguez-Morató, J., Boronat, A., Kotronoulas, A., Pujadas, M., Pastor, A., Olesti, E., Pérez-Mañá, C., Khymenets, O., Fitó, M., Farré, M. and de la Torre, R., 2016. Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: hydroxytyrosol and tyrosol. *Drug Metabolism Reviews*, 48(2), pp.218-236. **In-text:** (Rodríguez-Morató et al., 2016)
20. KarkovićMarković, A., Torić, J., Barbarić, M. and JakobušićBrala, C., 2019. Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules*, [online] 24(10), p.2001. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6571782/#molecules-24-02001-sch001>> **In-text:** (KarkovićMarković, Torić, Barbarić and JakobušićBrala, 2019)
21. Zou, X., Feng, Z., Li, Y., Wang, Y., Wertz, K., Weber, P., Fu, Y. and Liu, J., 2012. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, [online] 23(8), pp.994-1006. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21937211/>> **In-text:** (Zou et al., 2012)
22. <https://simple.wikipedia.org/wiki/Glyphosate>
23. Uren Webster, T. and Santos, E., 2015. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics*, [online] 16(1). Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4318436/>> **In-text:** (Uren Webster and Santos, 2015)
24. Michalkiewicz, S. Anodic oxidation of parabens in acetic acid–acetonitrile solutions. *J Appl Electrochem* 43, 85–97 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10800-012-0502-5>