

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ
ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΞΗ
ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΥΣΙΑ
ΜΕΤΑΒΑΛΛΟΜΕΝΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΡΙΓΑΝΕΛΑΙΟ ΑΠΟ
*ORIGANUM VULGARE***

Γεωργία Μπομπόλα

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: **Χαριτίνη Νέπκα**, Ιατρός-Κυτταροπαθολόγος

ΛΑΡΙΣΑ , 2022

UNIVERSITY OF THESSALY



SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

MASTER DEGREE PROGRAMME

SPECIALIZATION: TOXICOLOGY

MASTER'S THESIS

**COLLECTION AND ASSESSMENT OF DATA OF
TOXICOLOGICAL INTEREST REGARDING THE
HAZARD CLASS OF CARCINOGENICITY OF THE
SUBSTANCE OF VARIABLE COMPOSITION, OREGANO
OIL FROM *ORIGANUM VULGARE***

Georgia Bompola

SUPERVISING PROFESSOR: Charitini Nepka, MD -Cytopathologist

LARISSA, 2022

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

- 1) **Χαριτίνη Νέπκα**, Ιατρός-Κυτταροπαθολόγος, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
- 2) **Χριστίνα Τσιτσιμπίκου**, Γενικό Χημείο Κράτους , Εθνικό γραφείο στήριξης REACH & CLP
- 3) **Δημήτριος Κουρέτας**, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ριγανέλαιο είναι μία ουσία μεταβαλλόμενης σύνθεσης που, φαίνεται να έχει μία πληθώρα ευεργετικών για τον άνθρωπο βιολογικών δράσεων, γι' αυτό και το ενδιαφέρον για εμπορική αξιοποίησή του τα τελευταία χρόνια είναι ιδιαίτερο αυξημένο. Οι βιολογικές ιδιότητες αποδίδονται κυρίως στα τέσσερα συστατικά που επικρατούν στη σύνθεσή του: καρβακρόλη, θυμόλη, γ-τερπινένιο και p-κυμένιο. Ο χαρακτηρισμός του ριγανέλαιου ως υψηλής ποιότητας προέρχεται από το υψηλό ποσοστό καρβακρόλης στη σύνθεση. Ως εκ τούτου, το *Origanum vulgare* που ευδοκίμει κατά κόρον στην Ελλάδα και αποδίδει ριγανέλαιο με σταθερά πολύ υψηλά επίπεδα ποσοστού καρβακρόλης στο περιεχόμενό του θα μπορούσε να αξιοποιηθεί εμπορικά σε μεγάλο βαθμό.

Η τοξικολογική εκτίμηση για την τάξη κινδύνου της Καρκινογονικότητας, η οποία δεν έχει συντελεστεί προηγουμένως, κρίνεται μεγάλης σπουδαιότητας καθώς η ποσότητα του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare* που παράγεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση αυξάνεται. Ελλείπει δημοσιευμένων μελετών καρκινογονικότητας σε ζώα τόσο για την ίδια τη σύνθετη ουσία όσο και για τα βασικά συστατικά της, η αξιοπιστία των οποίων θα αξιολογούνταν με τη χρήση του εργαλείου εκτίμησης αξιοπιστίας τοξικολογικών μελετών, ToxRTool, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας η εκτίμηση βασίστηκε στην εκμετάλλευση όλων των διαθέσιμων υπάρχοντων πληροφοριών, ενδεικτικών του τοξικολογικού προφίλ της ουσίας και των βασικών συστατικών της για το τελικό σημείο της Καρκινογονικότητας. Η πορεία της διερεύνησης πληροφοριών σχετικών με πιθανή καρκινογονικότητα που σχεδιάστηκε αποτυπώθηκε σε διάγραμμα ροής και η εκτίμηση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας την προσέγγιση Βάρους των Αποδείξεων. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν αναζήτηση για τοξικολογικά δεδομένα καρκινογονικότητας από τον άνθρωπο ή/και από ζώα για το ριγανέλαιο από *Origanum vulgare* και τα τέσσερα επικρατή συστατικά στη βάση δεδομένων ουσιών του ECHA και τη βάση δεδομένων Pubmed, μελέτη QSAR για αναζήτηση δομικών χαρακτηριστικών που προειδοποιούν για κίνδυνο καρκινογονικότητας, ανάλυση read-across με άλλες ουσίες μεταβαλλόμενης σύνθεσης (ριγανέλαιο από *Thymus capitatus* και από άλλα είδη *Origanum*) με παρόμοια χαρακτηριστικά της σύνθεσής τους, αξιοποίηση στοιχείων της επιστημονικής βιβλιογραφίας για τη βιολογική δραστηριότητα, διερεύνηση για μεταλλαξιγόνο δράση και διερεύνηση της υπόθεσης γαστρίνης.

Τα περιορισμένα στοιχεία που παραπέμπουν σε καρκινογόνο δυναμικό αντιμετωπίζονται ως χαμηλής βαρύτητας, συνεπώς δεν προτείνεται ταξινόμηση για την

τάξη κινδύνου Καρκινογονικότητας, αλλά ούτε και περαιτέρω διερεύνηση με διεξαγωγή δοκιμασίας καρκινογονικότητας σε πειραματόζωα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κυρία Χαριτίνη Νέγκα για την ανάθεση του θέματος και την ευκαιρία να ασχοληθώ με το πεδίο της Εκτίμησης Κινδύνου Χημικών Ουσιών, για την άριστη συνεργασία και την καθοδήγησή της, αλλά και για την ενθάρρυνση που μου έδωσε σε όλα τα στάδια εκπόνησης της εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα την κυρία Χριστίνα Τσιτσιμπίκου, μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής της παρούσας εργασίας, για το χρόνο που αφιέρωσε στην εκπαίδευσή μου στις τεχνικές Εκτίμησης Κινδύνου, για τις πολύτιμες συμβουλές της και τις εποικοδομητικές συζητήσεις μας κατά τις προκλήσεις που προέκυψαν στη διαδικασία της συγγραφής, όπως και για τις υποδείξεις της στην παρουσίαση του περιεχομένου και των αποτελεσμάτων. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη σταθερή στήριξή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. Νομοθεσία REACH.....	10
A.2. Αξιολόγηση κινδύνου από τις χημικές ουσίες.....	14
A.2.1. Αξιολόγηση καρκινογονικότητας.....	14
A.2.1.1. Δοκιμασία καρκινογονικότητας σε πειραματόζωα.....	19
A.2.1.2. Εναλλακτικές μη πειραματικές μέθοδοι αξιολόγησης της καρκινογονικότητας.....	20
A.2.2. Αξιολόγηση καρκινογονικότητας UVCB ουσιών.....	22
A.3. Ριγανέλαιο.....	24
A.4. Ριγανέλαιο από το <i>Origanum vulgare</i>	26
A.4.1. Βιολογική δράση	27
A.4.2. Σύσταση και εμπορική αξιοποίηση	28
A.5. Σκοπός της εργασίας.....	

B. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΟ ΡΙΓΑΝΕΛΛΑΙΟ ΑΠΟ *ORIGANUM VULGARE*

B.1. Υλικά και μέθοδοι	31
B.1.1. Αναζήτηση δεδομένων καρκινογονικότητας στη βάση δεδομένων ουσιών του ECHA	33
B.1.2. Αναζήτηση δεδομένων καρκινογονικότητας στη βάση δεδομένων Pubmed	33
B.1.3. Ανάλυση QSAR	34
B.1.4. Εφαρμογή read-across μεθόδου	34
B.1.4.1. Αναζήτηση δεδομένων καρκινογονικότητας σε βάσεις δεδομένων για το ριγανέλαιο από το <i>Thymus capitatus</i>	35
B.1.4.2. Αναζήτηση δεδομένων καρκινογονικότητας σε βάσεις δεδομένων για ριγανέλαιο από είδη <i>Origanum</i> πέραν του είδους <i>Origanum vulgare</i>	36
B.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	37
B.2.1. Δεδομένα καρκινογονικότητας στη βάση δεδομένων χημικών ουσιών του ECHA.....	37
B.2.2. Δεδομένα καρκινογονικότητας από τον άνθρωπο.....	39

B.2.3. Δεδομένα καρκινογονικότητας από δοκιμασίες καρκινογονικότητας σε ζώα.....	39
B.2.4. Μελέτη QSAR.....	41
B.2.5. Εφαρμογή μεθόδου read-across.....	46
<i>B.2.5.1. Read-across με βάση το ριγανέλαιο από το <i>Thymus capitatus</i></i>	46
<i>B.2.5.2. Read-across με βάση το ριγανέλαιο από είδη <i>Origanum</i> πέραν του <i>Origanum vulgare</i></i>	48
B.2.6. Μεταλλαξιγόνος δράση	51
B.2.7. Αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση	51
B.2.8. Ερεθιστική δράση – Υπόθεση γαστρίνης	54
B.3. Συμπεράσματα.....	55
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	60

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. Νομοθεσία REACH

Μόλις τις τελευταίες δεκαετίες, χάρη στο περιβαλλοντικό κίνημα, αναδείχθηκε η προστασία του περιβάλλοντος ως προτεραιότητα ώστε να καταστρωθούν και να εφαρμοστούν σχετικές πολιτικές που την προασπίζουν. Το καθοριστικό βήμα προς αυτή την κατεύθυνση συντελέστηκε όταν η συστηματοποιημένη επιστημονική γνώση κατόρθωσε να καταστήσει κατανοητό πως η προστασία του περιβάλλοντος συνδέεται άρρηκτα με την υγεία και την ευημερία των ανθρώπων, τόσο στο παρόν όσο και των μελλοντικών γενιών.¹ Έτσι λοιπόν, στο γενικότερο ερώτημα σχετικά με το πώς μπορούν να διασφαλιστούν ταυτόχρονα το περιβάλλον και η ανθρώπινη υγεία, η απόκριση του διακρατικού Οργανισμού Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (ΟΟΣΑ) υπήρξε, μεταξύ άλλων, η εστίαση του ενδιαφέροντος στην ασφαλή χρήση των χημικών παρέχοντας κατευθυντήριες οδηγίες για τον τρόπο με τον οποίο πρέπει να πραγματοποιείται η αξιολόγηση χημικής ασφάλειας. Ακολούθως, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή, αξιοποιώντας τις βάσεις που έθεσε ο ΟΟΣΑ, θέσπισε τη νομοθεσία *REACH* (Κανονισμός 1907/2006/EK) που τέθηκε σε ισχύ και ξεκίνησε να επιβάλλεται η τήρησή της από τα Κράτη-Μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης από την 1^η Ιουνίου του 2007, ενώ στις 20 Ιανουαρίου του 2009 ως απόρροια του REACH τέθηκε σε εφαρμογή από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή ο Κανονισμός *CLP* (Κανονισμός 1272/2008/EK) που αποσκοπεί στην εφαρμογή εναρμονισμένου συστήματος ταξινόμησης και επισήμανσης των επικίνδυνων χημικών ουσιών.

Η ονομασία REACH της νομοθεσίας 1907/2006/EK προέκυψε ως ακρωνύμιο που αντιστοιχεί τις διαδικασίες τις οποίες αυτή καλύπτει, δηλαδή: **R**egistration (Καταχώριση), **E**valuation (Αξιολόγηση), **A**uthorisation (Αδειοδότηση) και **R**estriction (Περιορισμοί) of **C**hemicals (Χημικών Προϊόντων). Καθεμία από αυτές τις διαδικασίες αποτελεί και έναν πυλώνα-υποχρέωση που πρέπει να τηρείται για τις χημικές ουσίες ανάλογα με την ποσότητα στην οποία παράγονται ή εισάγονται αλλά και το χαρακτηρισμό της ή όχι ως «ουσίες με ιδιότητες που προκαλούν πολύ μεγάλη ανησυχία» (κατάλογος ουσιών Παραρτήματος XIV του REACH) ή την κατάταξή τους σε λίστα ουσιών στο Παράρτημα XVIII του Κανονισμού και παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.²

ΠΥΛΩΝΕΣ -ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ REACH	
ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗ	Ουσίες που παράγονται/εισάγονται στην ΕΕ σε ποσότητα >1 tn / έτος
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ -συμμόρφωση με τυπικές απαιτήσεις πληροφοριών -εξέταση προτάσεων δοκιμής	Μέχρι το 2023: ουσίες που παράγονται/εισάγονται στην ΕΕ σε ποσότητα >100 tn / έτος Μέχρι το 2027: ουσίες που παράγονται/εισάγονται στην ΕΕ σε ποσότητα 1-100 tn / έτος
ΑΔΕΙΟΔΟΤΗΣΗ	Ουσίες με ιδιότητες που προκαλούν πολύ μεγάλη ανησυχία: <ul style="list-style-type: none"> • Ουσίες καρκινογόνες, μεταλλαξιγόνες ή τοξικές για την αναπαραγωγή (CMR) κατηγορίας 1^A ή 1B • Ουσίες ανθεκτικές, βιοσυσσωρεύσιμες και τοξικές ή άκρως ανθεκτικές και άκρως βιοσυσσωρεύσιμες (Παράρτημα XIII) • Ενδοκρινείς διαταράκτες
ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ	Ουσίες στο Παράρτημα XVII

Πίνακας Α1: Συνοψιση υποχρεώσεων REACH για τις χημικές ουσίες

Η νομοθεσία αυτή δημιουργήθηκε με στόχο να κατοχυρώσει στο χώρο της Ευρωπαϊκής Ένωσης την εισαγωγή, παραγωγή και χρήση χημικών προϊόντων ασφαλών για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή διευκρινίζει ότι με τη θέσπιση της συγκεκριμένης νομοθεσίας εναποτέθηκε στη βιομηχανία η ευθύνη της συλλογής και παραγωγής δεδομένων για την ασφάλεια των χημικών ουσιών, καθώς και η διαχείριση των κινδύνων που ενέχουν, προκειμένου να κυκλοφορήσει μία ουσία στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Με αυτόν τον τρόπο εκπληρώνεται ακόμα ένας στόχος που έχει διακηρύξει η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την εφαρμογή του Κανονισμού REACH, που είναι η αύξηση της ανταγωνιστικότητας στη βιομηχανία.²

Συγκεκριμένα, ορίστηκε ότι στη νομοθεσία αυτή υπόκεινται οι χημικές ουσίες που παράγονται ή εισάγονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση σε ποσότητα μεγαλύτερη από έναν τόνο ανά έτος.^{2,3} Ο κάθε παραγωγός ή εισαγωγέας θα πρέπει πρώτα να έχει υποβάλει φάκελο με τις πληροφορίες σχετικά με την ασφάλεια της χημικής ουσίας (ή του

μείγματος) και προτάσεις για τη διαχείριση των κινδύνων, ο οποίος αξιολογείται από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Χημικών (European Chemicals Agency – ECHA), που έχει έδρα το Ελσίνκι, και τα Κράτη-Μέλη και αφού λάβει έγκριση και η ουσία καταχωρηθεί στην κεντρική βάση δεδομένων του ECHA είναι δυνατή η κυκλοφορία στην αγορά της Ευρωπαϊκής Ένωσης.² Η διαδικασία αυτή συνοψίζεται στο σύνθημα «No data, no market».

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή ξεκάθαρα σημειώνει ότι ο Κανονισμός REACH είναι εναρμονισμένος με την **αρχή των 3R**, δηλαδή την *αντικατάσταση* (replacement), τη *μείωση* (reduction) ή τη *βελτίωση* (refinement) της χρήσης ζώων σε δοκιμές και προωθεί, όπου είναι δυνατόν, τη χρήση δεδομένων που προέρχονται από «εναλλακτικές μεθόδους» ελέγχου ασφάλειας των χημικών ουσιών, οι οποίες περιλαμβάνουν μειωμένο αριθμό πειραματόζωων ή και ακόμα δε χρησιμοποιούν καθόλου ζώα, *in vitro* και *in silico* μεθόδους, αλλά και read-across, έναντι των συμβατικών *in vivo* μεθόδων ελέγχου.⁴ Μάλιστα, ο REACH προδιαγράφει (Άρθρα 25(1), 13(1), Παράρτημα XI) ότι για την περιγραφή αξιόπιστου προφίλ ασφάλειας μιας χημικής ουσίας θα πρέπει να πρώτα να εξαντληθούν όλα τα υπάρχοντα δεδομένα τοξικότητας, πριν προχωρήσει κανείς στη διενέργεια δοκιμής τοξικότητας που χρησιμοποιεί ζώα.³ Πραγματικά, σύμφωνα με την αντίστοιχη αναφορά του ECHA, ακόμα και κατά την πρώτη φάση εφαρμογής του REACH (προθεσμία μέχρι τις 30 Νοεμβρίου του 2008), οι παρασκευαστές και οι εισαγωγές, προκειμένου να προ-καταχωρήσουν χημικές ουσίες που ήδη κυκλοφορούσαν στην αγορά της Ευρωπαϊκής Ένωσης, στήριζαν τους ισχυρισμούς για το προφίλ ασφάλειας κυρίως σε υπάρχοντα δεδομένα, ενώ οι επόμενες περισσότερο χρησιμοποιούμενες μέθοδοι υπήρξαν η συγκριτική προσέγγιση read-across, στο πλαίσιο της οποίας έγινε χρήση των πληροφοριών από μελέτες συσχέτισης δομής-δράσης QSAR παρόλο που τα δεδομένα από αυτές δεν υποβλήθηκαν ανεξάρτητα, η αιτιολογημένη παράλειψη υποβολής δεδομένων και η προσέγγιση Βάρους των Αποδείξεων (Weight-of-Evidence), με αποτέλεσμα να μην επιβεβαιωθούν οι προβλέψεις για ραγδαία αύξηση των *in vivo* δοκιμασιών εξαιτίας των απαιτήσεων του REACH.^{5,6} Στο πλαίσιο αυτό, το Ευρωπαϊκό Κέντρο Επικύρωσης Εναλλακτικών Μεθόδων (European Centre for the Validation of Alternative Methods – ECVAM) έχει τον κεντρικό ρόλο στην αξιολόγηση της επιστημονικής εγκυρότητας των εναλλακτικών μεθόδων, ώστε να επεκταθεί η χρήση τους για κανονιστικούς σκοπούς.^{7,8}

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι πληροφορίες που συλλέγονται και παράγονται ώστε να συμμορφώνεται μία χημική ουσία ή ένα μείγμα με τις απαιτήσεις της νομοθεσίας REACH χρησιμοποιούνται ακολούθως για τους σκοπούς της διαχείρισης (risk management) και επικοινωνίας (risk communication) των κινδύνων από τις χημικές ουσίες. Έτσι, μετά από διαδικασίες αξιολόγησης κινδύνου, οι χημικές ουσίες ταξινομούνται σύμφωνα με συγκεκριμένα κριτήρια και δίνεται η κατάλληλη, ενιαία για όλο τον ευρωπαϊκό χώρο, επισήμανση με βάση τον ενδογενή κίνδυνο αυτών σε δελτία δεδομένων ασφαλείας (Safety Data Sheets), ακολουθώντας τον Κανονισμό 1272/2008/EK, CLP. Ο Κανονισμός αυτός είναι δεσμευτικός για τις ουσίες και τα μείγματα που εμπίπτουν στον REACH⁹ και η ονομασία του προκύπτει από τα αρχικά των λέξεων **C**lassification (Ταξινόμηση), **L**abeling (Επισήμανση), **P**ackaging (Συσκευασία). Μάλιστα, η (επαν)αξιολόγηση των ήδη υπάρχοντων δεδομένων τοξικότητας που συλλέγονται για την καταχώριση των χημικών ουσιών υπό τον Κανονισμό REACH ενδεχομένως, για ορισμένες κατηγορίες ουσιών και τάξεις βάρους, ενδέχεται να οδηγήσει σε πιο αυστηρή ταξινόμηση, σε σχέση με άλλα συστήματα εναρμονισμένης ταξινόμησης σε ισχύ ή σε ταξινόμηση για κάποιο επιπλέον τελικό σημείο κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία.¹⁰

A.2. Εκτίμηση κινδύνου από τις χημικές ουσίες

Η εκτίμηση κινδύνου των χημικών ουσιών (chemical risk assessment) είναι η διαδικασία που λαμβάνει χώρα με σκοπό την καταχώριση της ουσίας στη βάση δεδομένων του ECHA υπό τον REACH. Η διαδικασία που ακολουθείται αποτυπώνεται σε έγγραφο, την Έκθεση Χημικής Ασφάλειας. Πέρα από την καταχώριση της ουσίας, η αξιολόγηση κινδύνου συνιστά τη βάση ώστε να αυτή να υποβληθεί και σε κάποια από τις υπόλοιπες διαδικασίες της Νομοθεσίας REACH, εάν αυτό είναι απαραίτητο.¹¹

Κατά την εκτίμηση χημικής ασφάλειας που διενεργείται από τη βιομηχανία, ο παραγωγός ή εισαγωγέας οφείλει να παρέχει για μία χημική ουσία συμπεράσματα σύμφωνα με τις τυπικές απαιτήσεις πληροφοριών του REACH για μία σειρά τελικών σημείων.¹² Το είδος των τελικών σημείων που πρέπει να συμπεριλάβει στην αξιολόγηση ο παραγωγός ή ο εισαγωγέας εξαρτάται από την ποσοτική κατηγορία (tonnage) στην οποία παράγεται ή εισάγεται η ουσία και ορίζεται από τα αντίστοιχα Παραρτήματα του Κανονισμού REACH στα οποία υπάγεται. Τα συμπεράσματα της αξιολόγησης, επιπλέον, οδηγούν σε πρόταση της βιομηχανίας για εναρμονισμένη ταξινόμηση ή μη για τις διάφορες τάξεις κινδύνου του Κανονισμού CLP συντάσσοντας μία αναφορά που περιλαμβάνει τις σχετικές πληροφορίες. Η πρόταση ταξινόμησης της βιομηχανίας, ακολούθως, υφίσταται ανεξάρτητη αξιολόγηση από την Επιτροπή Αξιολόγησης Κινδύνου (Risk Assessment Committee) του ECHA και η τελική απόφαση για την πρόταση προωθείται στην Ευρωπαϊκή Επιτροπή ώστε να αναθεωρήσει τη Νομοθεσία για να συμπεριλάβει την ταξινόμηση στον Πίνακα εναρμονισμένων καταχωρήσεων του Παραρτήματος VI του Κανονισμού CLP.¹³

A.2.1. Αξιολόγηση καρκινογονικότητας

Στους Κανονισμούς REACH και CLP ως «καρκινογόνος» ορίζεται μία ουσία που προκαλεί την εμφάνιση όγκων, αυξάνει τη συχνότητα εμφάνισης όγκων και/ή την κακοήθεια ή μειώνει το χρόνο εμφάνισης όγκου.^{14,15}

Ο REACH απαιτεί την ταυτοποίηση καρκινογόνων ουσιών ως ουσιών υψηλού κινδύνου για όλες τις ποσοτικές κατηγορίες, συνεπώς και για τις ουσίες που παράγονται ή εισάγονται σε ποσότητα <1000 τόνων (ουσίες στα Παραρτήματα VII-IX), αξιοποιώντας τις υπάρχουσες σχετικές πληροφορίες. Ιδιαίτερα για τις ουσίες στο

Παράρτημα Χ, οι οποίες παράγονται ή εισάγονται στα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης σε ποσότητα μεγαλύτερη από 1000 τόνους, η αξιολόγηση της καρκινογονικότητας ανήκει στις τυπικές απαιτήσεις πληροφοριών που πρέπει να παρέχονται κατά την καταχώριση.¹² Η σύνδεση μιας χημικής ουσίας με τον καρκίνο σε ελάχιστες μόνο περιπτώσεις έχει προφανή σχέση αιτίου-αποτελέσματος, που είναι έκδηλη μέσα από επιδημιολογικά δεδομένα. Γι' αυτό και η απόδοση σε μια χημική ουσία του χαρακτηρισμού «καρκινογόνος» προκύπτει μέσα από μία πολυεπίπεδη διαδικασία, όπου επιστρατεύονται ποικίλα είδη μεθόδων, ώστε να αντλήσει κανείς πληροφορίες και να τεκμηριωθεί η συσχέτιση ή μη. Ο προσδιορισμός του καρκινογόνου δυναμικού μιας ουσίας από τους ειδικούς που αναλαμβάνουν την αξιολόγηση επιτυγχάνεται με την εφαρμογή της προσέγγισης Βάρους των Αποδείξεων, με σκοπό να αξιοποιηθούν με το σωστό τρόπο οι σχετικές πληροφορίες από τις διαφορετικές πηγές, λόγω των ποικίλων παραγόντων που μπορεί να επηρεάζουν την αξιοπιστία των δεδομένων.^{12,13}

Η προέλευση των πληροφοριών, η επάρκεια των δεδομένων και η αξιοπιστία αυτών θα καθορίσει την πρόταση για ταξινόμηση σύμφωνα με τον CLP στην κατάλληλη κατηγορία για την τάξη κινδύνου της καρκινογονικότητας, όπως φαίνεται στον **Πίνακα Α2**.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ CLP	
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ 1A	<ul style="list-style-type: none"> • «γνωστό καρκινογόνο για τον άνθρωπο» • από ανθρώπινα επιδημιολογικά δεδομένα • εμφανής σχέση μεταξύ ανθρώπινης έκθεσης σε μία ουσία και την ανάπτυξη καρκίνου
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ 1B	<ul style="list-style-type: none"> • «ουσία που πιθανολογείται ότι έχει τη δυνατότητα καρκινογονικότητας στον άνθρωπο» • από επαρκή δεδομένα καρκινογονικότητας σε ζώα
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ 2	<ul style="list-style-type: none"> • «ουσία για την οποία υπάρχουν υποψίες ότι προκαλεί καρκίνο στον άνθρωπο» • από δεδομένα από μελέτες στον άνθρωπο ή σε ζώα, όχι αρκετά πειστικά ώστε να οδηγήσουν σε Κατ 1A/1B

Πίνακας A2: Κατηγορίες για την τάξη κινδύνου της καρκινογονικότητας κατά CLP¹⁵

Αναφορικά με τα μείγματα που περιέχουν συστατικό με ταξινόμηση για καρκινογονικότητα, υπάρχει η υποχρέωση να δίνεται σε αυτά για επισήμανση το εικονόγραμμα CLP που αντιστοιχεί στο «σοβαρό κίνδυνος για την υγεία» (**Σχήμα A1**) εάν περιέχει σε ποσοστό >0,1% συστατικό που έχει ταξινομηθεί ως καρκινογόνο Κατηγορίας 1A ή 1B ή σε ποσοστό >1% συστατικό με ταξινόμηση για καρκινογονικότητα στην Κατηγορία 2.



Σχήμα A1: Εικονόγραμμα CLP «Σοβαρός κίνδυνος για την υγεία»¹⁵

Η αξιολόγηση της αξιοπιστίας του τρόπου που διεξήχθη και, κατά συνέπεια, της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων μιας *in vivo* μελέτης, όπως είναι η δοκιμασία καρκινογονικότητας, μπορεί να διεξαχθεί με τη βοήθεια του ανοιχτού για χρήση

λογισμικού-εργαλείου ToxRTool (**T**oxicological data **R**eliability **A**ssessment **T**ool). Στο εργαλείο αυτό, που δημιουργήθηκε στο πλαίσιο προγράμματος χρηματοδοτούμενο από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, τίθενται 21 ερωτήσεις που αντιστοιχούν σε κριτήρια αξιοπιστίας ποικίλων εκφάνσεων (χαρακτηρισμός ουσίας και οργανισμού, περιγραφή της μελέτης, καταγραφή των αποτελεσμάτων, ευλογοφάνεια αποτελεσμάτων και επιλογής της μελέτης)^{16,17}, καθένα από τα οποία έχει διαφορετική βαρύτητα για την εξαγωγή του τελικού συμπεράσματος και συνοδεύεται από λεπτομερείς οδηγίες. Μετά την απάντηση όλων των ερωτήσεων (με μία από τις επιλογές 0=όχι ή 1=ναι) από τον ειδικό που εκτελεί την αξιολόγηση, η μελέτη λαμβάνει ένα σκορ αξιοπιστίας που οδηγεί σε Κατηγορία 1, 2 ή 3 κατά Klimisch (**Πίνακας A3**). Για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας των *in vitro* μελετών το ToxRTool περιλαμβάνει ξεχωριστό φύλλο εργασίας με 19 αντίστοιχες ερωτήσεις-κριτήρια, κατάλληλες για τις παραμέτρους των μελετών αυτών.

Κατηγορία κατά Klimisch	Περιγραφή
Κατ.1 -αξιόπιστη χωρίς περιορισμούς	μελέτες ή δεδομένα της βιβλιογραφίας ή αναφορές που έχουν διεξαχθεί σύμφωνα με διεθνώς αποδεκτές κατευθυντήριες οδηγίες δοκιμασιών (κατά προτίμηση κατά GLP) ή οι παράμετροί τους βασίζονται σε ειδικές (εθνικές) κατευθυντήριες οδηγίες (και κατά προτίμηση να έχει διεξαχθεί κατά GLP) ή όλες οι παράμετροι που περιγράφονται συνδέονται στενά/είναι συγκρίσιμες με τις παραμέτρους της κατευθυντήριας μεθόδου
Κατ.2 -αξιόπιστη με περιορισμούς	μελέτες ή δεδομένα της βιβλιογραφίας ή αναφορές (κυρίως όχι σύμφωνα με GLP), όπου οι παράμετροι συνήθως δε συμμορφώνονται απόλυτα με συγκεκριμένη κατευθυντήρια μέθοδο, αλλά είναι επαρκείς για να αποδεχτούμε τα δεδομένα ή όπου περιλαμβάνονται διερευνήσεις που δεν υπάγονται σε συγκεκριμένη κατευθυντήρια μέθοδο, αλλά είναι καλώς καταγεγραμμένες και επιστημονικά αποδεκτές
Κατ. 3 – μη αξιόπιστη	μελέτες ή δεδομένα από βιβλιογραφία/αναφορές, όπου υπάρχουν παρεμβολές μεταξύ του συστήματος μέτρησης και της υπό δοκιμή ουσίας ή οι οργανισμοί/ τα συστήματα δοκιμασίας δεν είναι σχετικά με την έκθεση ή τα οποία διεξήχθησαν ή παρήχθησαν

	σύμφωνα με μέθοδο μη αποδεκτή, η καταγραφή της οποίας δεν είναι επαρκής για εκτίμηση και δεν είναι πειστικά ως κρίση ειδικών
--	--

Πίνακας A3: Κατηγορίες αξιοπιστίας κατά Klimisch¹⁸

Η απάντηση σε πολλά επιμέρους ερωτήματα που καλύπτουν ποικίλες παραμέτρους μιας μελέτης, σε αντίθεση με μία λιγότερο καθοδηγούμενη υπαγωγή σε κατηγορία αξιοπιστίας, αναμφίβολα κατέστησε την ίδια την αξιολόγηση πιο αξιόπιστη. Εντούτοις, φαίνεται ότι η δυνατότητα χρήσης ενός τέτοιου κατατοπιστικού εργαλείου δεν είναι δυνατόν να εξαλείψει τη μεροληψία, αλλά ούτε μπορεί να απαξιώσει την υποκειμενική γνώμη του εξειδικευμένου αξιολογητή.¹⁹ Η επιτυχία της χρήσης του ToxRTool θα μπορούσε να επεκταθεί με την εφαρμογή βελτιώσεων, τη δημιουργία ειδικών εργαλείων βαθμολόγησης για τους πιο εξειδικευμένους τύπους μελετών και την προσθήκη κριτηρίων αξιολόγησης της μεροληψίας κατά το σχεδιασμό της μελέτης.¹⁹

A.2.1.1. Δοκιμασία καρκινογονικότητας σε πειραματόζωα

Για τις ουσίες οι οποίες υπάγονται στο Παράρτημα X του REACH δίνεται το δικαίωμα να προταθεί από τον καταχωρούντα ή να ζητηθεί από τον ECHA η διεξαγωγή δοκιμασίας καρκινογονικότητας σε ζώα, εάν πληροί τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

- γίνεται ευρεία χρήση της σε διασπορά
- υπάρχει συχνή, μακροχρόνια έκθεση σε αυτή και είναι μεταλλαξιγόνο για τα γεννητικά κύτταρα Κατηγορίας 2 ή υπάρχουν γι' αυτή αποδείξεις από μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης ότι προκαλεί υπερπλασία ή προ-νεοπλαστικές αλλοιώσεις

Εάν η ουσία ταξινομείται ως μεταλλαξιγόνο Κατηγορίας 1A/1B η συνήθης υπόθεση είναι ότι πιθανόν να λαμβάνει χώρα γενοτοξικός μηχανισμός καρκινογονικότητας και δε χρειάζεται να διεξαχθεί δοκιμασία καρκινογονικότητας.^{3,12,13}

Η δοκιμασία αυτή αντιμετωπίζεται από μία μεγάλη μερίδα ερευνητών ως «ο χρυσός κανόνας» για την απόδειξη της καρκινογονικότητας μιας ουσίας. Προκειμένου η διεξαγωγή μιας μακροχρόνιας μελέτης καρκινογονικότητας σε ζώα να πραγματοποιείται με το βέλτιστο τρόπο, ακολουθείται συνήθως το πρωτόκολλο που προτείνει ο ΟΟΣΑ.²⁰ Ο τρόπος με τον οποίο έχει σχεδιαστεί η μελέτη επιτρέπει την παρακολούθηση των πειραματόζωων (συνήθως τρωκτικών, και πιο συχνά ποντικών και αρουραίων) για το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους με σκοπό να διερευνηθεί εάν θα εμφανίσουν νεοπλασματικές αλλοιώσεις από την έκθεση σε κλιμακούμενες δόσεις της υπό μελέτη ουσίας μέσω της πιο ενδεικτικής οδού χορήγησης, συνήθως μέσω χορήγησης από το στόμα.

Η κατευθυντήρια γραμμή της δοκιμασίας καρκινογονικότητας του ΟΟΣΑ ορίζει το σχηματισμό από πειραματόζωα τριών ομάδων δόσεων, καθεμία από τις οποίες αποτελείται από 50 αρσενικά και 50 θηλυκά ζώα που εκτίθενται στην υπό εξέταση ουσία καθημερινά με τον πιο ορθό τρόπο ανάλογα με τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες της ουσίας και μιας ομάδας ελέγχου με αντίστοιχο αριθμό ζώων που δεν προσλαμβάνει καθόλου την εξεταζόμενη ουσία. Συνήθως η δοκιμασία διαρκεί δύο έτη, χρόνος που κρίνεται ότι είναι ο κατάλληλος με βάση τη διάρκεια ζωής των τρωκτικών γενικά, μπορεί όμως να προσαρμοστεί για συγκεκριμένα είδη ποντικών με πιο σύντομη διάρκεια ζωής στους 18 μήνες. Οι ερευνητές οφείλουν να τερματίσουν τη δοκιμασία όταν επιβιώνει λιγότερο από το 25% των πειραματόζωων στην ομάδα χαμηλότερης δόσης. Μεταξύ των

καθημερινών παρατηρήσεων οι οποίες είναι απαραίτητο να γίνονται περιλαμβάνονται οι παρατηρήσεις για φαινόμενα νοσηρότητας και θνησιμότητας, αλλαγές στο βάρος και στη λήψη τροφής, ενώ διεξάγονται αναλύσεις δειγμάτων αίματος και ενδεχομένως και ούρων για εξέταση ποικίλων αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων. Επιπρόσθετα, συντελείται πλήρης και διεξοδική ιστοπαθολογική ανάλυση για τον εντοπισμό καλοήθων ή κακοήθων όγκων μετά το θάνατο ή τη θανάτωση.²⁰ Φυσικά, για την ορθή μετάφραση των αποτελεσμάτων στον άνθρωπο, είναι αναγκαίο να εκτιμηθεί εάν οι όγκοι που τυχόν θα αναπτυχθούν στα πειραματόζωα κατά τη διάρκεια του τεστ καρκινογονικότητας αφορούν μηχανισμούς και ανατομικά χαρακτηριστικά σχετικούς με τον άνθρωπο ή όχι.²¹

Η δοκιμασία καρκινογονικότητας, εντούτοις, προκειμένου να ικανοποιηθεί η αρχή των 3R ως προς τη μείωση του αριθμού ζώων που χρησιμοποιούνται στην αξιολόγηση παραμέτρων ασφάλειας των ουσιών, και δεδομένου ότι ακολουθώντας το πρωτόκολλο του ΟΟΣΑ χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 400 πειραματόζωα, δε λαμβάνει χώρα για κάθε ουσία που ικανοποιεί τις προϋποθέσεις που ορίζει ο REACH, παρά μόνο κατά περίπτωση με ειδική απαίτηση του ECHA. Πράγματι, από την εφαρμογή του Κανονισμού REACH σε ελάχιστες μεμονωμένες περιπτώσεις ουσιών έχει όντως ζητήσει ο ECHA τη διεξαγωγή αυτής έπειτα από πρόταση της βιομηχανίας.¹³

Ένας περιορισμός της κλασσικής δοκιμασίας καρκινογονικότητας που αναδεικνύουν στην αναφορά τους για τις εργασίες του Εργαστηρίου Τοξικολογίας με θέμα «Αξιολόγηση καρκινογονικότητας» οι Felter κ.λπ. (2020) αποτελεί το γεγονός ότι η χρήση της MTD (Maximum Tolerated Dose, Μέγιστη Ανεκτή Δόση), δηλαδή της μέγιστης δόσης η οποία χορηγείται σε ζώα και δεν προκαλεί σοβαρή νοσηρότητα²², ή υποδιαίρεσεων της τιμής αυτής σαν μέγιστη δόση χορήγησης σε μία από τις ομάδες πειραματόζωων της δοκιμασίας δεν αντικατοπτρίζει ρεαλιστικό σενάριο ανθρώπινης έκθεσης²², συνεπώς θα οδηγήσει σε υπερεκτίμηση του καρκινογόνου δυναμικού της ουσίας.

A.2.1.2. Εναλλακτικές μη πειραματικές μέθοδοι αξιολόγησης της καρκινογονικότητας

Λόγω των αμφιβολιών σχετικά με το κατά πόσο αξίζει για την εκτέλεση της δοκιμασίας καρκινογονικότητας να θυσιαστεί τόσο μεγάλος αριθμός ζώων για την εξαγωγή αποτελεσμάτων, τα οποία εν τέλει ενδέχεται να μην απεικονίζουν τον πραγματικό κίνδυνο που φέρει μία χημική ουσία για τον άνθρωπο, κρίνεται απαραίτητο

να παραχθούν δεδομένα για την καρκινογονικότητα μέσω διαφορετικών αξιόπιστων στρατηγικών, συμπεριλαμβανομένων και μη πειραματικών μεθόδων που δεν στηρίζονται στην εκμετάλλευση ζωικών ειδών. Η απουσία αποτελεσμάτων από δοκιμασία καρκινογονικότητας -ή από εύστοχο read-across (βλ. παρακάτω)- καθιστά αδύνατη την αξιολόγηση και σωστή ταξινόμηση κατά CLP, ακόμα και για την υψηλότερη ποσοτική κατηγορία. Ιδιαίτερα για τις ουσίες που θα έπρεπε να ταξινομούνται ως καρκινογόνα Κατηγορίας 1A/1B η επικινδυνότητα για τους χρήστες είναι μεγάλη από την αποτυχία ταξινόμησης της ουσίας λόγω έλλειψης αποδείξεων, διότι δεν προειδοποιούνται για τον ενδογενή κίνδυνο ουσιών στον οποίο ενδέχεται να εκτίθενται σε μεγάλο βαθμό μέσω της χρήσης προϊόντων.¹³

Η δοκιμασία καρκινογονικότητας δύο ετών, λόγω του πλήθους πληροφοριών που μπορεί να αντλήσει κανείς από αυτή, δεν μπορεί να αντικατασταθεί προς το παρόν από μοναδική αξιόπιστη μη πειραματική μέθοδο.²² Συνεπώς, αξιοποιείται μία σειρά από εναλλακτικές μεθόδους, καθεμία από τις οποίες θεωρείται σημαντική σε διαφορετικό βαθμό και εξετάζει τη δυνατότητα πρόκλησης καρκινογένεσης από διαφορετική σκοπιά. Είναι εύκολα αντιληπτό ότι λόγω της συσχέτισης της καρκινογονικότητας με τη μεταλλαξιγένεση, ιδιαίτερα για τις ουσίες που εμφανίζουν γενοτοξικό μηχανισμό δράσης, θα γίνει χρήση όλων των διαθέσιμων στοιχείων από *in vitro* δοκιμασίες γενοτοξικότητας ως στοιχεία που συνεισφέρουν στην στρατηγική αξιολόγησης Βάρους των Αποδείξεων.^{3,6} Πλέον επιστρατεύονται νέες τεχνολογίες, τις εργαλεία -omics, *in silico* μέθοδοι, φτάνοντας μέχρι και στα «όργανα πάνω σε chip» που, σε εξέλιξη των δισδιάστατων *in vitro* μοντέλων, μιμούνται με ακρίβεια ενδο- και εξω-κυτταρικές αλληλεπιδράσεις των ζωντανών οργανισμών, απαλλάσσοντας από την ανάγκη για μετάφραση των πληροφοριών καρκινογονικότητας για διαφορετικό είδος.²³

Ευρεία παραμένει από την έναρξη εφαρμογής του Κανονισμού REACH η χρήση της μεθόδου **read-across** κατά την αξιολόγηση του καρκινογόνου δυναμικού μιας ουσίας. Ειδικότερα, η αναλογική μέθοδος read-across περιλαμβάνει τη χρήση σχετικών πληροφοριών από ανάλογες ουσίες για την πρόβλεψη ιδιοτήτων της ουσίας υπό διερεύνηση.²³ Ο ECHA διασφάλισε ότι η μέθοδος εφαρμόζεται αξιόπιστα μέσω τυποποίησής της συντάσσοντας το Πλαίσιο Αξιολόγησης της Σύγκρισης (Read-Across Assessment Framework, RAAF), το οποίο αποτελεί εργαλείο που συνδράμει, μέσα από σενάρια περιπτώσεων που παρέχει, στην υπερπήδηση προκλήσεων που σχετίζονται με μεταβλητές παραμέτρους των συγκρινόμενων ουσιών. Παραδείγματα των μεταβλητών

αυτών παραμέτρων αποτελούν η αξιολόγηση από διαφορετική Κανονιστική Αρχή ή με βάση διαφορετικό Κανονισμό, ο διαφορετικός προϊόντων στα οποία περιλαμβάνονται και η διαφορετική χρήση των ουσιών.^{22,24}

A.2.2. Αξιολόγηση καρκινογονικότητας UVCB ουσιών

Ο ECHA στον ορισμό που παρέχει για τη «χημική ουσία» διευκρινίζει πως με τον όρο αυτό καλύπτονται τρεις τύποι ουσιών: οι μονοσυστατες ουσίες, οι πολυσυστατικές ουσίες και οι UVCB ουσίες (Ουσίες Άγνωστης ή Ασταθούς Σύνθεσης, Προϊόντα Πολύπλοκων Αντιδράσεων ή Βιολογικά Προϊόντα). Ο τρίτος τύπος ουσιών είναι αυτός που εμφανίζει τη μεγαλύτερη δυσκολία στη διαδικασία αξιολόγησης της καρκινογονικότητας (αλλά και άλλων τελικών σημείων), μιας και ο αριθμός των συστατικών είναι μεγάλος, ενώ πολλά από αυτά είναι άγνωστα.²⁵ Η ιδιαιτερότητα που αναδύεται σε αυτό το σημείο είναι το γεγονός ότι ενώ μια UVCB ουσία πρέπει να ικανοποιεί τις απαιτήσεις του REACH όπως και οποιαδήποτε μονοσυστατη ουσία, ταυτόχρονα αντιμετωπίζεται ως μείγμα για την τοξικολογική της αξιολόγηση.²⁶

Ένα μείγμα ως προς τον ενδογενή του κίνδυνο μπορεί να αξιολογηθεί είτε ολόκληρο (προσέγγιση «από πάνω προς τα κάτω», top down approach) είτε από τα συστατικά του με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα (προσέγγιση «από κάτω προς τα πάνω», bottom-up approach).^{23,26} Όπως προτείνεται και στην αναφορά της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για την αξιολόγηση των μειγμάτων αποφεύγεται η χρήση της προσέγγισης που βασίζεται σε ολόκληρο το μείγμα για τις UVCB ουσίες, καθώς εφαρμόζεται ικανοποιητικά μόνο για μείγματα των οποίων η σύσταση δε μεταβάλλεται σημαντικά.²⁶ Αυτό συνεπάγεται πως η αξιολόγηση τελικά στηρίζεται στα δεδομένα για τα επιμέρους συστατικά του μείγματος που συνιστούν σταθερά το μεγαλύτερο ποσοστό της σύστασής του.

Στο πλαίσιο αυτό, για το χαρακτηρισμό του ενδογενούς κινδύνου μιας ουσίας να προκαλεί καρκίνο μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέσω της μεθόδου read-across οι πληροφορίες για το προφίλ ασφάλειας ως προς την καρκινογονικότητα μιας UVCB ουσίας. Για να πραγματοποιηθεί το read-across τα συστατικά των UVCB ουσιών ομαδοποιούνται με βάση τη δομική ομοιότητά τους, η οποία τεκμηριώνεται από κοινές λειτουργικές ομάδες, κοινές πρόδρομες ενώσεις ή κοινά προϊόντα διάσπασης. Η διαδικασία που ακολουθείται για το read-across θεωρείται αξιόπιστη και τα

συμπεράσματα που προκύπτουν από αυτή έχουν σημαντική βαρύτητα στην τελική εκτίμησης της καρκινογονικότητας, εφόσον λαμβάνεται υπόψιν η επίδραση που μπορεί να έχει η διαφοροποίηση των συγκεντρώσεων των συστατικών στη σύσταση των δύο UVCB ουσιών στην ένταση της δράσης του καθενός.²⁴

A.3. Ριγανέλαιο

Η ονομασία «ριγανέλαιο» (oregano oil ή oil of *Origanum*) αποδίδεται σε μείγματα μεταβαλλόμενης σύνθεσης με χαρακτηριστική γεύση και οσμή αιθέριου ελαίου πλούσιου στη χημική ένωση καρβακρόλη. Η καρβακρόλη, όπως και η ισομερής της ένωση θυμόλη, αποτελούν φυσικά φαινολικά παράγωγα του μονοτερπενίου.²⁷ Συνεπώς, το ριγανέλαιο στην πραγματικότητα μπορεί να προέρχεται από μία ποικιλία φυτικών ειδών που ανήκουν σε διαφορετικά γένη της οικογένειας των χειλανθών (Lamiaceae).²⁸ Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αναζήτησης στη βάση δεδομένων χημικών ουσιών του ECHA η εμπορική ονομασία *ριγανέλαιο* (oregano oil) προσδιορίζει τα «εκχυλίσματα και τα φυσικώς τροποποιημένα παράγωγά τους, όπως βάμματα, πηγμένα, απόλυτα, αιθέρια έλαια, ελαιορητίνες, τερπένια, κλάσματα ελεύθερα τερπενίων, αποστάγματα, υπολείμματα κ.λπ.» που προέρχονται από το *Thymus capitatus* ή από είδη του γένους *Origanum*.²⁹ Τόσο το *Thymus capitatus*, γνωστό και ως ισπανική ρίγανη, όσο και τα φυτικά είδη *Origanum* εμφανίζουν ευρεία γεωγραφική κατανομή γύρω από τη Μεσόγειο.

Μία φυτική δρόγη δεν παράγει πάντοτε την ίδια ποσότητα αιθέριου ελαίου, αλλά και το αιθέριο έλαιο από κάθε είδος δεν έχει πάντα σταθερά χαρακτηριστικά. Τουναντίον, μεταξύ των φυτών που ανήκουν στην ίδια ταξονομική κατηγορία η παραγόμενη ποσότητα αιθέριου ελαίου και η σύσταση αυτού (ποιοτικά και ποσοτικά) διαφοροποιείται ανάλογα με την εποχή, τις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες, τις γενετικές διαφορές, την ηλικία του φυτού και την εποχή κατά την οποία γίνεται η συγκομιδή.³⁰ Γίνεται, έτσι, εύκολα κατανοητό ότι τα είδη που παράγουν τη μεγαλύτερη ποσότητα αιθέριου ελαίου και ταυτόχρονα περιέχουν μεγάλο ποσοστό του συστατικού ενδιαφέροντος θεωρούνται «καλύτερης ποιότητας» και θα είναι περισσότερο αξιοποιήσιμα εμπορικά.

Το *Thymus capitatus* και διάφορα είδη *Origanum* από τα 43 είδη της σύγχρονης ταξινόμησης³¹, όπως και αρκετά ακόμη φυτά που ανήκουν στην οικογένεια Lamiaceae, έχουν ιδιαίτερα διαδεδομένη χρήση στη μαγειρική λόγω της χαρακτηριστικής οσμής και γεύσης τους, όπου η «ελληνική ρίγανη» (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) κυριαρχεί, και στην αρωματοποιία.³⁰ Επιπρόσθετα, εμφανίζονται στην εθνοφαρμακολογία αρκετών χωρών όπου φύονται, όπου με τη μορφή αφεψήματος οι παραδοσιακές χρήσεις αυτών περιλαμβάνουν την ανακούφιση διάφορων διαταραχών του αναπνευστικού (πονόλαιμος, βήχας, κρυολόγημα), αλλά και του πεπτικού συστήματος.³²

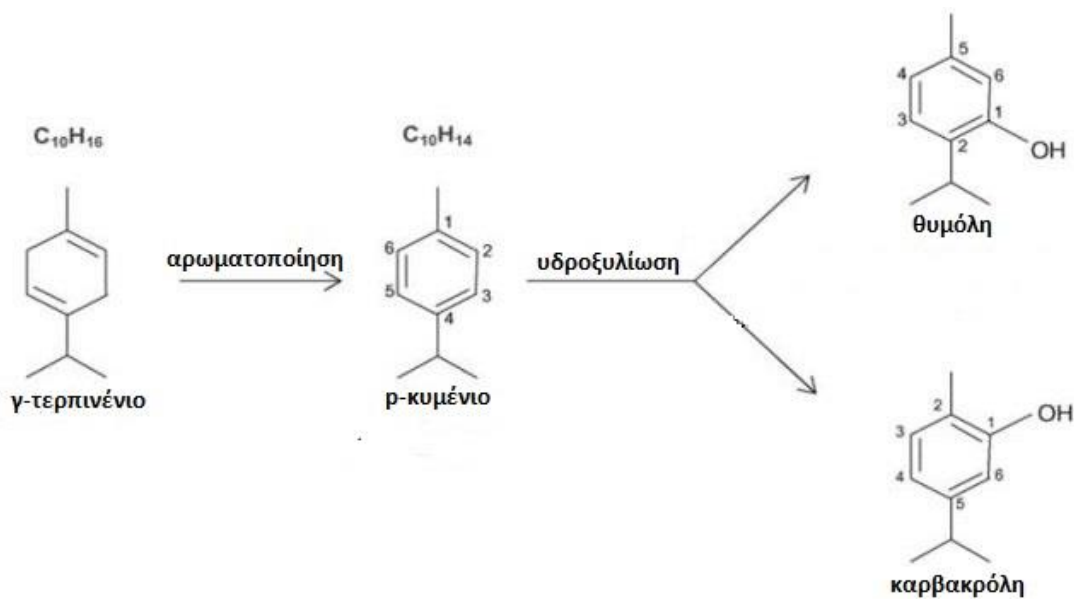
Το αιθέριο έλαιο από το *Thymus capitatus* και είδη *Origanum* λειτουργεί, έτσι, ως συντηρητικό τροφίμων, με το ενδιαφέρον να είναι διαρκώς αυξανόμενο για τη χρήση αυτή, γι' αυτό και γίνονται διαρκώς προσπάθειες απόδειξης της αποτελεσματικότητάς του μέσα από μελέτες, με σκοπό τη διεύρυνση αυτής της χρήσης.^{33,34,35}

A.4. Ριγανέλαιο από το *Origanum vulgare*

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, στο γένος *Origanum* συγκαταλέγονται 43 είδη, ενώ αν αναλογιστούμε το πλήθος των υποειδών που περιλαμβάνει κάθε είδος, αντιλαμβάνεται κανείς πως πρόκειται για ένα ιδιαίτερα ποικιλόμορφο ταξονομικό γένος. Τα είδη του γένους *Origanum* παράγουν ριγανέλαιο σύστασης που μεταβάλλεται (ουσία UVCB) για κάθε συγκεκριμένο είδος και ανάλογα με την περιοχή όπου το καθένα ευδοκιμεί, με το φυσικό φαινολικό παράγωγο του μονοτερπενίου, καρβακρόλη, και τη θυμόλη, που αποτελεί ισομερή ένωση της καρβακρόλης, να είναι τα συστατικά που συναντά κανείς σε υψηλότερο ποσοστό σε αρκετά από τα είδη έναντι των υπόλοιπων συστατικών του πραγματικά σύνθετου μείγματος.^{27,36,37}

Μεταξύ των ειδών *Origanum*, το *Origanum vulgare* είναι αυτό το οποίο έχει τη μεγαλύτερη γεωγραφική κατανομή, καθώς απαντάται ως ενδημικό είδος στην λεκάνη της Μεσογείου, τα Ιρανο-τουρανικά κράτη και την Ευρω-Σιβηρική περιοχή.³⁸

Στα υποείδη του *Origanum vulgare* με κατανομή στη λεκάνη της Μεσογείου φαίνεται πως το μεγαλύτερο ποσοστό του αιθέριου ελαίου αποτελούν τέσσερα συστατικά: οι ισομερείς μεταξύ τους φαινολικές ενώσεις θυμόλη και καρβακρόλη και οι χημικές ουσίες που προτείνεται ότι συνιστούν πρόδρομες ουσίες, τα τερπένια p-κυμένιο και γ-τερπινένιο (**Σχήμα Α2**)³⁹, με το άθροισμα της περιεκτικότητάς τους να είναι συνολικά πάντα >80% του ελαίου.^{27,38,40} Όπως παρουσιάζουν οι Lukas κ.λπ. (2015) στη μελέτη τους στην οποία ανέλυσαν δείγματα *Origanum vulgare* από όλη την Ευρώπη, ο χημειότυπος αυτός προκύπτει με ενίσχυση της συνθετικής οδού του «κυμυλικού» στα φυτά, έναντι της σύνθεσης ακυκλικών παραγώγων ή παραγώγων του «σαβινυλικού».^{27,31} Στις χώρες της Ευρώπης με ηπειρωτικό τύπο κλίματος οι χημειότυποι των ειδών *Origanum* που επικρατούν είναι φτωχοί σε φαινολικό περιεχόμενο³⁰, επομένως στα φυτά αυτά άλλες συνθετικές οδοί θα παρουσιάζουν αυξημένη ρύθμιση.



Σχήμα Α2: Μετατροπή του γ -τερπινενίου σε καρβακρόλη και θυμόλη⁴¹

A.4.1. Βιολογική δράση

Στο περιεχόμενο του αιθέριου ελαίου του *Origanum vulgare* στις φαινολικές ενώσεις θυμόλη και καρβακρόλη, καθώς και στη συνεργιστική δράση αυτών με συστατικά του αιθέριου ελαίου σε αρκετά μικρότερα ποσοστά με τα οποία συνυπάρχουν⁴⁰, αποδίδονται ιδιότητες του που έχουν μελετηθεί και που θα μπορούσαν να αποδειχθούν ευεργετικές για την ανθρώπινη υγεία. Οι Lombrea κ.λπ. (2015) ανατρέχοντας στις άφθονες μελέτες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία συνόψισαν τις ιδιότητες που πιθανόν να έχει το αιθέριο έλαιο που προέρχεται από διάφορα υποείδη του *Origanum vulgare*. Οι πιο σημαντικές ιδιότητες είναι οι εξής:

- *αντιβακτηριακή, αντιμυκητιασική και αντιπαρασιτική δράση*, που φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της διαταραχής της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης κάθε είδους μικροοργανισμού από τη θυμόλη και την καρβακρόλη με κατάλληλο μηχανισμό. Έτσι, στα βακτήρια το αιθέριο έλαιο λόγω υδροφοβικότητας κατανέμεται στη λιπιδική διπλοστιβάδα και τα συστατικά του συνδέονται μέσω ομάδων (π.χ. των φαινολικών -OH) με πρωτεΐνες αυτής αυξάνοντας τη διαπερατότητά της, με αποτέλεσμα την εκροή κυτταρικού περιεχομένου.^{42,43} Από την άλλη, η αποδυνάμωση της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων φαίνεται να

οφείλεται στην παρέμβαση της θυμόλης και της καρβακρόλης στη σύνθεση της εργοστερόλης.³²

- *αντιοξειδωτική δράση*: προκύπτει πιθανόν από τη δέσμευση ελεύθερων ριζών από την καρβακρόλη, τη θυμόλη και το p-κυμένιο³², αλλά και την ικανότητα του συνολικού φαινολικού περιεχομένου σε συνέργεια με τα μη φαινολικά συστατικά να ανάγουν τα μεταλλικά ιόντα.^{32,44,45}
- *αντιφλεγμονώδης δράση*: αποδίδεται στην αναστολή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και μείωση της έκφρασης των γονιδίων παραγόντων που σχετίζονται με τη φλεγμονή από την καρβακρόλη.³²
- *αντικαρκινική δράση*: από μελέτες σε διάφορες σειρές καρκινικών κυττάρων φαίνεται πως οι μηχανισμοί μέσω των οποίων εκδηλώνεται είναι η κυτταροτοξική δράση και η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων.³²
- *αναστολή σύνθεσης μελανίνης*: λόγω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου των φαινολικών συστατικών του αιθέριου ελαίου με το ενεργό κέντρο του ενζύμου τυροσινάση, μειώνεται η δραστηριότητα του ενζύμου αυτού, το οποίο εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της μελανίνης.⁴⁶

Οι Lombrea κ.λπ. (2015) προτείνουν, επιπλέον, ότι οι παραπάνω ευεργετικές ιδιότητες θα μπορούσαν να έχουν εφαρμογή στην αντιμετώπιση ποικίλων διαταραχών του δέρματος (ακμή, τραυματισμοί, φλεγμονώδεις εκδηλώσεις, δερματική υπερμελάγχρωση) αλλά και στη διατήρηση της καλής κατάστασης αυτού, εάν ενσωματωθεί το αιθέριο έλαιο του *Origanum vulgare* σε κατάλληλο φορέα και γίνει τοπική εφαρμογή μέσω κατάλληλης φαρμακοτεχνικής μορφής.³²

A.4.2. Σύσταση και εμπορική αξιοποίηση

Το ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα πιθανά πλεονεκτήματα που είναι δυνατόν να έχει το ριγανέλαιο στην ανθρώπινη υγεία κινητοποιεί για αναζήτηση των ειδών *Origanum* που θα έχουν τη μεγαλύτερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο και υψηλό ποσοστό, κατά προτίμηση, καρβακρόλης μεταξύ των συστατικών του UVCB μείγματος ή συνολικού φαινολικού περιεχομένου, καθώς θα είναι και αυτά που θεωρείται ότι θα έχουν περισσότερο δυναμική παρουσία στην αγορά.

Το ενδημικό στην Ελλάδα *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* πληροί πράγματι αυτά τα κριτήρια «καλής ποιότητας», γεγονός που του δίνει πλεονεκτική θέση. Πιο συγκεκριμένα, δίνει μεγάλη ποσότητα αιθέριου ελαίου, που φτάνει μέχρι τα 8% επί ξηρού βάρους, έναντι του *Origanum onites*, το είδος δηλαδή από το οποίο προέρχεται κατά κόρον το ριγανέλαιο που παράγεται στην Τουρκία, και έχει απόδοση αιθέριου ελαίου μέχρι 4% επί ξηρού βάρους. Συγχρόνως, η καρβακρόλη, που είναι το συστατικό που περιλαμβάνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό μέσα στο έλαιο στο *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* που καλλιεργείται στην Ελλάδα, μπορεί να αποτελεί μέχρι και το 95% του περιεχομένου του αιθέριου ελαίου.³⁰ Το εύρος τιμών περιεκτικότητας σε καρβακρόλη στο ριγανέλαιο από το ελληνικό *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* θα μπορούσε, συνεπώς, να χαρακτηριστεί συγκρίσιμο με το εύρος τιμών στο ριγανέλαιο από *Thymus capitatus* από τις περισσότερες γεωγραφικές περιοχές προέλευσής του, που περιέχει σταθερά υψηλά ποσοστά καρβακρόλης (70-80%).^{36,46-48} Ενδεχομένως, επιπλέον, να υπερτερεί, με βάση τα επίπεδα καρβακρόλης, του ριγανέλαιου από το *Origanum compactum*, σημαντικό φαρμακευτικό φυτικό είδος του Μαρόκο⁴² και να είναι τουλάχιστον εφάμιλλο του αιθέριου ελαίου από το *Origanum syriacum*, το οποίο συναντά κανείς στη Συρία, αλλά και σε άλλες περιοχές γύρω από την ανατολική Μεσόγειο.³¹ Εδώ να σημειωθεί ότι ο χημειότυπος ορισμένων άγριων τύπων *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά θυμόλης στο αιθέριο έλαιο, φτάνοντας μέχρι και 85% του αιθέριου ελαίου, με την καρβακρόλη να απαντάται ως δευτερεύον συστατικό³⁰, οπότε θα υπάρχει και διαφοροποίηση της οσμής του ελαίου, ενώ το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο διατηρείται και σε αυτά τα φυτά σε υψηλά επίπεδα.

Καθώς, λοιπόν, η αξιοποίηση του ριγανέλαιου μεταβλητής σύστασης από το *Origanum vulgare* διευρύνεται, αναμένεται στο προσεχές μέλλον η ποσότητα στην οποία παράγεται στο χώρο της Ευρωπαϊκής Ένωσης να ξεπεράσει τους 1000 τόνους ετησίως, με τη συμβολή της Ελλάδας να είναι σημαντική προς αυτή την κατεύθυνση, οπότε και η ουσία θα υπάγεται πλέον στο Παράρτημα X του REACH. Επακόλουθο αυτού θα είναι η απαίτηση για αξιολόγηση επιπλέον τελικών σημείων, συμπεριλαμβανομένης της εκτίμησης της καρκινογονικότητας.

A.5. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να καταστρωθεί και να τεθεί σε εφαρμογή μία στρατηγική εκτίμησης της ενδογενούς καρκινογονικότητας της ουσίας μεταβαλλόμενης σύνθεσης «ριγανέλαιο από *Origanum vulgare*» σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες των νομοθεσιών REACH και CLP. Για το σκοπό αυτό θα αξιοποιηθούν όλες οι ήδη υπάρχουσες διαθέσιμες πληροφορίες για την ίδια την ουσία, αλλά και για τα βασικά της συστατικά, οι οποίες θα αξιολογηθούν ως προς την επάρκεια και την αξιοπιστία τους εφαρμόζοντας την προσέγγιση Βάρους των Αποδείξεων. Με την περάτωση της διαδικασίας εκτίμησης εξάγεται η τελική πρόταση για ταξινόμηση ή μη της υπό διερεύνησης ουσίας για την τάξη κινδύνου της Καρκινογονικότητας κατά CLP.

**B. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΟ
ΡΙΓΑΝΕΛΑΙΟ ΑΠΟ *ORIGANUM VULGARE***

B.1. Υλικά και μέθοδοι

Σύμφωνα με τη σύσταση του REACH για την αξιολόγηση του τελικού σημείου της καρκινογονικότητας ακολουθήθηκε η προσέγγιση Βάρους των Αποδείξεων, ώστε να ληφθούν υπόψη όλες οι διαθέσιμες σχετικές πληροφορίες.¹² Η στρατηγική που καταστρώθηκε για την εκτίμηση της καρκινογονικότητας με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες του ECHA για την αξιολόγηση της καρκινογονικότητας συνοψίζεται σε διάγραμμα ροής (Σχήμα B1).



Σχήμα B1: Διάγραμμα ροής της εκτίμησης καρκινογονικότητας για το ριγανέλαιο από *Origanum vulgare*

Όλες οι αναζητήσεις σε βάσεις δεδομένων πραγματοποιήθηκαν τόσο για την ουσία, δηλαδή το ριγανέλαιο από το *Origanum vulgare*, χρησιμοποιώντας εναλλακτικές ονομασίες αυτού, όσο και ξεχωριστά για τα τέσσερα βασικά συστατικά της, καρβακρόλη, θυμόλη, γ-τερπινένιο, p-κυμένιο, τα οποία αποτελούν συνήθως συνολικά περίπου 80% της σύστασης της UVCB ουσίας.^{27,38,40}

B.1.1. Αναζήτηση δεδομένων καρκινογονικότητας στη βάση δεδομένων ουσιών του ECHA

Κατά την αναζήτηση αναφορών και επιστημονικών γνώμων των Κανονιστικών Αρχών της Ευρωπαϊκής Ένωσης που αξιολογούν εάν το ριγανέλαιο από το *Origanum vulgare* έχει καρκινογόνο δυναμικό έγιναν αναζητήσεις στον κατάλογο ουσιών του ECHA. Καθώς ο κατάλογος ουσιών του ECHA παρέχει ποικιλία διαφορετικών καταχωρίσεων, με βάση τις αναζητήσεις που έλαβαν χώρα επιλέχθηκαν για έλεγχο εκείνες οι καταχωρίσεις οι οποίες (α) αναφέρουν στην ονομασία τους μορφές του «εκχυλίσματος» (extract) και διάφορων φυσικώς τροποποιημένων παραγώγων αυτού, όπως του «βάμματος» (tincture) και του «αιθέριου ελαίου» (essential oil) μαζί με την εναλλακτική της ονομασία, «έλαιο» (oil) και (β) υποδεικνύουν προέλευση από υποείδη του *Origanum vulgare* ή η προέλευση αυτή συμπεριλαμβάνεται στην καταχώριση. Κατά συνέπεια, αφού αφαιρέθηκαν οι καταχωρίσεις που εμφανίζονται περισσότερες από μία φορές, αποκλείστηκαν από τον έλεγχο οι καταχωρίσεις εκείνες που αφορούν μορφές πέρα από αυτές που αναφέρθηκαν παραπάνω και οι καταχωρίσεις που αφορούν προέλευση αποκλειστικά από άλλα είδη *Origanum* ή από το *Thymus capitatus*. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση των εξής όρων στον κατάλογο ουσιών του ECHA: «oregano essential oil» «oregano extract», «oil of *Origanum*», «*Origanum vulgare* extract», «carvacrol-rich essential oil». Ταυτόχρονα, στη βάση δεδομένων του Οργανισμού έγινε αναζήτηση αναφορών σχετικά με την καρκινογονικότητα των βασικών συστατικών, εισάγοντας τους όρους: «carvacrol», «thymol», « γ -terpinene», «p-cymene».

B.1.2. Αναζήτηση δεδομένων καρκινογονικότητας στη βάση δεδομένων Pubmed

Για την αναζήτηση δεδομένων καρκινογονικότητας ανθρώπινων ή από δοκιμασίες σε ζώα διεξήχθη διεξοδική αναζήτηση στη βάση δεδομένων PubMed για άρθρα δημοσιευμένα σε επιστημονικά περιοδικά από την έναρξη της βάσης δεδομένων μέχρι 08 Μαρτίου 2022. Ο αλγόριθμος ο οποίος χρησιμοποιήθηκε είναι ο ακόλουθος: («oregano oil» Ή «oil of *Origanum*» Ή «*Origanum vulgare* extract» Ή «*Origanum vulgare* essential oil» Ή «*Origanum vulgare* oil») ΚΑΙ («carcinogen» Ή «carcinogenicity» Ή «cancer»). Για όλα τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν οι τίτλοι και οι περιλήψεις των μελετών. Πρωταρχικά αποκλείστηκαν από έλεγχο εκείνα τα άρθρα που αφορούν ριγανέλαιο αποκλειστικά προέλευσης εκτός του *Origanum vulgare*. Από εκεί

και πέρα, σε αυτό το στάδιο της αξιολόγησης δε λήφθηκαν υπόψιν μεταξύ των αποτελεσμάτων της αναζήτησης οι εργασίες οι οποίες εμφανίστηκαν και συνδέουν το ριγανέλαιο από το *Origanum vulgare* με τον καρκίνο διερευνώντας την αντικαρκινική δράση του ριγανέλαιου. Αποτελέσματα που αποκλείστηκαν για αυτό το λόγο ενδέχεται να αξιοποιηθούν στη συνέχεια στην αξιολόγηση με την προσέγγιση Βάρους των Αποδείξεων. Τέλος, απορρίφθηκαν μεταξύ των αποτελεσμάτων άρθρα που περιγράφουν τη διεξαγωγή μελετών μεταλλαξιγένεσης και γενοτοξικότητας, παρά τη σύνδεση αυτών με την καρκινογονικότητα, καθώς η εξέταση αυτών περιλαμβάνεται στην αξιολόγηση του τελικού σημείου της μεταλλαξιγένεσης. Αντίστοιχα, αποκλείστηκαν αποτελέσματα που σχετίζονται με τις βιολογικές δράσεις του ριγανέλαιου. Τα ίδια κριτήρια συμπερίληψης/αποκλεισμού εφαρμόστηκαν και κατά την αναζήτηση στη βάση δεδομένων Pubmed επιδημιολογικών στοιχείων καρκινογονικότητας ή αποτελεσμάτων δοκιμασιών καρκινογονικότητας σε πειραματόζωα για τα μεμονωμένα τέσσερα κύρια συστατικά του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare* χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο αναζήτησης: («carvacrol» Ή «thymol» Ή «p-cymene» Ή «γ-terpinene») ΚΑΙ («carcinogen» Ή «carcinogenicity» Ή «cancer»). Ανάμεσα στα αποτελέσματα της αναζήτησης θεωρήθηκαν μη σχετικά και απορρίφθηκαν όσα δεν αφορούν μελέτες για τα συστατικά αυτούσια, αλλά μελέτες μειγμάτων, σύνθετων ουσιών και συμπλόκων που τα περιέχουν.

B.1.3. Ανάλυση QSAR

Η ανάλυση QSAR που έλαβε χώρα με σκοπό τον εντοπισμό στα βασικά συστατικά της σύνθεσης της UVCB ουσίας δομικών χαρακτηριστικών που αποτελούν προειδοποίηση για σύνδεση των ουσιών με καρκινογονικότητα βασίστηκε στο περιεχόμενο του άρθρου ανασκόπησης των Plošnik κ.λπ. (2016).⁴⁹

B.1.4. Εφαρμογή read-across μεθόδου

Για την χρήση της μεθόδου read-across αρχικά έγινε αναζήτηση στον κατάλογο ουσιών του ECHA για τις ουσίες, ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχει αξιολόγηση και ταξινόμηση για το τελικό σημείο της καρκινογονικότητας για κάποια από τις ουσίες ενδιαφέροντος. Από τις καταχωρίσεις που προέκυψαν ως αποτελέσματα της αναζήτησης

εξετάστηκε το περιεχόμενο όσων η περιγραφή της μορφής στην ονομασία τους περιλαμβάνει τους όρους «εκχύλισμα» (extract), «βάμμα» (tincture), και «αιθέριο έλαιο» (essential oil) μαζί με την εναλλακτική απλοποιημένη του ονομασία ως «ελαίου» (oil). Για κάθε περίπτωση όλες οι εναλλακτικές ονομασίες των φυτικών ειδών εισήχθησαν ως όροι αναζήτησης. Ακολούθως διεξήχθησαν αναζητήσεις στη βάση δεδομένων Pubmed για άρθρα δημοσιευμένα σε επιστημονικά περιοδικά από την έναρξη της βάσης δεδομένων μέχρι 25 Μαρτίου 2022, κατά αντιστοιχία με την αναζήτηση για δεδομένα καρκινογονικότητας για το ριγανέλαιο από *Origanum vulgare*, πρώτα για το ριγανέλαιο από το *Thymus capitatus* και έπειτα για το ριγανέλαιο από άλλα είδη *Origanum* πέραν του *Origanum vulgare* με υψηλά ποσοστά καρβακρόλης.

B.1.4.1. Αναζήτηση δεδομένων καρκινογονικότητας σε βάσεις δεδομένων για το ριγανέλαιο από το Thymus capitatus

Στην βάση δεδομένων του ECHA πραγματοποιήθηκε αναζήτηση των όρων «*Thymus capitatus*», «*Coridothymus capitatus*», «*Thymbra capitata*» και «thyme oil». Εφόσον προκύψουν διπλές καταχωρίσεις στο σύνολο των αποτελεσμάτων, αυτές αποκλείονται. Επίσης, δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος του περιεχομένου καταχωρίσεων που αφορούν άλλο είδος *Thymus* πέραν του *Thymus capitatus* ή όσων αφορούν μείγματα αιθέριων ελαίων που περιέχουν το *Thymus capitatus* ως συστατικό.

Ο αλγόριθμος ο οποίος χρησιμοποιήθηκε κατά την αναζήτηση στη βάση δεδομένων Pubmed είναι ο εξής: («*Thymus capitatus* oil» Ή «*Thymus capitatus* essential oil» Ή «*Thymus capitatus* extract» Ή «*Coridothymus capitatus* oil» Ή «*Coridothymus capitatus* essential oil» Ή «*Coridothymus capitatus* extract» Ή «*Thymbra capitata* oil» Ή «*Thymbra capitata* essential oil» Ή «*Thymbra capitata* extract» Ή «thyme oil») ΚΑΙ («carcinogen» Ή «carcinogenicity» Ή «cancer»). Μεταξύ των άρθρων θα θεωρούνταν αποδεκτά αυτά που παρέχουν για το ριγανέλαιο από *Thymus capitatus* ανθρώπινα δεδομένα καρκινογονικότητας ή συμπέρασμα για καρκινογονικότητα μετά από δοκιμή σε ζώα ή άρθρα σύνοψης κανονιστικών αρχών που περιέχουν τη γνώμη ειδικών για το καρκινογόνο δυναμικό της ουσίας. Αποκλείστηκαν άρθρα που με έλεγχο του τίτλου και της περίληψης προκύπτει ότι δεν είναι σχετικά με το σκοπό της παρούσας εργασίας. Επιπλέον κριτήριο απόρριψης άρθρων υπήρξε η εξαγωγή συμπεράσματος που δεν αποτελεί συσχέτιση ή μη της ουσίας με καρκινογονικότητα, αλλά συσχέτιση του

ριγανέλαιου με τον καρκίνο με διαφορετικό τρόπο, για παράδειγμα αναδεικνύοντας την αντικαρκινική του δράση. Απορρίφθηκαν, ακόμη, μεταξύ των καταχωρίσεων άρθρα που αφορούν σε διεξαγωγή μελετών μεταλλαξιγένεσης και γενοτοξικότητας.

*B.1.4.2. Αναζήτηση δεδομένων καρκινογονικότητας σε βάσεις δεδομένων για ριγανέλαιο από είδη *Origanum* πέραν του είδους *Origanum vulgare**

Στην βάση δεδομένων χημικών ουσιών του ECHA έγινε αναζήτηση των όρων «*Origanum*» και «oregano». Διπλές καταχωρίσεις που εμφανίζονται στο σύνολο των αποτελεσμάτων αποκλείονται. Δεν ελέγχθηκαν καταχωρίσεις που η ονομασία τους υποδηλώνει προέλευση του ριγανέλαιου αποκλειστικά από *Origanum vulgare* ή από φυτικό είδος γένους διαφορετικού του *Origanum*, οι καταχωρίσεις για τις οποίες δεν είναι ξεκάθαρο ότι το αναφερόμενο φυτικό είδος έχει τη μορφή ριγανέλαιου και αυτές στις οποίες το ριγανέλαιο είναι συστατικό μείγματος ποικίλων αιθέριων ελαίων. Τέλος, δεν εξετάστηκε το περιεχόμενο καταχωρίσεων για τις οποίες δεν προέκυψαν στοιχεία για τη σύσταση της UVCB ουσίας την οποία αφορούν από τη βιβλιογραφία.

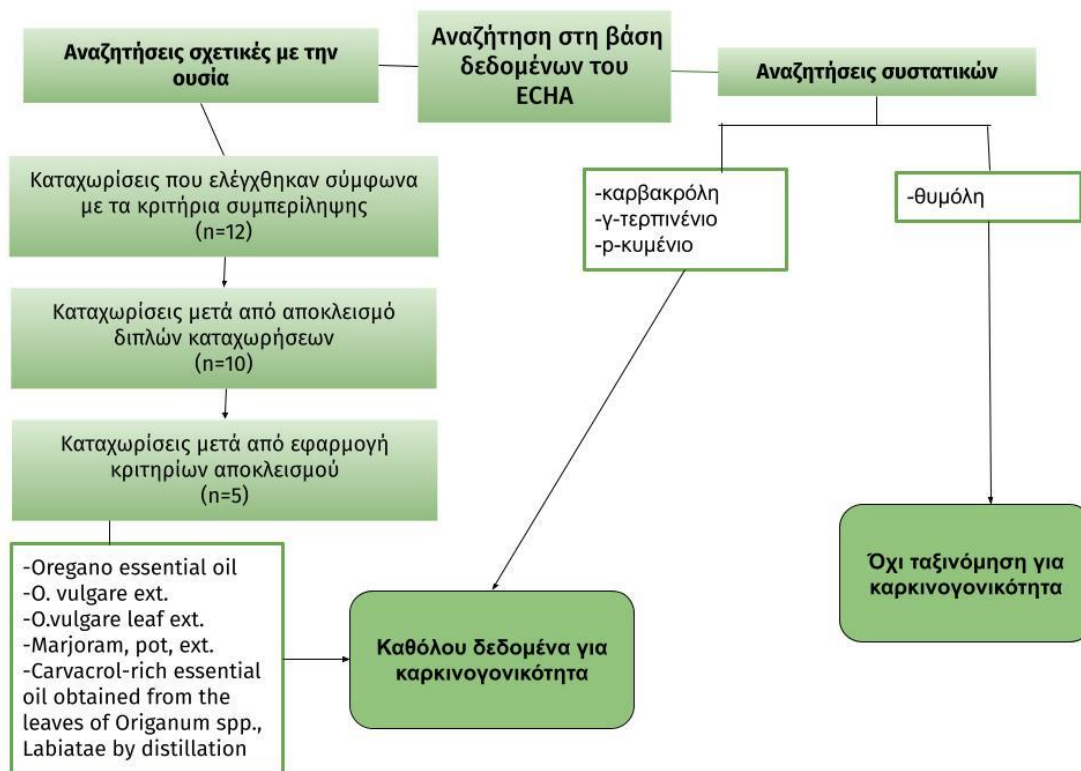
Για την αναζήτηση δεδομένων καρκινογονικότητας ανθρώπινης προέλευσης ή από δοκιμασία σε πειραματόζωα έγινε αναζήτηση στη βάση δεδομένων PubMed για επιστημονικά άρθρα από την έναρξη της βάσης δεδομένων μέχρι 25 Μαρτίου 2022. Ο αλγόριθμος ο οποίος χρησιμοποιήθηκε κατά την αναζήτηση είναι ο εξής: («oregano oil» Ή «oil of *Origanum*» Ή «*Origanum* extract» Ή «*Origanum* essential oil» Ή «*Origanum* oil») ΚΑΙ («carcinogen» Ή «carcinogenicity» Ή «cancer»). Εξετάστηκαν οι τίτλοι και οι περιλήψεις όλων των άρθρων που προέκυψαν ως αποτελέσματα της αναζήτησης. Για να κριθεί ένα άρθρο κατάλληλο για περαιτέρω αξιολόγηση για την καρκινογονικότητα του ριγανέλαιου προερχόμενο από είδος *Origanum* πρέπει να αφορά ανθρώπινα δεδομένα ή συμπέρασμα από αποτελέσματα του τεστ καρκινογονικότητας σε ζώα ή ανασκόπηση επιτροπών κανονιστικών αρχών. Επιπλέον, για την επιλογή των άρθρων απαραίτητο θεωρήθηκε το άρθρο να αναφέρεται σε ριγανέλαιο από τουλάχιστον ένα είδος *Origanum* εκτός του *Origanum vulgare*, το οποίο, σύμφωνα με τα στοιχεία του άρθρου ή της βιβλιογραφίας συνολικά, περιέχει άθροισμα ποσοστών των συστατικών καρβακρόλη, θυμόλη, γ-τερπινένιο και p-κυμένιο στη σύστασή του σε ποσοστό >60%, με ιδιαίτερη έμφαση στο υψηλό ποσοστό της καρβακρόλης. Δεν εξετάστηκαν όσα άρθρα αναφέρονται αποκλειστικά σε ριγανέλαιο από το *Origanum vulgare*.

B.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση

B.2.1. Δεδομένα καρκινογονικότητας στη βάση δεδομένων χημικών ουσιών του ECHA

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την αναζήτηση για ύπαρξη αναφορών έπειτα από εκτίμηση της καρκινογονικότητας στη βάση δεδομένων χημικών ουσιών του ECHA αποτυπώνονται σε διάγραμμα ροής (**Σχήμα B2**). Για καμία από τις σχετικές με την ουσία καταχωρίσεις από όσες ελέγχθηκαν, μετά την εφαρμογή των κριτηρίων αποκλεισμού (βλ. Ενότητα B.1.1.), δεν βρέθηκε αναφορά εκτίμησης τοξικότητας, και συνακόλουθη ταξινόμηση ή μη για το τελικό σημείο της καρκινογονικότητας. Μεταξύ των τεσσάρων βασικών συστατικών, των οποίων οι καταχωρίσεις στη λίστα ουσιών του ECHA ελέγχθηκαν, οι καταχωρούντες δεν παρείχαν δεδομένα και συμπεράσματα εκτίμησης καρκινογονικότητας για την καρβακρόλη, το γ-τερπινένιο και το p-κυμένιο.

Εντούτοις, στο φάκελο καταχώρησης της θυμόλης στον ECHA, ο οποίος μάλιστα έχει υποβληθεί στη διαδικασία αξιολόγησης υπό τον Κανονισμό REACH, φαίνεται να έχει πραγματοποιηθεί εκτίμηση καρκινογονικότητας με βάση μία δοκιμασία σε ποντίκια. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης ήταν αρνητικά για καρκινογονικότητα, οπότε προέκυψε το συμπέρασμα ότι δε δικαιολογείται η ταξινόμηση για αυτή την τάξη κινδύνου. Πρέπει να ληφθεί υπόψιν, ωστόσο, πως δεν παρέχονται αναλυτικά όλες οι πληροφορίες που αφορούν τη διαδικασία της δοκιμασίας, παρά μόνο ορισμένα στοιχεία. Από τα στοιχεία αυτά γίνεται κατανοητό ότι για τη δοκιμασία που διεξήχθη δεν ακολουθήθηκαν πιστά οι κατευθυντήριες οδηγίες του ΟΟΣΑ για τη δοκιμασία καρκινογονικότητας σε ζώα, καθώς σε αυτή περιλήφθηκαν δύο μόνο επίπεδα δόσεων της ουσίας⁵⁰, ενώ το πρωτόκολλο που προτείνει ο ΟΟΣΑ περιλαμβάνει τη χρήση τουλάχιστον τριών επιπέδων δόσεων.¹⁹ Επομένως, στο πλαίσιο εκτίμησης κινδύνου καρκινογονικότητας στην παρούσα εργασία δεν αποδίδεται στα δεδομένα αυτά σημαντικός βαθμός αξιοπιστίας.



Σχήμα Β2: Διάγραμμα ροής της αναζήτησης πληροφοριών καρκινογονικότητας για το ριγανέλαιο από *Origanum vulgare* στη βάση δεδομένων χημικών ουσιών του ECHA

B.2.2. Δεδομένα καρκινογονικότητας από τον άνθρωπο

Από τις αναζητήσεις που έλαβαν χώρα στη βάση δεδομένων Pubmed προέκυψαν 669 μελέτες. Αφού απορρίφθηκαν άρθρα μη σχετικά με το θέμα της παρούσας εργασίας, όπως επίσης κι εκείνα που δε συνάδουν με τα κριτήρια καταλληλότητας που ορίστηκαν προηγουμένως (βλ. Ενότητα B.1.2.), διαπιστώθηκε πως δεν υπάρχουν κλινικές μελέτες, επιδημιολογικές μελέτες ή άλλου είδους δεδομένα για τον άνθρωπο που συνδέουν το ριγανέλαιο από το *Origanum vulgare* ή κάποιο από τα συστατικά του τα οποία περιέχονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο μείγμα μεταβαλλόμενης σύνθεσης με καρκινογένεση (**Σχήμα B3**).

Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς πολύ σπάνια είναι διαθέσιμα ανθρώπινα δεδομένα για πρόκληση καρκινογονικότητας ή άλλου είδους τοξική επίδραση από μία χημική ουσία, παρά τις δυνατότητες αξιοποίησής τους μιας και δεν απαιτούν προσεκτική διαδικασία εξαγωγής συμπεράσματος για άλλο είδος, όπως συμβαίνει με τα δεδομένα από μελέτες σε ζώα.¹²

B.2.3. Δεδομένα καρκινογονικότητας από δοκιμασίες καρκινογονικότητας σε ζώα

Ανάμεσα στις 669 καταχωρήσεις που προέκυψαν από την αναζήτηση με εισαγωγή κατάλληλου αλγόριθμου στη βάση δεδομένων Pubmed, μετά την εφαρμογή των κριτηρίων αποκλεισμού (βλ. Ενότητα B.1.2.) και την απόρριψη μη σχετικών μελετών, δεν υπήρχε καμία μελέτη καρκινογονικότητας σε πειραματόζωα για το ριγανέλαιο από το *Origanum vulgare* ή τα τέσσερα βασικά συστατικά του που συμπεριλήφθηκαν στην αναζήτηση. Τα παραπάνω ευρήματα και η διαδικασία αναζήτησης στη βάση δεδομένων Pubmed απεικονίζονται σε διάγραμμα ροής (**Σχήμα B3**).

Ωστόσο, όπως σημειώθηκε ήδη (βλ. Ενότητα B.2.1.), στο φάκελο καταχώρησης της θυμόλης στον ECHA αναφέρεται για την ουσία η ύπαρξη μιας μελέτης καρκινογονικότητας σε μύες, χωρίς να εμφανίζονται τα πλήρη στοιχεία αυτής. Η θυμόλη δεν προκάλεσε καρκίνο των πνευμόνων σε ποντικούς μετά από ενδοπνευμονική έγχυση, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η θυμόλη δε χρειάζεται ταξινόμηση για την τάξη κινδύνου της καρκινογονικότητας.⁵⁰ Το συμπέρασμα αυτό αντιμετωπίζεται ως χαμηλού βαθμού αξιοπιστίας κατά την παρούσα διαδικασία εκτίμησης της καρκινογονικότητας

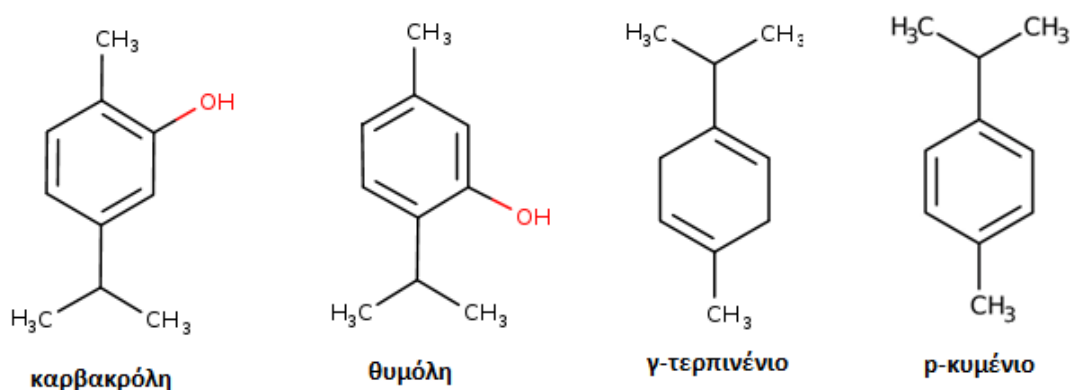
λόγω της μη-συμμόρφωσης της μεθόδου της δοκιμασίας με τις Κατευθυντήριες Οδηγίες του ΟΟΣΑ.



Σχήμα Β3: Διάγραμμα ροής της αναζήτησης δεδομένων καρκινογονικότητας για το ριγανέλαιο από *Origanum vulgare* από τον άνθρωπο ή από δοκιμασίες σε ζώα στη βάση δεδομένων Pubmed

B.2.4. Μελέτη QSAR

Η ανάλυση QSAR που έλαβε χώρα εστίασε στα συστατικά του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare* που το άθροισμά τους συστηματικά αποτελεί >60% του σύνθετου μείγματος, δηλαδή στην καρβακρόλη (2-μεθυλ-5-(προπαν-2-υλ)-φαινόλη), τη θυμόλη (5-μεθυλ-2-(προπαν-2-υλ)-φαινόλη), το γ-τερπινένιο και το p-κυμένιο. Οι τέσσερις αυτές ουσίες, οι οποίες συσχετίζονται μεταβολικά μεταξύ τους, ανήκουν στην ευρεία ομάδα των τερπενοειδών και οι χημικές τους δομές φαίνονται στο **Σχήμα B4**.



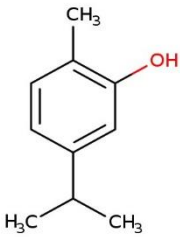
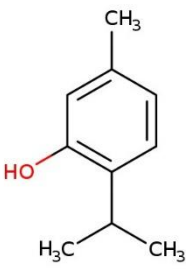
Σχήμα B4: Οι χημικές δομές των καρβακρόλη, θυμόλη, γ-τερπινένιο, p-κυμένιο⁵¹

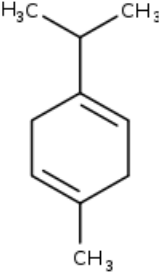
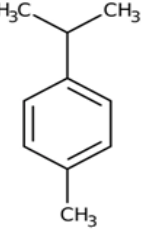
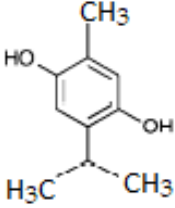
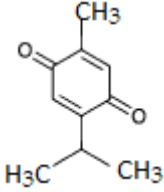
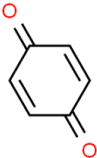
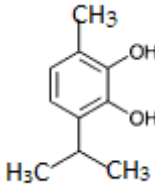
Μετά από αναζήτηση στις χημικές δομές των ουσιών αυτών για δομικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζονται συνολικά στο άρθρο ανασκόπησης των Plošnik κ.λπ. (2016)⁴⁹ και σηματοδοτούν τον κίνδυνο ότι η ένωση που τα περιέχει έχει καρκινογόνο δυναμικό, δεν ταυτοποιήθηκε σε καμία από τις ενώσεις υπό διερεύνηση δομικό χαρακτηριστικό που να προκαλεί ανησυχία για καρκινογονικότητα. Για τη δομή της καρβακρόλης επιβεβαιώνεται από την *in silico* μελέτη με χρήση του λογισμικού πρόβλεψης τοξικότητας Iazar των Fatima κ.λπ. (2022)⁵² ότι πράγματι δεν ενέχει κίνδυνο πρόκλησης καρκινογένεσης.

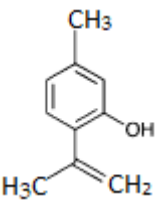
Επιπρόσθετα, εξετάστηκαν ενώσεις οι οποίες φαίνεται ή είναι πιθανόν να αποτελούν προϊόντα μεταβολισμού της θυμόλης στον άνθρωπο σύμφωνα με τη μελέτη των Thalhamer κ.λπ. (2011) για την παρουσία στοιχείων της δομής της που προκαλούν

ανησυχία για καρκινογονικότητα. Αυτός ο έλεγχος αποσκοπεί στο να διερευνηθεί εάν η θυμόλη, και πιθανόν κατ' αντιστοιχία και η ισομερής της καρβακρόλη, δρα ως *έμμεσο καρκινογόνο*, μετά το βιομετασχηματισμό της στον ανθρώπινο οργανισμό. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι ενώσεις: p-κυμενιο-2,5-διόλη και το οξειδωμένο παράγωγό της, p-κυμένιο-2,5-διόνη, p-κυμένιο-2,3-διόλη, και p-κυμένιο-3-ολ-8-ένιο, με το επικρατέστερο προϊόν μεταβολισμού που εντοπίστηκε στα ούρα να είναι η ένωση p-κυμενιο-2,5-διόλη, δηλαδή το δι-υποκατεστημένο παράγωγο μετά από την υδροξυλίωση του αρωματικού συστήματος.⁵³

Ο Πίνακας Β1 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της αναζήτησης δομικών χαρακτηριστικών που προκαλούν ανησυχία για καρκινογονικότητα στις δομές του συνόλου των ουσιών που αναφέρονται παραπάνω.

Χημική ένωση (χημ. δομή/όνομα)	Δομικό χαρακτηριστικό που προκαλεί ανησυχία για καρκινογονικότητα	Σχόλια
 καρβακρόλη	Κανένα	
 θυμόλη	Κανένα	

 <p>γ- τερπινένιο</p>	Κανένα	
 <p>p-κυμένιο</p>	Κανένα	
 <p>p-κυμένιο-2,5-διόλη</p>	Κανένα	
 <p>p-κυμένιο-2,5-διόνη</p>	 <p>1,4- βενζοκινόνη</p>	ηλεκτρονιόφιλος χαρακτήρας, παραγωγή ελευθέρων ριζών
 <p>p-κυμένιο-2,3-διόλη</p>	Κανένα*	

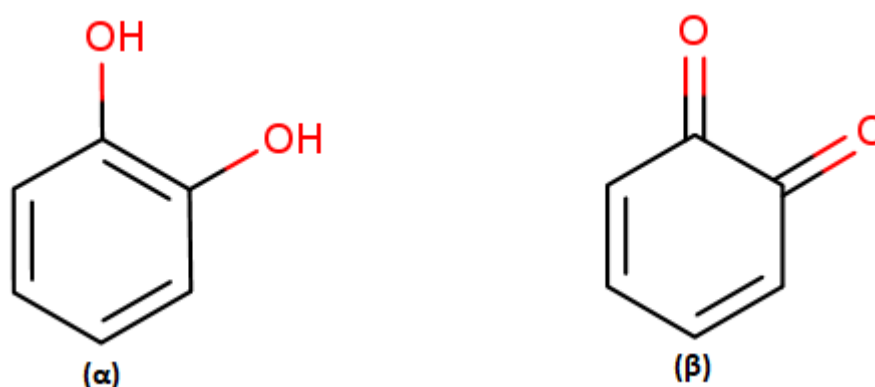
 <p>p-κυμένιο-3-ολ-8-ένιο</p>	<p>Κανένα</p>	
--	---------------	--

Πίνακας Β1: Αποτελέσματα QSAR μελέτης χημικών δομών συστατικών του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare* και μεταβολιτών αυτών

Από τις δομές που εξετάστηκαν το p-κυμένιο-2,5-διόνη είναι το μόνο που περιέχει δομικό χαρακτηριστικό που προκαλεί ανησυχία για καρκινογονικότητα και συγκεκριμένα η δομή της εμπεριέχει τη δομή της 1,4-βενζοκινόνης. Η δομή της 1,4-βενζοκινόνης, που διαθέτει ηλεκτρονιόφιλα καρβονυλικά κέντρα, αποκαλύπτει τον ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα της, εξαιτίας του οποίου μεταβάλλει τη δομή του DNA συνδεδεμένη με ομοιοπολικό τρόπο με αυτό, και συνάμα οξειδωτικές ιδιότητες, εξαιτίας των οποίων δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες.^{54,55} Σε αυτές τις ιδιότητες της δομής της 1,4-βενζοκινόνης αποδίδεται το καρκινογόνο δυναμικό της αλλά και των ενώσεων των οποίων η δομή τους την περιέχει. Η ένωση p-κυμένιο-2,5-διόνη προκύπτει από οξείδωση της ένωσης p-κυμένιο-2,5-διόλη, το βασικό μεταβολίτη της θυμόλης που απαντάται στα ούρα στον άνθρωπο (αλλά κατά αντιστοιχία και της καρβακρόλης ως οπτικού της ισομερούς), στις συνθήκες του ανθρώπινου σώματος.⁵³ Η παρουσία του p-κυμένιου-2,5-διόλη σε αφθονία στα ούρα και η οξείδωση του προς την ένωση p-κυμένιο-2,5-διόνη, η οποία περιλαμβάνει στη δομή της δομικό χαρακτηριστικό που προκαλεί ανησυχία για δυνατότητα της ένωσης να προκαλέσει καρκίνο, λαμβάνεται υπόψιν στην παρούσα διαδικασία χαρακτηρισμού κινδύνου καρκινογονικότητας του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare*. Τα επίπεδα των ενώσεων στο πλάσμα ενδέχεται να διαφοροποιούνται και να είναι λόγω κάθαρσης των ουσιών μέσω των ούρων πολύ χαμηλότερα εκεί, οπότε υπάρχει η επιφύλαξη πως η έκθεση της εν δυνάμει καρκινογόνους μεταβολίτες της θυμόλης και της καρβακρόλης είναι στην πραγματικότητα μικρή.

Ακόμη, παρατηρείται πως στη δομή του μεταβολίτη της θυμόλης, p-κυμένιο-2,3-διόλη (ή κυμοπυροκατεχόλη), που βρέθηκε στα ανθρώπινα ούρα, εμπεριέχεται η δομή

της πυροκατεχόλης (**Σχήμα B5(α)**), η οποία έχει ταξινομηθεί για την Ευρωπαϊκή Ένωση ως καρκινογόνο Κατ. 1B, δηλαδή ως πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο. Το καρκινογόνο δυναμικό της πυροκατεχόλης οφείλεται στην οξείδωση προς 1,2-βενζοκινόνη (**Σχήμα B5(β)**), η δομή της οποίας περιλαμβάνεται μεταξύ των δομικών χαρακτηριστικών που αναφέρουν οι Plošnik κ.λπ. (2016) ότι η παρουσία της στις ενώσεις προκαλεί ανησυχία για καρκινογονικότητα.⁴⁹ Το γεγονός ότι εμπεριέχεται στη δομή ενός από τους μεταβολίτες της θυμόλης, κύριου συστατικού του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare* -και κατ' επέκταση και στον αντίστοιχο μεταβολίτη της καρβακρόλης, η οποία περιέχεται σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό στη σύνθεση της υπό μελέτη ουσίας- η δομή ουσίας που έχει εναρμονισμένη ταξινόμηση ως καρκινογόνο και μάλιστα Κατηγορίας 1B, οδηγεί σε ταξινόμηση και του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare* για την τάξη κινδύνου της Καρκινογονικότητας τουλάχιστον για την *per os* έκθεση, ειδικά από τη στιγμή που ο μηχανισμός καρκινογονικότητας της πυροκατεχόλης δεν είναι γενικός, για παράδειγμα μέσω φλεγμονής, αλλά εξειδικευμένος και πολύπλοκος. Συγκεκριμένα, φαίνεται να περιλαμβάνεται η παραγωγή οξειδωτικού στρες, η μεθυλίωση του DNA και η αύξηση του πολλαπλασιασμού κυττάρων του στομάχου, αλλά και, συμπληρωματικά ο ερεθισμός των κυττάρων του στομάχου.⁵⁶ Βέβαια, αναμένεται διερεύνηση της συγκέντρωσής του στο πλάσμα για να διασαφηνιστεί η βαρύτητα που αποδίδεται στο στοιχείο αυτό κατά την εκτίμηση της καρκινογονικότητας του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare*.



Σχήμα B5: (α) δομή της πυροκατεχόλης (β) δομή της 1,2-βενζοκινόνης⁵¹

B.2.5. Εφαρμογή μεθόδου read-across

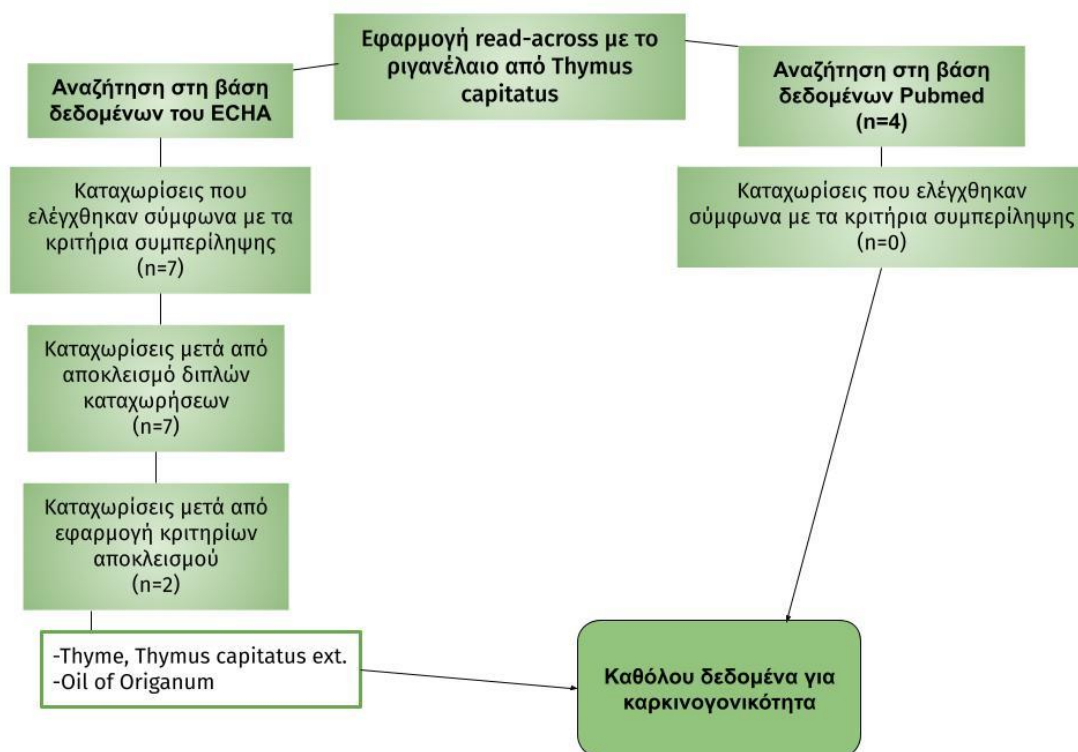
Για την εφαρμογή της αναλογικής μεθόδου read-across επιλέχθηκαν να εξεταστούν ως προς τα δεδομένα καρκινογονικότητας UVCB ουσίες με αντίστοιχη σύσταση, δηλαδή ουσίες μεταβαλλόμενης σύστασης που περιέχουν στη σύνθεσή τους τα ίδια επικρατή συστατικά, καρβακρόλη, θυμόλη, γ-τερπινένιο και p-κυμένιο, ή συστατικά παρόμοιας χημικής δομής σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις με το ριγανέλαιο από το *Origanum vulgare*, που είναι επίσης UVCB ουσία. Συμπεράσματα και ευρήματα για τις ουσίες αυτές, λόγω δομικής αναλογίας, μπορούν να επεκταθούν και για την υπό εξέταση ουσία. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η μέθοδος read-across εφαρμόστηκε αφενός για το ριγανέλαιο από το *Thymus capitatus*, και αφετέρου και για το ριγανέλαιο από άλλα είδη *Origanum* με υψηλή τιμή αθροίσματος των ποσοστών των τεσσάρων βασικών συστατικών του αιθέριου ελαίου του *Origanum vulgare*.

B.2.5.1. Read-across με βάση το ριγανέλαιο από το *Thymus capitatus*

Μετά από εισαγωγή προς αναζήτηση όλων των σχετικών όρων που αντιστοιχούν σε εναλλακτικές ονομασίες του *Thymus capitatus* ή του αιθέριου ελαίου του στον κατάλογο ουσιών του ECHA προέκυψαν 7 καταχωρίσεις. Καμία καταχώριση δεν εμφανίστηκε περισσότερες από μία φορές. Μετά από εφαρμογή των κριτηρίων αποκλεισμού που ορίστηκαν (βλ. Ενότητα B.1.4.1.), εξετάστηκαν 2 καταχωρίσεις για την πιθανή ύπαρξη δεδομένων καρκινογονικότητας για την ουσία ως μέρος αξιολόγησης της τοξικότητάς της. Σε καμία από αυτές δεν παρέχονται στοιχεία/ταξινόμηση για καρκινογονικότητα. Τα αποτελέσματα της αναζήτησης παρουσιάζονται σε διάγραμμα ροής (**Σχήμα B6**).

Ακολούθως, πραγματοποιώντας αναζήτηση με εφαρμογή του κατάλληλου αλγόριθμου στη βάση δεδομένων Pubmed προέκυψαν 4 καταχωρίσεις. Εξετάζοντας τους τίτλους και τις περιλήψεις των άρθρων που εμφανίστηκαν ως αποτελέσματα της αναζήτησης και εφαρμόζοντας κατόπιν τα κριτήρια επιλογής και αποκλεισμού που ορίστηκαν εξ αρχής (βλ. Ενότητα B.1.4.1), κανένα από τα άρθρα που αποτελούν αποτελέσματα της αναζήτησης δεν παρέχει δεδομένα καρκινογονικότητας για το ριγανέλαιο από *Thymus capitatus* είτε από τον άνθρωπο είτε από πειραματόζωα. Κατά συνέπεια, δεν υπάρχουν στοιχεία και συμπεράσματα για καρκινογονικότητα που θα

μπορούσαν με τη μέθοδο read-across να επεκταθούν και για το ριγανέλαιο από το *Origanum vulgare* (Σχήμα Β6).



Σχήμα Β6: Διάγραμμα ροής της αναζήτησης δεδομένων καρκινογονικότητας για το ριγανέλαιο από *Thymus capitatus* από τον άνθρωπο ή από δοκιμασίες σε ζώα στη βάση δεδομένων Pubmed και στη βάση δεδομένων χημικών ουσιών του ECHA

B.2.5.2. Read-across με βάση το ριγανέλαιο από είδη *Origanum* πέραν του *Origanum vulgare*

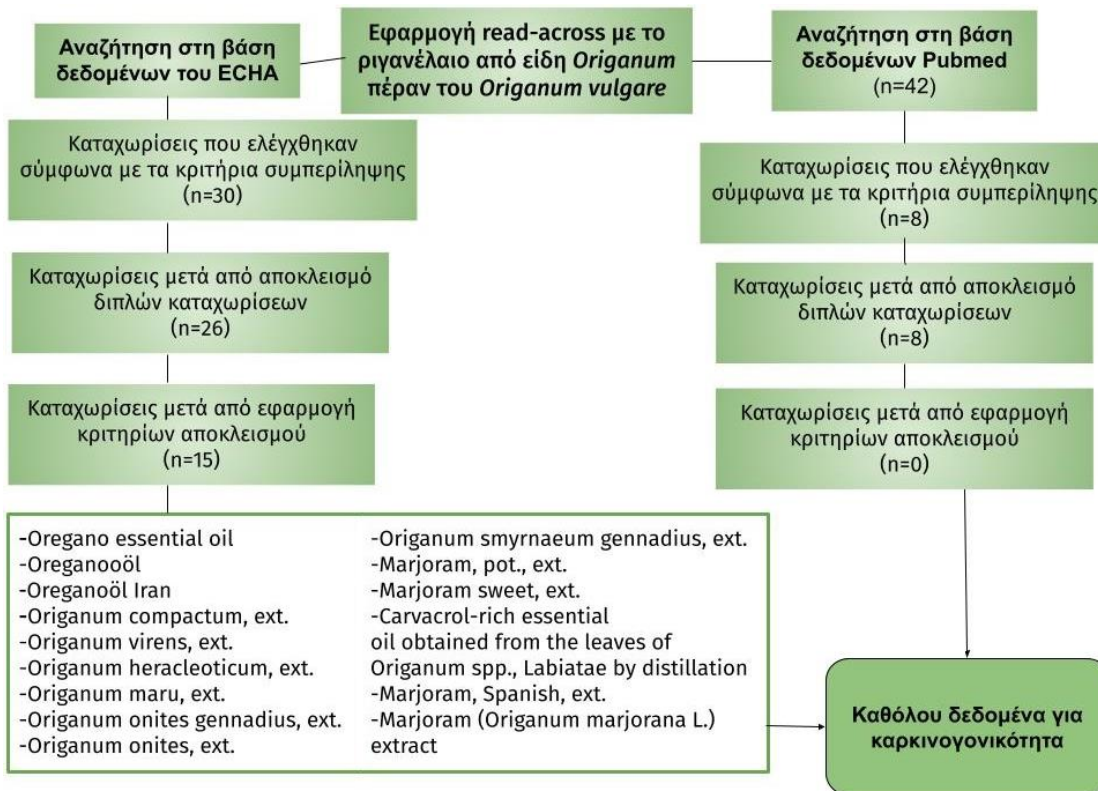
Από την αναζήτηση των όρων που επιλέχθηκαν στη βάση δεδομένων του ECHA προέκυψαν συνολικά 30 καταχωρίσεις. Μετά από αφαίρεση καταχωρίσεων που προέκυψαν δύο φορές απομένουν για έλεγχο 26 αποτελέσματα. Εφαρμόζοντας, εν συνεχεία, τα κριτήρια αποκλεισμού που ορίστηκαν (βλ. Ενότητα B.1.4.2.) έμειναν 19 καταχωρίσεις προς αρχική εξέταση με βάση στοιχεία της επιστημονικής βιβλιογραφίας, ώστε να συνάδουν με την προϋπόθεση η σύσταση να αποτελείται από υψηλό ποσοστό των επικρατών συστατικών στο *Origanum vulgare*. Με γνώμονα το υψηλό άθροισμα ποσοστών των συστατικών ενδιαφέροντος (>60%) εξετάστηκε το περιεχόμενο 15 καταχωρίσεων της βάσης δεδομένων ουσιών του ECHA για την ύπαρξη ταξινόμησης ή άλλων πληροφοριών σχετικά με το τελικό σημείο της καρκινογονικότητας, που κατά αναλογία, λόγω αντίστοιχης σύστασης, θα μπορούσαν να επεκταθούν για την εξαγωγή συμπεράσματος και για το ριγανέλαιο από *Origanum vulgare*.

Κατά την αναζήτηση στη βάση δεδομένων χημικών ουσιών του ECHA το περιεχόμενο των καταχωρίσεων που αφορούν ριγανέλαιο από το *Origanum marjorana* διερευνήθηκε με επιφύλαξη, λόγω της ύπαρξης φυτών με δύο διαφορετικούς χημειότυπους, από τους οποίους ο ένας χημειότυπος με γεωγραφική κατανομή αποκλειστικά στην Τουρκία εμφανίζει πολύ υψηλά ποσοστά καρβακρόλης, ενώ ο δεύτερος, ο οποίος έχει ευρύτερη γεωγραφική κατανομή στη Μεσόγειο και αλλού, δεν περιλαμβάνει καθόλου καρβακρόλη στη σύσταση του αιθέριου ελαίου.^{37,57,58} Παρομοίως, κατά τον έλεγχο των καταχωρίσεων για το ριγανέλαιο από *Origanum onites* λήφθηκε υπόψιν πως υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση της σύστασής του ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή στην οποία φύτευται το φυτό, καθώς κάποιες φορές ενδέχεται η θυμόλη να επικρατεί σε υψηλά ποσοστά της σύστασης του αιθέριου ελαίου και ταυτόχρονα η καρβακρόλη να απαντάται σε πολύ μικρά ποσοστά^{59,60}, ενώ σε φυτά από διαφορετικές περιοχές η καρβακρόλη να εμφανίζεται σε ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά στη σύσταση του ριγανέλαιου με εύρος, κατά προσέγγιση, 54%-71%.^{28,61} Αντίστοιχες διαφοροποιήσεις της σύστασης παρουσιάζει και το αιθέριο έλαιο του *Origanum compactum*^{42,62}, γεγονός που οδηγεί σε επιφυλακτική επέκταση τοξικολογικών στοιχείων καρκινογονικότητας, τα οποία ενδεχομένως να περιλαμβάνονται στην καταχώριση της ουσίας στη βάση δεδομένων του ECHA, και για το ριγανέλαιο από το *Origanum vulgare*.

Μετά από διεξοδικό έλεγχο διαπιστώθηκε πως για καμία από τις καταχωρίσεις των UVCB ουσιών των οποίων το περιεχόμενο εξετάστηκε δεν παρέχονται τοξικολογικά στοιχεία ή αξιολόγηση για καρκινογονικότητα, ενώ η αιτιολογία μη ταξινόμησης για το συγκεκριμένο τελικό σημείο σε όλες τις περιπτώσεις είναι η «έλλειψη δεδομένων».

Στη συνέχεια, εισήχθη στη βάση δεδομένων Pubmed ο κατάλληλος αλγόριθμος αναζήτησης που ορίστηκε και προέκυψαν αρχικά 42 αποτελέσματα. Από αυτά, λόγω της προϋπόθεσης τα άρθρα να αναφέρονται σε ριγανέλαιο από τουλάχιστον ένα είδος *Origanum* πέραν του *Origanum vulgare* με γνωστή σύσταση, ελέγχθηκε το περιεχόμενο 8 άρθρων για την ύπαρξη στοιχείων σχετικά με τη σύνδεση ή μη του ριγανέλαιου από τα είδη *Origanum* με καρκινογονικότητα. Καμία εργασία δεν εμφανίστηκε ανάμεσα στα αποτελέσματα της αναζήτησης περισσότερες από μία φορές. Έπειτα ελέγχθηκε το περιεχόμενο των 8 αυτών εργασιών εφαρμόζοντας τα κριτήρια αποκλεισμού άρθρων (βλ. Ενότητα B.1.4.2.). Τελικά κανένα από τα άρθρα δεν κρίνεται σχετικό με το σκοπό της παρούσας εργασίας, καθώς δεν παρουσιάζουν συμπεράσματα από ανθρώπινα δεδομένα ή δοκιμασίες σε ζώα για την περίπτωση το ριγανέλαιο από κάποιο είδος *Origanum* να έχει καρκινογόνο δυναμικό, ώστε να επεκταθούν, χάρη στην προσέγγιση read-across, και για το ριγανέλαιο από *Origanum vulgare*.

Στο διάγραμμα που παρουσιάζεται στο **Σχήμα B7** φαίνεται ότι, πραγματικά, τόσο η αναζήτηση στη βάση δεδομένων χημικών ουσιών του ECHA όσο και η αναζήτηση στη βάση δεδομένων Pubmed χρησιμοποιώντας κατάλληλους αλγόριθμους αναζήτησης δεν οδηγεί σε δεδομένα για καρκινογονικότητα για το ριγανέλαιο κάποιου άλλου είδους *Origanum* που στη συνέχεια θα μπορούσαν με εφαρμογή της μεθόδου read-across να επεκταθούν, λόγω αντίστοιχης σύστασης των UVCB ουσιών, και για την ουσία υπό διερεύνηση, δηλαδή για το ριγανέλαιο από *Origanum vulgare*.



Σχήμα Β6: Διάγραμμα ροής της αναζήτησης δεδομένων καρκινογονικότητας για το ριγανέλαιο από είδη *Origanum* πέραν του *Origanum vulgare* στη βάση δεδομένων χημικών ουσιών του ECHA και δεδομένα καρκινογονικότητας από τον άνθρωπο ή από δοκιμασίες σε ζώα στη βάση δεδομένων Pubmed

B.2.6. Μεταλλαξιγόνος δράση

Μετά από εκτίμηση της μεταλλαξιγένεσης του ριγανέλαιου ποικίλης προέλευσης αξιοποιώντας διαθέσιμα πειραματικά στοιχεία από δημοσιευμένες εργασίες στο πλαίσιο εκπόνησης μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας φαίνεται πως το ριγανέλαιο υψηλής περιεκτικότητας σε καρβακρόλη δεν ταξινομείται για αυτή την τάξη κινδύνου.⁶³ Στην περίπτωση που προέκυπτε από τις διαθέσιμες *in vivo* και *in vitro* μελέτες μεταλλαξιγένεσης ότι η ουσία εμφανίζει μεταλλαξιγόνο δράση και μάλιστα πως την ασκεί μέσω γενετοξικού μηχανισμού, τότε θα αντιμετωπιζόταν και ως καρκινογόνος και θα ακολουθούσε η αντίστοιχη ταξινόμηση, λαμβάνοντας υπόψιν και τα υπόλοιπα στοιχεία κατά την εφαρμογή της προσέγγισης Βάρους των Αποδείξεων για τον προσδιορισμό του καρκινογόνου δυναμικού.⁶⁴

B.2.7. Αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση

Κατά τις αναζητήσεις στη βάση δεδομένων Pubmed για τοξικολογικά στοιχεία που συσχετίζουν ή όχι το ριγανέλαιο από *Origanum vulgare* ή τα τέσσερα συστατικά που επικρατούν στη σύστασή του με καρκινογονικότητα, χρησιμοποιώντας κατάλληλους αλγόριθμους αναζήτησης, παρόλο που δεν εμφανίστηκαν άρθρα που παρέχουν άμεσα τις πληροφορίες αυτές, προέκυψε, ωστόσο, μεταξύ των αποτελεσμάτων ένα μεγάλο σώμα άρθρων τα οποία παρουσιάζουν συμπεράσματα από *in vitro* μελέτες για την αντιοξειδωτική ικανότητα⁶⁵⁻⁶⁷ και την αντικαρκινική δραστηριότητα της εν λόγω ουσίας ή των τεσσάρων βασικών συστατικών τους. Στον **Πίνακα Β2** παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα από ορισμένες μόνο εργασίες, μεταξύ της πληθώρας που έχουν δημοσιευτεί, οι οποίες αφορούν την *in vitro* επίδραση του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare* ή από ένα από τα τέσσερα βασικά συστατικά του σε διαφορετικούς τύπους καρκινικών κυτταρικών σειρών.

Ουσία	Τύπος καρκινικής σειράς	Αποτέλεσμα	Πηγή
αιθ. έλαιο από <i>O. vulgare</i> 0.0037%	ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες BioMAP HDF3CGF	επέμβαση στον κυτ. κύκλο	Han κ.λπ. (2017)
αιθ. έλαιο από <i>O. vulgare</i> 0.005%	ανθρώπινη καρκινική κυτ. σειρά στομάχου	απόπτωση, αναστολή λιπογένεσης, αναστολή μετάστασης	Balusamy κ.λπ. (2018)

καρβακρόλη 400-1000 μ M	ανθρώπινα κύτταρα γλοιοβλαστώματος DBTRG-05MG	απόπτωση	Liang κ.λπ. (2012)
καρβακρόλη 100 nM-100 μ M	ανθρώπινες καρκινικές κυτ. σειρές: -υποφαρυγγικό καρκίνωμα (FaDu) -ερυθροειδής λευχαιμία (K562) -καρκίνωμα πνευμόνων (A549)	διακοπή κυτ. κύκλου στη φάση G2/M, αναστολή ενζύμων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση	Fatima κ.λπ. (2022)
καρβακρόλη 0-250 μ M	ανθρώπινη καρκινική κυτ. σειρά μαστού MCF-7	διακοπή κυτ. κύκλου στη φάση G0/G1, απόπτωση	Mari κ.λπ. (2020)
θυμόλη 0-100 μ M	ανθρώπινες καρκινικές κυτ. σειρές ουροδόχου κύστης T24, SW780, J82	διακοπή κυτ. κύκλου στη φάση G2/M, απόπτωση	Li κ.λπ. (2017)
θυμόλη 25-200 μ M	ανθρώπινη κυτ. σειρά μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα A549	διακοπή κυτ. κύκλου στη φάση G0/G1, απόπτωση	Balan κ.λπ. (2020)
καρβακρόλη+θυμόλη 0-100 μ M	ανθρώπινες μυελοειδείς λευχαιμικές κυτ. σειρές K562, HL60, KG1	απόπτωση	Bouhtit κ.λπ. (2021)

Πίνακας B2: *In vitro* επίδραση του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare* και των βασικών συστατικών του, καρβακρόλη και θυμόλη, σε διάφορους τύπους καρκινικών κυτταρικών σειρών

Το γεγονός ότι το αιθέριο έλαιο του *Origanum vulgare* διαθέτει την ικανότητα να αναχαιτίζει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων διαφόρων τύπων *in vitro*, όπως φαίνεται μέσα από μία σειρά εργασιών, καθιστά σε πρώτη ανάγνωση αμφίβολο, λόγω αντίφασης, να έχει συγχρόνως καρκινογόνο δυναμικό. Στο ίδιο συμπέρασμα συνηγορεί και η αντιοξειδωτική του δραστηριότητα. Σύμφωνα με την επιστημονική βιβλιογραφία τα αντιοξειδωτικά έχουν τη δυνατότητα να ενισχύουν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA που οφείλονται σε οξειδωτικό στρες και συσσωρευτικά μπορούν να οδηγήσουν σε μεταλλαξιγένεση και, ακολούθως, σε καρκινογένεση.^{68,69}

Οι δημοσιευμένες εργασίες που στοχεύουν στην ανάδειξη της αντικαρκινικής δράσης του ριγανέλαιου από το *Origanum vulgare* αλλά και των βασικών συστατικών του κατορθώνουν να δείξουν πως, πραγματικά, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο⁷⁰⁻⁷³ τόσο η

UVCB ουσία όσο και τα μεμονωμένα συστατικά καρβακρόλη και θυμόλη, αλλά και ο συνδυασμός των δύο αυτών ουσιών ασκούν *in vitro* κυτταροτοξική δράση σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές διαφορετικών τύπων. Μάλιστα, επιχειρώντας να διευκρινίσουν τους μηχανισμούς με τους οποίους ασκείται η αντικαρκινική δράση με παρακολούθηση της διακύμανσης αρκετών σχετικών βιοδεικτών καταλήγουν στο συμπέρασμα πως λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα ποικίλοι μηχανισμοί. Πιο συχνά φαίνεται να επέρχεται απόπτωση των κυττάρων⁷¹⁻⁷⁶ ή σταματά ο κυτταρικός κύκλος σε διαφορετικές φάσεις^{52,72-74}, ενώ *in vitro* μελέτη περιγράφει τη δυνατότητα της καρβακρόλης να αναστέλλει ένζυμα που προωθούν την καρκινογένεση.⁵²

Ωστόσο, οι εν λόγω μελέτες αφορούν σε ορισμένο εύρος δόσεων των ουσιών, ενώ υψηλότερες δόσεις, οι οποίες ενδεχομένως να επέφεραν μη-δοσοεξαρτώμενη επίδραση στα κύτταρα, σπάνια περιλαμβάνονται. Λαμβάνεται υπόψιν πως χημικές ουσίες οι οποίες έχουν καρκινογόνο δυναμικό ή προκαλούν οξείδωση, σε πολύ χαμηλά επίπεδα δόσεων έκθεσης εμφανίζουν λόγω όρμησης αντικαρκινική και αντιοξειδωτική δράση αντίστοιχα. Το φαινόμενο προκύπτει λόγω συμμετοχής των χημικών ουσιών στον ομοιοστατικό μηχανισμό του οργανισμού που αφορά τις ελεύθερες ρίζες και αποτελεί εκδήλωση της πλαστικότητας των βιολογικών συστημάτων.⁷⁷ Συνεπώς, η *in vitro* αντιοξειδωτική δραστηριότητα και η *in vitro* αντικαρκινική δραστηριότητα μπορεί να συνδέονται με όμοιες επιδράσεις *in vivo* σε αντίστοιχες δόσεις έκθεσης, αλλά δεν αποκλείουν, και μάλιστα μπορεί και να υποδηλώνουν, την άσκηση της αντίστροφης δράσης σε υψηλότερα επίπεδα δόσεων.

B.2.8. Ερεθιστική δράση – Υπόθεση γαστρίνης

Στοιχείο εκτίμησης της ύπαρξης καρκινογόνου δυναμικού με την προσέγγιση Βάρους των Αποδείξεων μπορεί να αποτελέσει και η εξέταση για πιθανή ερεθιστική δράση του ριγανέλαιου από το *Origanum vulgare*. Η απάντηση στο ερώτημα σχετικά με το χαρακτηρισμό ως ερεθιστικής ή μη μίας ουσίας ονομάζεται *υπόθεση γαστρίνης*, και συνδράμει στην εξαγωγή συμπεράσματος για τη δυνατότητα πρόκλησης καρκίνου συγκεκριμένα στο στομάχι, καθώς ο επαναλαμβανόμενος ερεθισμός κυττάρων του βλεννογόνου μπορεί να οδηγήσει σταδιακά σε υπερπλασία και τελικά στο σχηματισμό όγκου.^{78,79}

Η διαπίστωση της ερεθιστικής ή μη δράσης συντελέστηκε σύμφωνα με τις Οδηγίες του ECHA για Εφαρμογή των Κριτηρίων CLP (2017)⁷⁹ για την εκτίμηση του τελικού σημείου ερεθισμού/διάβρωσης του δέρματος. Δεδομένου ότι το ριγανέλαιο από το *Origanum vulgare* είναι UVCB ουσία, αποτελεί στην πραγματικότητα μείγμα πολλών συστατικών μεταβαλλόμενης περιεκτικότητας. Το γεγονός ότι η υπό εξέταση ουσία χαρακτηρίζεται ως «ριγανέλαιο» συνεπάγεται πως η σύστασή της έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως άθροισμα του ποσοστού των συστατικών καρβακρόλη, θυμόλη, γ-τερπινένιο και p-κυμένιο σε υψηλό ποσοστό, συνήθως μεγαλύτερο του 60%, με την καρβακρόλη να απαντάται στο υψηλότερο ποσοστό και όλα να βρίσκονται σε ποσοστό >1%. Η πληροφορία αυτή για τη σύσταση του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare* επιτρέπει την εξαγωγή συμπεράσματος για την ουσία, εφόσον υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για τα συστατικά αυτά, με βάση την προσθετική ιδιότητα. Πιο συγκεκριμένα, η UVCB ουσία περιέχει σε ποσοστό αρκετά μεγαλύτερο του >10% την καρβακρόλη που ταξινομείται ως Ερεθιστικό του Δέρματος Κατηγορία 2 (ταυτόχρονα έχουν κοινοποιηθεί από αρκετούς καταχωρούντες και τα γ-τερπινένιο και p-κυμένιο ως Ερεθιστικά του Δέρματος Κατηγορία 2), ενώ η θυμόλη, η οποία περιέχεται σε ποσοστό >1% και πιθανόν ≤5% στη σύσταση, ταξινομείται ως Διαβρωτικό του Δέρματος Κατηγορία 1B. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα για μεμονωμένα συστατικά του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare* μπορεί να χαρακτηριστεί ως ερεθιστικό του δέρματος (Κατηγορία 2) χωρίς να απαιτείται η διενέργεια επιπλέον δοκιμών για το ίδιο ως μείγμα, επιβεβαιώνοντας την υπόθεση γαστρίνης.

B.3. Συμπεράσματα

Συνολικά, τα δεδομένα που λαμβάνονται υπόψιν για την εκτίμηση της καρκινογονικότητας για το ριγανέλαιο από *Origanum vulgare* με βάση το διάγραμμα ροής που σχεδιάστηκε εξ αρχής (Σχήμα B1) εφαρμόζοντας την προσέγγιση Βάρους των Αποδείξεων συνοψίζονται στον Πίνακα B3.

Στοιχείο εκτίμησης καρκινογονικότητας	
Δεδομένα καρκινογονικότητας στη βάση δεδομένων του ECHA	<ul style="list-style-type: none">• Καθόλου δεδομένα καρκινογονικότητας για το ριγανέλαιο του <i>O. vulgare</i>, την καρβακρόλη, το p-cymene και το γ-τερπινένιο• Θυμόλη: δεν ταξινομείται για την τάξη κινδύνου της Καρκινογονικότητας
Δεδομένα καρκινογονικότητας από τον άνθρωπο	Καθόλου δεδομένα καρκινογονικότητας για το ριγανέλαιο του <i>O. vulgare</i> και για καρβακρόλη, θυμόλη, p-κυμένιο και γ-τερπινένιο
Δεδομένα καρκινογονικότητας από δοκιμασίες καρκινογονικότητας σε ζώα	Καθόλου δεδομένα καρκινογονικότητας για το ριγανέλαιο του <i>O. vulgare</i> και για καρβακρόλη, θυμόλη, p-κυμένιο και γ-τερπινένιο
Μελέτη QSAR	<ul style="list-style-type: none">• <u>p-κυμένιο-2,5-διόνη</u> (προϊόν οξειδωσης της p-κυμένιο-2,5-διόλης, του βασικού μεταβολίτη της θυμόλης στα ούρα του ανθρώπου): περιέχει τη δομή της βενζοκινόνης –δομικό χαρακτηριστικό που προκαλεί ανησυχία για καρκινογόνο δράση της ουσίας• <u>p-κυμένιο-2,3-διόλη</u> (μεταβολίτης της θυμόλης, σε ίχνη στα ούρα του ανθρώπου): περιέχει τη δομή της πυροκατεχόλης -καρκινογόνο Κατ. 1B
Read-across με βάση το ριγανέλαιο από το <i>Thymus capitatus</i>	Καθόλου δεδομένα καρκινογονικότητας για το ριγανέλαιο από το <i>Thymus capitatus</i>
Read-across με βάση το ριγανέλαιο από είδη <i>Origanum</i> πέραν του <i>O. vulgare</i>	Καθόλου δεδομένα καρκινογονικότητας για το ριγανέλαιο από είδη <i>Origanum</i> πέραν του <i>O. vulgare</i>

<i>Μεταλλαξιγόνος δράση</i>	Δεν έχει μεταλλαξιγόνο δράση
<i>Αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση</i>	<i>in vitro</i> αντιοξειδωτική δράση και κυτταροτοξική έναντι ποικίλων ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών δράση ριγανέλαιου από <i>O. vulgare</i> , καρβακρόλης, θυμόλης, p-κυμένιου και γ-τερπινένιου
<i>Ερεθιστική δράση – Υπόθεση γαστρίνης</i>	Ερεθιστικό δέρματος Κατ. 2

Πίνακας Β3: Συνόψιση των πληροφοριών προς εκτίμηση της καρκινογονικότητας για το ριγανέλαιο από *Origanum vulgare* με την προσέγγιση Βάρους των Αποδείξεων

Παρατηρείται ότι μέχρι τώρα δεν υπάρχουν δεδομένα για καρκινογονικότητα για το ριγανέλαιο από *Origanum vulgare* ή ένα από τα βασικά συστατικά του (καρβακρόλη, θυμόλη, p-κυμένιο, γ-τερπινένιο) από τον άνθρωπο ή, προτιμότερα, από δοκιμασία καρκινογονικότητας σε πειραματόζωα, που, με την προϋπόθεση ότι είχε διεξαχθεί σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του ΟΟΣΑ και τις πρακτικές Καλής Εργαστηριακής Πρακτικής, θα αξιολογούνταν ως η βασική μελέτη (key study) στην οποία θα μπορούσε να αποδοθεί μεγάλη βαρύτητα ώστε να συναχθεί συμπέρασμα. Μόνο για τη θυμόλη στη βάση δεδομένων χημικών ουσιών του ECHA απαντάται εκτίμηση καρκινογονικότητας με βάση μελέτη καρκινογονικότητας σε ζώα. Σύμφωνα με τα ανοιχτά για το κοινό δεδομένα αυτή αποκλίνει από τις Κατευθυντήριες Οδηγίες του ΟΟΣΑ στον τρόπο διεξαγωγής της δοκιμασίας και τα αποτελέσματά της οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η θυμόλη δεν ταξινομείται για καρκινογονικότητα. Ομοίως, απουσιάζουν δεδομένα καρκινογονικότητας για το ριγανέλαιο από το *Thymus capitatus* και από άλλα είδη *Origanum*, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατόν να εφαρμοστεί επιτυχημένο read-across, ώστε να συναχθεί συμπέρασμα για την καρκινογονικότητα του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare*.

Κατά ανάλυση QSAR που πραγματοποιήθηκε δεν ταυτοποιήθηκαν στις δομές των τεσσάρων βασικών συστατικών της UVCB ουσίας δομικά χαρακτηριστικά που προκαλούν ανησυχία για καρκινογονικότητα, συνεπώς δεν υπάρχουν ενδείξεις πως η ουσία δρα σαν άμεσο καρκινογόνο. Εξετάστηκαν, ωστόσο, και δομές μεταβολιτών της θυμόλης που συναντώνται στα ούρα του ανθρώπου, καθώς αντίστοιχες δομές θα έχουν

και οι μεταβολίτες της καρβακρόλης, του επικρατούς συστατικού του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare*, λόγω ισομέρειας με τη θυμόλη, προκειμένου να διαπιστωθεί η δράση της ουσίας ως έμμεσο καρκινογόνο. Στη δομή δύο ενώσεων από αυτές στις οποίες έγινε έλεγχος ταυτοποιήθηκε δομικό χαρακτηριστικό που προκαλεί ανησυχία, με βάση το άρθρο ανασκόπησης των Plošnik κ.λπ. (2016)⁴⁸ από τις οποίες η μία (p-κυμένιο-2,5-διόλη) συνιστά οξειδωτικό παράγωγο του πιο άφθονου μεταβολίτη που απαντάται στα ούρα του ανθρώπου, ενώ η δεύτερη (p-κυμένιο-2,3-διόλη) βρίσκεται σε ίχνη στα ούρα.⁵³ Προκειμένου να αξιοποιηθούν τα δεδομένα αυτά και να εξακριβωθεί εάν οι μεταβολίτες αυτοί είναι υπεύθυνοι για την απόδοση καρκινογόνου δυναμικού στο ριγανέλαιο από *Origanum vulgare* είναι απαραίτητο να ληφθεί υπόψη η τοξικοκινητική της θυμόλης. Η αποβολή της θυμόλης στα ούρα γίνεται στον άνθρωπο μέσα στις πρώτες 24 ώρες, ενώ στην κυκλοφορία του αίματος, με κατανομή στον εξωκυττάριο χώρο ως θειικό άλας, μπορεί να παραμείνει μέχρι και 41 ώρες. Ταυτόχρονα δε φαίνεται να βιοσυσσωρεύεται.⁴⁹ Πιθανότατα η αφθονία του πρώτου μεταβολίτη στα ούρα υποδηλώνει αυξημένη κάθαρση της ουσίας, και κατ' επέκταση μικρή παραμονή στον ανθρώπινο οργανισμό. Εντούτοις η ύπαρξη ύποπτων για καρκινογονικότητα δομικών χαρακτηριστικών σε μεταβολίτες βασικών συστατικών της UVCB ουσίας αρκεί ώστε να αποδοθεί σε αυτή ταξινόμηση για την τάξη κινδύνου της καρκινογονικότητας εωσότου είναι διαθέσιμα περισσότερα διαφωτιστικά δεδομένα για τη συγκέντρωση των μεταβολιτών αυτών στον ανθρώπινο οργανισμό.

Κατά την εκτίμηση για το τελικό σημείο της καρκινογονικότητας αξιοποιήθηκε επίσης το συμπέρασμα της διαδικασίας εκτίμησης για τη μεταλλαξιγένεση με βάση την αξιολόγηση των ήδη υπάρχοντων *in vivo* και *in vitro* μελετών μεταλλαξιγένεσης.⁶² Οι εργασίες που αξιολογήθηκαν έδειξαν ότι το ριγανέλαιο ποικίλης προέλευσης με υψηλό ποσοστό καρβακρόλης στη σύστασή του δεν ασκεί μεταλλαξιγόνο δράση, συμπέρασμα που δε συνηγορεί στην ταξινόμηση του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare* για Καρκινογονικότητα.

Η αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare* και των κυρίαρχων συστατικών του, που προκύπτει από μία σειρά *in vitro* μελετών, φαίνεται να αντιβαίνουν στην υπόθεση για ενδογενή κίνδυνο καρκινογονικότητας της UVCB ουσίας. Εντούτοις, δεν πρέπει να παραληφθεί να σημειωθεί πως οι ουσίες αυτές που έχουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις αντικαρκινική και αντιοξειδωτική δράση είναι δυνατόν να έχουν διφασική δράση και σε υψηλότερες

συγκεντρώσεις έκθεσης να εκδηλώνουν τον αντίστροφο χαρακτήρα μέσα στον οργανισμό, δηλαδή καρκινική και οξειδωτική δράση, λόγω της συμμετοχής στην προσπάθεια του οργανισμού διατήρησης της ομοιόστασης των ελευθέρων ριζών⁷⁷, συνεπώς τα ευρήματα των *in vitro* μελετών για την αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση του ριγανέλαιου από *Origanum vulgare* και των κύριων συστατικών του, θυμόλη και καρβακρόλη, τα οποία απαντώνται στη βιβλιογραφία δεν αντιβαίνουν στην ύπαρξη ενδογενούς κινδύνου καρκινογονικότητας. Επιπρόσθετα, θεωρήθηκε πιθανή η άσκηση καρκινογόνου δράσης όταν υπάρχει επαναλαμβανόμενη *per os* έκθεση στην υπό μελέτη ουσία και μέσω ερεθισμού κυττάρων του στομάχου, καθώς ταξινομήθηκε ως Ερεθιστικό του Δέρματος Κατηγορίας 2, χωρίς να αγνοηθεί βέβαια η πιθανότητα αντιστροφής μέσω αντιοξειδωτικής και αντικαρκινικής δράσης της βλάβης που προξενήθηκε από την ίδια ουσία, εφόσον η έκθεση πραγματοποιείται σε χαμηλά επίπεδα δόσεων.

Με βάση όλα τα παραπάνω στοιχεία που αξιολογήθηκαν εφαρμόζοντας εφαρμογή της προσέγγισης Βάρους των Αποδείξεων, υπάρχουν ενδείξεις ώστε, παρά την έλλειψη δεδομένων από στοχευμένες δημοσιευμένες μελέτες για την ίδια την ουσία και τα συστατικά της, να προτείνεται ταξινόμηση για την τάξη κινδύνου Καρκινογονικότητας ως **Καρκινογόνο Κατηγορίας 2** (υπάρχουν υποψίες ότι προκαλεί καρκίνο στον άνθρωπο), τουλάχιστον για την έκθεση από το στόμα και μέχρι να υπάρξουν περισσότερα δεδομένα από μελέτες τοξικοκινητικής για την τύχη στον ανθρώπινο οργανισμό των μεταβολιτών που περιέχουν στη δομή τους δομικά χαρακτηριστικά που προκαλούν ανησυχία για καρκινογονικότητα. Με την ταξινόμηση αυτή στην περίπτωση παραγωγής ή εισαγωγής ριγανέλαιου από *Origanum vulgare* στην Ευρωπαϊκή Ένωση σε ποσότητα που θα ξεπεράσει τους 1000 τόνους ανά έτος (Παράρτημα Χ) **θα προταθεί η διεξαγωγή τεστ καρκινογονικότητας σε ζώα**, ώστε να εξαχθούν περισσότερες πληροφορίες. Το ριγανέλαιο ποικίλης προέλευσης μετά από εκτίμηση για την τάξη κινδύνου της Μεταλλαξιγένεσης δεν έλαβε ταξινόμηση. Ωστόσο, λόγω της ευρείας χρήσης σε διασπορά της συναφούς ουσίας «Carvacrol-rich essential oil obtained from the leaves of *Origanum* spp., by distillation» που διαθέτει καταχώρηση υπό τον REACH (EC 947-697-6), θα μπορούσε να υποτεθεί ότι και η ουσία που μελετήθηκε θα έχει αντίστοιχες χρήσεις, οπότε φτάνοντας την κατάλληλη ποσοτική κατηγορία θα πρέπει να αξιολογηθεί η ανάγκη για διεξαγωγή δοκιμασίας καρκινογονικότητας δύο ετών σε ζώα σε συνάρτηση με τα επικαιροποιημένα λοιπά δεδομένα που είναι σχετικά με την καρκινογονικότητα και ενδεχομένως να έχουν ήδη

προκύψει έως τότε για την ουσία. Η καθιέρωση της προτεινόμενης ταξινόμησης υποδεικνύει και τους τρόπους με τους οποίους θα λάβει χώρα στη συνέχεια η διαχείριση και η επικοινωνία κινδύνου σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Κανονισμού CLP.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Caldwell, L. K. *Between Two Worlds: Science, the Environmental Movement and Policy Choice*. Cambridge University Press, 1990.
- ² Ευρωπαϊκή Επιτροπή, REACH <https://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach>
- ³ Lilienblum, W., W. Dekan, H. Foth, T. Gebel, J.G. Hengstler., R. Kahl & K.M. Wollin (2008). *Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH)*. Archives of Toxicology, 82(4): 211–236.
- ⁴ Burden, N., M.J.D. Clift, G.J.S. Jenkins, B. Labram & F. Sewell (2021). *Opportunities and challenges for integrating new in vitro methodologies in hazard testing and risk assessment*. Small, 17(15).
- ⁵ ECHA (2011). *The use of Alternatives to testing on animals for the REACH Regulation*, 69pp. Helsinki, Finland: European Chemicals Agency.
- ⁶ Spielmann, H., U. G. Sauer & O. Mekenyan (2011). *A Critical Evaluation of the 2011 ECHA Reports on Compliance with the REACH and CLP Regulations and on the Use of Alternatives to Testing on Animals for Compliance with the REACH Regulation*. Alternatives to Laboratory Animals, 39(5): 481–493.
- ⁷ Halder, M. & T. Hartung (2018). *European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM): its role and contribution*. Conference Proceedings: Proceedings of the International Symposium. EDQM, Council of Europe, 23-32.
- ⁸ Worth, A. P. & M. Balls (2001). *The Role of ECVAM in promoting the regulatory acceptance of alternative methods in the European Union*. Alternatives to Laboratory Animals, 29(5): 525–535.
- ⁹ Di Prospero Fanghella, P. & T. Catone (2011). *The CLP Regulation: origin, scope and evolution*. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, 47(2): 126-131.
- ¹⁰ Oltmanns, J., D. Bunke, W. Jenseit, & C. Heidorn (2014). *The impact of REACH on classification for human health hazards*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 70(2): 474–481.
- ¹¹ ECHA, Έκθεση χημικής ασφάλειας
echa.europa.eu/el/regulations/reach/registration/information-requirements/chemical-safety-report
- ¹² ECHA (2017), *Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment*. Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.
- ¹³ Woutersen, M., M. Beekman, M. E. J. Pronk, A. Muller, J. A. de Knecht & B. C. Hakkert (2019). *Does REACH provide sufficient information to regulate mutagenic and*

carcinogenic substances?. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 25(8): 1996-2016.

¹⁴ Κανονισμός REACH (Ευρωπαϊκή Επιτροπή) Νο 1907/2006

¹⁵ Κανονισμός CLP (Ευρωπαϊκή Επιτροπή) Νο 1272/2008

¹⁶ Schneider, K., M. Schwarz, I. Burkholder, A. Kopp-Schneider, L. Edler, A. Kinsner-Ovaskainen, T. Hartung & S. Hoffmann (2009). “*ToxRTool*”, a new tool to assess the reliability of toxicological data. Toxicology Letters, 189(2): 138-144.

¹⁷ Ευρωπαϊκή Επιτροπή, Joint Research Center. ToxRTool user manual.

¹⁸ Klimisch, H.-J., M. Andreae, & U. Tillmann (1997). *A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 25(1): 1–5.

¹⁹ Segal, D., S.L. Makris, A.D. Kraft, A.S. Bale, J. Fox, M. Gilbert, D.R. Bergfelt, K.C. Raffaele, R.B. Blain, K.M. Fedak, M.K. Selgrade & K.M. Crofton (2015). *Evaluation of the ToxRTool’s ability to rate the reliability of toxicological data for human health hazard assessments*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 72(1): 94-101.

²⁰ OECD (2018). *Test No. 451: Carcinogenicity studies*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing.

²¹ Hayes, A. W., T. Wang & D. Dixon (2020). *Toxicologic testing methods*. Loomis’s Essentials of Toxicology, 189–222.

²² Felter, S.P., V. S. Bhat, P.A. Botham, D. A. Bussard, W. Casey, A. W. Hayes, G.M. Hilton, K. A. Magurany, U. G. Sauer & E. V. Ohanian (2022). *Assessing chemical carcinogenicity: hazard identification, classification, and risk assessment*. *Insight from a Toxicology Forum state-of-the-science workshop*. Critical Reviews in Toxicology.

²³ Hernandez, A. F., A. Buha, C. Constantin, D.R. Wallace, D. Sarigiannis, M. Neagu, B. Antonijevic, A.W. Hayes, M.F. Wilks & A. Tsatsakis (2019). *Critical assessment and integration of separate lines of evidence for risk assessment of chemical mixtures*. Archives of Toxicology, 93: 2741–2757.

²⁴ ECHA (2017). *Read-across Assessment Framework: Considerations on multi-constituent substances and UVCBs*.

²⁵ ECHA, What is a substance?

<https://echa.europa.eu/support/substance-identification/what-is-a-substance>

- ²⁶ Ευρωπαϊκή Επιτροπή (2020). Commission Staff Working Document: *Progress report on the assessment and management of combined exposures to multiple chemicals (chemical mixtures) and associated risks*.
- ²⁷ Lukas, B., C. Schmiderer & J. Novak (2015). *Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae)*. *Phytochemistry*, 119: 32–40.
- ²⁸ Kokkini, S., R. Karousou, E. Hanlidou & T. Lanaras (2004). *Essential oil composition of Greek (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) and Turkish (*O. onites*) oregano: a tool for their distinction*. *Journal of Essential Oil Research*, 16(4): 334-338.
- ²⁹ ECHA, Search for chemicals/ registered substances
<https://echa.europa.eu/>
- ³⁰ Kokkini, S., R. Karousou & E. Hanlidou (2003). *HERBS / Herbs of the Labiatae*. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 3082–3090.
- ³¹ Lukas, B., C. Schmiderer, C. Franz & J. Novak. (2009). *Composition of essential oil compounds from different Syrian populations of *Origanum syriacum* L. (Lamiaceae)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4): 1362–1365.
- ³² Lombrea, A., D. Antal, F. Ardelean, S. Avram, I.Z. Pavel, L. Vlaia, A.-M. Mut, Z. Diaconeasa, C. A. Dehelean, C. Soica & C. Danciu (2020). *A recent insight regarding the phytochemistry and bioactivity of *Origanum vulgare* L. essential oil*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24): 9653.
- ³³ Al-Hijazeen, M., E. Lee, A. Mendonca & D. Ahn (2016). *Effect of oregano essential oil (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) on the storage stability and quality parameters of ground chicken breast meat*. *Antioxidants*, 5(2): 18.
- ³⁴ Papageorgiou, G., N. Botsoglou, A. Govaris, I. Giannenas, S. Iliadis & E. Botsoglou (2003). *Effect of dietary oregano oil and alpha-tocopheryl acetate supplementation on iron-induced lipid oxidation of turkey breast, thigh, liver and heart tissues*. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 87(9-10): 324–335.
- ³⁵ Simitzis, P. E., S.G. Deligeorgis, J.A. Bizelis, A. Dardamani, I. Theodosiou & K. Fegeros (2008). *Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics*. *Meat Science*, 79(2): 217–223.
- ³⁶ Lagouri, V., G. Blekas, M. Tsimidou S. Kokkini, & D. Boskou (1993). *Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown wild in Greece*. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 197(1): 20-23.

- ³⁷ Baser, K. H. C., T. Özek, G. Tümen & E. Sezik (1993). *Composition of the essential oils of Turkish Origanum species with commercial importance*. Journal of Essential Oil Research, 5(6): 619-623.
- ³⁸ Vokou, D., S. Kokkini & J.-M. Bessiere (1993). *Geographic variation of Greek oregano (Origanum vulgare ssp. hirtum) essential oils*. Biochemical Systematics and Ecology, 21(2): 287–295.
- ³⁹ Poulose, A. J. & R. Croteau (1978). *Biosynthesis of aromatic monoterpenes*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 187(2): 307–314.
- ⁴⁰ Chorianopoulos, N., E. Kalpoutzakis, N. Aligiannis, S. Mitaku, G.-J. Nychas & S. A. Haroutounian (2004). *Essential Oils of Satureja, Origanum, and Thymus Species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(26): 8261–8267.
- ⁴¹ Kainat, R., Z. Mushtaq & F. Nadeem (2019). *Derivatization of essential oil of eucalyptus to obtain valuable market products -a comprehensive review*. International Journal of Chemical and Biochemical Sciences, 15:58-68.
- ⁴² Laghmouchi, Y., O. Belmehdi, N.S. Senhaji & J. Abrini (2018). *Chemical composition and antibacterial activity of Origanum compactum Benth. essential oils from different areas at northern Morocco*. South African Journal of Botany, 115: 120–125.
- ⁴³ Sikkema, J. J., A.M. De Bont & B. Poolman (1994). *Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes*. Journal of Biological Chemistry. 269: 8022–8028.
- ⁴⁴ Simirgiotis, M. J., D. Burton, F. Parra, J. López, P. Muñoz, H. Escobar & C. Parra (2020). *Antioxidant and antibacterial capacities of Origanum vulgare L. essential oil from the arid Andean region of Chile and its chemical characterization by GC-MS*. Metabolites, 10(10): 414.
- ⁴⁵ Kulisic, T., A. Radonic, V. Katalinic & M. Milos (2004). *Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil*. Food Chemistry, 85(4): 633–640.
- ⁴⁶ Fleisher, A., Z. Fleisher & S. Abu-Rukun (1984). *Chemovarieties of Coridothymus capitatus L. Rchb. growing in Israel*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 35(5): 495–499.
- ⁴⁷ Tammar, S., N. Salem. I. B. Rebey, J. Sriti, M. Hammami, S. Khammassi, B. Marzouk, R. Ksouri & K.Msaada (2018). *Regional effect on essential oil composition and antimicrobial activity of Thymus capitatus L.* Journal of Essential oil.

- ⁴⁸ Gonçalves, J. C. R., D. A. de Meneses, A. P. de Vasconcelos, C. A. Piauilino, F. R. de C. Almeida, Napoli, E. M. & D. A. M. de Araújo (2017). *Essential oil composition and antinociceptive activity of Thymus capitatus*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1): 782–786.
- ⁴⁹ Plošnik, A., M. Vračko1 & M. Sollner Dolenc (2016). *Mutagenic and carcinogenic structural alerts and their mechanisms of action*. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 67(3): 169–182.
- ⁵⁰ ECHA, EC number: 201-944-8
- ⁵¹ ChemIDplus βάση δεδομένων <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/>
- ⁵² Fatima, K., S. Luqman & A. Meena (2022). *Carvacrol arrests the proliferation of hypopharyngeal carcinoma cells by suppressing ornithine decarboxylase and hyaluronidase activities*. *Frontiers in nutrition*, 9: 857256.
- ⁵³ Thalhamer, B., W. Buchberger, & M. Waser (2011). *Identification of thymol phase I metabolites in human urine by headspace sorptive extraction combined with thermal desorption and gas chromatography mass spectrometry*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(1): 64–69.
- ⁵⁴ Scott Obach, R. & A.S. Kalgutkar (2010). *Reactive electrophiles and metabolic activation*. *Comprehensive Toxicology*, 309–347.
- ⁵⁵ Gates, K. S. (1999). *Covalent modification of DNA by natural products*. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 491–552.
- ⁵⁶ Tsitsimpikou, C. & N. Spetsieris (2016). *Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of 1,2-dihydroxybenzene; pyrocatechol*. ECHA Annex 1, CLH-O-0000001412-86-122/F
- ⁵⁷ Komaitis, M.E., N. Ifanti-Papatragianni & E. Melissari-Panagiotou (1992). *Composition of the essential oil of marjoram (Origanum majorana L.)*. *Food Chemistry*, 45: 117-118.
- ⁵⁸ Sellami I.H., E. Maamouri, W. A. Wannes, M.E. Kchouk & B. Marzouk (2009). *Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (Origanum majorana L.)*. *Industrial Crops and Products*, 30(3): 395-402.
- ⁵⁹ Ozdemir, N., Y. Ozgen, M. Kiralan, A. Bayrak, N. Arslan & M.F. Ramadan (2017). *Effect of different drying methods on the essential oil yield, composition and antioxidant activity of Origanum vulgare L. and Origanum onites L.* *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(2): 820–825.

- ⁶⁰ Spyridopoulou, K., E. Fitsiou, E. Bouloukosta, A. Tiptiri-Kourpeti, M. Vamvakias, A. Oreopoulou, E. Papavassilopoulou, A. Pappa & K. Chlichlia (2019). *Extraction, chemical composition, and anticancer potential of Origanum onites L. essential oil*. *Molecules*, 24(14): 2612.
- ⁶¹ Ozkan, G., H. Baydar & S. Erbas (2010). *The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (Origanum onites L.)*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2): 205–209.
- ⁶² Bouyahya, A., N. Dakka, A. Talbaoui, A. Et-Touys, H. El-Boury, J. Abrini & Y. Bakri (2017). *Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic Oregano (Origanum compactum Benth.)*. *Industrial Crops and Products*, 108: 729–737.
- ⁶³ Ψιλού, Η. (2022). *Συλλογή και εκτίμηση των υπάρχοντων πειραματικών δεδομένων τοξικολογικού ενδιαφέροντος για την τάξη κινδύνου Μεταλλαξιγένεσης με την χρήση του εργαλείου αξιοπιστίας δεδομένων ToxRTool, για την ουσία μεταβαλλόμενη σύνθεσης ριγανέλαιο*, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, ΠΜΣ Τοξικολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- ⁶⁴ ECHA (2011). *Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Part B: Hazard Assessment*.
- ⁶⁵ Kozics, K., M. Bučková, A. Puškárová, V. Kalászová, T.Cabicarová & D. Pangallo (2019). *The effect of ten essential oils on several cutaneous drug-resistant microorganisms and their Cyto/Genotoxic and antioxidant properties*. *Molecules*, 24(24): 4570.
- ⁶⁶ Elansary, H. O., S.A.M. Abdelgaleil, E.A. Mahmoud, K. Yessoufou, K. Elhindi & S. El-Hendawy (2018). *Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1).
- ⁶⁷ Aybastier, Ö., S. Dawbaa, C. Demir, O. Akgün, E. Ulukay & F. Arı (2018). *Quantification of DNA damage products by gas chromatography tandem mass spectrometry in lung cell lines and prevention effect of thyme antioxidants on oxidative induced DNA damage*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 808: 1–9.
- ⁶⁸ Kryston, T. B., A.B. Georgiev, P. Pissis & A.G. Georgakilas (2011). *Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1-2): 193–201.
- ⁶⁹ Loft, S. & H.E. Poulsen (1996). *Cancer risk and oxidative DNA damage in man*. *Journal of Molecular Medicine*, 74(6): 297–312.

- ⁷⁰ Han, X.& L.T. Parker (2017). *Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (Origanum vulgare) essential oil in a human skin disease model*. *Biochimie Open*, 4: 73–77.
- ⁷¹ Liang, W. Z., & C. H. Lu (2012). *Carvacrol-induced [Ca²⁺]_i rise and apoptosis in human glioblastoma cells*. *Life Sciences*, 90(17-18): 703–711.
- ⁷² Mari, A., G. Mani, S.N. Nagabhishek, G. Balaraman, N. Subramanian, F.B. Mirza, J. Sundaram & D. Thiruvengadam (2020). *Carvacrol promotes cell cycle arrest and apoptosis through PI3K/AKT signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells*. *Chinese Journal of Integrative Medicine*.
- ⁷³ Li, Y., J. Wen, C. Du, S. Hu, J. Chen, S. Zhang, F. Gao, S.-J. Li, X.-W. Mao, H. Miyamoto & K. Ding (2017). *Thymol inhibits bladder cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and apoptosis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491(2): 530–536.
- ⁷⁴ Balusamy, S. R., H. Perumalsamy, M.A. Huq & B. Balasubramanian (2018). *Anti-proliferative activity of Origanum vulgare inhibited lipogenesis and induced mitochondrial mediated apoptosis in human stomach cancer cell lines*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108: 1835–1844.
- ⁷⁵ Balan, D. J., T. Rajavel, M. Das, S. Sathya, M. Jeyakumar & K. P. Devi (2020). *Thymol induces mitochondrial pathway-mediated apoptosis via ROS generation, macromolecular damage and SOD diminution in A549 cells*. *Pharmacological Reports*.
- ⁷⁶ Bouhtit, F., M. Najjar, D. Moussa Agha, R. Melki, M. Najimi, K. Sadki, N. Boukhatem, D. Bron, N. Meuleman, A. Hamal, L. Lagneaux P. Lewalle & M. Merimi (2021). *New anti-leukemic effect of carvacrol and thymol combination through synergistic induction of different cell death pathways*. *Molecules*, 26(2): 410.
- ⁷⁷ Skaperda, Z., F. Tekos, P. Vardakas, C. Nepka & D. Kouretas (2021). *Reconceptualization of Hormetic Responses in the Frame of Redox Toxicology*. *International journal of molecular sciences*, 23(1): 49.
- ⁷⁸ Hakanson, R. & F. Sundler (1990). *Proposed mechanism of induction of gastric carcinoids: the gastrin hypothesis*. *European Journal of Clinical Investigation*, 20(1): 65–71.
- ⁷⁹ Chandra, S.A. M.W. Nolan, D.E. Malarkey (2010). *Chemical Carcinogenesis of the Gastrointestinal Tract in Rodents: An Overview with Emphasis on NTP Carcinogenesis Bioassays*. *Toxicologic Pathology*, 38(1):188-197.
- ⁸⁰ ECHA (2017). *Guidance on the application of CLP criteria*.

