

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΜΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΔΟΣΕΙΣ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΟ ΟΡΙΟ
ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ
ΙΣΤΩΝ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ.

PRESERVATIVES AND PESTICIDES MIXTURE
ADMINISTRATION EFFECTS AT BELOW SAFETY LIMIT
DOSES ON THE OXIDOREDUCTIVE STATE OF RABBIT
TISSUES.

Χρήστος Κωνσταντίνος Γουρνίκης

Λάρισα, 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Δημήτριος Κουρέτας**

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

- **Δημήτριος Στάγκος**

Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

- **Αριστείδης Βεσκούκης**

Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο άνθρωπος, κατά την διάρκεια της ζωής του, έρχεται καθημερινά σε επαφή με διάφορες χημικές ουσίες. Οι περισσότερες δεν επιφέρουν κίνδυνο, αλλά κάποιες μπορεί να επιφέρουν προβλήματα. Για τον λόγο αυτό, ένα μεγάλο μέρος της επιστημονικής κοινότητας, ανά τα έτη, έχει στρέψει την προσοχή της στην μελέτη των επιδράσεων που μπορούν να έχουν οι χημικές ουσίες, όταν ο άνθρωπος έρχεται σε επαφή μαζί τους. Η συντριπτική πλειοψηφία των μελετών αυτών αξιολογούν την επίδραση των διαφόρων χημικών ουσιών όταν αυτές βρίσκονται σε υψηλή δόση. Ωστόσο, ο μέσος άνθρωπος δεν έρχεται σε επαφή με αυτές τις χημικές ουσίες σε υψηλή δόση αλλά σε χαμηλή δόση και σε τακτά χρονικά διαστήματα. Έχοντας αυτό το στοιχείο υπόψιν, στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν χαμηλές, υπό του ορίου ασφαλείας, δόσεις χημικών ουσιών. Παράλληλα, έχει εξακριβωθεί ότι, συχνά, τα ξενοβιοτικά ασκούν μεγαλύτερη τοξική επίδραση όταν αποτελούν συστατικά μειγμάτων ξενοβιοτικών ουσιών, παρά όταν δρουν μεμονομένα. Επομένως, μελετήθηκε η τοξική δράση ενός μείγματος ξενοβιοτικών ουσιών, σε χαμηλές δόσεις, καθώς συνάδει καλύτερα με τις συνθήκες έκθεσης του ανθρώπου κατά την καθημερινότητά του. Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η εξακρίβωση της μακροχρόνιας επίδρασης ενός μείγματος 7 ενδοκρινικών διαταρακτών, του Roundup και της γλυφοσάτης, σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε ιστούς κουνελιών, και πιο συγκεκριμένα, στην καρδιά και στον δεξιό νεφρό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η χορήγηση γλυφοσάτης και Roundup για 12 μήνες προκάλεσε μείωση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στον νεφρό κουνελιών. Δεν βρέθηκε καμία άλλη επίδραση. Επομένως, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι επάγεται οξειδωτικό στρες στον νεφρό μόνο από τα μεμονωμένα ξενοβιοτικά και όχι από το μείγμα ξενοβιοτικών.

ABSTRACT

Humans are exposed to a wide range of chemicals during their lives. Most of chemicals are not harmful, while some might be able to cause health problems. Thus, the majority of researchers have turned their interest towards the examination of the effects that chemicals have to humans when they are exposed to them. Most of these studies assess the effects of chemicals at a high dose. However, according to the real-life exposure scenario humans do not encounter xenobiotics at high, toxic doses, but at low doses quite often. Moreover, it has been shown that, often, xenobiotics exert more severe toxic effects when they are administered as mixtures than when they are administered individually. Therefore, the toxic effects of a xenobiotic mixture at low doses were studied since it matches better with the conditions of exposure of humans during their lives. In this regard, the purpose of the present study was to investigate the long-term low-dose administration effects of a mixture of 7 endocrine disruptors, roundup, and glyphosate on redox biomarkers in tissues of rabbits, and more specifically, the heart and the kidneys. According to the results obtained, the administration of glyphosate and roundup for 12 months induced a decrease of the total antioxidant capacity (TAC) in the kidney. No further effects were found. Consequently, it is concluded that oxidative stress is induced in the kidney due to individual xenobiotics and not due to the xenobiotic mixture.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

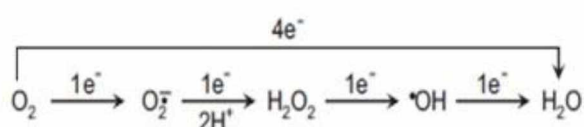
Ως ελεύθερες ρίζες ορίζονται τα άτομα ή οι ομάδες ατόμων με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, στην εξωτερική στιβάδα σθένους, που είναι ικανά να υπάρξουν ελεύθερα και αυτόνομα στη φύση (Veskoukis et al., 2012). Η ιδιότητα τους αυτή τα διαμορφώνει, συνήθως, ως εξαιρετικά ασταθής δομές, με μικρό χρόνο ημιζωής, που μπορούν να αντιδράσουν και να αλληλοεπιδράσουν με ένα μεγάλος πλήθος μακρομορίων, προκειμένου να σταθεροποιηθούν, οδηγώντας στην οξειδωσή τους (Veskoukis et al., 2012). Οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του οξειδωτικού στρες καθώς έχουν την δυνατότητα να προκαλούν ζημιά σε πρωτεΐνες, στο DNA, αλλά και σε λιπίδια (Klaus and Heribert, 2004). Η μεγάλη δραστηριότητα οφείλεται στην ικανότητα των ελευθέρων ριζών να δεσμεύουν ένα ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια, προκαλώντας την οξειδωσή τους (Finaud et al., 2006).

Ως δραστικές μορφές ορίζονται τα μόρια ή άτομα με μεγάλη δραστηριότητα που περιλαμβάνουν τις ελεύθερες ρίζες. Αυτές χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες, με βάση το κεντρικό άτομο, και πιο συγκεκριμένα στις δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), τις δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS), τις δραστικές μορφές θείου (reactive sulphur species, RSS) και τις δραστικές μορφές χλωρίου (reactive chlorine species, RCS), οι οποίες προέρχονται από το οξυγόνο, το άζωτο, το θείο και το χλώριο, αντίστοιχα (Veskoukis et al., 2012). Στις ROS περιλαμβάνονται οι ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}), περοξυλίου (ROO^{\cdot}), αλκοξυλίου (RO^{\cdot}), υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}), καθώς και οι μη ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), όζον (O_3) και μονήρες οξυγόνο (1O_2). Στις RNS ανήκουν το μονοξειδίο του αζώτου (NO^{\cdot}), το διοξειδίο του αζώτου (NO_2^{\cdot}), το υπεροξυνιτρώδες ανιόν (ONO_2O^{\cdot}) και το νιτρώδες/νιτρικό ανιόν. Στις RSS ανήκουν η ρίζαθειουλίου (RS^{\cdot}), το δισουλφίδιο ($RSSR$), τα σουλφοξειδία ($RS(O)SR'$ και $RS(O)_2SR'$), τοθεινικό (σουλφενικό) οξύ ($RSOH$) και τοθεινικό (σουλφινικό) οξύ (RSO_2H) (Giles et al., 2017). Στις RCS ανήκουν το άτομο του χλωρίου (Cl^{\cdot}), το υποχλωριώδες ανιόν (OCl^{\cdot}), το υποχλωριώδες οξύ ($HClO$) και οι χλωραμίνες ($RNHCl$). Τέλος, υπάρχουν και οι δραστικές μορφές καρβονυλίου (RCS) και οι δραστικές μορφές σεληνίου ($RSeS$) (Sies et al., 2017).

ΠΗΓΕΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν ενδογενώς στο σώμα κατά την διάρκεια διάφορων διεργασιών και λόγω διαφόρων παθήσεων όπως η φλεγμονή, το ψυχικό στρες, η έντονη άσκηση, ο καρκίνος και η γήρανση, ενώ ο σχηματισμός τους μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ενζυμικών ή μη-ενζυμικών αντιδράσεων.

Η μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αποτελεί τη βασική πηγή ATP στα κύτταρα των θηλαστικών, ωστόσο είναι υπεύθυνη για την σημαντικότερη παραγωγή ROS, τα οποία παράγονται από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο κυρίως ως παραπροϊόντα των διαδοχικών αντιδράσεων αναγωγής που λαμβάνουν μέρος στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων, προς παραγωγή H_2O (Εικόνα 1), λόγω ζημιάς στα μιτοχόνδρια, παθοφυσιολογικών καταστάσεων ή δυσλειτουργίας του μιτοχονδρίου, εμποδίζοντας έτσι τον μηχανισμό μεταφοράς ηλεκτρονίων (Fabrice C., 2019).



Εικόνα 1. Αντίδραση αναγωγής του O_2 σε H_2O .

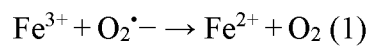
Τα ηλεκτρόνια της αλυσίδας, συχνά, διαφεύγουν και εν συνεχεία αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο (O_2) δημιουργώντας μία ροή O_2^- (McBride & Kraemer, 1999).

Το O_2^- παράγεται και μέσω του συμπλόκου CYP450, καθώς αυτό το σύμπλοκο μπορεί να αναχθεί, μέσω μιας φλαβοπρωτεΐνης και έπειτα να οξειδωθεί. Αποτέλεσμα αυτής την αντίδρασης είναι, σε μερικές περιπτώσεις, η απελευθέρωση O_2^- (Fang et al., 2002).

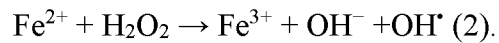
Μια άλλη φυσιολογική πηγή παραγωγής O_2^- είναι το ένζυμο οξειδάση του φωσφορικού νικοτιναμίδιο αδενο δινουκλεοτιδίου (NADPH). Το ένζυμο αυτό βρίσκεται σε κύτταρα υπεύθυνα για την ανοσία και την φαγοκυττάρωση, όπως τα λευκοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Κατά την φαγοκυττάρωση, επομένως, έχουμε αυξημένη παραγωγή O_2^- , προκειμένου να καταπολεμηθούν τα βακτήρια-ξενιστές (Birben et al., 2012).

Όσον αφορά το H₂O₂, αν και δεν είναι ελεύθερη ρίζα, ανήκει στις ROS εξαιτίας της τοξικότητάς του και της ικανότητάς του να προκαλεί εμμέσως τον σχηματισμό ROS (Finaud et al., 2006). Πιο συγκεκριμένα, αποτελεί βασικό συστατικό για την παραγωγή OH[•], που είναι η πιο δραστική από όλες τις ROS και οξειδώνει εύκολα τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια, τους υδατάνθρακες, το DNA και το RNA (Davies, 1995). Αυτό γίνεται μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss (1) και Fenton (2).

Αρχικά, έχουμε την μετατροπή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή:



Έπειτα, είναι η αντίδραση Fenton:



Τέλος, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματισθούν και μέσω εξωγενών πηγών, όπως οι ακτινοβολίες, διάφορα τοξικά χημικά, ο καπνός του τσιγάρου, περιβαλλοντικοί ρύποι, ζιζανιοκτόνα, ορισμένα φάρμακα, και άλλα.

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να έχουν θετικές και αρνητικές δράσεις. Δρουν αρνητικά στο DNA, στα λιπίδια, αλλά και στις πρωτεΐνες.

DNA

Είναι προφανές ότι οποιαδήποτε βλάβη στο DNA είναι επιζήμια για τον εκάστοτε οργανισμό. Έχει βρεθεί ότι οι ROS επιφέρουν οξειδωτική βλάβη στο DNA κυρίως μέσω της καταστροφής και της οξείδωσης πουρινών και πυριμιδινών, αλλά και μέσω πολλών άλλων τρόπων που ακόμη μελετούνται (Kryston et al., 2011). *ι.* Η δράση τους μπορεί να επιφέρει μεταλλάξεις και άλλες γενετικές επιπλοκές.

Τα κύρια προϊόντα της οξειδωτικής βλάβης του DNA περιλαμβάνουν την 8-υδροξυαδενίνη (8-OH-Ade), την 8-υδροξυγουανίνη (8-OH-Gua και το ισοδύναμο δεοξυνουκλεοσίδιο 8-OHdG), την 5,6-διυδροξυ-5,6-διυδροθυμίνη (γλυκόλη της θυμίνης) και τις αλλοιώσεις διάνοιξης δακτυλίου: 4,6-διαμινο-5-φορμαμιδοπυριμιδίνη (FapyAde) και 2,6-διαμινο-4-υδροξυ-5-φορμαμιδοπυριμιδίνη (FapyGua) (Cooke et al., 2006). Η 8-OHdG, που προκύπτει από την επίδραση της ρίζας υδροξυλίου στη θέση C-8 της γουανίνης, είναι η πιο σημαντική οξειδωμένη βάση, καθώς αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη για την εκτίμηση της οξειδωτικής βλάβης στο DNA (Kohen & Nyska, 2002).

ΛΙΠΙΔΙΑ

Η οξειδωτική βλάβη στα λιπίδια έχει ερευνηθεί σε μεγάλο βαθμό καθώς αποτελεί συχνό φαινόμενο, αφού οι κυτταρικές μεμβράνες, που αποτελούνται από ένα μεγάλο αριθμό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, είναι εύκολοι στόχοι για την επαγωγή οξειδωτικής βλάβης. Η λιπιδική υπεροξείδωση οφείλεται συνήθως στην πρωτονιωμένη μορφή της ρίζας σουπεροξειδίου (HO_2^\cdot) και η ρίζα υδροξυλίου (OH^\cdot) (Avery, 2011).

Η λιπιδική υπεροξείδωση ξεκινά με τα οξειδωτικά να αποσπών ένα υδρογόνο, σχηματίζοντας μια λιπιδική ελεύθερη ρίζα (L^\cdot), η οποία αντιδρά με το O_2 , σχηματίζει μία λιπιδική ρίζα περοξυλίου (LOO^\cdot), που αποσπά ένα άλλο άτομο υδρογόνου από ένα ακόρεστο λιπίδιο προς σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων (LOOH), τα οποία μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή λιπιδικής ρίζας περοξυλίου (LOO^\cdot) (Ayala et al., 2014).

ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Οι πρωτεΐνες είναι ένας από τους κύριους στόχους των ελευθέρων ριζών. Για τον λόγο αυτό, η οξειδωσή τους φέρει μεγάλο ενδιαφέρον για τους ερευνητές. Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τις ROS οδηγεί στην υπεροξειδωσή τους, καθώς και σε δομικές αλλαγές στην τριτοταγή δομή τους, ή ακόμη και στην αποδόμησή τους.

Οι πλευρικές αλυσίδες όλων των αμινοξέων είναι ευαίσθητες σε οξείδωση από τις ROS, με τα αμινοξέα που περιέχουν θείο, όπως η μεθειονίνη και η κυστεΐνη, και τα αμινοξέα με αρωματικές πλευρικές αλυσίδες όπως η ιστιδίνη, να είναι τα πιο ευάλωτα (Kunwar & Priyadarsini, 2011). Ένα πολύ σημαντικό στοιχείο αποτελεί το γεγονός ότι η οξείδωση κάποιων αμινοξικών καταλοίπων (κατάλοιπα λυσίνης, αργινίνης και προλίνης) οδηγεί στο σχηματισμό πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Stadtman & Levine, 2006).

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί με 2 τρόπους. Ο πρώτος είναι η "πρωτογενής πρωτεϊνική καρβονυλίωση", που οφείλεται στην οξείδωση μερικών αμινοξικών καταλοίπων και εκκινείται από τις ROS, τις RNS και τις RXS, και ο δεύτερος είναι η "δευτερογενής πρωτεϊνική καρβονυλίωση", που προκαλείται από την προσθήκη αλδευδών, οι οποίες σχηματίζονται κυρίως κατά τη διαδικασία της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (MDA) (Gonos et al., 2018).

Παρόλα αυτά, έχει αποδειχθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες, συνήθως όταν βρίσκονται σε χαμηλές δόσεις στο σώμα, έχουν και θετικές δράσεις. Αναφορικά, χρησιμοποιούνται από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα κατά την φαγοκυττάρωση, παίζουν τον ρόλο δεύτερων αγγελιοφόρων, ενεργοποιούν ορισμένα ένζυμα και παίζουν σημαντικό ρόλο στην σύσπαση μυών.

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

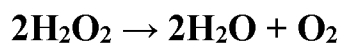
Ως αντιοξειδωτικό αναφέρεται κάθε ουσία η οποία καθυστερεί, προλαμβάνει ή απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη από ένα μόριο-στόχο και η συγκέντρωσή της είναι πολύ χαμηλότερη από την συγκέντρωση του μορίου-στόχου (Gutteridge & Halliwell, 2010).

Τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε 2 κύριες κατηγορίες, τα ενζυμικά και τα μη ενζυμικά.

ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

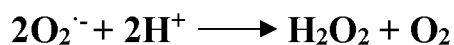
Στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνεται η **Καταλάση (CAT)**, η **Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)**, η **Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)** και η **Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)**.

Η **Καταλάση**, το ένζυμο που μελετήθηκε στην εργασία μας, είναι ένα ένζυμο που περιέχει αίμη, με σελήνιο ως συνένζυμο και καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε O_2 και H_2O , εμποδίζοντας το μετασχηματισμό του στην πολύ επιβλαβή ρίζα υδροξυλίου (OH^\cdot), όπως φαίνεται παρακάτω:

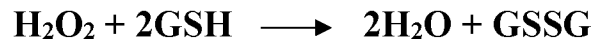


Η καταλάση χρησιμοποιεί ως συμπράγοντα το σίδηρο ή το μαγγάνιο, προκειμένου να καταλύσει την αποικοδόμηση του H_2O_2 σε O_2 και H_2O , ολοκληρώνοντας έτσι τη διαδικασία αποτοξίνωσης που ξεκινάει η υπεροξειδική δισμουτάση (Francenia et al., 2019).

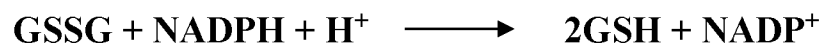
Οι **υπεροξειδικές δισμουτάσες (SODs)**, από την άλλη, καταλύουν την αντίδραση μετατροπής της $\text{O}_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 σύμφωνα με την αντίδραση που ακολουθεί:



Η **υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)** είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αναγωγή του H₂O₂ σε νερό χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) ως δότη ηλεκτρονίων, σύμφωνα με την αντίδραση:



Η **αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)** καταλύει την αντίδραση αναγωγής της οξειδωμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH), με ταυτόχρονη οξείδωση του NADPH (Piggott & Karuso, 2007), σύμφωνα με την αντίδραση που ακολουθεί:



Η GR είναι το βασικό ένζυμο για τη διατήρηση υψηλού λόγου GSH/GSSG που θεωρείται δείκτης της κυτταρικής οξειδοαναγωγής (Can et al., 2010).

ΜΗ ENZYMΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών. Ουσίες όπως **η Βιταμίνη C, η Βιταμίνη E, οι Πολυφαινόλες, το Ουρικό οξύ, το Σελήνιο και η Μελατονίνη** έχουν αποδειχθεί ως αντιοξειδωτικά, συμβάλλοντας στην καταπολέμηση των ελευθέρων ριζών. Ως πιο σημαντική, όμως, θεωρείται **η Γλουταθειόνη**.

Η γλουταθειόνη είναι το πιο σημαντικό υδρόφιλο αντιοξειδωτικό, το οποίο προστατεύει τα κύτταρα από εξωγενείς και ενδογενείς τοξίνες, συμπεριλαμβανομένων των ROS και των RNS (Aquilano et al., 2014). Η σύνθεση της γλουταθειόνης γίνεται *de novo* από τα αμινοξέα γλυκίνη, κυστεΐνη και γλουταμινικό οξύ και απαιτεί τη διαδοχική δράση δύο ενζύμων, της συνθετάσης της γ-γλουταμυλ κυστεΐνης (c-GCS) και της συνθετάσης της γλουταθειόνης (Townsend et al., 2003). Η γλουταθειόνη εντοπίζεται σε δύο μορφές, την ανηγμένη μορφή (GSH) και την οξειδωμένη μορφή (GSSG), με την ανηγμένη μορφή να αποτελεί > 98% της συνολικής γλουταθειόνης. Κατά την αντίδραση με τις ROS, η GSH οξειδώνεται σε GSSG. (Ribas et al., 2014). Η αντιοξειδωτική λειτουργία της γλουταθειόνης οφείλεται στη ανηγμένη μορφή της και καθορίζεται από τη σουλφυδρυλική ομάδα (-SH) της κυστεΐνης, η οποία οξειδώνεται όταν η GSH ανάγει τα μόρια στόχους (Ribas et al., 2014).

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Ο όρος οξειδωτικό στρες υπάρχει σαν έννοια στην βιολογία και την ιατρική από το 1985 όταν πρωτοεμφανίστηκε στο Κεφάλαιο 1 ενός βιβλίου με τίτλο «Οξειδωτικό Στρες» (Sies et al., 2017). Από τότε μέχρι σήμερα, το ενδιαφέρον των ερευνητών για το οξειδωτικό στρες ως ερευνητικό πεδίο έχει αυξηθεί σημαντικά. Ως αποτέλεσμα, όλο και περισσότερες ερευνητικές προσπάθειες διενεργούνται για την επίτευξη της πλήρους κατανόησης αυτού του πολύπλοκου συστήματος.

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η γενική ανισορροπία υπέρ των οξειδωτικών έναντι των αντιοξειδωτικών, η οποία επιφέρει διαταραχή στην οξειδοαναγωγική σηματοδότηση και μοριακές βλάβες (Sies και Jones, 2007). Τα οξειδωτικά παράγονται φυσιολογικά ως παράγωγα του αερόβιου μεταβολισμού, αλλά μπορούν να παραχθούν σε αυξημένες δόσεις λόγω διάφορων παθοφυσιολογικών διαταραχών (Sies, 1996). Κατά τον αερόβιο μεταβολισμό, το οξυγόνο, ως απαραίτητο συστατικό, χρησιμοποιείται στις αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων, κυρίως των μιτοχονδρίων των ευκαρυωτικών κυττάρων, για την παραγωγή ενέργειας (Halliwell και Gutteridge, 2015). Ωστόσο, κατά την διεργασία αυτή, δημιουργούνται επιζήμιες ουσίες που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στον οργανισμό. Έτσι, δημιουργείται μια παράδοξη κατάσταση κατά την οποία όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν ανάγκη το οξυγόνο για να επιβιώσουν, αλλά το οξυγόνο προκαλεί και βλάβες στους οργανισμούς αυτούς (Davies, 1995).

ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ

Ως ενδοκρινικοί διαταράκτες (EDCs) ορίζονται οι χημικές ουσίες που έχουν βλαβερές επιδράσεις στο ενδοκρινικό σύστημα οργανισμών (Monneret, 2017).

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες ασκούν την επίδρασή τους στο ορμονικό σύστημα μέσω της ικανότητάς τους να μιμούνται τις φυσιολογικές ορμόνες στο σώμα, αλλά και λόγω της ιδιότητάς τους να λειτουργούν ως ανταγωνιστές των ορμονών, καθώς δεσμεύονται στους υποδοχείς του, οδηγώντας σε αναστολή της σηματοδότησης (Kabir et al., 2015).

Οι EDCs μπορούν να εισέλθουν στο ανθρώπινο σώμα με μία ποικιλία οδών. Αρχικά, μέσω της κατανάλωσης τροφίμων, όπως το κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, και μολυσμένου νερού (Kabir et al., 2015). Επίσης, τα βρέφη έρχονται σε επαφή με τους EDCs μέσω του θηλασμού, των βρεφικών προϊόντων και του μολυσμένου αέρα (Kabir et al., 2015).

Στη μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε 7 ενδοκρινικούς διαταράκτες ως ένα χημικό μείγμα EDCs. Το μείγμα αυτό αποτελούνταν από τη γλυφοσάτη (Glyphosate), μεθυλ-παραβένιο (Methylparaben, MePB), βουτυλ-παραβένιο (Butylparaben, BuPB), προπυλ-παραβένιο (Propylparaben, PrPB), τρικλοζάνη (Triclosan, TCS), δισφαινόλη Α (Bisphenol A, BPA) και φθαλικός δι-(2-αιθυλοεξυλο) εστέρας (Di-2-ethylhexylphthalate, DEHP). Ταυτόχρονα, στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε και το εντομοκτόνο Roundup αλλά και η γλυφοσάτη, που αποτελεί το ενεργό συστατικό του Roundup.

Γλυφοσάτη

Πρόκειται για ένα πασίγνωστο μη-επιλεκτικό ζιζανιοκτόνο, γνωστό κυρίως με την εμπορική ονομασία round-up. Μετά την εμπορευματοποίησή του το 1974, κυριάρχησε στην αγορά (Duke, 2017). Η δημοτικότητά της οφείλεται στην αποτελεσματική θανάτωση των ζιζανίων με χαμηλό κόστος, αλλά επίσης και στη χαμηλή τοξικότητα, την ταχεία απορρόφηση από τα φυτά και την αργή εξέλιξη της ανθεκτικότητας στα ζιζάνια (Bai et al., 2016).

Η γλυφοσάτη καταστέλλει την δράση της 5-ενολοπυροσταφυλοσικιμικής-3-φωσφορικής συνθάσης (EPSPS), του έκτου ενζύμου στο μονοπάτι του σικιμικού, το οποίο είναι απαραίτητο για την σύνθεση των αρωματικών αμινοξέων και σχεδόν όλων των ενώσεων με αρωματικό δακτύλιο στις αλγείες, στα φυτά, στα βακτήρια και στους μύκητες (Bentley, 1990). Η καταστολή της δράσης του ενζύμου EPSPS απορρυθμίζει το μονοπάτι, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτη ροή άνθρακα, κυρίως προς το σικιμικό οξύ, μειώνοντας έτσι την ποσότητα των αναγκαίων μορίων που χρειάζονται για την δέσμευση του άνθρακα και επιφέροντας, έτσι, μεταβολικά προβλήματα (Bai et.al., 2016). Εφόσον οι άνθρωποι δεν διαθέτουν αυτή τη μεταβολική οδό, δεν θεωρήθηκε επικίνδυνο, ενώ για πολύ καιρό, το γενικό τοξικολογικό προφίλ της έμοιαζε σχετικά ακίνδυνο (Bai et.al., 2016).

Ωστόσο, η γλυφοσάτη έχει συσχετιστεί με το οξειδωτικό στρες. Ένα εντομοκτόνο με βάση τη γλυφοσάτη έχει τη δυνατότητα να προκαλεί αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας και παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου στο *C.elegans* (Bailey et.al., 2018), ενώ προκαλεί ζημιά και στα κύτταρα του ήπατος ποντικών, το κύριο όργανο αποτοξίνωσης μολυσματικών ουσιών από τρόφιμα και ποτά (Szarek et.al., 2000).

Μεθυλ-παραβένιο (MePB)

Το μεθυλ-παραβένιο είναι ένας μεθυλεστέρας του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος, που χρησιμοποιείται ευρύτατα ως αντιμικροβιακό συντηρητικό σε καλλυντικά, τρόφιμα και φάρμακα (Soni et al., 2002). Θεωρείται το πιο ασφαλές, καθώς η τοξικότητα των παραβένιων σχετίζεται με τον αριθμό των ανθράκων που υπάρχουν στην αλκυλομάδα του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος. Δημιουργεί μιτοχονδριακή βλάβη που είναι εξαρτώμενη από την επαγωγή αλλαγής της αγωγιμότητας της μεμβράνης, συνοδευόμενη από μιτοχονδριακή αποπόλωση και μείωση του κυτταρικού ATP μέσω αποσύνδεσης (uncoupling) της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Soni et al., 2002). Όπως και τα υπόλοιπα παραβένια, το MePB παρουσιάζει ασθενή οιστρογονική δράση η οποία *in vivo* οιστρογονική δράση των παραβένιων μειώνεται κατά περίπου τρεις τάξεις μεγέθους σε σύγκριση με την *in vitro* δράση τους (Monneret, 2017).

Βουτυλ-παραβένιο (BuPB)

Το βουτυλ-παραβένιο είναι ένας εστέρας του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος. Χρησιμοποιείται ως αντιμικροβιακό συντηρητικό σε καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα. Η αντιμικροβιακή δράση των παραβενίων προκύπτει μέσω της αναστολής των ΑΤΡασών και των φωσφοτρανσφερασών, αλλά και μέσω της διαταραχής του μεμβρανικού συστήματος μεταφοράς (Yang et al., 2018).

Το βούτυλ- παραβένιο θεωρούνταν αρκετά ασφαλές λόγω της αντιμικροβιακής δράσης του, της τιμής pH και της σταθερότητάς του στη θερμότητα. Ωστόσο, αυτή η εκτίμηση για την ασφάλεια του έχει έρθει ξανά στο προσκήνιο, καθώς αποδείχθηκε ότι ένα μέρος του βούτυλ-παραβενίου μπορεί να απορροφηθεί και να παραμείνει στους ιστούς του σώματος χωρίς να υδρολυθεί από τις εστεράσες (Darbre et.al., 2004). Σε in vitro και in vivo μοντέλα, το βούτυλ-παραβένιο φέρεται να μιμείται την δράση των οιστρογόνων, δρώντας έτσι ως ξένοοιστρογόνο (Reisch, 2005), ενώ στη μελέτη του Harvey (2003), συσχετίστηκε το βούτυλ-παραβένιο με αναπαραγωγική τοξικότητα.

Σε μια in vitro μελέτη σε αποικίες υπατοκυττάρων ποντικού, βρέθηκε ότι οι κύριες αιτίες επαγωγής τοξικότητας είναι η μείωση των επιπέδων ΑΤΡ, της ολικής ποσότητας του νουκλεοτιδίου αδερίνη και της γλουταθειόνης (Nakagawa και Moldeus, 1998).

Επίσης, λόγω της ιδιότητας των παραβενίων να γίνονται λιγότερο διαλυτά στο νερό όσο αυξάνεται ο αριθμός των ανθράκων της αλκυλικής ομάδας τους, το βούτυλ-παραβένιο είναι πολύ λιποφιλικό και έτσι έχει την ιδιότητα να διαπερνά και να αλληλεπιδρά με την λιπιδική μεμβράνη των υπατοκυττάρων. Έτσι, χορήγηση μέσω στόματος βούτυλ-παραβενίου οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων MDA, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε 2 πιθανές εξηγήσεις: α) Είτε στην κατά το ήμισυ ενσωμάτωση του βούτυλ- παραβενίου στη πλασματική μεμβράνη των κυττάρων, ή β) στην καταστολή του αντιοξειδωτικού συστήματος από το βούτυλ-παραβένιο. Επομένως, το βούτυλ-παραβένιο οδηγεί σε αλλοίωση του αντιοξειδωτικού συστήματος, καθώς και σε λιπιδική υπεροξειδωση, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες σε πειραματικά ζώα (Komal and Ramtej, 2011).

Πρόπυλ-παραβένιο (PrPB)

Το πρόπυλ-παραβένιο είναι ένας εστέρας του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος, ο οποίος παράγεται από την εστεροποίηση του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος με τη n-προπανόλη, με τη χρήση ενός όξινου καταλύτη και περίσσεια προπανόλης (Soni et al., 2002). Το πρόπυλ-παραβένιο αποτελεί το πιο συχνό συντηρητικό για αντιμικροβιακή δράση και αύξηση του προσδόκιμου ζωής ενός τρόφιμου.

Πολλές έρευνες *in vitro* και *in vivo* είχαν δείξει ότι το πρόπυλ-παραβένιο είναι μια μη τοξική ουσία, αλλά με περαιτέρω έρευνες, αποδείχθηκαν κάποιες δυσμενείς επιδράσεις, γεγονός που οδήγησε στην επανεξέταση της ασφάλειάς του το 2010 (Martin et.al., 2010). Αν και έχει βρεθεί ότι το πρόπυλ-παραβένιο δεν έχει οιστρογονική δράση (Sivaraman, 2018), χορήγησή του σε κύτταρα Vero από νεφρά πιθήκου για 24 ώρες προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της 8-OHdG (8-Oxo-2'-deoxyguanosine), ενός δείκτη οξειδωτικού, οδηγώντας σε καταστολή της κυτταρικής ανάπτυξης λόγω μείωσης της μιτωτικής δράσης (Martin et.al., 2010). Επίσης, για πρώτη φορά, παρατηρήθηκε η ικανότητα ενός παραβενίου να επιφέρει οξειδωτικό στρες συνοδευόμενο από ζημία στο DNA σε ένα σύστημα κυττάρων θηλαστικού (Martin et.al., 2010). Ωστόσο, η ταυτότητα και η πηγή των ριζών που προκαλούν το οξειδωτικό στρες δεν έχουν ακόμη αποσαφηνισθεί. Η παραγωγή του 8-OHdG που βρέθηκε, όμως, δίνει την εντύπωση ότι οι ρίζες υδροξυλίου, το μονήρες οξυγόνο και οι ρίζες φαινοξέος είναι πιθανές πηγές για το οξειδωτικό στρες (Martin et.al., 2010).

Τρικλοζάνη

Η τρικλοζάνη είναι ένα συντηρητικό με αντιμικροβιακή δράση. Βρίσκεται συχνά σε καλλυντικά και άλλα καταναλωτικά προϊόντα, επιφέροντας έκθεση περίπου στο 75% των Αμερικανών (Weatherly et.al., 2018). Η τρικλοζάνη ανιχνεύεται συχνά στο ανθρώπινο γάλα, το πλάσμα και τα ούρα αφού οι άνθρωποι εκτίθενται καθημερινά στην τρικλοζάνη. (Wang & Tian, 2015).

Έρευνες πάνω σε θηλαστικά δεν εντόπισαν οξεία , μεταλλαξιγόνο, καρκινογόνο ή αναπτυξιακή τοξικότητα, αλλά η πιθανή δράση τους ως ενδοκρινείς διαταράκτες ήρθε στο προσκήνιο, καθώς διαταράσσουν την ομοιόσταση της θυροειδούς ορμόνης (Dann et.al., 2010). Επιπροσθέτως, διαπιστώθηκε ότι η έκθεση σκωλήκων *Eisenia fetida* σε TCS για 14 μέρες προκάλεσε αύξηση της δράσης της, αύξηση της δράσης της GST και αύξηση των επιπέδων της MDA (Lin et al., 2010).

Διφαινόλη Α (BPA)

Η διφαινόλη Α είναι ένα πρόδρομο βιομηχανικό χημικό που χρησιμοποιείται, κυρίως, για την παραγωγή καταναλωτικών προϊόντων, όπως πολυανθρακικά πλαστικά, εποξειδικές ρητίνες και θερμικό χαρτί (Vandenberg et.al., 2007), αλλά και ως πρόσθετο για την εξάλειψη του πλεονάσματος του υδροχλωρικού οξέος κατά την παραγωγή PVC (Konieczna et.al., 2015). Η BPA παράγεται με την αντίδραση φαινόλης με ακετόνη, παρουσία μίας ισχυρά όξινης ρητίνης ως καταλύτη (Mikołajewska et al., 2015). Η BPA δεν χρησιμοποιείται μόνο για την παραγωγή πλαστικών που σκοπεύουν στην άμεση επαφή με τρόφιμα, αλλά, επίσης, και σε εσωτερικές επενδύσεις κονσερβών και καπακιών (Konieczna, 2015).

Υπάρχουν διάφορες οδοί για την έκθεση του ανθρώπου σε αυτό (μέσω στόματος, μέσω αναπνοής, μέσω του δέρματος κ.α.) και οι κύριες πηγές έκθεσης περιλαμβάνουν τη συσκευασία τροφίμων και τη σκόνη, οδοντιατρικά υλικά, εξοπλισμό για την φροντίδα της υγείας, θερμικό χαρτί και παιχνίδια και αντικείμενα για παιδιά και βρέφη (Konieczna et.al., 2015).

Το BPA μεταβολίζεται στο ήπαρ, μετατρέπεται σε γλυκουρονίδιο του BPA (BPAG) ή σε θειικό BPA (BPAS) και απεκκρίνεται μέσω των ούρων, ενώ διακατέχει και ένα οιστρογονικό χαρακτήρα, ωστόσο πολύ πιο αδύναμο από την εστραδιόλη (Domoradzki et.al., 2004), καθώς λόγω της φαινολικής δομής του, αλληλεπιδρά με του υποδοχείς του οιστρογόνου, δρώντας ως αγωνιστής ή ανταγωνιστής μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών εξαρτώμενα από υποδοχείς οιστρογόνου (Konieczna et.al., 2015). Αυτά τα 2 γεγονότα οδήγησαν στην πεποίθηση ότι οι επιζήμιες επιδράσεις ενδοκρινούς διαταραχής λόγω έκθεσης είναι μηδαμινές, καθιστώντας το BPA ένα ασφαλές χημικό για παγκόσμια και ευρεία χρήση στα μάτια της επιστημονικής κοινότητας.

Παρ' όλα αυτά, νέα πειραματικά δεδομένα ήρθαν στο φως και απέδειξαν ότι το ελεύθερο BPA έχει την ικανότητα να κυκλοφορεί στο σώμα (Vandenberg et.al., 2012), αλλά και την ικανότητα του να δρα ως ισχυρός ενδοκρινικός διαταράκτης, ακόμη και σε μικρές δόσεις (Rezg et.al., 2014), διαδραματίζοντας, έτσι, ρόλο σε πλήθος παθολογικών καταστάσεων, όπως η αγωνία και στα δύο φύλα, ορμονό-εξαρτώμενους όγκους και πλήθος μεταβολικών διαταραχών (Konieczna et.al., 2015).

Το ελεύθερο BPA επάγει ROS μέσω ενζυματικής (H_2O_2 /peroxidase and NADPH/CYP450) και μη-ενζυματικής (peroxynitrite/ CO_2 and OCl^-/HOCl) παραγωγής ριζών φαινοξυλίου, που με περαιτέρω κατεργασία με ένζυμα και με αντίδρασή τους με την ανηγμένη γλουταθειόνη και το NADPH, οδηγούν σε παραγωγή μεγάλης ποικιλίας ελευθέρων ριζών (Babu et.al., 2013), ενώ έχει συσχετιστεί με λιπιδική υπεροξειδωση και με καταστροφή του DNA επαγόμενη από οξειδωση (Asimakopoulos et.al., 2015).

Αν και ο μηχανισμός δεν είναι ακόμη απόλυτα γνωστός, η δομή του BPA εμφανίζει την πιθανή αντιοξειδωτική δράση του διαμέσου απώλειας ηλεκτρονίων μέσω του δεσμού O-H (Chepelev et.al., 2013).

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

Πρόκειται για πλαστικοποιητή που χρησιμοποιείται συχνά με σκοπό την αύξηση της ελαστικότητας, της ανθεκτικότητας και του προσδόκιμου ζωής των πλαστικών (Sedha et.al., 2015), και συναντάται κατά κόρον σε προϊόντα πολυβινυλοχλωρίδιου (PVC) (Jette Rank, 2005). Για την παραγωγή των PVC, χρησιμοποιούνται περίπου 20 διαφορετικοί φθαλικοί εστέρες, αλλά ο DEHP, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε και στη δική μας πειραματική διαδικασία, δεν δημιουργεί ομοιοπολικούς δεσμούς με έτερα μόρια, καθιστώντας τον επιρρεπή σε απόδρασή του από τα πλαστικά και μετανάστευσή του στο εγγύς περιβάλλον (Jette R., 2005). Ο φθαλικός δι-(2-αιθυλοεξυλο) εστέρας (DEHP) συντίθεται από φθαλικό οξύ, το οποίο εστεροποιείται με 2-αιθυλοεξανόλη (Erythropel et al., 2014). Ο DEHP ανήκει στην τάξη των πολλαπλασιαστών υπεροξειδισωμάτων και έχει ιδιότητες ενδοκρινικού διαταράκτη, ανταγωνιζόμενος τις επιδράσεις των φυλετικών ορμονών ή μεταβάλλοντας τις δράσεις των ενδογενών στεροειδών ορμονών, σε ζωικά μοντέλα (Latini et al., 2004).

Η υπέρμετρη χρήση τους οδηγεί σε υψηλή έκθεση του παγκόσμιου ανθρώπινου πληθυσμού μέσω πολλών οδών, συμπεριλαμβανομένου της κατάποσης, της δερματικής απορρόφησης και της εισπνοής (Latini 2005). Επίσης, ο DEHP έχει την ιδιότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να συσσωρεύεται στον εγκέφαλο (Wu et.al., 2014).

Έχει βρεθεί ότι η επαγωγή οξειδωτικού στρες λόγω έκθεσης σε φθαλικούς εστέρες στους όρχεις οδηγεί σε αγονία, ενώ ενδέχεται να παράγουν ROS που επιδρούν σε άλλες διάφορες μεταβολικές και αναπαραγωγικές διαδικασίες (Sedha et.al., 2015), όπως, για παράδειγμα, στην περίπτωση του διαβήτη τύπου 2, όπου υψηλές συγκεντρώσεις των ενώσεων αυτών βρέθηκαν σε τέτοιους ασθενείς. Επίσης, η χορήγηση DEHP σε νευρικά βλαστικά κύτταρα μύος NE-4C προκάλεσε την επαγωγή οξειδωτικού στρες, μέσω αύξησης των επιπέδων της MDA, της μείωσης της GSH και της μείωσης της δράσης των SOD και GPx (Wu et al., 2019).

Roundup

Το Roundup είναι ένα μείγμα άλατος ισοπροπυλαμίνης της N-(φωσφονομεθυλ) γλυκίνης (γλυφοσάτη), το οποίο είναι το κύριο συστατικό, νερού, χρωστικών και μερικών επιφανειοδραστικών ουσιών, όπως η πολυαιθοξυλιωμένη στεατική αμίνη (POEA), που προστίθεται για να βελτιωθεί η μεταφορά του ζιζανιοκτόνου στο φυτικό ιστό (Lipok et al., 2010). Σε σχέση με την γλυφοσάτη, είναι ευρέως γνωστό ότι το Roundup είναι πιο τοξικό.

Αρκετές ερευνητικές μελέτες έχουν συσχετίσει το Roundup με το οξειδωτικό στρες. Έχει βρεθεί ότι η καθημερινή χορήγηση Roundup σε μύες αρσενικών και θηλυκών ποντικών Swiss albino για 15 μέρες προκάλεσε σημαντική αύξηση των TBARS (Owagboriaye, 2019).

ΣΚΟΠΟΣ

Οι άνθρωποι εκτίθενται καθημερινά σε πολλαπλές χημικές ουσίες και σε δόσεις κάτω από τα ασφαλή όρια. Αν και μελέτες για πλήθος αυτών των χημικών ουσιών έχουν διεκπεραιωθεί, λίγες εξ' αυτών λαμβάνουν υπόψιν τους αυτό το γεγονός, καθώς, όπως προτείνεται από τα διεθνή πρωτόκολλα, διεξάγονται σε υψηλές δόσεις. Παράλληλα, οι χημικές ουσίες, συχνά, επιδρούν στον άνθρωπο, σχεδόν, ταυτοχρόνως. Η παρουσία 2 ή περισσότερων χημικών ουσιών μπορεί να ασκεί συνεργιστική, συνδυαστική ή ανταγωνιστική δράση, αλλά και να ενισχύει ή να αναστέλλει μηχανισμούς προστασίας, οδηγώντας έτσι σε ποικίλους κινδύνους. (Tsatsakis et al., 2016). Κατά συνέπεια, οι συγκεκριμένες μελέτες δεν προσομοιώνουν με ακρίβεια τα πραγματικά σενάρια έκθεσης. (Tsatsakis et al., 2017).

Επομένως, για την εκτίμηση του κινδύνου της μακροχρόνιας έκθεσης σε χημικά μείγματα, χρησιμοποιήθηκε μια νέα μεθοδολογία, ώστε να αξιολογηθεί εάν η μακροχρόνια έκθεση σε χαμηλές δόσεις χημικών μειγμάτων, από διαφορετικές πηγές, αποτελεί κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία (Tsatsakis et al., 2017). Επακολούθως, ο σκοπός αυτής της πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της μακροχρόνιας επίδρασης ενός μείγματος ενδοκρινικών διαταρακτών, του εντομοκτόνου Roundup και του ενεργού συστατικού του, γλυφοσάτη στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ιστών κουνελιών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πειραματόζωα

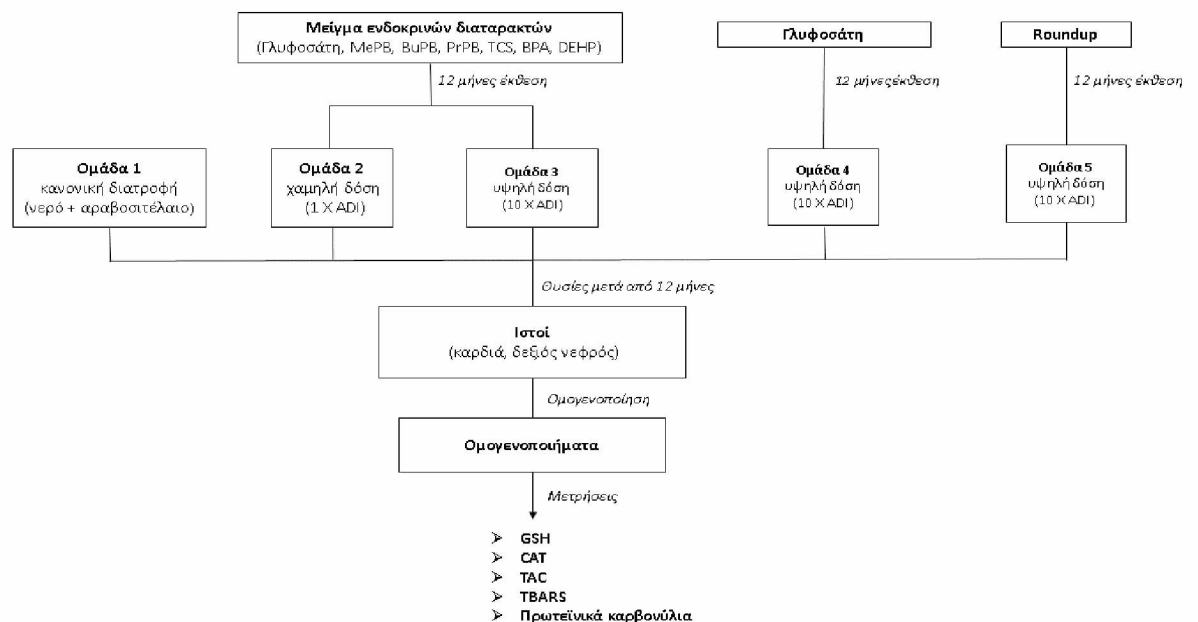
Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 20 New Zealand τύπου κουνέλια, 10 θηλυκά, με μέσο βάρος 3,015 kg, και 10 αρσενικά, με μέσο βάρος 2,94 kg. Όλα τα κουνέλια ήταν υγιή και είχαν ηλικία 2-3 μηνών. Η επιλογή των κουνελιών ως οργανισμού μοντέλο έγινε βάσει των πολλών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν. Πρόκειται για οργανισμούς με μικρούς κύκλους ζωής, είναι φιλήσυχα και υπάκουα, επιτρέπουν καλύτερο χειρισμό όντας λίγο μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα ποντίκια, ενώ έχουν και σχετικά μικρό κόστος συντήρησης και θρέψης. Η εκτροφή τους έγινε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας (23-24 °C) και σχετικής υγρασίας. Η θανάτωση των πειραματόζωων έγινε με χορήγηση του ενέσιμου διαλύματος Dolethal (1 ml / kg σωματικού βάρους). Όλες οι διαδικασίες ήταν σύμφωνες με την οδηγία 2010/63/EE της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για πειράματα σε ζώα.

Μείγματα

Στην μελέτη μας χορηγήθηκε μείγμα 7 ενδοκρινών διαταρακτών (γλυφοσάτη, μεθυλ-παραβένιο, βουτυλ-παραβένιο, προπυλ-παραβένιο, τρικλοζάνη, διφαινόλη Α και φθαλικό δι-(2-αιθυλοεξυλο) εστέρας) στις δόσεις 1 x ADI και 10 X ADI, καθώς επίσης και γλυφοσάτη σε δόση 10 X ADI και Roundup σε δόση 10 × ADI, όπου ADI ορίζεται η αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (acceptable daily intake) εκφρασμένη σε mg / kg σωματικού βάρους / ημέρα.

Πειραματική διαδικασία

Για την πειραματική διαδικασία, τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 5 ομάδες, με κάθε ομάδα να αποτελείται από 2 αρσενικά και 2 θηλυκά κουνέλια. Η 1^η ομάδα αποτελεί την ομάδα ελέγχου, στην οποία χορηγήθηκε νερό και αραβοσιτέλαιο. Στην 2^η ομάδα χορηγήθηκε η χαμηλή δόση του μείγματος ενδοκρινικών διαταρακτών ($1 \times \text{ADI}$), ενώ στην 3^η ομάδα χορηγήθηκε υψηλή δόση του μείγματος ($10 \times \text{ADI}$). Στην 4^η ομάδα χορηγήθηκε υψηλή δόση γλυφοσατίας ($10 \times \text{ADI}$) και τέλος στην 5^η ομάδα χορηγήθηκε υψηλή δόση Roundup $10 \times \text{ADI}$. Η χορήγηση των χημικών ουσιών διήρκεσε 12 μήνες και έπειτα τα ζώα θανατώθηκαν και συλλέχθηκαν η καρδιά και οι νεφροί.



Εικόνα2. Πειραματικός σχεδιασμός μελέτης.

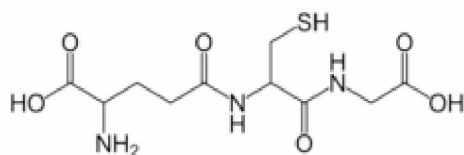
ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ

Αρχικά, για την ομογενοποίηση, ζυγίστηκαν τα δείγματα των ιστών (100-200 mg) και προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), το οποίο περιείχε ένα μείγμα αναστολέων πρωτεασών (EDTA, PMSF, απροτινίνη). Σε 10 ml PBS προστίθενται 100 μl EDTA, 100 μl PMSF και 100 μl απροτινίνης. Οι αναστολείς πρωτεασών διατηρούνται σε σωλήνες eppendorf στους -20°C . Έπειτα, σε 100 mg ιστού προστέθηκαν 300 μl PBS (Αραίωση $\frac{1}{4}$) και στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν στον ομογενοποιητή και ομογενοποιήθηκαν για 30 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα. Μετά την ομογενοποίηση, μεταφέρθηκαν στον πάγο και ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν στα 15,000 g, για 5 λεπτά, στους 5°C . Το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε και διατηρήθηκε σε ξεχωριστά κλάσματα στους -80°C . Τα κλάσματα αποψύχθηκαν μόνο μια φορά πριν από την ανάλυση.

Προσδιορισμός της γλουταθειόνης (GSH)

Βιοχημικό υπόβαθρο

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεϊνυλογλυκίνη) είναι η πλέον άφθονη θειόλη (SH) στους ζωικούς ιστούς. Είναι ένα τριπεπτίδιο, που απαντάται φυσικά και περιέχει μία πεπτιδική σύνδεση μεταξύ του γλουταμινικού οξέος, της γλυκίνης και της κυστεΐνης. Οι αναγωγικές ιδιότητες της γλουταθειόνης παίζουν κεντρικό ρόλο στις μεταβολικές οδούς, καθώς και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στην ανηγμένη μορφή της (GSH), όπως φαίνεται στην Εικόνα 3., καθώς το ένζυμο αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), το οποίο την επαναφέρει από την οξειδωμένη μορφή της (Δισουλφιδική γλουταθειόνη, GSSG), είναι στοιχειωδώς ενεργό και επαγωγίμο κατά το οξειδωτικό στρες. Στην πραγματικότητα, η αναλογία της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη, εντός των κυττάρων, χρησιμοποιείται συχνά επιστημονικά ως μέτρο κυτταρικής τοξικότητας.



Εικόνα 3. Σκελετική δομή της γλουταθειόνης

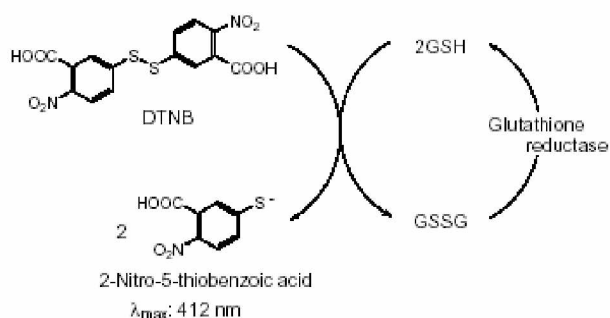
Η GSH απαιτείται ως συνένζυμο από μια ποικιλία ενζύμων που περιλαμβάνουν την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και τη θειολοτρανσφεράση (TTase). Η GSH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου, στον κύκλο του γ-γλουταμινικού οξέος, καθώς και στις λειτουργίες των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Η GSH είναι ζωτική για μια ποικιλία διαδικασιών της ζωής, συμπεριλαμβανομένης της αποτοξίνωσης των ξενοβιοτικών, της διατήρησης του επιπέδου των -SH των πρωτεϊνών, της ανταλλαγής θειολών-δισουλφιδίου, της απομάκρυνσης των υδροϋπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών και της μεταφοράς αμινοξέων στις μεμβράνες. Οι φυσιολογικές τιμές για τη συγκέντρωση της ενδοκυτταρικής GSH κυμαίνονται γενικά από 1 έως 10 mM.

Προετοιμασία ομογενοποιημένου ιστού για προσδιορισμό της γλουταθειόνης

1. Σε 50 μl ομογενοποιημένου ιστού προστέθηκαν 50 μl 5% TCA σε 1 σωλήνα erpendorf και τα δείγματα ανακινήθηκαν.
2. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 15000 g, για 5 λεπτά, στους 5 °C.
3. Το υπερκείμενο διανεμήθηκε σε 1 σωλήνα erpendorf.
4. Το διαυγές υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε 1 καθαρό σωλήνα erpendorf και αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

Προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

Η μέθοδος βασίζεται στην οξείδωση της GSH με το 5,5'-διθειο-δισ (2-νιτροβενζοϊκό οξύ) (DTNB), όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 4. Η GSH αντιδρά με το DTNB για να παράγει GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ, ένα έγχρωμο προϊόν, το οποίο απορροφά στα 412 nm. Η GSH υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Reddy et al. (2004), όπως έχει αναφερθεί (Veskoukis et al., 2016).



Εικόνα 4. Αρχή μέτρησης της γλουταθειόνης Αντιδραστήρια

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 67 mM (pH 7,95)

MB (KH₂PO₄): 136 g / mol

MB (Na₂HPO₄): 178 g / mol

Για την παρασκευή 500 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, απαιτείται η παρασκευή 25 ml KH₂PO₄ (67 mM) και 475 ml Na₂HPO₄ (67 mM). Για το διάλυμα KH₂PO₄ ζυγίστηκαν 0,227 g και διαλύθηκαν σε 25 ml dH₂O (αρχικό pH ~ 4,57). Για το διάλυμα Na₂HPO₄ ζυγίστηκαν 5,64 g και διαλύθηκαν σε 475 ml dH₂O (αρχικό pH

~ 9,11). Ακολούθως, τα διαλύματα αναμείχθηκαν σε ένα γυάλινο ποτήρι ζέσεως. Εάν ήταν αναγκαίο, γινόταν διόρθωση του pH με NaOH ή HCl, 1 N, μέχρι pH 7,95.

DTNB (1 mM) σε 1% κιτρικό νάτριο σε dH₂O

DTNB [5,5'-διθειο-δισ (2-νιτροβενζοϊκό οξύ)], MB: 396,35 g / mol

Κιτρικό νάτριο (C₆H₅O₇ * 2H₂O, διένυδρο τρι-νάτριο), MB: 294,10

Αρχικά, παρασκευάστηκε το 1% κιτρικό νάτριο με διάλυση 1 g κιτρικού νατρίου σε 100 ml dH₂O. Στη συνέχεια, διαλύθηκαν 0,0396 g DTNB. Το DTNB διαλύθηκε σε κιτρικό νάτριο, το οποίο λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας, ανθεκτικός στις αλλαγές του pH.

Μέθοδος

Προστέθηκαν οι ακόλουθοι όγκοι σε σωλήνες erpendorf (1,5 ml)

	Τυφλό	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 67 mM, pH 7.95	660 µL	660 µL
DTNB 1 mM	330 µL	330 µL
PBS	20 µL	—
Ομογενοποίηση ιστού αραιωμένο σε PBS (1/2)	—	20 µL

1. Τα erpendorfs αναδεύτηκαν στο vortex και επώαστηκαν στο σκοτάδι για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση έπρεπε να γίνει στο σκοτάδι ώστε να προχωρήσει η αντίδραση μεταξύ του DTNB και της GSH.
2. Το περιεχόμενο των erpendorfs μεταφέρθηκε σε γυάλινη κυψελίδα και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 412 nm.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα συγκέντρωσης της GSH (mmol / L ή μmol / ml) = (Absδείγματος - ΔΑτυφλού / 13,6) x 4 x 2 x 2 x 50,5

Το 13,6 (L / mmol / cm) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB και το 50,5 είναι ο συντελεστής αραίωσης (DF), ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μl) με τον όγκο του δείγματος (20 μl) (1010/20 = 50,5). Επίσης, πολλαπλασιάζεται επί 4 για να ληφθεί υπόψη η αραίωση κατά την ομογενοποίηση, επί 2 για να ληφθεί υπόψη η αραίωση που έγινε με TCA 5% (50 μl / 50 μl) και επί 2 για να ληφθεί υπόψη η αραίωση του δείγματος (1/2).

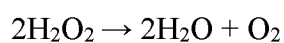
Η κανονικοποίηση για τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης έγινε με τον ακόλουθο τύπο:

Συγκέντρωση της GSH (μmol / mg συνολικής πρωτεΐνης) = μmol / ml / mg / ml
συνολικής πρωτεΐνης

Προσδιορισμός της δραστηριότητας της καταλάσης (CAT)

Βιοχημικό υπόβαθρο

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που περιέχει αίμη και σελήνιο ως συνένζυμο. Είναι ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα, που διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην εξουδετέρωση των ROS. Συγκεκριμένα, η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε H_2O και O_2 , εμποδίζοντας το μετασχηματισμό του στην πολύ επιβλαβή ρίζα υδροξυλίου (OH^\cdot) σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση.



Η καταλάση βρίσκεται σχεδόν σε κάθε είδους κύτταρο, αλλά η συγκέντρωσή της είναι υψηλότερη στα ερυθροκύτταρα και το ήπαρ. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της καταλάσης γίνεται στα υπεροξειδισώματα, στα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα. Η καταλάση προστατεύει άμεσα τα ερυθροκύτταρα με την εξουδετέρωση του H_2O_2 που προκύπτει από την αυτοοξειδωση της αιμοσφαιρίνης, αλλά επίσης προστατεύει έμμεσα κάθε ιστό, καθώς διασπά το H_2O_2 που είναι εύκολα διαπερατό από το πλάσμα στα ερυθροκύτταρα και τους ιστούς μέσω των κυτταρικών μεμβρανών.

Αρχή της μεθόδου

Το δείγμα του ιστού, δηλαδή το ένζυμο, προστίθεται στο H_2O_2 , το οποίο είναι το υπόστρωμα της αντίδρασης και η αποικοδόμησή του παρακολουθείται μέσω της μείωσης της απορρόφησης στα 240 nm. Η δραστηριότητα της καταλάσης υπολογίστηκε σύμφωνα με τον Aebi (1984), όπως έχει αναφερθεί (Veskoukis et al. 2016).

Αντιδραστήρια

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 67 mM (pH 7,4)

MB (KH_2PO_4): 136 g / mol

MB (Na_2HPO_4): 178 g / mol

Για την παρασκευή 500 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, απαιτείται η παρασκευή 100 ml KH_2PO_4 (67 mM) και 400 ml Na_2HPO_4 (67 mM). Για το διάλυμα KH_2PO_4 ζυγίστηκαν 0,91 g και διαλύθηκαν σε 100 ml dH_2O (αρχικό pH ~ 4,57). Για το διάλυμα Na_2HPO_4 ζυγίστηκαν 4,77 g και διαλύθηκαν σε 400 ml dH_2O (αρχικό pH ~ 9,11). Στη συνέχεια, τα διαλύματα αναμείχθηκαν σε ένα γυάλινο ποτήρι ζέσεως. Εφόσον ήταν αναγκαίο, γινόταν διόρθωση του pH με NaOH ή HCl, 1 N, μέχρι pH 7,4.

30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου ήταν έτοιμο για χρήση στο ψυγείο.

Μέθοδος

Προστέθηκαν οι ακόλουθοι όγκοι σε πλαστικούς σωλήνες

	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 67 mM, pH 7.4	2955 μL
Ομογενοποίηση ιστού αραιωμένο σε PBS (1/5 για την καρδιά και 1/40 για το νεφρό)	40 μL

1. Οι σωλήνες αναδεύτηκαν με vortex σε μέτρια ταχύτητα και επώαστηκαν σε κλίβανο για 10 λεπτά.
2. Το μείγμα μεταφέρθηκε στην κυβελίδα χαλαζία UV.
3. Προστέθηκαν 5 μl 30% υπεροξείδιο του υδρογόνου στην κυβελίδα χαλαζία UV και η κυβελίδα ανακινήθηκε με χρήση parafilm.
4. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 240 nm στα 5 δευτερόλεπτα και στα 125 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστηκότητα καταλάσης (U / mg ολικής πρωτεΐνης) = (ΔAbs δείγματος ανά λεπτό / 40) x (75 x 1000 x 4 x 20 ή 40 ή 5) / Συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης (mg / ml)
Το 40 ($\text{L} / \text{mol} / \text{cm}$) είναι ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης του H_2O_2 , που πολλαπλασιάζεται με το 1000 για να μετατραπεί από mol / L σε $\mu\text{mol} / \text{ml}$. Το 75 είναι ο συντελεστής αραιώσης, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (3000 μl) με τον όγκο του δείγματος (40 μl) (3000/40 = 75), το 4 είναι η αραιώση του δείγματος (1/4) κατά τη διαδικασία της ομογενοποίησης και το 40 ή 5 (ανάλογα τον ιστό) είναι η αραιώση του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο. $U = \mu\text{mol} / \text{λεπτό}$, $\Delta \text{Abs} (\text{min}) = \eta$ μεταβολή στην απορρόφηση σε ένα λεπτό.

Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Βιοχημικό υπόβαθρο

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εκκαθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες και τις δραστικές μορφές. Κάθε αντιοξειδωτικό συστατικό των ιστών έχει ατομική αντιοξειδωτική δράση και το καθένα συμβάλλει διαφορετικά στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ιστού.

Αρχή της μεθόδου

Ο υπολογισμός της TAC βασίζεται στη μέθοδο των Janaszewska and Bartosz (2002). Η TAC αξιολογείται χρησιμοποιώντας το 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•), το οποίο είναι μία εμπορικά διαθέσιμη ελεύθερη ρίζα. Έτσι λοιπόν, παρουσία ενός δότη υδρογόνου, δηλαδή ενός αντιοξειδωτικού μορίου, που υπάρχει στο δείγμα του ιστού, η ελεύθερη ρίζα DPPH• ανάγεται προς την αντίστοιχη υδραζίνη. Η αναγωγή της ρίζας αξιολογείται φασματοφωτομετρικά με τη μείωση της απορρόφησης στα 520 nm. Κανονικά, η τιμή της TAC του τυφλού πρέπει να είναι υψηλότερη από αυτή του δείγματος.

Αντιδραστήρια

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM (pH 7,4)

MB (KH₂PO₄): 136 g / mol

MB (Na₂HPO₄): 178 g / mol

Για την παρασκευή 500 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, απαιτείται η παρασκευή 100 ml KH₂PO₄ (10 mM) και 400 ml Na₂HPO₄ (10 mM). Για το διάλυμα KH₂PO₄ ζυγίστηκαν 0,136 g και διαλύθηκαν σε 100 ml dH₂O (αρχικό pH ~ 4,57). Για το διάλυμα Na₂HPO₄ ζυγίστηκαν 0,712 g και διαλύθηκαν σε 400 ml dH₂O (αρχικό pH ~ 9,11). Στη συνέχεια, τα διαλύματα αναμείχθηκαν σε ένα γυάλινο ποτήρι ζέσεως. Εφόσον ήταν αναγκαίο, γινόταν διόρθωση του pH με NaOH ή HCl, 1 N, μέχρι pH 7,4.

DPPH (2,2-διφαινυλ-1 πικρυλυδραζύλιο) 0,1 mM, MB: 394,32 g / mol

Αρχικά, διαλύθηκαν 0,02 g DPPH σε 5 ml μεθανόλης και αναμείχθηκαν στον αναδευτήρα (διάλυμα 10 mM). Στη συνέχεια, το διάλυμα αραιώθηκε 100 φορές με μεθανόλη και αναμείχθηκε στον αναδευτήρα για τελική συγκέντρωση 0,1 mM. Τυπικά, αραιώνονται 200 μl του διαλύματος 10 mM DPPH σε 19,8 ml μεθανόλης. Λόγω της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 ml είναι πάντα επαρκής για τους προσδιορισμούς. Τα γυάλινα σκεύη καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο, προκειμένου να αποφευχθεί η φωτόλυση. Το DPPH έπρεπε να παρασκευαστεί την ημέρα του πειράματος.

Μέθοδος

Προστέθηκαν οι ακόλουθοι όγκοι σε σωλήνες eppendorf (1,5 ml):

	Τυφλό	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7.4	500 μL	460 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL
Ομογενοποίηση ιστού αραιωμένο σε PBS 1/10	—	40 μL

1. Τα eppendorfs αναδεύτηκαν με vortex και επώαστηκαν στο σκοτάδι για 60 λεπτά.
2. Έγινε φυγοκέντρωση στα 15.000 g, για 3 λεπτά στους 25 ° C.
3. Το υπερκείμενο υγρό κάθε σωλήνα eppendorf μεταφέρθηκε σε καθαρή πλαστική κυψελίδα και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 520 nm.

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i) Η % μείωση απορρόφησης σε σχέση με το τυφλό, δηλαδή % Abs μείωση =
(Abstυφλού - Absδείγματος) / Abstυφλού x 100)

ii) Τα $\mu\text{mol DPPH}$ που ανήχθησαν / ml δείγματος = $[(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 25 \times 4 \times 10] / 1000$

A) Διαιρούμε με το 100, ώστε να μετατραπεί η μείωση της απορρόφησης σε ποσοστό απορρόφησης.

B) Πολλαπλασιάζουμε επί 50, επειδή η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol} / \text{L}$ κυψελίδας.

Γ) πολλαπλασιάζουμε επί 25, επειδή το δείγμα στην κυψελίδα είναι αραιωμένο 25 φορές (1000 μl στην κυψελίδα / 40 μl δείγματος ιστού στην κυψελίδα = 25)

Δ) Πολλαπλασιάζουμε επί 4, επειδή η αραιώση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του είναι 1/4.

E) Πολλαπλασιάζουμε επί 10 γιατί το δείγμα αραιώνεται 1/10 στη μέθοδο

ΣΤ) Διαιρούμε κατά 1000 για να μετατραπούν τα L του δείγματος σε ml του δείγματος. Η κανονικοποίηση για τη συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης έγινε με τον ακόλουθο τύπο:

$\text{mmol DPPH} (\text{mmol} / \text{mg} \text{ συνολικής πρωτεΐνης}) = \text{mmol DPPH nmol} / \text{ml} / \text{συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης mg} / \text{ml}.$

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

Βιοχημικό υπόβαθρο

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό πολύ δραστικών και ασταθών λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων. Η αποσύνθεση των ασταθών υπεροξειδίων, που προέρχονται από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, οδηγεί στο σχηματισμό της μηλονικής διαλδεύδης (MDA), η οποία μπορεί να ποσοτικοποιηθεί μέσω της ελεγχόμενης αντίδρασή της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Η μέτρηση αυτών των «ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ» (TBARS), είναι μια καλά θεμελιωμένη μέθοδος για τον έλεγχο και την παρακολούθηση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Τα TBARS εκφράζονται ως ισοδύναμα της μηλονικής διαλδεύδης, η οποία σχηματίζει ένα σύμπλοκο 1: 2 με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, το οποίο μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτομετρία. Τα TBARS επιστρέφουν στα κανονικά επίπεδα με την πάροδο του χρόνου, ανάλογα με την παρουσία των αντιοξειδωτικών. Η μέτρηση των TBARS έγινε σύμφωνα με τους Keles et al. (2001).

Πριν τη έναρξη του πειράματος, η θερμοκρασία του υδατόλουτρου ρυθμίζεται στους 95 °C.

Αντιδραστήρια

Tris-HCl 200 mM (pH 7,4)

MB (Tris): 121,14 g / mol

MB (HCl): 36,46 g / mol (απόθεμα 37%) [ίσο με 10,1 N]

Για την παρασκευή 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, απαιτείται η παρασκευή 25 ml Tris (200 mM) και 42 ml HCl (0,1 N). Για το διάλυμα Tris ζυγίστηκαν 0,61 g και διαλύθηκαν σε 25 ml dH₂O. Για το διάλυμα HCl αραιώθηκαν 0,42 ml από το απόθεμα 37% με dH₂O μέχρι τον όγκο των 42 ml. Έπειτα, σε ένα ποτήρι ζέσεως τα 42 ml διαλύματος HCl προστέθηκαν αργά στα 25 ml διαλύματος Tris και το διάλυμα που

προέκυψε ογκομετρήθηκε με dH_2O μέχρι τον όγκο των 100 ml. Εφόσον ήταν αναγκαίο, γινόταν διόρθωση του pH με NaOH ή HCl , 1 N, μέχρι pH 7,4.

Το Tris είναι μία συντομογραφία της κοινής ονομασίας (τριυδροξυμεθυλαμινομεθανίο) για την 2-αμινο-2-υδροξυμεθυλο-1,3-προπανοδιόλη. Χρησιμοποιείται ευρέως ως συστατικό ρυθμιστικών διαλυμάτων, όπως σε ρυθμιστικά διαλύματα TAE και TBE, με αποτελεσματική περιοχή pH 6,5-9,7.

Διάλυμα Na_2SO_4 (2M) - TBA (55 mM)

MB (TBA): 144,1 g / mol

MB (Na_2SO_4): 142,04 g / mol

Για την παρασκευή 10 ml διαλύματος ζυγίστηκαν 2,84 g Na_2SO_4 και 0,08 g TBA. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε ένα γυάλινο ποτήρι ζέσεως και προστέθηκαν 10 ml dH_2O . Το διάλυμα ανακατεύθηκε υπό θέρμανση μέχρι να διαλυθεί πλήρως. Το διάλυμα έπρεπε να γίνει φρέσκο την ημέρα του πειράματος.

TCA (τριχλωροοξικό οξύ, $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) 100%, MB: 163,39 g / mol

Το TCA είναι ένα αντιδραστήριο που απορροφά την υγρασία από τον αέρα. Συνεπώς, ολόκληρη η εμπορική σκόνη του αποθέματος (1 kg σε γυάλινο σκεύος) πρέπει να διαλύεται σε dH_2O . Για την παρασκευή ενός αποθέματος διαλύματος TCA 100%, προστέθηκε ένας μικρός όγκος dH_2O μέσα στο γυάλινο σκεύος του αντιδραστηρίου, αναμείχθηκε και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως, όπου αναμείχθηκε με μαγνήτη (το TCA αυξάνει τον όγκο του νερού). Το διάλυμα ογκομετρήθηκε μέχρι το 1 L με dH_2O . Τα TCA 35% και 70% παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις του αποθέματος διαλύματος 100% TCA.

- Το Tris-HCl είναι ένας ρυθμιστικός παράγοντας, που βοηθάει τις ενζυμικές αντιδράσεις να πραγματοποιηθούν.
- Το Na₂SO₄ χρησιμοποιείται ως παράγοντας ξήρανσης για τα οργανικά διαλύματα.
- Το TCA προστίθεται στο δείγμα προκειμένου να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του δείγματος.

Μέθοδος

1. Σε σωλήνες Falcon (15 ml) προστέθηκαν 50 μl ομογενοποιημένου ιστού αραιωμένου με PBS (1/2) για τα δείγματα ή 50 μl PBS για το τυφλό.
2. Προστέθηκαν 500 μl TCA 35% και 500 μl Tris-HCl και οι σωλήνες αναδεύτηκαν με vortex.
3. Οι σωλήνες επώαστηκαν για 10 λεπτά σε RT.
4. Προστέθηκε 1 ml Na₂SO₄ - TBA και οι σωλήνες επώαστηκαν στους 95°C για 45 λεπτά στο υδατόλουτρο.
5. Οι σωλήνες μεταφέρθηκαν στον πάγο και κρύωσαν για 5 λεπτά.
6. Προστέθηκε 1 ml TCA 70% και έγινε ανάδευση με vortex.
7. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε 1 ml σε σωλήνες erpendorf και φυγοκεντρήθηκε στα 11200 g, για 3 λεπτά, στους 25 °C.
8. Μεταφέρθηκαν 900 μl με πιπέτα σε καθαρή γυάλινη κυψελίδα και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 530 nm.

Η μέθοδος των TBARS είναι ένας γρήγορος και εύκολος τρόπος για να εκτιμηθεί η υπεροξειδωση των λιπιδίων ως τα επίπεδα της MDA που παράγονται. Το προϊόν είναι το σύμπλοκο MDA(TBA)₂, του οποίου η απορρόφηση μετρείται στα 530 nm.

Υπολογισμοί

$$\text{Συγκέντρωση των TBARS (}\mu\text{mol / L)} = 0,156 \times 62 \times 4 \times 2$$

Το 62 είναι ο συντελεστής αραίωσης, ο οποίος προκύπτει όταν διαιρείται ο τελικός όγκος (3100 μl) με τον όγκο του δείγματος (50 μl) ($3100/50 = 62$). Το 0,156 προκύπτει από τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA που είναι 156000 (mol / L) διαιρούμενο με 10^{-6} , προκειμένου να μετατραπεί από mol / L σε $\mu\text{mol / L}$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας είναι η απορρόφηση αυτής της ουσίας σε συγκέντρωση 1 mol / L. Ο πολλαπλασιασμός με το 4 γίνεται, ώστε να ληφθεί υπόψη η αραίωση (1/4) κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με το 2, για να ληφθεί υπόψη η αραίωση (1/2) του δείγματος.

Η κανονικοποίηση για τη συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης έγινε με τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{TBARS (nmol / mg συνολικής πρωτεΐνης)} = \text{συγκέντρωση TBARS nmol / ml} / \text{συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης mg / ml} .$$

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Βιοχημικό υπόβαθρο

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, δηλαδή οι αλδεΰδες και οι κετόνες, είναι δομές που δημιουργούνται μετά την οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών που επάγεται από τις ελεύθερες ρίζες και τις δραστικές μορφές γενικότερα. Συνήθως, οι οξειδωτικές τροποποιήσεις αφορούν είτε τις δομικές μεταβολές των καταλοίπων αμινοξέων είτε τη θραύση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και των πρωτεϊνών. Τα θειούχα αμινοξέα μεθειονίνη και κυστεΐνη και τα αμινοξέα με αρωματικές πλευρικές αλυσίδες όπως η ιστιδίνη είναι πιο επιρρεπή σε οξειδωτική βλάβη. Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών είναι μία μη αναστρέψιμη, μη ενζυμική διαδικασία και έχει αποδειχθεί ότι αν και οι μετρίως οξειδωμένες πρωτεΐνες μπορούν να αποικοδομηθούν από το πρωτεάσωμα, οι βαριά καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σχηματίζουν συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους, τα οποία όχι μόνο δεν μπορούν να αποικοδομηθούν, αλλά επίσης μπορούν να αναστείλουν τη λειτουργία του πρωτεασώματος. Αυτά τα συσσωματώματα είναι χημικά σταθερά και επομένως θεωρούνται ευρέως ως δείκτης σοβαρής οξειδωτικής βλάβης και ως βιοδείκτης οξειδωτικού στρες.

Αρχή της μεθόδου

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Patsoukis et al. (2004), όπως έχει αναφερθεί (Veskoukis et al., 2016). Η παρούσα μέθοδος για την ανίχνευση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων περιλαμβάνει την παραγωγοποίηση της ομάδας καρβονυλίου με 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH), η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ενός σταθερού προϊόντος υδραζόνης, του 2,4-δινιτροφαινυλίου (DNP), που απορροφά στα 375 nm.

Αντιδραστήρια

Διάλυμα HCl, MB 36,46 g / mol

Απόθεμα 37% (ίσο με 10,1 N)

Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος 2,5 N HCl, προστέθηκαν αργά 24,6 ml από το 37% HCl (ίσο με 10,1 N HCl) του αποθέματος σε 70 ml dH₂O και ογκομετρήθηκε μέχρι τα 100 ml με dH₂O. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται κατά την παρασκευή του διαλύματος 2,5 N HCl επειδή το απόθεμα 37% (10,1 N) HCl είναι πολύ διαβρωτικό. Πάντα προστίθεται το διάλυμα του οξέος στο νερό και όχι το αντίθετο και η διαδικασία επιτελείται στον απαγωγό με τη χρήση γαντιών.

DNPH (2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη, C₆H₆N₄O₄), MB: 198,1 g / mol

Για να παρασκευαστούν 100 ml 14 mM DNPH, διαλύθηκαν 0,2833 g DNPH σε 100 ml 2,5 N HCl. Το φωτοευαίσθητο DNPH έπρεπε να γίνει φρέσκο κατά την ημέρα των μετρήσεων.

Ουρία (CH₄N₂O), MB: 60,06 g / mol

Για να παρασκευαστούν 100 ml 5 M ουρίας, διαλύθηκαν 30 g ουρίας σε 70 ml dH₂O (επειδή η ουρία αυξάνει τον όγκο του νερού) και το διάλυμα θερμάνθηκε μετρίως μέχρι να είναι έτοιμο. Το διάλυμα ογκομετρήθηκε μέχρι τα 100 ml με dH₂O και το pH ρυθμίστηκε στο 2,3 με 2,5N HCl.

TCA (τριχλωροοξικό οξύ, C₂HCl₃O₂) 100%, MB: 163,39 g / mol

Το TCA είναι ένα αντιδραστήριο που απορροφά την υγρασία από τον αέρα. Έτσι, ολόκληρη η εμπορική σκόνη του αποθέματος (1 kg σε γυάλινο σκεύος) πρέπει να διαλύεται σε dH₂O. Για την παρασκευή ενός αποθέματος διαλύματος TCA 100%, προστέθηκε ένας μικρός όγκος dH₂O μέσα στο γυάλινο σκεύος του αντιδραστηρίου, αναμείχθηκε και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως, όπου αναμείχθηκε με μαγνήτη (το TCA αυξάνει τον όγκο του νερού). Το διάλυμα ογκομετρήθηκε μέχρι το 1 L με dH₂O. Τα TCA 10% και 20% παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις του αποθέματος διαλύματος 100% TCA.

Μέθοδος

1. Σε 50 μl ομογενοποιημάτος ιστού αραιωμένου με PBS (1/2), προστέθηκαν 50 μl 20% TCA σε σωλήνες erpendorf και το ίζημα που σχηματίστηκε διαλύθηκε χειροκίνητα. Στη συνέχεια, αναδεύτηκε με vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του). Το 20% TCA, ως αντιδραστήριο αφυδάτωσης κατακρήμνισε τις πρωτεΐνες του ιστού, οι οποίες σχημάτισαν ένα ίζημα στον πυθμένα των σωλήνων erpendorf μετά τη φυγοκέντρωση.
2. Τα erpendorfs επώαστηκαν στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν στα 15,000 g για 5 λεπτά στους 4 ° C.
3. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε.
4. Στο ίζημα προστέθηκαν 0,5 ml 14 mM DNPH (σε 2,5 N HCL) για το δείγμα ή 0,5 ml 2,5 N HCL για το τυφλό. Ακολούθως, το ίζημα διαλύθηκε χειροκίνητα χρησιμοποιώντας την άκρη της πιπέτας, αναδεύτηκε με vortex και τα erpendorfs επώαστηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση με vortex κάθε 15 λεπτά. Έπειτα, φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 ° C.
5. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε.
6. Προστέθηκε 1 ml 10% TCA, τα erpendorfs αναδεύτηκαν με vortex (εάν ήταν απαραίτητο, το ίζημα διαλυόταν χειροκίνητα με την άκρη της πιπέτας) και φυγοκεντρήθηκαν στα 15,000 g για 5 λεπτά στους 4 ° C.
7. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε.
8. Προστέθηκαν 0,5 ml αιθανόλης και 0,5 ml οξικού αιθυλεστέρα (αιθανόλη / οξικός αιθυλεστέρας, 1: 1 v / v), τα erpendorfs αναδεύτηκαν με vortex και φυγοκεντρήθηκαν στα 15,000 g για 5 λεπτά στους 4 ° C.
9. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε Τα ιζήματα πλύθηκαν με 10% TCA, που ακολουθήθηκε από τρεις πλύσεις με αιθανόλη-οξικό αιθυλεστέρα (1: 1, v / v), ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του DNPH που δεν αντέδρασε.
10. Τα βήματα 8 και 9 επαναλήφθηκαν δύο ακόμη φορές.
11. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε.
12. Προστέθηκε 1 ml 5 M ουρίας, τα erpendorfs αναδεύτηκαν με vortex και επώαστηκαν σε κλίβανο στους 37 ° C για 15 λεπτά. Η ουρία είναι ένα ισχυρό μετουσιωτικό πρωτεϊνών, το οποίο διασπά αποτελεσματικά τους μη ομοιοπολικούς δεσμούς στις πρωτεΐνες αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους.

13. Τα erpendorfs φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000 g για 3 λεπτά στους 4 ° C.

14. Τέλος, μεταφέρθηκαν 900 ml με πιπέτα σε καθαρή γυάλινη κυψελίδα και μετρήθηκε η απορρόφηση των τυφλών και των δειγμάτων στα 375 nm.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol / ml) = Αδείματος - Ατυφλού / 0,022 x 1000/50 x 4 x 2.

Ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM / cm. Το 0,022 υπολογίζεται ως εξής: 22 L / mmol / cm ισούται με 22 mL / μmol / cm, ισούται με 0,022 ml / nmol / cm. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μl στην κυψελίδα / 50 μl του δείγματος). Ο πολλαπλασιασμός με το 4 γίνεται ώστε να ληφθεί υπόψη η αραίωση (1/4) κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης των ιστών, ενώ ο πολλαπλασιασμός με το 2 γίνεται ώστε να ληφθεί υπόψη η αραίωση του δείγματος (1/2).

Η κανονικοποίηση για τη συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης έγινε με τον ακόλουθο τύπο:

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol / mg πρωτεΐνης) = συγκέντρωση καρβονυλίων nmol / ml / συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης mg / ml

Η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης προσδιορίζεται μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης (μέθοδος Bradford)

Αντιδραστήρια

Bradford

Για την παρασκευή 1 L αντιδραστηρίου Bradford, ζυγίστηκαν 100 mg της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue και προστέθηκαν σε ένα γυάλινο ποτήρι ζέσεως, που ήταν επενδυμένο με αλουμινόχαρτο, καθώς το διάλυμα ήταν φωτοευαίσθητο. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 50 ml 95% (v/v) αιθανόλης και 100 ml 85% (w/v) φωσφορικού οξέος και το διάλυμα αναδεύτηκε με μαγνήτη μέχρι να διαλυθεί πλήρως η σκόνη. Έπειτα, ογκομετρήθηκε μέχρι το 1 L με dH₂O και το διάλυμα αναδεύτηκε με μαγνήτη. Πριν από τη χρήση του διαλύματος απαιτήθηκε φιλτράρισμα.

Μέθοδος

Σε σωλήνες erpendorf (1,5 ml) προστέθηκαν οι ακόλουθοι όγκοι

	Τυφλό	Δείγμα
PBS	20 μL	-
Ομογενοποίηση ιστού αραιωμένου με PBS (1/30)	-	20 μL
Αντιδραστήριο Bradford	1 ml	1 ml

Σε σωλήνες erpendorf (1,5 ml) προστέθηκαν οι ακόλουθοι όγκοι

1. Τα erpendorfs αναδεύτηκαν με vortex.
2. Επώστηκαν στο σκοτάδι για 15 λεπτά.
3. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm με πλαστική κυψελίδα

Υπολογισμοί

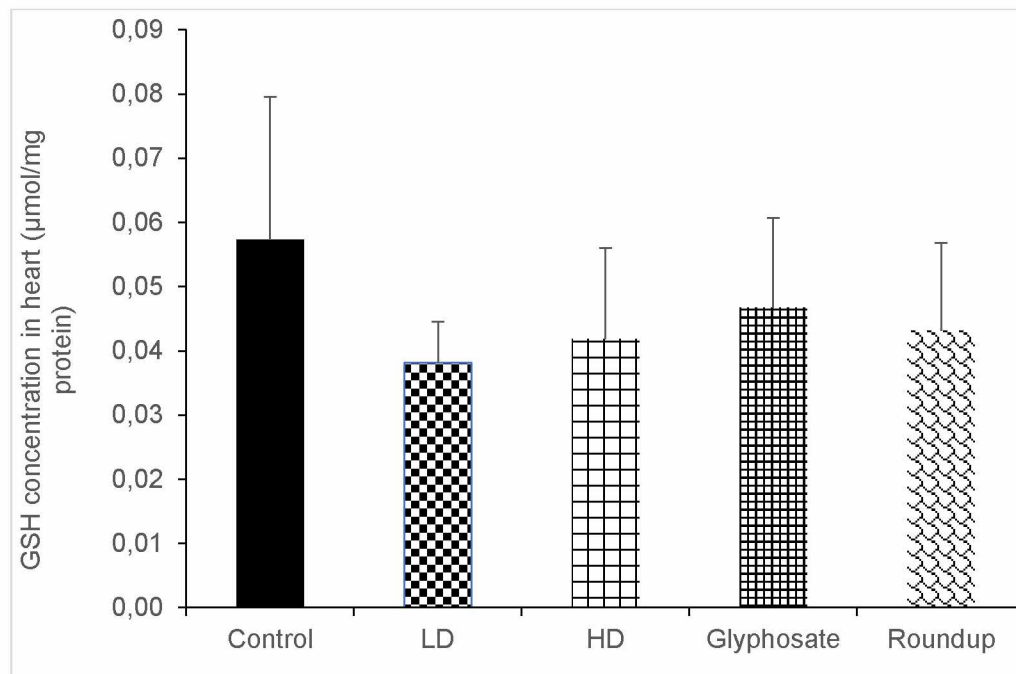
Ο προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης, με τη χρήση του αντιδραστηρίου Bradford. Ειδικότερα, η ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης υπολογίστηκε με βάση τους συντελεστές (α , β), που προέκυψαν από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης σε mg / ml, η οποία ήταν της μορφής $y = ax + b$.

Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα IBM SPSS Statistics. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο one-way ANOVA (Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα), ενώ για τις ζευγαρωτές συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκε το Tuckey τεστ. Επίσης, ορίστηκε ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0.05$ και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SD (Standard Deviation).

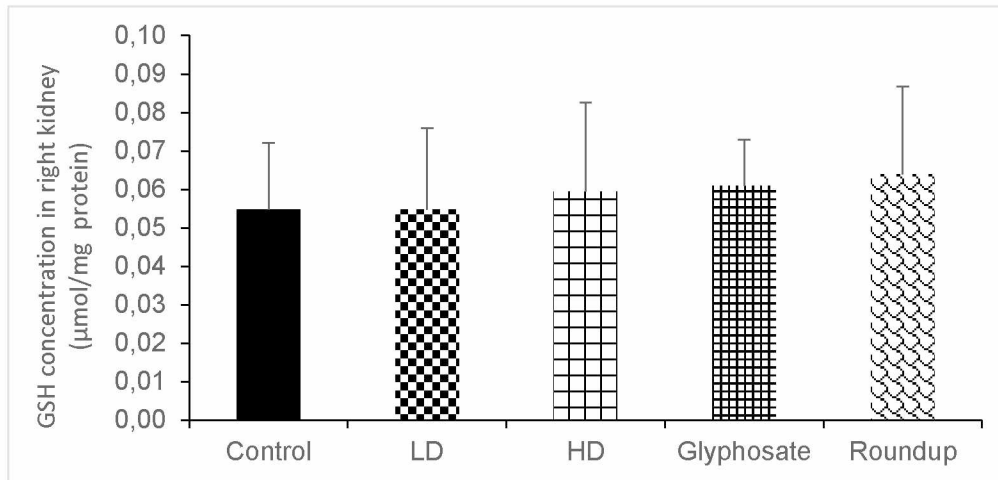
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε καρδιά και δεξιό νεφρό κουνελιών



Διάγραμμα 1. Επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών (Υψηλή και χαμηλή δόση), της γλυφοσάτης και του Roundup, στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης, στην καρδιά κουνελιών.

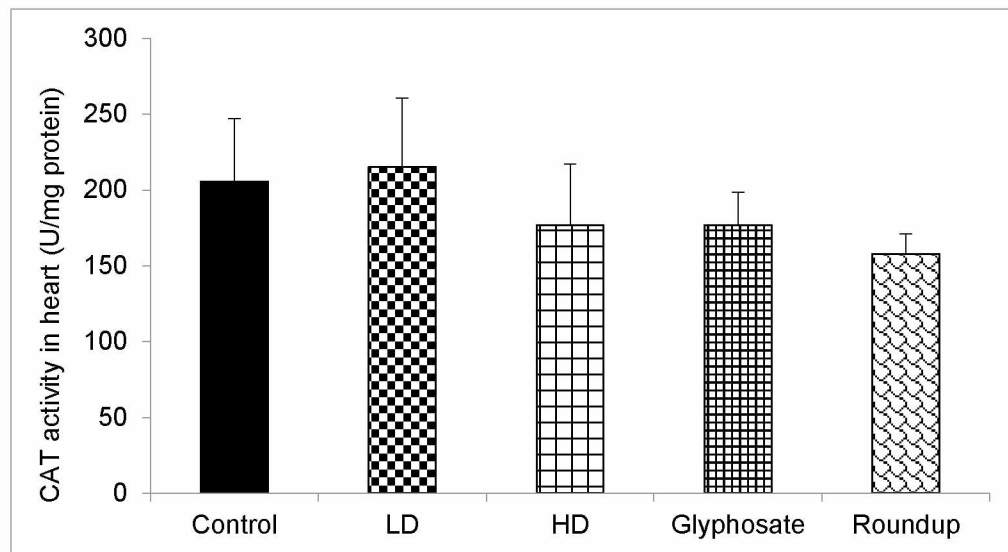
Κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στον ιστό της καρδιάς κουνελιών, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών, της γλυφοσάτης ή του Roundup.



Διάγραμμα 2. Επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών (Υψηλή και χαμηλή δόση), της γλυφοσάτης και του Roundup, στη δραστικότητα της ανηγμένης γλουταθειόνης, στον δεξιό νεφρό κουνελιών.

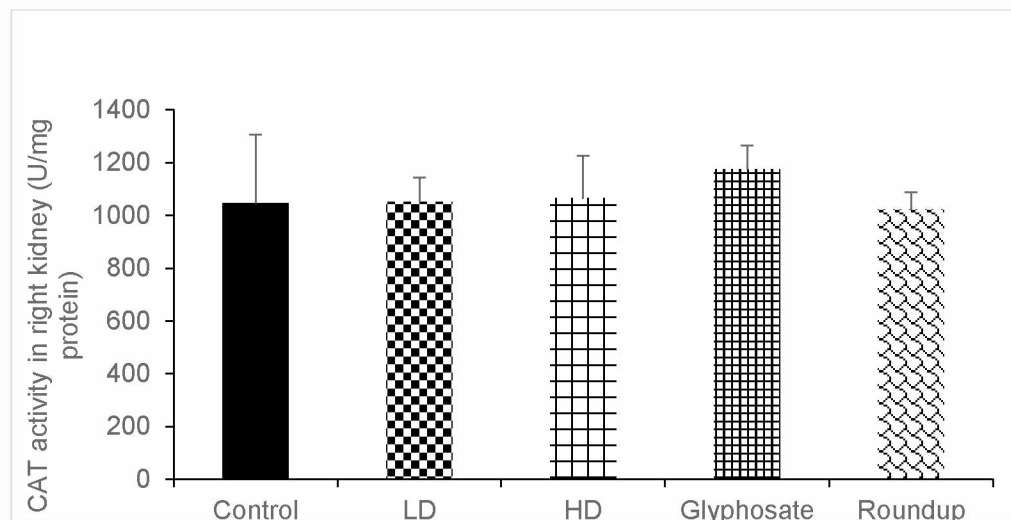
Κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στον δεξιό νεφρό κουνελιών, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών, της γλυφοσάτης ή του Roundup.

Δραστικότητα της καταλάσης (CAT) σε ιστούς κουνελιών



Διάγραμμα 3. Επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών (Υψηλή και χαμηλή δόση), της γλυφοσάτης και του Roundup, στη δραστικότητα της Καταλάσης, στην καρδιά κουνελιών.

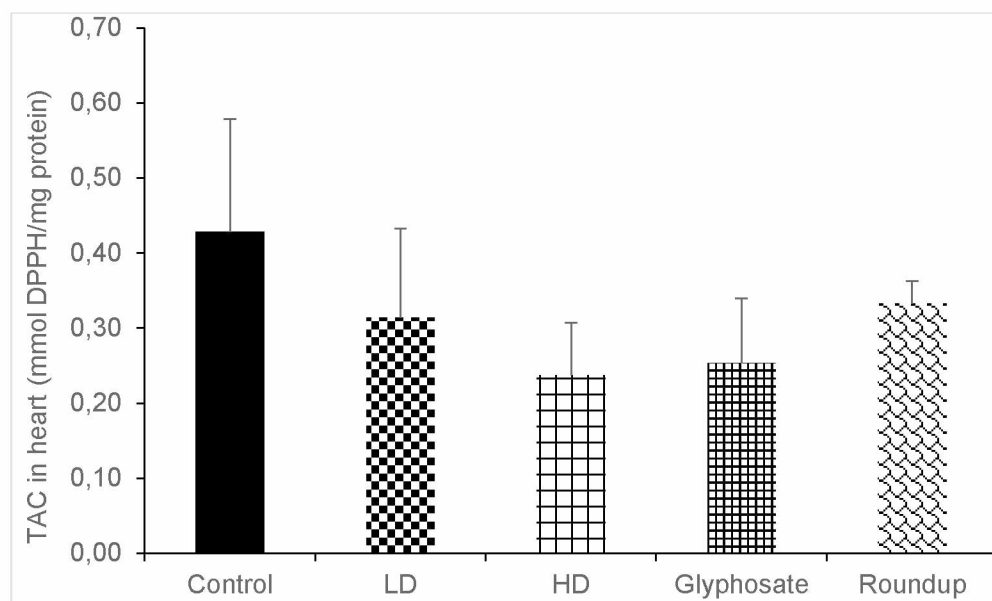
Κατά τον προσδιορισμό της δραστικότητας της Καταλάσης (CAT) στον ιστό της καρδιάς κουνελιών, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών, της γλυφοσάτης ή του Roundup.



Διάγραμμα 4. Επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών (Υψηλή και χαμηλή δόση), της γλυφοσάτης και του Roundup, στη δραστικότητα της Καταλάσης, στον δεξιό νεφρό κουνελιών.

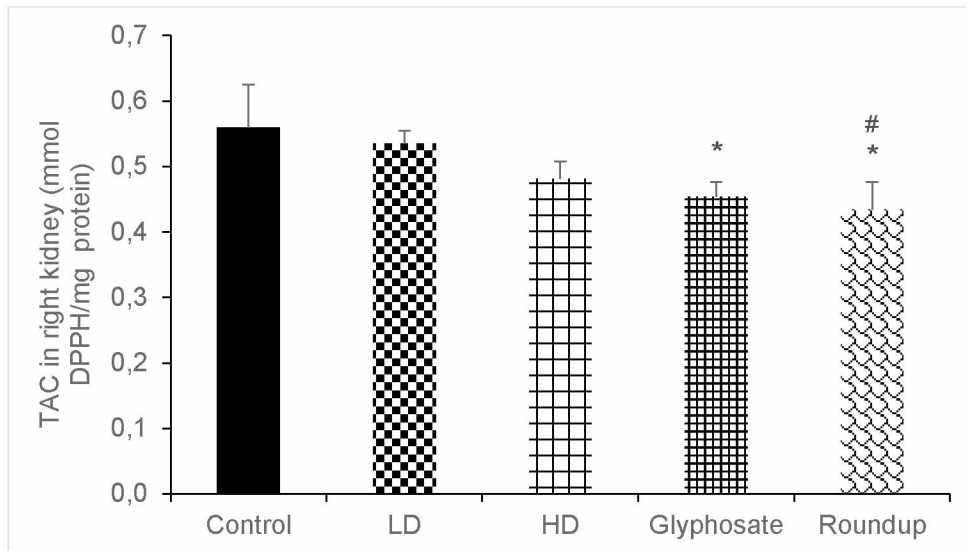
Κατά τον προσδιορισμό της δραστικότητας της Καταλάσης (CAT) στον δεξιό νεφρό κουνελιών, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών, της γλυφοσάτης ή του Roundup.

Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) σε ιστούς κουνελιών



Διάγραμμα 5. Επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών (Υψηλή και χαμηλή δόση), της γλυφοσάτης και του Roundup, στη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, στην καρδιά κουνελιών.

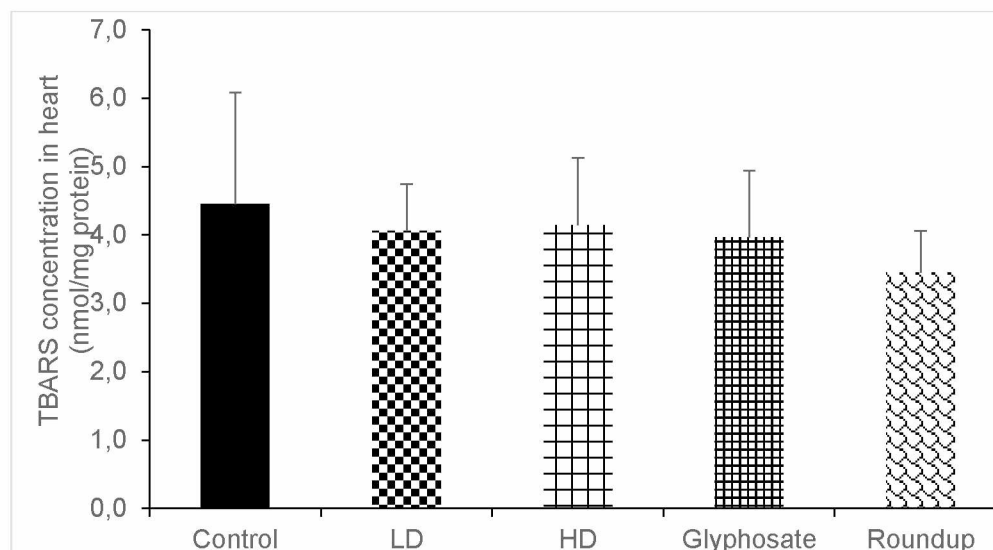
Κατά τον προσδιορισμό της Ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στον ιστό της καρδιάς κουνελιών, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών, της γλυφοσάτης ή του Roundup.



Διάγραμμα 6. Επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών (Υψηλή και χαμηλή δόση), της γλυφοσάτης και του Roundup, στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, στον δεξιό νεφρό κουνελιών. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($P < 0,05$). #: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε η χαμηλή δόση ($P < 0,05$).

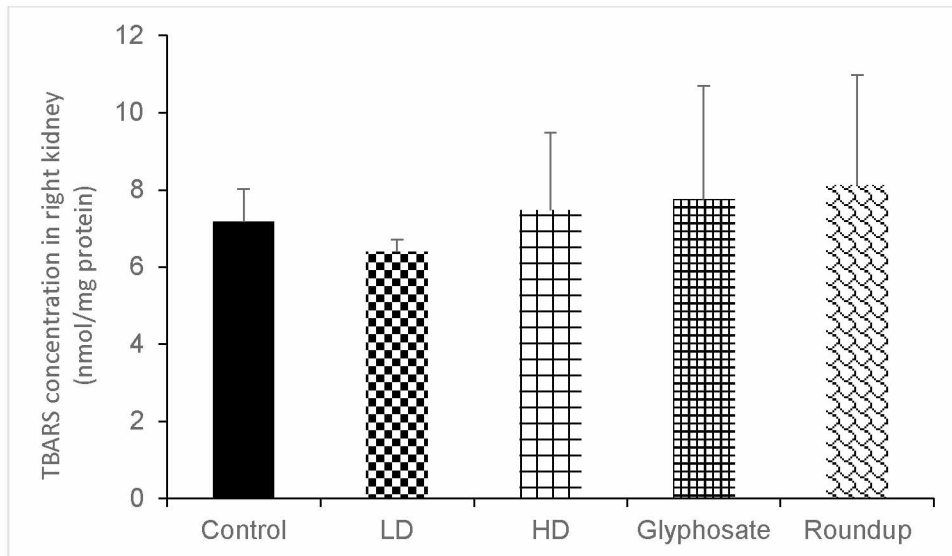
Κατά τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στο δεξιό νεφρό κουνελιών, βρέθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση της γλυφοσάτης οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ η χορήγηση του Roundup οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, αλλά και σε σχέση με την ομάδα του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών σε χαμηλή δόση.

Συγκέντρωση ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) σε ιστούς κουνελιών



Διάγραμμα 7. Επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών (Υψηλή και χαμηλή δόση), της γλυφοσάτης και του Roundup, στη συγκέντρωση των TBARS, στην καρδιά κουνελιών.

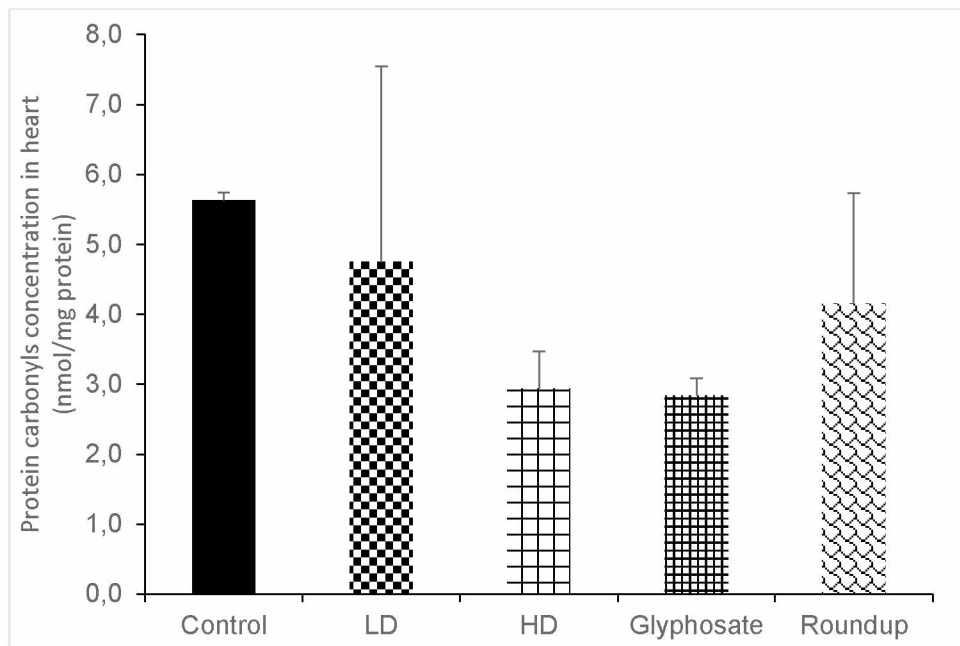
Κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στον ιστό της καρδιάς κουνελιών, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών, της γλυφοσάτης ή του Roundup.



Διάγραμμα 8. Επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών (Υψηλή και χαμηλή δόση), της γλυφοσάτης και του Roundup, στη συγκέντρωση των TBARS, στο δεξιό νεφρό κουνελιών.

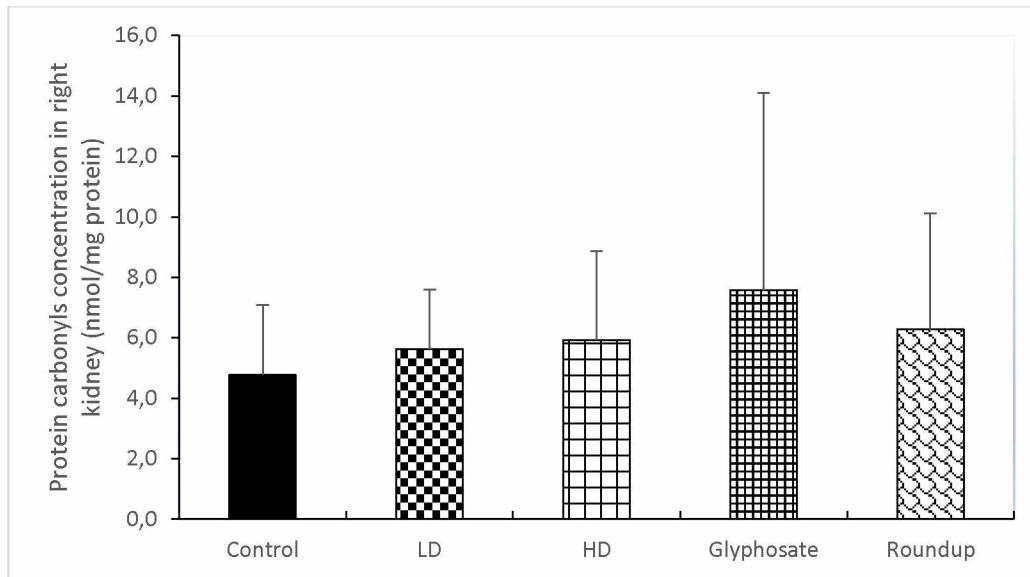
Κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στον δεξιό νεφρό κουνελιών, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών, της γλυφοσάτης ή του Roundup.

Συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε ιστούς κουνελιών



Διάγραμμα 9. Επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών (Υψηλή και χαμηλή δόση), της γλυφοσάτης και του Roundup, στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, στην καρδιά κουνελιών.

Κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον ιστό της καρδιάς κουνελιών, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών, της γλυφοσάτης ή του Roundup.



Διάγραμμα 10. Επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών (Υψηλή και χαμηλή δόση), της γλυφosatής και του Roundup, στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, στον δεξιό νεφρό κουνελιών.

Κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον δεξιό νεφρό κουνελιών, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση του μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών, της γλυφosatής ή του Roundup.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η ικανότητα ξενοβιοτικών ουσιών να επιφέρουν πιο επιβλαβής επιπτώσεις όταν αποτελούν συστατικά ενός χημικού μείγματος, ακόμη και όταν βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση. Με αυτό τον σκοπό, ερευνήθηκε η επίδραση ενός μείγματος ενδοκρινών διαταρακτών, της γλυφοσάτης και του Roundup σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Το χημικό μείγμα χορηγήθηκε σε 2 δόσεις, των 1 x ADI και 10 x ADI, η γλυφοσάτη σε δόση 10 x ADI και το Roundup σε δόση 10 x ADI για μια χρονική περίοδο της τάξεως των 12 μηνών σε κουνέλια και μελετήθηκε η επίδρασή τους στην καρδιά και στον δεξιό νεφρό.

Τα αποτελέσματα δίνουν μια σαφή εικόνα σχετικά με την επίδραση των ξενοβιοτικών που χορηγήθηκαν στην καρδιά και στον δεξιό νεφρό των κουνελιών. Η μοναδική στατιστικά σημαντική επιζήμια επίδραση ανιχνεύθηκε στον δεξιό νεφρό, όπου η δράση τόσο της γλυφοσάτης όσο και του Roundup επέφεραν την μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), δηλαδή της ικανότητας των συστατικών των ιστών να εκκαθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες και τις δραστικές μορφές. Επομένως, με την μείωση της TAC, επέρχεται και μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ζώων στον ιστό του νεφρού.

Όσον αφορά το μείγμα ξενοβιοτικών, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης που μετρήθηκαν. Επομένως, όσον αφορά την καρδιά και τον νεφρό, το μείγμα αυτό δεν επιφέρει οξειδωτικό στρες στις 2 διαφορετικές δόσεις που χορηγήθηκαν και για διάστημα 12 μηνών.

Φυσικά, σε σχέση με το προσδόκιμο ζωής των κουνελιών, που κυμαίνεται στα 10-12 έτη, οι 12 μήνες χορήγησης των χημικών ουσιών μπορεί να μην επαρκούν για την ολοκληρωμένη κατανόηση της μακροχρόνιας επίδρασης των ξενοβιοτικών που χορηγήσαμε. Επομένως, μία ενδεχόμενη έρευνα της επίδρασης του μείγματος μας στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μέσω χορήγησης του για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, πιο κοντά στο προσδόκιμο ζωής, ενδεχομένως, να μας οδηγούσε σε ένα διαφορετικό τελικό συμπέρασμα και μία διαφορετικού είδους επίδρασης του μείγματός μας.

Συμπερασματικά, η διεκπεραίωση της έρευνας αυτής, που είχε θέσει ως στόχο την μελέτη των επιδράσεων της χορήγησης ενός μείγματος ξενοβιοτικών καθημερινής χρήσης σε χαμηλές δόσεις επί 12 μήνες, είχε ως αποτέλεσμα την μη επαγωγή

οξειδωτικού στρες στους ιστούς της καρδιάς και του νεφρού κουνελιών. Το αντίθετο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε όταν χορηγήθηκαν το roundup και η γλυφοσάτη μεμονωμένα. Παρόλα αυτά, η ανάγκη για έρευνα σε πολλά και διάφορα μείγματα ξενοβιοτικών σε χαμηλές δόσεις είναι αναγκαία και η επιστημονική κοινότητα θα πρέπει πλέον να στρέψει την προσοχή της προς αυτήν την κατεύθυνση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aquilano, K., Baldelli, S., Ciriolo, M. R., 2014. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in Pharmacology*, 26(5), 196.

Asimakopoulos AG, Xue J, De Carvalho BP, Iyer A, Abualnaja KO, Yaghmoor SS, Kannan K. Urinary biomarkers of exposure to 57 xenobiotics and its association with oxidative stress in a population in Jeddah, Saudi Arabia. *Environ Res.* 2015.

Avery, S. V., 2011. Molecular targets of oxidative stress. *Biochemical Journal*, 434(2), 201-210.

Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S., 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-31.

Babu S, Uppu S, Claville MO, Uppu RM. Prooxidant actions of bisphenol A (BPA) phenoxyl radicals: implications to BPA-related oxidative stress and toxicity. *Toxicology mechanisms and methods.* 2013;23:273–280.

Bai, S. H., Ogbourne, S. M., 2016. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 18988-19001.

Bailey D.C., Todt C.E., Burchfield S.L., Pressley A.S., Denney R.D., Snapp I.B., Negga R., Traynor W.L., Fitsanakis W.L., 2018. chronic exposure to a glyphosate-containing pesticide leads to mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species production in *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2018 Jan;57:46-52.

Bentley R. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1990;25:307–383.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19.

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

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

Cooke, M. S., Olinski, R., Evans, M. D., 2006. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clinica Chimica Acta*, 365(1-2), 30-49.

Dann A.B., Hontela A., 2010. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology*, Volume 31, Issue 4, May 2011, Pages 285-311.

Darbre P.D., Alijarrah A., Miller W.R., Coldham N.G., Sauer M.J., Pope G.S., 2004. *Journal of Applied Toxicology*, 24, 5 (2004).

Davies, K. J. A., 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium*, 61, 1-31.

Domoradzki JY, Thornton CM, Pottenger LH, Hansen SC, Card TL, Markham DA, Waechter JM Jr., 2005. Age and dose dependency of the pharmacokinetics and metabolism of bisphenol A in neonatal sprague-dawley rats following oral administration. *Toxicol Sci.* 2004;77:230–242.

Duke S.O., 2017. The history and current status of glyphosate. *Pest Management Science*, Volume 74, Issue 5, May 2018 Pages 1027-1034.

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

Fabrice, C., 2019. Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019 May; 20(10): 2407.

Fang, Y.-Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.

Finaud, J., Lac, G., Filaire, E., 2006. Oxidative Stress. *Sports Medicine*, 36(4), 327-358.

Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., Hernández-Carlos, B., 2019. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *Antioxidants*.

Giles, G., Nasim, M., Ali, W., Jacob, C., 2017. The Reactive Sulfur Species Concept: 15 Years On. *Antioxidants*, 6(2), 38.

Gonos, E., S., Kapetanou, M., Sereikaite, J., Bartosz, G., Naparło, K., Grzesik, M., Sadowska-Bartosz, I., 2018. Origin and pathophysiology of protein carbonylation, nitration and chlorination in age-related brain diseases and aging. *Aging*, 10(5), 868-901.

Gutteridge, J. M. C., 1995. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1819-1828.

Gutteridge, J. M. C., Halliwell, B., 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 561-564.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th Edition, Chapter 1, Oxygen: boon yet bane-introducing oxygen toxicity and reactive species, Oxford University Press, New York.

Harvey P.W., 2003. Parabens, oestrogenicity, underarm cosmetics and breast cancer: a perspective on a hypothesis. *Journal of Applied Toxicology* 23, 285 (2003).

Jette Rank., 2005. Classification and Risk Assessment of Chemicals: The Case of DEHP in the Light of REACH. *The Journal of Transdisciplinary Environmental Studies* vol. 4, no. 3, 2005

Kabir, E. R., Rahman, M. S., Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1), 241-258.

Klaus, A. and Heribert, H., 2004. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. 55:373–99.

Kohen, R., Nyska, A., 2002. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650.

- Komal H. S. and Ramtej J. V., 2011. BUTYL p-HYDROXYBENZOIC ACID INDUCES OXIDATIVE STRESS IN MICE LIVER - AN IN VIVO STUDY. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, Vol. 68 No. 6 pp. 875-879, 2011.
- Konieczna A., Rutkowska A., Rachoń D., 2015. HEALTH RISK OF EXPOSURE TO BISPHENOL A (BPA). *Rocz Panstw Zakl Hig* 2015;66(1):5-11.
- Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., Georgakilas, A. G., 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1-2), 193-201.
- Kunwar, A., Priyadarsini, K. I., 2011. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical & Allied Sciences*, 1(2), 53-60.
- Latini G. 2005. Monitoring phthalate exposure in humans. *Clin Chim Acta* 361:20–29.
- Lin, D., Zhou, Q., Xie, X., Liu, Y., 2010. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, 81(10), 1328-1333.
- Lipok, J., Studnik, H., Gruyaert, S., 2010. The toxicity of Roundup® 360 SL formulation and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), 1681-1688.
- Martin J. M. P., Peropadre A., Herrero O., Freire P. F., Labrador V., Hazen M. J., 2010. Oxidative DNA damage contributes to the toxic activity of propylR in mammalian cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.702, Issue 1, 30 September 2010, Pages 86-91.
- McBride, J., Kraemer, W. J., 1999. Free Radicals, Exercise, and Antioxidants. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 13(2), 175-183.
- Mikołajewska, K., Stragierowicz, J., Gromadzińska, J., 2015. Bisphenol A – Application, sources of exposure and potential risks in infants, children and pregnant women. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 28(2), 209-241.
- Monneret, C., 2017. What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus Biologies*, 340(9-10), 403-405.

- Nakagawa Y., Moldeus P., 1998. Mechanism of p-Hydroxybenzoate Ester-induced Mitochondrial Dysfunction and Cytotoxicity in Isolated Rat Hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 55, 1907 (1998).
- Owagboriaye, F., Dedeke, G., Ademolu, K., Olujimi, O., Aladesida, A., Adeleke, M., 2019. Comparative studies on endogenic stress hormones, antioxidant, biochemical and hematological status of metabolic disturbance in albino rat exposed to roundup herbicide and its active ingredient glyphosate. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(14), 14502-14512.
- Piggott, A. M., Karuso, P., 2007. Fluorometric Assay for the Determination of Glutathione Reductase Activity. *Analytical Chemistry*, 79(22), 8769-8773.
- Rezg R, El-Fazaa S, Gharbi N, Mornagui B, 2014. Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environ Int.* 2014;64:83–90.
- Ribas, V., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J. C., 2014. Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 151.
- Sedha S., Kumar S., Shukla S., Role of Oxidative Stress in Male Reproductive Dysfunctions with Reference to Phthalate Compounds. *Urol J.* 2015 Nov 14;12(5):2304-16.
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D. P., 2017. Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 715-748.
- Sies, H., Jones, D. P., 2007. Oxidative stress. *Encyclopedia of Stress*, 3, 45-48.
- Sivaraman L., Pouliot L., Wang B., Brodie T., Graziano M., McNerney M. E., 2018. Safety assessment of propylparaben in juvenile rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 018 Feb;92:370-381.
- Soni M.G., Taylor S.L., Greenberg N.A., Burdock G.A., 2002. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 40, Issue 10, p.1335-1373, October 2002.
- Stadtman, E., R., Levine, R., L., 2006. Protein Oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 191-208.

Szarek J., Siwicki A., Andrzejewska A., Terech-Majewska E., Banaszkiwicz T. (2000). Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Mar. Environ. Res.* 50, 263–266.

Townsend, D. M., Tew, K. D., Tapiero, H., 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(3-4), 145-155.

Tsatsakis, A., Docea, A. O., Tsitsimpikou, C., 2016. New challenges in risk assessment of chemicals when simulating real exposure scenarios; simultaneous multi-chemicals' low dose exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 96, 174-176.

Tsatsakis, A., Kouretas, D., Tzatzarakis, M., Stivaktakis, P., Tsarouhas, K., Golokhvast, K., Rakitskii, V. N., Tutelyan, V. A., Hernandez, A. F., Rezaee, R., Chung, G., Fenga, C., Engin, A. B., Neagu, M., Arsene, A. L., Docea, A. O., Gofita, E., Calina, D., Taitzoglou, I., Liesivuori, J., Hayes, A. W., Gutnikov, S., Tsitsimpikou, C., 2017. Simulating real-life exposures to uncover possible risks to human health: A proposed consensus for a novel methodological approach. *Human & Experimental Toxicology*, 36(6), 554-564.

Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV, 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol.* 2007;24:139–177.

Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A. M., Kouretas, D., 2012. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress and Chaperones*, 17(1), 11-21.

Veskoukis, A. S., Kerasioti, E., Priftis, A., Kouka, P., Spanidis, Y., Makri, S., Kouretas, D., 2019. A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: the biomarker issue. *Current Opinion in Toxicology*, 13, 99-109.

Wang, C. F., Tian, Y., 2015. Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms. *Environmental Pollution*, 206, 195-201.

Weatherly L.M., Gosse J.A., 2018. Triclosan Exposure, Transformation, and Human Health Effects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2017; 20(8): 447–469.

Wu, Y., Li, K., Zuo, H., Yuan, Y., Sun, Y., Yang, X., 2014. Primary neuronal-astrocytic coculture platform for neurotoxicity assessment of di-(2-ethylhexyl) phthalate. *J. Environ. Sci. (China)* 26 (5), 1145–1153.

Yang, C., Lim, W., Bazer, F. W., Song, G., 2018. Butyl paraben promotes apoptosis in human trophoblast cells through increased oxidative stress-induced endoplasmic reticulum stress. *Environmental Toxicology*, 33(4), 436-445.