

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

“ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ
ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΠΙΜΥΩΝ
(ΗΠΙΑΤΟΣ, ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ ΝΕΦΡΟΥ)
ΩΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΗ
ΓΛΥΦΟΣΑΤΗ ΚΑΙ ΜΙΓΜΑΤΟΣ ΑΥΤΗΣ ΜΕ 2.4-D ΚΑΙ DICAMBA

Καραμπατζάκης Θωμάς του Νικολάου

BSc Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

Λάρισα, 2023

*«ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
ΕΠΙΜΥΩΝ (ΗΠΙΑΤΟΣ, ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ ΝΕΦΡΟΥ)
ΩΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΗ ΓΛΥΦΟΣΑΤΗ ΚΑΙ
ΜΙΓΜΑΤΟΣ ΑΥΤΗΣ ΜΕ 2,4-D ΚΑΙ DICAMBA»*

Καραμπατζάκης Θωμάς

Επιβλέπων καθηγητής: Κουρέτας Δημήτριος
Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών

*«ASSESEMENT OF REDOX STATUS MARKERS AS A RESULT OF PERINETAL
EXPOSURE TO GLYPHOSATE AND ITS MIXTURE WITH 2,4-D AND DICAMBA
IN RATS' SAMPLES (LIVER, LARGE INTESTINE AND KIDNEY) »*

Karampatzakis Thomas
Supervisor: Kouretas Demetrios
Laboratory of Animal Physiology

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κουρέτας Δημήτριος (Επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών – Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τσατσάκης Αριστείδης: Καθηγητής Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Νέγκα Χαριτίνη: Ιατρός – Κυτταροπαθολόγος του Εργαστηρίου Κυτταροπαθολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χειμερινό εξάμηνο του 2022.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Δημήτριο Κουρέτα, καθηγητή Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών – Τοξικολογίας, που με εμπιστεύτηκε και μου πρόσφερε τη δυνατότητα να εργαστώ στην παρούσα μελέτη και να συνεργαστώ με το Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, καθώς επίσης για την καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής μου.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Α. Τσατσάκη και την κυρία Χ. Νέγκα που δέχτηκαν να συμπληρώσουν την τριμελή εξεταστική επιτροπή μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην υπεύθυνη μου στο εργαστήριο, την υποψήφια διδάκτορα Μαρία – Παρασκευή Νεχαλιώτη, για το χρόνο που μου διέθεσε, τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε και για την εμπιστοσύνη και το ενδιαφέρον που μου έδειξε κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής μου.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να πω και ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το φιλικό και συνεργατικό κλίμα καθ' όλης της παρουσίας μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, την αδερφή μου Θεοφανία και τις γιαγιάδες μου που με στηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια και εξακολουθούν να το κάνουν δίνοντας μου δύναμη να συνεχίζω.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	10
ABSTRACT	12
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	14
1.1 Ελεύθερες Ρίζες.....	14
1.2 Είδη Δραστικών Μορφών	15
1.3 Παραγωγή Ελευθέρων Ριζών	19
1.3.1 Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών.....	19
1.3.2 Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών	23
1.4 Δράσεις ελευθέρων ριζών	23
1.4.2 Φυσιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών.....	23
1.4.3 Αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών.....	24
1.4.3.1 Επίδραση στα νουκλεϊκά οξέα.....	24
1.4.3.2 Επίδραση στα λιπίδια	25
1.4.3.3 Επίδραση στις πρωτεΐνες.....	26
1.5 Αντιοξειδωτικά.....	27
1.5.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	28
1.5.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	30
1.6 Οξειδωτικό στρες	32
1.7 Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα (PPPs) – Παρασιτοκτόνα.....	34
1.7.1 Χρήση Παρασιτοκτόνων: Από το παρελθόν έως το σήμερα.....	35
1.7.2 Κατηγοριοποίηση των παρασιτοκτόνων	36
1.7.3 Έκθεση στα φυτοφάρμακα.....	40
1.7.4 Επίδραση στο περιβάλλον	40
1.7.5 Επίδραση στην υγεία του ανθρώπου.....	41
1.7.6 Ρυθμιστικό πλαίσιο για τα παρασιτοκτόνα και ασφάλεια	42
1.8 Ζιζανιοκτόνα.....	42
1.8.1 Dicamba	42
1.8.2 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D)	43

1.8.3 Γλυφοσάτη (<i>Glyphosate</i>).....	43
1.8.4 Προγεννητική έκθεση σε ζιζανιοκτόνα	44
1.8.5 Οξειδωτική βλάβη από την επίδραση ζιζανιοκτόνων	45
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	46
3. ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ	47
3.1 Πειραματόζωα	47
3.2 Καθορισμός της δοσολογίας.....	47
3.3 Πειραματικός σχεδιασμός	47
3.4 Συλλογή ιστών και προετοιμασία	48
3.5 Εκτίμηση των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης	49
3.5.1 Υπολογισμός ολικής πρωτεΐνης ιστού.....	49
3.5.2 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (<i>TAC</i>).....	49
3.5.3 Προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης (<i>GSH</i>)	50
3.5.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (<i>TBARS</i>)	52
3.5.5 Προσδιορισμός του ρυθμού αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (<i>H₂O₂</i>)	53
3.5.6 Προσδιορισμός της ενεργότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (<i>GR</i>).....	54
3.5.7 Προσδιορισμός της ενεργότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (<i>GPx</i>)	54
3.5.8 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (<i>CARBS</i>).....	55
3.6 Στατιστική ανάλυση.....	56
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
4.1.1 Επιδράσεις της γλυφοσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο ήπαρ	57
4.1.2 Επιδράσεις στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο ήπαρ κατά την περίοδο ανάρρωσης.....	57
4.2.1 Επιδράσεις της γλυφοσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο παχύ έντερο	59
4.2.2 Επιδράσεις στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο παχύ έντερο κατά την περίοδο ανάρρωσης	60
4.3.1 Επιδράσεις της γλυφοσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στον νεφρό.....	61
4.3.2 Επιδράσεις στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στον νεφρό κατά την περίοδο ανάρρωσης.....	61
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	63
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<i>Εικόνα 1: Σχηματισμός των ROS μέσω της απελευθέρωσης ενέργειας και τις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων (Krumova & Cosa, 2016).</i>	16
<i>Εικόνα 2: Παραγωγή δραστικών μορφών αζώτου από το αρχικό μόριο NO (Elchenawwi, 2022)</i>	17
<i>Εικόνα 3: Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών (Santo et al, 2016)</i>	19
<i>Εικόνα 4: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από την αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια (Phaniedra et al, 2015)</i>	20
<i>Εικόνα 5: Παραγωγής ROS κατά την φαγοκύττωση από κυτταρικές οξειδάσες και δισμουτάσες ύστερα από την προσβολή από παθογόνο (Izzi, 2012)</i>	21
<i>Εικόνα 6: Αντιδράσεις Haber-Weiss και Fenton που χρησιμοποιούν μέταλλα για την παραγωγή ριζών (Obeagu, 2018)</i>	22
<i>Εικόνα 7: Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών (Santo, 2016)</i>	23
<i>Εικόνα 8: Ενδογενή ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί (Morris, 2014)</i>	28
<i>Εικόνα 9: Η αντίδραση κατάλυσης της SOD προς σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου (Obeagu et al, 2018)</i>	29
<i>Εικόνα 10: Το σύστημα της γλουταθειόνης (Simpson et al., 2015)</i>	30
<i>Εικόνα 11: Κατηγοριοποίηση του οξειδωτικού στρες ανάλογα της έντασής του. (Sies, 2020)</i>	34
<i>Εικόνα 12: Απεικόνιση της παραγωγής γεωργικών φαρμάκων (Carvahlo, 2017).</i>	34
<i>Εικόνα 13: Τάξεις τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων με βάση κατηγοριοποίησης από το WHO (Yadav & Devi, 2017).</i>	39
<i>Εικόνα 14: Πιθανές πηγές έκθεσης σε φυτοφάρμακα (Vera-Herrera, 2021)</i>	40
<i>Εικόνα 15: Απεικόνιση του βαθμού εισαγωγής των παρασιτοκτόνων σε σημεία του σώματος (Kim et al, 2017)</i>	40
<i>Εικόνα 16: Τρόποι με τους οποίους τα φυτοφάρμακα μπορούν να μεταφερθούν σε ευρύτερη περιοχή πέρα από το σημείο εφαρμογής τους (Tudi et al, 2021)</i>	41
<i>Εικόνα 17: Τυπικά παραδείγματα ασθενειών έπειτα από μακροχρόνια έκθεση σε γεωργικά φάρμακα (Kim et al, 2017)</i>	42
<i>Εικόνα 18: Πειραματικός σχεδιασμός</i>	48
<i>Εικόνα 19: Μέθοδος ολικής αντιοξειδωτική ικανότητας (TAC) (Ioana, Rugina, and Socaciu 2012).</i>	50
<i>Εικόνα 20: Αντίδραση της GSH με το DTNB (Araujo et al, 2008)</i>	51
<i>Εικόνα 21: Αντίδραση του TBA με το MDA για τον προσδιορισμό της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Sochor et al. 2012).</i>	52

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Δραστικά Είδη Οξυγόνου. _____	16
Πίνακας 2: Δραστικά Είδη Αζώτου. _____	17
Πίνακας 3: Δραστικά Είδη Θείου _____	18
Πίνακας 4: Δραστικά Είδη Χλωρίου _____	18
Πίνακας 5: Οι πιο συνηθισμένες κατηγορίες φυτοφαρμάκων ανάλογα με τον οργανισμό στόχο στον οποίο δρουν (Pogacean & Gavrilescu, 2009). _____	37
Πίνακας 6: Τρόποι με τους οποίους το παρασιτοκτόνο μπορεί να εισαχθεί στον οργανισμό στόχο και να επηρεάσει την επιβίωση του (Yadav & Devi, 2017). _____	37
Πίνακας 7: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με το αντιδραστήριο Bradford. _____	49
Πίνακας 8: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας TAC. _____	50
Πίνακας 9: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας της ανηγμένης γλουταθειόνης GSH. _____	51
Πίνακας 10: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της λιπιδικής υπεροξειδωσης _____	52
Πίνακας 11: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό του ρυθμού αποικοδόμησης του H ₂ O ₂ _____	53
Πίνακας 12: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της αναγωγής της γλουταθειόνης. _____	54
Πίνακας 13: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. _____	55
Πίνακας 14: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. _____	56

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Οι επιδράσεις της γλυφosatής και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων έπειτα από τρίμηνη έκθεση επιμύων της φυλής Wistar στους δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του ήπατος στη συγκέντρωση της GSH (a), του ρυθμού της αποικοδόμησης του H ₂ O ₂ (b), της ενεργότητας της GR (c), της ενεργότητας της GPx (d), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) (e), των επιπέδων των TBARS (f) και των επιπέδων των CARBS (g). * Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, σε σχέση με control group και σε σχέση με ADI group. _____	58
--	----

Σχήμα 2: Οι επιδράσεις της γλυφωσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων κατά την περίοδο ανάρρωσης των επιμύων της φυλής Wistar στους δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του ήπατος στη συγκέντρωση της GSH (a), του ρυθμού της αποικοδόμησης του H_2O_2 (b), της ενεργότητας της GR (c), της ενεργότητας της GPx (d), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) (e), των επιπέδων των TBARS (f) και των επιπέδων των CARBS (g). * Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ σε σχέση με control group και αντίστοιχο πειραματικό group. _____ 59

Σχήμα 3: Οι επιδράσεις της γλυφωσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων έπειτα από τρίμηνη έκθεση επιμύων της φυλής Wistar στους δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του παχέος εντέρου στη συγκέντρωση της GSH (a), του ρυθμού της αποικοδόμησης του H_2O_2 (b), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) (c), των επιπέδων των TBARS (d), και των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (e). * Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ σε σχέση με control group και σε σχέση με ADI group. _____ 60

Σχήμα 4: Οι επιδράσεις της γλυφωσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων κατά την περίοδο της ανάρρωσης των επιμύων της φυλής Wistar στους δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του παχέος εντέρου στη συγκέντρωση της GSH (a), του ρυθμού της αποικοδόμησης του H_2O_2 (b), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) (c), των επιπέδων των TBARS (d), και των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (e). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ σε σχέση με control group και αντίστοιχο πειραματικό group. _____ 61

Σχήμα 5: Οι επιδράσεις της γλυφωσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων έπειτα από τρίμηνη έκθεση επιμύων της φυλής Wistar στους δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των νεφρών στη συγκέντρωση της GSH (a), του ρυθμού της αποικοδόμησης του H_2O_2 (b), της ενεργότητας της GR (c), της ενεργότητας της GPx (d), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) (e), των επιπέδων των TBARS (f) και των επιπέδων των CARBS (g), ** $p < 0.01$, σε σχέση με control group, *** $p < 0.001$, σε σχέση με το control group. _____ 62

Σχήμα 6: Οι επιδράσεις της γλυφωσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων έπειτα από την περίοδο ανάρρωσης των επιμύων της φυλής Wistar στους δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των νεφρών στη συγκέντρωση της GSH (a), του ρυθμού της αποικοδόμησης του H_2O_2 (b), της ενεργότητας της GR (c), της ενεργότητας της GPx (d), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) (e), των επιπέδων των TBARS (f) και των επιπέδων των CARBS (g). * Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ σε σχέση με control group και αντίστοιχο πειραματικό group. ____ 63

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διαχείριση των ζιζανίων αποτελεί σημαντική πρόκληση για την αποτελεσματική προστασία των καλλιεργειών προκειμένου να επιτευχθούν υψηλές αποδόσεις σόγιας και άλλων σιτηρών και να ικανοποιηθούν οι διατροφικές ανάγκες. Σημαντικό εργαλείο προς αυτό το σκοπό αποτελεί η γλυφοσάτη, το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ζιζανιοκτόνο, το οποίο παρά τον αρχικό ισχυρισμό της ελάχιστης τοξικότητας σε οργανισμούς μη στόχους, έχει συσχετιστεί με διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και δυσμενή μακροπρόθεσμα αποτελέσματα, όπως την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων. Ωστόσο, η εμφάνιση καλλιεργειών ανεκτικών στη γλυφοσάτη οδήγησε στην εφαρμογή συνδυασμού φυτοφαρμάκων ως μια υποσχόμενη τεχνική για την αποτελεσματική αντιμετώπιση των ανεπιθύμητων φυτών, εντείνοντας ακόμη περισσότερο τις ανησυχίες για τις πιθανές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Λαμβάνοντας υπόψη την ανάγκη κατανόησης των τοξικών επιδράσεων των ζιζανιοκτόνων, κρίνεται απαραίτητο να εκτιμηθεί η επίδραση τους στην οξειδοαναγωγική κατάσταση σε επίπεδο πειραματόζωων και πιο συγκεκριμένα σε ιστούς ήπατος, παχέος εντέρου και νεφρού, έπειτα από περιγεννητική έκθεση γλυφοσάτης σε συνδυασμό με το 2,4-D και το dicamba. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, 20 επίμυες της φυλής Wistar εκτέθηκαν από την έκτη μέρα της κύησης μέχρι την ενηλικίωση σε γλυφοσάτη στο επίπεδο της ημερήσιας ανεκτής δόσης (ADI) και στο επίπεδο μη παρατηρούμενων δυσμενών επιδράσεων (NOAEL) καθώς και μίγματός της με το 2,4-D και το dicamba σε δόση ίση με τα ξεχωριστά επίπεδα ADI τους. Η οξειδοαναγωγική κατάσταση προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), του ρυθμού αποικοδόμησης του H₂O₂, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR), των ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μίγμα των ζιζανιοκτόνων διατάραξε την οξειδοαναγωγική ισορροπία του ήπατος προκαλώντας ταυτόχρονη αύξηση στα επίπεδα της γλουταθειόνης (p=0.0081) και των TBARS (p=0.0182). Παρόμοια διαταραχή στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση παρατηρήθηκε τόσο στο παχύ έντερο όσο και στο νεφρό έπειτα από την έκθεση στο μίγμα φυτοφαρμάκων προκαλώντας βλάβη στα βασικά μακρομόρια (p<0.05). Ακολούθως, αξιολογήθηκε η πιθανότητα αναστροφής της προκαλούμενης οξειδωτικής βλάβης λόγω της προγεννητικής έκθεσης, με την κατανάλωση τυπικής διατροφής για

χρονικό διάστημα 3 μηνών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την τρίμηνη περίοδο ανάρρωσης αποκάλυψαν πως οι επιπτώσεις στο ήπαρ φαίνεται να είναι μη αναστρέψιμες ($p=0.05$), ενώ στις περιπτώσεις του παχέος εντέρου και του νεφρού οι επίμυες ανέπτυξαν προσαρμοστικούς μηχανισμούς στις μη πειραματικές ομάδες NOAEL και μίγματος περιορίζοντας την οξειδωτική βλάβη τόσο στα λιπίδια όσο και στις πρωτεΐνες ενεργοποιώντας παράλληλα την αντιοξειδωτική τους άμυνα ($p=0.0001$). Η μελέτη αυτή εντάσσεται στην κατηγορία της προσομοίωσης κινδύνου σε ρεαλιστικά σενάρια, καθώς εστιάζει στις επιδράσεις που μπορεί να έχει ο συνδυασμός ζιζανιοκτόνων σε δόσεις που θεωρούνται ασφαλείς για τα επιμέρους χημικά. Τα αποτελέσματα αυτής θα συμβάλλουν στην επαναξιολόγηση της διαδικασίας εκτίμησης του κινδύνου των μιγμάτων φυτοφαρμάκων και στη θέσπιση ακριβέστερων κανόνων ασφαλείας.

ABSTRACT

Weed management is a major challenge for adequate crop protection to achieve high soybean yields and crops in an effort to satisfy the nutritional needs. An essential tool for this purpose is glyphosate, the most widely used herbicide, which despite the initial claim of minimal toxicity to non-target organisms, has been associated with the disruption of redox equilibrium and adverse long-term effects such as pathological conditions. However, the emergence of glyphosate-tolerant crops has led to the utilization of pesticide combinations as a promising technique for the successful control of unwanted plants; however, has further heightened concerns about potential effects on human health. Taking into account the need to understand the toxic effects of herbicides, it is necessary to assess their effect on the redox state in experimental animals, and more specifically in tissues such as liver, large intestine and kidney, after perinatal exposure to glyphosate in combination with 2,4-D and dicamba. In this master's thesis, 20 Wistar rats were exposed from the sixth day of gestation until adulthood to glyphosate at the tolerated daily intake (ADI) and no observed adverse effect level (NOAEL) as well as its mixture with 2,4-D and dicamba at a dose equal to their individual ADI levels. Redox status was determined by measuring reduced glutathione (GSH), total antioxidant capacity (TAC), decomposition rate of H₂O₂, glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR), thiobarbiturate-reactive substances acid (TBARS) and protein carbonyls (CARBS). The results showed that the mixture of herbicides disturbed the redox equilibrium of the liver, causing a simultaneous increase in the levels of glutathione (p=0.0081) and TBARS (p=0.0182). A similar disturbance in the redox homeostasis was observed in both the large intestine and the kidney after exposure to the pesticide mixture causing damage to primary macromolecules (p<0.05). Subsequently, the possibility of reversing the oxidative damage due to prenatal exposure was evaluated by consuming a standard diet for a period of 3 months. Noteworthy, the results obtained from the three-month recovery period revealed that the effects on the liver appear to be irreversible (p=0.05), yet in the cases of the large intestine and kidney, the rats managed to develop adaptive mechanisms in the non-experimental NOAEL and mixture groups, attenuating the oxidative damage to both lipids and proteins while activating their antioxidant defense (p=0.0001). This study in the context of real-life risk simulation, focuses on the effects that the combination of herbicides can have at doses considered safe for the individual

chemicals. The obtained results will contribute to the re-evaluation of the risk assessment process of pesticide mixtures and the establishment of more precise safety rules.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες Ρίζες

Η αυξανόμενη συγκέντρωση του μοριακού οξυγόνου στην ατμόσφαιρα περίπου πριν από 2.5 δις χρόνια, η οποία οφειλόταν στην εκτεταμένη φωτοσύνθεση από τα κυανοβακτήρια, αποτέλεσε αίτιο για την εξέλιξη της αερόβιας αναπνοής και οδήγησε στην ανάπτυξη περίπλοκων ευκαρυωτικών οργανισμών (Krumona & Cosa, 2016). Το οξυγόνο είναι απαραίτητο στοιχείο για την παραγωγή ενέργειας στους ζωντανούς οργανισμούς, καθώς συμμετέχει στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, μέσω της οποίας απελευθερώνεται ενέργεια σε μορφή ATP ώστε το κύτταρο να επιτελεί όλες τις φυσιολογικές λειτουργίες του (Obeagu, 2018). Περίπου το 90% του οξυγόνου που λαμβάνεται από του πνεύμονες, χρησιμοποιείται από τα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ATP. Το υπόλοιπο 10% του οξυγόνου χρησιμοποιείται κατά το μεταβολισμό από διάφορα ένζυμα, ώστε να καταλύσουν την οξείδωση διάφορων χημικών ενώσεων κυρίως με ενώσεις που περιέχουν οξυγόνο από τις κυτταρικές οξειδάσες (Santo et al, 2016).

Το μοριακό οξυγόνο είναι μη ρίζα και περιέχει στην εξωτερική του στοιβάδα δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με παράλληλη ιδιοστροφορμή. Η απαίτηση για αντίθετη ιδιοστροφορμή των ηλεκτρονίων στην ίδια τροχιά, συνεπάγεται σταδιακή προσθήκη ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο, κατά την αναγωγή του οποίου προκύπτουν υψηλής ενεργότητας ενδιάμεσα προϊόντα (Roy et al, 2017). Έτσι, λόγω της υψηλής οξειδωτικής ικανότητας καθίσταται ένας εξαιρετικός οξειδωτικός παράγοντας, ικανός να δέχεται εύκολα ηλεκτρόνια από ανηγμένα υποστρώματα (Royton et al, 2009).

Οι ελεύθερες ρίζες είναι φυσιολογικά προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού (Phaniedra et al, 2015). Ως ελεύθερη ρίζα μπορεί να οριστεί «οποιοδήποτε μόριο, άτομο ή ιόν ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη, το οποίο περιέχει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του ατομική τροχιά» (Lobo et al, 2010). Ο μονός αριθμός των ηλεκτρονίων καθιστά την ελεύθερη ρίζα ιδιαίτερα ασταθή με σύντομη διάρκεια ζωής και άκρως δραστική και έτσι προλαβαίνουν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια, ώστε να αποκτήσουν σταθερότερη ενεργειακή κατάσταση (Santo et al, 2016 ; Phaniedra et al, 2015). Το μόριο που χάνει ένα ηλεκτρόνιο γίνεται με τη σειρά

του ελεύθερη ρίζα και ξεκινά ένα αλυσιδωτό μονοπάτι αντιδράσεων, το οποίο τελικά καταστρέφει το κύτταρο (Phaniedra et al, 2015).

Η αλυσιδωτή αντίδραση των ελευθέρων ριζών σχετίζεται με το γεγονός ότι μια ρίζα μπορεί να αναγεννήσει μια άλλη ρίζα και η τελευταία με τη σειρά της μπορεί να ξεκινήσει ένα νέο κύκλο αντιδράσεων με τρία βασικά διακριτά σημεία: την έναρξη, κατά την οποία μη ριζικά μόρια μετατρέπονται σε ριζικά, τη διάδοση, κατά την οποία η ρίζα αναγεννάται συνεχώς με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας αλυσιδωτής αντίδρασης και τέλος τον τερματισμό, όπου δύο ρίζες αντιδρούν ώστε να δώσουν μη ρίζες (Saikat, 2010).

Ο όρος 'ρίζα' εισήχθη αρχικά από τον Guyton de Morneaw το 1786 (Di Meo & Venditti, 2020). Για μεγάλο χρονικό διάστημα θεωρούνταν ότι οι ελεύθερες ρίζες δεν ήταν παρούσες σε βιολογικά συστήματα λόγω της υψηλής ενεργότητας τους και του σύντομου χρόνου ζωής τους. Τη δεκαετία του '50, οι ελεύθερες ρίζες εντοπίστηκαν στα βιολογικά συστήματα και αμέσως θεωρήθηκε ότι κατείχαν κρίσιμο ρόλο για την εμφάνιση διάφορων παθολογικών καταστάσεων, καθώς επίσης και στη γήρανση (Harman, 2009) Από τότε οι γνώσεις σχετικά με την εμπλοκή των ελευθέρων ριζών στις βιολογικές διαδικασίες έχουν αυξηθεί δραματικά (Luschak, 2014).

1.2 Είδη Δραστικών Μορφών

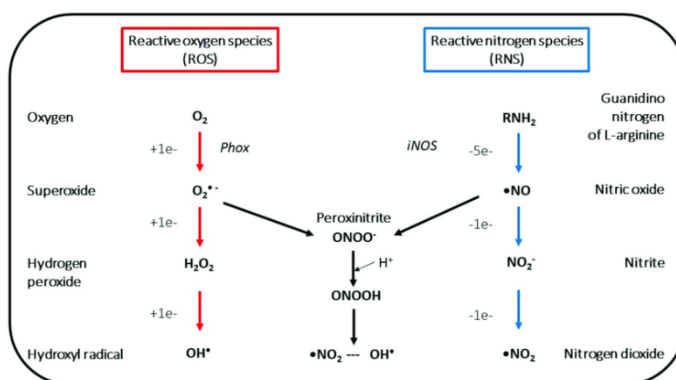
Οι ελεύθερες ρίζες είναι μια ετερογενής ομάδα μορίων. Κατατάσσονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες ανάλογα με το κεντρικό τους άτομο.

- Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ROS)
- Δραστικά Είδη Αζώτου (RNS)
- Δραστικά Είδη Θείου (RSS)
- Δραστικά είδη Χλωρίου (RCS)

Στις δραστικές μορφές περιλαμβάνονται και μη ριζικά μόρια, τα οποία ενώ δεν περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια, μπορεί να είναι εξίσου δραστικά ή και περισσότερο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα μη δραστικών ειδών είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), ο περοξυνιτρίτης ($ONOO^-$), το υποχλωριώδες ($HOCl$) και το όζον (O_3) (Phaniedra et al, 2015).

Δραστικά Είδη Αζώτου (ΔΕΑ)

Ορίζονται ως οι δραστικές μορφές με κεντρικό άτομο το άζωτο (**Εικόνα 2**). Είναι μια οικογένεια μορίων που προέρχονται από τη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου και τη ρίζα του σουπεροξειδίου με τη δράση των ενζύμων τη συνθάσης του νιτρικού οξειδίου 2 και της οξειδάσης του NADPH (Williams et al, 2019). Παραδείγματα δραστικών ριζών αυτής της κατηγορίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 2**).



Εικόνα 2: Παραγωγή δραστικών μορφών αζώτου από το αρχικό μόριο NO (Elchenawwi, 2022).

Πίνακας 2: Δραστικά Είδη Αζώτου.

Δραστικά Είδη Μονοξειδίου του Αζώτου	Συμβολισμός	Περιγραφή
Μονοξειδίο του Αζώτου	NO•	Παράγεται στα κύτταρα μέσω της δράσης του NOS έχοντας ως υπόστρωμα τη L-αργινίνη. Δρα ως σημαντικός βιολογικός μεταφορέας μηνυμάτων (Santo et al, 2016).
Διοξείδιο του Αζώτου	NO ₂ •	Εμφανίζει επιλεκτικότητα με τα υποστρώματα που θα αντιδράσει και παράγεται είτε από την οξείδωση του μονοξειδίου του αζώτου είτε από την υπεροξείδωσή του (Augousto et al, 2002).
Περοξυνιτρίτης	ONOO•	Σχηματίζεται από την αντίδραση του O ₂ με το NO•. Είναι πολύ τοξικό και μπορεί να αντιδράσει απευθείας με το CO ₂ για να σχηματίσει νέες άκρως ενεργές ενώσεις (Phaniendra et al, 2014).

Δραστικά Είδη Θείου (ΔΕΘ)

Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει δραστικές μορφές που περιέχουν ένα άτομο θείου και μπορεί να είναι από μικρά μόρια έως πρωτεΐνες. Πρόκειται για θειόλες μικρού μοριακού βάρους ή πρωτεϊνικές θειόλες συνδεδεμένα με άτομα θείου που έχουν κατάσταση οξείδωσης 0 ή -1. Γενικότερα, το άτομο του θείου μπορεί να δεχτεί ή να δωρίσει ηλεκτρόνια και να υπάρξει έτσι σε διάφορες ηλεκτρονιακές καταστάσεις με

βαθμό οξειδωσης μεταξύ -2 και +6, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιοχημικές και χημικές διαδικασίες (Kolluru et al, 2020) (**Πίνακας 3**).

Πίνακας 3: Δραστικά Είδη Θείου.

Δραστικά Είδη	Συμβολισμός	Περιγραφή
Ρίζα Θειωλίου	RS·	Σχηματίζεται από την οξείδωση ενός ηλεκτρονίου μια θειολικής ομάδας ως ενδιάμεσο προϊόν για την παραγωγή του δισουλφιδίου (Grulhke & Slusarenko, 2012).
Σουλφενικό οξύ, Σουλφινικό οξύ, δισουλφίδιο	RSOH RSO ₂ H RSSR	Σχηματίζονται ως ενδιάμεσα κατάλοιπα από την αντίδραση της κυστεΐνης με υπεροξειδία (Gurta & Carroll, 2016).

Δραστικά Είδη Χλωρίου (ΔΕΧ)

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν μόρια που περιέχουν ως κεντρικό μόριο ένα άτομο χλωρίου και είναι ικανά να οξειδώνουν και να δίνουν χλώριο σε άλλα μόρια (Lei et al, 2021). Τα πιο χαρακτηριστικά αυτής της ομάδας ριζών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**.

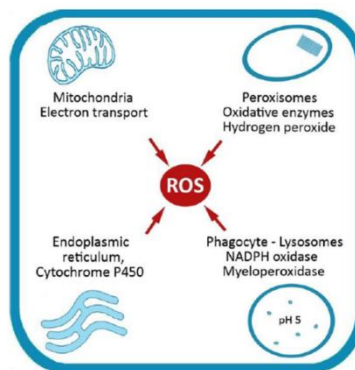
Πίνακας 4: Δραστικά Είδη Χλωρίου.

Δραστικά Είδη	Συμβολισμός	Περιγραφή
Υποχλωριώδες οξύ	HOCl	Αποτελεί το πιο σημαντικό πρόδρομο μόριο ελευθέρων ριζών και προκύπτει από τη δράση της μυελοπεροξειδάσης στα θηλαστικά κατά τη φλεγμονή (Rees et al, 2004).
Υποχλωριώδες ανιόν	OCl ⁻	Παράγεται σε περίπτωση μόλυνσης στον οργανισμό όταν αναλαμβάνουν δράση ειδικά λευκοκύτταρα (Hasegawa et al, 2005).
Χλωραμίνες	RNHCl	Παράγωγα αμμωνίας και άλλων ενώσεων οργανικών με αμμωνία των οποίων το υδρογόνο έχει αντικατασταθεί με χλώριο (Yangtao et al, 2022.)

1.3 Παραγωγή Ελευθέρων Ριζών

Εκτενέστερα, ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν από ενδογενείς πηγές όπως η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, από το μηχανισμό της φλεγμονής, το στρες, την έντονη άσκηση, την ισχαιμία, τη βακτηριακή ή ιϊκή μόλυνση και τη γήρανση (**Εικόνα 3**). Στα εξωγενή αιτιατά περιλαμβάνονται ο μολυσμένος αέρας, το νερό, ο καπνός τσιγάρου, το αλκοόλ, τα βαρέα μέταλλα, κάποια φάρμακα και βιομηχανικά απόβλητα (Pham-Huy et al, 2008).

1.3.1 Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών



Εικόνα 3: Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών (Santo et al, 2016).

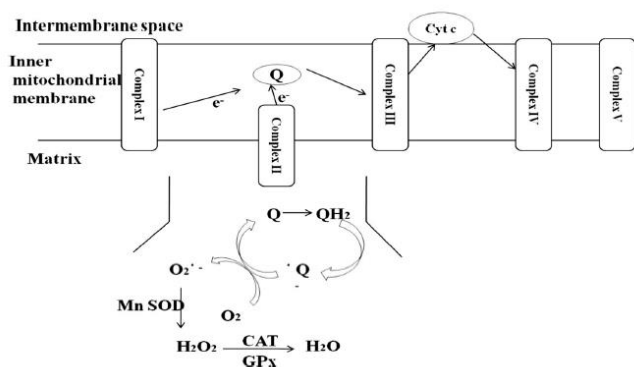
Παραγωγή ROS κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση

Το κυριότερο σημείο της ενδοκυττάριας παραγωγής ελευθέρων ριζών έχει θεωρηθεί ότι αποτελεί η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας (**Εικόνα 4**). Κατά την αναπνοή, το περισσότερο οξυγόνο που καταναλώνεται ανάγεται σε νερό. Ωστόσο, ένα εκτιμώμενο ποσοστό, που υπολογίζεται στα 1 με 2%, δεν ανάγεται πλήρως σε νερό αλλά ανάγεται σε μονήρες οξυγόνο, το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και στην άκρως δραστική ρίζα του υδροξυλίου. (Royton et al, 2009).

Αναλυτικότερα, τα ηλεκτρόνια που προέρχονται από το NADH και το FADH₂ μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως τελικό δέκτη σχηματίζοντας νερό στο σύμπλοκο IV. Εκεί τα μόρια οξυγόνου που

χρησιμοποιήθηκαν θα μετατραπούν σε νερό με τη συνεισφορά του κυτοχρώματος c. Όμως, σε ένα μικρό ποσοστό, κάποια ηλεκτρόνια θα διαφύγουν, με αποτέλεσμα εν τέλει τη δημιουργία ριζών.

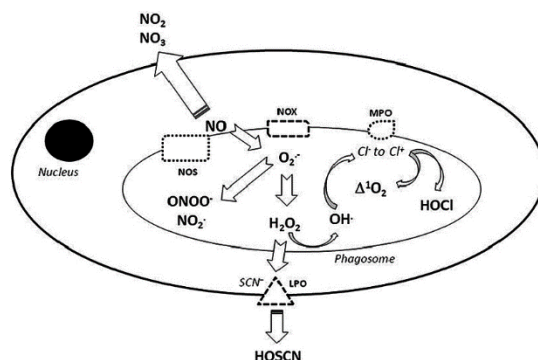
Κύρια αίτια αυτού του φαινομένου αποτελούν το σύμπλοκο I, NADPH – ουβικινόνη αφυδρογονάση, και το σύμπλοκο III, ουβικινόνη – κυτόχρωμα c αναγωγή. Τα ηλεκτρόνια από αυτά τα σύμπλοκα θα δημιουργήσουν την ανηγμένη μορφή του συνενζύμου Q. Η ανηγμένη μορφή αυτή θα προσπαθήσει να αναγεννήσει το Q, όμως θα δημιουργήσει το ασταθές ενδιάμεσο ανιόν της ημικινόνης, το οποίο με τη σειρά του θα μεταφέρει ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο και θα το μετατρέψει σε ρίζα του σουπεροξειδίου (Phaniendra et al, 2015)



Εικόνα 4: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από την αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια (Phaniendra et al, 2015)

Μηχανισμός της φαγοκύτωσης

Κατά το μηχανισμό της φαγοκύτωσης συμμετέχουν κυρίως ουδετερόφιλα, τα οποία όμως με συνδυασμό με άλλα μακροφάγα και άλλα φαγοκύτταρα του αίματος ενεργοποιούνται, κινητοποιούνται έναντι μόλυνσης και αυξάνουν δραματικά την κατανάλωση οξυγόνου, προκαλώντας την απελευθέρωση πολλών ενεργών ριζών, ένα φαινόμενο γνωστό με τον όρο αναπνευστική έκρηξη (**Εικόνα 5**). Αυτές οι δραστικές μορφές δρουν ως σημαντικά συστατικά του αμυντικού συστήματος έναντι της εισβολής παθογόνων. Το ένζυμο που συμμετέχει σε αυτό το μηχανισμό είναι η οξειδάση του NADPH 2, η οποία παράγει ρίζες σουπεροξειδίου από το οξυγόνο που διέφυγε από την αναπνευστική έκρηξη (Santo et al, 2016).



Εικόνα 5: Παραγωγή ROS κατά την φαγοκύτωση από κυτταρικές οξειδάσες και δισμουτάσες ύστερα από την προσβολή από παθογόνο (Izzi, 2012).

Μεταβολική διαδικασία του κυτοχρώματος P450

Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYP) αποτελούν μια μεγάλη ομάδα που αποτελείται από μια οικογένεια αιμοπρωτεϊνών, και τα ένζυμα που είναι μέρος της είναι μονοοξειδάσες. Καταλύουν διάφορους κύκλους αντιδράσεων και συνεισφέρουν με τη σειρά τους στην ενδοκυττάρια παραγωγή ριζών. Κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη φυσιολογία και εμπλέκονται στο μεταβολισμό φαρμάκων και ξеноβιοτικών ουσιών, καθώς επίσης και στη βιοσύνθεση ενδογενών μορίων. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου τους, ελεύθερες ρίζες παράγονται ως παραπροϊόν των αντιδράσεων (Veith & Moorthy, 2018).

Υπεροξειδισώματα

Τα υπεροξειδισώματα είναι μικρά διαμεμβρανικά οργανίδια, τα οποία περιέχουν ένζυμα που λαμβάνουν μέρος σε ποικίλες μεταβολικές αντιδράσεις, περιλαμβάνοντας και το μεταβολισμό για παραγωγή ενέργειας. Παρόλο που είναι ίδια μορφολογικά με τα λυσοσώματα, τα υπεροξειδισώματα συμμετέχουν σε αντιδράσεις του οξειδωτικού μεταβολισμού ενώ τα λυσοσώματα στην αποικοδόμηση βιομορίων. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από τουλάχιστον 50 ένζυμα και συμμετέχουν κυρίως σε οξειδωτικές αντιδράσεις με κυρίαρχο προϊόν το υπεροξείδιο του υδρογόνου.

Υποστρώματά τους αποτελούν το ουρικό οξύ, τα αμινοξέα και λιπαρά οξέα (Cooper & Hausmann, 2015).

Κυτταρικές οξειδάσες

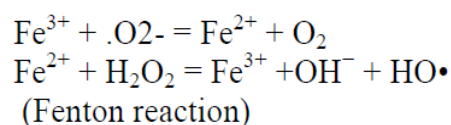
Σε αυτές τις οξειδάσες περιλαμβάνονται η οξειδάση του NADPH (οικογένεια NOX) και η οξειδάση της ξανθίνης (XO). Τα ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία NOX μπορούν να εντοπιστούν στα λεμφοκύτταρα, στους ινοβλάστες, στα ενδοθηλιακά, στα μυοκύτταρα και στα χονδροκύτταρα, όπου είναι υπεύθυνα για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ROS και δρουν ως ρυθμιστές κυτταρικών σημάτων. Ακόμη, η δράση αυτών των ενζύμων ακολουθείται από την αναπνευστική έκρηξη, όπου καταναλώνονται μεγάλες ποσότητες οξυγόνου, γλυκόζης και αυξημένη παραγωγή NADPH από το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών (Obeagu, 2018).

Αντιδράσεις με ιόντα μετάλλων

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου παράγεται σε συνθήκες υποξίας από την οξειδάση της ξανθίνης και είναι πιθανό να βρεθεί σε άλλες καταστάσεις, όπως να μετατραπεί σε νερό και μοριακό οξυγόνο από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και από την καταλάση στα υπεροξειδισώματα, ή μπορεί να δράσει ως πρόδρομο μόριο για άλλους ισχυρούς οξειδωτικούς παράγοντες αντιδρώντας με οργανικά μόρια και μέταλλα. Κύριες αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι οι Haber – Weiss και οι Fenton που οδηγούν στην παραγωγή άκρως τοξικών ριζών (**Εικόνα 6**) (Obeagu, 2018).



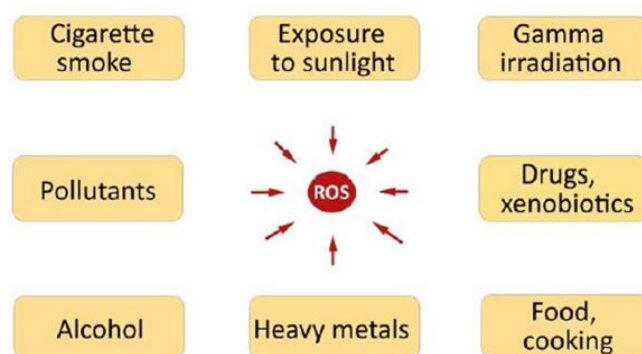
(Haber - Weiss Reaction).



Εικόνα 6: Αντιδράσεις Haber-Weiss και Fenton που χρησιμοποιούν μέταλλα για την παραγωγή ριζών (Obeagu, 2018).

1.3.2 Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών

Τα δραστικά είδη οξυγόνου μπορούν να παραχθούν από μια ποικιλία εξωγενών παραγόντων: από περιβαλλοντικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του υπεριώδους φωτός, της ιονίζουσας ακτινοβολίας και ρυπαντών, από χημικές ουσίες, καπνό και ορισμένα φάρμακα (**Εικόνα 7**). Μεταξύ των ρυπαντών ανήκουν χημικά τα οποία δρουν είτε για το σχηματισμό υπεροξειδίων και όζοντος είτε ως χημικά που προάγουν το σχηματισμό του σουπεροξειδίου όπως είναι οι κινόνες, οι νιτροσαμίνες και το παρακουάτ. Ακόμη, χημικά που μεταβολίζονται απευθείας σε ρίζες όπως πολυαλκυλωμένα αλκάνια, φαινόλες και αμινοφαινόλες και τέλος, χημικά τα οποία απελευθερώνουν σίδηρο και χαλκό τα οποία θα μπορούσαν να επάγουν το σχηματισμό ρίζας υδροξυλίου. Επίσης, ROS μπορούν να σχηματιστούν και από τη ραδιόλυση του νερού (Krumova & Cosa, 2016).



Εικόνα 7: Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών (Santo, 2016).

1.4 Δράσεις ελευθέρων ριζών

Τα ROS και τα RNS έχουν διαπιστωθεί ότι διαδραματίζουν διττό ρόλο ως μη επιβλαβή και επιζήμια δραστικά είδη ανάλογα με τη συγκέντρωση που βρίσκονται και την επίδραση που θα έχουν στο βιολογικό σύστημα (Obeagu, 2018).

1.4.2 Φυσιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών

Οι θετικές δράσεις παρατηρούνται από χαμηλές έως μέτριες συγκεντρώσεις, ενώ οι δυσμενείς δράσεις αφορούν υψηλές συγκεντρώσεις, όπου η παραγωγή των ελευθέρων

ριζών εμποδίζει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να επαναφέρει την ισορροπία (Hekimi et al, 2011).

Αναλυτικότερα, τα φαγοκύτταρα κατά τη διάρκεια μιας μόλυνσης απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες με σκοπό να καταστρέψουν παθογόνους μικροοργανισμούς και ξενιστές που έχουν εισβάλει στον οργανισμό, αποτελώντας έτσι στοιχεία του αμυντικού συστήματος (Pham – Huy et al, 2008). Ακόμα, τα διάφορα δραστικά είδη εμπλέκονται σε μια ποικιλία σηματοδοτικών μονοπατιών και επικοινωνίας. Η πιο γνωστή ρίζα που δρα ως σηματοδοτικό μόριο είναι το μονοξειδίο του αζώτου. Επιπλέον, λαμβάνουν δράση και σε κυτταρικές διαδικασίες, καθώς ελέγχουν την απόπτωση και τον πολλαπλασιασμό μέσω του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, τη μετανάστευση των κυττάρων και τη διαφοροποίηση βλαστοκυττάρων (Pizzino et al, 2017 ; Roy et al, 2017).

1.4.3 Αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

Τα δραστικά είδη οξυγόνου μπορούν να προκαλέσουν βλάβη σε βασικά μακρομόρια όπως είναι τα λιπίδια, τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες. (Hekimi et al, 2011).

1.4.3.1 Επίδραση στα νουκλεϊκά οξέα

Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι το DNA και το RNA είναι επιρρεπή σε οξειδωτικές βλάβες. Έχει αναφερθεί ότι, κυρίως στη γήρανση και στον καρκίνο το DNA αποτελεί το βασικό στόχο (Lobo et al, 2010). Επιπλέον, από τη στιγμή που αυτό το μακρομόριο είναι ζωτικής σημασίας, υπάρχουν αποδείξεις ότι δεν είναι το πρώτο το οποίο δέχεται προσβολή από τις ελεύθερες ρίζες, το οποίο έγκειται στο γεγονός ότι προστατεύεται στη χρωματίνη από τη συνέργεια των ιστονών με άλλες πρωτεΐνες. Ακόμη, το DNA είναι πιο σταθερό σε σχέση με το RNA απέναντι στις ρίζες λόγω της δομής του που σχετίζεται με τη δίκλωνη φύση του (Gebicki, 2016).

Επιπλέον έχει εξακριβωθεί ότι το γενετικό υλικό των μιτοχονδρίων είναι πιο ευάλωτο στις προσβολές των ριζών από αυτό που βρίσκεται στον πυρήνα και σχετίζεται με την εμφάνιση διάφορων ασθενειών (Lobo et al, 2010). Αυτό συμβαίνει

επειδή βρίσκεται πιο κοντά στο σημείο παραγωγής των ελευθέρων ριζών (Poyton et al, 2009).

Βασικό αίτιο αποτελεί η ρίζα του υδροξυλίου που οδηγεί στην οξείδωση του σκελετού της δεοξυριβόζης και της αζωτούχου βάσης. Η οξείδωση του DNA μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες μεταλλάξεις, σε θραύσεις στις έλικες, βλάβες στις πουρίνες και στο σύστημα επιδιόρθωσης και αυτό επιφέρει αντίκτυπο σε διαδικασίες τόσο της αντιγραφής και της μεταγραφής όσο και στα αρχικά στάδια της μετάφρασης (Pizzino et al, 2017).

Η οξειδωτική βλάβη οδηγεί στο σχηματισμό διάφορων τροποποιημένων βάσεων όπως είναι 2-υδροξυαδενίνη, 8-οξοαδενίνη, η 5-υδροκυστεΐνη (Liguori et al, 2018). Μια κοινή μέθοδος εξακρίβωσης για το εάν υπάρχει βλάβη στο γενετικό υλικό είναι η μέτρηση των επιπέδων της 8 υδροξυγουανοσίνης (8-OH-dG), η οποία συσσωρεύεται στο DNA και είναι υπεύθυνη για μεταλλαξιγένεση και για την απώλεια της επιγενετικής πληροφορίας, καθώς ένα τμήμα της νησίδας CpG μεθυλιώνεται (Poyton et al, 2009).

1.4.3.2 Επίδραση στα λιπίδια

Στην περίπτωση των λιπιδίων, η οξείδωση συστατικών της λιπιδικής μεμβράνης θεωρείται ως ένας σημαντικός παράγοντας για την καταστροφή του κυττάρου καθώς προκαλείται ανεξέλεγκτη αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσής, που η καταστροφή του ενός μορίου οδηγεί στην καταστροφή του επόμενου (Gebicki, 2016). Η λιπιδική υπεροξειδωση αναφέρεται σε μια διαδικασία κατά την οποία οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν λιπίδια που έχουν δεσμό άνθρακα – άνθρακα, ιδίως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs). Όσο μεγαλύτερος ο αριθμός των διπλών δεσμών στα λιπαρά οξέα τόσο πιο γρήγορα υπεροξειδώνονται.

Τα PUFAs είναι συνδεδεμένα με φωσφολιπίδια και αποτελούν δομικά βασικά συστατικά των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών. Πολλά από τα χαρακτηριστικά που έχουν να κάνουν με τη διαπερατότητα των μεμβρανών σχετίζονται με την ακεραιότητα και την πυκνότητα της διπλοστοιβάδας των λιπιδίων. Η διαπερατότητα των μεμβρανών επιτρέπει σε προϊόντα του μεταβολισμού και άλλων συστατικών να βρίσκονται και να κινούνται μέσα ή έξω από το κύτταρο. Βλάβη στα PUFAs συνεπάγεται απώλεια της σταθερότητας και ρευστότητας της μεμβράνης, και γενικότερη απώλεια λειτουργίας του κυττάρου και του οργανιδίου, καθώς υπάρχει μη σωστή εναπόθεση ιόντων ασβεστίου

και πρωτονίων, με αποτέλεσμα την ελλιπή λειτουργία μεμβρανικών ενζύμων (Agmon et al., 2018).

Οι δύο πιο δραστικές ρίζες έναντι των λιπιδίων είναι η ρίζα του υδροξυλίου και η ρίζα του περοξυνιτρίτη. Η όλη διαδικασία της υπεροξειδωσής των λιπιδίων διακρίνεται σε τρία στάδια, την έναρξη, την προαγωγή και τον τερματισμό (Santo et al, 2016). Κατά τη διάρκεια αυτή της αλυσιδωτής αντίδρασης σχηματίζονται διάφορες ενδιάμεσες ενώσεις όπως είναι τα αλκάνια, οι μαλονδιαλδεΐδες, και τα ισοπρένια. Αυτά τα μόρια χρησιμοποιούνται ως δείκτες στα πρωτόκολλα εύρεσης των επιπέδων της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση διάφορων ασθενειών όπως νευρολογικών διαταραχών και διαβήτη (Lobo et al, 2010).

1.4.3.3 Επίδραση στις πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι τα πιο συνηθισμένα βιομόρια που προσβάλλονται από τα δραστικά είδη οξυγόνου ιδίως τη ρίζα του υδροξυλίου και άλλους ισχυρούς οξειδωτικούς παράγοντες (Gebicki, 2016).

Αυτή η κατηγορία μακρομορίων οξειδώνεται και τροποποιείται με τρεις τρόπους: α) οξείδωση ορισμένων αμινοξέων, με τα αμινοξέα μεθειονίνη, κυστεΐνη, αργινίνη και ιστιδίνη να είναι περισσότερο ευάλωτα στην οξείδωση, β) με την αποκοπή πολυπεπτιδικής αλυσίδας και γ) το σχηματισμό νέων ενώσεων πρωτεϊνών με προϊόντα που προκύπτουν από τη λιπιδική υπεροξειδωση (Santo et al, 2016).

Με την οξείδωση των πρωτεϊνών προκύπτουν καρβονύλια και άλλα τροποποιημένα αμινοξέα συμπεριλαμβανομένων των σουλφιδίων μεθειονίνης και περοξειδίων πρωτεϊνών. Η οξείδωση των πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα να μην απομακρύνονται τα κατεστραμμένα μόρια από το πρωτεάσωμα, να παρατηρείται η συσσώρευσή τους και μέσω της μεταβολής της ενεργότητας των ενζύμων, των υποδοχέων και των μεμβρανικών μεταφορέων να διαταράσσονται μηχανισμοί ρύθμισης και έλεγχοι της κυτταρικής σηματοδότησης (Lobo et al, 2010).

Ένας χρήσιμος μάρτυρας ελέγχου των επιπέδων της καταστροφής των πρωτεϊνών είναι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Είναι εύκολα ανιχνεύσιμα ύστερα από την αντίδραση με 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH) (Poyton et al, 2009). Σχηματίζονται από την αντίδραση Fenton όταν οξειδωτικά αντιδρούν με τα αμινοξέα λυσίνη, αργινίνη, προλίνη, θρεονίνη (Liguori et al, 2018).

1.5 Αντιοξειδωτικά

Στους μηχανισμούς άμυνας έναντι των δραστικών μορφών περιλαμβάνονται μηχανισμοί πρόληψης, μηχανισμοί επιδιόρθωσης, η φυσική άμυνα και οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί (Valko et al, 2007). Ο ανθρώπινος οργανισμός έχει αναπτύξει ένα εξαιρετικά περίπλοκο αντιοξειδωτικό σύστημα το οποίο λειτουργεί συνεργειακά και σε συνδυασμό με άλλες εξωγενείς ουσίες για να προστατέψει το κύτταρο και τον οργανισμό έναντι στην οξειδωτική καταστροφή (Rahman, 2007).

Η ιδέα ενός βιολογικού αντιοξειδωτικού αναφέρεται στο ότι «οποιαδήποτε ένωση η οποία είναι παρούσα σε μικρή συγκέντρωση συγκριτικά με το προς οξείδωση υπόστρωμά του, είναι ικανή να αποτρέψει ή να καθυστερήσει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος» (Halliwell & Gatteridge, 1999). Οι λειτουργίες των αντιοξειδωτικών έγκεινται στο γεγονός ότι αντιμετωπίζουν το οξειδωτικό στρες, περιορίζουν τις μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό, αποτρέπουν τις αλλαγές στη δομή των μορίων, καθώς ελαττώνουν και άλλες παραμέτρους της οξειδωτικής βλάβης (Piroschi & Pop, 2015).

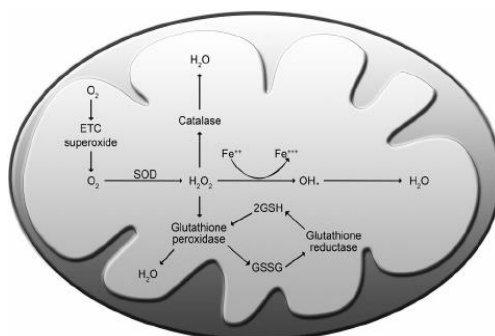
Τα αντιοξειδωτικά ασκούν τη δράση τους με διαφορετικούς μηχανισμούς. Αναλυτικότερα, ένα αντιοξειδωτικό δύναται να εξαλείψει άμεσα μια ρίζα δρώντας ως δότης ηλεκτρονίων και διακόπτοντας την αλυσιδωτή αντίδραση. Επιπρόσθετα, ένας μηχανισμός αφορά τη δυνατότητα να δημιουργήσει σταθερά μόρια δίνοντας πρωτόνια καθώς και να συμβάλει στην επιδιόρθωση των οξειδωτικών βλαβών και να περιορίσει τη διαθεσιμότητα χηλικών μετάλλων (Pham-Huy et al, 2008). Ακόμη θα πρέπει να ενεργεί και σε υδατικό και σε λιποδιαλυτό περιβάλλον (Rahman, 2007).

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με πολλούς τρόπους. Βασιζόμενοι στην ενεργότητα, μπορούν να ταξινομηθούν σε ενζυμικά και σε μη ενζυμικά. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά δρουν ως δότες ηλεκτρονίων εξουδετερώνοντας άμεσα τις ελεύθερες ρίζες. Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά λειτουργούν διακόπτοντας την αλυσιδωτή αντίδραση. Άλλος τρόπος ομαδοποίησης είναι με βάση την ικανότητα διάλυσής σε υδατικούς και μη διαλύτες (Nimse & Pal, 2015).

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν επίσης με βάση το μέγεθός τους, σε μικρομοριακά και σε μακρομοριακά. Τελευταίος διαχωρισμός των αντιοξειδωτικών είναι η πηγή προέλευσής τους, η οποία μπορεί να είναι είτε ενδογενής είτε εξωγενής (Nimse & Pal, 2015).

1.5.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SuperOxide Dismutase, SOD), η καταλάση (Catalase, CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR) (**Εικόνα 8**).



Εικόνα 8: Ενδογενή ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί (Morris, 2014).

Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD)

Οι δισμουτάσες του υπεροξειδίου είναι στενά συνδεδεμένα ένζυμα τα οποία καταλύουν τη διάσπαση του ιόντος του σουπεροξειδίου σε οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου και είναι παρόντα σε όλα τα αερόβια κύτταρα. Αποτελούνται από τρεις διακριτές οικογένειες βασιζόμενα στο συμπάραγοντα, ο οποίος είναι ένα μέταλλο, που χρησιμοποιείται: Cu/Zn, Fe και Mn καθώς και ο τύπος Ni το οποίο συνδέεται με νικέλιο. Η MnSOD έχει βρεθεί κυρίως στα μιτοχόνδρια και στα υπεροξειδισώματα. Η FeSOD εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα και η CuZnSOD στα υπεροξειδισώματα και στο κυτοσόλιο (Valko et al, 2007).

Επιπλέον, έχουν βρεθεί 3 τύποι SOD να είναι παρούσες στο κύτταρο. Η SOD1 στο κυτταρόπλασμα, η SOD2 στα μιτοχόνδρια και η SOD3 εξωκυτταρικά, με τη SOD1 και SOD3 να περιέχουν χαλκό και ψευδάργυρο στο ενεργό κέντρο τους, ενώ η SOD2 να περιέχει μαγγάνιο. Η αντίδραση την οποία καταλύει είναι η εξής: (**Εικόνα 9**) (Obeagu et al, 2018)



Εικόνα 9: Η αντίδραση κατάλυσης της SOD προς σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου (Obeagu et al, 2018).

Καταλάση (CAT)

Οι κύριες οδοί για την αποικοδόμηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου περιλαμβάνουν την καταλάση (CAT), την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και τις περοξειρεδοξίνες. Σχετικά με την καταλάση, είναι το ένζυμο το οποίο συναντάται σε όλους του ζωντανούς οργανισμούς οι οποίοι εκτίθενται στο οξυγόνο, με κύρια λειτουργία την αποικοδόμηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο. Το υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι μια επιβλαβής μη ρίζα που θα πρέπει να μετατραπεί σε ένα μη δραστικό προϊόν πολύ γρήγορα για να προληφθεί η ακεραιότητα του κυττάρου. Βρίσκεται σε όλα τα όργανα των οργανισμών, με μεγαλύτερη συγκέντρωση στο ήπαρ (Lobo et al, 2010).

Σύστημα της γλουταθειόνης (Glutathione System)

Το σύστημα της γλουταθειόνης συνίσταται από τρία βασικά ενδογενή ένζυμα, τη ρεδοκτάση της γλουταθειόνης, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και τη S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης. Αυτό το σύστημα έχει βρεθεί παρόν σε ζώα, φυτά και μικροοργανισμούς (Obeagu et al, 2018). Και τα τρία αυτά ένζυμα εντοπίζονται σε μέγιστα επίπεδα στο ήπαρ και συμμετέχουν στην αποτοξικοποίηση του οργανισμού (Lobo et al, 2010).

Η περοξειδάση της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο που χρησιμοποιεί ως συμπαράγοντα 4 σελήνια και καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και άλλων οργανικών υπεροξειδίων. Υπάρχουν τέσσερα τουλάχιστον ισοένζυμα με την περοξειδάση I να είναι η επικρατέστερη και να δρα έναντι του H_2O_2 , ενώ η περοξειδάση IV να δρα αποτελεσματικότερα έναντι οξειδωμένων λιπιδίων (Deponte, 2013).

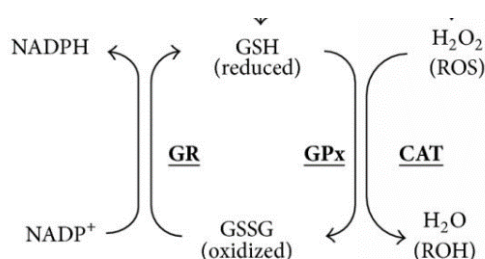
Η S τρανσφεράση της γλουταθειόνης εμφανίζει υψηλή ενεργότητα έναντι οξειδωμένων λιπιδίων και καταλύει το σχηματισμό ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) από ηλεκτρόφιλα άτομα αζώτου, άνθρακα και θείου (Oakley, 2005). Όσον αφορά τη

ρεδουκτάση της γλουταθειόνης είναι μια ομοδιμερής αιμοπρωτεΐνη με δύο ενεργές πλευρές, όπου στη μία πλευρά το FAD συνδέεται με το NAPH για να μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα και στην άλλη πλευρά έχει άλλο ένα μόριο FAD το οποίο χρησιμεύει για το διαμερισμό της. Ρόλος της είναι να ανάγει την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) στην ανηγμένη μορφή της (GSH) (Deponte, 2013).

1.5.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Γλουταθειόνη (GSH)

Είναι η πιο άφθονη θειόλη στους ζώντες οργανισμούς, είναι μικρού μοριακού βάρους και αποτελεί το κυριότερο μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό. Δεν προσλαμβάνεται από τη διατροφή αλλά σχηματίζεται de novo από τρία αμινοξέα, τη γλυκίνη, την κυστεΐνη και το γλουταμινικό οξύ. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα. Βρίσκεται κυρίως στην ανηγμένη της μορφή, ενώ μπορεί να οξειδωθεί σε GSSG και ο κύκλος της ελέγχεται από τα ένζυμα GPx και GR (*Εικόνα 10*). Ο λόγος GSH/GSSG είναι σταθερό και τυχόν μεταβολή του αποτελεί δείκτη διαταραχής της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Η αντιοξειδωτική της ικανότητα οφείλεται στην σουλφυδρυλική ομάδα που έχει, με αποτέλεσμα όταν συναντά μια ρίζα να λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων. Ο βαθμός οξείδωσής της επηρεάζει μια σειρά από κρίσιμες διαδικασίες της κυτταρικής σηματοδότησης και ανάπτυξης του κυττάρου (Lobo et al, 2010).



Εικόνα 10: Το σύστημα της γλουταθειόνης (Simpson et al., 2015).

Βιταμίνες A, C, E

Η βιταμίνη C ή ασκορβικό οξύ προσλαμβάνεται μέσω της διατροφής καθώς ο άνθρωπος και άλλα ανώτερα θηλαστικά δεν έχουν την ικανότητα να τη συνθέσουν

λόγω της στέρησης ενός ενζύμου (Lobo et al, 2010). Είναι υδατοδιαλυτή, ισχυρό αντιοξειδωτικό καθώς δρα εκτός και εντός των κυττάρων και αποτελεί συμπράγοντα σε αρκετές υδροξυλάσες. Βρίσκεται κυρίως στην ανηγμένη μορφή της καθώς αλληλεπιδρά με τη γλουταθειόνη (Obeagu et al, 2018).

Η βιταμίνη Ε περιλαμβάνει δύο λιπόφιλες ομάδες, τις τοκοφερόλες και τις τοκονιетроλές, συγκροτώντας μια οικογένεια 8 μορίων. Η βασικότερη των οποίων είναι η α-τοκοφερόλη, η οποία είναι η πιο καλά μελετημένη και παρουσιάζει μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα στον οργανισμό. Ρόλος των τοκοφερολών είναι η προστασία των κυττάρων από τη λιπιδική περοξειδωση, διατηρώντας ακέραιες τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας και αμετάβλητες τις κυτταρικές μεμβράνες (Obeagu et al, 2018).

Η βιταμίνη Α ανήκει στην κατηγορία των λιποδιαλυτών αντιοξειδωτικών και προσλαμβάνεται είτε αυτούσια μέσω της τροφής είτε ως β-καροτένιο, το οποίο αποτελεί σημαντικό πρόδρομο μόριο για τη σύνθεσή της (Grune et al, 2010).

Ουρικό Οξύ

Αποτελεί τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών και είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό του πλάσματος. Θεωρείται ότι κατά την εξέλιξη αντικατέστησε το ασκορβικό. Όπως και το ασκορβικό, το ουρικό είναι ικανό να ανακόπτει την παραγωγή ριζών (Obeagu et al, 2018). Έτσι, αποτρέπει τα επιβλαβή αποτελέσματα που θα επέφεραν οι διαδικασίες της αυτοοξειδωσης των αιμοσφαιρινών και την παραγωγή περοξειδίων από τα μακροφάγα, καθώς αντιμετωπίζει επιτυχώς ρίζες όπως το μονήρες οξυγόνο, τα περοξύλια και τη ρίζα του υδροξυλίου, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων από τη λιπιδική περοξειδωση (Piroschi et al, 2015).

Καροτενοειδή

Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα οφείλεται στο πιο σημαντικό χαρακτηριστικό της δομής τους που είναι οι εναλλαγές μονών και διπλών ηλεκτρονίων, γεγονός που τα καθιστά ιδανικούς δότες ηλεκτρονίων για την αντιμετώπιση ριζών (Rahman, 2007). Το πιο σημαντικό μόριο σε αυτήν την κατηγορία είναι το β-καροτένιο το οποίο αποτελεί πρόδρομο για τη βιταμίνη Α, είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό και είναι υπεύθυνο για την

προστασία του δέρματος. (Piroschi et al, 2015). Η κύρια ρίζα που αντιμετωπίζει και απενεργοποιεί με επιτυχία αυτή η κατηγορία είναι το μονήρες οξυγόνο (Rahman, 2007).

Φαινολικές ενώσεις

Είναι μια τεράστια οικογένεια ενώσεων μικρού μοριακού βάρους και αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά, που παράγονται ως αμυντικός μηχανισμός σε εξωτερικούς παράγοντες. Τα φλαβονοειδή είναι παράγωγα γ-βενζοπυρενίων και αποτελούνται από ένα χαρακτηριστικό βενζοϊκό δακτύλιο με μια ομάδα φαινόλης και κατά το μεταβολισμό τους υπόκεινται σε μεθυλίωση, σε γλυκουρονισιδίωση, θειόλυση. Η βιολογική δράση τους σχετίζεται με τον αριθμό, τη θέση και τη φύση της ομάδας του υδροξυλίου που έχουν. (Rahman, 2007).

Μελατονίνη

Είναι μια φυσική ορμόνη που συναντάται στα ζώα και σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς, περιλαμβανομένου της άλγης. Αποτελεί ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό το οποίο μπορεί εύκολα να διαπεράσει κυτταρικές μεμβράνες και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Σε αντίθεση με άλλα αντιοξειδωτικά, η μελατονίνη δεν δύναται να αναγεννηθεί και συνεπώς όταν οξειδωθεί, δε μπορεί να επανέλθει στην ανηγμένη της μορφή (Lobo et al, 2010).

1.6 Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες απασχολούσε χρόνια τον τομέα της οξειδοαναγωγικής βιολογίας και φαρμακολογίας ώσπου τα τελευταία 30 χρόνια υπήρξε ένας καταγισμός πληροφοριών επί του θέματος. Το 1991 εκδόθηκε το βιβλίο «Oxidative Stress» από το Helmut Sies όπου σε αυτό αναφέρεται ο πρώτος ορισμός που δόθηκε για το φαινόμενο

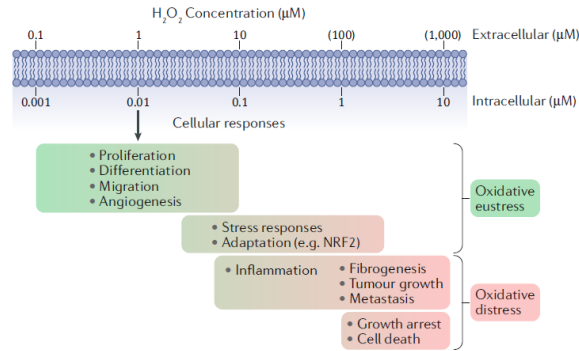
αυτό, ως «η ανισορροπία στην παραγωγή των προοξειδωτικών σε σχέση με τα αντιοξειδωτικά, υπέρ των προοξειδωτικών» (Sies, 2015).

Τα χρόνια που ακολούθησαν δόθηκε προσοχή στην βλάβη των κυττάρων και των οργάνων που σχετίζονταν με αντιδράσεις οξείδωσης. Επόμενο βιβλίο σταθμός ήταν το “Biochemistry of Oxidative Stress” το οποίο επικεντρωνόταν στο σωστό και τεκμηριωμένο χαρακτηρισμό των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών, καθώς και τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούσαν, της ενδογενείς και εξωγενείς πηγές (Sies, 2018).

Ύστερα από κάποιες δεκαετίες που έγιναν περισσότερες ανακαλύψεις για τη κυτταρική σηματοδότηση και τη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, ο αρχικός ορισμός αναθεωρήθηκε το 2006 και έτσι διατυπώθηκε εκ νέου ένας νέος ορισμός του οξειδωτικού στρες, ο οποίος είναι η ανισορροπία μεταξύ των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών, υπέρ των οξειδωτικών, οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου ή/και μοριακή βλάβη (Sies, 2018).

Το οξειδωτικό στρες προκαλούμενο από την ανισορροπία οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών, έχει συνδεθεί με πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως είναι καρδιαγγειακά νοσήματα, καρκίνος, νευρολογικές διαταραχές, φλεγμονές, διαβήτη και νοσήματα που σχετίζονται με τη γήρανση (Krumona & Cosa, 2016). Αυτή η ανισορροπία μπορεί να συμβαίνει α) λόγω αυξημένων επιπέδων συστατικών που αυτοοξειδώνονται με αποτέλεσμα την παραγωγή ROS, β) λόγω μειωμένου αριθμού αντιοξειδωτικών, γ) λόγω απενεργοποίησης αντιοξειδωτικών ενζύμων και δ) λόγω μειωμένης παραγωγής αντιοξειδωτικών (Luschak, 2014).

Από τον ανανεωμένο ορισμό μπορεί το οξειδωτικό στρες να κατηγοριοποιηθεί ως το φυσιολογικό οξειδωτικό στρες (eustress) και ως επιζήμιο σε βασικά μακρομόρια (distress) (**Εικόνα 11**). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις και με πλήρη ισορροπία οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών επικρατεί οξειδωτική σηματοδότηση, στοχεύοντας συγκεκριμένους στόχους, ενώ σε υψηλή έκθεση διακόπτεται η οξειδοαναγωγική σηματοδότηση και καταστρέφονται μόρια μη στόχοι, το οποίο αποτελεί παράδειγμα της φράσης του Παράκελσου, ότι η δόση κάνει το δηλητήριο (Sies, 2018).

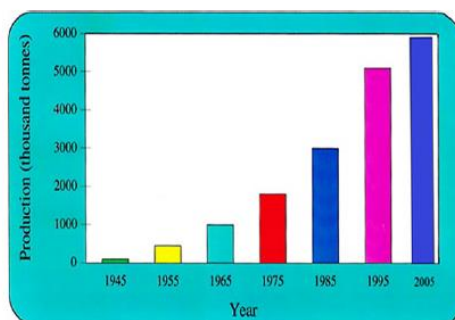


Εικόνα 11: Κατηγοριοποίηση του οξειδωτικού στρες ανάλογα της έντασής του. (Sies, 2020).

Εκεί που γίνεται αναφορά για φυσιολογική λειτουργία υπό ελεγχόμενη έκθεση στις ελεύθερες ρίζες, ένα ενδιαφέρον φαινόμενο είναι αυτό της όρμησης (hormesis), όπου τα κύτταρα έχουν αναπτύξει προσαρμοστικούς μηχανισμούς έναντι των ριζών επάγοντας κυτταρικές διαδικασίες και τροποποιώντας τη γονιδιακή τους έκφραση (Sies, 2018). Δεδομένου ότι η υπέρμετρη έκθεση στις ρίζες είναι επιζήμια και ότι η δόση κάνει το δηλητήριο, προκύπτει πως εκτεταμένη σε διάρκεια αυξημένη αντιοξειδωτική άμυνα οδηγεί τον οργανισμό στην κατάσταση του αναγωγικού στρες (Perez-Tores, 2017).

1.7 Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα (PPPs) – Παρασιτοκτόνα

Τα παρασιτοκτόνα είναι σημαντικά φυτοφάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στις σύγχρονες τεχνικές αγροκαλλιέργειών ελέγχοντας τα ζιζάνια και διάφορα είδη παρασίτων που επηρεάζουν τις καλλιέργειες (Vera-Herrera et al, 2021). Αποτελούν πλέον σημαντικό στοιχείο της παγκόσμιας γεωργίας επιτρέποντας την αύξηση της σοδειάς και της παραγωγής φαγητού (Εικόνα 12) (Carvahlo, 2017).



Εικόνα 12: Απεικόνιση της παραγωγής γεωργικών φαρμάκων (Carvahlo, 2017).

Σύμφωνα με μια εκτίμηση, 2.35 δις κιλά φυτοφαρμάκων χρησιμοποιούνται κάθε χρόνο (Kaur et al, 2019).

Τα παράσιτα μπορούν να οριστούν όσα φυτά, ζώα ή μικροοργανισμοί δύνανται να προκαλέσουν ζημιά στα καλλιεργήσιμα προϊόντα και στην υγεία (Kaur et al, 2019). Τα παρασιτοκτόνα έχουν συνεισφέρει στην αύξηση της αποτελεσματικότητας, της παραγωγικότητας της ποιότητας και μπορούν:

- Να προστατέψουν τα φυτά ή τους φυτικούς οργανισμούς από κάθε είδους βλαβερούς οργανισμούς.
- Να επηρεάσουν τις βιολογικές διεργασίες των φυτών εκτός αν πρόκειται για θρεπτικές ουσίες.
- Να διατηρήσουν τα φυτικά προϊόντα εκτός αν πρόκειται για ουσίες – συντηρητικά.
- Να καταστρέψουν μέρη των φυτών ή να καταστείλουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξή τους (Pogacean & Gavrilescu, 2009).

1.7.1 Χρήση Παρασιτοκτόνων: Από το παρελθόν έως το σήμερα

Η πρώτη καταγεγραμμένη χρήση χρονολογείται πριν από 4500 χρόνια από τους Σουμέριους ελέγχοντας έντομα με ενώσεις θείου. Η έλλειψη γνώσεων για χημικές διεργασίες, είχε ως συνέπεια όλα τα προϊόντα να προέρχονταν απευθείας από ζώα, φυτά και πηγές μετάλλων (Tudi et al, 2021). Στα μέσα του 1800, οι αγρότες στις ΗΠΑ, χρησιμοποιούσαν συγκεκριμένα χημικά όπως σουλφίδια νικοτίνης, μεταρσενικού χαλκού και ενώσεις θείου για να προστατέψουν τις καλλιεργήσιμες εκτάσεις τους όμως απέβαιναν άκαρπες λόγω των μεθόδων και της τοξικότητας αυτών των ουσιών (Kaur et al, 2019).

Η κύρια ανάπτυξη παρασιτοκτόνων έγινε την περίοδο στα μέσα και μετά του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, όπου σχεδιάστηκαν και παράχθηκαν αποτελεσματικά και φθηνά φυτοφάρμακα. (Delaplane 2000). Ωστόσο, από το 1962 και μετά παρατηρήθηκε μειωμένη ανάπτυξη νέων παρασιτοκτόνων, καθώς το ευρύ κοινό άρχισε να προβληματίζεται για τους ενεχόμενους περιβαλλοντικούς κινδύνους.

Στα τέλη του 1960, συγκροτήθηκε ένας νέος τρόπος διαχείρισης των παρασίτων, IPM (Integrated Pest Management), η οποία είναι μια μέθοδος χρήσης βιολογικών φορέων για τον έλεγχο των παρασίτων. (Mahmood et al, 2016). Στις

μοντέρνες αγροκαλλιέργειες, η έρευνα στοχεύει στην ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων φυτών που θα είναι σχεδιασμένα να μπορούν να ανταπεξέλθουν από επιθέσεις παρασίτων και περιβαλλοντικών καταπονήσεων. (Tudi et al, 2021).

1.7.2 Κατηγοριοποίηση των παρασιτοκτόνων

Τα φυτοφάρμακα διαφέρουν μεταξύ τους και κατηγοριοποιούνται με βάση τη χημική τους ταυτότητα, τη λειτουργική τους ομάδα, τον τρόπο δράσης και την τοξικότητα (Kim et al, 2016)

Χημική Δομή

Τα παρασιτοκτόνα έχουν σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να μιμούνται και να αντικαθιστούν μόρια σε συγκεκριμένες βιολογικές αντιδράσεις. Με βάση τη δομή τους, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες.

- Ανόργανες ενώσεις
- Οργανομεταλλικές ενώσεις
- Οργανικές ενώσεις (Με προέλευση φυτά, βακτήρια)

Παρασιτοκτόνα με παρόμοια δομή έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά και συνήθως παρόμοιο τρόπο δράσης (Pogacean & Gavrilescu, 2009).

Οργανισμός – Στόχος

Τα παρασιτοκτόνα διακρίνονται σε διάφορους τύπους ανάλογα με τον επιθυμητό οργανισμό που πρέπει να αντιμετωπίσουν όπως φαίνεται στον **Πίνακα 5**.

Πίνακας 5: Οι πιο συνηθισμένες κατηγορίες φυτοφαρμάκων ανάλογα με τον οργανισμό στόχο στον οποίο δρουν (Rogasean & Gavrilescu, 2009).

Τάξη	Στόχοι και Χαρακτηριστικά	Κατηγορίες
Ζιζανιοκτόνα	Δραστικές ουσίες που καταστρέφουν τα ζιζάνια και να αναστέλλουν την ανάπτυξή τους.	Οργανοχλωρίνες, Οργανοφωσφορικά, Πυρεθροειδή, Καρβαμίδια
Μυκητοκτόνα	Απομακρύνουν τους μύκητες	Αλογονιωμένες ενώσεις, Καρβαμίδια, Διθειοκαρβαμίδια, Οργανοφωσφορικά
Εντομοκτόνα Αλγοκτόνα	Για τον έλεγχο των εντόμων Καταστρέφει και προλαμβάνει την ανάπτυξη των άλγεων	Ακαριοειδή, Νηματοειδή
Βιολογικά παρασιτοκτόνα	Λιγότερο τοξικά Μεγαλύτερη ειδικότητα Αποτελεσματικά σε μικρές δόσεις	Βιολογικοί φορείς (μικροβιακοί, φυτικοί) Φυσικά βιοχημικά μόρια
Ρυθμιστές Ανάπτυξης Φυτών	Για τη βελτίωση της σοδειάς, ταχύτερη ανάπτυξη, ρύθμιση μεγέθους προϊόντων	
Γενετικά Τροποποιημένα Φυτά	Μέσω της χρήσης της βιοτεχνολογίας	Ανθεκτικά στα ζιζάνια, σε έντομα, ιούς, καταπονήσεις περιβάλλοντος

Τρόπος εισαγωγής

Οι τρόποι εισαγωγής του παρασιτοκτόνου σχετίζονται με το πως το παράσιτο συναντά το φάρμακο και τυπικά παραδείγματα αναπαρίστανται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Τρόποι με τους οποίους το παρασιτοκτόνο μπορεί να εισαχθεί στον οργανισμό στόχο και να επηρεάσει την επιβίωση του (Yadav & Devi, 2017).

Συστημικά παρασιτοκτόνα	Απορροφώνται από τα φυτά ή ζώα και μεταφέρονται σε ιστούς. Μπορούν να εισέρθουν στο κύτταρο και να μετακινηθούν μεταξύ των συστημάτων για να αντιμετωπίσει τα παράσιτα.
Μη συστημικά (επαφής) παρασιτοκτόνα	Δρουν στο παράσιτο στόχο όταν έρχεται σε επαφή. Εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της επιδερμίδας και προκαλούν θάνατο από δηλητηρίαση.
Δηλητήρια στομάχου	Εισέρχονται στο σώμα ύστερα από κατάποση τροφής, μέσω του στόματος και του πεπτικού, η οποία είναι στα φύλλα ή άλλα μέρη του φυτού.
Υποκαπνιστικά	Δρουν μέσω της παραγωγής καπνού. Εισέρχονται στο σώμα μέσω της τραχειακής κοιλότητας με τη μορφή σωματιδίων προκαλώντας δηλητηρίαση.

Τρόπος δράσης

- Φυσικά δηλητήρια: Αυτή η τάξη καταστρέφει τα παράσιτα λόγω των εγγενών τοξικών ιδιοτήτων τους.
- Δηλητήρια που στοχεύουν περιεχόμενα του κυττάρου: Είναι υπεύθυνα για τον κατακερματισμό και καταστροφή κυτταρικών οργανιδίων.
- Δηλητήρια αναπνευστικού: Είναι χημικά που απενεργοποιούν ένζυμα του αναπνευστικού συστήματος.
- Δηλητήρια νευρικού συστήματος: Αναστέλλουν ή τροποποιούν τη μετάδοση νευρικών ώσεων.
- Αναστολείς χητίνης: Αναστέλλουν τη σύνθεση χητίνης, η οποία έχει δομικό ρόλο στο κύτταρο (Yadav & Devi, 2017).

Πηγή προέλευσης

Τα φυτοφάρμακα ταξινομούνται σε χημικά παρασιτοκτόνα και σε βιολογικά. Τα κύρια πλεονεκτήματα της χρήσης βιολογικών παρασιτοκτόνων είναι ότι έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα απέναντι στον οργανισμό στόχο, είναι φιλικά προς το περιβάλλον, προϋποθέτουν μικρότερη ποσότητα και δεν έχουν μεγάλη υπολειμματικότητα σε σχέση με τα συμβατικά χημικά. Ένα ακόμη σημαντικό πλεονέκτημα των βιολογικών φυτοφαρμάκων είναι ότι με τη χρήση τους είναι λιγότερο σύνηθες να αναπτύξουν τα παράσιτα αντίσταση λόγω γενετικής τροποποίησης (Yadav & Devi, 2017).

Τα βιολογικά παρασιτοκτόνα είναι μια ομάδα που έχουν προέλευση ζωική, φυτική και μικροβιακή και ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες:

- Μικροβιακά παρασιτοκτόνα
- Φυτικά παρασιτοκτόνα
- Βιοχημικά παρασιτοκτόνα (Yadav & Devi, 2017)

Εύρος δράσης

- Εκλεκτικά παρασιτοκτόνα, τα οποία δρουν μόνο σε συγκεκριμένα παράσιτα με ταυτόχρονη ελάχιστη έως καθόλου επίδραση σε άλλους οργανισμούς.
- Μη-εκλεκτικά παρασιτοκτόνα, τα οποία ελέγχουν ένα μεγάλο εύρος παρασίτων συμπεριλαμβανομένου οργανισμούς μη στόχους (Pogacean & Gavrilesu, 2009).

Τύπος μορφής

Τα παρασιτοκτόνα είναι μίγματα ενός ενεργού συστατικού (AI) και αδρανών άλλων. Τα ενεργά συστατικά είναι τα χημικά που έχουν στόχο να καταπολεμήσουν το παράσιτο στόχο, ενώ τα αδρανή συστατικά χρησιμοποιούνται και προστίθενται στη δραστική ουσία ώστε να γίνει πιο ασφαλής, αποτελεσματική και εύκολη η παρασκευή της και η εφαρμογή της κατά τη χρήση της. Τα παρασιτοκτόνα μπορούν να βρεθούν σε στερεή, υγρή και αέρια μορφή, ενώ κάποιες μορφές είναι απευθείας έτοιμες για χρήση ενώ κάποιες άλλες προϋποθέτουν μια προετοιμασία διάλυσης σε νερό ή κάποιο έλαιο προτού γίνει η εφαρμογή τους (Yadav & Devi, 2017).

Τοξικότητα

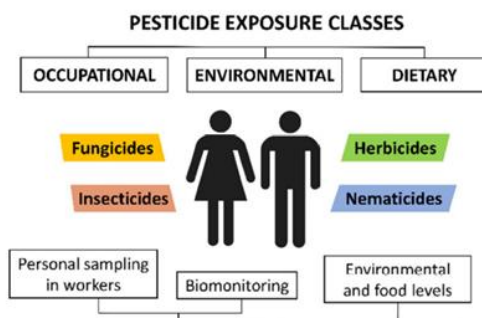
Βασιζόμενοι στο ρίσκο στην υγεία που μπορεί να φέρουν τα φυτοφάρμακα ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) τα κατατάσσει σε τέσσερις κατηγορίες (Εικόνα 13). (Yadav & Devi, 2017).

WHO class	Toxicity level	LD ₅₀ for the rat (mg/kg body weight)		Examples
		Oral	Dermal	
Class Ia	Extremely hazardous	<5	<50	Parathion, Dieldrin
Class Ib	Highly hazardous	5–50	50–200	Eldrin, Dichlorvos
Class II	Moderately hazardous	50–2000	200–2000	DDT, Chlordane
Class III	Slightly hazardous	>2000	>2000	Malathion
Class IV	Unlikely to present acute hazard in normal use	≥ 5000		Carbetamide, Cycloprothrin

Εικόνα 13: Τάξεις τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων με βάση κατηγοριοποίησης από το WHO (Yadav & Devi, 2017).

1.7.3 Έκθεση στα φυτοφάρμακα

Η έκθεση στα παρασιτοκτόνα μπορεί να συμβεί άμεσα σε χώρους εργασίας, σε καλλιεργήσιμες εκτάσεις και στο οικιακό περιβάλλον, ενώ μπορεί να συμβεί και έμμεσα μέσω της κατανάλωσης τροφής (Damalas & Eleftherohorinos, 2011).



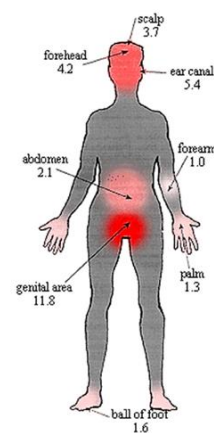
Εικόνα 14: Πιθανές πηγές έκθεσης σε φυτοφάρμακα (Vera-Herrera, 2021).

Έμμεση επαφή με τέτοιου είδους φάρμακα μπορεί να γίνει με την κατανάλωση φρούτων, λαχανικών και σιτηρών που δεν έχουν πλυθεί σωστά (**Εικόνα 14**). Ακόμη, μια διατροφική πηγή που μπορεί να περιέχει ελάχιστες ποσότητες σε παρασιτοκτόνα είναι τα ζώα και τα ψάρια τα οποία ζουν και τρέφονται σε περιβάλλοντα που γίνεται χρήση των φυτοφαρμάκων χωρίς προσοχή (Vera-Herrera et al, 2021).

Υπάρχουν 4 οδοί έκθεσης του ανθρώπινου οργανισμού σε φυτοφάρμακα:

- Μέσω δέρματος
- Από στόματος
- Μέσω αναπνοής
- Μέσω των οφθαλμών

Η τοξικότητα των φυτοφαρμάκων έγκειται στην περίοδο και στον τύπο έκθεσης του οργανισμού, καθώς επίσης και στη χημική σύνθεση της κάθε ουσίας που μπορεί να περιέχει (**Εικόνα 15**) (Vera-Herrera et al, 2021).



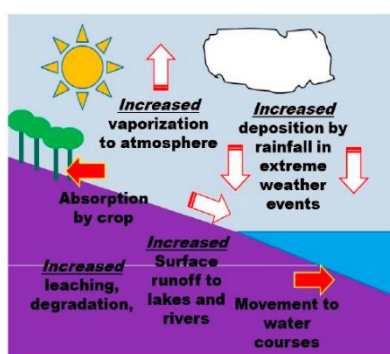
Εικόνα 15: Απεικόνιση του βαθμού εισαγωγής των παρασιτοκτόνων σε σημεία του σώματος (Kim et al, 2017)

1.7.4 Επίδραση στο περιβάλλον

Η εκτεταμένη εφαρμογή φυτοφαρμάκων από γεωργούς, βιομηχανίες και από το γενικό πληθυσμό αποτελούν αιτία μόλυνσης και συσσώρευσης των ουσιών αυτών στο περιβάλλον. (Yadav & Devi, 2017). Περίπου το 80% με 90% των παρασιτοκτόνων έχουν την ικανότητα να εξατμίζονται και να βρίσκονται σε μορφή σωματιδίων μερικές

μέρες μετά από την εφαρμογή τους με αποτέλεσμα να αποτελούν κίνδυνο για ζώα και φυτά που βρίσκονται στη ξηρά και σε υδάτινα συστήματα (Mahmood et al, 2016). Ακόμη, αυξημένη συχνότητα εφαρμογής, λανθασμένη χρονική στιγμή σε συνέργεια κακών περιβαλλοντικών συνθηκών έχουν συσχετιστεί με αρνητική επίδραση που μπορεί να έχουν τα φυτοπροστατευτικά (Damalas & Eleftherohorinos, 2011).

Τα φυτοφάρμακα όταν εισάγονται στο περιβάλλον μπορούν να αποσυντεθούν στις ουσίες από τις οποίες αποτελούνται και αυτές με τις σειρές τους να μεταφερθούν σε όλο το οικοσύστημα (*Εικόνα 16*) (Tudi et al, 2021).



Εικόνα 16: Τρόποι με τους οποίους τα φυτοφάρμακα μπορούν να μεταφερθούν σε ευρύτερη περιοχή πέρα από το σημείο εφαρμογής τους (Tudi et al, 2021).

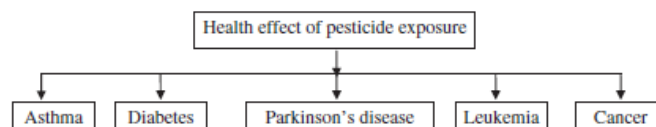
1.7.5 Επίδραση στην υγεία του ανθρώπου

Παγκοσμίως υπολογίζεται ότι 25 εκ επαγγελματίες που ασχολούνται με τις αγροκαλλιέργειες δηλητηριάζονται κάθε χρόνο από την επαφή τους με τα φυτοφάρμακα, ενώ υπολογίζεται ότι 1.8 δις άνθρωποι ασχολούνται από μόνοι τους με τις καλλιέργειες και χρησιμοποιούν παρασιτοκτόνα για να προστατέψουν τις σοδειές τους (Carvahlo, 2017).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι δεν είναι όλος ο γενικός πληθυσμός το ίδιο ευάλωτος στην έκθεση σε φυτοφάρμακα. Πιο συγκεκριμένα, τα νεογνά, τα μικρά παιδιά και οι επαγγελματίες σε χώρους καλλιεργειών, όπου η πρώτη ομάδα δεν έχει τόσο ανεπτυγμένη άμυνα ενώ οι επαγγελματίες έρχονται σε επαφή καθημερινά με μεγάλες συγκεντρώσεις και ποικιλία φαρμάκων, δεν αποτοξικοποιούν πλήρως τις ξενοβιοτικές αυτές ουσίες, με αποτέλεσμα να μην αποβάλλονται και να μεταφέρονται σε όλο το σώμα τους μέσω του κυκλοφορικού (Kaur et al, 2019).

Τα αρνητικά αποτελέσματα από την έκθεση σε παρασιτοκτόνα μπορούν να διακριθούν σε άμεσα και χρόνια. Όσον αφορά τις άμεσες επιδράσεις, αρκεί μία μόνο

έκθεση σε μεγάλη συγκέντρωση στη χημική ουσία, ενώ οι χρόνιες συνέπειες έρχονται έπειτα από μακροχρόνια έκθεση του οργανισμού στην ουσία σε μικρές συγκεντρώσεις (*Εικόνα 17*) (Bonner & Alavanja, 2017). Κάποια ασθένεια ή διαταραχή που σχετίζεται με χρόνια έκθεση μπορεί να οφείλεται στις ιδιότητες της ουσίας να προκαλεί γενετική βλάβη, να επάγει επιγενετικές τροποποιήσεις, να δρα ως ενδοκρινής διαταρράκτης και να προκαλεί οξειδωτικό στρες (Mostafalou & Abdollahi, 2013).



Εικόνα 17: Τυπικά παραδείγματα ασθενειών έπειτα από μακροχρόνια έκθεση σε γεωργικά φάρμακα (Kim et al, 2017).

1.7.6 Ρυθμιστικό πλαίσιο για τα παρασιτοκτόνα και ασφάλεια

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση προκειμένου να εγκριθούν τα υποψήφια φυτοφάρμακα θα πρέπει να είναι εναρμονισμένα με το νόμο 1107/2009, για την εναρμονισμένη χρήση των ουσιών και στο νόμο 395/2006 που σχετίζεται με τα ανώτερα όρια υπολειμματικότητας της ουσίας στα τρόφιμα και στο περιβάλλον (Kudsk & Mathiassen, 2020).

Κάποιες από τις προϋποθέσεις που πρέπει να ικανοποιούν πριν βγουν στη αγορά είναι ότι δεν πρέπει να ενέχουν κάποιο κίνδυνο για τον άνθρωπο και τα υπόλοιπα ζώα. Ειδικότερα να μην κατατάσσονται ως μεταλλαξιογόνα στις κατηγορίες 1A ή 1B, ως καρκινογόνα στις κατηγορίες 1A ή 1B και τοξικά για την αναπαραγωγή και να μην υπάρχουν υποψίες ότι μπορεί να δράσουν ως ενδοκρινείς διαταρράκτες. Όσον αφορά μόνο τη δραστική ουσία, εάν θεωρείται οργανικός ρυπαντής, ισχυρά τοξική και πολύ βιοσυσσωρεύσιμη, δεν επιτρέπεται η κυκλοφορία της (Pelaez et al., 2013).

1.8 Ζιζανιοκτόνα

1.8.1 Dicamba

Το dicamba με τη χημική ονομασία του να είναι 3,6-διχλωρο-μεθοξυβενζοϊκό οξύ, είναι ένα εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο με ευρύ φάσμα δράσης σε πλατύφυλλα φυτά. Είναι μια συνθετική ένωση αυξίνης που μιμείται τη φυσική φυτική ορμόνη, δρώντας

αγωνιστικά και προωθώντας την ανάπτυξη των κυττάρων και τη σύνθεση πρωτεϊνών. Απορροφάται ταχύτατα από τα φύλλα, τις ρίζες και το βλαστό του φυτού, με αποτέλεσμα μη κανονική κυτταρική αύξηση, απώλεια φύλλων, μειωμένη εισροή θρεπτικών και εν τέλει θάνατο του φυτού (Riter et al., 2021).

Το dicamba είναι εξαιρετικά πτητική ένωση και έτσι μπορεί να προσβάλει φυτά μη στόχους, όμως είναι περιβαλλοντικά φιλικό προϊόν και έχει ελάχιστη τοξικότητα στον άνθρωπο και σε άλλα ζώα. Η πιο πιθανή βλάβη που μπορεί να προκαλέσει είναι μέσω άμεσης τοξικότητας λόγω κατάποσης (Carbonari et al., 2020).

1.8.2 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid (2,4- D)

Το 2,4 D φυτικοχημικά είναι μια οργανοχλωριωμένη ένωση με ιόν φαινοξικού, η οποία μπορεί να βρεθεί σε μορφή οξέος, άλατος και εστέρα. Συντέθηκε για πρώτη φορά το 1941, δρα σαν αγωνιστής αυξίνης, απορροφάται σε μεγάλο βαθμό από πολλά μέρη του φυτού και προκαλεί ανεξέλεγκτη ανάπτυξη. (Girón-Navarro et al., 2021).

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι το ζιζανιοκτόνο συνδέεται με την εμφάνιση νευρολογικών διαταραχών και συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. Οι επιδράσεις του είναι δοσοεξαρτώμενες και σχετίζεται με την ανάπτυξη λεμφώματος τύπου μη-Hodgkin, καθώς επάγει το οξειδωτικό στρες και προκαλεί ανοσοκαταστολή (Girón-Navarro et al., 2021). Οι νευροτοξικές επιδράσεις του οφείλονται στο γεγονός ότι προκαλεί αλλαγές στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και στο DNA, αλλαγές στη σεροτονίνη και άλλες μορφολογικές τροποποιήσεις στον εγκέφαλο (Magnoli et al., 2020).

1.8.3 Γλυφοσάτη (Glyphosate)

Με χημική ονομασία (N-φωσφονομεθυλο-γλυκίνη) που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των ζιζανίων σε μονοετή πλατύφυλλα, η γλυφοσάτη ανακαλύφθηκε το 1970 έκτοτε είναι το πιο διαδεδομένο ζιζανιοκτόνο (Duke & Powles, 2008). Φυτικοχημικά έχει μια μακριά ευθεία ανθρακική αλυσίδα με ασθενείς δεσμούς διαφοροποιώντας το από τα άλλα ζιζανιοκτόνα που περιέχουν αρωματικό δακτύλιο, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο βιοσυσσωρεύσιμη στο περιβάλλον και τοξικολογικά ασφαλέστερη. Εμπορικά διατίθεται σε μορφή άλατος που διαλύεται σε υδατικά διαλύματα και συχνά

συμπεριέχονται στα σκευάσματα και άλλες δραστικές και επιφανειοδραστικές ουσίες (NPIRS, 2017 , PAN, 2016).

Σε βιοχημικό επίπεδο, δρα στο φυτικό οργανισμό μπλοκάροντας το μονοπάτι του σικιμικού μέσω της αναστολής του ενζύμου EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate) που εμπλέκεται στο μεταβολισμό αρωματικών αμινοξέων με τελικό αποτέλεσμα το φυτό να οδηγείται στο θάνατο (Boocock and Coggins, 1983). Όταν απελευθερώνεται στο περιβάλλον μετατρέπεται από τους μικροοργανισμούς σε AMPA που είναι η πιο δραστική μορφή. Στο σώμα μπορεί να έρθει είτε από επαφή με το δέρμα είτε μέσω κατάποσης και να βιοσυσσωρευτεί στους νεφρούς, στο ήπαρ και στο έντερο (Zhang et al., 2019 ; Peillex & Pelletier, 2020).

Έρευνες έχουν δείξει ότι η γλυφοσάτη δρα ως ενδοκρινής διαταρράκτης απορρυθμίζοντας τη σύνθεση οιστρογόνων και έχει δειχθεί ότι έχει την ικανότητα να δημιουργεί δεσμούς με μέταλλα και ότι προάγει το οξειδωτικό στρες με αποτέλεσμα την εμφάνιση ασθενειών και διαταραχών, όπως νευρολογικές, εντερικές μολύνσεις, διατάραξη της λειτουργίας του θυροειδούς, στειρότητα και διαταραχές άγχους (Samsel and Seneff, 2015). Ακόμη, έχει κατηγορηθεί για τερατογένεση και καρκινογόνο δράση, κυρίως λόγω εμφάνισης λεμφώματος μη Hodgkin (Mesnage et al., 2015).

1.8.4 Προγεννητική έκθεση σε ζιζανιοκτόνα

Όσον αφορά το 2,4 D, έρευνα σε επίμυες έχει δείξει ότι εισέρχεται στον εγκέφαλο των εμβρύων λόγω μειωμένης ικανότητας ελέγχου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Ωστόσο, τα έμβρυα παρουσιάζονται πιο προστατευμένα συγκριτικά με τα νεογνά, καθώς προστατεύονται από τη μητέρα λόγω της κύησης και έτσι διατρέχουν λιγότερο κίνδυνο (Freitas et al., 2019). Άλλη έρευνα έδειξε ότι αυξημένη συγκέντρωση 2,4 D στο πλάσμα γυναικών που κυοφορούσαν, είχε ως αποτέλεσμα να επηρεάζεται η μετάδοση ώσεων που σχετίζονται με την ακοή στα νεογνά (Silver et al., 2019).

Η έκθεση στη γλυφοσάτη κατά την κύηση σε επίμυες έχει συνδεθεί με τερατογένεση σε έμβρυα γενιάς F2, καθώς εμφάνισαν διατακτική καρδιά (Antonίου, 2012). Ακόμη, προγεννητική έκθεση στο ίδιο ζιζανιοκτόνο είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή ενζύμων που συνδέονταν με τον ενεργητικό μεταβολισμό των επίμυων και των εμβρύων τους (Daruichet al., 2001). Επιπλέον, σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε αλλαγή στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης και αντιοξειδωτικής άμυνας σε έμβρυα 21 ημερών (Beuret et al., 2005). Όσον αφορά τον άνθρωπο, μελέτες που βασίζονται σε

έκθεση στο φυτοφάρμακο κατά τη διάρκεια της κύησης έδειξαν ότι πιθανώς προκαλεί πρόωρες γεννήσεις, ενώ άλλη μελέτη διατύπωσε την πιθανή σύνδεσή της με διαταραχές που μπορεί να συμβούν στο έμβρυο καθώς η γλυφοσάτη αναστέλλει το μονοπάτι του σικιμικού και σε βακτήρια που υπάρχουν φυσιολογικά στο έντερο (Silver et al, 2021 ; Gerona et al., 2022).

1.8.5 Οξειδωτική βλάβη από την επίδραση ζιζανιοκτόνων

Από αυτά τα τρία παραπάνω ζιζανιοκτόνα μεγαλύτερη ικανότητα να επάγει το οξειδωτικό στρες φαίνεται να έχει το 2,4 D (Mesnage et al., 2021). Αναλυτικότερα, το 2,4-D ενεργοποιεί συγκεκριμένα ένζυμα κυτταρικών οξειδασών όπως είναι η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης (XOD), η λιποξυγενάση (LOX) και η ενεργοποίηση των NADPH οξειδασών (Pazmino et al. 2011 ; Ortega-Galisteo et al, 2012). Σε μελέτη βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα 8-OHdG έπειτα από έκθεση σε 2,4-D και υποδείκνυαν αυξημένη βλάβη στο DNA (Lerro et al., 2017).

Το dicamba παρουσιάζει μέτρια τάση να επάγει οξειδωτική καταστροφή με βάση μελέτη του Mesnage *et al*, ενώ οι απόψεις για τη γλυφοσάτη δίστανται (Mesnage et al., 2021). Η γλυφοσάτη από μόνη της μπορεί να μην προκαλεί οξειδωτικό στρες αλλά το εμπορικό σκεύασμα που την εμπεριέχει επάγει ανισορροπία στην οξειδοαναγωγική κατάσταση επίμυων και ανθρώπινων κυτταρικών σειρών (Astiz et al., 2009 ; Chaufan et al., 2014). Άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι η γλυφοσάτη μπορεί να προωθήσει το οξειδωτικό στρες μέσω της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων και την παραγωγή μεγάλης ποσότητας ελευθέρων ριζών (Bailey et al., 2018). Εναλλακτικά, μπορεί να δράσει ως επαγωγέας του οξειδωτικού στρες μέσω της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού καθώς θεωρείται ξеноβιοτική ουσία όπως φάνηκε σε μελέτη που προκάλεσε λειτουργική βλάβη στο ήπαρ επίμυων (Tang et al., 2017).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής αποτελεί ο προσδιορισμός των επιδράσεων χαμηλών δόσεων της γλυφοσάτης καθώς και μίγματός της με τις ενώσεις 2,4-διγλωροφαινοξυοξικό οξύ και dicamba, στο οξειδοαναγωγικό προφίλ επιμύων, ως αποτέλεσμα της προ- και μετα-γεννητικής έκθεσης σε ζιζανιοκτόνα. Παράλληλα, εκτιμήθηκε η ικανότητα αναστροφής της επαγόμενης από φυτοφάρμακα οξειδωτικής βλάβης, μελετώντας την τοξικότητα που οφείλεται στην έκθεση των επιμύων στα φυτοφάρμακα κατά τη διάρκεια της περιόδου κύησης. Ειδικότερα, η παρούσα πειραματική μελέτη παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον, καθώς εξετάζει τη γλυφοσάτη και το μείγμα της, προκειμένου να μιμηθεί την έκθεση στη νεότερη γενιά γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών που είναι ανεκτικές σε συνδυασμό ζιζανιοκτόνων, οι οποίες εμφανίστηκαν λόγω της ευρείας χρήσης της γλυφοσάτης. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίστηκαν στο ήπαρ, το παχύ έντερο και τον νεφρό, βασικοί βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης που σχετίζονται τόσο με την αντιοξειδωτική άμυνα ενός οργανισμού, όπως είναι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η ανηγμένη γλουταθειόνη, τα ένζυμα του κύκλου της γλουταθειόνης, αναγωγή της γλουταθειόνης και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, ο ρυθμός αποικοδόμησης του H₂O₂ όσο και με τα επίπεδα οξειδωτικής βλάβης όπως οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

Τα δεδομένα που θα προκύψουν από αυτήν τη μελέτη και σε συνδυασμό με ανάλογες μελέτες θα οδηγήσουν τις ρυθμιστικές αρχές και τους διεθνείς οργανισμούς στην επανεκτίμηση της αξιολόγησης ασφάλειας μίγματος ξеноβιοτικών ουσιών και στην καθιέρωση μελλοντικών κανόνων ασφάλειας τόσο για τον κίνδυνο από τις χημικές ουσίες όσο και για την αξιολόγηση κινδύνου.

3. ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πειραματόζωα

Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 20 ενήλικοι θηλυκοί κλινικά υγιείς επίμυες της φυλής Wistar με ένα μέσο όρο βάρους γύρω στα 300g σύμφωνα με το πρωτόκολλο TG 414 του OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development) για μελέτες προγεννητικής αναπτυξιακής τοξικότητας (OECD/OCDE, 2018). Τα ζώα εγκλιματίστηκαν σε ειδικά κλουβιά πριν από το πείραμα και σε ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες: 12 ώρες φως / σκοτάδι, ελεγχόμενη θερμοκρασία μεταξύ 19°C και 23°C, και με ελεγχόμενη σχετική υγρασία μεταξύ 35-55%. Η διατροφή τους περιλάμβανε τυπική ζωική τροφή (Cantacuzino Institute, Bucharest) και φιλτραρισμένο νερό κατά βούληση. Το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν σύμφωνο με την οδηγία 2010/63/EE της Επιτροπής για πειράματα σε ζώα και είχε εγκριθεί από την Επιτροπή Ηθικής του Πανεπιστημίου Ιατρικής και Φαρμακευτικής της Craiova, Ρουμανία.

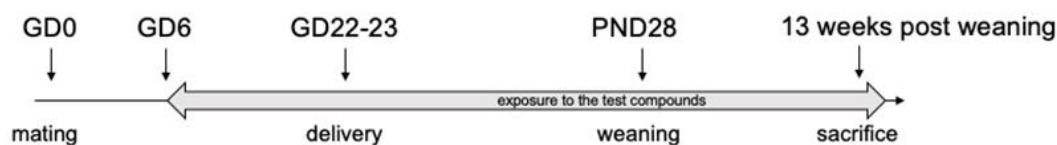
3.2 Καθορισμός της δοσολογίας

Η γλυφοσάτη χρησιμοποιήθηκε σε δόσεις που αντιστοιχούσαν στην ημερήσια ανεκτή πρόσληψη (ADI) και στο επίπεδο μη παρατηρούμενων δυσμενών επιπτώσεων (NOAEL), τα οποία ισούταν 0.5 και 50 mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα αντίστοιχα. Όσον αφορά το μίγμα ζιζανιοκτόνων, το οποίο περιείχε τη γλυφοσάτη, το 2,4-D και το dicamba, χρησιμοποιήθηκε σε δόση η οποία αντιστοιχούσε στα ADI της κάθε επιμέρους ουσίας, όπου ισούταν με 0.5 mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα, 0.3 mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα και 0.02 mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα αντίστοιχα. Όλες οι δόσεις που αναφέρθηκαν ήταν σύμφωνες με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA).

3.3 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο 20 εγκύων θηλυκών επιμύων της φυλής Wistar τα οποία τυχαία χωρίστηκαν σε 4 ομάδες όπου κάθε ομάδα αποτελούνταν από 5 επίμυες. Η πρώτη ομάδα έλαβε κανονική διατροφή και θεωρήθηκε

η ομάδα ελέγχου (control group). Η δεύτερη ομάδα με τα θηλυκά δέχθηκε γλυφοσάτη σε δόση ίση με την ημερήσια ανεκτή δόση (ADI), ενώ η τρίτη έλαβε το ίδιο ζιζανιοκτόνο σε δόση ίση με με το ανώτερο επίπεδο μη παρατηρούμενης δυσμενούς βλάβης (NOAEL). Τέλος, στην τέταρτη ομάδα των θηλυκών χορηγήθηκε το μίγμα των ζιζανιοκτόνων σε δόση ίση με το κάθε ADI του επιμέρους χημικού. Η αρχή του πειραματικού πρωτοκόλλου ορίστηκε ως η έκτη μέρα της κύησης και συνεχίστηκε έως τον απογαλακτισμό των νεαρών ζώων, δηλαδή 28 μέρες μετά τη γέννησή τους. Μετά τον απογαλακτισμό, τα νεογνά διαχωρίστηκαν από τις μητέρες τους και έλαβαν το ίδιο πλάνο δόσεων, όπως εκτείθονταν προγεννητικά, για άλλες 13 εβδομάδες, προκειμένου να εξασφαλιστούν τα κριτήρια μελέτης υποχρόνιας τοξικότητας για 90 ημέρες. Κάθε ομάδα περιλάμβανε 10 θηλυκούς και 10 αρσενικούς επίμυες, αποτελούμενη από 2 ζώα ανά φύλο που προερχόταν από κάθε έγκυο μητέρα. Για να διευκρινιστούν οι επιδράσεις της γλυφοσάτης και του μίγματος κατά την κύηση, μετά τον απογαλακτισμό, μια ομάδα 17 ζώων δεν εντάχθηκε στο πλάνο δόσεων για τις επόμενες 13 εβδομάδες, αλλά για το διάστημα των 90 ημερών έλαβε κανονική διατροφή και θεωρήθηκε ομάδα ανάρρωσης (recovery group).



Εικόνα 18: Πειραματικός σχεδιασμός

3.4 Συλλογή ιστών και προετοιμασία

Με το πέρας του πειράματος, τα ζώα θανατώθηκαν με αναισθησία και συλλέχθηκαν τρεις ιστοί, το ήπαρ, το παχύ έντερο και ο νεφρός, ξεπλύθηκαν με ισοτονικό διάλυμα αλάτων και αμέσως τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο και εν συνεχεία στους -80°C για περαιτέρω ανάλυση. Για την προετοιμασία του ιστού, τα δείγματα ζυγίστηκαν και έπειτα προστέθηκε σε αυτά αλατούχο διάλυμα φωσφορικού (PBS), που περιείχε αναστολείς πρωτεασών (CompleteTM mini protease inhibitors) και μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια ομογενοποίησης. Η διαδικασία της ομογενοποίησης πραγματοποιήθηκε για 30 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ένταση με τη χρήση

ομογενοποιητή (Bertin Technologies). Ακολούθησε φυγοκέντρηση (15,000 g, 5 min, 5 °C), συλλέχθηκε το υπερκείμενο και τέλος αποθηκεύτηκε στους -80°C.

3.5 Εκτίμηση των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης

3.5.1 Υπολογισμός ολικής πρωτεΐνης ιστού

Ο προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης, με χρήση του αντιδραστηρίου Bradford.

Πειραματική διαδικασία

Πίνακας 7: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με το αντιδραστήριο Bradford.

	Blank	Δείγμα ιστού
Αντιδραστήριο Bradford	1mL	1mL
Ομογενοποίηση ιστού	-	20μL
PBS	20μL	-

Επώαση για 15 λεπτά και καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στα 595 nm

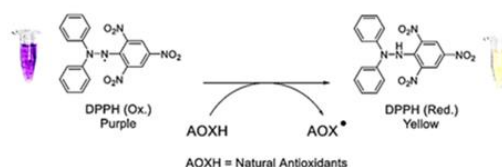
Υπολογισμοί

Η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης, υπολογίζεται σύμφωνα με τους συντελεστές που προκύπτουν κάθε φορά, από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης σε mg/ml.

3.5.2 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Αρχή της μεθόδου

Αναφέρεται στην ικανότητα όλων των συστατικών του ομογενοποιημένου ιστού, να ανάγουν την τεχνητή ρίζα DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η χρωματική μεταβολή υπολογίζεται φωτομετρικά στα 520 nm.



Εικόνα 19: Μέθοδος ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) (Ioana, Rugina, and Socaciu 2012).

Πειραματική διαδικασία

Προηγείται καθαρισμός με 20 μL ομογενοποιημένου ιστού να διαλύονται σε 20 μL TCA 5% (1:1) και ακολουθεί φυγοκέντρηση (15,000 g, 5 min, 5 °C) Συλλέγεται το υπερκείμενο και το πείραμα συνεχίζεται όπως αναγράφεται παρακάτω.

Πίνακας 9: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας της ανηγμένης γλουταθειόνης GSH.

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μL	660 μL
PBS	20 μL	—
Ομογενοποιημένος ιστός	—	20 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL
Επώαση για 15 λεπτά στο σκοτάδι και μέτρηση του έγχρωμου προϊόντος στα 412 nm		

Υπολογισμοί

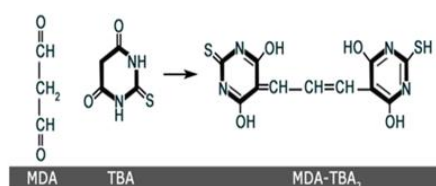
$\text{Δραστικότητα GSH (}\mu\text{mol/mg total prot.)} = (\text{Absδείγματος} - \text{Δabstυφλού}/13.6) \times 2 \times \text{αντίστοιχη αραίωση που έγινε σε κάθε ιστό κατά την ομογενοποίηση} \times \text{αντίστοιχη αραίωση που έγινε σε κάθε ομογενοποιημένο ιστό κατά τη μέθοδο} \times 50.5 / \text{Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL)}$.

Όπου το 50.5 είναι ο συντελεστής αραίωσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του ιστού (20 μL) (1010/20=50.5), πολλαπλασιάζουμε με 2 και την πρώτη αραίωση που έγινε από το TCA 5% (1:1), πολλαπλασιάζουμε με την αντίστοιχη αραίωση που έγινε σε κάθε ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

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

Αρχή της μεθόδου

Η μαλονδιαλδεΐδη, η οποία είναι ένα άκρως ενεργό και ασταθές προϊόν της οξειδωσης των λιπιδίων, προσδιορίζεται φωτομετρικά καθώς δημιουργεί σύμπλοκο με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με μέγιστη απορρόφηση στα 530 nm (Keles et al., 2001).



Εικόνα 21: Αντίδραση του TBA με το MDA για τον προσδιορισμό της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Sochor et al. 2012).

Πειραματική διαδικασία

Πίνακας 10: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της λιπιδικής υπεροξειδωσης

	Control	Δείγμα
Ομογενοποιημένος ιστός		100 μL
PBS	100 μL	
TCA 35%	500 μL	500 μL
Tris-HCl (200 mM, pH = 7.4)	500 μL	500 μL
Επώαση για 10 λεπτά σε RT		
Na ₂ SO ₄ – TBA	1mL	1mL
Επώαση για 45 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 95°C		
TCA 70%.	1mL	1mL
Μεταφορά 1 mL του σε νέα erppendorf tubes και φυγοκέντρηση (11,200 g, 3 min, 25 °C)		
Φωτομέτρηση στα 530 nm		

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg total protein) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 * 31 * την αντίστοιχη αραιώση που έγινε σε κάθε ιστό κατά την ομογενοποίηση * την αντίστοιχη αραιώση που έγινε σε κάθε ομογενοποιημένο ιστό κατά τη μέθοδο, όπου το 31 ο συντελεστής αραιώσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (100 μL) (3100 / 100 = 31).

Το 0.156, ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA που είναι 156,000 (mol/L) διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε $\mu\text{mol/L}$.

3.5.5 Προσδιορισμός του ρυθμού αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)

Αρχή της μεθόδου

Η καταλάση ανήκει στα ένζυμα που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και οξυγόνο, Προστίθεται H_2O_2 , το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα, στο ομογενοποιημένο ιστό και καταγράφεται η μείωση της απορρόφησης του στα 240 nm (Aebi, 1984).

Πειραματική διαδικασία

Πίνακας 11: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό του ρυθμού αποικοδόμησης του H_2O_2

	Δείγμα
Ομογενοποιημένος ιστός	5 μL
Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (67 mM, pH = 7.4)	2990 μL
Επόαση για 15 λεπτά στους 37 °C	
Μεταφορά περιεχομένου σε κυψελίδα Quartz, προσθήκη 5 μL 30% H_2O_2 και καταγραφή της μεταβολής της οπτικής απορρόφησης για 125s	

Υπολογισμοί

Ενεργότητα καταλάσης (U/mg total protein) = $(\Delta\text{Abs}_{\text{sample}}/\text{min} / 40) \times (600 \times 1000 \times \text{αντίστοιχη αραίωση που έγινε σε κάθε ιστό κατά την ομογενοποίηση} \times \text{αντίστοιχη αραίωση που έγινε στον ομογενοποιημένο ιστό κατά τη μέθοδο}) / \text{Conc. Protein (mg/mL)}$.

40 (mol/L): συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2 πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε $\mu\text{mol/mL}$. 600: παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μL) με τον όγκο του δείγματος (5 μL) (3000/5=600).

3.5.6 Προσδιορισμός της ενεργότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR)

Αρχή της μεθόδου

Η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR), είναι ένα σημαντικό ένζυμο έναντι του οξειδωτικού στρες συμμετέχοντας στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας ενδοκυτταρικά. Είναι μια διμερής αναγωγάση, χρησιμοποιεί το FAD ως πρόσθετη ομάδα και το NADPH ώστε να ανάγει τη GSSG σε δύο μόρια GSH, συμμετέχοντας έτσι στον κύκλο ανακύκλωσης της γλουταθειόνης (Smith et al., 1988).

Πειραματική διαδικασία

Πίνακας 12: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.

	Control	Δείγμα
Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (200 mM, 1 mM EDTA, pH = 7.5)	700 μL	700 μL
DTNB (3 mM)	250 μL	250 μL
β-NADPH	50 μL	50 μL
GSSG	50 μL	50 μL
	Ανάδευση και μεταφορά σε κυψελίδα	
Ομογενοποιημένος ιστός	25 μL	-
GR	-	25 μL

Καταγραφή της διαφοράς της οπτικής πυκνότητας στα 412 nm για 30s

Υπολογισμοί

GR activity (U/g total protein) = $[\Delta\text{abs}(\text{sample}) \times 0.026 / \Delta\text{abs}(\text{control}) \times 43 \times 5 \times \text{συντελεστής αραίωσης του ομογενοποιημένου ιστού στη μέθοδο}] / \text{total protein (g/L)}$

Δabs =Απορρόφηση στα 30 δευτερόλεπτα, 38: ο συντελεστής αραίωσης στην κυψελίδα(1075 μl/25 μl sample), 5: συντελεστής αραίωσης του ομογενοποιημένου ιστού, 0.026 U/ml: η τελική ενεργότητα του ενζύμου στην κυψελίδα.

3.5.7 Προσδιορισμός της ενεργότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της GPx βασίζεται στην καταγραφή της οξείδωσης του NADPH. Ειδικότερα, το GSSG παράγεται από αναγωγή ενός οργανικού

υδροπεροξειδίου από τη GPx και ταυτόχρονα παρατηρείται συνεχής παραγωγή GSH από την αναγωγή της γλουταθειόνης. Η συνεχής οξείδωση του NADPH σε NAD⁺ προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 340 nm για 150 δευτερόλεπτα.

Πειραματική διαδικασία

Πίνακας 13: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.

	Δείγμα
Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (100 mM, pH = 7)	500 μL
GR (0.24 U)	100 μL
GSH (10 mM)	100 μL
Ομογενοποιημένος ιστός	100 μL
Επώαση για 10 λεπτά με αποφυγή φωτός	
β-NADPH (1.5 mM) σε 0.1% NaHCO ₃	100 μL
Επώαση για 3 λεπτά με αποφυγή φωτός	
Μεταφορά στην κυψελίδα και προσθήκη 100 μL tert-butyl hydroperoxide (12 mM)	
Καταγραφή οπτικού σήματος στα 340 nm για 150s	

Υπολογισμοί

GPx activity (U/g total protein) = $0.868 \times \Delta_{\text{abs}} \text{NADPH}_{2.5\text{min}} / 10 \times 10 \times \text{συντελεστή αραίωσης του ιστού} \times \text{συντελεστή αραίωσης του ομογενοποιημένου ιστού στη μέθοδο} / \text{total protein conc.}$

10: συγκέντρωση της GSH (10 mM), 10: συντελεστής αραίωσης στο δείγμα (1000 μl/100 μl).

3.5.8 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS)

Αρχή της μεθόδου

Ένας δείκτης που αντικατοπτρίζει την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται στις πρωτεΐνες είναι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων είναι δυνατόν να ανιχνευθεί λόγω της ιδιότητάς τους να αντιδρούν με το DNPH (2,4 – δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαινυλδραζονίου) (Patsoukis et al., 2004).

Πειραματική διαδικασία

Πίνακας 14: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Ομογενοποιημένος ιστός	25 μ L	25 μ L
20% TCA	25 μ L	25 μ L
Διάλυση pellet, επώαση 15 λεπτών στον πάγο, φυγοκέντρηση (15,000 g, 5 min, 4 °C), απομάκρυνση υπερκειμένου		
DNPH (10 mM) σε (HCl) (2.5 N)	-	250 μ L
HCl (2.5 N)	250 μ L	-
Διάλυση pellet, επώαση σε RT για 60 λεπτά, ανάδευση κάθε 15 λεπτά		
Φυγοκέντρηση (15,000 g, 5 min, 4 °C), απομάκρυνση υπερκειμένου		
10% TCA	500 μ L	500 μ L
Ανάδευση, φυγοκέντρηση (15,000 g, 5 min, 4 °C), απομάκρυνση υπερκειμένου		
Ethanol / Ethyl acetate (1:1)	500 μ L	500 μ L
Ανάδευση, φυγοκέντρηση (15,000 g, 5 min, 4 °C), απομάκρυνση υπερκειμένου x 3		
Ουρία (5 M, pH = 2.3)	500 μ L	500 μ L
Ανάδευση και επώαση για 15 λεπτά στους 37 °C		
Φυγοκέντρηση (15,000 g, 3 min, 4 °C)		
Καταγραφή οπτικής πυκνότητας στα 375 nm		

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg total prot.)= $[(A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}}) / 0.022] \times 1000 / 50$ x με την αντίστοιχη αραιώση που έγινε σε κάθε ιστό κατά την ομογενοποίηση x αντίστοιχη αραιώση του ομογενοποιημένου ιστού στη μέθοδο /Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL).

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$. Το $1000/50$ είναι ο συντελεστής αραιώσης (1000 μ L στην κυψελίδα /50 μ L δείγματος).

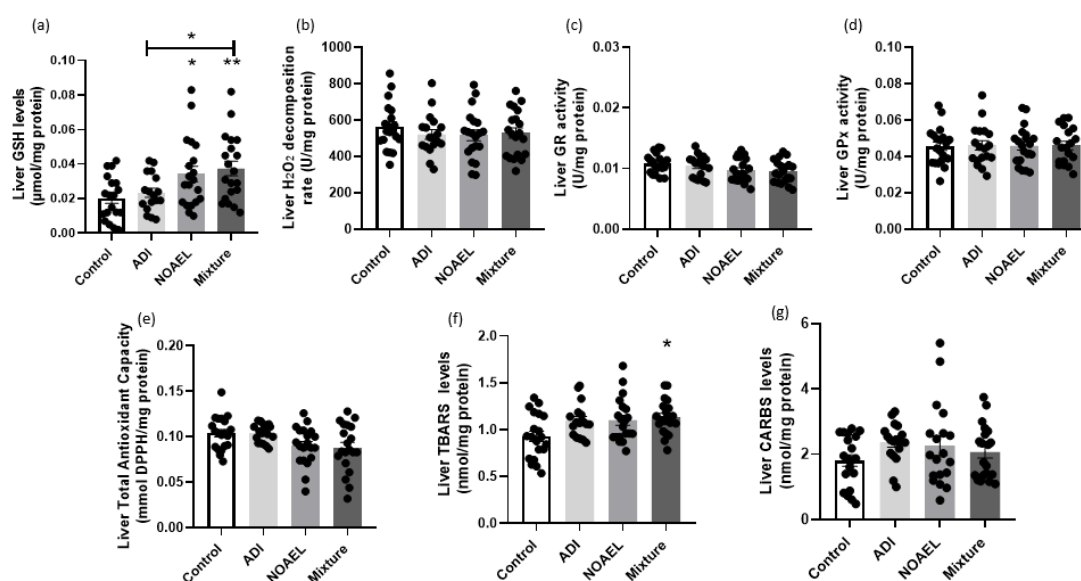
3.6 Στατιστική ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm SEM (τυπικό σφάλμα του μέσου) με 95% διάστημα αξιοπιστίας ($p < 0.05$) χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 8.0.1. (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) και τα outliers αποκλείστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Outliers. Για τη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε one-way ANOVA που ακολουθήθηκε από τη δοκιμή post hoc test Turkey (i) για σύγκριση των μέσων μεταξύ των διάφορων πειραματικών ομάδων χορήγησης και εν συνεχεία (ii) για σύγκριση των μέσων της κάθε ομάδας ανάρρωσης με την ομάδα ελέγχου και την αντίστοιχη πειραματική ομάδα.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1.1 Επιδράσεις της γλυφosatης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο ήπαρ

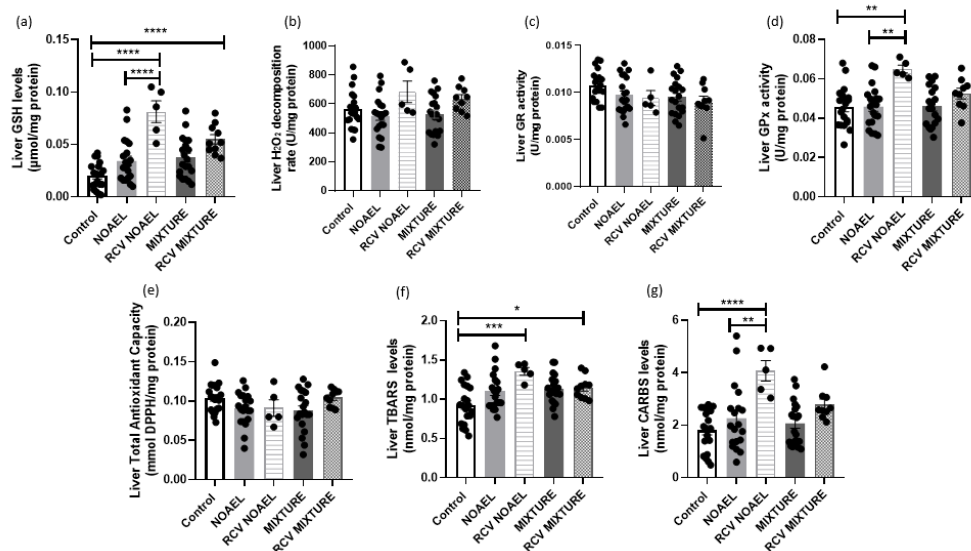
Η εκτίμηση της επίδρασης των ζιζανιοκτόνων στους δείκτες οξειδοαναγωγής στο ήπαρ έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης στις ομάδες του NOAEL ($p=0.0423$) και του μίγματος ($p=0.0081$) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η ομάδα του μίγματος έδειξε στατιστικώς αυξημένα επίπεδα σε σχέση με την ομάδα ADI ($p=0.0521$) (Σχήμα 1a). Όσον αφορά τα επίπεδα των TBARS, η ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το μίγμα των ζιζανιοκτόνων εμφάνισε στατιστικά αυξημένα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.0182$). Επιπρόσθετα, μια τάση αύξησης διαπιστώθηκε στο γκρουπ του NOAEL ($p=0.0594$) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Σχήμα 1f). Σχετικά με τους άλλους βιοδείκτες, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση από καμία εφαρμοσμένη δόση (Σχήμα 1b-e,g).



Σχήμα 1: Οι επιδράσεις της γλυφosatης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων έπειτα από τρίμηνη έκθεση επιμύων της φυλής Wistar στους δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του ήπατος στη συγκέντρωση της GSH (a), του ρυθμού της αποικοδόμησης του H_2O_2 (b), της ενεργότητας της GR (c), της ενεργότητας της GPx (d), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) (e), των επιπέδων των TBARS (f) και των επιπέδων των CARBS (g). * Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, σε σχέση με control group και σε σχέση με ADI group.

4.1.2 Επιδράσεις στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο ήπαρ κατά την περίοδο ανάρρωσης

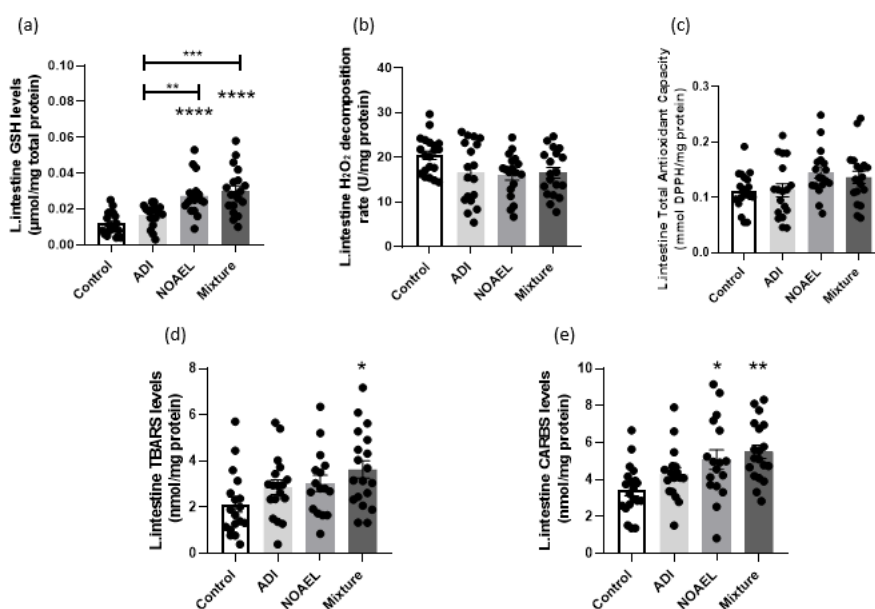
Η εκτίμηση των επιδράσεων στους δείκτες οξειδοαναγωγής κατά την περίοδο ανάρρωσης έδειξε στατιστικά αυξημένα επίπεδα στη συγκέντρωση της GSH τόσο στο γκρουπ ανάρρωσης του NOAEL με το αντίστοιχο πειραματικό γκρουπ ($p < 0.0001$) όσο και με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.0001$) (Σχήμα 2a). Επιπλέον, τα επίπεδα της GSH ήταν στατιστικώς αυξημένα και στην ομάδα ανάρρωσης στην οποία χορηγήθηκε το μίγμα σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα της ομάδας ελέγχου ($p < 0.0001$). Όσον αφορά τη δραστηριότητα της GPx αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά στην ομάδα NOAEL της μη πειραματικής ομάδας σε σχέση με την αντίστοιχη πειραματική ομάδα NOAEL ($p = 0.0018$) αλλά και με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.0014$) (Σχήμα 3d). Ακόμα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στα επίπεδα των TBARS στο γκρουπ NOAEL της ανάρρωσης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.0009$) αλλά και στο γκρουπ ανάρρωσης του μίγματος με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.05$) (Σχήμα 2f). Στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στην ομάδα ανάρρωσης του NOAEL σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα NOAEL ($p = 0.0024$) και σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.0001$) (Σχήμα 2g). Οι άλλοι δείκτες δεν εμφάνισαν κάποια σημαντική διαφορά στα επίπεδά τους (Σχήμα 2b-c,e).



Σχήμα 2: Οι επιδράσεις της γλυφοσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων κατά την περίοδο ανάρρωσης των επιμύων της φυλής Wistar στους δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του ήπατος στη συγκέντρωση της GSH (a), του ρυθμού της αποικοδόμησης του H_2O_2 (b), της ενεργότητας της GR (c), της ενεργότητας της GPx (d), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) (e), των επιπέδων των TBARS (f) και των επιπέδων των CARBS (g). * Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ σε σχέση με control group και αντίστοιχο πειραματικό group.

4.2.1 Επιδράσεις της γλυφωσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο παχύ έντερο

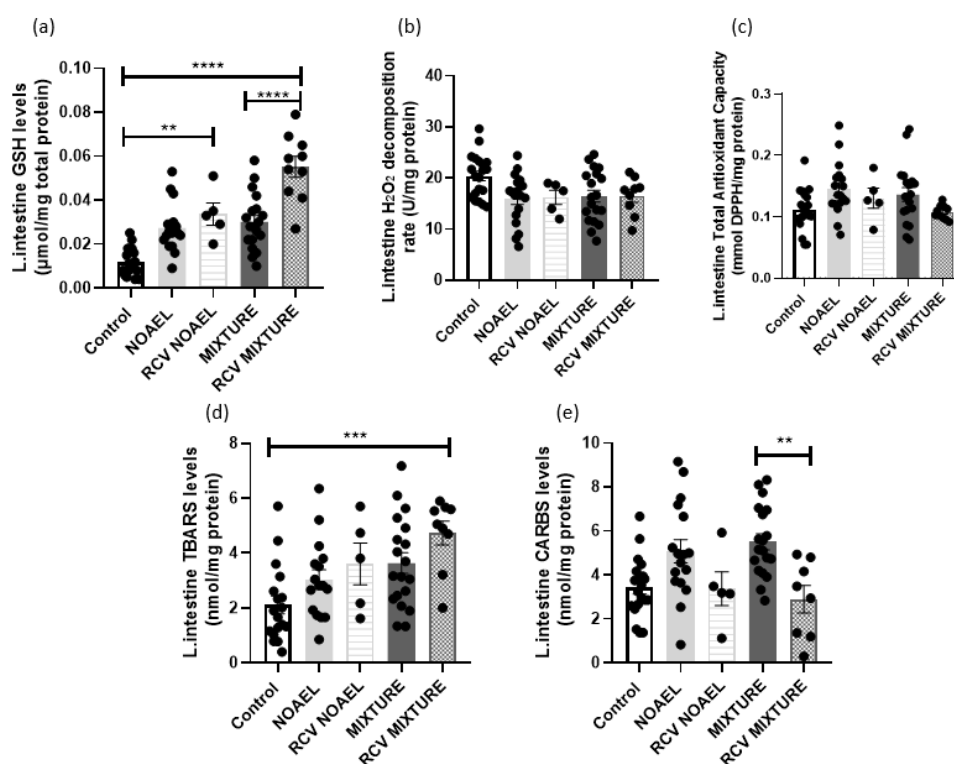
Οι επιδράσεις της γλυφωσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο παχύ έντερο σχετίζονταν με στατιστική σημαντική αύξηση στα επίπεδα της GSH τόσο στην ομάδα του NOAEL με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.0001$), όσο και στην ομάδα του μίγματος συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.0001$) (Σχήμα 3a). Διαφορά στα επίπεδα της GSH εμφανίστηκαν και στην ομάδα NOAEL σε σχέση με την ομάδα ADI ($p = 0.0069$) αλλά και στην ομάδα του μίγματος συγκριτικά με την ομάδα ADI ($p = 0.0004$) (Σχήμα 3a). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα επίπεδα οξείδωσης λιπιδίων στο γκρουπ του μίγματος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.0117$) (Σχήμα 3d). Τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σημείωσαν και αυτά αύξηση στις ομάδες NOAEL ($p = 0.0185$) και του μίγματος ($p = 0.0012$) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Σχήμα 3e). Τέλος, τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και του ρυθμού αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε αυτόν τον ιστό δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική διαφορά (Σχήμα 3b,c)



Σχήμα 3: Οι επιδράσεις της γλυφωσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων έπειτα από τρίμηνη έκθεση επιμύων της φυλής Wistar στους δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του παχέος εντέρου στη συγκέντρωση της GSH (a), του ρυθμού της αποικοδόμησης του H_2O_2 (b), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) (c), των επιπέδων των TBARS (d), και των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (e). * Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, σε σχέση με control group, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ σε σχέση με control group και σε σχέση με ADI group.

4.2.2 Επιδράσεις στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο παχύ έντερο κατά την περίοδο ανάρρωσης

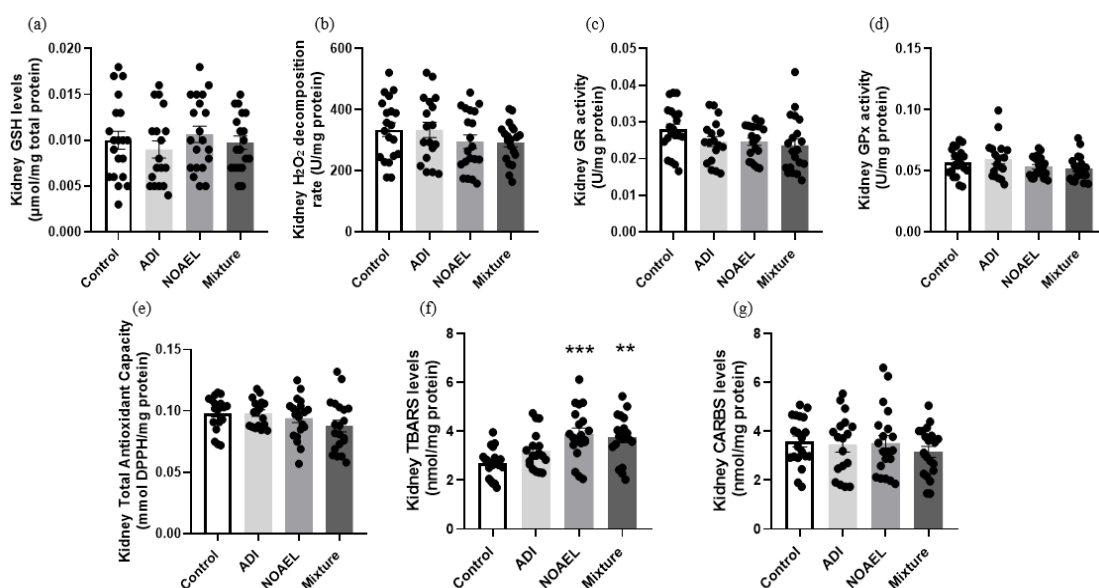
Η εκτίμηση των επιδράσεων στους δείκτες οξειδοαναγωγής κατά την περίοδο ανάρρωσης έδειξε στατιστικώς αυξημένα επίπεδα της συγκέντρωσης της GSH τόσο της ομάδας ανάρρωσης του μίγματος μεταξύ της ομάδας ελέγχου ($p=0.0001$) όσο μεταξύ της αντίστοιχης ομάδας μίγματος ($p=0.0001$) (Σχήμα 4a). Ακόμη τα επίπεδα της GSH εμφάνισαν σημαντική αύξηση στην ομάδα NOAEL του γκρουπ ανάρρωσης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.0015$) (Σχήμα 4a). Όσον αφορά του δείκτες οξειδωτικής καταστροφής, τα επίπεδα των TBARS ήταν στατιστικώς αυξημένα στην ομάδα του μίγματος του γκρουπ ανάρρωσης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου με $p=0.0005$ (Σχήμα 4d) και τα επίπεδα των CARBS παρουσίασαν σημαντική μείωση μεταξύ των ομάδων του μίγματος του γκρουπ ανάρρωσης σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα μίγματος με $p=0.0054$ (Σχήμα 4e). Στους υπόλοιπους δείκτες δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά (Σχήμα 4b-c).



Σχήμα 4: Οι επιδράσεις της γλυφοσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων κατά την περίοδο της ανάρρωσης των επιμόνων της φυλής Wistar στους δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του παχέος εντέρου στη συγκέντρωση της GSH (a), του ρυθμού της αποικοδόμησης του H₂O₂ (b), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) (c), των επιπέδων των TBARS (d), και των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (e). ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ σε σχέση με control group και αντίστοιχο πειραματικό group.

4.3.1 Επιδράσεις της γλυφωσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στον νεφρό

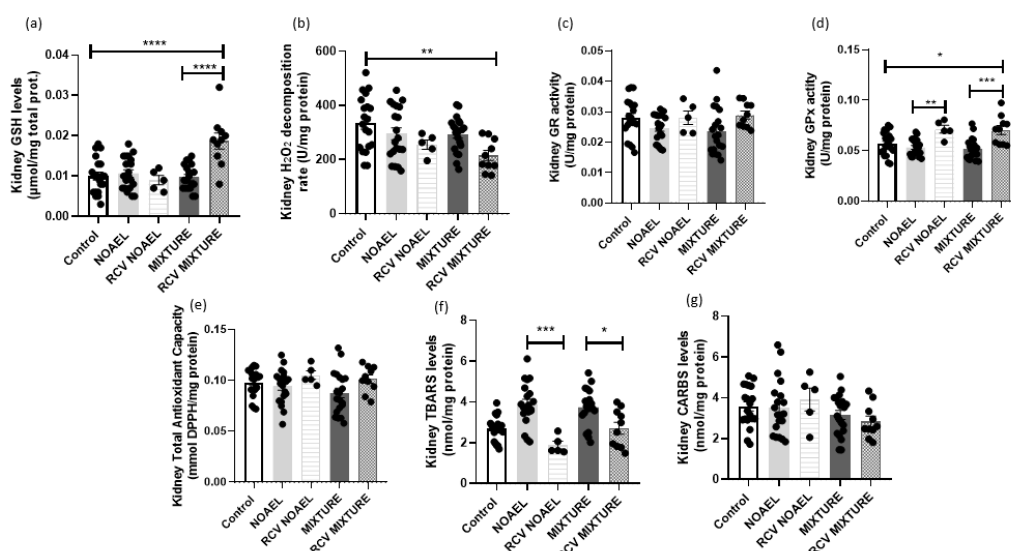
Η εκτίμηση στους δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης στον νεφρό από την επίδραση της γλυφωσάτης και του μίγματος της με τα άλλα δύο ζιζανιοκτόνα έδειξε ότι επίμυες που ανήκαν στις ομάδες του NOAEL και του μίγματος εμφάνισαν στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα της λιπιδική υπεροξειδωσις συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα των επίμυων που εντάσσονταν στην ομάδα ελέγχου, με $p=0.0001$ και με $p=0.0011$ αντίστοιχα (Σχήμα 5f). Οι άλλοι δείκτες που μελετήθηκαν σε αυτόν τον ιστό δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική μεταβολή στα επίπεδά τους από κανένα γκρουπ (Σχήμα 5a-e, g).



Σχήμα 5: Οι επιδράσεις της γλυφωσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων έπειτα από τρίμηνη έκθεση επίμυων της φυλής Wistar στους δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των νεφρών στη συγκέντρωση της GSH (a), του ρυθμού της αποικοδόμησης του H_2O_2 (b), της ενεργότητας της GR (c), της ενεργότητας της GPx (d), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) (e), των επιπέδων των TBARS (f) και των επιπέδων των CARBS (g), ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, σε σχέση με το control group.

4.3.2 Επιδράσεις στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στον νεφρό κατά την περίοδο ανάρρωσης

Οι επιδράσεις της γλυφασάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο νεφρό κατά την περίοδο ανάρρωσης έδειξαν στατιστικώς αυξημένα επίπεδα της συγκέντρωσης της GSH στην πειραματική ομάδα ανάρρωσης που δέχθηκε το μίγμα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.0001$) και με την αντίστοιχη πειραματική ομάδα ($p < 0.0001$) (Σχήμα 6a). Επιπλέον, τα επίπεδα του ρυθμού αποικοδόμησης του H_2O_2 της ίδιας ομάδας εμφάνισαν σημαντική μείωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.0038$) (Σχήμα 6b). Ακόμη, τα επίπεδα της GPx αυξήθηκαν σημαντικά στην ομάδα NOAEL της πειραματικής ομάδας ανάρρωσης σε σχέση με την αντίστοιχη πειραματική ομάδα ($p = 0.0091$), ενώ ταυτόχρονα παρατηρήθηκε αύξηση και στην ομάδα ανάρρωσης του μίγματος συγκριτικά με την αντίστοιχη πειραματική ομάδα ($p = 0.0002$), αλλά και με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.0128$) (Σχήμα 6d). Όσον αφορά τα επίπεδα των TBARS, και οι δύο ομάδες ανάρρωσης NOAEL και μίγματος εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με τις αντίστοιχες ομάδες ($p = 0.0001$ και $p = 0.0242$) (Σχήμα 6f). Οι υπόλοιποι δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης δεν εμφάνισαν κάποια σημαντική διαφορά (Σχήμα 6c,e,g).



Σχήμα 6: Οι επιδράσεις της γλυφασάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων έπειτα από την περίοδο ανάρρωσης των επιμών της φυλής Wistar στους δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των νεφρών στη συγκέντρωση της GSH (a), του ρυθμού της αποικοδόμησης του H_2O_2 (b), της ενεργότητας της GR (c), της ενεργότητας της GPx (d), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) (e), των επιπέδων των TBARS (f) και των επιπέδων των CARBS (g).. * Στατιστικώς σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ σε σχέση με control group και αντίστοιχο πειραματικό group.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι άνθρωποι καθημερινά εκτίθενται σε διάφορες χημικές ενώσεις εν αγνοία, προερχόμενες από πολλαπλές πηγές (εργασία, διατροφή, τρόπο ζωής) και μέσω διαφορετικών οδών (εισπνοή, δερματική επαφή, κατάποση) (Richardson et al, 2019). Τα παρασιτοκτόνα αποτελούνται από πλήθος χημικών ουσιών που πωλούνται για να αντιμετωπίσουν έντομα, νηματοειδή, φυτά ή μικροοργανισμούς τα οποία θεωρούνται σοβαρή πηγή προβλήματος για τους αγρότες (Ferguson et al, 2022), και χρησιμοποιούνται από τους ανθρώπους στις αγροκαλλιέργειες ως προϊόντα προστασίας φυτών (PPPs) καθώς και σε άλλους βιομηχανικούς τομείς (Bjorling-Roulsen et al, 2008). Η εκτεταμένη χρήση τους στιγματίσει τον προηγούμενο αιώνα λόγω των υψηλών αναγκών των καταναλωτών που απαιτούσαν ταυτόχρονη αυξημένη απόδοση καλλιεργειών και παραγωγής φαγητού (Carvahlo et al, 2017).

Τα παρασιτοκτόνα που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως βρίσκονται στη μορφή μίγματος, αφού τα εμπορικά φυτοφάρμακα δεν περιέχουν μόνο την αναφερόμενη δραστική ουσία αλλά και μίγμα άλλων χημικών ουσιών. Η σύνθεση με τα υπόλοιπα συστατικά συνήθως παραμένει μυστική από τους κατασκευαστές, οι οποίοι αναφέρουν ότι αυτές δεν έχουν κάποια δράση και δεν είναι τοξικές για οργανισμούς-μη στόχους. Έτσι, για ρυθμιστικούς σκοπούς και για τις μελέτες χρόνιας τοξικότητας ο έλεγχος πραγματοποιείται μόνο στην ενεργή ουσία και όχι στο εμπορικό μίγμα (Mesnage et al, 2014). Ωστόσο, έρευνες έχουν δείξει ότι τα εμπορικά σκευάσματα των φυτοφαρμάκων τείνουν να είναι πιο τοξικά από ότι η ίδια καθαρή ουσία μόνη της (Guyton et al, 2015).

Τα φυτοφάρμακα επάγουν υψηλά επίπεδα τοξικότητας και επομένως είναι επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, συσχετίζονται όλο και περισσότερο με διάφορα ζητήματα υγείας επειδή έχουν την ικανότητα να βιοσυσσωρεύονται σε ανθρώπινα όργανα και ζωικούς ιστούς (Tsatsakis et al, 2017). Πιο συγκεκριμένα, η έκθεση στα παρασιτοκτόνα έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη καρκίνου (Zhang et al, 2019), νόσου Πάρκινσον (Tanner et al, 2011), νόσου Αλτσχάιμερ (Yan et al, 2016), διαταραχών στην ανδρική γονιμότητα και της εμβρυική ανάπτυξη (Mehroor et al, 2014; Koutroulakis et al, 2014), καθώς και με αλλαγές που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης οδηγώντας σε μεταβολικές διαταραχές (Petraakis et al, 2017).

Σε αυτήν την περίοδο που τα παρασιτοκτόνα κατείχαν κεντρικό ρόλο στις τεχνικές αγροκαλλιέργειας, για την αντιμετώπιση των ζιζανίων, κανένα άλλο ζιζανιοκτόνο δε

χρησιμοποιήθηκε τόσο όσο η γλυφοσάτη (Duke & Powles, 2008). Η γλυφοσάτη είναι μια οργανοφωσφορική ένωση που χρησιμοποιείται διεθνώς έχοντας ευρύ φάσμα δράσης και είναι ένα μη εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο και ξηραντικό των σιτηρών. Εμπορικά σκευάσματα που περιέχουν τη γλυφοσάτη κατέχουν περίπου το 60% της παγκόσμιας αγοράς των μη εκλεκτικών ζιζανιοκτόνων (IBABA, 2014; IARC, 2015). Η εκτεταμένη χρήση των ζιζανιοκτόνων στις σύγχρονες καλλιέργειες έχει ως συνέπεια την εξάπλωση ισχυρά ανθεκτικών ζιζανίων, οδηγώντας όμως στην ανάγκη για πιο συχνές εφαρμογές του παρασιτοκτόνου και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτού (Office of Chemical Safety, 2017). Ωστόσο, αυτή η βάση που δόθηκε στη γλυφοσάτη για την αντιμετώπιση των ζιζανίων με ακραίες τεχνικές οδήγησε σε ακόμη πιο ανεκτικά στη γλυφοσάτη ζιζάνια (Hear & Duke, 2008).

Στην προσπάθεια να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα της ανθεκτικότητας των ζιζανίων, προέκυψε η χρήση πολλαπλών ζιζανιοκτόνων ώστε να είναι αποτελεσματικά έναντι αυτών των ανθεκτικών καλλιεργειών (Wright et al, 2010). Αυτό οδήγησε στη δημιουργία συνδυασμού χημικών ενώσεων όπως είναι αυτών της γλυφοσάτης, του 2,4-D και του dicamba όπου ήδη έχει αρχίσει και αυξάνεται η χρήση τους και πρόκειται να συνεχιστεί αυτή η ανοδική τάση τα επόμενα χρόνια (Mesnage & Antoniou, 2021). Το 2,4-D και το dicamba είναι σημαντικά συστημικά ζιζανιοκτόνα που μιμούνται την αυξίνη και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των πλατύφυλλων φυτών (Vink et al, 2012; Peterson et al, 2016).

Ένα μεγάλο ζήτημα το οποίο δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως είναι η κατανόηση των επιδράσεων που μπορεί να έχουν οι χημικές ουσίες σε συγκεντρώσεις μικρότερες του NOAEL. Ο σύγχρονος τρόπος ζωής φέρνει τον άνθρωπο αντιμέτωπο με μια πληθώρα άγνωστων χημικών ουσιών. Παρόλο που αυτές οι ουσίες βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση, ο συνδυασμός τους και η άμεση επαφή με αυτές, μπορεί να οδηγήσουν σε επιζήμιες συνέπειες (Fenga et al, 2017) Η συνεχής έκθεση σε τέτοιες ουσίες μπορεί να οδηγήσει στην πιθανή πρόκληση διάφορων παθολογικών καταστάσεων (Bulka et al, 2019) Μια ξеноβιοτική ουσία όταν εξετάζεται μόνη της σε μικρότερες συγκεντρώσεις από αυτές που έχουν οριστεί από ρυθμιστικούς φορείς μπορεί να μη δώσει κάποιο αρνητικό αποτέλεσμα (Kostoff et al, 2018). Όμως μια ουσία ενδέχεται να είναι επιβλαβής όταν αποτελεί μέρος ενός μίγματος. Αυτό συμβαίνει επειδή υπάρχει η πιθανότητα δύο ή περισσότερες ουσίες να δρουν συνεργιστικά και να παράγουν αρνητικά αποτελέσματα, τα οποία δύσκολα θα παρατηρούνταν αν η κάθε ουσία εξετάζονταν ξεχωριστά (Tsatsakis et al, 2017).

Όσον αφορά την τοξικότητα της γλυφοσάτης που μπορεί να έχει στον ανθρώπινο οργανισμό οι απόψεις δίστανται (Mesnage & Zaller, 2021). Η αντιπαράθεση έγινε ακόμη πιο έντονη όταν ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (International Agency of Cancer, IARC) κατέταξε αυτό το συστατικό ως πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο τάξης 2Α (Guyton et al, 2015). Σε πρόσφατες δηλώσεις που αφορούσαν την τοξικότητα της γλυφοσάτης και των μιγμάτων που την περιέχουν και είχαν σχέση με την έκθεση και τον κίνδυνο που απορρέει, οι Myers και συνεργάτες κατέληξαν ότι η έκθεση στη γλυφοσάτη αυξάνεται συνεχώς και τα ισχύοντα μέτρα προστασίας δεν επαρκούν για να προστατέψουν τη δημόσια υγεία (Myers et al, 2016).

Το οξειδωτικό στρες είναι ένα κρίσιμο τελικό σημείο που επάγεται λόγω της έκθεσης στα φυτοφάρμακα (Docea et al, 2018) Ο χρόνος έκθεσης και η δόση χορήγησης είναι σημαντικοί παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν το οξειδοαναγωγικό προφίλ των οργανισμών (Lee et al, 2017; Cortez-Iza & Rodriguez, 2018). Πιο συγκεκριμένα, η γλυφοσάτη έχει δειχθεί ότι προάγει το οξειδωτικό στρες και προκαλεί οξειδωτική βλάβη στις πρωτεΐνες, στα λιπίδια και στο DNA (Larsen et al, 2012).

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της περιγεννητικής έκθεσης χαμηλών δόσεων γλυφοσάτης και μίγματος αυτής με τις ενώσεις 2,4-D και dicamba στο οξειδοαναγωγικό προφίλ του αναπτυσσόμενου οργανισμού, εξετάζοντας 20 επίμυες της φυλής Wistar που εκτέθηκαν από την έκτη μέρα της κύησης μέχρι την ενηλικίωση τους. Επίσης, εξετάστηκαν τα επίπεδα τοξικότητας που προκλήθηκαν μέσω της έκθεσης σε αυτά τα ζιζανιοκτόνα κατά τη διάρκεια της περιόδου κύησης, προκειμένου να διαπιστωθεί η ικανότητα αναστροφής της επαγόμενης από φυτοφάρμακα οξειδωτικής βλάβης. Οι βιοδείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης που προσδιορίστηκαν ήταν αρχικά η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) και Ο ρυθμός αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου, οι οποίοι αποτελούν το βασικότερο κομμάτι της αντιοξειδωτικής άμυνας. Η GSH είναι ένα από τα πιο σημαντικά μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, ενώ η καταλάση είναι ένα από τα ενδογενή ένζυμα τα οποία βοηθούν στην αποικοδόμηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Birben et al, 2012; Weydert & Cullen, 2019). Άλλοι δείκτες που προσδιορίστηκαν ήταν η GR και η GPx που αποτελούν ένζυμα που συμμετέχουν στην ανακύκλωση της γλουταθειόνης (Margis et al, 2008). Τέλος, για τον προσδιορισμό της οξειδωτικής βλάβης μελετήθηκαν τα

πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARBS) και οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), ως δείκτες οξειδωσης των πρωτεϊνών και των λιπιδίων αντίστοιχα.

Ο πρώτος ιστός που μελετήθηκε ήταν το ήπαρ. Το ήπαρ είναι ένα όργανο ιδιαίτερα επιρρεπές σε τοξικότητα καθώς κατέχει κεντρικό ρόλο στο βιομεσχηματισμό και στην αποικοδόμηση ενδογενών και εξωγενών χημικών. Η περιγεννητική έκθεση των επιμύων της φυλής Wistar σε δόσεις NOAEL της γλυφοσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων για τρεις μήνες οδήγησε σε επιβλαβείς επιδράσεις για την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση του ήπατος. Ειδικότερα, εντοπίστηκαν αυξημένα επίπεδα οξειδωσης λιπιδίων στις δύο προηγούμενες ομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ως απόκριση στην πρόκληση οξειδωτικής βλάβης, οι επίμυες ενεργοποίησαν την αντιοξειδωτική τους άμυνα που υποστηρίζεται από το γεγονός των αυξημένων επιπέδων GSH σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, χωρίς όμως να επιτευχθεί αποτροπή της βλάβης.

Ο δεύτερος ιστός που εξετάστηκε ήταν το παχύ έντερο. Το έντερο είναι ένα όργανο στο οποίο πραγματοποιείται η πέψη και η απορρόφηση ωφέλιμων ουσιών καθώς επίσης είναι το πρώτο όργανο που μπορεί να δεχθεί τοξικότητα από ουσίες που βρίσκονται στην τροφή και αποτελεί φραγμό του σώματος από το εξωτερικό περιβάλλον. Η προγεννητική και ύστερα η υποχρόνια έκθεση των ζώων επηρέασε και αυτόν τον ιστό με παρόμοιο μοτίβο. Οι δόσεις NOAEL της γλυφοσάτης και του μίγματος είχαν ως αποτέλεσμα να προκληθεί βλάβη στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια, το οποίο επιβεβαιώνεται από τα στατιστικώς αυξημένα επίπεδα των CARBS και TBARS αντίστοιχα. Επιπλέον, και στην προκειμένη περίπτωση οι επίμυες προσπάθησαν να ανταπεξέλθουν στη βλάβη, ενεργοποιώντας εσωτερικούς μηχανισμούς όπως παρατηρείται από τα αυξημένα επίπεδα της συγκέντρωσης της GSH, χωρίς ωστόσο να επιτυγχάνεται η αντιστάθμιση της βλάβης.

Ο τελευταίος ιστός που εξετάστηκε ήταν ο νεφρός. Ο νεφρός είναι ένα όργανο που συμμετέχει και αυτό στην αποτοξικοποίηση και στη βιομετατροπή ουσιών σε λιγότερο δραστικές ενώσεις ώστε να αποβληθούν από τον οργανισμό. Στον ιστό αυτό έπειτα από το μεγάλο χρονικό διάστημα έκθεσης σε δόσεις NOAEL της γλυφοσάτης και του μίγματος που την περιέχει, παρατηρήθηκαν μόνο αυξημένα επίπεδα TBARS που σχετίζονται με υπεροξειδωση των λιπιδίων και οξειδωτική καταστροφή χωρίς όμως να ενεργοποιείται κάποιος αντιοξειδωτικός αμυντικός μηχανισμός όπως στις άλλες περιπτώσεις.

Προηγούμενες μελέτες έχουν παρουσιάσει ότι η γλυφοσάτη στην καθαρή μορφή της επάγει οξειδωτική βλάβη, γεγονός που αποδεικνύεται από αυξημένες συγκεντρώσεις μαλονδιαλδεΐδης στον ορό αίματος (Tang et al, 2017) και στον ηπατικό ιστό (Soudani et al, 2019). Ένας προτεινόμενος μηχανισμός πρόκλησης τοξικότητας μέσω της γλυφοσάτης είναι η διαταραχή της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίων, που σχετίζεται με την ενεργοποίηση ιοντικών διαύλων και την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (Tang et al, 2017). Ακόμη, η γλυφοσάτη παρουσιάζεται να εμπλέκεται στην πρόκληση επιγενετικών τροποποιήσεων, όπως είναι η μεθυλίωση του DNA, στην τροποποίηση ιστονών και σε μεταβολή της έκφρασης μικρών μη κωδικοποιητικών RNA (Bukowska et al, 2022; Rosetti et al, 2021). Επίσης η γλυφοσάτη έχει δειχθεί ότι μεταβάλλει την έκφραση ορισμένων γονιδίων και στους νεφρούς προκαλώντας γενετική βλάβη και πιθανώς δρώντας ως καρκινογόνος ουσία (Mesnage et al, 2022). Επιπλέον όσον αφορά το έντερο, έχει σημειωθεί ότι η γλυφοσάτη επηρεάζει τη μικροβιακή κοινότητα του εντέρου με αποτέλεσμα να γίνεται πιο συχνό φαινόμενο ο πολλαπλασιασμός παθογόνων μικροβίων σε αυτό το όργανο (Kruger et al, 2013; Abraham et al, 2010). Σε οξειδοαναγωγικό επίπεδο έχει δειχθεί ότι η γλυφοσάτη μεταβάλλει τα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων και της οξείδωσης των λιπιδίων, τα οποία και τα δύο αυξάνονται λόγω οξειδωτικής βλάβης, ενώ παράλληλα επάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με φλεγμονή στο λεπτό έντερο (Qiu et al, 2020; Tang et al, 2020).

Επιστημονικά στοιχεία έχουν δείξει ότι εκτός της γλυφοσάτης, το 2,4-D έχει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση του οξειδωτικού στρες (IARC, 2018). Ισχύει ότι το 2,4-D είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας και επιφέρει τις πιο τοξικές συνέπειες από τα υπόλοιπα συστατικά του μίγματος, όπου η γλυφοσάτη και το dicamba χαρακτηρίστηκαν ως ουσίες με ελάχιστη επίδραση σύμφωνα με το πρωτόκολλο του ToxTracker (Mesnage et al, 2021a). Άλλη έρευνα ανέφερε ότι έκθεση σε μίγμα dicamba και γλυφοσάτης είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή του οξειδωτικού στρες, ενώ το 2,4-D δεν οδήγησε στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Αυτό το εύρημα ίσως να οφείλεται στην ευαισθησία του τεστ να ανιχνεύει το οξειδωτικό στρες (Ferguson et al, 2022). Ακόμη, εμπορικά σκευάσματα με συνδυασμούς γλυφοσάτης και 2,4-D άσκησαν συνεργιστική και ανταγωνιστική επίδραση σε τεστ εκτίμησης γενετοξικότητας στον *Cnesterodon decemmaculatus* (Carvahlo et al, 2020).

Με σκοπό να εξεταστούν εάν οι επιδράσεις των φυτοφαρμάκων στις εκάστοτε δόσεις προκαλούν μόνιμες ή αναστρέψιμες επιδράσεις μετά από την προγεννητική

έκθεση σε αυτά, στο πείραμα εντάχθηκε άλλη μια ομάδα επιμύων όπου μετά τον απογαλακτισμό αυτών, δε τους χορηγήθηκε κανένα ζιζανιοκτόνο, τρέφονταν με κανονική δίαιτα για τις επόμενες 90 ημέρες και θεωρήθηκαν ως η ομάδα ανάρρωσης. Όσον αφορά το ήπαρ, η οξειδωτική καταστροφή που προκλήθηκε από τη δόση NOAEL της γλυφωσάτης και του μίγματος των ζιζανιοκτόνων φαίνεται να είναι μη αναστρέψιμη, γεγονός που επιβεβαιώνεται με τα αυξημένα επίπεδα των TBARS και των CARBS. Η ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών μηχανισμών, μέσω της ενίσχυσης των επιπέδων της GPx και της GSH, παρουσιάζεται ανεπαρκής ώστε να περιορίσει τη βλάβη που προκαλείται στα βασικά μακρομόρια.

Αντίθετα, εξετάζοντας τον ιστό του παχέος εντέρου, παρατηρείται παρόμοιο μοτίβο προσαρμογής της αντιοξειδωτικής άμυνας, καθώς οι επίμυες της πειραματικής ομάδας ανάρρωσης που είχαν εκτεθεί στο μίγμα εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα GSH συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου και την αντίστοιχη πειραματική ομάδα, καθώς επίσης και τα ζώα που είχαν εκτεθεί στο NOAEL και άνηκαν στην ομάδα ανάρρωσης παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, η ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών προκύπτει να αντισταθμίζει την οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών, γεγονός που διαφαίνεται από τα μειωμένα επίπεδα CARBS στην ομάδα ανάρρωσης του μίγματος σε σύγκριση με την αντίστοιχη πειραματική ομάδα, προσεγγίζοντας τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου. Αντίστοιχο μοτίβο όμως, δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης που παρέμειναν υψηλά. Καλύτερη προσαρμογή και μετρίαση της οξειδωτικής βλάβης παρατηρείται και στον νεφρό των ζώων της πειραματικής ομάδας ανάρρωσης, γεγονός που αποδεικνύεται με τα αυξημένα επίπεδα των δεικτών αντιοξειδωτικής ικανότητας όπως είναι της GSH και της GPx για τους επίμυες που είχαν εκτεθεί πρωτύτερα στο μίγμα και της GPx για τους επίμυες που είχαν εκτεθεί προηγουμένως σε δόση NOAEL της γλυφωσάτης. Ο προηγούμενος ισχυρισμός ενισχύεται και με την στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδωσης τόσο στην περίπτωση του NOAEL όσο και του μίγματος.

Η περιγεννητική περίοδος είναι ένα ιδιαίτερο χρονικό διάστημα για τον προς ανάπτυξη οργανισμό καθώς είναι ευαίσθητος σε αυτά το στάδιο σε περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι μπορεί να επιφέρουν κάποια δυσμενή επίπτωση στην υγεία του στο μέλλον. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι η έκθεση εμβρύων σε ζιζανιοκτόνα με βασικό συστατικό τη γλυφωσάτη προκαλεί σε νεαρά ποντίκια 15 ημερών οξειδωτική βλάβη επηρεάζοντας τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Ένας μηχανισμός που εξηγεί αυτή τη βλάβη

είναι ότι το χημικό διαταράσσει την ομοιόσταση του ασβεστίου και του σιδήρου καθώς επίσης και την οξειδοαναγωγική ισορροπία (Rieg et al., 2022). Άλλη μελέτη έχει παρουσιάσει ότι έκθεση σε ζιζανιοκτόνα που περιέχουν τη γλυφosatή κατά την περιγεννητική περίοδο προκαλεί διαταραχή στην οξειδοαναγωγική ισορροπία και αλλαγές στη συμπεριφορά των νεογνών επιμύων (de Oliveira et al., 2022). Επιπλέον, έρευνες έχουν παρουσιάσει ότι η προγεννητική έκθεση σε ζιζανιοκτόνα συνδέεται με φλεγμονή στο ήπαρ (Carolina et al., 2022) και νευρολογικές διαταραχές σε νεαρά ζώα (Von Ehrenstein et al., 2019).

Αξίζει να διερευνηθεί εάν οι επιδράσεις των χημικών που ασκούνται κατά την προγεννητική περίοδο, μπορούν να αντιστραφούν από τον ίδιο τον οργανισμό, λαμβάνοντας τυπική διατροφή για το επόμενο διάστημα από τον απογαλακτισμό. Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ότι η οξειδωτική βλάβη που παρατηρήθηκε στο ήπαρ, δεν αναστράφηκε κατά την περίοδο ανάρρωσης. Αντίθετα, όσο αφορά τους ιστούς του παχέος εντέρου και των νεφρών, φάνηκε ότι οι επίμυες προσαρμόστηκαν και ενίσχυσαν την αντιοξειδωτική τους άμυνα ενώ παράλληλα περιόρισαν την καταστροφή που είχε προκληθεί σε βασικά μακρομόρια.

Σε αντίθεση με το αποτέλεσμα του ήπατος σε αυτήν τη μελέτη, άλλη έρευνα έδειξε ότι τα αυξημένα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης λόγω τοξικότητας στο ήπαρ όρνιθας που προκαλούνται από έκθεση σε ζιζανιοκτόνα είναι αναστρέψιμα μετά από 28 μέρες ακολουθώντας κανονική διατροφή (Fréville et al., 2022). Ακόμη, μελέτη που έγινε σε ψάρια, παρουσίασε ότι τα επίπεδα των οξειδωμένων λιπιδίων και καρβονυλίων αναστράφηκαν πλήρως, ενώ παράλληλα τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων μειώθηκαν κατά την περίοδο ανάρρωσης έπειτα από έκθεση σε γλυφosatή (de Menezes et al., 2011). Τα διαφορετικά αποτελέσματα που λαμβάνονται θα μπορούσαν να εξηγηθούν από τη διαφορετική χρονική στιγμή της έκθεσης καθώς, η προγεννητική έκθεση μπορεί να έχει κρίσιμο αντίκτυπο στην ανάπτυξη του εμβρύου. Επιπλέον, το γεγονός ότι το ήπαρ δεν κατάφερε να αναρρώσει μπορεί να οφείλεται στο ότι είναι το πρώτο όργανο-στόχος που πλήττεται από τις ξενοβιοτικές ουσίες, όπου πραγματοποιείται η βιομετατροπή τους και αυτές με τη σειρά τους ίσως να προκαλούν αλλαγές τόσο στην έκφραση των γονιδίων λόγω επιγενετικών τροποποιήσεων του ιστού όσο και στη μορφολογία του (Abass et al, 2009; Ren et al, 2019).

Από όσα είναι ήδη γνωστά, η μελέτη αυτή είναι από τις πρώτες που εξετάζουν τις επιδράσεις της γλυφosatής κατά την προγεννητική και μεταγεννητική περίοδο, μόνη της και σε συνδυασμό με άλλα δύο ζιζανιοκτόνα εστιάζοντας στην τοξικότητα που

μπορεί να ενέχουν σε ιστούς του ήπατος, του παχέος εντέρου και των νεφρών επιμύων. Το κύριο αναμενόμενο αποτέλεσμα είναι η εκτίμηση των επιδράσεων των ζιζανιοκτόνων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση, ως αποτέλεσμα χορήγησης σε χαμηλές δόσεις για χρονικό διάστημα 3 μηνών, αξιολογώντας τον κίνδυνο που ενέχει η έκθεση σε αυτά. Η μελέτη αυτή θα μπορούσε να δώσει πιο εμπειριστατωμένα αποτελέσματα εφόσον πρώτα εξεταστούν οι δείκτες που θα προέρχονται από δείγματα αίματος των επιμύων. Έτσι, θα διατυπωθεί μια ολοκληρωμένη εικόνα για την γενικότερη οξειδοαναγωγική κατάσταση καθώς θα γίνει εστίαση στη συστημακή κυκλοφορία του οργανισμού και όχι μόνο στον κάθε ιστό ξεχωριστά. Επιπλέον, χρήζει και ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μελέτη των γενετοξικών επιδράσεων που μπορεί να φέρει η γλυφosatη και το μίγμα της για μεγάλο χρονικό διάστημα σε χαμηλές δόσεις που θεωρούνται ασφαλείς.

Τα νέα δεδομένα που θα προκύψουν από ανάλογες μελέτες θα οδηγήσουν τις ρυθμιστικές αρχές και τους διεθνείς οργανισμούς στην επανεκτίμηση της αξιολόγησης ασφάλειας των δοκιμών ξενοβιοτικών ουσιών και στην καθιέρωση μελλοντικών κανόνων ασφάλειας τόσο για τον κίνδυνο από τις χημικές ουσίες όσο και για την αξιολόγηση κινδύνου.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abass K, Turpeinen M, Pelkonen O., (2009), An evaluation of the cytochromeP450 inhibition potential of selected pesticides in humanhepatic microsomes. *J Environ Sci Health B*. 44(6):553-563.
- Abraham, W. (2010). Glyphosate formulations and their use for the inhibition of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. US Patent.
- Agmon, E., Solon, J., Bassereau, P., & Stockwell, B. R. (2018). Modeling the effects of lipid peroxidation during ferroptosis on membrane properties. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23408-0>
- Antoniou, M., Habib, M.E.M., Howard, C.V., Jennings, R.C., Leifert, C., Nodari, R.O., Robinson, C.J., Fagan, J., 2012. Teratogenic effects of glyphosate-based herbicides:divergence of regulatory decisions from scientific evidence. *J. Environ.Anal. Toxicol.* S4:006.
- Astiz, M., de Alaniz, M. J. T., & Marra, C. A. (2009). Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(3), 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.07.009>
- Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C. X., & De Menezes, S. L. (2002). Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(9), 841–859. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00786-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00786-4)
- B. Halliwell, J.M. Gutteridge, 1999, *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed., Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.
- Bailey, D. C., Todt, C. E., & Burchfield, S. L. (2018). Chronic exposure to a glyphosate-containing pesticide leads to mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species production in *Caenorhabditis elegans*, *Environ. Environ. Toxicol. Pharmacol*, 57, 46–52.
- Beuret, C.J., Zirulnik, F., Gimenez, M.S., 2005. Effect of the herbicide glyphosate onliver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reprod. Toxicol.* 19,501e504
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* 5 (1), 9–19.
- Bjorling-Poulsen, M., Andersen, H.R., Grandjean, P., (2008). Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ. Health* 7, 50.
- Bonner, M. R., & Alavanja, M. C. R. (2017). Pesticides, human health, and food security. *Food and Energy Security*, 6(3), 89–93. <https://doi.org/10.1002/fes3.112>

- Boocock, M.R., Coggins, J.R., 1983. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Lett.* 154, 127e133.
- Bukowska, B., Woźniak, E., Sicińska, P., Mokra, K., Michałowicz, J., (2022). Glyphosate disturbs various epigenetic processes in vitro and in vivo – A mini review. *Sci. Total Environ.* 851.
- C. Fenga, S. Gangemi, M. Teodoro, V. Rapisarda, K. Golokhvast, A.O. Docea, A., M. Tsatsakis, C. Costa, (2017), 8-Hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to low-dose benzene, *Toxicol. Rep.* 4, 291–295.
- C.M. Bulka, M.L. Daviglus, V.W. Persky, R.A. Durazo-Arvizu, J.P. Lash, T. Elfassy, D.J. Lee, A.R. Ramos, W. Tarraf, M. Argos, (2019), Association of occupational exposures with cardiovascular disease among US Hispanics/Latinos, *Heart* 105 (6), 439–448.
- Carbonari, C. A., Costa, R. N., Bevilaqua, N. C., Pereira, V. G. C., Giovanelli, B. F., Lopez Ovejero, R. F., Palhano, M., Barbosa, H., & Velini, E. D. (2020). Volatilization of standalone dicamba and dicamba plus glyphosate as function of volatility reducer and different surfaces. *Agriculture*, 10(11), 495. <https://doi.org/10.3390/agriculture10110495>
- Carolina, E., Gomes, Z., Liara Teleken, J., Vargas, R., Claudia, A., Alegre-Maller, P., Paulo, J., Amorim, A., Lúcia Bonfleur, M., Balbo, S.L., 2022. Exposure to glyphosate-based herbicide during early stages of development increases insulin sensitivity and causes liver inflammation in adult mice offspring ■ ABSTRACT. https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2022AO6778
- Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48–60. <https://doi.org/10.1002/fes3.108>
- Carvalho, W.F., Ruiz de Arcaute, C., Torres, L., de Melo e Silva, D., Soloneski, S., Larramendy, M.L., (2020). Genotoxicity of mixtures of glyphosate with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid chemical forms towards *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 6515–6525. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07379-x>
- Chaufan, G., & Coalova, I. (2014). Rios de Molina MdelGlyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient. *Int. J. Toxicol.* 33(1), 29–38.
- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2015). *The cell: A molecular approach* (1st ed.). Sinauer Associates.
- Cortés-Iza, S.K., Rodríguez, A.I., (2018). Oxidative stress and pesticide disease: a challenge for toxicology *Rev. Fac. Med.* 66 (2), 261–267.
- D. Harman, (2009), Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009, *Biogerontology* 10 773–781.

- Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5), 1402–1419. <https://doi.org/10.3390/ijerph8051402>
- Daruich, J., Zirulnik, F., Gimenez, M.S., 2001. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environ. Res.* 85, 226e231.
- de Menezes, C. C., da Fonseca, M. B., Loro, V. L., Santi, A., Cattaneo, R., Clasen, B., Pretto, A., & Morsch, V. M. (2011). Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(4), 665–671. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9574-6>
- de Oliveira, M.A.L., Rojas, V.C.T., de Sá, J.C., de Novais, C.O., Silva, M.S., de Almeida Paula, H.A., Kirsten, T.B., Bernardi, M.M., Pinheiro, L.C., Giusti-Paiva, A., Vilela, F.C., 2022. Perinatal exposure to glyphosate-based herbicides induced neurodevelopmental behaviors impairments and increased oxidative stress in the prefrontal cortex and hippocampus in offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 82, 528–538. <https://doi.org/10.1002/JDN.10207>
- Delaplane KS (2000) Pesticide usage in the United States: history, benefits, risks, and trends. Cooperative Extension Service. The University of Georgia, College of Agricultural and Environmental Sciences. Bulletin 1121. Reprinted November 2000.
- Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2013 May;1830(5):3217–66.
- Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 9829176. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
- Docea, A.O., Gofita, E., Goumenou, M., Calina, D., Rogoveanu, O., Varut, M., Olaru, C., Kerasioti, E., Fountoucidou, P., Taitzoglou, I., Zlatian, O., Rakitskii, V.N., Hernandez, A.F., Kouretas, D., Tsatsakis, A., (2018). Six months exposure to a real-life mixture of 13 chemicals' below individual NOAELs induced non monotonic sex-dependent biochemical and redox status changes in rats. *Food Chem. Toxicol.* 115, 470–481.
- Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide: Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4), 319–325. <https://doi.org/10.1002/ps.1518>
- El-Shenawy, N. S. (2009). Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(3), 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.06.001>
- Ferguson, S., Mesnage, R., & Antoniou, M. N. (2022). Cytotoxicity mechanisms of eight major herbicide active ingredients in comparison to their commercial formulations. *Toxics*, 10(11), 711. <https://doi.org/10.3390/toxics10110711>

- Freitas, L. M., Valadares, L. de A., Camozzi, M., de Oliveira, P. G., Ferreira Machado, M. R., & Lima, F. C. (2019). Animal models in the neurotoxicology of 2,4-D. *Human & Experimental Toxicology*, 38(10), 1178–1182. <https://doi.org/10.1177/0960327119860172>
- Fréville, M., Estienne, A., Ramé, C., Lefort, G., Chahnamian, M., Staub, C., Venturi, E., Lemarchand, J., Maximin, E., Hondelatte, A., Zemb, O., Canlet, C., Guabiraba, R., Froment, P., Dupont, J., 2022. Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in total or partial reversibility of plasma oxidative stress, cecal microbiota abundance and short-chain fatty acid composition in broiler hens. *Front. Physiol.* 13, 0–19. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.974688>
- Gebicki, J. M. (2016). Oxidative stress, free radicals and protein peroxides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.10.021>
- Gerona, R. R., Reiter, J. L., Zakharevich, I., Proctor, C., Ying, J., Mesnage, R., Antoniou, M., & Winchester, P. D. (2022). Glyphosate exposure in early pregnancy and reduced fetal growth: a prospective observational study of high-risk pregnancies. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 21(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s12940-022-00906-3>
- Girón-Navarro, R., Linares-Hernández, I., Teutli-Sequeira, E. A., Martínez-Miranda, V., & Santoyo-Tepole, F. (2021). Evaluation and comparison of advanced oxidation processes for the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): a review. *Environmental Science and Pollution Research International*, 28(21), 26325–26358. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13730-y>
- Gruhlke, M. C. H., & Slusarenko, A. J. (2012). The biology of reactive sulfur species (RSS). *Plant Physiology and Biochemistry*, 59, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.03.016>
- Grune T., Lietz G., Palou A., Ross A. C., Stahl W., Tang G., Thurnham D., Yin S., Biesalski H.K., (2010), β -Carotene Is an Important Vitamin A Source for Humans, *The Journal of Nutrition*, 140 (12), 2268S–2285S, <https://doi.org/10.3945/jn.109.119024>
- Gupta, V., & Carroll, K. S. (2016). Profiling the reactivity of cyclic C-nucleophiles towards electrophilic sulfur in cysteine sulfenic acid. *Chemical Science (Royal Society of Chemistry: 2010)*, 7(1), 400–415. <https://doi.org/10.1039/C5SC02569A>
- Guyton, K.; Loomis, D.; Grosse, Y.; El Ghissassi, F.; Benbrahim-Tallaa, L.; Guha, N.; Scoccianti, C.; Mattock, H.; Straif, K., (2015), Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol.* 16, 490–491.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine* (5th ed.). Oxford University Press.

- Hasegawa, T., Malle, E., Farhood, A., & Jaeschke, H. (2005). Generation of hypochlorite-modified proteins by neutrophils during ischemia-reperfusion injury in rat liver: attenuation by ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(4), G760-7. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00141.2005>
- Heap, I., Duke, S.O., 2018. Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Manag. Sci.* 74 (5), 1040–1049. <https://doi.org/10.1002/ps.4760>.
- Hekimi, S., Lapointe, J., & Wen, Y. (2011). Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology*, 21(10), 569–576. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.06.008>
- IARC, Cancer, I.A.f.R.o. (2015) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans – Glyphosate monograph: World Health Organization.
- IBAMA, DIQUA, D.d.Q.A., (2014) Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins – Histórico de Vendas 2000–2012. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente – MMA
- Ioana Simona, Dumitrita Rugina, and Carmen Socaciu. 2012. “Antioxidant Activity of European Mistletoe (*Viscum Album*).” *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, March. <https://doi.org/10.5772/26845>
- Izzi, V. (2012). The effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks. *Frontiers in Bioscience*, 17(7), 2396. <https://doi.org/10.2741/4061>
- Kaur, R., Mavi, G. K., Raghav, S., & Khan, I. (2019). Pesticides Classification and its Impact on Environment. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(03), 1889–1897. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.803.224>
- Kim, K.-H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *The Science of the Total Environment*, 575, 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
- Kolluru, G. K., Shen, X., & Kevil, C. G. (2020). Reactive sulfur species: A new redox player in cardiovascular pathophysiology: A new redox player in cardiovascular pathophysiology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 40(4), 874–884. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314084>
- Kostoff, R.N., Goumenou, M., Tsatsakis, A., (2018). The role of toxic stimuli combinations in determining safe exposure limits. *Toxicol. Rep.* 5, 1169–1172.
- Koutroulakis, D., Sifakis, S., Tzatzarakis, M.N., Alegakis, A.K., Theodoropoulou, E., Kavvalakis, M.P., Kappou, D., Tsatsakis, A.M., 2014. Dialkyl phosphates in amniotic fluid as a biomarker of fetal exposure to organophosphates in Crete, Greece; association with fetal growth. *Reprod. Toxicol.* 46, 98–105.

- Krüger, M., Shehata, A. A., Schrödl, W., & Rodloff, A. (2013). Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on *Clostridium botulinum*. *Anaerobe*, 20, 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.01.005>
- Krumova, K., & Cosa, G. (2016). Chapter 1. Overview of reactive oxygen species. In *Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences* (pp. 1–21). Royal Society of Chemistry.
- Kudsk, P., & Mathiassen, S. K. (2020). Pesticide regulation in the European Union and the glyphosate controversy. *Weed Science*, 68(3), 214–222. <https://doi.org/10.1017/wsc.2019.59>
- Larsen, K., Najle, R., Lifschitz, A., & Virkel, G. (2012). Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys, and small intestine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(3), 811–818. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.09.005>
- Lee, K.M., Park, S.Y., Lee, K., Oh, S.S., Ko, S.B., (2017). Pesticide metabolite and oxidative stress in male farmers exposed to pesticide. *Ann. Occup. Environ. Med.* 29, 5.
- Lerro, C. C., Beane Freeman, L. E., Portengen, L., Kang, D., Lee, K., Blair, A., Lynch, C. F., Bakke, B., De Roos, A. J., & Vermeulen, R. C. H. (2017). A longitudinal study of atrazine and 2,4-D exposure and oxidative stress markers among iowa corn farmers: Atrazine, 2,4-D, and Oxidative Stress Among Farmers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(1), 30–38. <https://doi.org/10.1002/em.22069>
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757–772. <https://doi.org/10.2147/cia.s158513>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemical Biological Interactions*, 224,164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Magnoli, K., Carranza, C. S., Aluffi, M. E., Magnoli, C. E., & Barberis, C. L. (2020). Herbicides based on 2,4-D: its behavior in agricultural environments and microbial biodegradation aspects. A review. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(31), 38501–38512. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10370-6>
- Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., & Hakeem, K. R. (2016). Effects of pesticides on environment. In *Plant, Soil and Microbes* (pp. 253–269). Springer International Publishing.

- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M., (2008), Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *FEBS J.*;275(15);3959-3970.
- Mehrpour, O., Karrari, P., Zamani, N., Tsatsakis, A.M., Abdollahi, M., 2014. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: a review. *Toxicol. Lett.* 230 (2), 146–156.
- Mesnage, R., Antoniou, M.N., 2021. Chapter Six - human health effects of herbicides used in intensive GM crop farming. In: Mesnage, R., Zaller, J.G. (Eds.), *Herbicides: Chemistry, Efficacy, Toxicology, and Environmental Impacts Elsevier in Cooperation with RTI Press.*
- Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., & Séralini, G. E. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 84, 133–153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>
- Mesnage, R., Ibragim, M., Mandrioli, D., Falcioni, L., Tibaldi, E., Belpoggi, F., Brandsma, I., Bourne, E., Savage, E., Mein, C. A., & Antoniou, M. N. (2022). Comparative toxicogenomics of glyphosate and Roundup herbicides by mammalian stem cell-based genotoxicity assays and molecular profiling in Wistar rats. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 186(1), 83–101. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab143>
- Mesnage, R.; Defarge, N.; Spiroux de Vendômois, J.; Séralini, G., (2014), Major Pesticides Are More Toxic to Human Cells Than Their Declared Active Principles. *Biomed Res. In.* 2014, 179691.
- Mesnage, Robin, Brandsma, I., Moelijker, N., Zhang, G., & Antoniou, M. N. (2021a). Genotoxicity evaluation of 2,4-D, dicamba and glyphosate alone or in combination with cell reporter assays for DNA damage, oxidative stress and unfolded protein response. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 157(112601), 112601. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112601>
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2), 157–177. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025>
- Myers, J. P., Antoniou, M. N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L. G., Hansen, M., Landrigan, P. J., Lanphear, B. P., Mesnage, R., Vandenberg, L. N., Vom Saal, F. S., Welshons, W. V., & Benbrook, C. M. (2016). Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 15(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>

- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986–28006. <https://doi.org/10.1039/c4ra13315c>
- NPIRS Glyphosate, 2017. Search federal pesticide products. West Lafayette. National Pesticide Information Retrieval System <http://npirspublic.ceris.purdue.edu/ppis/>. P273-Safety data sheet, 2014. Glyphosate 450G/L sl, Material Group 45Q/4535, p.
- Oakley A., (2005), Glutathione transferases: new functions, *Current Opinion in Structural Biology*, 15(6), 716-723. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.10.005>
- Obeagu E.I, (2018), A Review on Free Radicals and Antioxidants, *International Journal of Current Research in Medical Sciences*, 4(2): 123-133
- Office of Chemical Safety And Pollution Prevention, Glyphosate. Dietary Exposure Analysis in Support of Registration Review, United States Environmental Protection Agency. (2017).
- Ortega-Galisteo AP, Rodriguez-Serrano M, Pazmino DM, Gupta DK, Sandalio LM, Romero-Puertas MC (2012) S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: Changes under abiotic stress. *J Exp Bot* 63: 2089–2103
- PAN, 2016. PAN Pesticides Database-Pesticide Products. Pesticide Action Network, North America, Oakland, CA http://www.pesticideinfo.org/List_Products.jsp.
- Pazmino DM, Rodriguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Archilla-Ruiz A, Del Rio LA, Sandalio LM (2011) Differential response of young and adult leaves to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: Role of reactive oxygen species. *Plant Cell Environ* 34:1874–1889
- Peillex, C., & Pelletier, M. (2020). The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *Journal of Immunotoxicology*, 17(1), 163–174. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2020.1804492>
- Pelaez, V., da Silva, L. R., & Araujo, E. B. (2013). Regulation of pesticides: A comparative analysis. *Science & Public Policy*, 40(5), 644–656. <https://doi.org/10.1093/scipol/sct020>
- Pérez-Torres, I., Guarner-Lans, V., & Rubio-Ruiz, M. E. (2017). Reductive stress in inflammation-associated diseases and the pro-oxidant effect of antioxidant agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102098>
- Peterson, M. A., McMaster, S. A., Riechers, D. E., Skelton, J., and Stahlman, P. W. (2016). 2,4-D past, present, and future: a review. *Weed Technol.* 30, 303–345. doi: 10.1614/WT-D-15-00131.1
- Petrakis, D., Vassilopoulou, L., Mamoulakis, C., Psycharakis, C., Anifantaki, A., Sifakis, S., Docea, A.O., Tsiaoussis, J., Makrigiannakis, A., Tsatsakis, A.M., 2017. Endocrine disruptors leading to obesity and related diseases. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14(10) pii: E1282.

- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 4(2), 89–96.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Pogăcean, M.O., M. Gavrilescu, M., (2009), Plant Protection Products and their sustainable and environmentally friendly use. *Environmental Engineering and Management Journal*, 8 (3), 607-627
- Poyton, R. O., Ball, K. A., & Castello, P. R. (2009). Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 20(7), 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.04.001>
- Qiu, S., Fu, H., Zhou, R., Yang, Z., Bai, G., & Shi, B. (2020). Toxic effects of glyphosate on intestinal morphology, antioxidant capacity and barrier function in weaned piglets. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 187(109846), 109846. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109846>
- Rahman K., (2007), Studies in free radicals, antioxidants and co-factors, *Clinical Interventions in Aging*, 2(2) 219–236
- Rees, M. D., Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (2004). Hypochlorite and superoxide radicals can act synergistically to induce fragmentation of hyaluronan and chondroitin sulphates. *The Biochemical Journal*, 381(Pt 1), 175–184. <https://doi.org/10.1042/BJ20040148>
- Richardson, J.R.; Fitsanakis, V.; Westerink, R.H.S.; Kanthasamy, A.G., (2019), Neurotoxicity of Pesticides. *Acta Neuropathol*, 138, 343–362.
- Riter, L. S., Pai, N., Vieira, B. C., MacInnes, A., Reiss, R., Hapeman, C. J., & Kruger, G. R. (2021). Conversations about the future of dicamba: The science behind off-target movement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(48), 14435–14444. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05589>
- Rossetti, M.F., Canesini, G., Lorenz, V., Milesi, M.M., Varayoud, J., Ramos, J.G., (2021). Epigenetic Changes Associated With Exposure to Glyphosate-Based Herbicides in Mammals. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 12, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.671991>

- Roy, J., Galano, J.-M., Durand, T., Le Guennec, J.-Y., & Chung-Yung Lee, J. (2017). Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(9), 3729–3745. <https://doi.org/10.1096/fj.201700170r>
- Saikat S., Raja C., C. Sridhar1, Y. S. R. Reddy, Biplab D., (2010), Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospects, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, Volume 3, Issue 1; Article 021
- Samsel, A., Seneff, S., 2015. Glyphosate, pathways to modern diseases IV: cancer and related pathologies. *J. Biol. Phys. Chem.* 15 (3), 121–159. doi: 10.4024/11sa15r.jbpc.15.03.
- Santo, A., Zhu, H., & Li, Y. R. (2016). Free radicals: From health to disease. *Reactive Oxygen Species*. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.847>
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.002>
- Silver MK, Jennifer F, Jason T, Anna M, Jason S, Zaira R, et al. 2021. Prenatal exposure to glyphosate and its environmental degradate, aminomethylphosphonic acid (AMPA), and preterm birth: a nested case–control study in the PROTECT cohort (Puerto Rico). *Environ Health Perspect* 129(5):057011, 10.1289/EHP7295.
- Silver, M. K., Shao, J., Li, M., Ji, C., Chen, M., Xia, Y., Lozoff, B., & Meeker, J. D. (2019). Prenatal exposure to the herbicide 2,4-D is associated with deficits in auditory processing during infancy. *Environmental Research*, 172, 486–494. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.02.046>
- Simpson, T., Pase, M., & Stough, C. (2015). Bacopa monnieri as an antioxidant therapy to reduce oxidative stress in the aging brain. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2015, 615384. <https://doi.org/10.1155/2015/615384>
- Sochor, Jiri, Branislav Ruttkay-Nedecky, Petr Babula, Vojtech Adam, Jaromir Hubalek, and Rene Kizek. 2012. “Automation of Methods for Determination of Lipid Peroxidation.” *Lipid Peroxidation*, August. <https://doi.org/10.5772/45945>.
- Soudani, N., Chaâbane, M., Ghorbel, I., Elwej, A., Boudawara, T., Zeghal, N., (2019). Glyphosate disrupts redox status and up-regulates metallothionein I and II genes expression in the liver of adult rats. Alleviation by quercetin. *Gen. Physiol. Biophys* 38, 123–134. https://doi.org/10.4149/gpb_2018043
- Tang, J., Hu, P., Li, Y., Win-Shwe, T.-T., & Li, C. (2017). Ion imbalance is involved in the mechanisms of liver oxidative damage in rats exposed to glyphosate. *Frontiers in Physiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01083>

- Tang, Q., Tang, J., Ren, X., & Li, C. (2020). Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats. *Environmental Pollution* (Barking, Essex: 1987), 261(114129), 114129. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114129>
- Tanner, C.; Kamel, F.; Ross, G.; Hoppin, J.; Goldman, S.; Korell, M.; Marras, C.; Bhudhikanok, G.; Kasten, M.; Chade, A.; et al., (2011), Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. *Environ. Health Perspect.* 119, 866–872.
- Tsatsakis, A. M., Kouretas, D., Tzatzarakis, M. N., Stivaktakis, P., Tsarouhas, K., Golokhvast, K. S., Rakitskii, V. N., Tutelyan, V. A., Hernandez, A. F., Rezaee, R., Chung, G., Fenga, C., Engin, A. B., Neagu, M., Arsene, A. L., Docea, A. O., Gofita, E., Calina, D., Taitzoglou, I., ... Tsitsimpikou, C. (2017). Simulating real-life exposures to uncover possible risks to human health: A proposed consensus for a novel methodological approach. *Human & Experimental Toxicology*, 36(6), 554–564. <https://doi.org/10.1177/0960327116681652>
- Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), 1112. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Vardakas, P., Veskoukis, A.S., Rossiou, D., Gournikis, C., Kapetanopoulou, T., Karzi, V., Docea, A.O., Tsatsakis, A., Kouretas, D., 2022. A Mixture of Endocrine Disruptors and the Pesticide Roundup® Induce Oxidative Stress in Rabbit Liver When Administered under the Long-Term Low-Dose Regimen: Reinforcing the Notion of Real-Life Risk Simulation. *Toxics* 10. <https://doi.org/10.3390/toxics10040190>
- Veith, A., & Moorthy, B. (2018). Role of cytochrome p450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.003>
- Vera-Herrera, L., Sadutto, D., & Picó, Y. (2021). Non-occupational exposure to pesticides: Experimental approaches and analytical techniques (from 2019). *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(12), 3688. <https://doi.org/10.3390/molecules26123688>
- Vink, J. P., Soltani, N., Robinson, D. E., Tardif, F. J., Lawton, M. B., and Sikkema, P. H. (2012). Glyphosate-resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida*) control in dicamba-tolerant soybean. *Weed Technol.* 26, 422–428. doi: 10.1614/WT-D-11-00184.1

- Von Ehrenstein, O.S., Ling, C., Cui, X., Cockburn, M., Park, A.S., Yu, F., Wu, J., Ritz, B., 2019. Prenatal and infant exposure to ambient pesticides and autism spectrum disorder in children: population-based case-control study. *BMJ* 364, 962. <https://doi.org/10.1136/bmj.1962>
- Weydert, C.J., Cullen, J.J., (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat. Protoc.* 5 (1), 51–66.
- Williams, E., Whiteman, M., Wood, M. E., Wilson, I. D., Lodomery, M. R., Allainguillaume, J., Teklic, T., Lisjak, M., & Hancock, J. T. (2019). Investigating ROS, RNS, and H₂S-sensitive signaling proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1990, 27–42. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9463-2_3
- Wright, T.R., Shan, G., Walsh, T.A., et al., 2010. Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 107 (47), 20240. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013154107>.
- Yadav, I.C., Devi, N.L., (2017), Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment, *Environ. Sci. & Engg.* Vol. 6:
- Yan, D.; Zhang, Y.; Liu, L.; Yan, H., (2016), Pesticide exposure and risk of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 6, 32222.
- Yangtao W., Weiqiu Z, Lingjun B, Shumin Z. Jue W, Shiqing Z., (2022), UV-induced activation of organic chloramine: Radicals generation, transformation pathway and DBP formation, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 421, 126459, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126459>
- Yu Lei, Xin Lei, Paul Westerhoff, Xinran Zhang, and Xin Yang, (2021), Reactivity of Chlorine Radicals (Cl• and Cl₂•-) with Dissolved Organic Matter and the Formation of Chlorinated Byproducts, *Environ. Sci. Technol.* 55, 1, 689–699
- Zhang, L., Rana, I., Shaffer, R. M., Taioli, E., & Sheppard, L. (2019). Exposure to glyphosate-based herbicides and risk for non-Hodgkin lymphoma: A meta-analysis and supporting evidence. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*, 781, 186–206. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.02.001>
- Zhang, W.; van Gent, D.; Incrocci, L.; van Weerden, W.; Nonnekens, (2019), J. Role of the DNA damage response in prostate cancerformation, progression and treatment. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 23, 24–37.