



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

***IN VIVO* ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ  
ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΩΝ ΣΕ ΚΟΥΝΕΛΙΑ ΕΠΕΙΤΑ  
ΑΠΟ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΕΚΘΕΣΗ**

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΚΑΡΖΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΤΣΑΤΣΑΚΗΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2024**





**UNIVERSITY OF CRETE**  
**SCHOOL OF MEDICINE**



**DOCTORAL THESIS**

***IN VIVO* ESTIMATION OF THE BIOLOGICAL EFFECTS OF  
ENDOCRINE DISRUPTORS IN RABBITS AFTER COMBINED  
AND LONG-TERM EXPOSURE**

**VASILIKI KARZI**

**Supervisor: Prof. ARISTIDIS TSATSAKIS**

**HERAKLION 2024**



**Creative Commons Αναφορά (CC BY):**

Η άδεια αυτή επιτρέπει στο χρήστη να χρησιμοποιεί, μοιράζεται και δημιουργεί παράγωγα έργα επί του αδειοδοτούμενου περιεχομένου και να το διαμοιράζεται χωρίς περιορισμούς, πέραν του να κάνει αναφορά στο δημιουργό (π.χ. τον συγγραφέα), ή το δικαιούχο (π.χ. εκδότη) ή/και το φορέα που κάνει το περιεχόμενο διαθέσιμο (π.χ. το Υπουργείο Παιδείας).



*Στον Γιάννη*





# ΕΠΙΤΡΟΠΗ

---

## ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Αριστείδης Τσατσάκης

Καθηγητής Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αριστείδης Τσατσάκης

Καθηγητής Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Αντώνιος Μακρυγιαννάκης

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εμμανουήλ Ν. Τζατζαράκης

Αναπληρωτής Καθηγητής Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Αριστείδης Τσατσάκης

Καθηγητής Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Αντώνιος Μακρυγιαννάκης

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εμμανουήλ Ν. Τζατζαράκης

Αναπληρωτής Καθηγητής Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μαρία – Ελένη Καμπά

Καθηγήτρια Εργαστηριακής Ενδοκρινολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εμμανουήλ Συμβουλάκης

Αναπληρωτής Καθηγητής Πρωτοβάθμιας Φροντίδας Υγείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ελευθερία Χατζηδάκη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Νεογνολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Αικατερίνη Μπερδιάκη

Επίκουρη Καθηγήτρια Ιστολογίας – Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

---

Με την ολοκλήρωση της Διδακτορικής Διατριβής μου, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω, τον Καθηγητή Τοξικολογίας, κ. Αριστεΐδη Τσατσάκη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας, ο οποίος όντας υπεύθυνος της παρούσας Διατριβής φρόντισε για την όσο τον δυνατόν καλύτερη οργάνωση της καθώς και για τις συνεργασίες με άλλα πανεπιστημιακά ιδρύματα και εργαστήρια ούτως ώστε να έρθει εις πέρας το σύνολο των αναλύσεων.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μαιευτικής – Γυναικολογίας, κ. Αντώνιο Μακρυγιαννάκη, για τη συμβολή του στο ερευνητικό πρωτόκολλο και συμμετοχή του με κάθε δυνατό μέσο.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Τοξικολογίας, κ. Εμμανουήλ Τζατζαράκη για τις πολύτιμες συμβουλές και την υπομονή του, καθώς και για τη συνεχή μεταλαμπάδευση γνώσεων και πρακτικών.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω την εκτίμηση μου και να πω ένα ευχαριστώ στον Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών και Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Δημήτριο Κουρέτα, για την περαιώση των πειραμάτων εκτίμησης του οξειδωτικού στρες.

Σημαντική ήταν και η συμβολή της Καθηγήτριας Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου της Craiova, Anca Oana Docea, στην οργάνωση όλης της εργασίας αλλά και στην περάτωση του *in vivo* πειράματος, καθώς και της Καθηγήτριας Φαρμακευτικής Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου της Istanbul, Eren Ozcagli που ανέλαβε εξ ολοκλήρου την εκτίμηση του comet assay.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια, την άριστη συνεργασία και τη συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την καλή μου φίλη και συνεργάτη, Ειρήνη Φραγκιαδουλάκη, για την πολύτιμη βοήθεια της τόσο στο πειραματικό μέρος όσο και στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στην παιδική μου φίλη, και φιλόλογο, Μανθούλα Χλέπα για τις πολύτιμες συγγραφικές της συμβουλές αλλά και για την «πλάτη» που έβαλε όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια και τους φίλους μου για την πολυεπίπεδη υποστήριξη τους και την ενθάρρυνση όλα αυτά τα χρόνια. Το ευχαριστώ είναι λίγο για όλα αυτά που μου έχουν προσφέρει απλόχερα.

Χωρίς αυτούς τους ανθρώπους στη ζωή μου δεν θα είχα καταφέρει τίποτα...!

# Πίνακας περιεχομένων

---

ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	1
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	3
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	9
ABSTRACT .....	12
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	14
1.1 ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ .....	14
1.1.1 ΓΕΝΙΚΑ .....	14
1.2 ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ – ΣΤΟΧΟΙ.....	16
1.2.1 GLYPHOSATE.....	16
1.2.2 PARABENS .....	18
1.2.3 TRICLOSAN .....	19
1.2.4 BISPHENOL A .....	20
1.2.5 DI (2-ΕΤΗΥΛΗΕΧΥΛ) ΡΗΤΗΛΑΤΕ.....	22
1.3 ΤΑ ΚΟΥΝΕΛΙΑ ΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ .....	25
1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	27
2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	28
2.1 <i>In vivo</i> ΠΕΙΡΑΜΑ.....	28
2.1.1 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ .....	28
2.1.2 ΕΚΤΡΟΦΗ .....	29
2.1.3 ΔΟΣΟΛΟΓΙΕΣ.....	30
2.1.4 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ – ΘΑΝΑΤΩΣΗ .....	30
2.2 ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....	32
2.2.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ.....	32
2.2.2 COMET ASSAY .....	36
2.2.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	39
2.2.4 ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ.....	46
2.2.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΡΜΟΝΩΝ.....	47
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	48
3.1 ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΕΣ .....	48
3.2 COMET ASSAY.....	50
3.2.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΑΙ COMET ASSAY.....	52

3.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	54
3.3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟΥΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	54
3.3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟΥΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ.....	62
3.4 ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΥΜΑΤΑ.....	64
3.5 ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΡΜΟΝΩΝ.....	69
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	73
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	85
6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	95
1 <sup>η</sup> Δημοσίευση.....	95
2 <sup>η</sup> Δημοσίευση.....	105

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

---

<b>ADI</b>	<b>Acceptable daily intake</b>
<b>AMPA</b>	Aminomethylphosphonic acid
<b>ARBA</b>	American Rabbit Breeders Association
<b>BN</b>	Binuclei
<b>BPA</b>	Bisphenol A
<b>BPAF</b>	Bisphenol AF
<b>BPF</b>	Bisphenol F
<b>BPS</b>	Bisphenol S
<b>BuPB</b>	Butyl paraben
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CBMN</b>	Cytokinesis – Block Micronucleus Assay
<b>DEHP</b>	Bis(2-ethylhexyl) phthalate
<b>DETAPAC</b>	diethylenetriaminepentaacetic acid
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>DNPH</b>	2,4-dinitrophenylhydrazine
<b>DPPH•</b>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical
<b>DPX</b>	Dibutylphthalate polystyrene xylene
<b>DTNB</b>	5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid
<b>ECHA</b>	European Chemicals Agency
<b>EDC</b>	Endocrine disruptor
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>G6PD</b>	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
<b>GLY</b>	Glyphosate
<b>GPx</b>	Glutathione peroxidase
<b>GR</b>	Glutathione reductase

<b>Grx</b>	glutaredoxin
<b>GSH</b>	Glutathione
<b>GSSG</b>	Glutathione Disulfide
<b>HD</b>	High dose
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer
<b>LD</b>	Low dose
<b>LMA</b>	Low melting agarose
<b>MDA</b>	Malonyl dialdehyde
<b>MEHP</b>	Mono(2-ethylhexyl) phthalate
<b>MePB</b>	Methyl paraben
<b>MN</b>	Micronuclei
<b>NBT</b>	Nitro blue tetrazolium
<b>NMA</b>	Normal melting agarose
<b>NOAEL</b>	No Adverse Effect Level
<b>PBs</b>	Parabens
<b>PBS</b>	Phosphate buffer saline
<b>PHA</b>	Phytohemagglutinin
<b>POEA</b>	Polyoxyethylene tallow amine
<b>PrPB</b>	Propyl paraben
<b>PVC</b>	Polyvinyl chloride
<b>SOD</b>	Superoxide dismutase
<b>T3</b>	Τριωδοθυρονίνη
<b>T4</b>	Θυροξίνη
<b>TAC</b>	Total Antioxidant Capacity
<b>TBARS</b>	Thiobarbituric acid reactive substances
<b>TCA</b>	Trichloroacetic acid
<b>TCS</b>	Triclosan
<b>TNB</b>	2-nitro-5-thiobenzoate
<b>Trx</b>	Thioredoxin
<b>TSH</b>	Θυρεοτρόπος Ορμόνη
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>Ε.Δ.</b>	Ενδοκρινικός διαταράκτης



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Η πρόοδος και η εξέλιξη της βιομηχανίας έχουν συνδεθεί στενά με την εκτεταμένη ρύπανση και την παρουσία διαφόρων χημικών ουσιών τόσο στο περιβάλλον όσο και στην τροφική αλυσίδα. Αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι πολυάριθμες χημικές ουσίες έχουν την ικανότητα να διαταράσσουν το ενδοκρινικό σύστημα και οι ουσίες αυτές αναφέρονται ως ενδοκρινικοί διαταράκτες (Ε.Δ.). Υπάρχει ένας αυξανόμενος όγκος στοιχείων που αναδεικνύει τις δυσμενείς επιπτώσεις τους στους ζωντανούς οργανισμούς, οι οποίοι έρχονται σε επαφή με τους ΕΔ κυρίως μέσω της κατανάλωσης επιβαρυσμένων τροφίμων και υγρών, της εισπνοής ή της απορρόφησης μέσω του δέρματος.

Μελέτες για τη βιοπαρακολούθηση του ανθρώπου έχουν αποκαλύψει ότι ο γενικός πληθυσμός, συμπεριλαμβανομένων των παιδιών, σπάνια εκτίθεται σε μια μεμονωμένη ένωση. Αντίθετα, η έκθεση γίνεται κυρίως σε χημικούς συνδυασμούς που βρίσκονται στο περιβάλλον (νερό, αέρας, έδαφος), καθώς και σε τρόφιμα ή καταναλωτικά προϊόντα. Προς το παρόν, υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα σχετικά με τις πιθανές δυσμενείς επιδράσεις που προκύπτουν από την παρατεταμένη έκθεση σε χημικά μείγματα τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η προσομοίωσης της έκθεσης του ανθρώπου σε ενδοκρινικούς διαταράκτες στην πραγματική ζωή. Συγκεκριμένα, επικεντρωθήκαμε στην εκτίμηση της συνδυαστικής δράσης των glyphosate (GLY), bisphenol A (BPA), parabens (PBs), triclosan (TCS) και di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), στον οργανισμό κουνελιών έπειτα από δωδεκάμηνη συνδυαστική έκθεση σε αυτές τις ενώσεις. Παράλληλα, έγινε σύγκριση των επιπτώσεων που επήλθαν ύστερα από δωδεκάμηνη έκθεση στην καθαρή μορφή του glyphosate σε σχέση με την εμπορική του μορφή (ζιζανιοκτόνο Roundup®). Η εκτίμηση της τοξικότητας των ανωτέρω πραγματοποιήθηκε εξετάζοντας οξειδοαναγωγικούς βιοδείκτες και βιολογικούς δείκτες βλάβης του DNA (μέτρηση μικροπυρήνων και ένταση ουράς (comet)), και ακόμη μετρώντας τις αναπαραγωγικές ορμόνες και μελετώντας τις κυτταρολογικές βλάβες.

Καθ' όλη τη διάρκεια του *in vivo* πειράματος, τα αποτελέσματα από διάφορες δειγματοληψίες έδειξαν αύξηση του σχηματισμού μικροπυρήνων με δοσο – και χρόνο – εξαρτώμενο τρόπο. Η

ίδια τάση παρατηρήθηκε και για την ένταση της ουράς, αλλά αυτή σχετιζόταν αποκλειστικά με τη δόση, δεδομένου του περιορισμένου αριθμού δειγματοληψιών (συγκεκριμένα, μόνο της τελευταίας). Η ομάδα που έλαβε υψηλή δόση μείγματος ουσιών (ομάδα HD) φάνηκε να επηρεάζεται περισσότερο όσον αφορά στην ένταση της ουράς, πιθανότατα λόγω της αθροιστικής επίδρασης των χορηγούμενων ουσιών. Σε όλες τις ομάδες έκθεσης, υπήρξε θετική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των μικροπυρήνων και της έντασης της ουράς.

Η χορήγηση του μείγματος Ε.Δ. προκάλεσε διαταραχές της ομοιόστασης οξειδοαναγωγής του αίματος στους 3 μήνες, ενώ στους 6 και 12 μήνες ενεργοποίησε προσαρμογές οξειδοαναγωγής. Αντίθετα, η έκθεση σε GLY και Roundup®, μεμονωμένα, προκάλεσε κυρίως διαταραχές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του αίματος. Σε επίπεδο ιστών, ιδίως στο ήπαρ, η χορήγηση τόσο του μείγματος Ε.Δ. όσο και του Roundup® προκάλεσε οξειδωτικό στρες, ενώ η GLY δεν το επηρέασε. Ακόμη, η χορήγηση του μείγματος Ε.Δ. και του Roundup®, προκάλεσε επιζήμιες επιδράσεις στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του ήπατος, ενός κρίσιμου ιστού με πολύτιμο βιολογικό ρόλο στην αποτοξίνωση των οργανισμών από ξενοβιοτικά.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μέτρησης των επιπέδων των αναπαραγωγικών ορμονών, τα θηλυκά κουνέλια δεν παρουσίασαν ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις, εκτός από την περίπτωση της T<sub>4</sub> όπου τόσο στα θηλυκά όσο και στα αρσενικά κουνέλια παρουσιάστηκε αύξηση από τους 3 μήνες και μετά, στις ομάδες HD και Roundup. Η β-οιστραδιόλη παρέμεινε σχεδόν ανεπηρέαστη σε όλη τη διάρκεια του πειράματος χωρίς να παρουσιάζει διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών. Όσον αφορά στα επίπεδα τεστοστερόνης στα αρσενικά κουνέλια αυξήθηκαν μετά τους 3 μήνες έκθεσης και μειώθηκαν κατακόρυφα στους 12 μήνες έκθεσης στις ομάδες Glyphosate, HD και Roundup. Η συγκέντρωση της T<sub>3</sub> αυξήθηκε στους 3 μήνες έκθεσης, και μετά, σε όλες τις ομάδες ενώ μειώθηκε στους 12 μήνες στην ομάδα Roundup. Παράλληλα, τα επίπεδα της προγεστερόνης μειώθηκαν στους 12 μήνες έκθεσης (σε σχέση με τους 0 μήνες) στις ομάδες LD, HD και Roundup, ενώ αυξήθηκαν στην ομάδα Glyphosate.

Τα κυτταρολογικά ευρήματα κάνουν σαφή την ύπαρξη εκτεταμένων βλαβών στις ομάδες HD, Glyphosate και Roundup. Ύπαρξη εκμαγείων, εκφυλισμός και καρκινογένεση καταγράφηκαν σε ήπαρ, νεφρούς, όρχεις, ωοθήκες και θυρεοειδή αδένες, ενώ η καρδιά δεν παρουσίασε κυτταρολογικές αλλοιώσεις.

Τα ευρήματά μας αναδεικνύουν ότι η έκθεση σε Ε.Δ., μεμονωμένα αλλά και συνδυαστικά, προκαλεί δυσμενείς επιδράσεις σε κυτταρολογικό επίπεδο, στο DNA, στα επίπεδα των ορμονών και στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού. Αυτό υπογραμμίζει τους πιθανούς κινδύνους που συνδέονται με την καθημερινή έκθεση σε αυτές τις ουσίες και υπογραμμίζει την επιτακτική ανάγκη για πρόσθετη έρευνα σε αυτόν τον τομέα.

# ABSTRACT

---

The advancement and evolution of industry have been closely associated with widespread pollution and the presence of various chemicals in both the environment and the food chain. Several surveys have indicated that numerous chemicals possess the capability to disrupt the endocrine system, and these substances are referred to as endocrine disruptors (EDCs). There is an increasing body of evidence highlighting their adverse effects on living organisms, which come into contact with EDCs primarily through the consumption of contaminated food and fluids, inhalation or absorption through the skin.

Studies on human biomonitoring have revealed that the general population, including children, is seldom exposed to a solitary compound. Instead, exposure predominantly occurs to chemical combinations found in the environment (water, air, soil), as well as in food or consumer products. Currently, there is limited data regarding potential adverse effects both in humans and animals.

The aim of this PhD thesis was to simulate human exposure to endocrine disruptors in real life. Specifically, we focused on assessing the synergistic or non-synergistic effects of glyphosate, BPA, PBs, TCS and DEHP, on the rabbit organism after a 12-month combined exposure to these compounds. In addition, a comparison was made of the effects following 12 months exposure to the pure form of glyphosate versus its commercial form (Roundup® herbicide). The toxicity of the above was assessed by examining redox biomarkers and biological markers of DNA damage (micronuclei count and comet intensity), and also by measuring reproductive hormones and estimating cytological damage.

Throughout the *in vivo* experiment, results from different samplings showed an increase in micronuclei formation in a dose – and time – dependent manner. The same trend was also observed for tail intensity, but this was exclusively dose – related, given the limited number of samples (specifically, only the latter). The group receiving a high dose of a mixture of substances (HD group) seemed to be more affected in terms of tail intensity, probably due to the synergistic effect of the administered substances. In all exposure groups, there was a positive correlation between the number of micronuclei and tail intensity.

Administration of the EDCs mixture induced perturbations of blood redox homeostasis at 3 months, while at 6 and 12 months it triggered redox adaptations. In contrast, exposure to GLY and Roundup®, individually, mainly induced perturbations of blood redox balance. At the tissue level, especially in the liver, administration of both EDCs mixture and Roundup® induced oxidative stress, whereas GLY did not. Furthermore, the administration of both EDCs and Roundup® caused detrimental effects on the redox status of the liver, a critical tissue with a valuable biological role in the detoxification of organisms from xenobiotics.

According to the results of the measurement of reproductive hormone levels, the female rabbits did not show any particular differences, except for the case of T<sub>4</sub> where both female and male rabbits showed an increase from 3 months onwards in the HD and Roundup groups. B-estradiol remained almost unaffected throughout the experiment with no differences between males and females. Regarding testosterone levels in male rabbits, they increased after 3 months of exposure and decreased sharply at 12 months of exposure in the Glyphosate, HD and Roundup groups. T<sub>3</sub> concentration increased at 3 months of exposure onwards and decreased at 12 months of exposure in the Roundup group. In parallel, progesterone levels decreased at 12 months of exposure (compared to 0 months) in the LD, HD and Roundup groups, while they increased in the Glyphosate group.

The cytological findings make clear the existence of extensive lesions in the HD, Glyphosate and Roundup groups. Existence of ectasia, degeneration and carcinogenesis were recorded in liver, kidney, testis, ovary and thyroid gland, while the heart did not show any cytological lesions.

Our findings indicate that exposure to EDCs, individually and in combination, causes adverse effects on the cytological scale, the DNA, the hormone levels and the redox status of the organism. This underlines the potential risks associated with daily exposure to these substances and highlights the urgent need for additional research in this area.

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

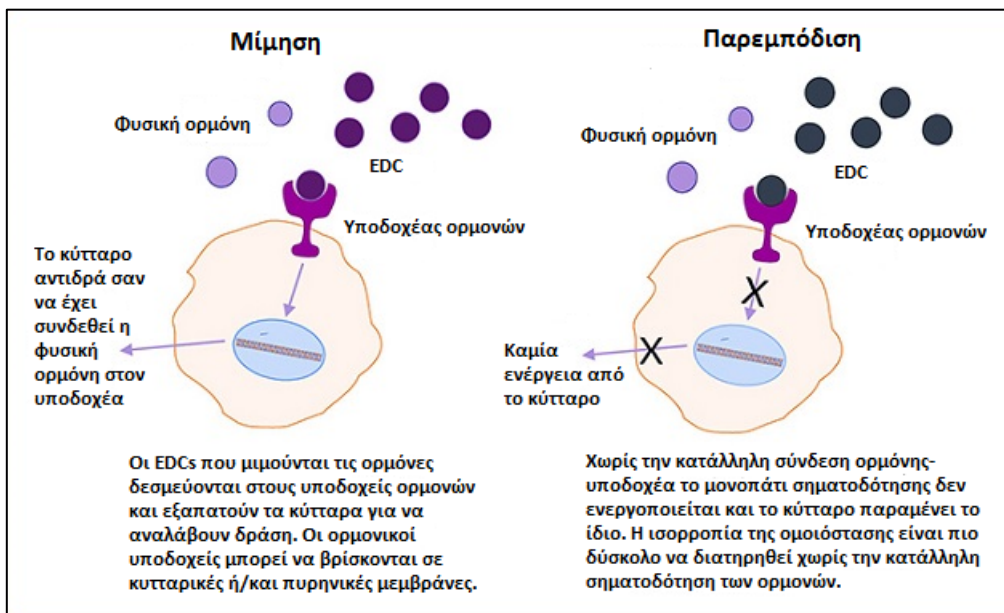
## 1.1 ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ

### 1.1.1 ΓΕΝΙΚΑ

Ο όρος «ενδοκρινικός διαταράκτης» ορίστηκε αρχικά ως κάθε ουσία που επηρεάζει το ενδοκρινικό σύστημα. Ένας ακριβέστερος ορισμός σύμφωνα με τον Οργανισμό Προστασίας Περιβάλλοντος ορίζει έναν ενδοκρινικό διαταράκτη (Ε.Δ.) ως μια εξωγενή ουσία που παρεμβαίνει στη σύνθεση, έκκριση, μεταφορά, δέσμευση, δράση ή εξάλειψη των φυσικών ορμονών που είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της ομοιόστασης, την αναπαραγωγή, την ανάπτυξη ή/και τη συμπεριφορά.

Ο όρος αυτός περιλαμβάνει σήμερα χιλιάδες ουσίες και ο αριθμός τους εξακολουθεί να αυξάνεται. Τα ζητήματα που αφορούν τους Ε.Δ. και τις πιθανές δυσμενείς επιδράσεις τους στον ανθρώπινο οργανισμό αποτελούν σήμερα ένα από τα σημαντικότερα επιστημονικά θέματα και έχουν συζητηθεί επίσης από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή και το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.), το κύριο ρυθμιστικό όργανο σχετικά με τη χρήση των χημικών ουσιών είναι ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Χημικών Ουσιών (European Chemical Agency). Ο αριθμός των επιστημονικών εκθέσεων που ασχολούνται με τους Ε.Δ. έχει αυξηθεί ραγδαία, με πολλές από αυτές να εστιάζουν στη σχέση των Ε.Δ. με την αναπαραγωγή, τις λειτουργίες του θυρεοειδούς αδένου, την ογκογόνο δράση, τη σχέση με την έναρξη και την εξέλιξη της εφηβείας ακόμα και με την παχυσαρκία (1).

Οι πρώτοι Ε.Δ. που εντοπίστηκαν ήταν εκείνοι με δράση παρόμοια με αυτή των οιστρογόνων, και όπως έχει αποδειχθεί μιμούνται ή παρεμποδίζουν τη δράση των οιστρογόνων και χαρακτηρίζονται ως ξενοοιστρογόνα. Δρουν προσθετικά με τα ενδογενή οιστρογόνα, αν και συνήθως έχουν χαμηλότερη συγγένεια προς τους κλασικούς υποδοχείς οιστρογόνων. Τα ίδια ξενοοιστρογόνα που φαίνεται να είναι ασθενείς αγωνιστές για τους οιστρογονικούς υποδοχείς, μπορεί να είναι ισχυροί αγωνιστές όταν δρουν μέσω των μεμβρανικών υποδοχέων γεγονός το οποίο εξηγεί την ικανότητά τους να παράγουν βιολογικές επιδράσεις σε χαμηλές δόσεις (2).



Εικόνα 1.1 Τρόποι δράσης ενδοκρινικών διαταρακτών (EDCs) (3).

Στο περιβάλλον, εμφανίζονται παράλληλα πολλές χημικές ουσίες και ο ανθρώπινος οργανισμός εκτίθεται συνήθως σε ένα μείγμα χημικών ουσιών που μπορεί να έχουν προσθετικές ή ακόμη και συνεργικές επιδράσεις. Πολλοί Ε.Δ. είναι ανθεκτικοί, με αποτέλεσμα τη βιοσυσσώρευσή τους στην τροφική αλυσίδα και στον ανθρώπινο οργανισμό. Η ηλικία κατά την οποία ένας οργανισμός εκτίθεται σε έναν Ε.Δ. μπορεί επίσης να είναι καθοριστική. Στους ενήλικες, απαιτούνται συνήθως υψηλότερα επίπεδα για να προκληθούν επιβλαβείς επιδράσεις, αλλά κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης ανάπτυξης ακόμη και πολύ χαμηλές δόσεις μπορεί να έχουν μακροχρόνιες επιδράσεις (The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis).

## 1.2 ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ – ΣΤΟΧΟΙ

### 1.2.1 GLYPHOSATE

Η έκθεση σε φυτοφάρμακα αποτελεί κίνδυνο και μπορεί να οδηγήσει σε οξείες και χρόνιες επιπτώσεις στην υγεία, συμπεριλαμβανομένης της νευροτοξικότητας, της ενδοκρινικής διαταραχής και του καρκίνου. Έχει υπολογιστεί ότι περίπου 25 εκατομμύρια άνθρωποι δηλητηριάζονται από φυτοφάρμακα παγκοσμίως κάθε χρόνο, οδηγώντας σε περίπου 300.000 θανάτους ετησίως (4). Ο γενικός πληθυσμός εκτίθεται κυρίως μέσω της διατροφής, αλλά συνήθως σε χαμηλά επίπεδα. Οι ομάδες του πληθυσμού που κινδυνεύουν να εκτεθούν σε μεγάλο βαθμό στα φυτοφάρμακα είναι κυρίως οι αγρότες και οι ψεκαστές, και ιδιαίτερα σε χαμηλές έως μεσαίου εισοδήματος χώρες, όπου δεν υπάρχουν ή δεν τηρούνται αυστηρά μέτρα για τον κατάλληλο χειρισμό και την προστασία κατά τη χρήση των φυτοφαρμάκων (5). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι τα μέλη της οικογένειας των αγροτών, παρόλο που δεν δραστηριοποιούνται ως αγρότες, μπορούν να εκτεθούν σε αυξημένα επίπεδα φυτοφαρμάκων (6,7).

Το glyphosate ή γλυφοσάτη (N-(phosphonomethyl) glycine, GLY) είναι ένα από τα κυριότερα φυτοφάρμακα που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα και είναι το πιο εμπορεύσιμο φυτοφάρμακο παγκοσμίως για τον μη επιλεκτικό έλεγχο των ζιζανίων (8). Χρησιμοποιείται κυρίως στη γεωργία μεγάλης κλίμακας, αλλά είναι επίσης πολύ διαδεδομένο στους οικιακούς κήπους. Έχει την ικανότητα να αναστέλλει την ανάπτυξη των φυτών παρεμβαίνοντας στην παραγωγή των αρωματικών αμινοξέων φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη, γεγονός που προκαλεί μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης (9). Το GLY διασπάται στο περιβάλλον κυρίως μέσω της δράσης μικροοργανισμών, ιδίως βακτηρίων, σε αμινομεθυλοφωσφονικό οξύ (AMPA). Η τύχη του GLY και ο αντίκτυπος του στα οικοσυστήματα, επηρεάζονται από παράγοντες όπως ο ρυθμός εφαρμογής GLY, οι ιδιότητες του εδάφους, οι διαδικασίες μεταφοράς και οι πρακτικές διαχείρισης καθώς επίσης και από τα χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών. Ως αποτέλεσμα, υπάρχουν αντικρουόμενες πληροφορίες στη βιβλιογραφία σχετικά με τις επιπτώσεις της γλυφοσάτης στο περιβάλλον (10).



Οι τρέχουσες γεωργικές δραστηριότητες εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη χρήση εμπορικών σκευασμάτων με βάση το GLY, και αυτό έχει γίνει ακόμη πιο έντονο τα τελευταία χρόνια, επειδή πάνω από το 75% των γενετικά τροποποιημένων φυτών έχουν διαμορφωθεί έτσι ώστε να ανέχονται υψηλά επίπεδα GLY (11). Η επαναλαμβανόμενη χρήση του GLY κατά τη διάρκεια των ετών οδήγησε τελικά στην εμφάνιση ζιζανίων ανθεκτικών στο GLY, κάτι που ανάγκασε τους αγρότες να ψεκάζουν μεγαλύτερη δόση GLY πιο συχνά. Αυτή η επιταχυνόμενη χρήση οδήγησε στη συσσώρευση υπολειμμάτων GLY στο περιβάλλον, στο έδαφος, στο νερό και στα φυτά. Τα σκευάσματα των ζιζανιοκτόνων με βάση του GLY είναι πολύπλοκα και μεταβλητά μείγματα τα οποία περιέχουν βοηθητικά και επιφανειοδραστικά προσθετικά εκτός από τη δραστική ουσία GLY, με στόχο την αύξηση της απορρόφησης και της αποτελεσματικότητάς τους (8). Δυστυχώς, οι επιφανειοδραστικές ουσίες μπορεί να παρουσιάσουν τοξικότητα πολλές φορές μεγαλύτερη από το GLY, καθιστώντας το τυποποιημένο προϊόν πολύ πιο τοξικό από το απομονωμένο δραστικό συστατικό (11).

Το GLY ή τα προϊόντα που περιέχουν GLY περιορίζονται ή απαγορεύονται επί του παρόντος σε αρκετές χώρες, αφού οι αξιολογήσεις της IARC και της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης και του αυξημένου κινδύνου εμφάνισης διαφόρων μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του λεμφώματος non-Hodgkin (NHL) (EFSA, 2015- IARC, 2017). Ωστόσο, άλλοι διεθνείς ρυθμιστικοί οργανισμοί, όπως ο WHO/FAO και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Χημικών Προϊόντων (ECHA), κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το GLY είναι απίθανο να έχει καρκινογόνο δράση για τον άνθρωπο (ECHA, 2017- WHO/FAO, 2016) (5).

Το GLY, το προϊόν διάσπασής του, AMPA, καθώς και/ή τα προϊόντα που το περιέχουν ως δραστική ουσία είναι ύποπτα για την πρόκληση διαφόρων προβλημάτων υγείας κατά τη διάρκεια των ετών. Νεφρική και ηπατική βλάβη, διάφορες μορφές καρκίνου και ψυχικές παθήσεις όπως η νόσος του Alzheimer και η νόσος του Parkinson έχουν συνδεθεί με την εκτεταμένη χρήση του GLY. Ακόμη, έχουν καταγραφεί περιστατικά αποβολών, δερματολογικών ερεθισμών και αναπνευστικών προβλημάτων μετά από έκθεση σε GLY. Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες έχουν δείξει αύξηση της στειρότητας και των δυσμορφιών μεταξύ των χοίρων, καθώς και βλάβες στο DNA και αυξημένη μεθυλίωση *in vitro* (12). Έχει αποδειχθεί ότι το AMPA συνδέεται με γενετοξικότητα, οξειδωτικό στρες, προβλήματα στην

ανάπτυξη και το μεταβολισμό καθώς και συμπεριφορικά προβλήματα (13). Εκτός από το GLY, το Roundup® περιέχει πολυαιθοξυλιωμένη ταλλεινική αμίνη (POEA), ένα επιφανειοδραστικό που ενισχύει την πρόσληψη και τη μετατόπιση του δραστικού συστατικού. Ωστόσο, το Roundup® περιέχει πολλά ακόμη συστατικά για τα οποία ο πλήρης κατάλογος παραμένει άγνωστος, καθώς θεωρείται εμπορικό μυστικό και συνεπώς προστατεύεται από την εταιρεία. Κατά συνέπεια, έχει γίνει πιο δύσκολο να κατανοήσουμε τους κινδύνους που εγκυμονεί η χρήση του Roundup® (14). Σήμερα, είναι προφανές ότι η ασφάλεια του Roundup® αμφισβητείται έντονα. Από το 2015, έχουν κατατεθεί περισσότερες από 300 αγωγές που κατηγορούν το προϊόν ότι είναι επιβλαβές για την ανθρώπινη υγεία. Επί του παρόντος, αρκετές χώρες έχουν απαγορεύσει τη χρήση του, αλλά οι βλαβερές επιπτώσεις του εξακολουθούν να υπάρχουν στο περιβάλλον και στον άνθρωπο.

## 1.2.2 PARABENS

Τα parabens (PBs) ή παραβένια, τα οποία είναι εστέρες του παρα-υδροξυβενζοϊκού οξέος, εισήχθησαν για πρώτη φορά στην αγορά το 1930 και χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά και αντιμικροβιακοί παράγοντες (15). Χρησιμοποιούνται ευρέως στα καλλυντικά και τα προϊόντα προσωπικής φροντίδας λόγω των πλεονεκτικών φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών τους, συμπεριλαμβανομένης της άχρωμης κρυσταλλικής τους μορφής, της έλλειψης οσμής ή γεύσης, της ικανότητάς τους να λειτουργούν καλά σε ένα ευρύ φάσμα τιμών pH και της σταθερότητάς τους ακόμη και όταν αναμειγνύονται με άλλα προϊόντα (16). Τα PBs προτιμώνται για τη χημική τους σταθερότητα και τις ευρείες αντιμικροβιακές τους ιδιότητες, ιδίως έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων και μυκήτων. Η ισχύς της αντιμικροβιακής επίδρασης αυξάνεται όσο αυξάνεται το μήκος της αλειφατικής αλυσίδας, με το butyl paraben να είναι το πιο αποτελεσματικό. Ωστόσο, η διαλυτότητα των PBs μειώνεται με την αύξηση του μήκους της αλυσίδας, αλλά αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση διαφορετικών αλάτων. Η σταθερότητα των PBs μειώνεται παρουσία μη ιοντικών επιφανειοδραστικών ουσιών, όπως το πολυσορβικό 80. Για βέλτιστη αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα, τα PBs χρησιμοποιούνται συχνά σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες, όπως το EDTA και η μαλιτιτόλη (17).

Τα PBs αποτελούν το πιο κοινό συστατικό σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας, μετά το νερό, με αποτέλεσμα τη σημαντική έκθεση των ανθρώπων και του περιβάλλοντος, ιδίως σε υδάτινα περιβάλλοντα. Έχει βρεθεί ότι τα PBs παρουσιάζουν οιστρογονική δράση και παρεμβαίνουν σε ορμόνες όπως τα ανδρογόνα, τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη και τα γλυκοκορτικοστεροειδή (18). Ανησυχία προκαλεί η σύνδεσή τους με δυσμενείς επιδράσεις στην αναπαραγωγή, παιδική παχυσαρκία, αναστολή της σωστής λειτουργίας του θυρεοειδούς αδένου, μείωση των τελομερικών άκρων, δυσλειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος, καρκινογόνος δράση (κυρίως συσχέτιση με τον καρκίνο του μαστού), βλάβη στο DNA σε παιδιά, καθώς επίσης και αύξηση του κινδύνου εμφάνισης ατοπικού άσθματος και ευαισθητοποίησης σε αεροαλλεργιογόνα σε παιδιά, διαταραχή του εμμηνορροϊκού κύκλου που εκδηλώνεται με συντομότερους κύκλους στις γυναίκες, μειωμένη γονιμότητα και εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (16,19). Σε απάντηση, έχουν τεθεί περιορισμοί στη χρήση των PBs σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας και καλλυντικά, ενώ το 2013 η Ευρωπαϊκή Επιτροπή απαγόρευσε τη χρήση ορισμένων PBs στα προϊόντα αυτά (18).

### 1.2.3 TRICLOSAN

Το triclosan ή τρικλοζάνη (TCS), ή 5-χλωρο-2-(2,4-διχλωροφαινοξυ) φαινόλη, είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος αντιμικροβιακός παράγοντας. Είναι γνωστό επίσης με τις ονομασίες Irgasan DP300, CH3565, GP41-353, FAT 80'023, Irgacare MP και Irgasan. Το TCS παρήχθη για πρώτη φορά το 1964 από την ελβετική εταιρία Ciba-Geigy και χρησιμοποιήθηκε κυρίως ως απολυμαντικό σε ιατρικές εγκαταστάσεις. Με την πάροδο του χρόνου, προστέθηκε σε διάφορα καταναλωτικά προϊόντα, όπως σαπούνια, οδοντόκρεμες, καλλυντικά και προϊόντα καθαρισμού (20,21). Η ποσότητα TCS σε αυτά τα προϊόντα είναι συνήθως μεταξύ 0,1% έως 0,3% του βάρους τους. Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή TCS έχει ξεπεράσει τους 1500 τόνους ετησίως (22).

Το 2016, ο FDA απαγόρευσε την χρήση TCS σε προϊόντα σαπουνιού, ενώ το 2017, απαγορεύτηκε η χρήση του σε όλα τα βιοκτόνα προϊόντα υγιεινής στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Λόγω της ευρείας χρήσης του και παρά τις απαγορεύσεις αυτές, το TCS εξακολουθεί να υπάρχει σε ορισμένα προϊόντα και μπορεί να ανιχνευθεί σε διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα,

όπως ακατέργαστα και επεξεργασμένα λύματα, ρυάκια, λυματολάσπη, ψάρια, ακόμη και σε ανθρώπινα σωματικά υγρά, όπως ούρα, πλάσμα και μητρικό γάλα (22).

Το TCS έχει συνδεθεί με ενδοκρινικές διαταραχές και έχει βρεθεί ότι προσδένεται στους υποδοχείς των θυρεοειδικών ορμονών και έχει αντιανδρογονική και αντιοιστρογονική δραστηριότητα (23). Θεωρείται επίσης αλλεργιογόνο, το οποίο μπορεί να προκαλέσει ή να επιδεινώσει την ευαισθησία στα αλλεργιογόνα. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι συνδέεται με αρνητικές επιδράσεις στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-θυρεοειδούς τόσο σε μελέτες σε ζώα όσο και σε μελέτες παρατήρησης σε ανθρώπους. Ιδιαίτερη ανησυχία υπάρχει για τις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας καθώς το TCS έχει την ικανότητα να διαπερνά τον πλακούντα και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να εισέρχεται στο μητρικό γάλα. Το TCS, συνδέεται επίσης με νευροαναπτυξιακές διαταραχές, μεταβολικές διαταραχές και καρδιοτοξικότητα, ενώ η συσχέτιση του με την εμφάνιση καρκίνου είναι αμφιλεγόμενη. Ορισμένες μελέτες αναφέρουν ότι το TCS αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, ενώ παράλληλα άλλες προτείνουν την επανατοποθέτηση του TCS στη θεραπεία του καρκίνου, ιδίως του καρκίνου του προστάτη (21).

#### 1.2.4 BISPHEENOL A

Η bisphenol A ή δισφαινόλη A (BPA), ή 4,4'-(προπανο-2,2-διυλ) διφαινόλη, ανακαλύφθηκε το 1891 από τον Aleksandr Dianin, και αργότερα συντέθηκε το 1905 από τον Zincke με τη χρήση αντίστοιχων φαινολών και τη συμπύκνωση ακετόνης. Στα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα, η BPA γνώρισε αυξημένη ζήτηση για χρήση σε πολυμερή, συμπεριλαμβανομένων των πολυκαρβονικών, της πολυσουλφόνης, του πολυακρυλικού και των εποξειδικών ρητινών, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν επίσης ως αντιοξειδωτικά και ως τελικό στάδιο για την αναστολή του πολυμερισμού στα πλαστικά PVC (24). Η BPA έχει διάφορες βιομηχανικές χρήσεις, όπως στην παραγωγή μελανιών και χρωμάτων, στην κατασκευή θερμικών χαρτιών, συμπαγών δίσκων και ηλεκτρονικών ειδών. Ακόμη, χρησιμοποιείται ευρέως σε υλικά συσκευασίας τροφίμων, σε μπουκάλια νερού για φαγητό και σε επιστρώσεις βερνικιών για κονσερβοκούτια (24,25). Ωστόσο, η BPA έχει την ικανότητα να «μεταναστεύει» από την εσωτερική επίστρωση της συσκευασίας στο τρόφιμο ή ποτό ιδιαίτερα αν εκτεθεί σε μεγάλες θερμοκρασίες. Έτσι, η

κατανάλωση αυτών των τροφίμων αποτελεί μία από τις βασικές πηγές έκθεσης του ανθρώπου σε BPA (26).

Έχει αποδειχθεί ότι η BPA παρουσιάζει οιστρογονική δραστηριότητα. Εκτός όμως από τις οιστρογονικές επιδράσεις, η BPA έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα των ανδρογόνων, τον υποδοχέα του θυρεοειδούς, τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και αρκετούς άλλους. Οι επιδράσεις της BPA έχουν διαπιστωθεί σε συγκεντρώσεις συγκρίσιμες με εκείνες των ορμονών που απαντώνται στη φύση (1). Η αλληλεπίδραση αυτή με τους διάφορους ορμονικούς υποδοχείς έχει συνδεθεί με μία ευρεία λίστα προβλημάτων υγείας. Στη λίστα αυτή περιλαμβάνονται διαταραχή της ανάπτυξης, νοητικές βλάβες και συμπεριφορικές διαταραχές, καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, οξειδωτικό στρες, αναπαραγωγικά προβλήματα όπως αποβολές, στειρότητα, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, ενδομητρίωση αλλαγές στην ποσότητα, ποιότητα και κινητικότητα του σπέρματος, δυσπλασίες στα ανδρικά γεννητικά όργανα. Ιδιαίτερα ανησυχητική είναι η συσχέτιση της έκθεσης σε BPA με την εμφάνιση καρκίνου του μαστού, των ωοθηκών, της μήτρας, του προστάτη και των όρχεων (24).

Η δισφαινόλη Α (BPA) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη συνθετική ένωση με τον παγκόσμιο όγκο παραγωγής να εκτιμάται το 2015 σε 7,69 εκατομμύρια μετρικούς τόνους και να αυξάνεται σε 10,7 εκατομμύρια μετρικούς τόνους έως το 2020. Η παγκόσμια ζήτηση για την BPA εκτιμάται στα 22,49 δισεκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ το 2022, με τη μεγαλύτερη αγορά να βρίσκεται στην περιοχή της Ασίας και του Ειρηνικού και να αντιπροσωπεύει το 52% του μεριδίου αγοράς. Οι Η.Π.Α. και η Δυτική Ευρώπη συνεισφέρουν περίπου το 36% της αγοράς (24).

Το 2012, ο FDA περιόρισε τη χρήση πολυκαρβονικών ρητινών με βάση τη BPA σε μιμπερό και πιπίλες σε απάντηση σε αίτηση για πρόσθετα τροφίμων που κατέθεσε το Αμερικανικό Συμβούλιο Χημείας. Ένα χρόνο αργότερα, ο FDA επέκτεινε αυτούς τους περιορισμούς για τη χρήση εποξειδικών ρητινών με βάση τη BPA ως επικαλύψεις σε συσκευασίες για βρεφικά παρασκευάσματα, ενώ παράλληλα η Ευρωπαϊκή Επιτροπή κοινοποίησε την απόφαση να περιορίσει την BPA στα πλαστικά μιμπερό στην Ε.Ε. Το 2017, η FDA ξεκίνησε έρευνα επανεξέτασης της επικινδυνότητας της χρήσης της BPA και το 2020 απαγόρευσε τη χρήση της στο χαρτί θερμικής εκτύπωσης, ενώ αναμένεται να επιβληθούν απαγορεύσεις χρήσης της BPA

και σε άλλα προϊόντα. Ήδη σε πολλές πολιτείες των Η.Π.Α., έχουν γίνει μεγάλα κινήματα για την ολική απαγόρευση της χρήσης της και το έχουν καταφέρει σε κάποιες από αυτές (1).

Εξαιτίας των απαγορεύσεων αυτών, η BPA αντικαθίσταται συχνά από ανάλογα της όπως η δισφαινόλη S (BPS), η δισφαινόλη F (BPF) και η δισφαινόλη AF (BPAF). Δυστυχώς, η πλειονότητα των υποκατάστατων δεν δοκιμάζεται πριν από την εισαγωγή τους στην αγορά και συχνά παρουσιάζουν παρόμοιες ή και πιο ισχυρές διαταρακτικές επιδράσεις από τις αρχικές. (27). Ωστόσο, τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών έδειξαν ότι οι δραστηριότητες, ο μεταβολισμός και ο μηχανισμός δράσης των BPS και BPF είναι παρόμοιοι με τον BPA και, λαμβάνοντας υπόψη τις ορμονικές δράσεις, ενδέχεται να ενέχουν παρόμοιους δυνητικούς κινδύνους για την υγεία με τον BPA (28,29).

### 1.2.5 DI (2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE

Οι φθαλικοί εστέρες είναι διεστέρες του φθαλικού οξέος (1,2-βενζενιδικοκαρβοξυλικό οξύ) και είναι συνθετικές οργανικές χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία ως διαλύτες, πλαστικοποιητές και πρόσθετα στα πλαστικά πολυβινυλοχλωριδίου (PVC) ή στα προϊόντα προσωπικής φροντίδας (PCP). Περισσότεροι από 25 φθαλικοί εστέρες χρησιμοποιούνται σε εμπορικές εφαρμογές, με τον καθένα να προσθέτει μοναδικές ιδιότητες στο προϊόν στο οποίο ενσωματώνεται (30).

Το di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) είναι ένας από τους σημαντικότερους φθαλικούς εστέρες στο εμπόριο και συντέθηκε για πρώτη φορά για χρήση ως πλαστικοποιητής το 1933 (31). Χρησιμοποιείται ως πλαστικοποιητής στην παραγωγή χλωριούχου πολυβινυλίου (PVC) για την παραγωγή μαλακότερων και πιο εύκαμπτων υλικών. Το PVC που περιέχει DEHP χρησιμοποιείται σε νοσοκομειακό εξοπλισμό (ενδοφλέβια σωληνάκια και σακούλες), περιτύλιγμα τροφίμων, μόνωση καλωδίων και εξαρτήματα αυτοκινήτων (32). Τα προϊόντα PVC μπορεί να περιέχουν έως και 50% (κατά βάρος) φθαλικές ενώσεις (31). Στις μέρες μας, οι άνθρωποι εκτίθενται διάχυτα στους φθαλικούς εστέρες μέσω της κατάποσης, της εισπνοής και της απορρόφησης από το δέρμα, καθώς οι φθαλικοί εστέρες μπορούν εύκολα να

μεταναστεύσουν στο περιβάλλον διότι δεν είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένοι με τα πλαστικά (33).

Το DEHP είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος φθαλικός εστέρας που αντιπροσωπεύει σχεδόν το 50% της παγκόσμιας κατανάλωσης φθαλικών εστέρων και έχει συσχετιστεί με διάφορες αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία (33). Η κύρια πηγή έκθεσης του ανθρώπου στο DEHP είναι τα τρόφιμα και το εμφιαλωμένο νερό, παρόλο που το DEHP δεν χρησιμοποιείται για την κατασκευή μπουκαλιών νερού. Το DEHP είναι πιο πιθανό να διαρρεύσει σε λιπαρά τρόφιμα ή σε τρόφιμα που έχουν υψηλή συγκέντρωση λιπιδίων, καθώς παρουσιάζει αυξημένη διαλυτότητα στα έλαια αλλά όχι στο νερό. Άλλες πηγές έκθεσης περιλαμβάνουν τη σκόνη του σπιτιού, τον αέρα εσωτερικών χώρων, το χώμα ή τις αποθήκες νερού, αλλά αυτές είναι δευτερεύουσες πηγές που οδηγούν σε μια ελάχιστη πρόσληψη (34). Αφού εισέλθει στον οργανισμό, το DEHP μεταβολίζεται σε διάφορες ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων της 2-αιθυλεξανολικής εξανόλης, του 2-αιθυλεξανοϊκού οξέος και του MEHP (φθαλικός μονο (2-αιθυλεξυλ) εστέρας). Αυτοί οι μεταβολίτες θεωρούνται πιο τοξικοί από τη μητρική ένωση, ιδίως το MEHP, μια ουσία που έχει συσχετιστεί με αντιανδρογόνο δράση στον άνθρωπο (34). Το ίδιο το DEHP διαταράσσει επίσης τη φυσιολογική λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος (32).

Λαμβάνοντας υπόψη τις επιπτώσεις της DEHP στον άνθρωπο, έχει απαγορευθεί η χρήση έξι φθαλικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένου και του DEHP, στην παραγωγή παιχνιδιών στις Η.Π.Α., τον Καναδά και την Ε.Ε. Παρόλο που ορισμένοι φθαλικοί εστέρες έχουν περιοριστεί στα παιδικά παιχνίδια, εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται σε παιχνίδια σε πολλές άλλες περιοχές του κόσμου, συμπεριλαμβανομένης της Κίνας και της Ινδίας, χωρίς περιοριστικούς κανονισμούς. Επιπλέον, τα παιδιά εξακολουθούν να εκτίθενται σε φθαλικές ενώσεις μέσω καλλυντικών και προϊόντων προσωπικής φροντίδας, καθώς και μέσω σχολικών ειδών από PVC, όπως τετράδια, ντοσιέ, είδη ζωγραφικής, σακίδια, κουτιά φαγητού, συνδετήρες και ομπρέλες. Φθαλικές ενώσεις μπορούν επίσης να βρεθούν και σε αδιάβροχα, μπότες, τσάντες και μαλακά πλαστικά παπούτσια (31).

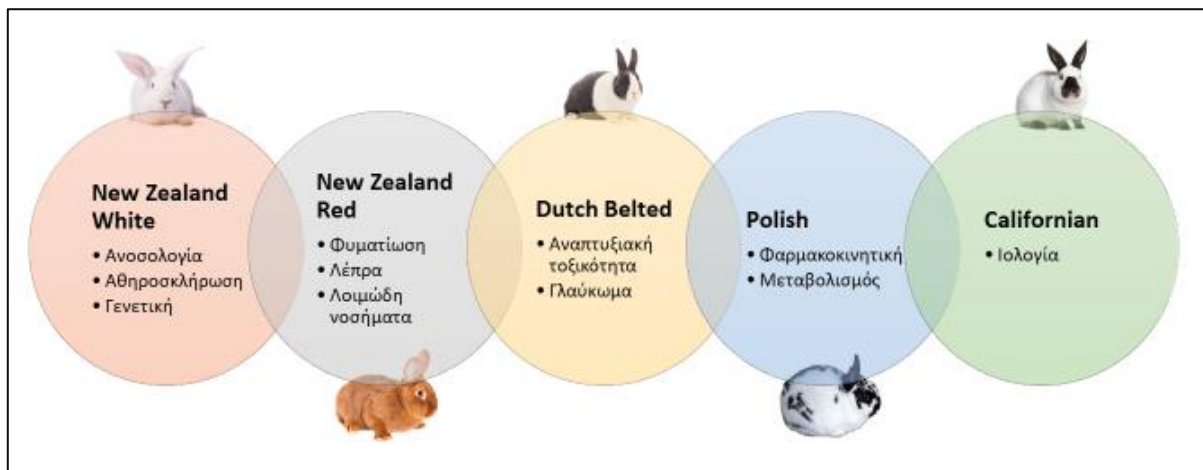
Η έκθεση σε DEHP έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση διαβήτη, παχυσαρκίας, αλλεργιών και άσθματος, καρκίνου καθώς και αναπαραγωγικών προβλημάτων όπως αποβολές και πρόωρους τοκετούς (31). Συγκεκριμένα, έκθεση των παιδιών σε φθαλικούς εστέρες έχει συσχετιστεί με

ακατάλληλη σεξουαλική ανάπτυξη, όπως πρόωγη ανάπτυξη του μαστού, δυσμενείς διαταραχές του ανοσοποιητικού, νευρικού και αναπνευστικού συστήματος, όπως άσθμα και βρογχική απόφραξη καθώς και πρόωγη εφηβεία. Παράλληλα, έκθεση ενηλίκων σε φθαλικούς εστέρες έχει βρεθεί να έχει σχέση με μη φυσιολογική διάρκεια/απώλεια εγκυμοσύνης, πρόωρο τοκετό αύξηση του σωματικού βάρους, αντίσταση στην ινσουλίνη, αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού αλλά και μεταστάσεων, και μη φυσιολογικές πνευμονικές λειτουργίες στους άνδρες (35).



### 1.3 ΤΑ ΚΟΥΝΕΛΙΑ ΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Τα κουνέλια είναι μικρά θηλαστικά της οικογένειας Leporidae της τάξης Lagomorpha (36) που απαντώνται σε διάφορα μέρη του κόσμου. Οι συνήθεις εργαστηριακές φυλές κουνελιών προέρχονται από το ευρωπαϊκό κουνέλι (*Oryctolagus cuniculus*), μεταξύ των οποίων οι πιο ζωτικές για την έρευνα είναι το New Zealand White (αλμπίνο), το New Zealand Red, το Dutch-belted, το Californian White, και το Polish. Ωστόσο, έχουν αναγνωριστεί από την Αμερικανική Ένωση Εκτροφέων Κουνελιών, (American Rabbit Breeders Association, ARBA) περίπου 30 φυλές κουνελιών (συμπεριλαμβανομένων των μεταλλαγμένων στελεχών) για εμπορικές και πειραματικές χρήσεις. Οι φυλές κουνελιών μπορούν να διαφοροποιηθούν σε γενικές γραμμές με βάση το μέγεθος και το σωματικό τους βάρος. Συγκεκριμένα, το μικρό αναφέρεται σε λιγότερο από 2 κιλά (Polish, Dutch-belted), το μεσαίο αναφέρεται σε 2-5 κιλά (New Zealand White, New Zealand Red, Californian White), ενώ το μεγάλο αναφέρεται σε αυτά που ξεπερνούν ακόμη και τα 5 κιλά (Flemish). Αν και το New Zealand White είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο εργαστηριακό στέλεχος, καθώς είναι εύκολο να εντοπιστούν οι επιφανειακές φλέβες και αρτηρίες του για τη συλλογή αίματος, και τα άλλα στελέχη χρησιμοποιούνται σε σημαντικές ερευνητικές προσπάθειες (Εικόνα 1.2) (37).



Εικόνα 1.2 Είδη κουνελιών που χρησιμοποιούνται ως πειραματόζωα (37).

Τα πλεονεκτήματα χρήσης κουνελιών ως πειραματόζωα είναι τα εξής (38):

- Μη εχθρική συμπεριφορά, που το καθιστά εύκολο στη διαχείριση και την παρατήρηση.
- Εκτρέφεται ευρέως και είναι πολύ πιο αποδοτικό από τα μεγαλύτερα ζώα.
- Οι ζωτικοί του κύκλοι, όπως η κύηση, η γαλουχία και η εφηβεία, είναι σύντομοι.
- Δεδομένου ότι ταξινομείται ως μικρό ζώο, εμπίπτει στη δικαιοδοσία της τοπικής επιτροπής δεοντολογίας. Αντίθετα, η λήψη άδειας από την κεντρική επιτροπή δεοντολογίας για τα μεγαλύτερα ζώα είναι μια χρονοβόρα και αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία.
- Οι εγκαταστάσεις εκτροφής που απαιτούνται για τη χορήγηση άδειας ηθικής και δεοντολογίας για την εκτέλεση χειρουργικών επεμβάσεων σε μεγαλύτερα ζώα είναι πολύ περίπλοκες και δαπανηρές, και συνήθως είναι εφικτές μόνο για κεντρικές εγκαταστάσεις έρευνας σε ζώα.

Ωστόσο, τα πειράματα με κουνέλια παρουσιάζουν και κάποια προβλήματα που είναι κοινά για πολλά ζώα, όπως (38)

- Η έλλειψη καλά εξοπλισμένων χώρων φιλοξενίας ζώων, εμπειρών χειριστών και άμεσα διαθέσιμης μετεγχειρητικής και διεγχειρητικής φαρμακευτικής αγωγής.
- Η έλλειψη βιβλιογραφίας σχετικά με τη φροντίδα των κουνελιών κατά τη διάρκεια της πειραματικής χρήσης καθώς και η ύπαρξη λίγων κτηνιατρικών χειρουργών που ειδικεύονται στα κουνέλια.

## 1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί μια μελέτη προσομοίωσης της έκθεσης του ανθρώπου σε ενδοκρινικούς διαταράκτες στην πραγματική ζωή. Συγκεκριμένα, στοχεύσαμε στην εκτίμηση της συνδυαστικής δράσης των glyphosate, BPA, PBs, TCS και DEHP, στον οργανισμό κουνελιών έπειτα από δωδεκάμηνη συνδυαστική έκθεση σε αυτές τις ενώσεις. Παράλληλα, έγινε σύγκριση των επιπτώσεων που επήλθαν ύστερα από δωδεκάμηνη έκθεση στην καθαρή μορφή του glyphosate σε σχέση με την εμπορική του μορφή (ζιζανιοκτόνο Roundup®). Η εκτίμηση της τοξικότητας των ανωτέρω πραγματοποιήθηκε εξετάζοντας οξειδοαναγωγικούς βιοδείκτες και βιολογικούς δείκτες βλάβης του DNA (μέτρηση μικροπυρήνων και ένταση ουράς (comet)), και ακόμη μετρώντας τις αναπαραγωγικές ορμόνες και μελετώντας τις κυτταρολογικές βλάβες.

## 2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

### 2.1 *In vivo* ΠΕΙΡΑΜΑ

#### 2.1.1 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ

Ο αριθμός των ζώων καθώς και οι μέθοδοι εκτροφής και θεραπείας ακολουθούν τους κανόνες της αρχής των 3R (Replacement (αντικατάσταση), Reduction (μείωση) και Refinement (βελτίωση)) καθώς και όλες τις κατευθυντήριες γραμμές από τις αρμόδιες αρχές της Ευρωπαϊκής Ένωσης σχετικά με τη χρήση πειραματόζωων (39,40).

Τα 3R σημαίνουν:

- **Replacement**

Αντικατάσταση της χρήσης ζώων με μη ζωικές μεθόδους, όπου αυτό είναι δυνατόν.

- **Reduction**

Μείωση του αριθμού των χρησιμοποιούμενων ζώων στο ελάχιστο, με παράλληλη επίτευξη επιστημονικά έγκυρων αποτελεσμάτων.

- **Refinement**

Βελτίωση των πρακτικών για την ελαχιστοποίηση του στρες και την ενίσχυση της ευζωίας των πειραματόζωων που χρησιμοποιούνται.

Αυτοί οι κανόνες είναι αυστηροί ώστε να εξασφαλίζεται η ευημερία των ζώων, καθώς και η συγκρατημένη και ορθολογική χρήση τους, και η Επιτροπή Δεοντολογίας απαιτεί την πλήρη συμμόρφωση με αυτούς τους κανόνες. Η έρευνα έχει καταχωρηθεί στο Animal Study Registry (DOI: 10.17590/asr.0000259). Το πρωτόκολλο έχει εγκριθεί από την Επιτροπή Ηθικής και Ακαδημαϊκής και Επιστημονικής Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Ιατρικής και Φαρμακευτικής της Craïona (4/17 Ιανουαρίου 2020).

## 2.1.2 ΕΚΤΡΟΦΗ

Είκοσι κουνέλια (10 αρσενικά και 10 θηλυκά), ηλικίας τριών μηνών και βάρους περίπου τριών κιλών το καθένα, χωρίστηκαν σε πέντε ομάδες (τέσσερα ζώα σε κάθε ομάδα) και φιλοξενήθηκαν σε ατομικά μεταλλικά κλουβιά. Μετά από μία εβδομάδα εγκλιματισμού των κουνελιών, άρχισε η χορήγηση των ενώσεων ενδιαφέροντος.

Η πρώτη ομάδα αποτελεί την ομάδα ελέγχου (control) και λάμβανε κανονική διατροφή (νερό, τροφή εμποτισμένη με καλαμποκέλαιο (5% αιθανόλη/νερό)). Στις ομάδες 2 και 3 χορηγήθηκαν χαμηλές και υψηλές δόσεις, αντίστοιχα, μείγματος των ουσιών BPA, MePB, PrPB, BuPB, TCS, DEHP και GLY (85%), ενώ η τέταρτη και η πέμπτη ομάδα έλαβαν υψηλή δόση GLY στην καθαρή και εμπορική του μορφή, αντίστοιχα (Πίνακας 2.1). Οι ουσίες διαλύθηκαν σε 5% αιθανόλη/νερό για την παρασκευή των διαλυμάτων αποθέματος. Οι ουσίες αφού διαλύονταν σε 5% αιθανόλη / νερό, αναμειγνύονταν με την τροφή και χορηγούνταν στα ζώα μία φορά την ημέρα, πέντε ημέρες ανά εβδομάδα για δώδεκα συνεχόμενους μήνες. Οι δόσεις που αντιστοιχούσαν σε κάθε ομάδα διαμορφώθηκαν με βάση τα όρια που έχουν θεσπιστεί από τις αρμόδιες αρχές (βλ. παράγραφο 2.1.3) και λαμβάνοντας υπόψη το βάρος του κάθε ζώου καθώς η εκάστοτε δόση υπολογιζόταν σε mg ουσίας ανά kg σωματικού βάρους. Η τελική ημερήσια ποσότητα αιθανόλης στη χορηγούμενη τροφή ήταν μικρότερη από 0,5%.

Πίνακας 2.1 Ομάδες και δόσεις του in vivo πειράματος

Ομάδα	Κωδικός	Περιγραφή	Δόση	Ουσία
1	Control	Ελέγχου	-	-
2	LD	Μείγμα σε χαμηλή δόση	1 x ADI	GLY, BPA, MePB, PrPB, BuPB, TCS, DEHP
3	HD	Μείγμα σε υψηλή δόση	10 x ADI	GLY, BPA, MePB, PrPB, BuPB, TCS, DEHP
4	Glyphosate	Υψηλή δόση GLY σε καθαρή μορφή	10 x ADI	GLY
5	Roundup®	Υψηλή δόση GLY σε εμπορική μορφή	10 x ADI	GLY

Όλα τα ζώα παρακολουθούνταν και εξετάζονταν καθημερινά για σημεία νοσηρότητας ή θνησιμότητας. Η παρακολούθηση περιλάμβανε εξέταση της γούνας, των βλεννογόνων και των εκκρίσεων, καθώς και παρατήρηση της συμπεριφοράς των ζώων. Η κατανάλωση τροφής και νερού καταγραφόταν επίσης καθημερινά. Συγκεκριμένα, η κατανάλωση των ομάδων χορήγησης (ομάδες 2, 3, 4 και 5) συνεκρίθει με την κατανάλωση της ομάδας ελέγχου (ομάδα 1) για τον εντοπισμό τυχόν διαφορών.

### 2.1.3 ΔΟΣΟΛΟΓΙΕΣ

Οι δοσολογίες χορήγησης βασίστηκαν στα όρια που έχουν καθοριστεί από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) και την ανάλογη υπηρεσία στον Καναδά. Σύμφωνα με την EFSA, το ADI για την BPA ορίζεται σε 0,004 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, για το BuPB σε 0,5 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, για όλα τα PBs (MePB, PrPB) σε 0-10 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα (θεωρείται 5 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα για την MePB και 5 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα για την PrPB), για το σύνολο των φθαλικών ενώσεων ως 0,05 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα και για τη GLY έως 0,5 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα. Η κυβέρνηση του Καναδά καθόρισε την ADI για το TCS σε 0,08 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα.

Η χαμηλή δόση των χορηγούμενων διαλυμάτων (ομάδα 2) περιείχε ποσότητα από κάθε ένωση ίση με το ADI της ( $1 \times \text{ADI}$ ), ενώ η υψηλή δόση (ομάδα 3, 4 και 5) ίση με το δεκαπλάσιο του ADI ( $10 \times \text{ADI}$ ).

### 2.1.4 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ – ΘΑΝΑΤΩΣΗ

Κατά την έναρξη του πειράματος *in vivo* ( $t = 0$  μήνας) και κάθε τρεις μήνες ( $t = 3, 6, 9$  και 12 μήνες), πραγματοποιείτο συλλογή δειγμάτων αίματος. Όλα τα ζώα θανατώθηκαν στο τέλος του πειράματος σχήματος, με phenobarbital sodium (εμπορικό διάλυμα Dolethal, 5ml/5kg σωματικού βάρους), αφού πρώτα υπέστησαν νάρκωση με υποδόρια ένεση διαλύματος Xylapan/Narketan (2/1), και νεκροτομήθηκαν από τον αρμόδιο κτηνίατρο.

Οι ιστοί που συλλέχθηκαν ήταν καρδιά, ήπαρ, νεφροί, θυρεοειδής αδένας, ωθήκες και όρχεις. Σύμφωνα με τις ήδη υπάρχουσες μελέτες, ο θυρεοειδής αδένας και τα γεννητικά όργανα επηρεάζονται άμεσα από τους ενδοκρινικούς διαταράκτες, λόγω της ορμονοεξαρτώμενης λειτουργίας τους, ενώ οι νεφροί και το ήπαρ αποτελούν τα «φίλτρα» του οργανισμού και άρα επιβαρύνονται ιδιαίτερα. Ακόμη, η έκθεση στους ενδοκρινικούς διαταράκτες που μελετάμε έχει συσχετιστεί και με καρδιακά νοσήματα.

Αφού αφαιρέθηκαν οι ιστοί, κόπηκαν σε κομμάτια και χωρίστηκαν σε eppendorf ούτως ώστε να πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες (φύλαξη στους -80°C), ενώ παράλληλα λήφθηκαν αποτυπώματα των ιστών σε αντικειμενοφόρους πλάκες για την εκτίμηση των κυτταρολογικών βλαβών (φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου).

## 2.2 ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

### 2.2.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ

Σε κάθε δειγματοληψία (κάθε 3 μήνες), πραγματοποιείται συλλογή δειγμάτων ολικού αίματος, συγκεκριμένα 1 ml ολικού αίματος, σε σωληνάρια ηπαρίνης, από τη σφαγίτιδα φλέβα του κάθε ζώου. Τα δείγματα παρέμεναν στους 4 °C μέχρι την ανάλυση.

Για την καλλιέργεια των κυττάρων αναμείχθηκαν τα παρακάτω:

- 0,5 ml από το αίμα κάθε ζώου αναμείχθηκαν
- 6,5 ml μέσου HAM (αυξητικός παράγοντας),
- 1,5 ml εμβρυϊκός ορός βοοειδούς (FBS, Fetal Bovine Serum), ένας αυξητικός παράγοντας που περιέχει χαμηλές ποσότητες αντισωμάτων
- 0,3 ml φυτοαιμοσυγκολλητίνης (PHA), ένα μιτογόνο που επάγει τη διαίρεση των κυττάρων των λεμφοκυττάρων
- 0,1 ml αντιβιοτικού για την αποφυγή επιμόλυνσης της κυτταροκαλλιέργειας.

Η κυτταροκαλλιέργεια παρασκευάστηκε υπό αποστειρωμένες συνθήκες σε ειδικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειας και τοποθετήθηκε στον επωαστήρα στους 37°C με παροχή 5% CO<sub>2</sub>.

Με το πέρας της επώασης των κυτταροκαλλιεργειών για 44 ώρες, προστέθηκαν 20μl κυτταροχλασίνης β σε κάθε καλλιέργεια και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν ξανά στον επωαστήρα για 28 ώρες (72 ώρες επώασης συνολικά). Η κυτταροχλασίνη β αναστέλλει την κυτταροπλασματική διαίρεση παρεμποδίζοντας τον σχηματισμό νηματίων ακτίνης. Με τον τρόπο αυτό, η κυτταροκίνηση σταματά, ενώ η πυρηνική διαίρεση συνεχίζεται, κάτι που οδηγεί στο σχηματισμό διπύρηνων κυττάρων.

Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση των καλλιεργειών, το επόμενο στάδιο ήταν η σταθεροποίηση των κυττάρων. Όλα τα βήματα που αναφέρονται παρακάτω πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση αναμεικτήρα vortex.

- Μεταφορά των καλλιεργειών σε σωληνάρια falcons των 10 ml



- Φυγοκέντρωση στα 1500 rpm για 10 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού
- Προσθήκη 4 ml υποτονικού διαλύματος (ddH<sub>2</sub>O : HAM 1:1) για τη διάσπαση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και αναμονή για 4 λεπτά. Είναι πολύ σημαντικό, ο χρόνος αυτός να μην ξεπεραστεί ούτως ώστε να διασπαστούν μόνο τα ερυθρά αιμοσφαίρια και όχι τα λεμφοκύτταρα.
- Προσθήκη 4 ml σταθεροποιητικού διαλύματος (CH<sub>3</sub>OH : CH<sub>3</sub>COOH 3:1)
- Φυγοκέντρωση στα 1200 rpm για 10 λεπτά
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και προσθήκη 4 ml σταθεροποιητικού διαλύματος

Τα δύο τελευταία στάδια επαναλήφθηκαν τουλάχιστον 3 φορές έως ότου το υγρό να γίνει διαυγές. Μετά την τελευταία φυγοκέντρωση απομακρύνθηκε το μεγαλύτερο μέρος του υπερκείμενου υγρού και η κυτταρική πελέτα επαναιωρήθηκε απαλά με τα 0,5 ml υπερκείμενου υγρού που παρέμειναν. Στη συνέχεια, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Για κάθε κυτταρική καλλιέργεια παρασκευάστηκαν 3 αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη διάρκεια της νύχτας.

Στη συνέχεια και αφού οι αντικειμενοφόρες πλάκες ήταν εντελώς στεγνές, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα Giemsa 15% για 20 λεπτά. Έπειτα, εμβαπτίστηκαν σε ddH<sub>2</sub>O για λίγα δευτερόλεπτα και τέλος αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Η χρώση Giemsa περιέχει μείγμα μπλε του μεθυλενίου, ηωσίνης και Azure B και είναι ειδική για τις φωσφορικές ομάδες του DNA, καθώς συνδέεται με αυτές. Επιπλέον, η Giemsa χρωματίζει διαφορετικά συστατικά του κυττάρου με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, οι πυρήνες χρωμαίζονται σε διάφορες αποχρώσεις του μωβ, ενώ το κυτταρόπλασμα σε διάφορες αποχρώσεις του μπλε έως ανοιχτού ροζ.

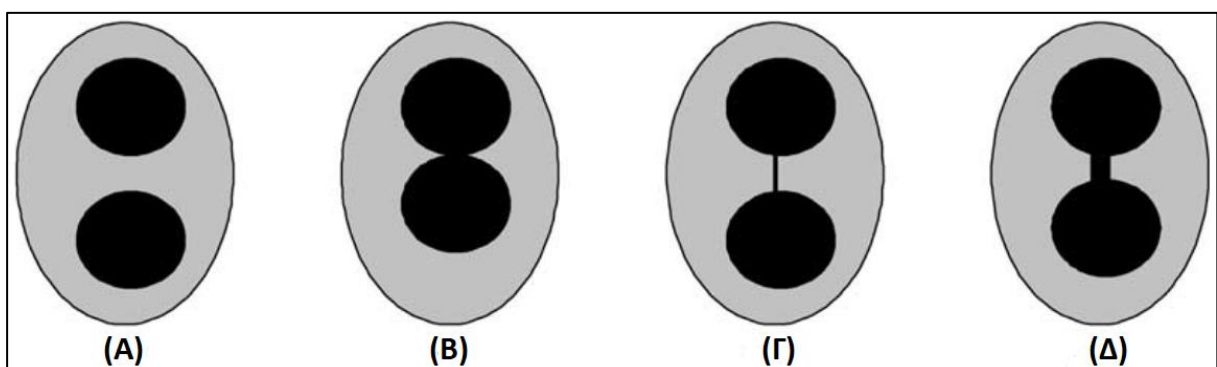
Όταν οι αντικειμενοφόρες πλάκες είχαν στεγνώσει εντελώς, χρησιμοποιήθηκε DPX (Dibutylphthalate Polystyrene Xylene) για να κολληθούν οι καλυπτρίδες σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα. Αφού αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη διάρκεια της νύχτας, ήταν έτοιμες για μετρήσεις στο μικροσκόπιο.

Για τον προσδιορισμό της γονιδιοτοξικότητας στα λεμφοκύτταρα των κουνελιών χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία CBMN (Cytokinesis – Block Micronucleus Assay). Οι

αντικειμενοφόρες πλάκες εξετάστηκαν με οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 100x χρησιμοποιώντας έλαιο κέδρου ως λάδι εμβάπτισης. Για κάθε ζώο, μετρήθηκαν μικροπυρήνες (micronuclei, MN) σε 1000 διπύρηνα κύτταρα. Καταμετρήθηκε επίσης ο αριθμός των διπύρηνων κυττάρων που περιείχαν μικροπυρήνες.

Τα κριτήρια καταμέτρησης για την επιλογή των διπύρηνων (binucleated, BN) κυττάρων που μπορούν να μετρηθούν για τη συχνότητα των MN περιγράφηκαν από τον Michael Fenech (41) και είναι τα εξής:

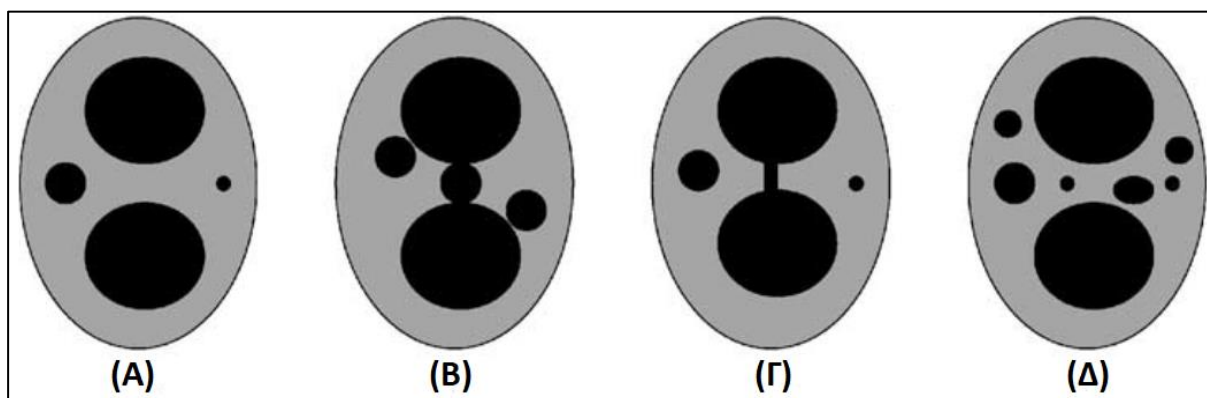
- ✓ Τα κύτταρα πρέπει να είναι διπύρηνα
- ✓ Οι δύο πυρήνες σε ένα BN κύτταρο πρέπει να έχουν άθικτες πυρηνικές μεμβράνες και να βρίσκονται στο ίδιο κυτταροπλασματικό όριο
- ✓ Οι δύο πυρήνες σε ένα BN κύτταρο πρέπει να είναι περίπου ίσοι σε μέγεθος, είδος χρώσης και ένταση χρώσης
- ✓ Οι δύο πυρήνες σε ένα BN κύτταρο μπορούν να συνδέονται με μια λεπτή πυρηνοπλασματική γέφυρα που δεν είναι μεγαλύτερη από το 1/4 της πυρηνικής διαμέτρου
- ✓ Οι δύο κύριοι πυρήνες σε ένα BN κύτταρο μπορούν να είναι σε επαφή αλλά ιδανικά δεν πρέπει να επικαλύπτονται μεταξύ τους. Ένα κύτταρο με δύο επικαλυπτόμενους πυρήνες μπορεί να καταμετρηθεί μόνο εάν τα πυρηνικά όρια κάθε πυρήνα είναι ευδιάκριτα
- ✓ Το κυτταροπλασματικό όριο ή η μεμβράνη ενός BN κυττάρου πρέπει να είναι άθικτο και να διακρίνεται σαφώς από το κυτταροπλασματικό όριο των γειτονικών κυττάρων.



**Εικόνα 2.1** Κριτήρια για την επιλογή διπύρηνων κυττάρων με τη δοκιμασία CBMN. (Α) Ιδανικό διπύρηνο κύτταρο. (Β) Διπύρηνο κύτταρο με πυρήνες που εφάπτονται. (Γ) Διπύρηνο κύτταρο με στενή πυρηνοπλασματική γέφυρα μεταξύ των πυρήνων. (Δ) Διπύρηνο κύτταρο με σχετικά ευρεία πυρηνοπλασματική γέφυρα (42).

Τα κριτήρια για την καταμέτρηση των μικροπυρήνων (micronuclei, MN) περιγράφηκαν επίσης από τον Michael Fenech (Fenech, 2000) και είναι τα εξής:

- ✓ Η διάμετρος των MN στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα κυμαίνεται συνήθως μεταξύ του 1/16 και του 1/3 της μέσης διαμέτρου των κύριων πυρήνων που αντιστοιχεί στο 1/256 και στο 1/9 της επιφάνειας ενός από τους κύριους πυρήνες σε ένα BN κύτταρο, αντίστοιχα
- ✓ Οι MN δεν είναι διαθλαστικοί και επομένως μπορούν εύκολα να διακριθούν από τεχνουργήματα όπως τα σωματίδια χρώσης
- ✓ Οι MN δεν συνδέονται με τους κύριους πυρήνες
- ✓ Οι MN μπορούν να είναι σε επαφή αλλά όχι να επικαλύπτουν τους κύριους πυρήνες και το μικροπυρηνικό όριο πρέπει να διακρίνεται από το πυρηνικό όριο
- ✓ Οι MN έχουν συνήθως την ίδια ένταση χρώσης με τους κύριους πυρήνες, αλλά περιστασιακά η χρώση μπορεί να είναι εντονότερη.

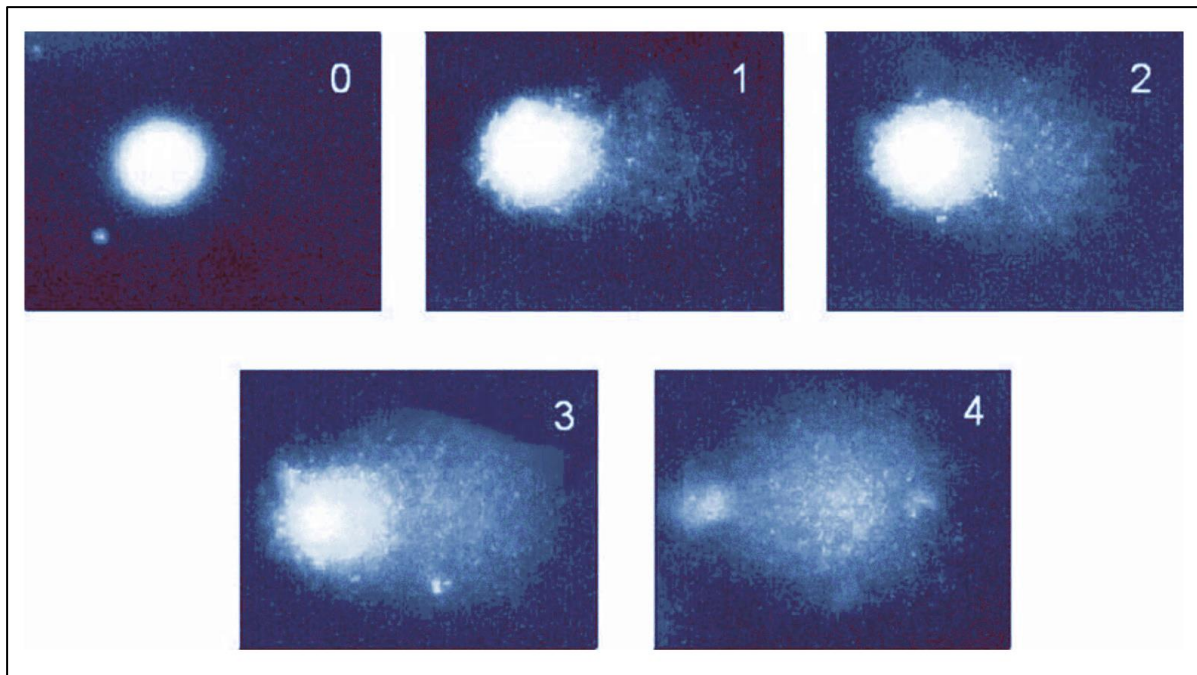


**Εικόνα 2.2** Τυπική εμφάνιση και σχετικό μέγεθος των μικροπυρήνων σε διπύρηνα κύτταρα. (Α) Κύτταρο με δύο μικροπυρήνες, ο ένας μεγέθους 1/3 και ο άλλος 1/9 της διαμέτρου ενός από τους κύριους πυρήνες εντός του κυττάρου. (Β) Μικροπυρήνες που αγγίζουν αλλά δεν επικαλύπτουν τους κύριους πυρήνες. (Γ) Διπύρηνο κύτταρο με πυρηνοπλασματική γέφυρα μεταξύ των κύριων πυρήνων και των δύο μικροπυρήνων. (Δ) Διπύρηνο κύτταρο με έξι μικροπυρήνες διαφόρων μεγεθών, τύπος κυττάρου που παρατηρείται σπάνια (42).

## 2.2.2 COMET ASSAY

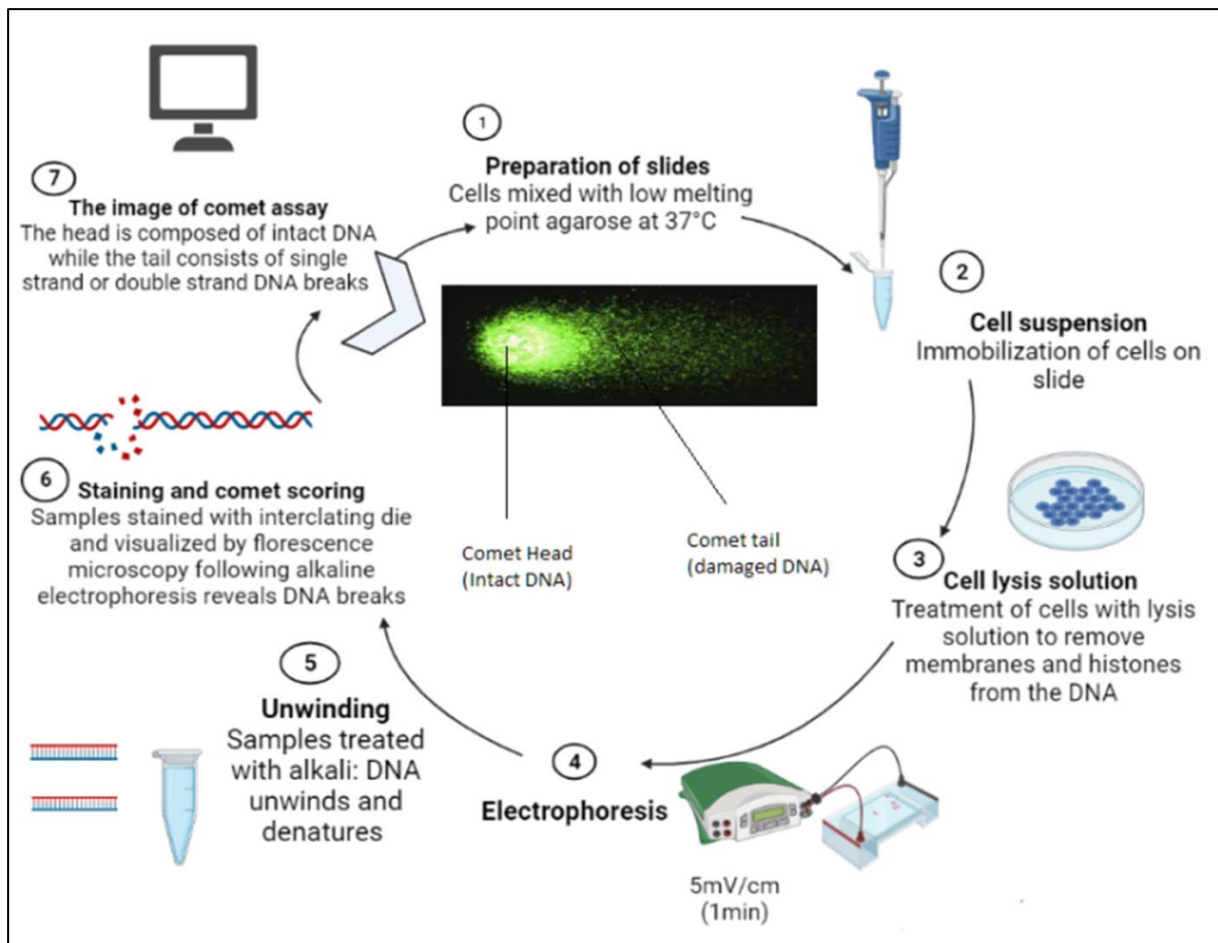
Η έννοια της ηλεκτροφόρησης με μικρογέλη παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1984 από τους Ostling και Johanson ως μέθοδος μέτρησης κερμάτωσης της μονής έλικας του DNA που προκαλεί χαλάρωση των υπερσπειρών του DNA (43). Μία τροποποιημένη έκδοση δημοσιεύθηκε από τον Singh και τους συνεργάτες του το 1988, η οποία χρησιμοποιούσε αλκαλικές συνθήκες (44).

Το comet assay είναι μια απλή μέθοδος για τη μέτρηση του DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Κύτταρα ενσωματωμένα σε αγαρόζη σε αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου λύνονται με απορρυπαντικό και υψηλή συγκέντρωση αλατιού για να σχηματιστούν νουκλεοειδή που περιέχουν υπερσπειρωμένους βρόχους DNA συνδεδεμένους με τον πυρήνα (45). Εάν το αρνητικά φορτισμένο DNA περιέχει θραύσματα, οι υπερσπείρες του DNA χαλαρώνουν και τα κερματισμένα άκρα μεταναστεύουν προς την άνοδο κατά τη διάρκεια μιας σύντομης ηλεκτροφόρησης. Εάν το DNA δεν είναι κατεστραμμένο, η έλλειψη ελεύθερων άκρων και το μεγάλο μέγεθος των θραυσμάτων εμποδίζουν τη μετανάστευση (43). Η ηλεκτροφόρηση σε υψηλό pH οδηγεί σε δομές που μοιάζουν με «κομήτες», οι οποίες παρατηρούνται με μικροσκοπία φθορισμού. Η έκταση της βλάβης εκφράζεται ανάλογα με το μέγεθος του κομήτη και σύμφωνα με τον Collins και τους συνεργάτες τους διακρίνονται πέντε τάξεις, από 0 (καθόλου ουρά) έως 4 (σχεδόν όλο το DNA στην ουρά) (Εικόνα 2.3) (45).



**Εικόνα 2.3** Εικόνες «κομητών» (από λεμφοκύτταρα), χρωματισμένων με DAPI. Αντιπροσωπεύουν τις κλάσεις 0 – 4, όπως χρησιμοποιούνται για την οπτική βαθμολόγηση (45).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μία τροποποιημένη μορφή της μεθόδου που πρότεινε ο Singh και οι συνεργάτες του σε αλκαλικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, Δείγματα φλεβικού αίματος συλλέχθηκαν κατά την τελευταία δειγματοληψία ( $t = 12$  μήνες) σε σωληνάρια που περιείχαν αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν κλάσματα των 200μl στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Μετά την προσθήκη 1 ml κρύου ρυθμιστικού αλατούχου διαλύματος φωσφορικών αλάτων (phosphate buffer saline, PBS) σε 100 μl ολικού αίματος, η απομόνωση των λεμφοκυττάρων επιτεύχθηκε με τη χρήση μέσου διαχωρισμού λεμφοκυττάρων στον πυθμένα του σωλήνα και φυγοκεντρήθηκε αμέσως στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 3 λεπτά στα 200g. Τα λεμφοκύτταρα ελήφθησαν από το στρώμα που εμφανίστηκε μεταξύ του πλάσματος του αίματος και του μέσου διαχωρισμού λεμφοκυττάρων μετά τη φυγοκέντρωση. Η βιωσιμότητα των κυττάρων, όπως εκτιμήθηκε με το Trypan blue test, ήταν πάνω από 97% για όλα τα δείγματα. Κάθε ανάλυση έγινε εις τριπλούν για την παρούσα μελέτη.



**Εικόνα 2.4** Τα στάδια της μεθόδου comet assay. (1) Προετοιμασία slides – ανάμειξη των κυττάρων με αгарόζη (2) Παρασκευή εναιωρημάτων μεμονωμένων κυττάρων – σταθεροποίηση των κυττάρων στο slide (3) Λύση των κυττάρων – επεξεργασία των κυττάρων με διάλυμα λύσης ώστε να αφαιρεθούν οι μεμβράνες και οι ιστόνες από το DNA (4) Ηλεκτροφόρηση (5) Ξετύλιγμα DNA – αλκαλική επεξεργασία (το DNA ξετυλίγεται και μετουσιώνεται) (6) Χρόση και βαθμολόγηση – τα δείγματα χρωματίζονται και οπτικοποιούνται με μικροσκοπία φθορισμού αφού η αλκαλική ηλεκτροφόρηση έχει προκαλέσει θραύση του DNA (7) Η εικόνα του comet assay – η «κεφαλή» αποτελείται από το ανέπαφο DNA ενώ η «ουρά» από μονόκλινα ή δίκλινα θραύσματα του DNA (46).

Αρχικά, προετοιμάστηκαν αντικειμενοφόρες πλάκες και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 0,65% κανονικής τήξης αγαρόζης (normal melting agarose, NMA) σε PBS (που δεν περιείχε  $\text{Ca}^{2+}$  ή  $\text{Mg}^{2+}$ ). Τα λεμφοκύτταρα αναμείχθηκαν με 100 μl LMA για να σχηματιστεί κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο στη συνέχεια εφαρμόστηκε στις αντικειμενοφόρους πλάκες. Μετά την αφαίρεση του coverlip, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίστηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας σε ψυχρό διάλυμα λύσης που περιείχε 2,5M NaCl, 100mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 10mM Tris, pH=10, 1% Triton X και 10% DMSO.

Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόροι πλάκες αφαιρέθηκαν από το διάλυμα λύσης, στραγγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε οριζόντια δεξαμενή ηλεκτροφόρησης κοντά στην άνοδο. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 1,6 V/cm για 20 λεπτά (300 mA) στους 4 °C υπό εξασθενημένο φως. Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι αντικειμενοφόροι πλάκες επεξεργάστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα Tris (0,4 M Tris, pH 7,5) και αφέθηκαν για 5 λεπτά, διαδικασία που επαναλήφθηκε τρεις φορές.

Κάθε αντικειμενοφόρος πλάκα χρωματίστηκε με 50μl βρωμιούχου αιθιδίου και αποθηκεύτηκε σε υγρανόμενο αεροστεγές δοχείο έως ότου αναλυθεί εντός 3-4 ωρών. Για κάθε δείγμα παρασκευάστηκαν τρεις αντικειμενοφόροι πλάκες και αναλύθηκαν συνολικά 100 κύτταρα ανά δείγμα σε μεγέθυνση x400, χρησιμοποιώντας ένα φθορίζον μικροσκόπιο Olympus εξοπλισμένο με φίλτρο διέγερσης 546 nm και φίλτρο φραγμού 590 nm. Η βλάβη του DNA αξιολογήθηκε με τη μέτρηση της περιεκτικότητας του DNA στην ουρά (% ένταση ουράς, % tail intensity) με τη χρήση του συστήματος ανάλυσης εικόνας Comet Assay IV (Perceptive Instruments).

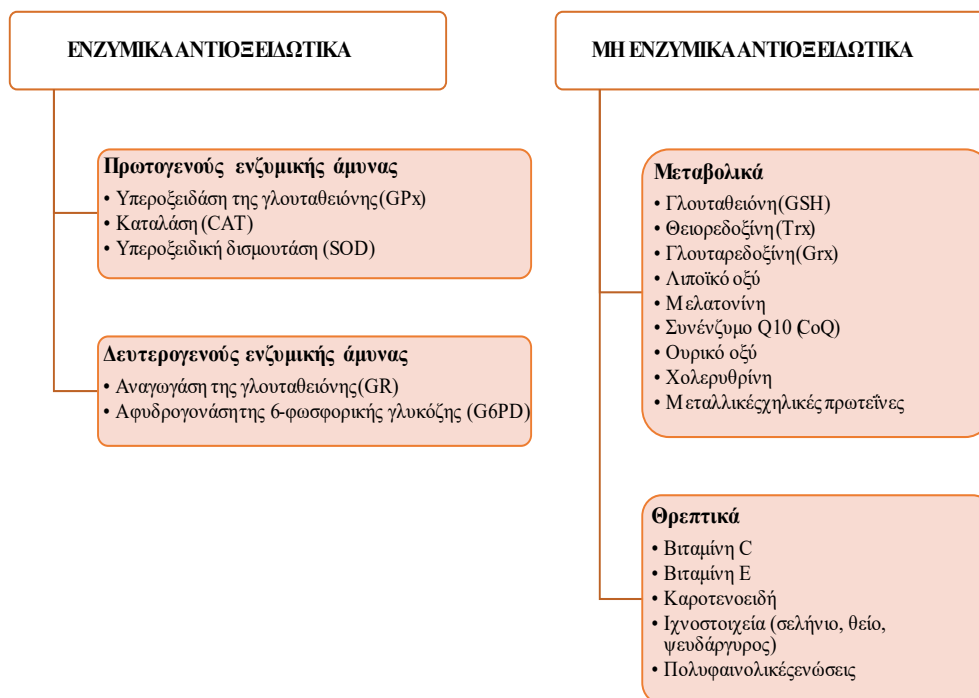
### 2.2.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Ελεύθερες ρίζες ορίζονται τα μόρια ή άτομα τα οποία διαθέτουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους, με την απλούστερη μορφή αυτών να αποτελεί το άτομο του υδρογόνου (ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο) (47). Σχηματίζονται είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς παράγοντες με τρεις δυνατούς τρόπους: 1) μέσω διάσπασης ενός χημικού δεσμού μεταξύ δύο μορίων (κάθε θραύσμα διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο), 2) μέσω διάσπασης μίας ρίζας προς σχηματισμό μίας άλλης ρίζας και 3) μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων (48). Κάποιες από τις αιτίες παραγωγής ενδογενών ελευθέρων ριζών είναι η φλεγμονή, το ψυχικό στρες, η έντονη άσκηση, η γήρανση και ο καρκίνος (48) ενώ ο ανθυγιεινός τρόπος ζωής (π.χ. κάπνισμα, αλκοόλ), οι ακτινοβολίες, οι χημικοί διαλύτες, περιβαλλοντικοί ρύποι και βαρέα μέταλλα καθώς και ορισμένα φάρμακα όπως η γενταμικίνη οδηγούν στην παραγωγή εξωγενών ελευθέρων ριζών (49). Αν και οι ελεύθερες ρίζες έχουν συνδεθεί κυρίως με αρνητικές επιδράσεις, σε μικρές ή μέτριες συγκεντρώσεις είναι απαραίτητες για κάποιες φυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού. Η διαδικασία ωρίμανσης των κυττάρων και η σωστή



βιολογική δράση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων απαιτούν την παρουσία ελευθέρων ριζών ενώ δρουν και ως όπλα για το αμυντικό σύστημα του ξενιστή (50).

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται οποιαδήποτε ουσία καθυστερεί, προλαμβάνει ή απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη από ένα μόριο (51). Τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα ενζυμικά και μη ενζυμικά. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά διακρίνονται περαιτέρω σε πρωτογενούς και δευτερογενούς ενζυμικής άμυνας ενώ τα μη ενζυμικά σε μεταβολικά και θρεπτικά. Στην Εικόνα 2.5 φαίνεται η κατανομή των αντιοξειδωτικών ανά κατηγορία.



Εικόνα 2.5 Κατανομή αντιοξειδωτικών ανά κατηγορία (51).

Οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας οξειδωτικών – αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων η οποία οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης προκαλώντας βλάβες σε όλα τα βιολογικά μακρομόρια όπως DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια (52).



Το παράδοξο είναι ότι το οξειδωτικό στρες αποτελεί φυσικό επακόλουθο για τους αερόβιους οργανισμούς, οι οποίοι δεν μπορούν να επιβιώσουν χωρίς οξυγόνο αλλά ταυτόχρονα αυτό είναι και επικίνδυνο για την διαβίωσή τους (53).

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν δείγματα αίματος και ιστών με σκοπό τον προσδιορισμό οξειδοαναγωγικών βιοδεικτών.

Η διαδικασία περιελάμβανε τη συλλογή αίματος από καρδιακή παρακέντηση, ακολουθούμενη από άμεση φυγοκέντρηση για το διαχωρισμό του πλάσματος από τα ερυθροκύτταρα. Το πλάσμα αποθηκεύτηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για περαιτέρω ανάλυση, ενώ τα ερυθρά αιμοσφαίρια αιμολύθηκαν με τη χρήση αποσταγμένου νερού, και τα δείγματα που προέκυψαν φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου, ενώ το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Το ήπαρ, η καρδιά, ο αριστερός νεφρός, ο δεξιός νεφρός και ο θυρεοειδής αδένας αφαιρέθηκαν, καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Για την ομογενοποίηση των ιστών, αναμείχθηκαν με φυσιολογικό ορό ρυθμισμένο με φωσφορικά άλατα που περιείχε ένα δισκίο μείγματος αναστολέων πρωτεασών Roche cOmplete™, μεταφέρθηκαν σε ομογενοποιητή MiniLys, ομογενοποιήθηκαν, τοποθετήθηκαν στον πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν. Το υπερκείμενο που προέκυψε, δηλαδή ο ομογενοποιημένος ιστός, συλλέχθηκε, χωρίστηκε σε κλάσματα και αποθηκεύτηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### ***2.2.3.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ GSH ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΙΣΤΩΝ***

Η συγκέντρωση της GSH μετρήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Reddy et al. (54), με ορισμένες τροποποιήσεις (55). Για τα δείγματα αίματος, 400  $\mu\text{L}$  του δείγματος αναμείχθηκαν με 400  $\mu\text{L}$  5% τριχλωροοξικού οξέος (trichloroacetic acid, TCA) και φυγοκεντρήθηκαν, και 300  $\mu\text{L}$  του υπερκείμενου αναμείχθηκαν περαιτέρω με 90  $\mu\text{L}$  5% TCA και φυγοκεντρήθηκαν. Για δείγματα ιστών, 50  $\mu\text{L}$  του ομογενοποιημένου ιστού αναμείχθηκαν με 50  $\mu\text{L}$  5% TCA, φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο που προέκυψε συλλέχθηκε. Για την ανάλυση, 20  $\mu\text{L}$  του δείγματος, αραιωμένα 1:2 σε PBS για τους ομογενοποιημένους ιστούς, αναμείχθηκαν με 660  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων και 330  $\mu\text{L}$  DTNB (5,5-

dithiobis(2-nitrobenzoic acid). Το μείγμα αναδεύτηκε με vortex και επώαστηκε για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 412 nm. Η συγκέντρωση της GSH υπολογίστηκε με βάση τον συντελεστή χιλιοστομοριακής απόσβεσης του TNB (2-nitro-5-thiobenzoate) (13.6 L/mmol/cm).

### *2.2.3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ CAT ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΙΣΤΩΝ*

Για τη μέτρηση της δραστηριότητας της CAT χρησιμοποιήθηκε μια τροποποιημένη έκδοση της μεθόδου του Aebi (56). Συγκεκριμένα, 4  $\mu\text{L}$  αίματος, αραιωμένα 1:10 σε PBS, ή 40  $\mu\text{L}$  αραιωμένου ομογενοποιημένου ιστού σε PBS (αραιωμένα 1:5 για την καρδιά και τον θυρεοειδή αδέν, 1:20 για το ήπαρ και 1:40 για τους νεφρούς) αναμείχθηκαν με 2991  $\mu\text{L}$  και 2955  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (67 mM, pH = 7,4), αντίστοιχα. Το μείγμα επώαστηκε για 10 λεπτά στους 37°C και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε κυψελίδα UV χαλαζία, όπου προστέθηκαν 5  $\mu\text{L}$  υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Η μείωση της οπτικής πυκνότητας παρακολούθηθηκε στα 240 nm για 2 λεπτά. Η δραστηριότητα της CAT προσδιορίστηκε με βάση τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  (40 L/mol/cm).

### *2.2.3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ SOD ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ*

Η δραστηριότητα της SOD μετρήθηκε με τη μέθοδο που ανέπτυξαν οι Oberley και Spitz (57). Συγκεκριμένα, 100  $\mu\text{L}$  αίματος αναμείχθηκαν με 800  $\mu\text{L}$  ενός κύριου μείγματος που αποτελείται από διαιθυλενοτριαμινοπενταοξικό οξύ (diethylenetriaminopentaacetic acid, DETAPAC) (1,34 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0,05 M, pH=7,8), NBT (nitro blue tetrazolium) (2,24 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου και ξανθίνη (1,18 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου. Το μείγμα που προέκυψε αναμείχθηκε και προστέθηκαν 100  $\mu\text{L}$  οξειδάσης της ξανθίνης (60 mU) σε DETAPAC. Στη συνέχεια παρακολούθηθηκε η μεταβολή της οπτικής πυκνότητας στα 560 nm για 1,5 λεπτό. Η δραστηριότητα της SOD υπολογίστηκε με βάση το ποσοστό αναστολής της NBT.

#### *2.2.3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ GPx ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ*

Η δραστικότητα της GPx μετρήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Flohé και Günzler (58). Αρχικά, 100  $\mu$ L αίματος, αραιωμένα 1:100 σε PBS, αναμείχθηκαν με 500  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (100 mM, pH = 7), 100  $\mu$ L GR (0,24 U) και 100  $\mu$ L GSH (10 mM) και επωάστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε κυψελίδα και προστέθηκαν 100  $\mu$ L NADPH (1,5 mM) σε 0,1% NaHCO<sub>3</sub> και μετρήθηκε η κατανάλωση NADPH στα 340 nm για 3 λεπτά. Τέλος, προστέθηκαν 100  $\mu$ L tert-βουτυλ υδροϋπεροξειδίου (12 mM) και η μεταβολή της οπτικής πυκνότητας παρακολούθηθηκε στα 340 nm για 3 λεπτά. Η δραστικότητα GPx υπολογίστηκε με βάση το μοριακό συντελεστή απόσβεσης του NADPH (6,22 L/mmol/cm).

#### *2.2.3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ GR ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ*

Η δραστικότητα του GR μετρήθηκε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο του Smith και των συνεργατών του (59). Σε αυτή τη μέθοδο, 700  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών που περιείχε EDTA και DTNB (3 mM), μαζί με 50  $\mu$ L  $\beta$ -NADPH (2 mM), αναμείχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε κυψελίδα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν διαδοχικά 50  $\mu$ L GSSG (20 mM) σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα και 25  $\mu$ L αίματος (αραιωμένο 1:100 σε PBS) και η μεταβολή της οπτικής πυκνότητας παρακολούθηθηκε στα 412 nm για ένα λεπτό.

#### *2.2.3.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΑC ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ*

Τα επίπεδα TAC αξιολογήθηκαν με το πρωτόκολλο Janaszewska και Bartosz (60). Συγκεκριμένα, 20  $\mu$ L πλάσματος ή 40  $\mu$ L ομογενοποιημένου ιστού σε PBS (αραιωμένο σε 1:5 για τον θυρεοειδή αδένα και 1:10 για το ήπαρ, την καρδιά και τους νεφρούς) αναμείχθηκαν με

480  $\mu\text{L}$  ή 460  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (10 mM, pH = 7,4), αντίστοιχα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 500  $\mu\text{L}$  διαλύματος (0,1 mM) DPPH $\bullet$  (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) σε κάθε δείγμα. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναμείχθηκαν, επώαστηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000 g για 3 λεπτά στους 25°C. Τέλος, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα κάθε δείγματος στα 520 nm. Τα επίπεδα TAC εκφράστηκαν ως mmol DPPH $\bullet$  που ανάγονται στην αντίστοιχη υδραζίνη από τις αντιοξειδωτικές ενώσεις που υπάρχουν στο πλάσμα ή στους ομογενοποιημένους ιστούς.

#### ***2.2.3.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ TBARS ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ***

Τα επίπεδα TBARS μετρήθηκαν με τροποποιημένη τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Keles et al. (61) Αρχικά, 100  $\mu\text{L}$  πλάσματος ή 50  $\mu\text{L}$  αραιωμένου ομογενοποιημένου ιστού σε PBS αναμείχθηκαν με 500  $\mu\text{L}$  Tris-HCl και 500  $\mu\text{L}$  35% TCA και αφέθηκαν να επωαστούν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η αναλογία αραιώσης του ομογενοποιημένου ιστού σε PBS ήταν 1:2 για την καρδιά και τον θυρεοειδή αδένα και 1:5 για το ήπαρ και τους νεφρούς. Στη συνέχεια, προστέθηκε διάλυμα Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και θειοβαρβιτουρικού οξέος (thiobarbituric acid, TBA) και τα δείγματα θερμάνθηκαν σε υδατόλουτρο για 45 λεπτά στους 95°C. Μετά την ψύξη σε πάγο, προστέθηκε 70% TCA και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 11.200 g για 3 λεπτά στους 25°C. Η οπτική πυκνότητα του υπερκείμενου υγρού μετρήθηκε στα 530 nm και τα επίπεδα TBARS προσδιορίστηκαν με τη χρήση του μοριακού συντελεστή απόσβεσης της MDA (malonyl dialdehyde) (156,000 L/mol/cm).

#### ***2.2.3.8 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ***

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του Patsoukis και της ομάδας του (62). 50  $\mu\text{L}$  είτε πλάσματος είτε αραιωμένου ομογενοποιημένου ιστού σε PBS (1:2 για όλους τους ιστούς) αναμείχθηκαν με 50  $\mu\text{L}$  20% TCA και αναδεύτηκαν με vortex. Αφού τοποθετήθηκαν τα δείγματα στον πάγο για 15 λεπτά, φυγοκεντρήθηκαν (15.000 g, 5

λεπτά, 4°C) και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 500 µL 2,4-δινιτροφαινυλοϋδραζίνης (2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH) (10 mM) σε υδροχλωρικό οξύ (HCl) (2,5 N) και 500 µL HCl (2,5 N) στα δείγματα και στα τυφλά δείγματα, αντίστοιχα. Τα δείγματα επώαστηκαν για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύονταν με vortex ανά 15 λεπτά. Μετά την επώαση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (15.000 g, 5 λεπτά, 4°C) και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1 mL 10% TCA και τα δείγματα αναδεύτηκαν με vortex και φυγοκεντρήθηκαν (15.000 g, 5 λεπτά, 4°C). Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκε 1 mL διαλύματος αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v). Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε δύο φορές. Στη συνέχεια, προστέθηκε στα δείγματα 1 mL ουρίας (5 M, pH = 2,3), αναδεύτηκαν με vortex και επώαστηκαν στους 37 C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (15.000 g, 3 λεπτά, 4°C) και πάλι και η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 375 nm. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων προσδιορίστηκε με τη χρήση του χλιοστομοριακού συντελεστή απόσβεσης του DNPH (22 L/mmol/cm).

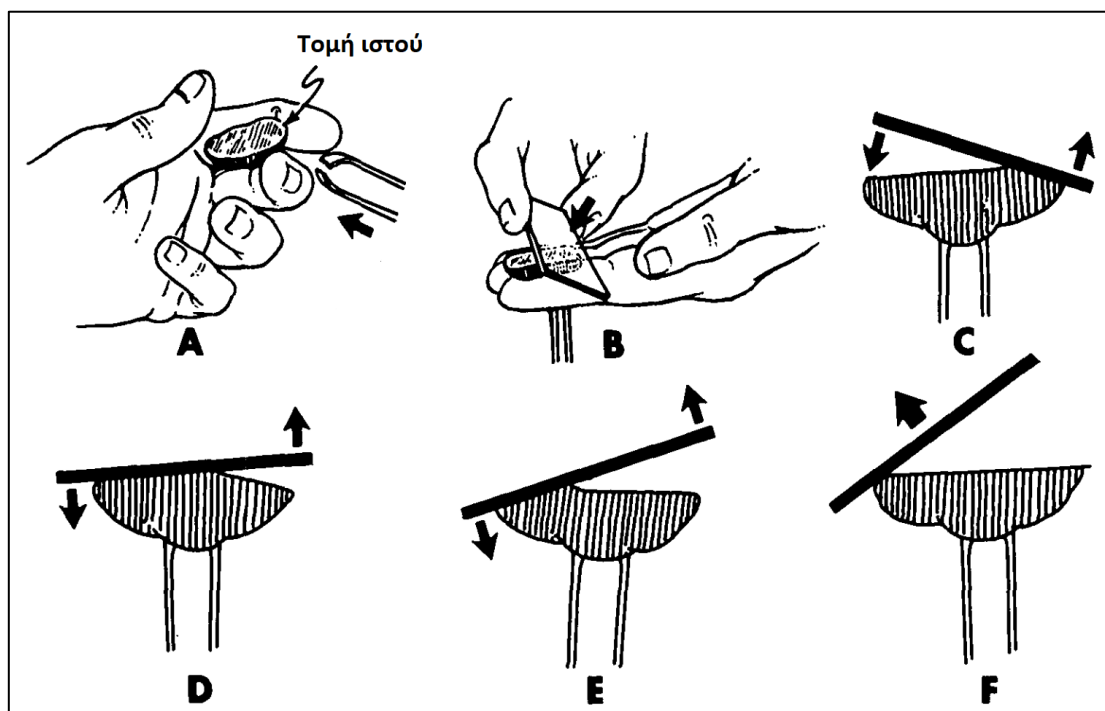
#### ***2.2.3.9 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΑΙΜΟΓΛΟΒΙΝΗΣ***

Οι συγκεντρώσεις των οξειδοαναγωγικών βιοδεικτών τόσο στο πλάσμα όσο και στους ομογενοποιημένους ιστούς προσαρμόστηκαν για τις διακυμάνσεις της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης, η οποία προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (63). Η δοκιμασία περιελάμβανε τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιώντας διαλύματα με γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης ορού βοοειδών ως πρωτεΐνη αναφοράς. Αντίθετα, οι τιμές των βιοδεικτών οξειδοαναγωγής στα δείγματα αίματος προσαρμόστηκαν για τις διακυμάνσεις της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης, η οποία υπολογίστηκε με τη χρήση ενός εμπορικά διαθέσιμου κιτ (Dutch Diagnostics, Zutphen, Ολλανδία) που βασίζεται στη μέθοδο αιμογλοβινοκυανιδίου. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις επαναλήψεις.

## 2.2.4 ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ

Η επιστήμη της κυτταρολογίας και της κυτταροπαθολογίας εφαρμόστηκε και αναγνωρίστηκε από τον 18<sup>ο</sup> και 19<sup>ο</sup> αιώνα. Κυτταρολογία είναι η εξέταση ενός κυτταρικού τύπου σε δείγματα ιστών, επιχρίσματα, βιολογικά υγρά (67). Ο ιατρός Γεώργιος Παπανικολάου ήταν από τους πρώτους που εισήγαγαν την έννοια της κυτταρολογίας στη γυναικολογία, το γνωστό «Τεστ Παπανικολάου» ή «Τεστ Παπ» (68).

Για την κυτταρολογική εξέταση των δειγμάτων ιστού χρησιμοποιήθηκε η τεχνική touch preparation. Συγκεκριμένα, μετά την αφαίρεση του οργάνου, ο ιστός διατομήθηκε και αποτυπώθηκε σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα (Εικόνα 2.7). Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόροι πλάκες σταθεροποιήθηκαν με αλκοόλη 60%, χρωματίστηκαν με τη μέθοδο Παπ και μετρήθηκαν σε μικροσκόπιο φωτός (Nikon ECLIPSE E 400) (20x) (69).



Εικόνα 2.6 Τεχνική για την προετοιμασία του αποτυπώματος (70).

## 2.2.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΡΜΟΝΩΝ

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των ορμονών πραγματοποιήθηκε με αυτόματο αναλυτή ανοσοδιάγνωσης και συγκεκριμένα το μοντέλο ARCHITECT i1000SR της εταιρίας Abbott (Illinois, U.S.A.) (Εικόνα 2.8).



Εικόνα 2.7 Αυτόματος αναλυτής ανοσοδιάγνωσης ARCHITECT i1000SR (Abbott).

Πρόκειται για μία *in vitro* αυτοματοποιημένη τεχνική ανάλυσης που βασίζεται στη αλληλεπίδραση αντιγόνου – αντισώματος με δυνατότητα ανάλυσης ολικού αίματος, ορού, πλάσματος και ούρων. Με τη χρήση ειδικών αντιδραστηρίων για κάθε περίπτωση μετρήθηκαν οι εξής ορμόνες:

- β-οιστραδιόλη
- Προγεστερόνη
- Τεστοστερόνη
- Τριωδοθυρονίνη (T3)
- Θυροξίνη (T4)

## 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΕΣ

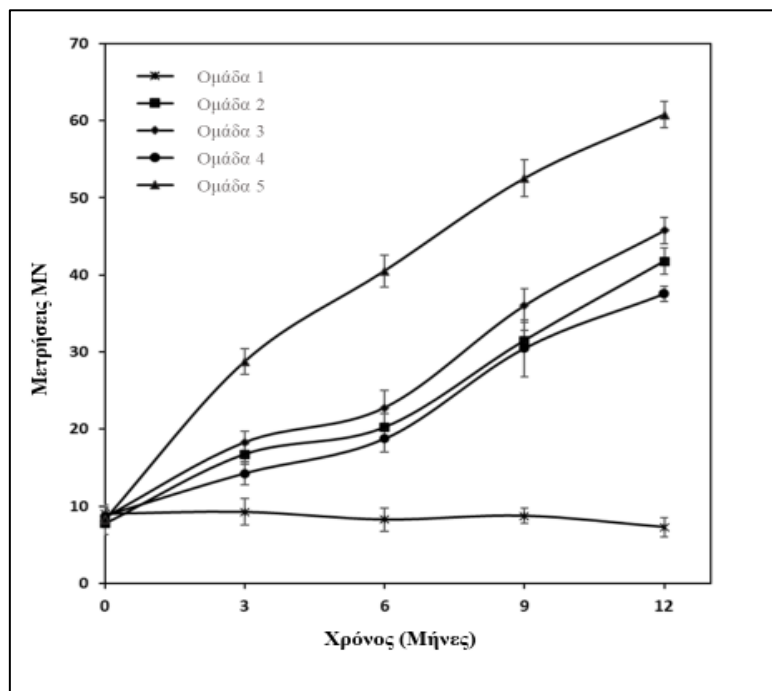
Επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ANOVA, χρησιμοποιώντας τις ομάδες έκθεσης ως παράγοντες, εφαρμόστηκαν στις μετρήσεις MN στους 0, 3, 6, 9 και 12 μήνες έκθεσης, για να εκτιμηθούν οι επιδράσεις τόσο του χρόνου έκθεσης όσο και της βαρύτητας της έκθεσης. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην αλληλεπίδραση χρόνου και έκθεσης (ANOVA  $F(1, 4) = 479,23$ ,  $p < 0,001$ ). Οι τιμές της ομάδας control ήταν σταθερές στα διάφορα χρονικά σημεία του πειράματος, κυμαινόμενες από  $7,25 \pm 1,26$  (12 μήνες) έως  $9,25 \pm 1,71$  (3 μήνες). Όλες οι άλλες ομάδες παρουσίασαν αυξητική τάση στο χρόνο, υποδεικνύοντας τη χρονική εξάρτηση του σχηματισμού μικροπυρήνων. Για την ομάδα LD, η μέση τιμή των MN σε  $t = 0$  μήνες ήταν  $7,75 \pm 0,50$ , η οποία αυξήθηκε σε  $41,75 \pm 1,71$  στον 12<sup>ο</sup> μήνα. Η ομάδα HD φάνηκε να αυξάνεται με σταθερό μοτίβο από  $8,50 \pm 1,00$  ( $t = 0$  μήνες) σε  $45,75 \pm 1,71$  ( $t = 12$  μήνες). Ομοίως, η ομάδα Glyphosate και η ομάδα Roundup<sup>®</sup>, ξεκινώντας από  $8,75 \pm 0,96$  και  $8,25 \pm 1,89$ , έφτασαν σε τιμές  $37,50 \pm 1,00$  και  $60,75 \pm 1,71$ , αντίστοιχα (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1 Μέση τιμή και τυπική απόκλιση (SD) των μετρήσεων MN στα διάφορα χρονικά σημεία δειγματοληψίας στις ομάδες έκθεσης.

Μήνες	Ομάδα control		Ομάδα LD		Ομάδα HD		Ομάδα Glyphosate		Ομάδα Roundup <sup>®</sup>	
	Μέση τιμή	±SD	Μέση τιμή	±SD	Μέση τιμή	±SD	Μέση τιμή	±SD	Μέση τιμή	±SD
0	9,00	0,82	7,75	0,50	8,50	1,00	8,75	0,96	8,25	1,89
3	9,25	1,71	16,75	1,26	18,25	1,50	14,25	1,50	28,75	1,71
6	8,25	1,50	20,25	1,71	22,75	2,22	18,75	1,71	40,50	2,08
9	8,75	0,96	31,50	1,29	36,00	2,16	30,50	3,70	52,50	2,38
12	7,25	1,26	41,75	1,71	45,75	1,71	37,50	1,00	60,75	1,71
Σύνολο	8,50	1,25	23,60	1,29	26,25	1,72	21,95	1,77	38,15	1,95



Στην ομάδα HD χορηγήθηκε 10 φορές υψηλότερη δόση από την ομάδα LD. Ωστόσο, οι μετρήσεις των MN δεν παρουσίασαν ανάλογες διακυμάνσεις. Κατά τους χρόνους δειγματοληψίας t = 3-12 μήνες, οι αριθμοί MN της ομάδας LD κυμάνθηκαν από  $16,75 \pm 1,26$  έως  $41,75 \pm 1,71$ , ενώ οι αριθμοί της ομάδας HD διέφεραν ελαφρώς, με μέσους αριθμούς MN  $18,25 \pm 1,50 - 45,75 \pm 1,71$ . Στην ομάδα Glyphosate χορηγήθηκε η ίδια δόση GLY με την ομάδα HD, αλλά η ομάδα HD περιείχε επίσης μείγμα ενδοκρινικών διαταρακτών. Η ομάδα HD φάνηκε να είναι πιο επιβαρυνμένη από την ομάδα Glyphosate ( $18,25 \pm 1,50 - 45,75 \pm 1,71$  και  $14,25 \pm 1,50 - 37,50 \pm 1,00$ , αντίστοιχα), γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στους πρόσθετους ενδοκρινικούς διαταράκτες που χορηγήθηκαν στην ομάδα HD. Παρόλο που οι ομάδες Glyphosate και Roundup® δεν διέφεραν ως προς τη δόση, τα πρόσθετα που περιέχει το Roundup® (εκτός από τη δραστική ουσία glyphosate) φάνηκε να επηρεάζουν τον περαιτέρω σχηματισμό MN, ενώ η ομάδα Roundup® είχε υψηλότερες μέσες τιμές MN ( $28,75 \pm 1,71 - 60,75 \pm 1,71$  έναντι  $14,25 \pm 1,50 - 37,50 \pm 1,00$  της ομάδας Glyphosate), στις ίδιες περιόδους έκθεσης. Επιπλέον, η ομάδα Roundup® είχε τις υψηλότερες μέσες τιμές MN από όλες τις ομάδες (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Μετρήσεις MN των ομάδων στα διαφορετικά χρονικά σημεία. Ομάδα 1: control, Ομάδα 2: LD, Ομάδα 3: HD, Ομάδα 4: Glyphosate, Ομάδα 5: Roundup®

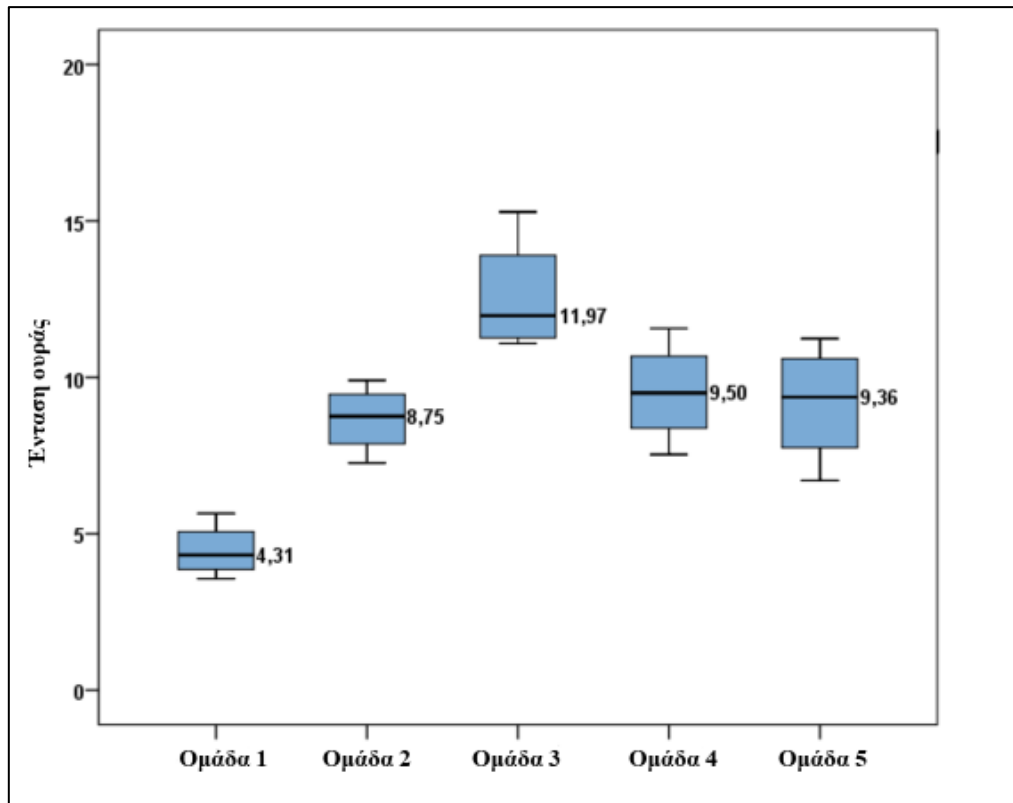
## 3.2 COMET ASSAY

Η ένταση της ουράς (tail intensity) μετρήθηκε με αίμα από την τελευταία δειγματοληψία (t = 12 μήνες). Όλες οι ομάδες έκθεσης φάνηκε να επηρεάζονται σε σχέση με την ομάδα control. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2, η ένταση της ουράς κάθε ομάδας διέφερε σημαντικά (ANOVA:  $F(4, 15) = 13,974$ ,  $p < 0,001$ , Kruskal-Wallis  $\chi^2(4) = 13,786$ ,  $p = 0,008$ ). Η υψηλότερη διάμεση ένταση ουράς, 11,97 (11,26-13,90), παρατηρήθηκε στην ομάδα HD, ενώ η ένταση στην ομάδα control ήταν 4,31 (3,86-5,06) (Πίνακας 3.2), γεγονός που δείχνει ότι η συνδυασμένη έκθεση σε ενδοκρινικούς διαταράκτες είχε μεγαλύτερη επίδραση στη βλάβη του DNA και, κατ' επέκταση, στην ένταση της ουράς.

**Πίνακας 3.2** Περιγραφικά στατιστικά στοιχεία (μέσος όρος, τυπική απόκλιση (SD), τεταρτημόρια) και σύγκριση της έντασης της ουράς μεταξύ των ομάδων (LSD test).

Ομάδα	Μέση τιμή	±SD	Τεταρτημόριο			LSD test				
			1 <sup>ο</sup>	Διάμεσος	3 <sup>ο</sup>	Ομάδα control	Ομάδα LD	Ομάδα HD	Ομάδα Glyphosate	Ομάδα Roundup <sup>®</sup>
control	4,46	0,88	3,86	4,31	5,06		0,002	<0,001	<0,001	0,001
LD	8,67	1,10	7,88	8,75	9,46	0,002		0,003	0,449	0,655
HD	12,58	1,90	11,26	11,97	13,90	<0,001	0,003		0,014	0,007
Glyphosate	9,52	1,66	8,37	9,50	10,67	<0,001	0,449	0,014		0,752
Roundup <sup>®</sup>	9,17	1,92	7,74	9,36	10,59	0,001	0,655	0,007	0,752	

Η διαφορά στις μέσες τιμές της έντασης της ουράς μεταξύ της ομάδας LD (8,75/ 7,88 – 9,46) και της ομάδας HD (11,97/ 11,26 – 13,90) αποδεικνύει την ύπαρξη δόσο – εξαρτώμενης απόκρισης. Ενδιαφέρον προκαλεί το ότι οι μέσες τιμές έντασης της ουράς των ομάδων Glyphosate και Roundup<sup>®</sup> ήταν παρόμοιες (9,50/ 8,37 – 1,67 και 9,36/ 7,74 – 10,59, αντίστοιχα), γεγονός που αποδεικνύει ότι τα πρόσθετα που περιέχει το Roundup<sup>®</sup> δεν ενισχύουν το σχηματισμό βλαβών στο DNA (Εικόνα 3.2).

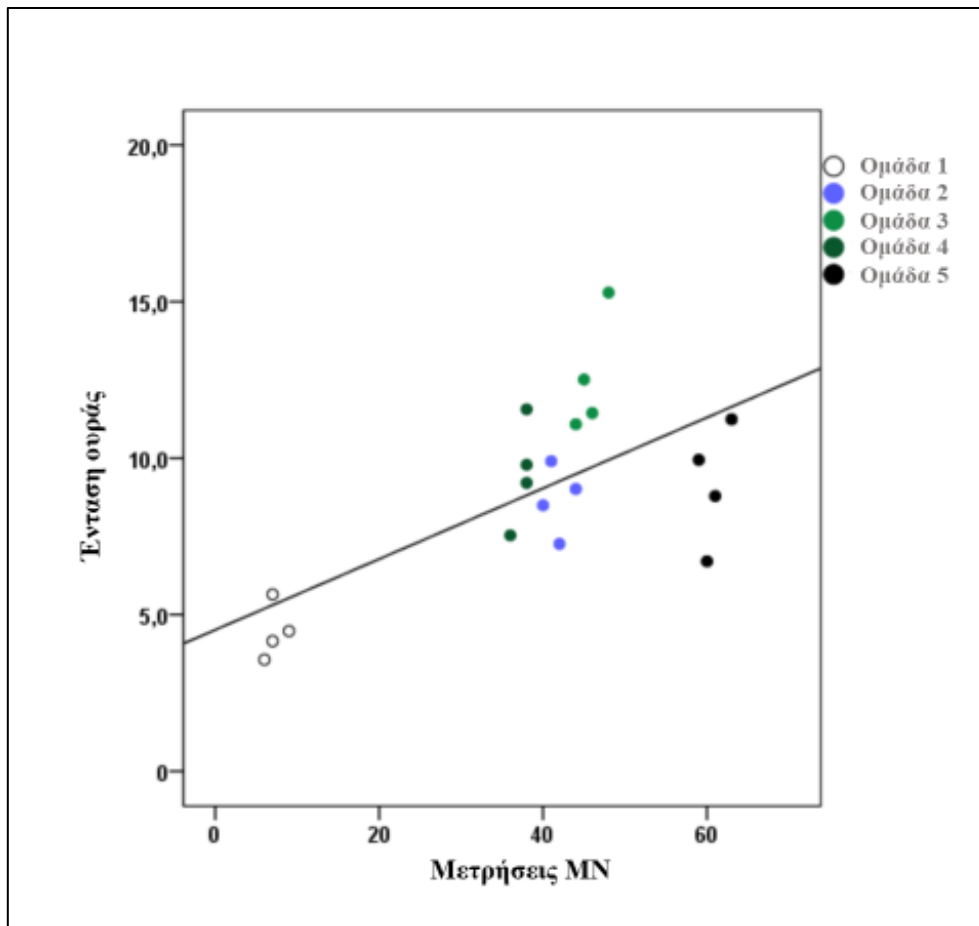


Εικόνα 3.2 Μέση τιμή έντασης ουράς μεταξύ των ομάδων στους 12 μήνες έκθεσης. Ομάδα 1: control, Ομάδα 2: LD, Ομάδα 3: HD, Ομάδα 4: Glyphosate, Ομάδα 5: Roundup®

Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές προέκυψαν από το προσαρμοσμένο t-test με LSD. Μεταξύ των ομάδων LD και HD, οι οποίες είχαν διαφορετικά επίπεδα έκθεσης, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ( $p = 0,003$ ), ενώ η ομάδα HD διέφερε σημαντικά από την ομάδα Glyphosate ( $p = 0,014$ ) και την ομάδα Roundup® ( $p = 0,007$ ) σε  $t = 12$  μήνες (Πίνακας 3.2).

### 3.2.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΑΙ COMET ASSAY

Ο αριθμός των MN σε  $t = 12$  μήνες συσχετίστηκε με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της έντασης της ουράς. Οι αριθμοί MN όλων των ομάδων έκθεσης φάνηκε να σχετίζονται στατιστικά σημαντικά με την ένταση της ουράς, αποδεικνύοντας τη γενotoξικότητα των χορηγούμενων ουσιών. Στην Εικόνα 3.3, παρουσιάζονται διαγράμματα διασποράς της έντασης της ουράς σε σχέση με τον αριθμό των MN στους 12 μήνες. Οι αρχικές μετρήσεις MN συσχετίστηκαν με την ένταση της ουράς ( $r_s = 0,581$ ,  $p = 0,007$ ).



Εικόνα 3.3 Συσχέτιση της έντασης της ουράς με τον αριθμό των MN για κάθε μία από τις πέντε διαφορετικές ομάδες σε  $t = 12$  μήνες. Ομάδα 1: control, Ομάδα 2: LD, Ομάδα 3: HD, Ομάδα 4: Glyphosate, Ομάδα 5: Roundup®

Στον Πίνακα 3.3, παρουσιάζονται συσχετίσεις του αριθμού MN σε διάφορες χρονικές στιγμές έκθεσης. Οι μετρήσεις σε  $t = 0$  μήνες δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των χρονικών σημείων ( $p > 0,05$ ). Όλες οι άλλες διμεταβλητές συσχετίσεις των μετρήσεων των MN στα διάφορα χρονικά διαστήματα φάνηκε να σχετίζονται έντονα, με τη χαμηλότερη τιμή  $r_s$  να παρατηρείται μεταξύ των μετρήσεων έκθεσης 3 και 9 μηνών ( $r_s = 0,826$ ,  $p < 0,001$ ).

**Πίνακας 3.3** Συσχέτιση (Spearman's) των μετρήσεων των MN μεταξύ των χρονικών διαστημάτων έκθεσης.

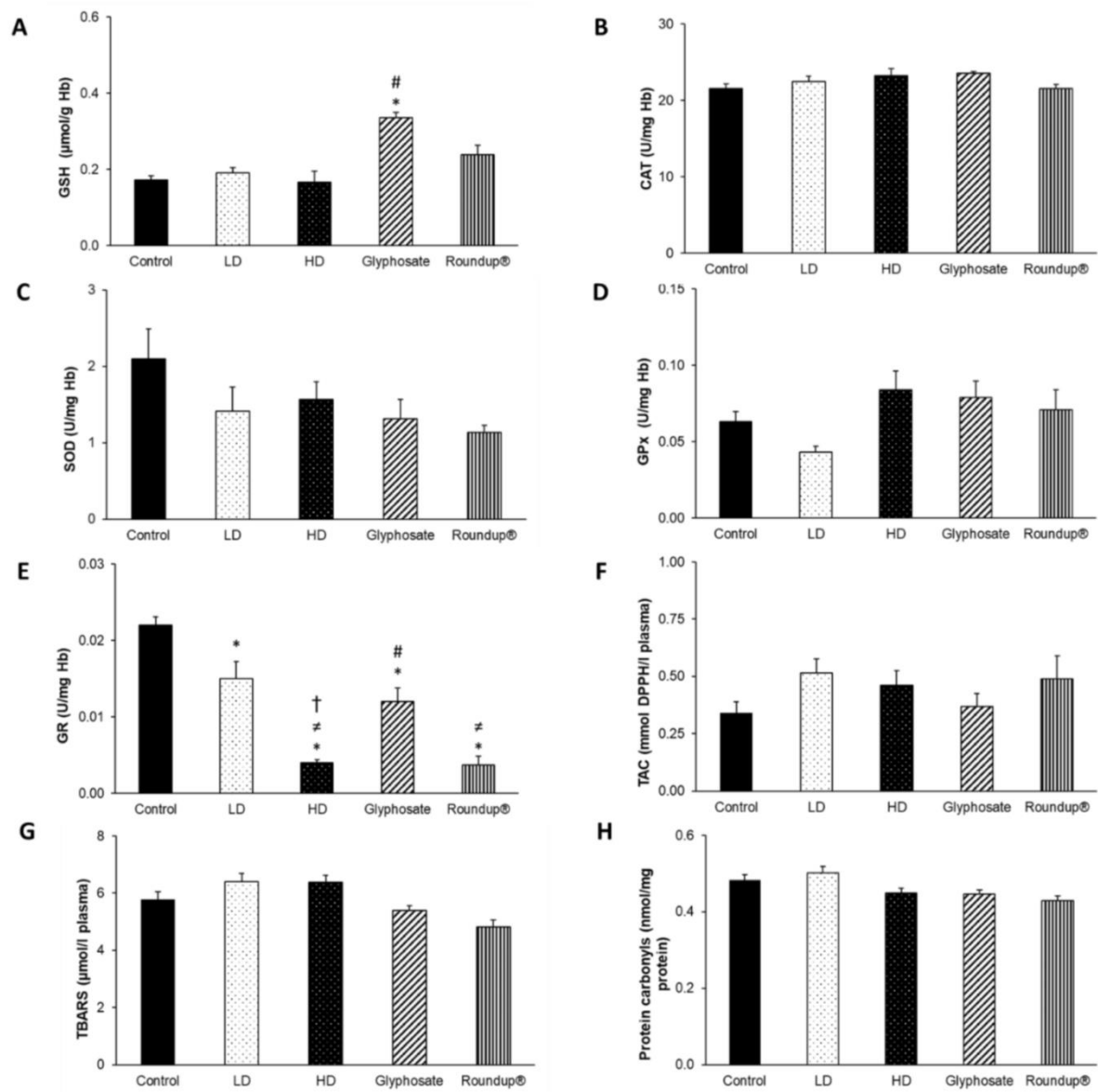
<i>Μήνες</i>	<i>Μήνες</i>	<i>r<sub>s</sub></i>	<i>p</i>
<b>0</b>	<b>3</b>	-0,350	0,130
	<b>6</b>	-0,201	0,394
	<b>9</b>	-0,285	0,223
	<b>12</b>	-0,368	0,110
<b>3</b>	<b>6</b>	0,874	<0,001
	<b>9</b>	0,826	<0,001
	<b>12</b>	0,940	<0,001
<b>6</b>	<b>9</b>	0,928	<0,001
	<b>12</b>	0,887	<0,001
<b>9</b>	<b>12</b>	0,889	<0,001

## 3.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

### 3.3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟΥΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

#### 3.3.1.1 ΤΡΕΙΣ ΜΗΝΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ

Μετά από έκθεση στις ουσίες ενδιαφέροντος για περίοδο τριών μηνών, παρατηρήθηκαν διαταραχές στην οξειδοαναγωγική ισορροπία του αίματος. Συγκεκριμένα, υπήρξε αξιοσημείωτη αύξηση της συγκέντρωσης της GSH στην ομάδα που εκτέθηκε στη γλυφosatη σε σύγκριση τόσο με την ομάδα ελέγχου όσο και με την ομάδα υψηλής δόσης μίγματος ενδοκρινικών διαταρακτών (ομάδα HD), όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1-A. Επιπλέον, η δραστηριότητα του ενζύμου GR μειώθηκε σε όλες τις ομάδες έκθεσης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 3.1-E. Αξίζει να σημειωθεί ότι η δραστηριότητα του GR ήταν επίσης χαμηλότερη στην ομάδα HD σε σύγκριση τόσο με την ομάδα LD (χαμηλή δόση μίγματος ενδοκρινικών διαταρακτών) όσο και με την ομάδα που εκτέθηκε στη γλυφosatη, καθώς και στην ομάδα που χορηγήθηκε Roundup® σε σύγκριση με την ομάδα LD. Αντίθετα, υπήρξε αύξηση της δραστηριότητας του GR στην ομάδα Glyphosate σε σύγκριση με την ομάδα HD, ενώ δεν παρατηρήθηκαν άλλες σημαντικές διαφορές.

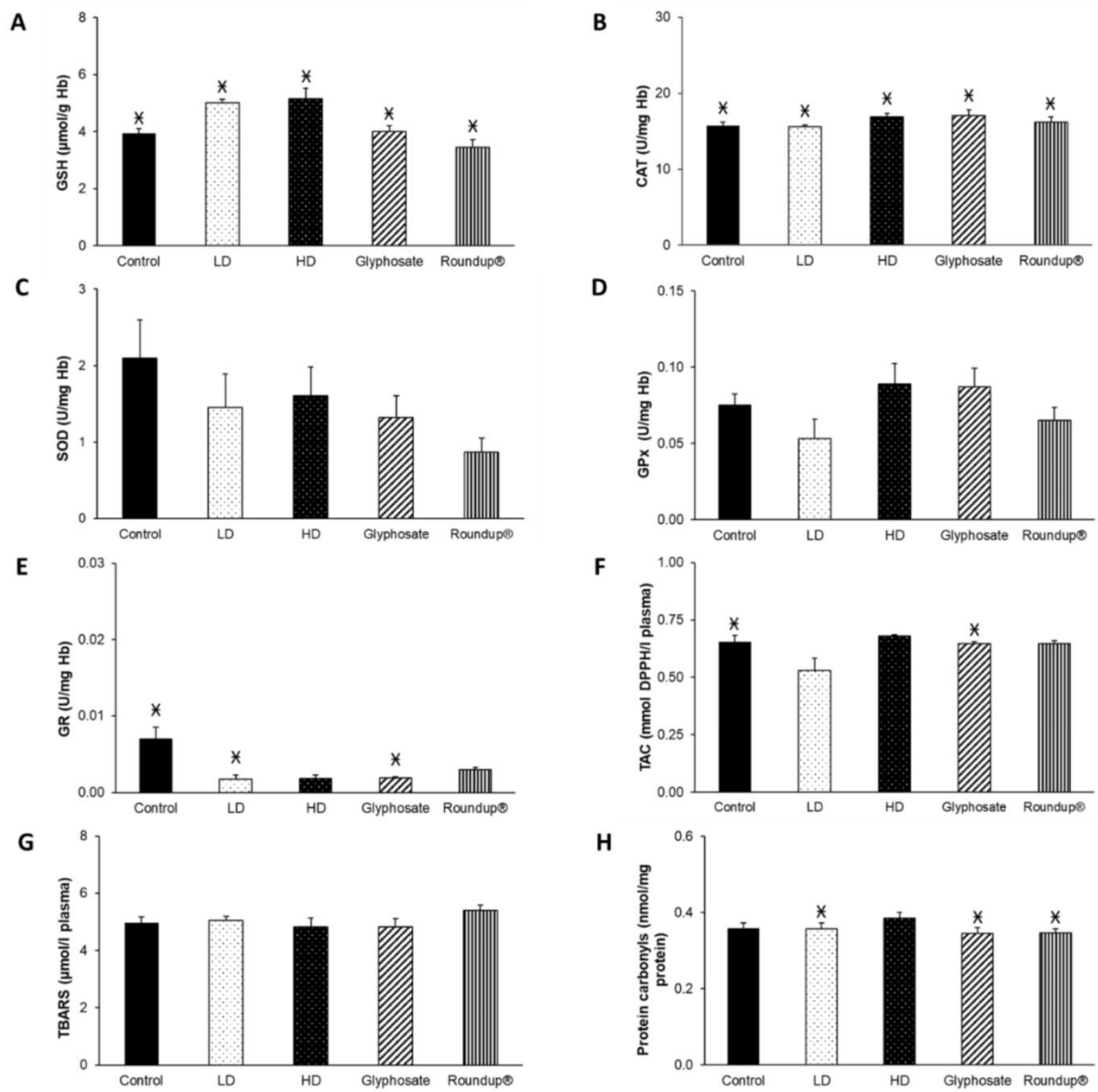


Εικόνα 3.4 Οι επιπτώσεις της 3μηνης έκθεσης στους οξειδοαναγωγικούς βιοδείκτες του αίματος.

### *3.3.1.2 ΕΞΙ ΜΗΝΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ*

Μετά την 6μηνη έκθεση, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων πειραματικών ομάδων. Ωστόσο, υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις μετρήσεις της ίδιας ομάδας μεταξύ των διαφορετικών χρονικών σημείων. Η συγκέντρωση GSH παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση σε όλες τις πειραματικές ομάδες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες μετρήσεις στους 3 μήνες (Εικόνα 3.2-A). Επιπλέον, η δραστηριότητα της CAT μειώθηκε σε όλες τις ομάδες σε σύγκριση με τους 3 μήνες (Εικόνα 3.2-B). Όσον αφορά τη δραστηριότητα του GR, μειώθηκε σε όλες τις ομάδες έκθεσης, εκτός από τις ομάδες HD και Roundup<sup>®</sup>, σε σύγκριση με τους 3 μήνες (Εικόνα 3.2-E). Επιπλέον, τα επίπεδα TAC ήταν στατιστικά αυξημένα στις ομάδες control και Glyphosate σε σύγκριση με τους 3 μήνες (Εικόνα 3.2-F). Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση στις ομάδες LD, Glyphosate και Roundup<sup>®</sup> σε σύγκριση με τα επίπεδα στους 3 μήνες (Εικόνα 3.2-H). Ωστόσο, οι δραστηριότητες της SOD και της GPx, καθώς και τα επίπεδα του TBARS παρέμειναν αμετάβλητα (Εικόνα 3.2-C,D,G).

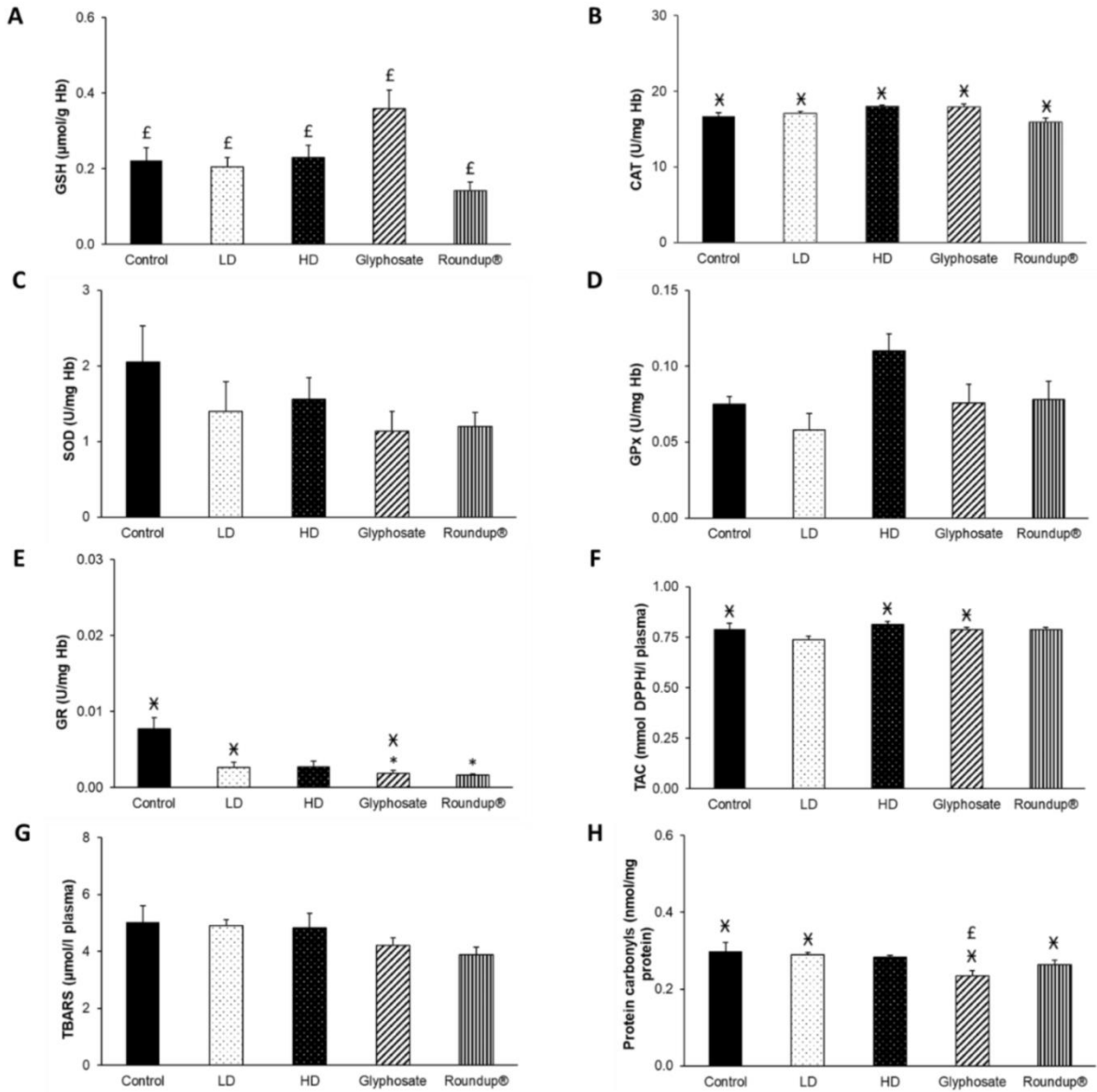




Εικόνα 3.5 Οι επιπτώσεις της βμηνης έκθεσης στους οξειδοαναγωγικούς βιοδείκτες του αίματος.

### *3.3.1.3 ENNEA MHNES EKΘEΣHΣ*

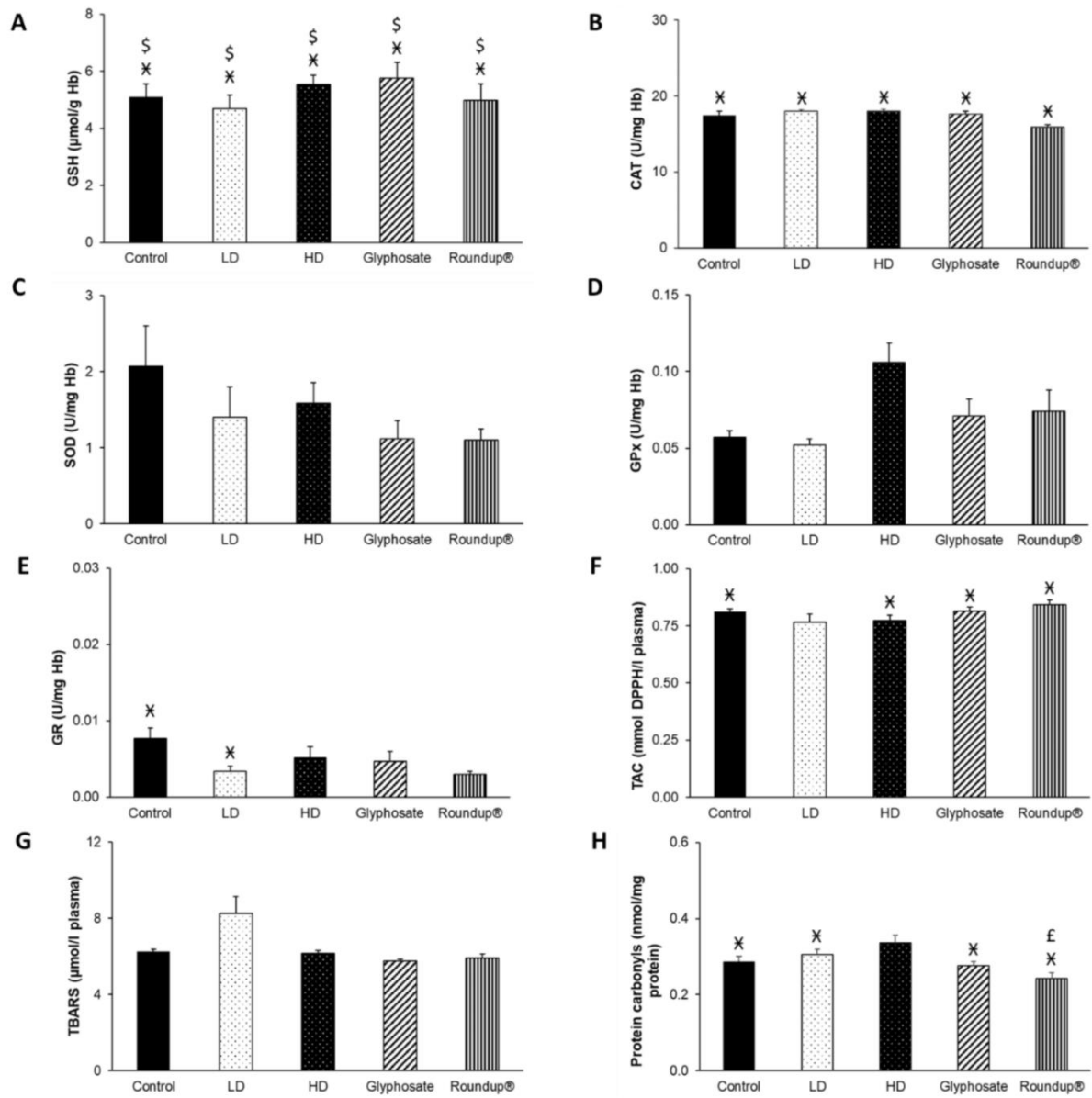
Παρόμοια με τα ευρήματα στους 6 μήνες έκθεσης, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν κυρίως εντός κάθε ομάδας κατά τη σύγκριση των διαφορετικών χρονικών σημείων. Συγκεκριμένα, υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της GSH σε όλες τις ομάδες σε σύγκριση με τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο σημείο των 6 μηνών (Εικόνα 3.3-A). Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της δραστηριότητας της CAT σε όλες τις ομάδες σε σύγκριση με τα επίπεδα στους 3 μήνες (Εικόνα 3.3-B). Επιπλέον, η δραστηριότητα του GR παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση στις ομάδες Glyphosate και Roundup® σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 3.3-E). Αντίθετα, η δραστηριότητα του GR μειώθηκε στις ομάδες control, LD και Glyphosate σε σύγκριση με τα επίπεδα στους 3 μήνες. Ακόμη, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TAC στην ομάδα control, στην ομάδα HD και στην ομάδα Glyphosate σε σύγκριση με τις μετρήσεις των 3 μηνών (Εικόνα 3.3-F). Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μειώθηκε σημαντικά σε όλες τις ομάδες, εκτός από την ομάδα HD, σε σύγκριση με τα επίπεδα στους 3 μήνες. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην ομάδα Glyphosate, η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ήταν επίσης μειωμένη σε σύγκριση με τις μετρήσεις των 6 μηνών. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις δραστηριότητες των SOD και GPx ή στα επίπεδα TBARS (Εικόνα 3.3-C,D,G).



Εικόνα 3.6 Οι επιπτώσεις της 9μηνιαίας έκθεσης στους οξειδωαναγωγικούς βιοδείκτες του αίματος.

#### *3.3.1.4 ΔΩΔΕΚΑ ΜΗΝΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ*

Μετά από 12 μήνες έκθεσης, σημαντικές διαφορές στους μετρούμενους βιοδείκτες οξειδοαναγωγής παρατηρήθηκαν μόνο κατά τη σύγκριση των διαφορετικών χρονικών σημείων και όχι μεταξύ των διαφόρων πειραματικών ομάδων. Συγκεκριμένα, υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης GSH σε όλες τις ομάδες σε σύγκριση με τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν τόσο στους 3 όσο και στους 9 μήνες (Εικόνα 3.4-A). Όσον αφορά τη δραστικότητα της CAT, υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση σε όλες τις ομάδες σε σύγκριση με τα επίπεδα στους 3 μήνες (Εικόνα 3.4-B). Η δραστικότητα του GR μειώθηκε στις ομάδες control και LD σε σύγκριση με τις μετρήσεις στους 3 μήνες ( Εικόνα 3.4-E). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TAC σε όλες τις ομάδες σε σύγκριση με τα επίπεδα στους 3 μήνες, εκτός από την ομάδα LD (Εικόνα 3.4-F). Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση σε όλες τις ομάδες σε σύγκριση με τα επίπεδα στους 3 μήνες, εκτός από την ομάδα HD. Επιπλέον, ήταν μειωμένη στην ομάδα Roundup<sup>®</sup> σε σύγκριση με τις μετρήσεις των 6 μηνών (Εικόνα 3.4-H). Οι δραστικότητες των SOD και GPx, καθώς και τα επίπεδα TBARS, παρέμειναν αμετάβλητα (Εικόνα 3.4-C,D,G).



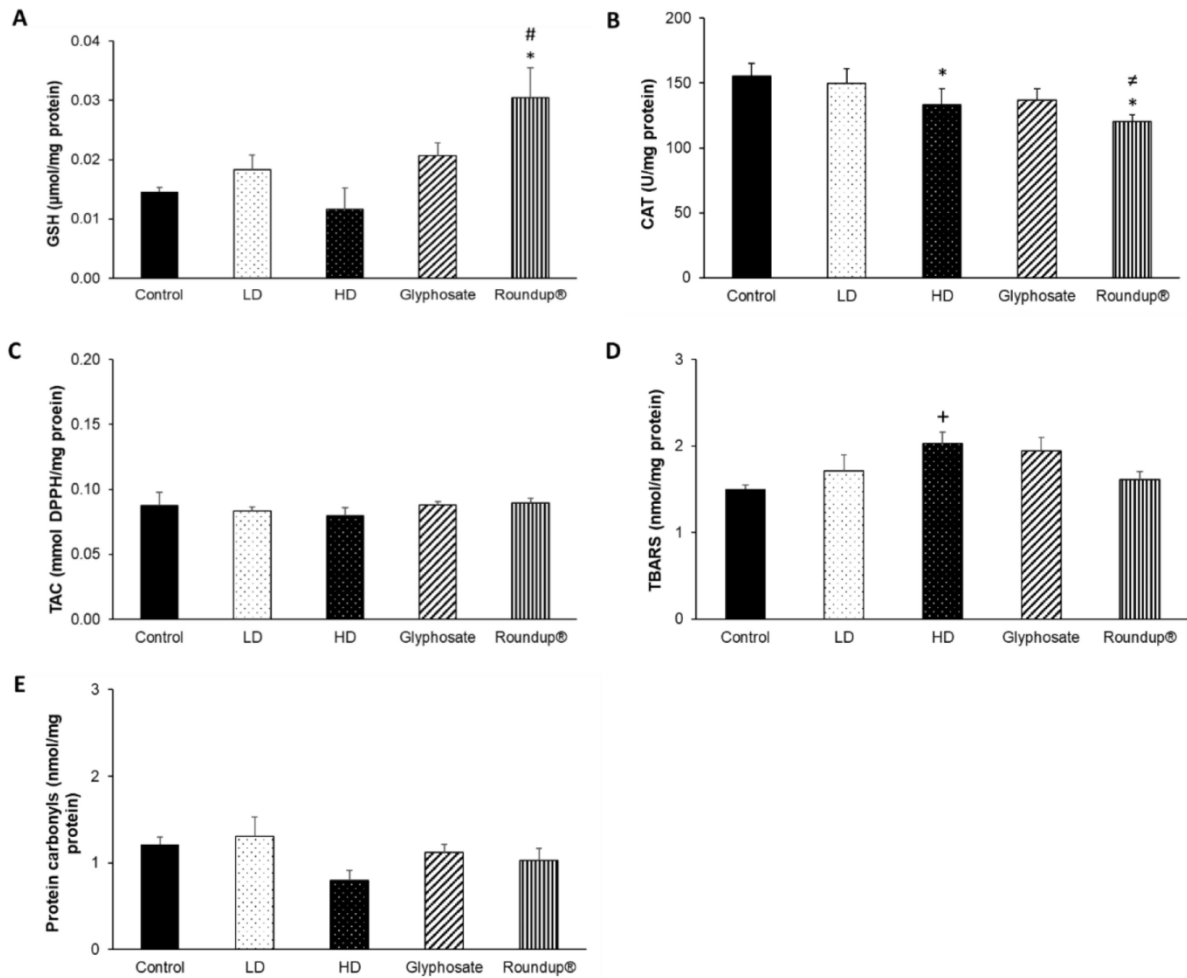
Εικόνα 3.7 Οι επιπτώσεις της 12μηνιαίας έκθεσης στους οξειδοαναγωγικούς βιοδείκτες του αίματος.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αξιολόγηση των οξειδοαναγωγικών βιοδεικτών στο αίμα έδειξαν ότι η 12μηνη έκθεση τόσο σε LD όσο και σε HD του μείγματος Ε.Δ. ενεργοποίησε χρήσιμες αντιοξειδωτικές προσαρμογές, ισχυρισμός που υποστηρίζεται από την αύξηση των επιπέδων GSH και τη μείωση των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Αντίθετως, η 12μηνη έκθεση στη GLY και το Roundup® προκάλεσε διαταραχές της ομοιόστασης της οξειδοαναγωγής στο αίμα. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις, όλα τα σχήματα χορήγησης είχαν το ίδιο μοτίβο δράσης στο ίδιο χρονικό σημείο, με ορισμένες εξαιρέσεις, καθώς δεν εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αξιολόγηση των βιοδεικτών οξειδοαναγωγής των ιστών υπαγορεύουν ότι η HD του μείγματος Ε.Δ. προκάλεσε οξειδωτικό στρες στο ήπαρ, όπως φαίνεται από τη μείωση της δραστηριότητας της CAT και την τάση αύξησης των επιπέδων TBARS. Ομοίως, το χορηγούμενο Roundup® λειτούργησε ως οξειδωτικός παράγοντας, καθώς μείωσε τη δραστηριότητα CAT και αύξησε τα επίπεδα GSH, προκαλώντας έτσι επιζήμιες επιδράσεις στην ομοιόσταση οξειδοαναγωγής του ήπατος. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι οι δυσμενείς επιδράσεις γίνονται εντονότερες με την αύξηση της δόσης ή του χρόνου έκθεσης.

### 3.3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟΥΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ

Μετά τη 12μηνη έκθεση στους ενδοκρινικούς διαταράκτες, ο μόνος προσβεβλημένος ιστός ήταν το ήπαρ. Όσον αφορά στις επιδράσεις της ομάδας HD, η δραστηριότητα της CAT μειώθηκε σε σύγκριση με την ομάδα control (Εικόνα 3.5-B) και, ταυτόχρονα, ανιχνεύθηκε τάση αύξησης των επιπέδων TBARS (Εικόνα 3.5-D). Αντίθετα, η ομάδα LD δεν επηρέασε τους βιοδείκτες οξειδοαναγωγής που εξετάστηκαν. Σημειωτέον, η 12μηνη χορήγηση Roundup® προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης GSH (Εικόνα 3.5-A) σε σύγκριση με τις ομάδες control και HD, καθώς και στατιστικά σημαντική μείωση της δραστηριότητας CAT σε σύγκριση με τις ομάδες control και LD (Εικόνα 3.5-B). Αντίθετα, η 12μηνη έκθεση στη γλυφοσάτη δεν επηρέασε τα επίπεδα των μετρούμενων οξειδοαναγωγικών

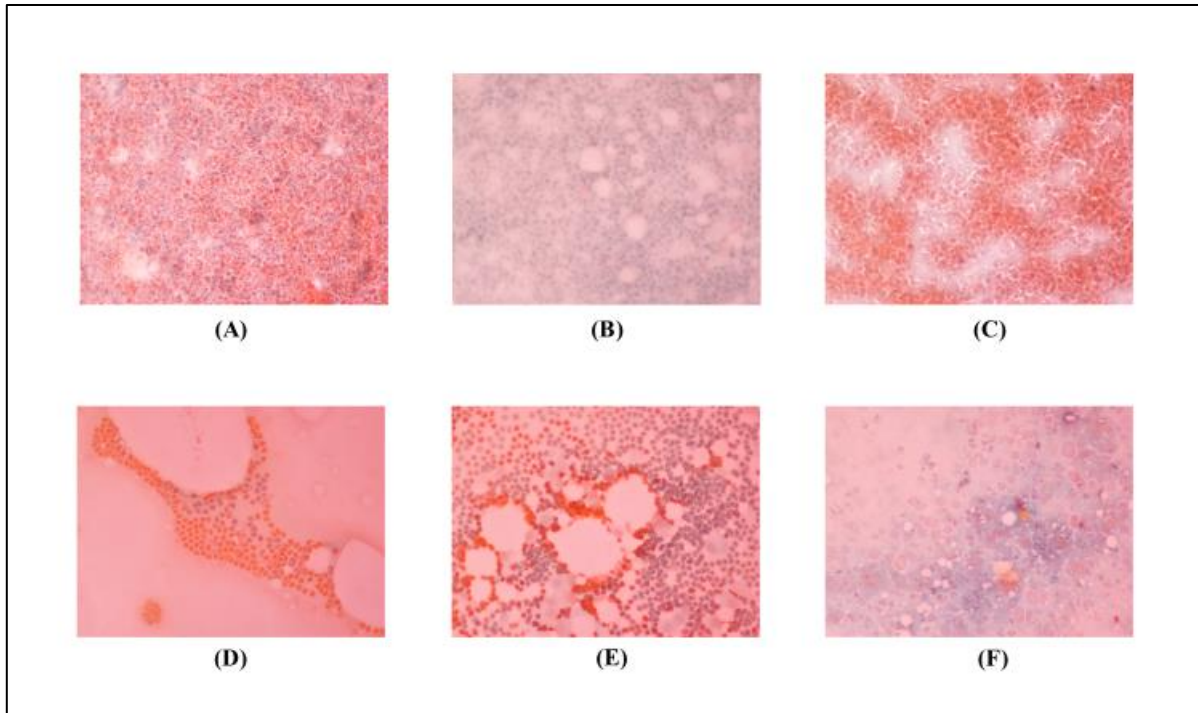
βιοδεικτών. Τα επίπεδα TAC (Εικόνα 3.5-C) και η συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Εικόνα 3.5-E) παρέμειναν ανεπηρέαστα.



Εικόνα 3.8 Οι επιπτώσεις της 12μηνος έκθεσης στους οξειδοαναγωγικούς βιοδείκτες του ήπατος.

### 3.4 ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΥΜΑΤΑ

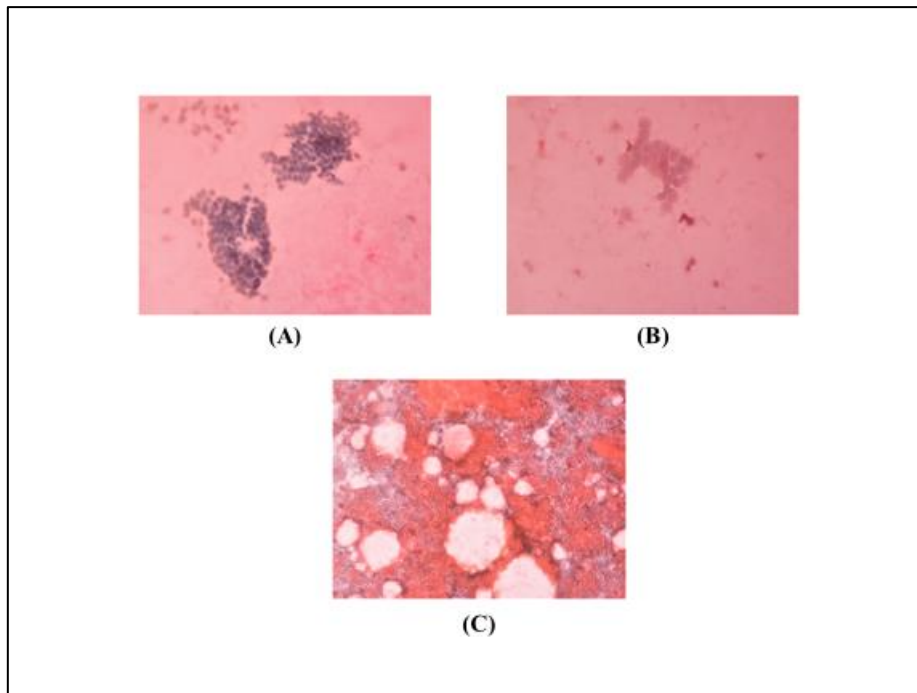
Η κυτταρολογική εξέταση των δειγμάτων ιστών έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ομάδων έκθεσης αλλά και μεταξύ των διαφορετικών ομάδων έκθεσης. Η ομάδα control παρουσίασε αραιά κύτταρα φυσιολογικής κατάστασης ανά ιστό (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9 Κυτταρολογική απεικόνιση ιστών ομάδας control (ομάδα 1). A) Καρδιά B) Νεφρός C) Ήπαρ D) Θυρεοειδής αδένας E) Ωοθήκη F) Όρχεις

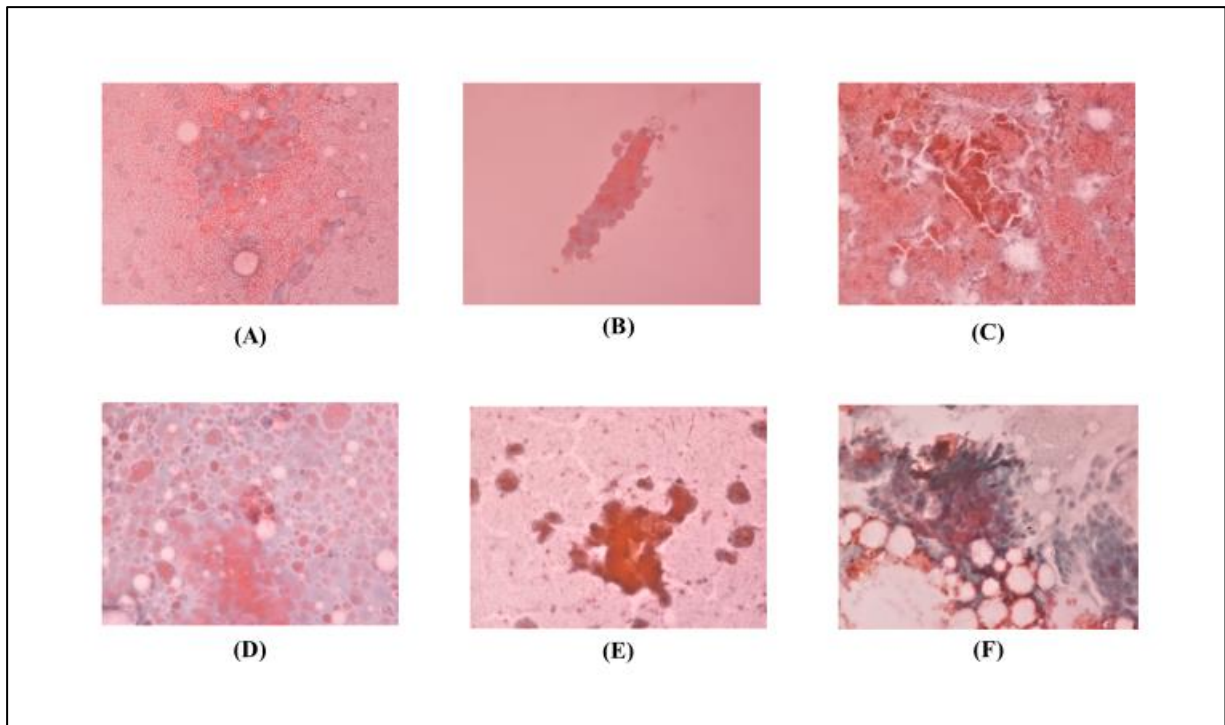
Ήδη από την ομάδα LD φαίνονται οι επιδράσεις των ουσιών σε κυτταρικό επίπεδο. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.10, υπάρχουν άφθονα κυτταρικά στοιχεία, ερυθρά κύτταρα και θυλάκια ανά ιστό (Εικόνα 3.10-A,B), ενώ στους νεφρούς επιβεβαιώνεται και η ύπαρξη φλεγμονής (Εικόνα 3.10-C).





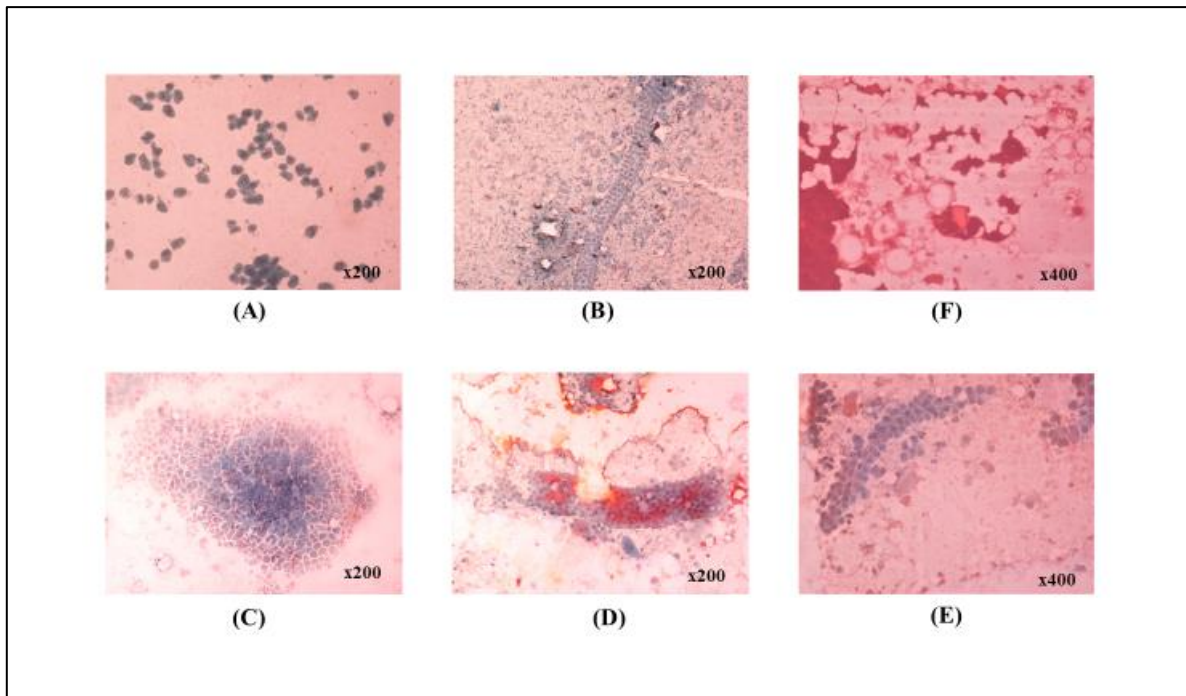
**Εικόνα 3.10** Κυτταρολογική απεικόνιση ιστών ομάδας LD (ομάδα ). A) Άφθονα κυτταρικά στοιχεία στις ωθήκες B) Θυλάκιο στο θυρεοειδή αδένα C) Αρκετά κύτταρα, ερυθροκύτταρα και ύπαρξη φλεγμονής στο νεφρό.

Όπως ήταν αναμενόμενο, οι ομάδες HD, Glyphosate και Roundup παρουσίασαν τις μεγαλύτερες βλάβες στα κύτταρα των ιστών. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν εκμαγεία σε όλους τους ιστούς, εκφυλισμός των κυττάρων καθώς και καρκινογένεση. Ειδικότερα, στην ομάδα HD παρατηρήθηκαν θηλώδεις (Εικόνα 3.11-A) και μικροθηλώδεις ομάδες θυλακικών κυττάρων και καρκινογένεση στο θυρεοειδή αδένα (Εικόνα 3.11-B) καθώς και άφθονα κυτταρικά στοιχεία και εκμαγεία ουροφόρων σωληνάρων στους νεφρούς (Εικόνα 3.11-C). Παράλληλα, παρατηρήθηκε αύξηση στον πληθυσμό των κυττάρων των όρχεων (Leydig, Sertoli, κ.α.) με ήπια εκφύλιση (Εικόνα 3.11-D), υπερπλασία, ακόμα και καρκινογένεση, στα κύτταρα των ωθηκών (Εικόνα 3.11-F) καθώς και υπερπλασία των ηπατικών κυττάρων (Εικόνα 3.11-E). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα κύτταρα της καρδιάς έμειναν σχεδόν ανεπηρέαστα.



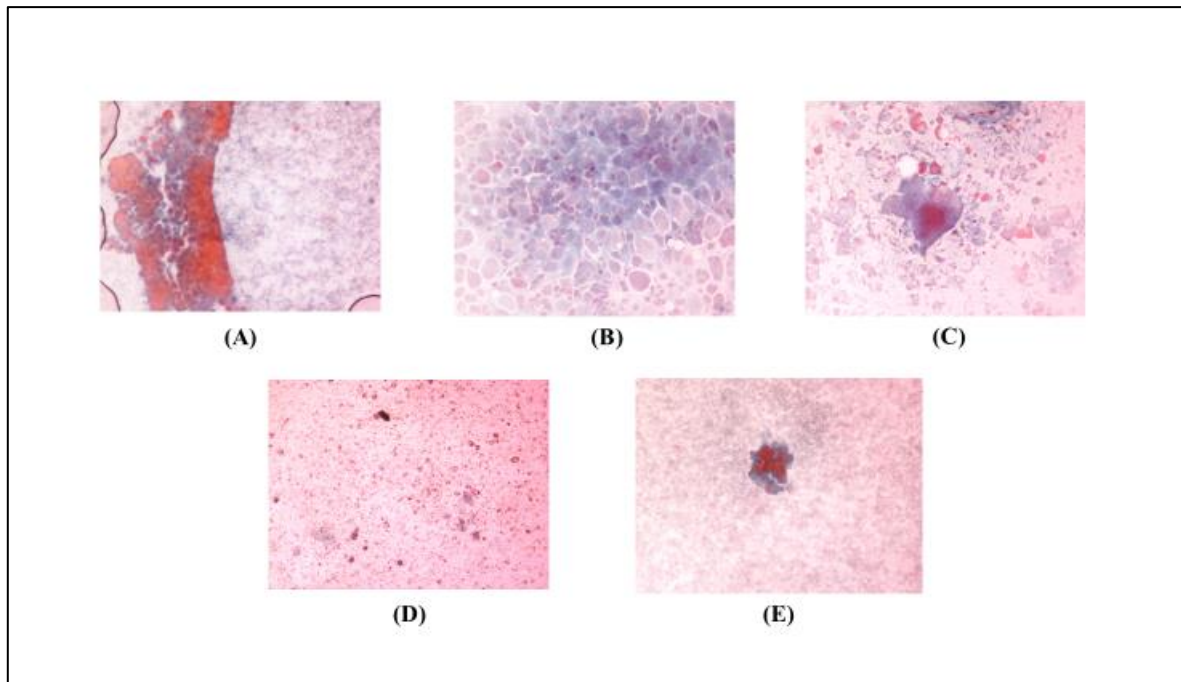
**Εικόνα 3.11** Κυτταρολογική εξέταση ιστών ομάδας HD (ομάδα 3). Α) Θηλώδεις ομάδες θυλακικών κυττάρων στον θυρεοειδή αδένα Β) Μικροθηλώδεις ομάδες θυλακικών κυττάρων και εμφάνιση καρκινογένεσης στον θυρεοειδή αδένα C) Κυτταρικά στοιχεία και εκμαγεία ουροφόρων σωληνάρων στους νεφρούς D) Ήπια εκφύλιση των κυττάρων των όρχεων (Sertoli, Leydig) E) Ηπατικά κύτταρα με ευδιάκριτη υπερπλασία F) Υπερπλασία και εμφάνιση καρκινογένεσης των ωοθηκικών κυττάρων.

Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και στην ομάδα Glyphosate, που ήταν η ομάδα που εκτέθηκε στην καθαρή μορφή του GLY. Σε όλα τα είδη ιστών παρουσιάστηκαν άφθονα κύτταρα αλλά και φλεγμονή, ενώ δεν σημειώθηκε καρκινογένεση (Εικόνα 3.12-A, B, C, D, E). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα της καρδιάς εμφάνισαν αυξημένο αριθμό, ιδιαίτερα τα μεσοθηλιακά κύτταρα του περικαρδίου, καθώς και φλεγμονή (Εικόνα 3.12-F).



**Εικόνα 3.12** Κυτταρολογική εξέταση ιστών ομάδας Glyphosate (ομάδα 4). Αυξημένος αριθμός κυττάρων και παρουσία φλεγμονής σε Α) ήπαρ Β) νεφρούς C) όρχεις D) θυρεοειδή αδένα E) ωοθήκες F) καρδιά.

Στην 5<sup>η</sup> και τελευταία ομάδα (Roundup<sup>®</sup>), οι νεφροί, οι όρχεις και ο θυρεοειδής αδένας ήταν οι ιστοί που επηρεάστηκαν περισσότερο. Άφθονα εκμαγεία, έντονη ρυπαρότης και φλεγμονή σημειώθηκαν στα κύτταρα των νεφρών (Εικόνα 3.13-A) με παρόμοια εικόνα να παρατηρείται και στα κύτταρα των όρχεων (Εικόνα 3.13-B). Στα κύτταρα του θυρεοειδή αδένα παρατηρήθηκαν κολλοειδές και άφθονα θυλακικά κύτταρα αλλά και διαταραχή της αρχιτεκτονικής των θυλακίων (Εικόνα 3.13-C). Παράλληλα, στην καρδιά και το ήπαρ παρατηρήθηκε αισθητή μείωση του αριθμού των κυττάρων (Εικόνα 3.13-D, E).

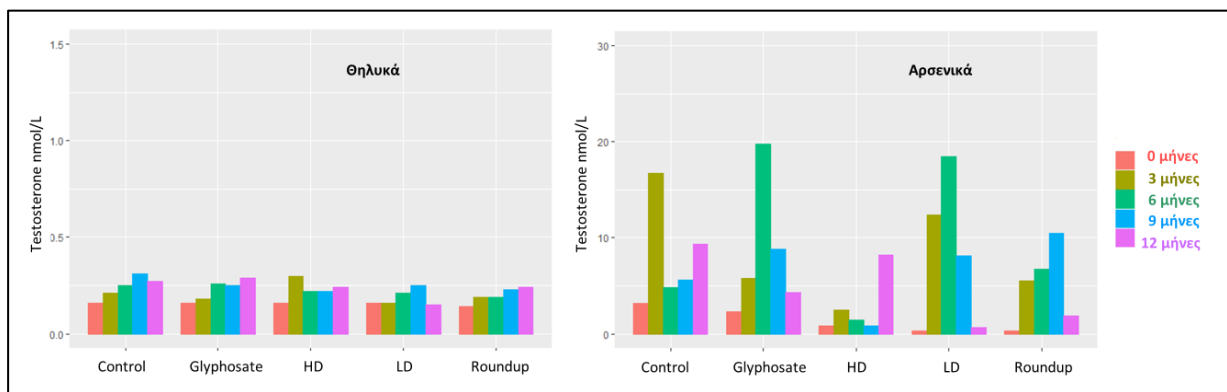


**Εικόνα 3.13** Κυτταρολογική εξέταση ιστών ομάδας Roundup (ομάδα 5). Εκμαγεία, έντονη ρυπαρότης και φλεγμονή στα κύτταρα A) των νεφρών και B) των όρχεων C) Κολλοειδές, θυλακικά κύτταρα και διαταραχή αρχιτεκτονικής των θυλακίων του θυρεοειδή αδένα. Μείωση των κυττάρων σε D) καρδιά και E) ήπαρ.

### 3.5 ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΡΜΟΝΩΝ

Οι μετρήσεις των ορμονών έδειξαν μικρές διαφοροποιήσεις τόσο μεταξύ των ομάδων όσο και μεταξύ των χρονικών διαστημάτων έκθεσης, ενώ παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις και μεταξύ «ανδρικών» και «γυναικείων» ορμονών.

Στην Εικόνα 3.14 δίνονται τα επίπεδα της τεστοστερόνης στα αρσενικά και θηλυκά κουνέλια. Όσον αφορά στα θηλυκά κουνέλια, δεν υπήρξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις ούτε μεταξύ των ομάδων αλλά ούτε και σε σχέση με το χρόνο έκθεσης.

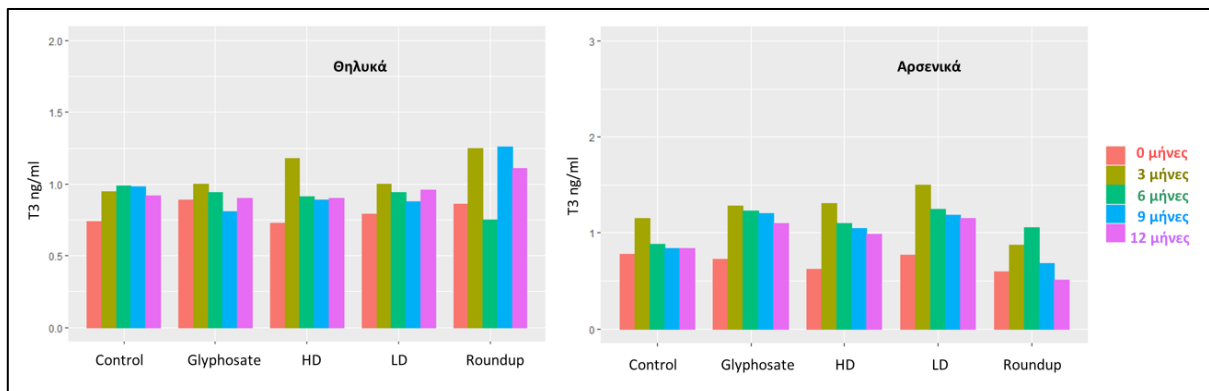


Εικόνα 3.14 Επίπεδα τεστοστερόνης (nmol/L) σε θηλυκά και αρσενικά κουνέλια.

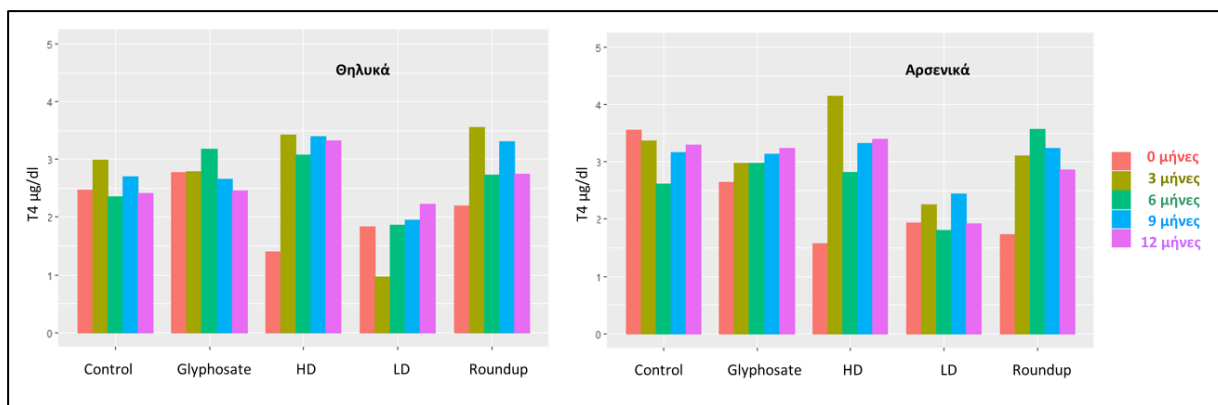
Στα αρσενικά κουνέλια φαίνεται να υπάρχει μία διαταραχή στην ορμονική ισορροπία, καθώς στις ομάδες Glyphosate, LD και Roundup η συγκέντρωση της τεστοστερόνης αυξάνεται στους 3 και 6 μήνες έκθεσης ενώ μειώνεται κατακόρυφα στους 12 μήνες. Λόγω του μικρού αριθμού ζώων (2 θηλυκά και 2 αρσενικά κουνέλια ανά ομάδα) δεν υπάρχει δυνατότητα σύγκρισης των επιπέδων των ορμονών με την ομάδα control. Επίσης ακόμα και αν έχει χορηγηθεί υψηλή δόση ουσιών στις ομάδες HD, Glyphosate και Roundup, οι δόσεις αυτές παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα, πολύ πιο χαμηλά από τα αντίστοιχα NOAEL, οδηγώντας σε ασαφείς και στατιστικά μη σημαντικές διαφοροποιήσεις.

Οι ορμόνες T<sub>3</sub> και T<sub>4</sub> δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα μεταξύ αρσενικών και θηλυκών κουνελιών (Εικόνα 3.15 & 3.16). Συγκεκριμένα τα επίπεδα της T<sub>3</sub> στα θηλυκά κουνέλια δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε μεταξύ των χρόνων έκθεσης αλλά ούτε και μεταξύ των ομάδων έκθεσης. Ωστόσο, στα αρσενικά κουνέλια, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης T<sub>3</sub> στους 3 μήνες έκθεσης, σε όλες τις ομάδες, συμπεριλαμβανομένης και της ομάδας control. Στα επόμενα χρονικά σημεία, η συγκέντρωση της T<sub>3</sub> παρέμεινε αυξημένη σε όλες τις ομάδες, εκτός από την ομάδα Roundup όπου στους 12 μήνες φαίνεται να μειώνεται (Εικόνα 3.15).

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.16, τα επίπεδα της T<sub>4</sub> δεν παρουσίασαν ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ θηλυκών και αρσενικών κουνελιών. Ωστόσο παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων από τους 3 μήνες και μετά, στις ομάδες HD και Roundup τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά κουνέλια συγκρίνοντας πάντα με το χρόνο μηδέν.

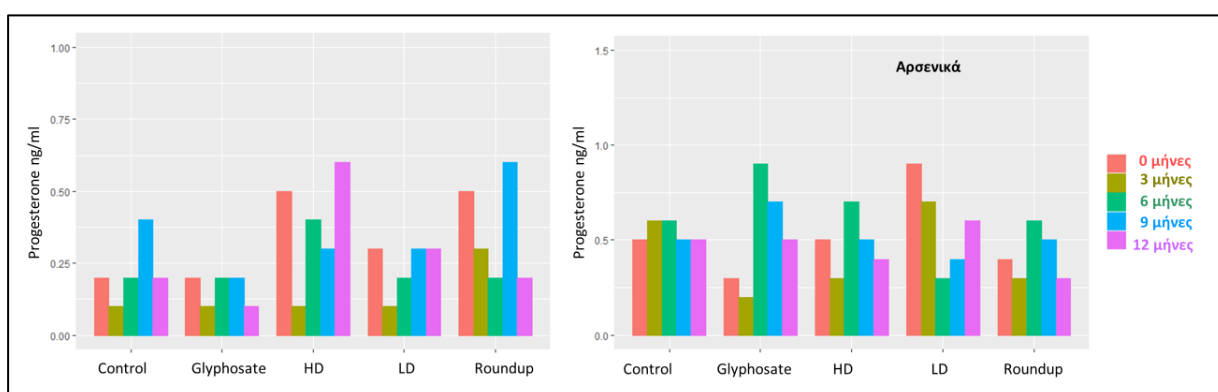


Εικόνα 3.15 Επίπεδα T<sub>3</sub> (ng/ml) σε θηλυκά και αρσενικά κουνέλια.

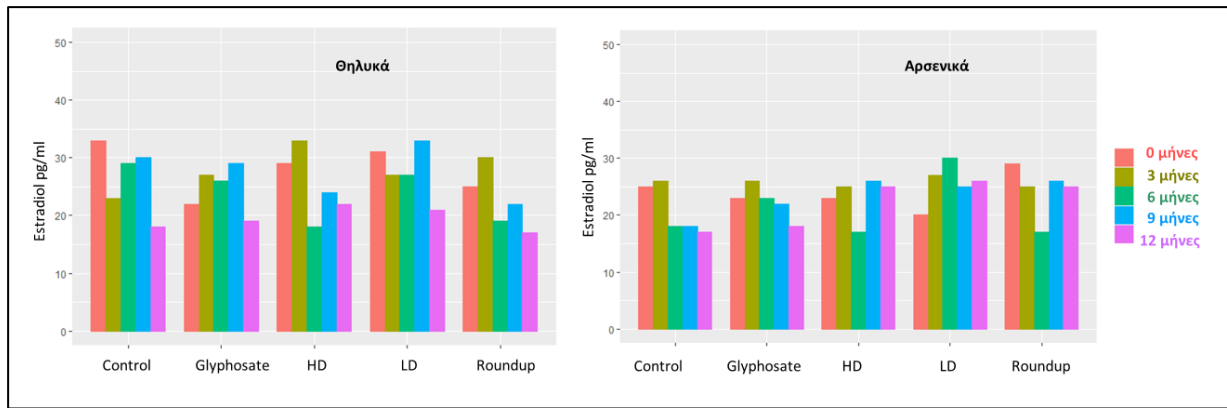


Εικόνα 3.16 Επίπεδα T4 (µg/dl) σε θηλυκά και αρσενικά κουνέλια.

Όσον αφορά στα επίπεδα της προγεστερόνης, δεν υπήρξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο φύλων. Ιδιαίτερα, στα θηλυκά κουνέλια, οι συγκεντρώσεις παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα χωρίς συγκεκριμένο μοτίβο αυξομειώσης. Από την άλλη μεριά, στα αρσενικά κουνέλια, στους 12 μήνες, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων προγεστερόνης στις ομάδες LD, HD και Roundup σε σχέση με την αρχή του πειράματος (0 μήνες). Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι αντίστοιχα τα επίπεδα προγεστερόνης της ομάδας Glyphosate αυξήθηκαν (Εικόνα 3.17). Ωστόσο δεν μπορούμε να βγάλουμε σαφές συμπέρασμα λόγω του μικρού αριθμού ζώων και των χαμηλών δόσεων που χορηγήθηκαν.



Εικόνα 3.17 Επίπεδα προγεστερόνης (ng/ml) σε θηλυκά και αρσενικά κουνέλια.



Εικόνα 3.18 Επίπεδα β-οιστραδιόλης (pg/ml) σε θηλυκά και αρσενικά κουνέλια.

Τέλος, οι τιμές της β-οιστραδιόλης δεν φάνηκε να επηρεάζονται παρουσιάζοντας παρόμοιες τιμές σε θηλυκά και αρσενικά, μεταξύ των ομάδων αλλά και μεταξύ των διαστημάτων έκθεσης (Εικόνα 3.18).



## 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή προσπαθήσαμε να προσομοιάσουμε κινδύνους στους οποίους εκτίθεται ο άνθρωπος καθημερινά στην πραγματική ζωή. Για το σκοπό αυτό, χορηγήθηκαν σε κουνέλια glyphosate, MePB, PrPB, BuPB, TCS, BPA και TCS σε διαφορετικές δόσεις και συνδυασμούς στοχεύοντας να εξετάσουμε τόσο τη συνδυαστική έκθεση όσο και τη διαφοροποίηση μεταξύ καθαρής και εμπορικής μορφής glyphosate.

Η μελέτη της τοξικότητας των χορηγηθεισών ουσιών έγινε με βάση βιοδείκτες έκθεσης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση μικροπυρήνων (micronuclei assay), μέτρηση έντασης ουράς (comet assay), καθορισμός οξειδοαναγωγικών βιοδεικτών (γλουταθειόνη, αναγωγή της γλουταθειόνης, καταλάση, κ.ά.), κυτταρολογική εκτίμηση και μέτρηση αναπαραγωγικών ορμονών.

Η μέτρηση των μικροπυρήνων (MN) αποκάλυψε αξιοσημείωτες διακυμάνσεις από την αρχή έως το τέλος της περιόδου έκθεσης. Ενώ η ομάδα control διατήρησε σταθερές μέσες τιμές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (που κυμάνθηκαν από  $7,25 \pm 1,26$  έως  $9,25 \pm 1,71$ ), όλες οι άλλες ομάδες παρουσίασαν μεταβολές κατά τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο και τη δόση. Μέχρι το τελικό σημείο έκθεσης (12 μήνες), οι μέσες τιμές MN για τις ομάδες LD και HD ( $41,75 \pm 1,71$  και  $45,75 \pm 1,71$ , αντίστοιχα) εμφανίστηκαν περίπου πέντε φορές υψηλότερες από τις αρχικές τιμές ( $7,75 \pm 0,50$  και  $8,50 \pm 1,00$ , αντίστοιχα). Ομοίως, η μέση τιμή MN της ομάδας Glyphosate φάνηκε να είναι τρεις φορές υψηλότερη από την αρχική τιμή σε  $t = 0$  μήνες (από  $8,75 \pm 0,96$  σε  $37,50 \pm 1,00$ ). Ακόμη, η ομάδα Roundup παρουσίασε επταπλάσια αύξηση των μέσων τιμών MN στους 12 μήνες ( $60,75 \pm 1,71$ ) σε σύγκριση με τους  $t = 0$  μήνες ( $8,25 \pm 1,89$ ).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μελέτη των Koller et al. σχετικά με τις κυτταροτοξικές και γονιδιοτοξικές ιδιότητες της GLY και του Roundup® σε μια κυτταρική σειρά στοματικού επιθηλίου, διαπίστωσε ότι το Roundup® ήταν πιο δραστικό από το GLY, προκαλώντας κυτταροτοξικές επιδράσεις μέσω της βλάβης των μεμβρανών και της εξασθένησης της μιτοχονδριακής λειτουργίας (71). Αυτό συμφωνεί με τα ευρήματά μας, καθώς η ομάδα Roundup εμφάνισε αριθμούς MN σχεδόν διπλάσιους από την ομάδα Glyphosate στο τέλος του

πειράματος *in vivo* ( $t = 12$  μήνες). Η εμπορική μορφή GLY (Roundup) περιέχει πρόσθετα, συμπεριλαμβανομένου του πρόσθετου πολυοξυαιθυλεναμίνη (POEA), που είναι γνωστό ότι προκαλεί γονιδιωματική βλάβη (72), εξηγώντας ενδεχομένως τη διαφορά μεταξύ των ομάδων Glyphosate και Roundup.

Καθ' όλα τα χρονικά σημεία, η ομάδα HD ( $8,50 \pm 1,00$ - $45,75 \pm 1,71$ ) παρουσίασε σταθερά υψηλότερους αριθμούς MN από την ομάδα LD ( $7,75 \pm 0,50$ - $41,75 \pm 1,71$ ), οι οποίοι όμως δεν αντιστοιχούσαν στη δεκαπλάσια διαφορά της χορηγούμενης δόσης. Ειδικότερα, η ομάδα HD παρουσίασε μεγαλύτερο αριθμό MN από την ομάδα Glyphosate ( $8,75 \pm 0,96$ - $37,50 \pm 1,00$ ), αν και η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αυτή η διαφορά στις μετρήσεις των MN αποδίδεται στις επιπλέον ουσίες (BPA, TCS, DEHP, MePB, PrPB και BuPB) που υπάρχουν στην ομάδα HD σε σύγκριση με την ομάδα glyphosate, γεγονός που υποδηλώνει μια συνεργιστική επίδραση της GLY με αυτές τις ενώσεις στον αριθμό των MN.

Τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών ποικίλλουν ανάλογα με τις υπό εξέταση ουσίες. Για παράδειγμα, οι Duarte et al. παρατήρησαν αύξηση των συχνοτήτων μικροπυρήνων (MN) σε ηπατικά κύτταρα που εκτέθηκαν ξεχωριστά σε TCS και DEHP (73). Ωστόσο, όταν εκτέθηκαν μαζί, δεν παρατηρήθηκε επαγόμενος σχηματισμός μικροπυρήνων, αν και η βιωσιμότητα των κυττάρων φάνηκε να επηρεάζεται αρνητικά. Αντίθετα, πειράματα που αφορούσαν ηπατοκύτταρα που εκτέθηκαν σε μείγμα δισφαινολών έδειξαν αυξημένη κυτταροτοξικότητα με σχηματισμό MN, ενώ η έκθεση σε μεμονωμένες δισφαινόλες δεν προκάλεσε τέτοιες επιδράσεις (74).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ομάδα Roundup, επηρεάστηκε περισσότερο όσον αφορά τον σχηματισμό MN ( $8,25 \pm 1,89$ - $60,75 \pm 1,71$ ), με σχεδόν διπλάσιο αριθμό MN από την ομάδα Glyphosate ( $8,75 \pm 0,96$ - $37,50 \pm 1,00$ ). Παρά το γεγονός ότι τόσο η ομάδα Glyphosate όσο και η ομάδα Roundup έλαβαν την ίδια δόση GLY, η πρώτη αποτελούνταν από καθαρό GLY, ενώ η δεύτερη περιλάμβανε όλα τα πρόσθετα που υπάρχουν στην εμπορική μορφή GLY. Ένα από αυτά τα βοηθητικά είναι η POEA, η τοξικότητα της οποίας έχει επικυρωθεί σε πειράματα σε ζώα (18,75). Ειδικότερα, πειράματα σε νεαρά ψάρια έδειξαν τη γονοτοξικότητά της, την ικανότητά της να προκαλεί υπεροξειδωση των λιπιδίων και να διαταράσσει την οξειδοαναγωγική κατάσταση (76).

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας comet αποκάλυψαν ότι η ομάδα HD είχε υψηλότερη τιμή έντασης ουράς ( $12,58 \pm 1,90$ ), σημαντικά διαφορετική από εκείνη της ομάδας LD ( $8,67 \pm 1,10$ ), υποδεικνύοντας δόσοεξαρτώμενη βλάβη, καθώς οι δύο αυτές ομάδες είχαν δεκαπλάσια διαφορά στη χορηγούμενη δόση. Παρόμοιες τάσεις παρατηρήθηκαν σε προηγούμενες μελέτες που αφορούσαν λεμφοκύτταρα ψαριών και ανθρώπων που εκτέθηκαν μεμονωμένα σε GLY, TCS και PBs (77–79). Οι ομάδες Glyphosate και Roundup δεν παρουσίασαν καμία σημαντική διαφορά, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα πρόσθετα στην εμπορική μορφή του GLY δεν είχαν καμία επιπλέον επίδραση στην ένταση της ουράς. Ωστόσο, οι ομάδες HD και Glyphosate παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές της έντασης της ουράς ( $12,58 \pm 1,90$  και  $9,52 \pm 1,66$ , αντίστοιχα), υποδεικνύοντας μια πρόσθετη επίδραση της GLY, της BPA, της TCS, του DEHP, του MePB, του PrPB και του BuPB στην ένταση της ουράς. Προηγούμενες δοκιμές comet σε κυτταρικές σειρές ποντικού που εκτέθηκαν σε GLY, Roundup και POEA έδειξαν ότι η ανασταλτική ισχύς ακολούθησε τη σειρά  $POEA > Roundup > GLY$  (80). Οι αποκλίσεις στα βιβλιογραφικά δεδομένα μπορεί να αποδοθούν στον περιορισμένο αριθμό μελετών και στις διαφοροποιημένες ομάδες έκθεσης.

Η συσχέτιση μεταξύ της έντασης της ουράς και του αριθμού των MN κατά τη 12μηνιαία έκθεση αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις εντός των ομάδων έκθεσης ( $p < 0,001$ ). Τόσο η ένταση της ουράς όσο και ο αριθμός των MN παρουσίασαν χρονικά εξαρτώμενη απόκριση, ενώ ορισμένες ομάδες εμφάνισαν επίσης δόσοεξαρτώμενο μοτίβο. Προηγούμενες μελέτες σχετικά με τις ενώσεις – στόχους, GLY, BPA, TCS, DEHP και PBs, έδειξαν δυσμενείς επιδράσεις στον αριθμό των MN, οι οποίες αυξάνονταν με την παρατεταμένη έκθεση και τις υψηλότερες δόσεις (22,79,81–83). Ωστόσο, η ένταση της ουράς δεν φάνηκε να ακολουθεί την ίδια τάση (72).

Όλες οι ουσίες – στόχοι της παρούσας μελέτης εμφάνισαν γενετοξική δράση. Σε προηγούμενες μελέτες, το TCS, παρουσίασε δόσοεξαρτώμενη γενετοξική δράση σε διάφορους οργανισμούς, με αποτέλεσμα τη σταδιακή αύξηση της έντασης της ουράς και του σχηματισμού μικροπυρήνων (78,84) ή ακόμη και την πρόκληση πλήρους διάλυσης των πυρήνων σε υψηλές δόσεις έκθεσης (85). Πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι τα PBs ασκούν κυτταροτοξικές και γενετοξικές επιδράσεις, οδηγώντας σε σχηματισμό MN και αύξηση της έντασης της ουράς με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση (79). Οι φθαλικές ενώσεις και η BPA έχουν επίσης

καθιερωθεί ως γενετοξικές, επηρεάζοντας αρνητικά τα χρωμοσώματα και το μήκος της ουράς με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (86–89). Επιπλέον, η έκθεση στο DEHP έχει συνδεθεί με επαγόμενη βλάβη του DNA και κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι αρουραίοι που εκτέθηκαν σε DEHP παρουσίασαν αυξημένη ένταση ουράς τόσο σε κύτταρα όσο και σε θυρεοειδικό ιστό (90).

Παρόμοιες μελέτες που διερευνούν τις γενετοξικές επιδράσεις των φυτοφαρμάκων παρατήρησαν σημαντικές διαφορές με την αύξηση του χρόνου έκθεσης (91,92). Για παράδειγμα, κουνέλια που εκτέθηκαν σε cypermethrin παρουσίασαν σημαντική αύξηση των διπύρηνων MN, συνοδευόμενη από ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις και φλεγμονή στο ήπαρ και τους νεφρούς (91). Επιπλέον, η έρευνα σε κουνέλια που εκτέθηκαν σε imidacloprid αποκάλυψε διαφορές στον αριθμό των MN μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ομάδων που εκτέθηκαν, αλλά δεν υπήρχε εμφανής χρονική εξάρτηση της γενετοξικής επίδρασης (92). Αυτή η έλλειψη χρονικής εξάρτησης μπορεί να αποδοθεί στην εφαρμογή μηχανισμών αποτοξίνωσης, στον πιθανό μεταβολισμό των ξενοβιοτικών και στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA (8).

Προηγούμενες έρευνες έχουν διερευνήσει την επίδραση ενός διαφορετικού χημικού μείγματος, συμπεριλαμβανομένων ευρέως συναντόμενων ξενοβιοτικών όπως η GLY, το BuPB και η BPA, στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος και των ιστών των αρουραίων. Τα ευρήματα των εν λόγω μελετών έδειξαν ότι το συγκεκριμένο μείγμα προκάλεσε ευεργετικές προσαρμογές οξειδοαναγωγής σε 6 και 12 μήνες χορήγησης (93–95). Ωστόσο, όταν χορηγήθηκε επί 18 μήνες, που ισοδυναμεί με τη διάρκεια ζωής των πειραματόζων, διατάραξε την ομοιότητα της οξειδοαναγωγής, με αποτέλεσμα δυσμενείς επιδράσεις τόσο στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγής του αίματος όσο και στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγής των ιστών (93).

Στην παρούσα μελέτη, στους 3 μήνες έκθεσης επηρεάστηκε αρνητικά η οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος των ομάδων LD, HD και Roundup, όπως αποδεικνύεται από τη μείωση της δραστηριότητας GR σε σύγκριση με την ομάδα control. Στην περίπτωση της ομάδας Glyphosate, αν και η δραστηριότητα GR μειώθηκε, υπήρξε αύξηση της συγκέντρωσης GSH σε σύγκριση με τις ομάδες control και HD, πιθανώς ως προσαρμοστικός μηχανισμός για την προστασία των μακρομορίων από την οξειδωτική βλάβη. Μετά από 6 μήνες έκθεσης, οι αντιοξειδωτικές άμυνες του αίματος ενεργοποιήθηκαν για να αντιμετωπίσουν πιθανές διαταραχές στην ομοιότητα οξειδοαναγωγής. Η συγκέντρωση GSH αυξήθηκε σε όλες τις πειραματικές ομάδες, αντισταθμίζοντας πιθανώς τη σημαντική μείωση της δραστηριότητας της

CAT (96,97). Επιπλέον, τα επίπεδα TAC αυξήθηκαν στις ομάδες control και Glyphosate. Ταυτόχρονα, η αύξηση της συγκέντρωσης της GSH συνέβαλε στη μείωση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στις ομάδες LD, Glyphosate και Roundup, αποτρέποντας έτσι το οξειδωτικό στρες.

Είναι ενδιαφέρον ότι μετά από 9 μήνες έκθεσης, παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη μείωση της δραστηριότητας GR στις ομάδες Glyphosate και Roundup σε σύγκριση με την ομάδα control. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του αίματος επηρεάστηκαν αρνητικά, εκτός από την ομάδα Glyphosate, όπου εντοπίστηκε ένας προσαρμοστικός μηχανισμός. Όσον αφορά την GSH, η συγκέντρωσή της μειώθηκε σε όλες τις ομάδες σε σύγκριση με τους 6 μήνες. Η εξάντληση των δεξαμενών GSH θα μπορούσε να αποδοθεί σε αυξημένα επίπεδα αντιδραστικών ειδών, που οδηγούν στη μετατροπή της GSH στην οξειδωμένη μορφή της (GSSG), ή σε μειωμένη δραστηριότητα του GR, του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση της GSH από την GSSG. Οι μεταβολές στην ενδοκυττάρια ισορροπία GSH/GSSG θεωρούνται κρίσιμες για την οξειδοαναγωγική κατάσταση και η εξάντληση των δεξαμενών GSH μπορεί να συμβάλλει στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες (98).

Ωστόσο, στην περίπτωση της ομάδας Glyphosate, η συγκέντρωση GSH μειώθηκε ως προσαρμοστικός μηχανισμός για την αντιμετώπιση των οξειδωτικών πρωτεϊνικών τροποποιήσεων, όπως αποδεικνύεται από τη μειωμένη συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σύγκριση με την περίοδο των 6 μηνών. Όσον αφορά την έκθεση 12 μηνών, φαίνεται ότι οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του αίματος έχουν ανακάμψει, όπως υποδεικνύεται από την αύξηση της συγκέντρωσης GSH σε όλες τις ομάδες σε σύγκριση με τους 9 μήνες. Η χορήγηση των ουσιών στις ομάδες LD και HD για 3 μήνες διατάραξε την οξειδοαναγωγική ισορροπία του αίματος μειώνοντας τη δραστηριότητα του GR, αν και δεν προκάλεσε άλλες συστηματικές επιδράσεις στα επόμενα χρονικά σημεία. Επιπλέον, η έκθεση στη γλυφοσάτη για 3 μήνες (ομάδα Glyphosate) ενεργοποίησε τις αντιοξειδωτικές προσαρμογές, όπως υποδεικνύεται από την αύξηση της συγκέντρωσης GSH, αλλά οδήγησε σε διαταραχές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας μετά από 9 μήνες, όπως καταδεικνύεται από τη μείωση της δραστηριότητας GR. Τέλος, η έκθεση στο Roundup® (ομάδα Roundup) για 3 και 9 μήνες προκάλεσε διαταραχές της ομοιόστασης οξειδοαναγωγής, όπως έδειξε η μείωση της δραστηριότητας GR.

Η GLY, είτε στην καθαρή της μορφή είτε ως μέρος εμπορικών σκευασμάτων αναμειγμένων με διάφορα βοηθητικά, έχει βρεθεί στο επίκεντρο πρόσφατων ερευνών λόγω των επιβλαβών επιπτώσεών της. Ωστόσο, υπάρχει αξιοσημείωτη έλλειψη μελετών που να διερευνούν τις συστηματικές επιδράσεις της (99). Η έκφραση των βλαβερών αποτελεσμάτων επηρεάζεται τόσο από τη δοσολογία όσο και από τη διάρκεια της έκθεσης. Η βραχυπρόθεσμη έκθεση σε χαμηλές δόσεις GLY μπορεί να ενεργοποιήσει τις αντιοξειδωτικές άμυνες του αίματος για την πρόληψη της οξειδωτικής βλάβης. Για παράδειγμα, η έκθεση αρουραίων Wistar σε GLY σε επίπεδα που θεωρούνται ασφαλή για τον άνθρωπο για 28 συνεχόμενες ημέρες ενεργοποίησε τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του αίματος, προστατεύοντας από την υπεροξείδωση των λιπιδίων (100).

Γενικά, τα εμπορικά σκευάσματα όπως το Roundup®, που περιέχουν GLY, παρουσιάζουν περισσότερες ανεπιθύμητες ενέργειες από ό,τι η μεμονωμένη δραστική ουσία, που αποδίδονται στην αυξημένη τοξικότητα των επιφανειοδραστικών ουσιών (101). Για παράδειγμα, ένα ζιζανιοκτόνο με βάση τη GLY προκάλεσε οξειδωτικό στρες σε αρουραίους λόγω εξάντλησης της GSH, μειωμένης δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων και αυξημένης υπεροξείδωσης των λιπιδίων (102). Συγκριτική μελέτη αποκάλυψε ότι η έκθεση στο Roundup® προκάλεσε οξειδωτικό στρες σε αρουραίους, που αποδεικνύεται από μειωμένα αποθέματα GSH, μειωμένη δραστηριότητα CAT και οξειδωτικές τροποποιήσεις των λιπιδίων. Αντίθετα, η GLY μόνη της προκάλεσε διαταραχές στην ομοιόσταση της οξειδοαναγωγής του αίματος μόνο σε υψηλές δόσεις, όπως φαίνεται από τη μείωση των επιπέδων της GSH και την αύξηση των υποπροϊόντων της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (103).

Ενώ η ακριβής χημική σύνθεση του Roundup® δεν αποκαλύπτεται για ρυθμιστικούς λόγους, αναγνωρίζεται η κύρια μη ιονική επιφανειοδραστική ουσία, η POEA (104). Πολυάριθμες μελέτες έχουν συσχετίσει την POEA, είτε μόνη της είτε σε συνέργεια με τη GLY, με τις επιβλαβείς επιδράσεις των σκευασμάτων με βάση τη GLY (105–109). Λόγω αυτών των ανησυχιών, υπήρξε στροφή προς τη χρήση λιγότερο τοξικών επιφανειοδραστικών ουσιών εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης (101).

Μετά από 12 μήνες έκθεσης, ο μόνος προσβεβλημένος ιστός ήταν το ήπαρ, που διαταράχθηκε στις ομάδες HD και Roundup. Η ευαισθησία του ήπατος σε βλάβες από ξενοβιοτικά είναι κρίσιμη λόγω του κεντρικού του ρόλου στο μεταβολισμό και την αποτοξίνωση (110). Στα

κουνέλια της ομάδας HD προκλήθηκε μείωση της δραστηριότητας της CAT. Είναι γνωστό ότι οι CAT και SOD παίζουν καθοριστικό ρόλο για την εξάλειψη των αντιδραστικών ειδών κατά τον μεταβολισμό των ξеноβιοτικών, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες και υπεροξειδωση των λιπιδίων στο ήπαρ (111). Επομένως, η μείωση της δραστηριότητας της CAT θα μπορούσε να οδηγήσει στη συσσώρευση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που συμβάλλει στη δημιουργία ισχυρών οξειδωτικών, όπως η ρίζα υδροξυλίου (OH<sup>•</sup>), μέσω της αντίδρασης Fenton (112). Με αυτόν τον τρόπο, προωθήθηκε η υπεροξειδωση των λιπιδίων, όπως φαίνεται από την αυξητική τάση των επιπέδων TBARS, προκαλώντας οξειδωτικό στρες στο ήπαρ.

Αν και οι χημικές ουσίες της μελέτης δεν είχαν εξεταστεί προηγουμένως σε μορφή μείγματος, μεμονωμένες τοξικολογικές έρευνες έχουν δείξει την ικανότητά τους να δρουν ως οξειδωτικοί παράγοντες στο ήπαρ, προκαλώντας οξειδοαναγωγική ανισορροπία. Για παράδειγμα, η έκθεση στη GLY έχει συσχετιστεί με ηπατοτοξικότητα, η οποία προκύπτει από την αύξηση των επιπέδων των δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου, ROS και RNS, αντίστοιχα, και από την εξασθένηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών άμυνας, γεγονότα που μπορούν δυνητικά να οδηγήσουν σε οξειδωτικές τροποποιήσεις των λιπιδίων (113–116). Ομοίως, έχει βρεθεί ότι τα PBs προκαλούν διαταραχές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του ήπατος λόγω περιορισμού της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων και εξάντλησης των δεξαμενών GSH, με αποτέλεσμα την υπεροξειδωση των λιπιδίων (117,118). Η ηπατική βλάβη μέσω οξειδωτικού στρες είναι ένα κοινό εύρημα στην περίπτωση έκθεσης σε TCS, που προκαλείται από την προχωρημένη υπεροξειδωση των λιπιδίων και τη συσσώρευση των αντίστοιχων τελικών προϊόντων (119,120). Είναι ενδιαφέρον ότι η χορήγηση BPA σε προηγούμενη μελέτη προκάλεσε οξειδωτικό στρες παρόμοιο με αυτό που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, δηλαδή μειώνοντας τη δραστηριότητα της CAT και αυξάνοντας τα επίπεδα TBARS (121). Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση DEHP μειώνει τα αποθέματα GSH και εξασθενεί τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων της οδού GSH (122), προωθώντας μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις την υπεροξειδωση των λιπιδίων (123).

Αντίθετα με τις υπόλοιπες ομάδες, η χρόνια χορήγηση Roundup<sup>®</sup> ενεργοποίησε μια προσαρμοστική οξειδοαναγωγική απόκριση στο ήπαρ για την άμβλυνση της οξειδωτικής βλάβης, καθώς φαίνεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της GSH προκλήθηκε για να αντισταθμίσει τη μείωση της δραστηριότητας της CAT. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με μια

προηγούμενη μελέτη, όπου η υποθανατηφόρος έκθεση αρουραίων Wistar για 90 ημέρες σε Roundup® μείωσε τη δραστικότητα της CAT και αύξησε τη συγκέντρωση ολικής γλουταθειόνης, τον λόγο GSH/GSSG και τη δραστικότητα GPx, λειτουργώντας ως προστατευτικός μηχανισμός έναντι των δυνητικά επιβλαβών επιδράσεων του ζιζανιοκτόνου (96).

Οι ουσίες που μελετήσαμε έχουν χαρακτηριστεί ως ενδοκρινικοί διαταράκτες και στο πλαίσιο αυτό μετρήσαμε τις συγκεντρώσεις συγκεκριμένων αναπαραγωγικών ορμονών στο αίμα των κουνελιών. Τεστοστερόνη, β-οιστραδιόλη, προγεστερόνη T<sub>4</sub> και T<sub>3</sub> ήταν οι ορμόνες που μετρήθηκαν. Όπως ήταν αναμενόμενο, υπήρξαν διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο φύλων αλλά και μεταξύ χρόνου και δόσης έκθεσης.

Τα αποτελέσματα της τεστοστερόνης έδειξαν μικρές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων, με τα θηλυκά κουνέλια να μην παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις ούτε μεταξύ των ομάδων αλλά και ούτε μεταξύ των διαφορετικών χρόνων έκθεσης. Όσον αφορά στα αρσενικά κουνέλια, οι ομάδες που φαίνεται να επηρεάστηκαν ήταν οι Glyphosate, LD και Roundup, καθώς η συγκέντρωση της τεστοστερόνης αυξήθηκε στους 3 και 6 μήνες έκθεσης και μειώθηκε αισθητά μέχρι το τέλος του in vivo πειράματος (t = 12 μήνες). Προηγούμενα ευρήματα μελετών σε ποντίκια και αρουραίους, έχουν αποδείξει ότι η GLY παρεμποδίζει την παραγωγή τεστοστερόνης μειώνοντας τη συγκέντρωσή της στο αίμα (124,125). Παρόμοια επίδραση έχει παρατηρηθεί και σε σαλιγκάρια τα οποία εκτέθηκαν για 3 εβδομάδες σε GLY (126). Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές ότι ουσίες όπως η BPA αυξάνουν τα επίπεδα τεστοστερόνης στο αίμα (127).

Οι ορμόνες T<sub>3</sub> και T<sub>4</sub> σχετίζονται άμεσα με τη σωστή λειτουργία του θυρεοειδή αδένου, άρα και με την ομοιόσταση του οργανισμού. Στην παρούσα εργασία, και οι δύο αυτές ορμόνες δεν παρουσίασαν διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο φύλων και ακόμη τα επίπεδα T<sub>3</sub> στα θηλυκά κουνέλια φάνηκε να μην επηρεάζονται ιδιαίτερα. Στα αρσενικά κουνέλια, η συγκέντρωση της T<sub>3</sub> παρέμεινε αυξημένη σε όλες τις ομάδες, εκτός από την ομάδα Roundup όπου στους 12 μήνες φαίνεται να μειώθηκε. Τα επίπεδα T<sub>4</sub> παρουσίασαν αύξηση από τους 3 μήνες έκθεσης και στα δύο φύλα και συγκεκριμένα στις ομάδες HD και Roundup.



Τόσο η GLY όσο και οι υπόλοιπες ουσίες που περιείχαν τα μείγματα ουσιών που χορηγήθηκαν στις ομάδες αυτές, έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τις ορμόνες και τη σωστή λειτουργία του θυρεοειδή αδένος. Τα αποτελέσματα ποικίλουν στη βιβλιογραφία ανάλογα με τον οργανισμό που μελετάται, τις δόσεις και τους χρόνους έκθεσης. Σε πειράματα που έγιναν σε αρουραίους, τα επίπεδα T<sub>3</sub> και T<sub>4</sub> μειώθηκαν μετά από έκθεση σε GLY (124), ενώ όταν αρουραίοι εκτέθηκαν σε BPA, τα επίπεδα T<sub>4</sub> διέφεραν ανάλογα με την ηλικία (128). Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα T<sub>4</sub> αυξήθηκαν στους ενήλικους αρουραίους ενώ μειώθηκαν στα νεογέννητα. Σε πειράματα που έγιναν σε θηλυκούς αρουραίους, το DEHP επέφερε δυσμενείς επιπτώσεις στο θυρεοειδή αδένος προκαλώντας μεταβολές στον ιστό, διαταράσσοντας κατά αυτό τον τρόπο και την παραγωγή των ανάλογων ορμονών (129).

Στην παρούσα έρευνα, τα επίπεδα της β-οιστραδιόλης έμειναν σχεδόν ανεπηρέαστα σε όλες τις ομάδες και σε όλη τη διάρκεια του πειράματος ενώ δεν υπήρξε διαφοροποίηση στα αποτελέσματα μεταξύ των δύο φύλων. Ωστόσο, δεδομένα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία αναφέρουν αυξημένη έκφραση β-οιστραδιόλης σε αρουραίους μετά από έκθεση σε GLY (124), ενώ αντίστοιχα πειράματα σε σαλιγκάρια συμπέραναν μείωση της β-οιστραδιόλης στις εκτιθέμενες ομάδες (126). Ακόμη, πειράματα βιοπαρακολούθησης που έγιναν σε διάφορες ηλικίες και κατηγορίες ανθρώπων, έδειξαν αυξημένα επίπεδα β-οιστραδιόλης μετά από έκθεση σε BPA (127). Ο Pollock και οι συνεργάτες τους εξέτασαν την επίδραση των PBs στα επίπεδα β-οιστραδιόλης σε ποντίκια, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι το BuPB μπορεί να μεταβάλλει την έκφραση της β-οιστραδιόλης (130).

Οι συγκεντρώσεις προγεστερόνης παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα για τα θηλυκά κουνέλια ενώ δεν υπήρξαν και σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο φύλων. Ωστόσο, στα αρσενικά κουνέλια σημειώθηκε μείωση των επιπέδων προγεστερόνης στο τέλος του in vivo πειράματος (t = 12 μήνες) στις ομάδες LD, HD και Roundup, ενώ εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι τα επίπεδα της ομάδας Glyphosate αυξήθηκαν. Αυτό το εύρημα είναι σε διαφωνία με προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αρουραίους και στην οποία οι θηλυκοί αρουραίοι εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα προγεστερόνης μετά από έκθεση σε GLY (131).

Γενικά ο μικρός αριθμός ζώων που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα μας δεν μας επιτρέπει να εντοπίσουμε σημαντικές διαφοροποιήσεις. Επίσης, οι δόσεις που χορηγήσαμε, ακόμα και εκείνες που θεωρήσαμε υψηλές, κυμαίνονταν σε αρκετά χαμηλά επίπεδα πολύ πιο χαμηλά από

τα αντίστοιχα NOAEL της κάθε ουσίας, γεγονός το οποίο ίσως να μη βοήθησε στην παρουσία πιο έντονων διαφοροποιήσεων. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη είναι μία μελέτη προσομοίωσης της έκθεσης στην πραγματική ζωή, οπότε προσπαθήσαμε να χορηγήσουμε επίπεδα ουσιών που να αντικατοπτρίζουν την πραγματική έκθεση του ανθρώπου στην καθημερινή ζωή.

Σε κυτταρικό επίπεδο, τα ευρήματα ποικίλαν ανάλογα τον ιστό και τη δόση έκθεσης. Οι πιο επιβαρυνόμενες ομάδες ήταν, όπως αναμενόταν, οι HD, Glyphosate και Roundup. Ωστόσο ακόμα και η ομάδα LD εμφάνισε κυτταροτοξικά στοιχεία καθώς στους νεφρούς παρατηρήθηκε η ύπαρξη φλεγμονής.

Όλοι οι ιστοί της ομάδας HD ήταν επηρεασμένοι εκτός από έναν, την καρδιά. Συγκεκριμένα, καταγράφηκαν στον θυρεοειδή αδένα θηλώδεις και μικροθηλώδεις ομάδες θυλακικών κυττάρων καθώς και καρκινογένεση, ενώ στους νεφρούς άφθονα κυτταρικά στοιχεία και εκμαγεία ουροφόρων σωληνάρων. Παράλληλα, παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων των όρχεων (Leydig, Sertoli, κ.α.) με ήπια εκφύλιση. Τα κύτταρα του ήπατος εμφάνισαν υπερπλασία, ενώ στα κύτταρα των ωοθηκών εκτός από υπερπλασία παρατηρήθηκε και καρκινογένεση.

Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και στην ομάδα Glyphosate. Σε όλα τα είδη ιστών παρουσιάστηκαν άφθονα κύτταρα αλλά και φλεγμονή ενώ δεν σημειώθηκε καρκινογένεση. Αξίζει να αναφερθεί ότι, σε αυτή την περίπτωση, τα κύτταρα της καρδιάς εμφάνισαν αυξημένο αριθμό, ιδιαίτερα τα μεσοθηλιακά κύτταρα του περικαρδίου, καθώς και φλεγμονή. Τέλος, αν και στις ομάδες Glyphosate και Roundup χορηγήθηκε η ίδια δραστική ουσία στην ίδια δοσολογία, φαίνεται ότι τα πρόσθετα που περιέχει το Roundup<sup>®</sup> επηρεάζουν ακόμα πιο πολύ την κυτταρική εικόνα. Συγκεκριμένα, οι νεφροί, οι όρχεις και ο θυρεοειδής αδένας ήταν οι πιο επιβαρυνόμενοι ιστοί σημειώνοντας άφθονα εκμαγεία και έντονη ρυπαρότητα στα δύο πρώτα ενώ παράλληλα κολλοειδές, άφθονα θυλακικά κύτταρα και διαταραχή της αρχιτεκτονικής των θυλακίων παρατηρήθηκαν στον θυρεοειδή αδένα. Ωστόσο, σημειώθηκε μειωμένος αριθμός κυττάρων στην καρδιά και το ήπαρ.

Δυστυχώς υπάρχουν ελάχιστα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία εξετάζουν κυτταρολογικά την τοξικότητα των ουσιών που μας ενδιαφέρουν. Ωστόσο τα αποτελέσματα μας φαίνεται να συμφωνούν με τα ήδη υπάρχοντα. Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε αρουραίους

χορηγήθηκαν μείγματα ουσιών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις συμπεριλαμβανομένων των GLY, PBs και BPA (69). Η εξέταση των δειγμάτων ιστού με την τεχνική touch preparation αποκάλυψε μια δόσοεξαρτώμενη απόκριση, υποδεικνύοντας συσχέτιση μεταξύ υψηλότερων δόσεων και σοβαρότερου εκφυλισμού των κυττάρων. Όπως και στη δική μας μελέτη, δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές στον ιστό της καρδιάς σε σύγκριση με τον ιστό ελέγχου. Στους όρχεις, υπήρξε σημαντική μείωση του κυτταρικού πληθυσμού, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή ανδρική στειρότητα και ανισορροπίες στα επίπεδα τεστοστερόνης. Το ήπαρ εμφάνισε αυξημένη κυτταρική βλάβη και διαστολή των φλεβοκομβικών κόλπων, ενδεικτικά πρώιμων σταδίων κίρρωσης και απόφραξης των χοληφόρων. Οι νεφροί, ανάλογα με τη δοσολογία, παρουσίασαν καταστάσεις που κυμαίνονταν από σπειραματονεφρίτιδα έως εκτεταμένη νεφρική βλάβη και πιθανή νεφρική ανεπάρκεια (69).

Συνοπτικά, στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιδιώξαμε να αξιολογήσουμε τις επιδράσεις ενός χημικού μείγματος αποτελούμενου από Ε.Δ., του ζιζανιοκτόνου Roundup® και του δραστικού συστατικού του GLY, στον οργανισμό κουνελιών, μετά από 12 μήνες καθημερινής έκθεσης. Η 12μηνη έκθεση των ζώων στο μείγμα Ε.Δ. ενεργοποίησε χρήσιμες οξειδοαναγωγικές προσαρμογές. Αντίθετα, η GLY και το Roundup® προκάλεσαν δυσλειτουργία της ομοιόστασης της οξειδοαναγωγής. Όσον αφορά τους εξεταζόμενους ιστούς, η 12μηνη έκθεση των ζώων στο μείγμα Ε.Δ. ήταν επιζήμια για το ήπαρ, του οποίου η οξειδοαναγωγική ισορροπία επηρεάστηκε αρνητικά, με αποτέλεσμα το οξειδωτικό στρες. Το Roundup® λειτούργησε επίσης ως οξειδωτικός παράγοντας στο ήπαρ, ενώ η GLY δεν άσκησε δυσμενείς επιδράσεις. Τα αποτελέσματα από τις διάφορες δειγματοληψίες έδειξαν ότι ο σχηματισμός MN αυξήθηκε με δόσο – και χρόνο – εξαρτώμενο τρόπο. Παράλληλα η ένταση της ουράς παρουσίασε δόσο – εξάρτηση, ενώ η πιο επηρεασμένη ομάδα ήταν η HD. Τα κυτταρολογικά ευρήματα έδειξαν εκτεταμένες βλάβες όπως φλεγμονή, ρυπαρότητα και καρκινογένεση στους ιστούς των ομάδων HD, Glyphosate και Roundup, ενώ η καρδιά παρέμεινε σχεδόν ανεπηρέαστη. Ωστόσο τα αποτελέσματα των ορμονών δεν ακολούθησαν κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο παρουσιάζοντας μικρές διαφορές ανά ομάδα και χρόνο έκθεσης, ενώ μόνο για την προγεστερόνη και την τεστοστερόνη υπήρξε διαφοροποίηση μεταξύ θηλυκών και αρσενικών κουνελιών, με τα τελευταία να κατέχουν τα μεγαλύτερα επίπεδα.

Η μελέτη αυτή είναι μία από τις λίγες που προσπάθησαν να προσδιορίσουν τους κινδύνους που εγκυμονεί για την ανθρωπότητα η έκθεση σε χαμηλά και υψηλά επίπεδα δόσεων μειγμάτων Ε.Δ. Υπάρχει μεγάλος δρόμος για την επιστήμη προκειμένου να διερευνήσει διεξοδικά τους κινδύνους της πραγματικής ζωής.

## 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. Kolatorova L, Duskova M, Vitku J, Starka L. Prenatal Exposure to Bisphenols and Parabens and Impacts on Human Physiology. *Physiol Res*. 30 Σεπτέμβριος 2017;S305–15.
2. Hewitt S. Endocrine-Disrupting Chemicals: From Basic Research to Clinical Practice. *Environ Health Perspect*. Απρίλιος 2008;116(4):A178.
3. Daughter DES. Diethylstilbestrol DES. 2019 [παρατίθεται 4 Απρίλιος 2023]. Endocrine disruption of oestrogen action and female reproductive tract cancers. Διαθέσιμο στο: <https://diethylstilbestrol.co.uk/endocrine-disruption-oestrogen-action/>
4. Jørs E, Neupane D, London L. Pesticide Poisonings in Low- and Middle-Income Countries. *Environ Health Insights*. 1 Ιανουάριος 2018;12:117863021775087.
5. Barrón Cuenca J, de Oliveira Galvão MF, Ünlü Endirlik B, Tirado N, Dreij K. In vitro cytotoxicity and genotoxicity of single and combined pesticides used by Bolivian farmers. *Environ Mol Mutagen*. Ιανουάριος 2022;63(1):4–17.
6. Alvarado-Hernandez DL, Montero-Montoya R, Serrano-García L, Arellano-Aguilar O, Jasso-Pineda Y, Yáñez-Estrada L. Assessment of exposure to organochlorine pesticides and levels of DNA damage in mother-infant pairs of an agrarian community. *Environ Mol Mutagen*. Μάρτιος 2013;54(2):99–111.
7. Ruiz-Guzmán JA, Gómez-Corrales P, Cruz-Esquivel Á, Marrugo-Negrete JL. Cytogenetic damage in peripheral blood lymphocytes of children exposed to pesticides in agricultural areas of the department of Cordoba, Colombia. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. Δεκέμβριος 2017;824:25–31.
8. Ghisi N de C, Oliveira EC de, Prioli AJ. Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. *Chemosphere*. Φεβρουάριος 2016;145:42–54.
9. Faus I, Zabalza A, Santiago J, Nebauer SG, Royuela M, Serrano R, κ.ά. Protein kinase GCN2 mediates responses to glyphosate in Arabidopsis. *BMC Plant Biol*. Δεκέμβριος 2015;15(1):14.
10. Zabaloy MC, Allegrini M, Hernandez Guijarro K, Behrends Kraemer F, Morrás H, Erijman L. Microbiomes and glyphosate biodegradation in edaphic and aquatic environments: recent issues and trends. *World J Microbiol Biotechnol*. Ιούνιος 2022;38(6):98.
11. Vera-Candioti J, Soloneski S, Larramendy ML. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Ecotoxicol Environ Saf*. Μάρτιος 2013;89:166–73.
12. Van Bruggen AHC, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, κ.ά. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci Total Environ*. Μάρτιος 2018;616–617:255–68.
13. Martins-Gomes C, Silva TL, Andreani T, Silva AM. Glyphosate vs. Glyphosate-Based Herbicides Exposure: A Review on Their Toxicity. *J Xenobiotics*. 17 Ιανουάριος 2022;12(1):21–40.

14. Vandenberg LN, Blumberg B, Antoniou MN, Benbrook CM, Carroll L, Colborn T, κ.ά. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? *J Epidemiol Community Health*. Ιούνιος 2017;71(6):613–8.
15. Dodge LE, Kelley KE, Williams PL, Williams MA, Hernández-Díaz S, Missmer SA, κ.ά. Medications as a source of paraben exposure. *Reprod Toxicol*. Απρίλιος 2015;52:93–100.
16. Wei F, Mortimer M, Cheng H, Sang N, Guo LH. Parabens as chemicals of emerging concern in the environment and humans: A review. *Sci Total Environ*. Ιούλιος 2021;778:146150.
17. Petric Z, Ružić J, Žuntar I. The controversies of parabens – an overview nowadays. *Acta Pharm*. 1 Μάρτιος 2021;71(1):17–32.
18. Nowak K, Ratajczak–Wrona W, Górská M, Jabłońska E. Parabens and their effects on the endocrine system. *Mol Cell Endocrinol*. Οκτώβριος 2018;474:238–51.
19. Bolujoko NB, Unuabonah EI, Alfred MO, Ogunlaja A, Ogunlaja OO, Omorogie MO, κ.ά. Toxicity and removal of parabens from water: A critical review. *Sci Total Environ*. Οκτώβριος 2021;792:148092.
20. Weatherly LM, Gosse JA. Triclosan exposure, transformation, and human health effects. *J Toxicol Environ Health Part B*. 17 Νοέμβριος 2017;20(8):447–69.
21. Sinicropi MS, Iacopetta D, Ceramella J, Catalano A, Mariconda A, Pellegrino M, κ.ά. Triclosan: A Small Molecule with Controversial Roles. *Antibiotics*. 30 Μάιος 2022;11(6):735.
22. Hemalatha D, Nataraj B, Rangasamy B, Shobana C, Ramesh M. DNA damage and physiological responses in an Indian major carp *Labeo rohita* exposed to an antimicrobial agent triclosan. *Fish Physiol Biochem*. Αύγουστος 2019;45(4):1463–84.
23. Bedoux G, Roig B, Thomas O, Dupont V, Le Bot B. Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environ Sci Pollut Res*. Μάιος 2012;19(4):1044–65.
24. Manzoor MF, Tariq T, Fatima B, Sahar A, Tariq F, Munir S, κ.ά. An insight into bisphenol A, food exposure and its adverse effects on health: A review. *Front Nutr*. 3 Νοέμβριος 2022;9:1047827.
25. Michałowicz J. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol*. Μάρτιος 2014;37(2):738–58.
26. Tzatzarakis MN, Karzi V, Vakonaki E, Goumenou M, Kavvalakis M, Stivaktakis P, κ.ά. Bisphenol A in soft drinks and canned foods and data evaluation. *Food Addit Contam Part B*. 3 Απρίλιος 2017;10(2):85–90.
27. Howard GJ. Chemical alternatives assessment: The case of flame retardants. *Chemosphere*. Δεκέμβριος 2014;116:112–7.
28. Eladak S, Grisin T, Moison D, Guerquin MJ, N’Tumba-Byn T, Pozzi-Gaudin S, κ.ά. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil Steril*. Ιανουάριος 2015;103(1):11–21.
29. Rochester JR, Bolden AL. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ Health Perspect*. 2015;123(7).

30. Zhang YJ, Guo JL, Xue J chuan, Bai CL, Guo Y. Phthalate metabolites: Characterization, toxicities, global distribution, and exposure assessment. *Environ Pollut.* Δεκέμβριος 2021;291:118106.
31. Wang Y, Zhu H, Kannan K. A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. *Toxics.* 5 Απρίλιος 2019;7(2):21.
32. Rowdhwal SSS, Chen J. Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate: An Overview. *BioMed Res Int.* 2018;2018:1–10.
33. Kwan WS, Roy VAL, Yu KN. Review on Toxic Effects of Di(2-ethylhexyl) Phthalate on Zebrafish Embryos. *Toxics.* 21 Αύγουστος 2021;9(8):193.
34. Erythropel HC, Maric M, Nicell JA, Leask RL, Yargeau V. Leaching of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) from plastic containers and the question of human exposure. *Appl Microbiol Biotechnol.* Δεκέμβριος 2014;98(24):9967–81.
35. Bilal M, Iqbal HMN. An insight into toxicity and human-health-related adverse consequences of cosmeceuticals — A review. *Sci Total Environ.* Ιούνιος 2019;670:555–68.
36. Pearce A, Richards R, Milz S, Schneider E, Pearce S. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *Eur Cell Mater.* 2 Μάρτιος 2007;13:1–10.
37. Sengupta P, Dutta S. Mapping the Age of Laboratory Rabbit Strains to Human. *Int J Prev Med.* 2020;11:194.
38. Mapara M, Thomas B, Bhat K. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J.* 2012;9(1):111.
39. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposesText with EEA relevance.
40. Percie Du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, κ.ά. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Boutron I, επιμελητής. PLOS Biol.* 14 Ιούλιος 2020;18(7):e3000410.
41. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res.* Ιανουάριος 1993;285(1):35–44.
42. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 2003;
43. Olive PL, Banáth JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc.* Ιούνιος 2006;1(1):23–9.
44. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1 Μάρτιος 1988;175(1):184–91.
45. Collins AR. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Mol Biotechnol.* 2004;26(3):249–61.

46. Jiang N, Naz S, Ma Y, Ullah Q, Khan MZ, Wang J, κ.ά. An Overview of Comet Assay Application for Detecting DNA Damage in Aquatic Animals. *Agriculture*. 5 Μάρτιος 2023;13(3):623.
47. Halliwell B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. Στο: John Wiley & Sons, Ltd, επιμελητής. *eLS [Διαδίκτυο]*. 1η έκδ. Wiley; 2015 [παρατίθεται 25 Φεβρουάριος 2023]. σ. 1–9. Διαθέσιμο στο: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0002269.pub3>
48. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *FREE Radic Antioxid*. 2008;4(2).
49. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, κ.ά. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1–13.
50. Kaminsky VO, Zhivotovsky B. Free Radicals in Cross Talk Between Autophagy and Apoptosis. *Antioxid Redox Signal*. Ιούλιος 2014;21(1):86–102.
51. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen: boon yet bane—introducing oxygen toxicity and reactive species. Στο: Halliwell B, Gutteridge JMC, επιμελητές. *Free Radicals in Biology and Medicine [Διαδίκτυο]*. Oxford University Press; 2015 [παρατίθεται 25 Φεβρουάριος 2023]. σ. 0. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.003.0001>
52. Jones DP. Redefining Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. Σεπτέμβριος 2006;8(9–10):1865–79.
53. Davies KJA. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. Rice-Evans C, Halliwell B, Lunt GG, επιμελητές. *Biochem Soc Symp*. 1 Νοέμβριος 1995;61:1–31.
54. Yn R, Murthy S, Dr K, Prabhakar M. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. Στο 2004 [παρατίθεται 25 Φεβρουάριος 2023]. Διαθέσιμο στο: <https://www.semanticscholar.org/paper/Role-of-free-radicals-and-antioxidants-in-patients-Yn-Murthy/e6d3e073291797e45c977b0ee430b47ff34018fe>
55. Veskoukis AS, Kyparos A, Paschalis V, Nikolaidis MG. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood. *Biomarkers*. 2 Απρίλιος 2016;21(3):208–17.
56. Aebi H. [13] Catalase in vitro. Στο: *Methods in Enzymology [Διαδίκτυο]*. Academic Press; 1984 [παρατίθεται 25 Φεβρουάριος 2023]. σ. 121–6. (*Oxygen Radicals in Biological Systems*; τ. 105). Διαθέσιμο στο: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687984050163>
57. Oberley LW, Spitz DR. [61] Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. Στο: *Methods in Enzymology [Διαδίκτυο]*. Elsevier; 1984 [παρατίθεται 25 Φεβρουάριος 2023]. σ. 457–64. Διαθέσιμο στο: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050643>
58. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984;105:114–21.
59. Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem*. Δεκέμβριος 1988;175(2):408–13.
60. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest*. Ιανουάριος 2002;62(3):231–6.



61. Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akçay F. Effect of Corticosteroid Therapy on Serum and CSF Malondialdehyde and Antioxidant Proteins in Multiple Sclerosis. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol*. Μάιος 2001;28(2):141–3.
62. Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett*. Μάρτιος 2004;357(2):83–6.
63. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.
64. Tsitsimpikou C, Vasilaki F, Tsarouhas K, Fragkiadaki P, Tzardi M, Goutzourelas N, κ.ά. Nephrotoxicity in rabbits after long-term nandrolone decanoate administration. *Toxicol Lett*. Σεπτέμβριος 2016;259:21–7.
65. Kalyvianaki K, Malamos P, Mastrodimou N, Manoura-Zonou I, Vamvoukaki R, Notas G, κ.ά. Toxicity evaluation of an essential oil mixture from the Cretan herbs thyme, Greek sage and Cretan dittany. *Npj Sci Food*. 9 Νοέμβριος 2020;4(1):20.
66. BATRA S. Paramedics World. 2018 [παρατίθεται 2 Απρίλιος 2023]. Hematoxylin and Eosin Staining Protocol - Principle, Procedure, Results | Histopathology Practicals. Διαθέσιμο στο: <https://paramedicsworld.com/histopathology-practicals/hematoxylin-eosin-staining-protocol-principle-procedure-results/medical-paramedical-studynotes>
67. Al-Abbadi MA. Basics of cytology. *Avicenna J Med*. Ιούλιος 2011;01(01):18–28.
68. Diamantis A, Beloukas AI, Kalogeraki AM, Magiorkinis E. A brief chronicle of cytology: From Janssen to Papanicolaou and beyond. *Diagn Cytopathol*. 2013;41(6):555–64.
69. Tsatsakis A, Docea AO, Constantin C, Calina D, Zlatian O, Nikolouzakis TK, κ.ά. Genotoxic, cytotoxic, and cytopathological effects in rats exposed for 18 months to a mixture of 13 chemicals in doses below NOAEL levels. *Toxicol Lett*. Νοέμβριος 2019;316:154–70.
70. Tanapatchaiyapong P. A Modification of the Lymph Node Imprint Technic.
71. Koller VJ, Fürhacker M, Nersesyan A, Mišík M, Eisenbauer M, Knasmueller S. Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Arch Toxicol*. 1 Μάιος 2012;86(5):805–13.
72. Lopes A, Benvindo-Souza M, Carvalho WF, Nunes HF, de Lima PN, Costa MS, κ.ά. Evaluation of the genotoxic, mutagenic, and histopathological hepatic effects of polyoxyethylene amine (POEA) and glyphosate on *Dendropsophus minutus* tadpoles. *Environ Pollut*. Νοέμβριος 2021;289:117911.
73. Duarte N de AA, Lima LE de, Maraslis FT, Kundi M, Nunes EA, Barcelos GRM. Acute Toxicity and DNA Instability Induced by Exposure to Low Doses of Triclosan and Phthalate DEHP, and Their Combinations, in vitro. *Front Genet*. 20 Απρίλιος 2021;12:649845.
74. Yu H, Liu Y. Impact of Extended and Combined Exposure of Bisphenol Compounds on Their Chromosome-Damaging Effect—Increased Potency and Shifted Mode of Action. *Environ Sci Technol*. 10 Ιανουάριος 2023;57(1):498–508.

75. Mesnage R, Ferguson S, Brandsma I, Moelijker N, Zhang G, Mazzacuva F, κ.ά. The surfactant co-formulant POEA in the glyphosate-based herbicide RangerPro but not glyphosate alone causes necrosis in Caco-2 and HepG2 human cell lines and ER stress in the ToxTracker assay. *Food Chem Toxicol.* 1 Οκτώβριος 2022;168:113380.
76. Navarro CDC, Martinez CBR. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol.* Σεπτέμβριος 2014;165:83–90.
77. Ayanda OI, Tolulope A, Oniye SJ. Mutagenicity and genotoxicity in juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* exposed to formulations of glyphosate and paraquat. *Sci Prog.* Απρίλιος 2021;104(2):003685042110217.
78. Wang F, Xu R, Zheng F, Liu H. Effects of triclosan on acute toxicity, genetic toxicity and oxidative stress in goldfish (*Carassius auratus*). *Exp Anim.* 2018;67(2):219–27.
79. Güzel Bayülken D, Ayaz Tüylü B, Sinan H, Sivas H. Investigation of genotoxic effects of paraben in cultured human lymphocytes. *Drug Chem Toxicol.* 4 Ιούλιος 2019;42(4):349–56.
80. Oláh M, Farkas E, Székács I, Horvath R, Székács A. Cytotoxic effects of Roundup Classic and its components on NE-4C and MC3T3-E1 cell lines determined by biochemical and flow cytometric assays. *Toxicol Rep.* 2022;9:914–26.
81. Tsatsakis A, Tyshko NV, Docea AO, Shestakova SI, Sidorova YS, Petrov NA, κ.ά. The effect of chronic vitamin deficiency and long term very low dose exposure to 6 pesticides mixture on neurological outcomes – A real-life risk simulation approach. *Toxicol Lett.* 15 Οκτώβριος 2019;315:96–106.
82. Al-Saleh I, Al-Rajudi T, Al-Qudaihi G, Manogaran P. Evaluating the potential genotoxicity of phthalates esters (PAEs) in perfumes using in vitro assays. *Environ Sci Pollut Res Int.* Οκτώβριος 2017;24(30):23903–14.
83. Martínez-Paz P, Morales M, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* Δεκέμβριος 2013;758(1–2):41–7.
84. Gyimah E, Dong X, Qiu W, Zhang Z, Xu H. Sublethal concentrations of triclosan elicited oxidative stress, DNA damage, and histological alterations in the liver and brain of adult zebrafish. *Environ Sci Pollut Res.* 1 Μάιος 2020;27(14):17329–38.
85. Ciniglia C, Cascone C, Giudice RL, Pinto G, Pollio A. Application of methods for assessing the geno- and cytotoxicity of Triclosan to *C. ehrenbergii*. *J Hazard Mater.* Ιούλιος 2005;122(3):227–32.
86. Durovcova I, Spackova J, Puskar M, Galova E, Sevcovicova A. Bisphenol A as an environmental pollutant with dual genotoxic and DNA-protective effects. *Neuro Endocrinol Lett.* Οκτώβριος 2018;39(4):294–8.
87. Song P, Gao J, Li X, Zhang C, Zhu L, Wang J, κ.ά. Phthalate induced oxidative stress and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*). *Environ Int.* Αύγουστος 2019;129:10–7.
88. Afzal G, Ahmad HI, Hussain R, Jamal A, Kiran S, Hussain T, κ.ά. Bisphenol A Induces Histopathological, Hematobiochemical Alterations, Oxidative Stress, and Genotoxicity in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Oxid Med Cell Longev.* 28 Ιανουάριος 2022;2022:5450421.

89. Zheng Y, Zhou K, Tang J, Liu C, Bai J. Impacts of di-(2-ethylhexyl) phthalate on *Folsomia candida* (Collembola) assessed with a multi-biomarker approach. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1 Μάρτιος 2022;232:113251.
90. Kim S, Park GY, Yoo YJ, Jeong JS, Nam KT, Jee SH, κ.ά. Di-2-ethylhexylphthalate promotes thyroid cell proliferation and DNA damage through activating thyrotropin-receptor-mediated pathways in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol.* Φεβρουάριος 2019;124:265–72.
91. Vardavas AI, Stivaktakis PD, Tzatzarakis MN, Fragkiadaki P, Vasilaki F, Tzardi M, κ.ά. Long-term exposure to cypermethrin and piperonyl butoxide cause liver and kidney inflammation and induce genotoxicity in New Zealand white male rabbits. *Food Chem Toxicol.* Αύγουστος 2016;94:250–9.
92. Stivaktakis PD, Kavvalakis MP, Tzatzarakis MN, Alegakis AK, Panagiotakis MN, Fragkiadaki P, κ.ά. Long-term exposure of rabbits to imidacloprid as quantified in blood induces genotoxic effect. *Chemosphere.* Απρίλιος 2016;149:108–13.
93. Fountoucidou P, Veskoukis AS, Kerasioti E, Docea AO, Taitzoglou IA, Liesivuori J, κ.ά. A mixture of routinely encountered xenobiotics induces both redox adaptations and perturbations in blood and tissues of rats after a long-term low-dose exposure regimen: The time and dose issue. *Toxicol Lett.* 15 Δεκέμβριος 2019;317:24–44.
94. Docea AO, Gofita E, Goumenou M, Calina D, Rogoveanu O, Varut M, κ.ά. 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.* 1 Μάιος 2018;115:470–81.
95. Docea AO, Goumenou M, Calina D, Arsene AL, Dragoi CM, Gofita E, κ.ά. Adverse and hormetic effects in rats exposed for 12 months to low dose mixture of 13 chemicals: RLRS part III. *Toxicol Lett.* Αύγουστος 2019;310:70–91.
96. Larsen K, Najle R, Lifschitz A, Maté ML, Lanusse C, Virkel GL. Effects of Sublethal Exposure to a Glyphosate-Based Herbicide Formulation on Metabolic Activities of Different Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Rats. *Int J Toxicol.* Ιούλιος 2014;33(4):307–18.
97. Abarikwu SO, Akiri OF, Durojaiye MA, Adenike A. Combined effects of repeated administration of Bretmont Wipeout (glyphosate) and Ultrazin (atrazine) on testosterone, oxidative stress and sperm quality of Wistar rats. *Toxicol Mech Methods.* 2 Ιανουάριος 2015;25(1):70–80.
98. Franco R, Cidlowski JA. Glutathione Efflux and Cell Death. *Antioxid Redox Signal.* 15 Δεκέμβριος 2012;17(12):1694–713.
99. Mesnage R, Defarge N, Spiroux De Vendômois J, Séralini GE. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem Toxicol.* Οκτώβριος 2015;84:133–53.
100. Milić M, Žunec S, Micek V, Kašuba V, Mikolić A, Lovaković BT, κ.ά. Oxidative stress, cholinesterase activity, and DNA damage in the liver, whole blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to glyphosate. *Arch Ind Hyg Toxicol.* 1 Ιούνιος 2018;69(2):154–68.
101. Mesnage R, Benbrook C, Antoniou MN. Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. *Food Chem Toxicol.* Ιούνιος 2019;128:137–45.

102. Turkmen R, Birdane YO, Demirel HH, Yavuz H, Kabu M, Ince S. Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosate-based herbicide-induced oxidative stress in rats. *Environ Sci Pollut Res*. Απρίλιος 2019;26(11):11427–37.
103. Owagboriaye F, Dedeke G, Ademolu K, Olujimi O, Aladesida A, Adeleke M. Comparative studies on endogenic stress hormones, antioxidant, biochemical and hematological status of metabolic disturbance in albino rat exposed to roundup herbicide and its active ingredient glyphosate. *Environ Sci Pollut Res*. Μάιος 2019;26(14):14502–12.
104. Martens MA, Bleeke MS, Leopold VA, Farmer DR. Toxicology and human health risk assessment of polyethoxylated tallow amine surfactant used in glyphosate formulations. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1 Οκτώβριος 2019;107:104347.
105. Chłopecka M, Mendel M, Dziekan N, Karlik W. The effect of glyphosate-based herbicide Roundup and its co-formulant, POEA, on the motoric activity of rat intestine – In vitro study. *Environ Toxicol Pharmacol*. 1 Ιανουάριος 2017;49:156–62.
106. Defarge N, Spiroux de Vendômois J, Séralini GE. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. *Toxicol Rep*. 1 Ιανουάριος 2018;5:156–63.
107. Bednářová A, Kropf M, Krishnan N. The surfactant polyethoxylated tallowamine (POEA) reduces lifespan and inhibits fecundity in *Drosophila melanogaster*- In vivo and in vitro study. *Ecotoxicol Environ Saf*. 30 Ιανουάριος 2020;188:109883.
108. Székács I, Fejes Á, Klátyik S, Takács E, Patkó D, Pomóthy J, κ.ά. Environmental and Toxicological Impacts of Glyphosate with Its Formulating Adjuvant. 2014;8(3).
109. de Brito Rodrigues L, Gonçalves Costa G, Lundgren Thá E, da Silva LR, de Oliveira R, Morais Leme D, κ.ά. Impact of the glyphosate-based commercial herbicide, its components and its metabolite AMPA on non-target aquatic organisms. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 1 Ιούνιος 2019;842:94–101.
110. Bischoff K, Mukai M, Ramaiah SK. Chapter 15 - Liver Toxicity. Στο: Gupta RC, επιμελητής. *Veterinary Toxicology (Third Edition)* [Διαδίκτυο]. Academic Press; 2018 [παρατίθεται 13 Ιανουάριος 2024]. σ. 239–57. Διαθέσιμο στο: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128114100000155>
111. Abhijith BD, Ramesh M, Poopal RK. Responses of metabolic and antioxidant enzymatic activities in gill, liver and plasma of *Catla catla* during methyl parathion exposure. *J Basic Appl Zool*. 1 Οκτώβριος 2016;77:31–40.
112. Pignatello JJ, Oliveros E, MacKay A. Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 1 Ιανουάριος 2006;36(1):1–84.
113. Astiz M, de Alaniz MJT, Marra CA. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. *Environ Toxicol Pharmacol*. 1 Νοέμβριος 2009;28(3):465–73.
114. El-Shenawy NS. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environ Toxicol Pharmacol*. 1 Νοέμβριος 2009;28(3):379–85.
115. Çavuşoğlu K, Yapar K, Oruç E, Yalçın E. Protective Effect of *Ginkgo biloba* L. Leaf Extract Against Glyphosate Toxicity in Swiss Albino Mice. *J Med Food*. Οκτώβριος 2011;14(10):1263–72.

116. Tang J, Hu P, Li Y, Win-Shwe TT, Li C. Ion Imbalance Is Involved in the Mechanisms of Liver Oxidative Damage in Rats Exposed to Glyphosate. *Front Physiol* [Διαδίκτυο]. 2017 [παρατίθεται 13 Ιανουάριος 2024];8. Διαθέσιμο στο: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.01083>
117. Salem AM, Said MM, Badawi MM, Rabo MM. Subchronic toxicity of propyl paraben in adult male rats. *Egypt J Biochem Mol Biol*. 29 Ιούλιος 2013;31(1):1–20.
118. Adegoke AO, Njoku R, Bamigbowu OE, Idung UI. Effect of Quercetin on Liver Oxidative Stress Parameters Induced by Butylparaben in Male Wistar Rats. *Int J Med Health Sci Res*. Subtitle 2021;8(1):1–7.
119. Ena L, Lim JS, Son JY, Park YJ, Lee YH, Kim JY, κ.ά. Evaluation of subchronic exposure to triclosan on hepatorenal and reproductive toxicities in prepubertal male rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2018;81(11):421–31.
120. Zhang P, Zheng L, Duan Y, Gao Y, Gao H, Mao D, κ.ά. Gut microbiota exaggerates triclosan-induced liver injury via gut-liver axis. *J Hazard Mater*. 5 Ιανουάριος 2022;421:126707.
121. Bindhumol V, Chitra KC, Mathur PP. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology*. 30 Ιούνιος 2003;188(2):117–24.
122. Erkekoglu P, Zeybek ND, Giray BK, Rachidi W, Kızılgün M, Hininger-Favier I, κ.ά. The effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on rat liver in relation to selenium status. *Int J Exp Pathol*. Φεβρουάριος 2014;95(1):64–77.
123. Zhao ZB, Ji K, Shen XY, Zhang WW, Wang R, Xu WP, κ.ά. Di(2-ethylhexyl) phthalate promotes hepatic fibrosis by regulation of oxidative stress and inflammation responses in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. Δεκέμβριος 2019;68:109–19.
124. Maddalon A, Galbiati V, Colosio C, Mandić-Rajčević S, Corsini E. Glyphosate-based herbicides: Evidence of immune-endocrine alteration. *Toxicology*. Ιούλιος 2021;459:152851.
125. Mohammadi K, Sani MA, Safaei P, Rahmani J, Molaee-Aghaee E, Jafari SM. A systematic review and meta-analysis of the impacts of glyphosate on the reproductive hormones. *Environ Sci Pollut Res*. Σεπτέμβριος 2022;29(41):62030–41.
126. Omran NE, Salama WM. The endocrine disruptor effect of the herbicides atrazine and glyphosate on *Biomphalaria alexandrina* snails. *Toxicol Ind Health*. Απρίλιος 2016;32(4):656–65.
127. Rochester JR. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reprod Toxicol*. 1 Δεκέμβριος 2013;42:132–55.
128. Kim MJ, Park YJ. Bisphenols and Thyroid Hormone. *Endocrinol Metab*. 23 Δεκέμβριος 2019;34(4):340–8.
129. Jebara A, Beltifa A, Di Bella G, Mabrouk L, Ben Mansour H. Endocrine-disruptor endpoints in the ovary and thyroid of adult female rats exposed to realistic doses of di-(2-ethylhexyl) phthalate. *J Water Health*. 27 Ιούλιος 2022;20(8):1256–67.

130. Pollock T, Weaver RE, Ghasemi R, deCatanzaro D. Butyl paraben and propyl paraben modulate bisphenol A and estradiol concentrations in female and male mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15 Ιούνιος 2017;325:18–24.
131. Lorenz V, Pacini G, Luque EH, Varayoud J, Milesi MM. Perinatal exposure to glyphosate or a glyphosate-based formulation disrupts hormonal and uterine milieu during the receptive state in rats. *Food Chem Toxicol.* 1 Σεπτέμβριος 2020;143:111560.
132. Dutta S, Sengupta P. Rabbits and men: relating their ages. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1 Σεπτέμβριος 2018;29(5):427–35.
133. Esteves PJ, Abrantes J, Baldauf HM, BenMohamed L, Chen Y, Christensen N, κ.ά. The wide utility of rabbits as models of human diseases. *Exp Mol Med.* 22 Δεκέμβριος 2018;50(5):1–10.



Study Protocol

## In Vivo Estimation of the Biological Effects of Endocrine Disruptors in Rabbits after Combined and Long-Term Exposure: Study Protocol

Vasiliki Karzi <sup>1</sup>, Manolis N. Tzatzarakis <sup>1</sup>, Athanasios Alegakis <sup>1</sup> , Elena Vakonaki <sup>1</sup>, Irene Fragkiadoulaki <sup>1</sup> , Konstantinos Kaloudis <sup>1</sup>, Christina Chalkiadaki <sup>1</sup>, Paraskevi Apalaki <sup>1</sup>, Maria Panagiotopoulou <sup>1</sup>, Aikaterini Kalliantasi <sup>1</sup>, Demetrios Kouretas <sup>2</sup> , Anca Oana Docea <sup>3,\*</sup> , Daniela Calina <sup>4,\*</sup> and Aristidis Tsatsakis <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Center of Toxicology, Medicine School, University of Crete, 70013 Heraklion, Greece; chemstud.vas2010@gmail.com (V.K.); tzatzarakis@uoc.gr (M.N.T.); alegkaka@uoc.gr (A.A.); evakonaki@gmail.com (E.V.); eirinimbj@hotmail.gr (I.E.); kaloudis@uoc.gr (K.K.); christina4495@hotmail.com (C.C.); bio2278apalaki@gmail.com (P.A.); mpanagiotopoulou22@gmail.com (M.P.); kalliantash\_k@hotmail.com (A.K.)
- <sup>2</sup> Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Volos, Mezourlo, 41500 Larissa, Greece; dkouret@uth.gr
- <sup>3</sup> Department of Clinical Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy of Craiova, 200349 Craiova, Romania
- <sup>4</sup> Department of Toxicology, University of Medicine and Pharmacy of Craiova, 200349 Craiova, Romania
- \* Correspondence: ancadocea@gmail.com (A.O.D.); calinadaniela@gmail.com (D.C.); tsatsaka@uoc.gr (A.T.)



**Citation:** Karzi, V.; Tzatzarakis, M.N.; Alegakis, A.; Vakonaki, E.; Fragkiadoulaki, I.; Kaloudis, K.; Chalkiadaki, C.; Apalaki, P.; Panagiotopoulou, M.; Kalliantasi, A.; et al. In Vivo Estimation of the Biological Effects of Endocrine Disruptors in Rabbits after Combined and Long-Term Exposure: Study Protocol. *Toxics* 2022, 10, 246. <https://doi.org/10.3390/toxics10050246>

Academic Editor: Gilles-Eric Serralini

Received: 30 March 2022

Accepted: 10 May 2022

Published: 12 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract** Recently, an increasing number of chemical compounds are being characterized as endocrine disruptors since they have been proven to interact with the endocrine system, which plays a crucial role in the maintenance of homeostasis. Glyphosate is the active substance of the herbicide Roundup<sup>®</sup>, bisphenol A (BPA) and di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) are used as plasticizers, while triclosan (TCS), methyl (MePB), propyl (PrPB), and butyl (BuPB) parabens are used as antimicrobial agents and preservatives mainly in personal care products. Studies indicate that exposure to these substances can affect humans causing developmental problems and problems in the endocrine, reproductive, nervous, immune, and respiratory systems. Although there are copious studies related to these substances, there are few in vivo studies related to combined exposure to these endocrine disruptors. The aim of the present pilot study is the investigation and assessment of the above substances' toxicity in rabbits after twelve months of exposure to glyphosate (both pure and commercial form) and to a mixture of all the above substances at subtoxic levels. The lack of data from the literature concerning rabbits' exposure to these substances and the restrictions of the 3Rs Principle will result in a limited number of animals available for use (four animals per group, twenty animals in total).

**Keywords:** glyphosate; parabens; triclosan; di (2-ethylhexyl) phthalate; rabbits; combined exposure; chronic exposure

### 1. Introduction

The constant exposure of the population to a variety of chemicals is a global problem and has been of particular concern to the scientific community. In particular, exposure to substances suspected of being endocrine disruptors (EDCs) has been studied by many researchers. The endocrine system is a system of glands that control the proper functioning and action of hormones. Endocrine disruptors are chemicals that can interact with the endocrine system—a system that plays an important role in maintaining the body's homeostasis—usually causing adverse effects on the body. This disorder leads to developmental problems as well as problems in the reproductive, nervous, respiratory, and immune systems [1].

Existing *in vivo* and *in vitro* studies mainly investigate the action and potential effects of a single substance. In addition, guidelines usually indicate whether or not a single substance is associated with endocrine action. However, people are exposed to a variety of chemicals at a daily rate, which raises concerns about the effects that the possible synergistic action that all of these substances may have on an organism [2]. Over the last five years, researchers have focused on determining the effects of real-life exposure on human organisms, the so-called real life risk simulation (RLRS), which proposes new approaches to exposure scenarios [3,4].

This study aims to investigate the daily effects that the exposure to chemical substances has on people, as these effects have several applications. In other words, our goal is to simulate the effects of chemical compounds in real life. In particular, the synergistic activity of glyphosate, bisphenol A (BPA), parabens (PBs), triclosan (TCS), and bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in rabbits after twelve months of combined exposure will be evaluated. The toxicity of the above substances will be assessed both at the molecular and histological bases. At the same time, the effects after twelve months of exposure to the pure form of glyphosate will be compared with its commercial form (Roundup® herbicide).

#### Glyphosate

Glyphosate (N-(phosphonomethyl) glycine) is a broad-spectrum biocide and is the active substance of the herbicide Roundup®. It was accidentally discovered by Henri Martin in 1950, however, it was in 1970 when Monsanto identified its herbicidal activity and formulated Roundup® which has been commercially available since 1974 [5]. Although in the beginning glyphosate was used sparingly since its only application was as an aerosol spray, in 1996 genetically modified herbicide-tolerant plants accelerated its use.

Glyphosate and/or products containing it as an active substance have been suspected of causing several health problems over the years. Kidney and liver damage, various forms of cancer, and mental conditions such as Alzheimer's and Parkinson's disease have all been associated with the extensive use of glyphosate. Miscarriages, dermatological irritations, and respiratory problems have been reported after exposure to glyphosate. In addition, there are studies that have recorded an increase in infertility and malformations among pigs, as well as DNA damage and increased methylation *in vitro* [6].

Aside from glyphosate, Roundup® contains polyethoxylated tallow amine (POEA), a surfactant that enhances the uptake and translocation of the active ingredient. However, Roundup® contains many more ingredients for which the full list remains unknown, since it is considered a trade secret and is thus protected by the company. Consequentially, it has become more difficult to understand the risks posed by Roundup® use [7]. Today, it is evident that the safety of Roundup® is strongly doubted. Since 2015, over 300 lawsuits have been filed accusing the product of being detrimental to human health. Currently, several countries have banned its use, but its harmful effects are still present in the environment and in humans.

#### Bisphenol A

Bisphenol A (BPA) is an artificial compound that was first synthesized in 1891. It is used as a plasticizer in a wide variety of products such as food packaging, water bottles, thermal paper, and toys [8]. The most common use of BPA is for the manufacturing of epoxy resins that are used as an inner coating for metallic cans or other food or beverage packaging. BPA leaks out of epoxy resins and plastic bottles to contaminate food, beverages, and water [9]. The amount of BPA that leaks into stored foods and bottled water escalates when the plastics are exposed to high temperatures [8].

It has been proven that BPA causes endocrine disrupting effects in humans by interacting with nuclear receptors, such as estrogen receptors (ERs), androgen receptors (ARs), and thyroid hormone receptors (THR). Since the endocrine system is affected, problems will automatically occur in the other systems of an organism. The reproductive system, the nervous system, metabolic function, immune function, and the growth and development of offspring are all adversely affected consequentially. Furthermore, associations between



BPA levels and tumor development including prostate, breast, and lung cancer are added to the list of the effects of exposure to BPA [10].

#### Parabens

Parabens (PBs) are esters of para-hydroxybenzoic acid (pHBA) and were introduced to the market in 1930. They are used as antimicrobial agents and preservatives, and they have several applications in everyday products. In particular, they are used in deodorants, cosmetics, pharmaceuticals, and paper products such as baby wipes [11]. Moreover, PBs are the most common ingredient in personal care products, which makes them the two main sources of exposure. However, as expected, the environment is also burdened with PBs, mostly in aquatic environments, thereby creating a vicious cycle of exposure.

PBs have been blamed for exhibiting estrogenic activity, which is why an increasing amount of personal care products are currently being advertised as paraben-free. It has been found that parabens can disrupt the regular function of certain hormones such as androgens, estrogens, progesterone, and glucocorticosteroids by obstructing nuclear receptors [12]. They are also related to reproductive problems, breast cancer, obesity, genotoxicity, and allergies.

Authorities have set specific limitations regarding the use of PBs in personal care products and cosmetics. Since 2013, the European Commission has banned the use of specific parabens in all cosmetic and personal care products. In the current research, the toxicity of methyl (MePB), propyl (PrPB), and butyl (BuPB) parabens will be studied.

#### Triclosan

Triclosan (TCS) is a broad-spectrum antimicrobial agent that was first synthesized in the late 1960s. Initially, it was used as a disinfectant for hospitals and medical clinics but has since been used in soaps, toothpastes, cosmetics, and household cleaning products [13].

TCS has been blamed for disrupting the normal function of the endocrine system due to its structural similarity to estrogens. Moreover, it has the ability to bind to thyroid hormone receptors and has presented anti-androgenic and anti-estrogenic activity [14]. In addition, it is characterized as an allergen, one which either causes or enhances sensitivity to allergens.

In 2016, the FDA banned the use of TCS in soap, and in 2017 its usage was banned in all human hygiene biocidal products used within the European Union. Due to these bans, human exposure to TCS may be less than it was in previous years, however, there are still products that contain this substance. Another route for human exposure to TCS is the environment and especially the aquatic environment. Since this substance is present in the aquatic environment, water and natural products are being contaminated as well [13].

#### Bis (2-ethylhexyl) phthalate

DEHP is a phthalate ester used as a plasticizer in the production of polyvinyl chloride (PVC) to provide softer and more flexible materials. PVC containing DEHP is used in hospital equipment (intravenous tubing and bags), food wrapping, cable insulation, and automobile parts. DEHP is not bound to plastics with a covalent bond, and hence it may seep out of a product under certain conditions [15].

The main source of DEHP exposure for humans is in foodstuffs and bottled water, even though DEHP is not used in the manufacturing of water bottles. DEHP is more likely to leach into oily foods or foodstuffs that have a high concentration of lipids since it is highly soluble in oils but not very soluble in water. Other sources of exposure include house dust, indoor air, soil, or water sheds, but those are secondary sources only providing a minimal uptake [16].

After entering the body, DEHP is metabolized into several compounds including 2-ethyl hexanol, 2-ethyl hexanoic acid, and MEHP (mono (2-ethylhexyl) phthalate). Those metabolites are considered to be more toxic than the parent compound, especially MEHP, a substance that has been associated with antiandrogenic activity in humans [16]. DEHP itself also disrupts the normal function of the endocrine system. A decrease in aldosterone and

testosterone concentrations after in utero exposure of male rats to DEHP has been reported in a previous study. This substance and its metabolites have also been demonstrated to affect some thyroid hormones in several animal models such as thyroxine (T<sub>4</sub>) and triiodothyronine (T<sub>3</sub>) in rats [15]. Considering the effects of DEHP in humans, children's toys are not allowed to contain certain phthalates in the USA, Canada, and the European Union [15].

## 2. Study Design

### 2.1. Study Characteristics

This is a simulation study of human exposure to endocrine disruptors in real and daily life. The research is registered in the Animal Study Registry where further information such as the timeline and methods are available (DOI: 10.17590/asr.0000259). The protocol has been approved by the Committee of Ethics and Academic and Scientific Deontology of the University of Medicine and Pharmacy of Craiova (4/17 January 2020).

### 2.2. Study Group

Twenty rabbits (ten female and ten male), three months old and weighing about three kilos each, will be divided into five groups (four animals each) and placed in separate metal cages. After one week of the rabbits' acclimatization, the administration of the compounds of interest will begin.

### 2.3. Sample Size Estimation

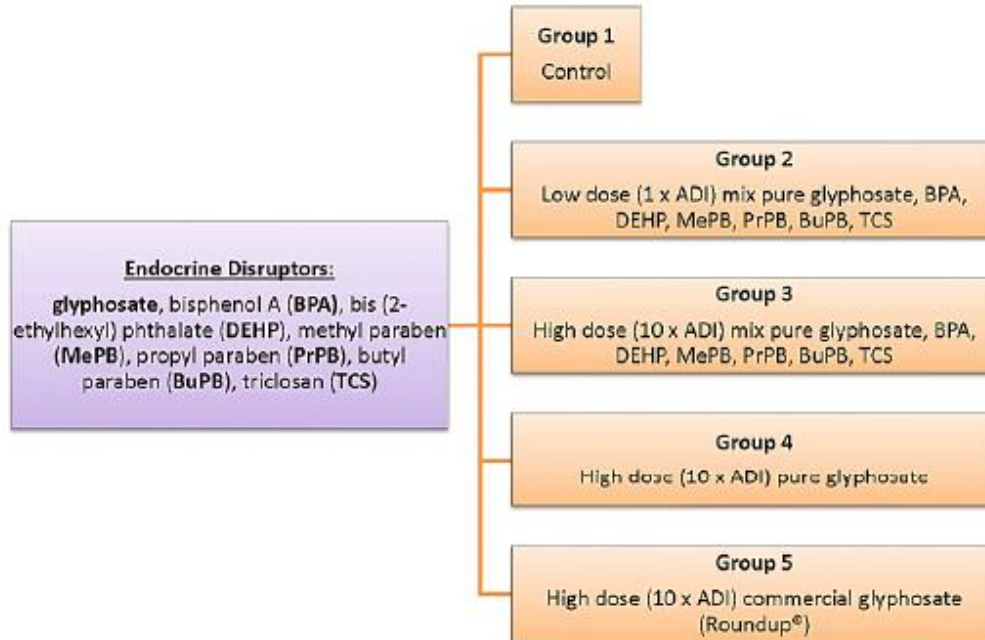
The number of animals as well as the methods of breeding and treatment should follow the rules of the 3Rs Principle (Refinement, Reduction, and Replacement) (<https://nc3rs.org.uk/>). These rules are sharp and strict to ensure the well-being of the animals as well as their restrained and rational use, and the Ethical Committee requires full compliance with these rules. To calculate the required sample size, a literature search was performed. According to the limited literature data, there is only one metanalysis supporting the glyphosate effect on the micronuclei of male mammals, but there are no studied effects on rabbits' micronuclei from glyphosate exposure. Due to the lack of corresponding scientific articles concerning the exposure of rabbits to the compounds of interest, data on the exposure of rats to the commercial form of glyphosate (Roundup®) were used [17–19]. The changes observed comparing the control group's testosterone levels with the group exposed to Roundup® ranged from 13.2 to 66.2%, depending on the dose administered. Based on the hypothesis of finding a testosterone change in rats and the accepted type I error of 5% and type II of 20%, it was estimated that four experimental animals per group were required to detect a percentage difference of 50%.

### 2.4. Breeding-Administration-Dosages

The first group will be the control group and will receive a normal diet (water, pellets, corn oil with 5% ethanol/water). In the second and third group, low and high doses of mixed BPA (>99%), PBs (MePB, PrPB, BuPB) (HPLC) grade, TCS (100%), DEHP (PESTANAL®, analytical standard) and glyphosate (85%), will be administered while the fourth and fifth groups will receive a high dose of glyphosate in its pure and commercial form (Roundup®) (Figure 1). The substances will be dissolved in 5% ethanol/water to prepare the stock solutions. Specific amounts of each solution will be administered to the animals once a day, and mixed with their food five days per week for twelve consecutive months. The final daily amount of ethanol in the administered food will be less than 0.5%.

Dosages are based on the limits set by the European Food Safety Authority (EFSA) and the related service in Canada. According to the EFSA the ADI for BPA is set as 0.004 mg/kg body weight/day, for BuPB as 0.5 mg/kg body weight/day, for all PBs (MePB, PrPB) as 0–10 mg/kg body weight/day (considered 5 mg/kg body weight/day for MePB and 5 mg/kg body weight/day for PrPB), for total phthalates up to 0.05 mg/kg

body weight/day, and for glyphosate up to 0.5 mg/kg body weight/day. The Government of Canada has set the ADI for TCS as 0.08 mg/kg body weight/day.



**Figure 1.** Groups of administration (substances-doses). ADI: Acceptable Daily Intake.

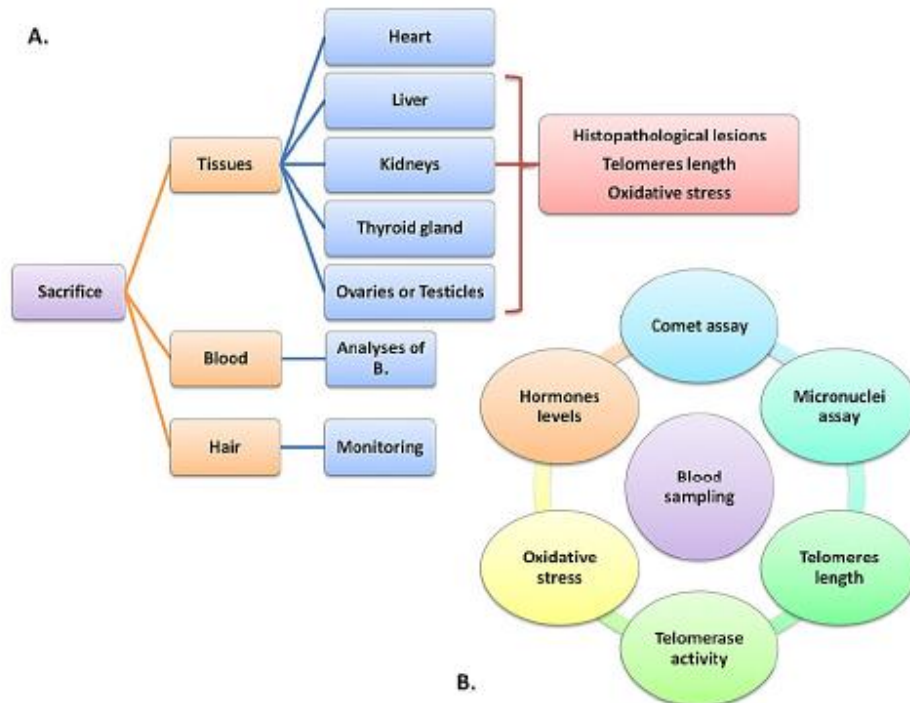
The low dose of the administered solution will contain an amount of each compound equal to its ADI ( $1 \times \text{ADI}$ ), while the high dose will contain ten times the ADI ( $10 \times \text{ADI}$ ).

All animals will be monitored and examined daily for signs of morbidity or mortality. Monitoring will include an examination of fur, mucous membranes, and secretions as well as an observation of animal behavior. Food and water consumption will also be recorded daily. Specifically, the consumption of the administration groups (groups 2, 3, 4, and 5) will be compared with the consumption of the control group (group 1) to identify any differences.

### 2.5. Sampling-Sacrifice

At the beginning of the *in vivo* experiment ( $t = 0$  month) and every three months ( $t = 3, 6, 9$  and 12 months), blood and hair samples will be collected and then analyzed to determine the levels of the compounds we are interested in (Figure 2).





**Figure 2.** (A). Sacrifice procedure: obtained tissues and applied tests (B). Blood sampling and applied tests.

Blood samples will also be used to assess a series of biomarkers that have been proved to be affected by exposure to substances with endocrine activity:

**Micronuclei assay**

Measurement of both the number of nucleated cells and the number of micro-nuclei in the dicotyledonous cells will be measured by testing the micro-nuclei in the lymphocytes. Cell culture, the addition of cytochalasin b (to stop cytokinesis while nuclear division carries on), and finally fixation of the cells are the main steps before measuring the micronuclei. By applying this method, we will study the toxicity of these substances in the genetic material of rabbits, using a method of high accuracy and a relatively low cost. Previous studies have already proven that exposure to glyphosate leads to greater rates of micronuclei formation [19].

**Reproductive hormone levels**

The substances that will be administered to the animals are characterized as endocrine disruptors which means that the endocrine system (controlling hormones) is the first to be affected. Thus, we will be able to determine the levels of the reproductive hormones progesterone, testosterone, androstenedione, and  $\beta$ -estradiol, but also of the thyroid hormones: thyroxine (T4), triiodothyronine (T3), and the thyroid stimulating hormone (T) using immunoassay techniques (e.g., Elisa kit).

**Telomere length**

Telomeres are repetitive sequences at the ends of chromosomes, which preserve chromosome integrity and offer protection from degradation, recombination, and fusion.

Their length will be measured via Quantitative-Polymerase Chain Reaction (Q-PCR). After DNA extraction using an Absolute Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit (ScienCell, USA), telomere length will be estimated by an automatic real-time PCR instrument. The attrition of telomeres after exposure to organic chemicals and pesticides has been recorded by Louzon and co-authors [20] rendering it worthy of investigation.

#### Telomerase activity

Telomerase is an enzyme responsible for the elongation of telomeres. Its activity will be measured via a Trap Elisa kit. Organic chemicals and pesticides are associated with a decrease in telomerase activity [20] and in this study we intend to verify this.

#### Oxidative stress

An assessment of oxidative stress will be accomplished by measuring the total antioxidant capacity (TAC), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyl concentrations, glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD), and catalase quantities (CAT). Previously applied protocols [21–25] will be used and absorbance will be measured to determine redox biomarkers. Studies examining the associations between exposure to pesticides and oxidative stress biomarkers showed an increased oxidative stress [26] while the same was observed for endocrine disruptors mainly in mixtures, indicating a more profound effect compared to individual exposure [27].

#### Comet assay

DNA damage will be assessed using a single gel electrophoresis assay (SCGE). Lately, Kara and co-authors observed DNA damage and induced oxidative stress after exposure to pesticides [28].

All animals will be sacrificed at the end of the experiment (after twelve months of exposure) using phenobarbital sodium (Dolethal commercial solution, 5 mL/5 kg body weight), after first being anesthetized with a subcutaneous injection of Xylapan/Narketan solution (2/1) and will be necropsied. A complete macroscopic examination will be performed on the heart, liver, kidneys, brain, lungs, thyroid gland, and genitals.

After sacrifice, tissues and specifically kidneys, liver, heart, brain, lungs, thyroid gland, and genitals will be examined for histopathological lesions. At the same time, an oxidative stress assessment will be performed as well as a measurement of telomerase activity to determine the rate of its expression in the organs and the possible problems that may be associated with its reduced action.

### 3. Discussion

Studies in animals and humans have shown that health problems occur after systemic exposure to substances classified as endocrine disruptors. The literature so far reports the detection of the aforementioned substances in biological samples such as urine, blood, and hair [29–32], indicating the diffusion of the substances into the body and their possible accumulation in organs and/or adipose tissue. In the present study, the compounds of interest have been associated with neurological and behavioral problems; liver and kidney lesions; cancer mainly of the breast, skin, liver, or kidney; thyroid gland problems; adverse effects on the reproductive system, such as changes in the function and morphology of the ovaries and sperm motility; pregnancy problems; oxidative stress; increased chances of obesity; and allergies. The fact that there is evidence of possible genotoxicity of these substances, namely glyphosate, PBs, and BPA, also raises concerns [6,32–35].

Over the last few years, few studies have been conducted that simulate real life exposures to pesticides, food additives, and other chemicals found in consumer products (e.g., PBs). These *in vivo* studies have proved that exposures to such substances can lead to genotoxic and cytotoxic effects as well as changes in the redox profile of several tissues such as the liver, lungs, and brain [36,37]. Tsiaoussis and co-authors have concluded that being exposed to a wide variety of toxicants such as pesticides, aromatic hydrocarbons,

and polychlorinated biphenyls highly affects the gut microbiome leading to metabolic, malignant, inflammatory, or immune system diseases [38]. These data raise doubts about the true extent of the burden these substances pose to people.

It is also worth noting that in terms of glyphosate, the environment—and consequently humans and animals—are not exposed in its pure form but in commercial forms. As it happens in all drugs and pesticides, except for the active substance, there are other additives that usually help to increase the stability and/or absorption of the drug by humans or plants, as in the case of pesticides [39]. These additives may act individually or synergistically with the active substance and have effects that are different or more pronounced than those of the active substance. In vivo and in vitro studies have shown that the commercial form of glyphosate has adverse effects on the animal bodies and cells compared to the pure form [40,41].

In the current study we aim to assess the effects of this kind of substance on several of the systems of an organism. The main point is that glyphosate, BPA, PBs, and TCS have been strongly associated with hormonal perturbation. Being the leading system of animal organisms, the hormonal system regulates the activity of all other systems. Hence, if hormonal function is changed all an organism's systems are affected. Our main goal is to estimate the magnitude of these changes, when such substances act simultaneously, and their further health effects. The correlation of the implications of glyphosate in comparison with those of Roundup® will also clarify the adverse synergistic effects of the additives.

#### 4. Perspectives

This study aims to estimate the biological effects of long-term exposure to endocrine disruptors. The experimental protocol of this study has been designed based on the scarce literature data regarding rabbits and is restricted by the limitations of the 3Rs Principle. Until now, most researchers have focused on determining the associations and effects of exposure to one or two substances. However, people are exposed to the substances in question on a daily basis, unintentionally, and the real effects are still unknown. By studying the effects on the entire organism, the tissues, genetic material, the hormones, and the oxidative stress we will simulate real life exposure to these substances thus paving the way to unravelling the real health effects.

**Author Contributions:** Investigation, Validation, Formal analysis, Writing—original draft, V.K.; Conceptualization, Supervision, Methodology, M.N.T.; Formal analysis, Data curation, A.A.; Resources, Methodology, E.V. and I.F.; Methodology, K.K., C.C., P.A., M.P. and A.K.; Investigation, Methodology, Data curation, Visualization, Writing—original draft, D.K., A.O.D., D.C. and A.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Committee of Ethics and Academic and Scientific Deontology of the University of Medicine and Pharmacy of Craiova (4/17 January 2020) and has been registered to Animal Study Registry (DOI 10.17590/asr.0000259).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: Scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment. *EFSA J.* **2013**, *11*, 3132.
2. Tsatsakis, A.; Kouretas, D.; Tzatzarakis, M.; Stivaktakis, P.; Tsarouhas, K.; Golokhvast, K.; Rakitskii, V.; Tutelyan, V.; Hernandez, A.; Rezaee, R.; et al. Simulating real-life exposures to uncover possible risks to human health: A proposed consensus for a novel methodological approach. *Hum. Exp. Toxicol.* **2016**, *36*, 554–564. [CrossRef] [PubMed]
3. Tsatsakis, A.M.; Docea, A.O.; Tsitsimpikou, C. New challenges in risk assessment of chemicals when simulating real exposure scenarios; simultaneous multi-chemicals' low dose exposure. *Food Chem. Toxicol.* **2016**, *96*, 174–176. [CrossRef] [PubMed]



4. Hernández, A.F.; Tsatsakis, A.M. Human exposure to chemical mixtures: Challenges for the integration of toxicology with epidemiology data in risk assessment. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *103*, 188–193. [\[CrossRef\]](#)
5. Benbrook, C.M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Ecol.* **2016**, *28*, 3. [\[CrossRef\]](#)
6. Van Bruggen, A.H.C.; He, M.M.; Shin, K.; Mai, V.; Jeong, K.C.; Finckh, M.R.; Morris, J.G., Jr. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci. Total Environ.* **2018**, *616–617*, 255–268. [\[CrossRef\]](#)
7. Vandenberg, L.N.; Blumberg, B.; Antoniou, M.N.; Benbrook, C.M.; Carroll, L.; Colborn, T.; Everett, L.G.; Hansen, M.; Landrigan, P.J.; Lanphear, B.P.; et al. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? *J. Epidemiol. Community Health* **2017**, *71*, 613–618. [\[CrossRef\]](#)
8. Michałowicz, J. Bisphenol A—Sources, toxicity and biotransformation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *37*, 738–758. [\[CrossRef\]](#)
9. Tzatzarakis, M.N.; Karzi, V.; Vakonaki, E.; Goumenou, M.; Kavvalakis, M.; Stivaktakis, P.; Tsitsimpikou, C.; Tsakiris, I.; Rizos, A.K.; Tsatsakis, A.M. Bisphenol A in soft drinks and canned foods and data evaluation. *Food Addit. Contam. Part B* **2016**, *10*, 85–90. [\[CrossRef\]](#)
10. Ma, Y.; Liu, H.; Wu, J.; Yuan, L.; Wang, Y.; Du, X.; Wang, R.; Marwa, P.W.; Petulu, P.; Chen, X.; et al. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environ. Res.* **2019**, *176*, 108575. [\[CrossRef\]](#)
11. Dodge, L.E.; Kelley, K.E.; Williams, P.L.; Williams, M.A.; Hernández-Díaz, S.; Missmer, S.A.; Hauser, R. Medications as a source of paraben exposure. *Reprod. Toxicol.* **2015**, *52*, 93–100. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Nowak, K.; Ratajczak-Wrona, W.; Górska, M.; Jabłońska, E. Parabens and their effects on the endocrine system. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2018**, *474*, 238–251. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Weatherly, L.M.; Gosse, J.A. Triclosan exposure, transformation, and human health effects. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* **2017**, *20*, 447–469. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Bedoux, G.; Roig, B.; Thomas, O.; Dupont, V.; Le Bot, B. Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2011**, *19*, 1044–1065. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Rowdhwaj, S.S.S.; Chen, J. Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate: An Overview. *BioMed. Res. Int.* **2018**, *2018*, 1750368. [\[CrossRef\]](#)
16. Eyrthropel, H.C.; Maric, M.; Nicell, J.A.; Leask, R.L.; Yargeau, V. Leaching of the plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) from plastic containers and the question of human exposure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 9967–9981. [\[CrossRef\]](#)
17. Romano, R.M.; Romano, M.A.; Bernardi, M.M.; Furtado, P.V.; Oliveira, C.A. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Reprod. Toxicol.* **2010**, *84*, 309–317. [\[CrossRef\]](#)
18. Owagboriaye, F.O.; Dedeke, G.A.; Ademolu, K.O.; Olujimi, O.O.; Ashidi, J.S.; Adeyinka, A.A. Reproductive toxicity of Roundup herbicide exposure in male albino rat. *Exper. Toxicol. Pathol.* **2017**, *69*, 461–468. [\[CrossRef\]](#)
19. Ghisi, N.D.C.; De Oliveira, E.C.; Prioli, A.J. Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. *Chemosphere* **2016**, *145*, 42–54. [\[CrossRef\]](#)
20. Louzon, M.; Coeurdassier, M.; Gimbert, F.; Pauget, B.; de Vaulleury, A. Telomere dynamic in humans and animals: Review and perspectives in environmental toxicology. *Environ. Int.* **2019**, *131*, 105025. [\[CrossRef\]](#)
21. Oberley, L.W.; Spitz, D.R. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 457–464. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Keles, M.; Taysi, S.; Sen, N.; Aksoy, H.; Akçay, F. Effect of Corticosteroid Therapy on Serum and CSF Malondialdehyde and Antioxidant Proteins in Multiple Sclerosis. *Can. J. Neurol. Sci.* **2001**, *28*, 141–143. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Janaszewska, A.; Bartosz, G. Assay of total antioxidant capacity: Comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* **2002**, *62*, 231–236. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Patsoukis, N.; Zervoudakis, G.; Panagopoulos, N.T.; Georgiou, C.D.; Angelatou, F.; A Matsokis, N. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci. Lett.* **2004**, *357*, 83–86. [\[CrossRef\]](#)
25. Veskoukis, A.S.; Kyparos, A.; Paschalis, V.; Nikolaidis, M.G. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood. *Biomarkers* **2016**, *21*, 208–217. [\[CrossRef\]](#)
26. Ledda, C.; Cannizzaro, E.; Cinà, D.; Filetti, V.; Vitale, E.; Paravizzini, G.; Di Naso, C.; Iavicoli, I.; Rapisarda, V. Oxidative stress and DNA damage in agricultural workers after exposure to pesticides. *J. Occup. Med. Toxicol.* **2021**, *16*, 1. [\[CrossRef\]](#)
27. Puttabyatappa, M.; Banker, M.; Zeng, L.; Goodrich, J.M.; E Domino, S.; Dolinoy, D.C.; Meeker, J.D.; Pennathur, S.; Song, P.X.K.; Padmanabhan, V. Maternal Exposure to Environmental Disruptors and Sexually Dimorphic Changes in Maternal and Neonatal Oxidative Stress. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2019**, *105*, 492–505. [\[CrossRef\]](#)
28. Kara, M.; Oztas, E.; Ramazanoğulları, R.; Kouretas, D.; Nepka, C.; Tsatsakis, A.; Veskoukis, A.S. Benomyl, a benzimidazole fungicide, induces oxidative stress and apoptosis in neural cells. *Toxicol. Rep.* **2020**, *7*, 501–509. [\[CrossRef\]](#)
29. Machtinger, R.; Berman, T.; Adir, M.; Mansur, A.; Baccarelli, A.A.; Racowsky, C.; Calafat, A.M.; Hauser, R.; Nahum, R. Urinary concentrations of phthalate metabolites, bisphenols and personal care product chemical biomarkers in pregnant women in Israel. *Environ. Int.* **2018**, *116*, 319–325. [\[CrossRef\]](#)
30. Dann, A.B.; Hontela, A. Triclosan: Environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *J. Appl. Toxicol.* **2011**, *31*, 285–311. [\[CrossRef\]](#)

31. Parvez, S.; Gerona, R.R.; Proctor, C.; Friesen, M.; Ashby, J.L.; Reiter, J.L.; Lui, Z.; Winchester, P.D. Glyphosate exposure in pregnancy and shortened gestational length: A prospective Indiana birth cohort study. *Environ. Health* **2018**, *17*, 23. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Błędzka, D.; Gromadzińska, J.; Wąsowicz, W. Parabens. From environmental studies to human health. *Environ. Int.* **2014**, *67*, 27–42. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Katsikantami, I.; Sifakis, S.; Tzatzarakis, M.N.; Vakonaki, E.; Kalantzi, O.I.; Tsatsakis, A.M.; Rizos, A.K. A global assessment of phthalates burden and related links to health effects. *Environ. Int.* **2016**, *97*, 212–236. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Rodricks, J.V.; Swenberg, J.A.; Borzelleca, J.F.; Maronpot, R.R.; Shipp, A.M. Triclosan: A critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products. *Crit. Rev. Toxicol.* **2010**, *40*, 422–484. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Rochester, J.R. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reprod. Toxicol.* **2013**, *42*, 132–155. [\[CrossRef\]](#)
36. Tsatsakis, A.; Docea, A.O.; Constantin, C.; Calina, D.; Zlatian, O.; Nikolouzakis, T.K.; Stivaktakis, P.D.; Kalogeraki, A.; Liesivuori, J.; Tzanakakis, G.; et al. Genotoxic, cytotoxic, and cytopathological effects in rats exposed for 18 months to a mixture of 13 chemicals in doses below NOAEL levels. *Toxicol. Lett.* **2019**, *316*, 154–170. [\[CrossRef\]](#)
37. Fountoucidou, P.; Veskoukis, A.S.; Kerasioti, E.; Docea, A.O.; Taitzoglou, I.A.; Liesivuori, J.; Tsatsakis, A.; Kouretas, D. A mixture of routinely encountered xenobiotics induces both redox adaptations and perturbations in blood and tissues of rats after a long-term low-dose exposure regimen: The time and dose issue. *Toxicol. Lett.* **2019**, *317*, 24–44. [\[CrossRef\]](#)
38. Tsiaoussis, J.; Antoniou, M.N.; Koliarakis, I.; Mesnage, R.; Vardavas, C.I.; Izotov, B.N.; Psaroulaki, A.; Tsatsakis, A. Effects of single and combined toxic exposures on the gut microbiome: Current knowledge and future directions. *Toxicol. Lett.* **2019**, *312*, 72–97. [\[CrossRef\]](#)
39. Gress, S.; Lemoine, S.; Séralini, G.E.; Puddu, P.E. Glyphosate-based herbicides potentially affect cardiovascular system in mammals: Review of the literature. *Cardiovasc. Toxicol.* **2015**, *15*, 117–126. [\[CrossRef\]](#)
40. Defarge, N.; de Vendôme, J.S.; Séralini, G.E. Toxicity of formulators and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. *Tox. Rep.* **2018**, *5*, 156–163. [\[CrossRef\]](#)
41. Bach, N.C.; Marino, D.J.G.; Natale, G.S.; Somoza, G.M. Effects of Glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the Neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (Amphibia: Anura). *Chemosphere* **2018**, *202*, 289–297. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)





## Article

# DNA Damage Estimation after Chronic and Combined Exposure to Endocrine Disruptors: An In Vivo Real-Life Risk Simulation Approach

Vasiliki Karzi <sup>1</sup>, Eren Ozcagli <sup>2</sup>, Manolis N. Tzatzarakis <sup>1</sup>, Elena Vakonaki <sup>1</sup>, Irene Fragkiadoulaki <sup>1</sup>, Aikaterini Kalliantasi <sup>1</sup>, Christina Chalkiadaki <sup>1</sup>, Athanasios Alegakis <sup>1</sup>, Polychronis Stivaktakis <sup>1</sup>, Aikaterini Karzi <sup>1</sup>, Antonios Makrigiannakis <sup>3</sup>, Anca Oana Docea <sup>4</sup>, Daniela Calina <sup>5</sup> and Aristidis Tsatsakis <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Toxicology, Medicine School, University of Crete, 70013 Heraklion, Greece; chemstud.vas2010@gmail.com (VK); tzatzarakis@uoc.gr (M.N.T.); evakonaki@gmail.com (E.V.); eirinimb@gmail.com (I.F.); kalliantash\_k@hotmail.com (A.K.); christina4495@hotmail.com (C.C.); alegkaka@uoc.gr (A.A.); polychronia.stivaktakis@gmail.com (P.S.); katerinakarzi@hotmail.com (A.K.)

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Toxicology, Faculty of Pharmacy, Istanbul University, Beyazit, Istanbul 34116, Turkey; eren.ozcagli@istanbul.edu.tr

<sup>3</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital of Heraklion, 71500 Heraklion, Greece; makrygia@uoc.gr

<sup>4</sup> Department of Clinical Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy of Craiova, 200349 Craiova, Romania; daoana00@gmail.com

<sup>5</sup> Department of Toxicology, University of Medicine and Pharmacy of Craiova, 200349 Craiova, Romania; calinadaniela@gmail.com

\* Correspondence: toxlahpublications@gmail.com or tsatsaka@uoc.gr; Tel.: +30-2810-394-870



Citation: Karzi, V.; Ozcagli, E.; Tzatzarakis, M.N.; Vakonaki, E.; Fragkiadoulaki, I.; Kalliantasi, A.; Chalkiadaki, C.; Alegakis, A.; Stivaktakis, P.; Karzi, A.; et al. DNA Damage Estimation after Chronic and Combined Exposure to Endocrine Disruptors: An In Vivo Real-Life Risk Simulation Approach. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 9989. <https://doi.org/10.3390/ijms24129989>

Academic Editor: Noriyuki Kobuchi

Received: 13 May 2023

Revised: 7 June 2023

Accepted: 8 June 2023

Published: 10 June 2023



Copyright © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract** Exposure to chemical substances has always been a matter of concern for the scientific community. During the last few years, researchers have been focusing on studying the effects resulting from combined exposure to different substances. In this study, we aimed to determine the DNA damage caused after chronic and combined exposure to substances characterized as endocrine disruptors using comet and micronuclei assays, specifically glyphosate (pure and commercial form), bisphenol A, parabens (methyl-, propyl- and butylparaben), triclosan and bis (2-ethylhexyl) phthalate. The highest mean tail intensity was observed in the group exposed to a high-dose (10 × ADI) mixture of substances (Group 3), with a mean value of 11.97 (11.26–13.90), while statistically significant differences were noticed between the groups exposed to low-dose (1 × ADI) (Group 2) and high-dose (10 × ADI) (Group 3) mixtures of substances ( $p = 0.003$ ), and between Group 3 and both groups exposed to high doses (10 × ADI) of the pure and commercial forms of glyphosate (Groups 4 ( $p = 0.014$ ) and 5 ( $p = 0.007$ )). The micronuclei assay results were moderately correlated with the exposure period. Group 5 was the most impacted exposure group at all sampling times, with mean MN counts ranging between  $28.75 \pm 1.71$  and  $60.75 \pm 1.71$ , followed by Group 3 ( $18.25 \pm 1.50$ – $45.75 \pm 1.71$ ), showing that commercial forms of glyphosate additives as well as mixtures of endocrine disruptors can enhance MN formation. All exposure groups showed statistically significant differences in micronuclei counts with an increasing time trend.

**Keywords:** glyphosate; bisphenol a; parabens; bis (2-ethylhexyl) phthalate; triclosan; rabbits; comet assay; micronuclei assay

## 1. Introduction

The continuous increase in the population and the over-consumerism that is currently being promoted have raised the use of agrochemicals and preservatives in order to increase food production and ensure food quality. However, this phenomenon has led to the constant exposure of the population to a variety of compounds that are marketed by manufacturers as harmless, with little or no side effects. Most of the existing studies aim to estimate the

side effects of exposure to one chemical, rather than determining the synergic effects of the combined exposure that actually happens in real life. The same applies to the existing authorized guidelines and regulations, which are focused on one substance or one group of substances [1,2]. The increase in the amount of data from biomonitoring studies has caused researchers to turn their attention to the synergic or antagonistic effects of exposure to more than two compounds, introducing the concept of real-life risk simulation (RLRS) [1–4].

Glyphosate (GLY) is the active substance of one of the most used pesticides, Roundup. Although GLY has been proven to be toxic, it is noteworthy that its commercial form, Roundup, presents excessive toxicity due to its adjuvants, especially polyethoxylated tallow amine (POEA) [5,6]. In the last decade, there has been a large debate concerning the detrimental effects of exposure to this pesticide and the proven association with various forms of cancer, kidney and liver damage, delivery problems, mental conditions and DNA damage [7]. However, Roundup is still classified by regulatory agencies as safe due to the lack of significant studies showing its toxicity, and its residues are present in the environment, thus entering the food chain [8].

Parabens (PBs) and triclosan (TCS) are antimicrobial substances widely used in personal care products (PCPs). It has been shown that both PBs and TCS can disrupt the regular function of certain hormones, especially those related to reproduction such as estrogens, androgens and testosterone [9,10]. PBs are also related to reproductive problems, breast cancer, obesity, genotoxicity and allergies, while TCS is characterized as an allergen [9].

Bisphenol A (BPA) and bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) are plasticizers used in a variety of products, but the main source of exposure is food packaging and plastic bottles [11,12]. BPA is used for the production of epoxy resins coating the inner layer of packaging [13], while DEHP is used for the production of polyvinyl chloride (PVC), in order to provide softer and more flexible materials [11]. Both are proven to act like endocrine disruptors, thus affecting several systems of the organism, such as the reproductive system, immune system, metabolism and development [11,12].

In the last few years, exposure studies have been focusing on determining DNA damage since it strongly relates to or even causes all proven problems [14]. Exposure of the African catfish to glyphosate triggered the formation of micronuclei abnormalities and other nuclear abnormalities such as bean-shaped cells, while the comets formed in the analyses of the liver cells indicated potential genotoxic properties [15]. Previously, experiments by Koller et al. in a buccal epithelial cell line proved that exposure to glyphosate and/or Roundup led to elevated frequencies of micronuclei and nuclear buds and increased membrane damage [5].

Studies on EDC mixtures have indicated elevated effects of co-exposure in contrast with mono-exposure to EDCs [16,17]. Treatment of HepG2 cells with binary mixtures of BPA, dibutyl phthalate (DBP) and cadmium had a stronger DNA damage effect than individual exposure, while stronger cytotoxicity and the generation of greater amounts of reactive oxygen species (ROS) were also observed [18]. Likewise, enhanced ROS production and, hence, oxidative stress biomarker variations were noticed by Falfushynska and co-authors in zebrafish administered a mixture of chlorpyrifos and Roundup. Additionally, decreased cortisol levels were measured after combined exposure to a mixture of the aforementioned pesticides [19]. It is worth noting that Dinca et al. found cytotoxic and histopathological effects even at very low doses (below NOAEL—No Observed Adverse Effect Level) in rats exposed to a mixture of chemical substances containing several pesticides, ethylparaben, butylparaben, bisphenol A and others [20].

The objective of this study was to investigate the DNA damage caused by chronic and combined exposure to substances characterized as endocrine disruptors using two different techniques that offer different approaches to the issue. The comet assay detects the fragmentation of DNA, while the micronuclei assay detects chromosome breakage and impairment of the mitotic apparatus [21]. Both methods have been previously applied and proven to be reliable for the detection of DNA damage in human and animal cells caused by various chemical substances [22–24]. Specifically, we aimed to determine the extent of

DNA damage in peripheral lymphocytes and tissues in rabbits after 12 months of exposure to GLY (pure and commercial forms), BPA, methylparaben (MePB), propylparaben (PrPB), butylparaben (BuPB), TCS and DEHP.

## 2 Results

### 2.1. Micronuclei Counts

Repeated measures ANOVA using the exposure groups as factors was applied for MN counts at 0, 3, 6, 9 and 12 months of exposure, to estimate both time and exposure effects. A statistically significant difference was observed in the time and exposure interaction (ANOVA  $F(1, 4) = 479.23, p < 0.001$ ). The group details are presented in Table 1. The Group 1 values were stable at the experiment time points, ranging from  $7.25 \pm 1.26$  (12 months) to  $9.25 \pm 1.71$  (3 months). All other groups showed an increasing time trend, indicating time dependence on micronuclei formation. In Group 2,  $7.75 \pm 0.50$  was measured at  $t = 0$  months, which increased to a mean value of  $41.75 \pm 1.71$  in the 12th month. Group 3 seemed to increase in a stable pattern from  $8.50 \pm 1.00$  ( $t = 0$  months) to  $45.75 \pm 1.71$  ( $t = 12$  months). Similarly, Group 4 and Group 5, starting from  $8.75 \pm 0.96$  and  $8.25 \pm 1.89$ , reached values of  $37.50 \pm 1.00$  and  $60.75 \pm 1.71$ , respectively (Table 2 and Figure 1). Post hoc comparisons (LSD test) showed a statistically significant difference at the  $p < 0.001$  level when the total group mean values were compared.

**Table 1.** Groups and doses of the in vivo experiment.

Group	Dose	Substance
1	Control	-
2	Low-dose mix	$1 \times$ ADI GLY, BPA, MePB, PrPB, BuPB, TCS, DEHP
3	High-dose mix	$10 \times$ ADI GLY, BPA, MePB, PrPB, BuPB, TCS, DEHP
4	High-dose pure GLY	$10 \times$ ADI GLY
5	High-dose commercial GLY	$10 \times$ ADI GLY

ADI is 0.004 mg/kg bw/day for BPA; 0.5 mg/kg bw/day for BuPB; 0–10 mg/kg bw/day for MePB and PrPB; up to 0.05 mg/kg bw/day for total phthalates; and up to 0.5 mg/kg bw/day for glyphosate (EFSA values). ADI for TCS is 0.08 mg/kg bw/day (Government of Canada values).

**Table 2.** Mean and standard deviation of MN counts at different time points in different exposure groups.

Months	Group 1		Group 2		Group 3		Group 4		Group 5	
	Mean	$\pm$ SD	Mean	$\pm$ SD	Mean	$\pm$ SD	Mean	$\pm$ SD	Mean	$\pm$ SD
0	9.00	0.82	7.75	0.50	8.50	1.00	8.75	0.96	8.25	1.89
3	9.25	1.71	16.75	1.26	18.25	1.50	14.25	1.50	28.75	1.71
6	8.25	1.50	20.25	1.71	22.75	2.22	18.75	1.71	40.50	2.08
9	8.75	0.96	31.50	1.29	36.00	2.16	30.50	3.70	52.50	2.38
12	7.25	1.26	41.75	1.71	45.75	1.71	37.50	1.00	60.75	1.71
<b>Total mean</b>	8.50	1.25	23.60	1.29	26.25	1.72	21.95	1.77	38.15	1.95

Time  $\times$  group interaction:  $F(1, 4) = 479.23, p < 0.001$ .

Group 3 was administered a 10 times higher dose than Group 2; however, the MN counts did not present proportional values. Over the sampling times  $t = 3$ –12 months, Group 2 MN counts ranged from  $16.75 \pm 1.26$  to  $41.75 \pm 1.71$ , while those of Group 3 slightly differed, with mean MN counts of  $18.25 \pm 1.50$ – $45.75 \pm 1.71$ . Group 4 was administered the same dose of GLY as Group 3, but Group 3 also contained a mixture of endocrine disruptors. Group 3 appeared to be more burdensome than Group 4 ( $18.25 \pm 1.50$ – $45.75 \pm 1.71$  and  $14.25 \pm 1.50$ – $37.50 \pm 1.00$ , respectively), which could be attributed to the additional endocrine disruptors administered to Group 3. Although Groups 4 and 5 did not differ in dose, the adjuvants in the commercial form of GLY seemed to affect further

MN formation, while Group 5 had higher mean values of MN ( $28.75 \pm 1.71$ – $60.75 \pm 1.71$  to  $14.25 \pm 1.50$ – $37.50 \pm 1.00$  of Group 4), in the same periods of exposure. Additionally, Group 5 had the highest mean MN counts of all groups.

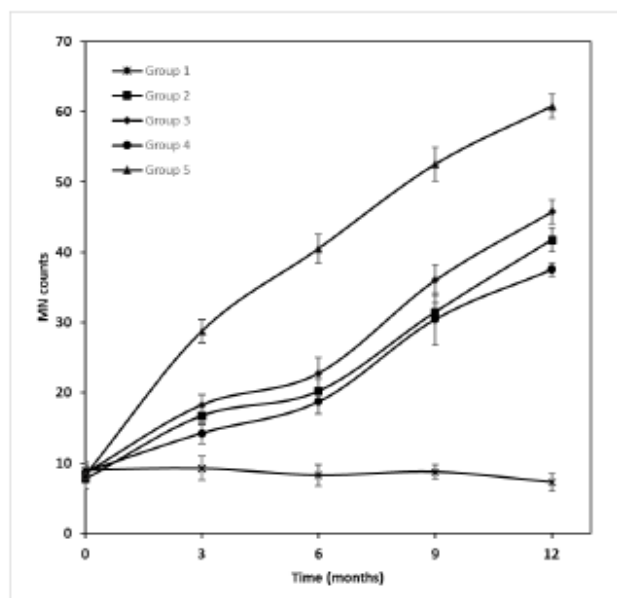


Figure 1. MN expression in different exposure groups at different sampling times.

## 2.2. Tail Intensity

The tail intensity was measured using blood from the last sampling ( $t = 12$  months). All exposure groups seemed to be affected in relation to Group 1, which was the control group. As shown in Figure 2, the tail intensity of each group was significantly different (ANOVA:  $F(4, 15) = 13.974$ ,  $p < 0.001$ , Kruskal–Wallis  $\chi^2(4) = 13.786$ ,  $p = 0.008$ ). The highest median tail intensity, 11.97 (11.26–13.90), was observed in Group 3, while the intensity in Group 1 was 4.31 (3.86–5.06) (Table 3), showing that combined exposure to endocrine disruptors had a greater impact on DNA damage and, by extension, the tail intensity.

Table 3. Descriptive statistics (mean, SD, quartiles) and comparison of tail intensities between groups.

Group	Mean	±SD	Quartile			LSD Test				
			1st	Median	3rd	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	4.46	0.88	3.86	4.31	5.06					
2	8.67	1.10	7.88	8.75	9.46	0.002	0.002	<0.001	<0.001	0.001
3	12.58	1.90	11.26	11.97	13.90	<0.001	0.003	0.003	0.449	0.655
4	9.52	1.66	8.37	9.50	10.67	<0.001	0.449	0.014	0.014	0.007
5	9.17	1.92	7.74	9.36	10.59	0.001	0.655	0.007	0.752	0.752

ANOVA:  $F(4, 15) = 13.974$ ,  $p < 0.001$ .

The difference in the tail intensity mean values between Group 2 (8.75; 7.88–9.46) and Group 3 (11.97; 11.26–13.90) is proof of a dose-dependent response. Interestingly, the mean tail intensity values of Groups 4 and 5 were similar (9.50; 8.37–10.67 and 9.36; 7.74–10.59, respectively), which is evidence that the adjuvants of the commercial form of GLY do not enhance breaks in the DNA. Statistically significant differences were obtained from the LSD adjusted t-test. Between Groups 2 and 3, which had different levels of exposure, a



significant difference was observed ( $p = 0.003$ ), while Group 3 was significantly different from Group 4 ( $p = 0.014$ ) and Group 5 ( $p = 0.007$ ) at  $t = 12$  months (Table 3).

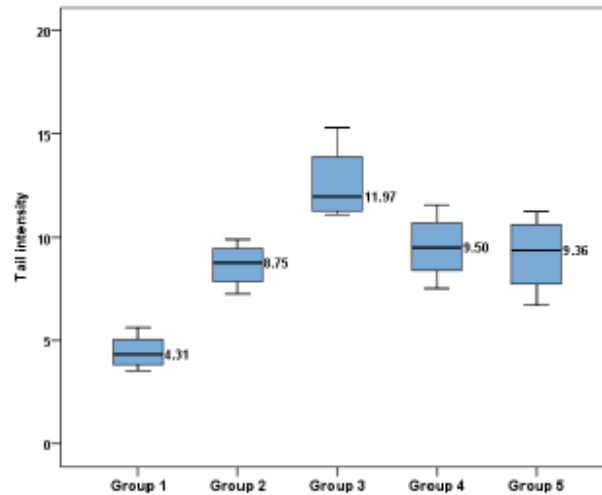


Figure 2. Mean tail intensity values between groups at 12 months of exposure.

### 2.3. Correlation of Micronuclei and Comet Assay Results

MN counts at  $t = 12$  months were correlated with the corresponding tail intensity results. All exposure groups' MN counts appeared to be statistically significantly associated with the tail intensity, proving the genotoxicity of the administered substances. In Figure 3, scatterplots of the tail intensity vs. MN counts at 12 months are presented. The baseline MN counts were correlated with the tail intensity ( $r_s = 0.581$ ,  $p = 0.007$ ).

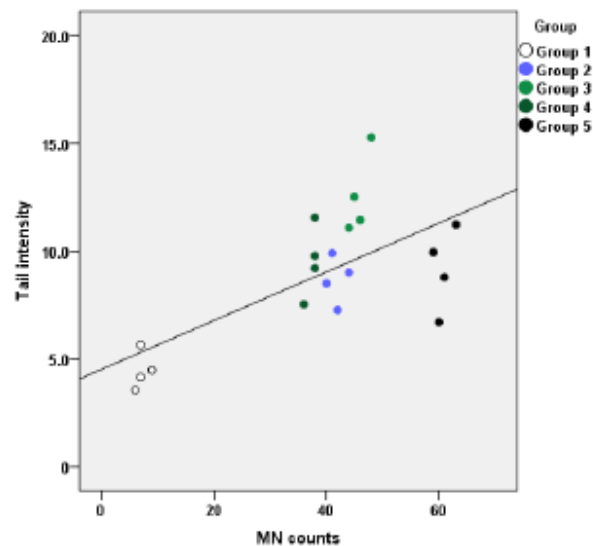


Figure 3. Correlation of tail intensity with micronuclei counts (MN) for each of the five different groups at  $t = 12$  months ( $r_s = 0.581$ ,  $p = 0.007$ ).

In Table 4, measurements of the MN counts at different time points of exposure are shown. The baseline counts were not significantly correlated between the time intervals ( $p > 0.05$ ). All other bivariate correlations of the MN counts were strongly correlated, with the lowest  $r$  value observed between the 3- and 6-month exposure counts ( $r_s = 0.826$ ,  $p < 0.001$ ).

**Table 4.** Correlation of micronuclei counts between months of exposure.

		Spearman's $r$	
Months	Months	$r_s$	$p$
0	3	−0.350	0.130
	6	−0.201	0.394
	9	−0.285	0.223
	12	−0.368	0.110
3	6	0.874	<0.001
	9	0.826	<0.001
	12	0.940	<0.001
6	9	0.928	<0.001
	12	0.887	<0.001
9	12	0.889	<0.001

### 3. Discussion

In the current study, we aimed to determine DNA damage caused by chronic exposure to substances characterized as endocrine disruptors. Specifically, we tried to simulate the real-life exposure by administering GLY, TCS, BPA, MePB, PrPB, BuPB and DEHP to rabbits at different doses for 12 consecutive months.

The micronuclei assay showed significant differences from the beginning to the end of the exposure period. Except for Group 1, which showed similar mean values throughout the whole experiment ( $7.25 \pm 1.26$ – $9.25 \pm 1.71$ ), all other groups showed differences in a time- and dose-dependent manner. At the last time point of exposure (12 months), the mean MN values of Groups 2 and 3 ( $41.75 \pm 1.71$  and  $45.75 \pm 1.71$ , respectively) seemed to be five times the initial values ( $7.75 \pm 0.50$  and  $8.50 \pm 1.00$ , respectively), while the mean MN value of Group 4 seemed to three times the initial value at  $t = 0$  months (from  $8.75 \pm 0.96$  to  $37.50 \pm 1.00$ ). The most affected group seemed to be Group 5, which showed a 7 times higher value at 12 months ( $60.75 \pm 1.71$ ) in comparison with that at  $t = 0$  months ( $8.25 \pm 1.89$ ).

Koller et al. studied the cytotoxic and genotoxic properties of GLY and Roundup in a buccal epithelial cell line, observing that Roundup was more active than GLY and induced cytotoxic effects due to membrane damage and impairment of mitochondrial functions [5]. This observation can be found in our results, as Group 5's (commercial GLY exposure group) MN counts at the end of the in vivo experiment ( $t = 12$  months) were almost twice as much as those of Group 4 (pure GLY exposure group). The commercial form of GLY (Roundup) contains additives including the adjuvant POEA, which is proven to cause excessive genomic damage [6], a fact that may justify the difference between Groups 4 and 5.

At all sampling time points, Group 3 ( $8.50 \pm 1.00$ – $45.75 \pm 1.71$ ) presented higher MN counts than Group 2 ( $7.75 \pm 0.50$ – $41.75 \pm 1.71$ ), but this did not correspond to the tenfold difference in the administered dosage. Interestingly, Group 3 presented greater MN counts than Group 4 ( $8.75 \pm 0.96$ – $37.50 \pm 1.00$ ), although they were not statistically significant. This difference in MN measurements is attributed to the extra substances (BPA, TCS, DEHP, MePB, PrPB and BuPB) that Group 3 contained in relation to Group 4 (pure GLY), concluding that there is a synergic additive effect of GLY with these compounds in MN counts.

The results from previous studies vary depending on the substances of exposure. Duarte et al. observed increased MN frequencies when hepatic cells were exposed to TCS and DEHP separately. However, when exposed in combination, no induced micronuclei formation was observed, while cell viability seemed to be negatively affected [25]. On the other hand, experiments on the exposure of hepatocytes to a mixture of bisphenols revealed increased cytotoxicity with MN formation, but no such effects were observed when hepatocytes were exposed to individual bisphenols [26].

It is worth noting that Group 5 was the most impacted exposure group concerning MN formation ( $8.25 \pm 1.89$ – $60.75 \pm 1.71$ ), where it had almost twice the MN counts of Group 4 ( $8.75 \pm 0.96$ – $37.50 \pm 1.00$ ). Although Groups 4 and 5 were administered the same dose of GLY, the former contained pure GLY, while the latter contained all the adjuvants included in the commercial form of GLY (Roundup). One of these adjuvants is POEA, the toxicity of which has been proven in animal experiments [8,27]. Notably, the results retrieved from experiments on juvenile fish indicated its ability to be genotoxic, induce lipid peroxidation and unbalance the redox status [28].

The comet assay results showed that Group 3 had a higher tail intensity value ( $12.58 \pm 1.90$ ), which was significantly different from that of Group 2 ( $8.67 \pm 1.10$ ), suggesting a dose-dependent damage, as these two groups had a tenfold difference in the administered dosage. The same trend was observed in previous studies when fish and human lymphocytes were exposed to GLY, TCS and PBs individually [15,29,30]. Groups 4 and 5 showed no significant difference, indicating that the additives of the commercial form of GLY had no additive effect on the tail intensity. However, Groups 3 and 4 presented statistically significant differences in the mean tail intensity values ( $12.58 \pm 1.90$  and  $9.52 \pm 1.66$ , respectively), indicating a synergic effect of GLY, BPA, TCS, DEHP, MePB, PrPB and BuPB on the tail intensity. Previously, comet assay tests on murine cell lines exposed to GLY, Roundup and POEA showed that the inhibitory potency followed the order POEA > Roundup > GLY [31]. The differences in bibliographic data can be explained by the limited number of studies and the diversified exposure groups.

The correlation of the tail intensity with the MN counts at 12 months of exposure showed statistically significant associations among the exposure groups ( $p < 0.001$ ). Both the tail intensity and MN counts showed a time-dependent response, while some of the groups also responded in a dose-dependent manner. In previous studies, the target compounds GLY, BPA, TCS, DEHP and PBs seemed to have detrimental effects on the MN counts, which increased with increasing exposure period and dose [3,21,30,32,33], but the tail intensity did not respond to this trend in the same capacity [6].

All of the target substances of the current study seemed to present genotoxic activity. In previous studies, TCS has shown a dose-dependent genotoxic effect in different organisms, gradually increasing the tail intensity and micronuclei formation [29,34] or even leading to complete nuclei dissolution at high exposure doses [35]. *In vitro* experiments have proven that PBs' cytotoxic and genotoxic effects induce MN formation and increase tail intensity in a concentration-dependent manner [30]. Both phthalates and BPA have also been proven to be genotoxic and negatively affect chromosomes and tail length, in a dose-dependent manner [36–39]. Furthermore, the induced DNA damage and cellular proliferation have been attributed to DEHP exposure. In particular, exposure of rats to DEHP led to elevated comet tail moments in both the cells and thyroid tissue of juvenile rats [40].

Similar research studying the genotoxic effects of pesticides observed significant differences with increasing exposure time [41,42]. Vardavas et al. noticed significant increases in binucleated MN after the exposure of rabbits to cypermethrin. The induced genotoxicity was accompanied by histopathological lesions as well as liver and kidney inflammation [41]. Likewise, Stivaktakis et al. found differences in the MN counts between control groups and groups of rabbits exposed to imidacloprid, but there was no time dependence of the genotoxic effect [42]. This fact can be explained by the application of detoxification mechanisms, possible metabolism of the xenobiotics and DNA damage repair [43].

For the sake of argument, micronuclei formation and generation of DNA strand breaks directly affect the functions of cells, provoking problems in the organism [14]. Our results indicate that mixtures of EDCs have a greater negative impact on DNA, a fact that emphasizes the danger posed by daily exposure to these substances and the need for further research in this field.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. In Vivo Experiment

The in vivo experiment has been described in detail previously [44]. In brief, 20 New Zealand albino rabbits, 10 males and 10 females, 3–4 months old, weighing approximately 3 kg each, were divided into 5 treatment groups of 4 animals each. The details of the groups and doses are presented in Table 1. The substances were orally administered to the rabbits once a day, 7 days per week, for 12 months. Solutions of the substances dissolved in 5% ethanol/water were prepared and mixed with the rabbits' food in specific amounts (final daily amount of ethanol was less than 0.5%). The dose calculation was based on the established acceptable daily intakes (ADIs) of the substances set by authorized services. The control group (Group 1) received a normal diet (water, pellets, corn oil with 5% ethanol/water). This research has been registered in the Animal Study Registry (DOI: 10.17590/asr.0000259). The protocol was approved by the Committee of Ethics and Academic and Scientific Deontology of the University of Medicine and Pharmacy of Craiova (4/17.01.2020).

### 4.2. Reagents

GLY (PESTANAL<sup>®</sup>, analytical standard, CAS number: 1071-83-6), MePB (Methyl 4-hydroxybenzoate) (ReagentPlus<sup>®</sup>, ≥99.0%, crystalline, CAS number: 99-76-3), PrPB (Propyl 4-hydroxybenzoate) (≥99%, CAS number: 94-13-3), BuPB (Butyl 4-hydroxybenzoate) (≥99.0% (GC), CAS number: 94-26-8), BPA (>99%, CAS number: 80-05-7) and DEHP (PESTANAL<sup>®</sup>, analytical standard, CAS Number: 117-81-7) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). TCS (100%) and ethanol absolute (≥99.8%, CAS number: 64-17-5) were obtained from Honeywell-Fluka (Seelze, Germany), methanol (≥99.8%, CAS number: 67-56-1) was obtained from Honeywell-Riedel de Haën (Seelze, Germany) and acetic acid glacial (≥99.7%, CAS Number: 64-19-7) was obtained from VWR (Radnor, PA, USA).

DPX mountant for histology was purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA), while KaryoMAX™ Giemsa Stain Solution (CAS Number: 67-56-1) and PHA (Ref. number: 10576-015) were purchased from Gibco™ (Dreieich, Germany). FBS and HAM were obtained from Biowest (Nuaille, France), and cytochalasin b (CAS number: 14930-96-2) was obtained from Acros Organics (Geel, Belgium). Ultrapure water (ddH<sub>2</sub>O) was produced using a Direct-Q 3UV water purification system (Merck, Darmstadt, Germany).

Dimethyl sulfoxide (for molecular biology, CAS number: 67-68-5), ethidium bromide (95% HPLC, CAS No.: 1239-45-8), sodium chloride (≥99% (titration), CAS No.: 7647-14-5), Na<sub>2</sub>EDTA (98.5–101.5% (titration), CAS No.: 6381-92-6), trizma base (≥99.9% (titration), CAS Number: 77-86-1), phosphate-buffered saline (tablet), Triton™ X-100 (laboratory grade, CAS Number: 9036-19-5) and trypan blue test (0.4%, for microscopy, CAS Number: 72-57-1) were purchased from Sigma-Aldrich (Gillingham, UK).

Finally, NMA (Catalog number: 16500100) and LMA (Catalog number: 16520100) were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

The acceptable daily intake (ADI) for various chemicals is determined by the European Food Safety Authority (EFSA) and the related service in Canada. The EFSA has set the ADI to 0.004 mg/kg of bw/day for BPA [45], 0.5 mg/kg of bw/day for BuPB, 5 mg/kg of bw/day for MePB and 5 mg/kg of bw/day for PrPB [46]. The ADI for total phthalates is up to 0.05 mg/kg of bw/day [47], and the ADI for glyphosate is up to 0.5 mg/kg of bw/day [48]. The Environment and Climate Change Canada and the Health Canada services have defined the ADI for TCS as 0.08 mg/kg of bw/day [49].



#### 4.3. Micronuclei Assay

The micronuclei assay procedure has been described in detail previously [22,50]. The sampling was conducted every 3 months ( $t = 0, 3, 6, 9, 12$  months). Blood samples (from the jugular vein) were collected in heparin tubes and stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. In brief, 0.5 mL of each blood sample was mixed with 6.5 mL of HAM medium, 1.5 mL of FBS, 0.3 mL of phytohemagglutinin (PHA) and 0.1 mL of antibiotic. The cell culture was prepared under sterile conditions in special cell culture flasks and placed into an incubator at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  with a 5%  $\text{CO}_2$  supply. After incubation for 44 h, 20  $\mu\text{L}$  of cytochalasin b was added to each cell culture, which was then placed back into the incubator for 28 h (72 h of incubation in total).

The next step was cell fixation, firstly with 4 mL of hypotonic solution ( $\text{ddH}_2\text{O}:\text{HAM}$  1:1) and then with 4 mL of fixative solution ( $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}$  3:1). Washes with fixative solution were repeated until the liquid was clear. After the final centrifugation, most of the supernatant was removed, and the pellet was gently resuspended with the 0.5 mL of supernatant that remained. The cells were then placed on slides by dripping two drops of the solution on each slide. For each cell culture, 3 slides were prepared. The slides were left to air-dry overnight.

The slides were then submerged in 15% Giemsa solution for 20 min, followed by  $\text{ddH}_2\text{O}$  for a few seconds immediately after, and finally left to air-dry for 2 h. When the slides were completely dry, DPX mountant was used to glue the coverslips to each slide. The slides were left to air-dry overnight and were then ready for microscope measurement.

Slides were examined with an optical microscope at  $100\times$  magnification using cedar oil as the immersion oil. For each animal, micronuclei were scored in 1000 binucleated cells. The number of binucleated cells that contained micronuclei was also counted. The scoring criteria for selecting binucleated cells that can be scored for MN frequency were described in detail by Michael Fenech [51]. In order to determine additional possible cytotoxic effects, the cytokinesis-block proliferation index (CBPI) was also calculated. Counting 2000 cells and based on the equation  $\text{CBPI} = [M_1 + 2M_2 + 3(M_3 + M_4)]/N$ , where  $M_1, M_2, M_3$  and  $M_4$  correspond to the number of cells with one, two, three and four nuclei, respectively, and  $N$  is the total number of cells, the CBPI is a useful index for determining additional cytotoxic effects [52].

#### 4.4. Comet Assay

Venous blood samples (from the jugular vein) were collected during the last sampling ( $t = 12$  months) in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and then 200  $\mu\text{L}$  aliquots were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After the addition of 1 mL cold phosphate-buffered saline (PBS) to 100  $\mu\text{L}$  whole blood, lymphocyte isolation was achieved using lymphocyte separation medium at the bottom of the tube and centrifuged immediately at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 3 min at  $200\times g$ . Lymphocytes were obtained from the layer that appeared between the blood plasma and the lymphocyte separation medium after centrifugation. The cell viability, as assessed via the trypan blue test, was more than 97% for all samples. Each analysis was conducted in triplicate for this study.

The alkaline comet assay technique has been previously described in detail [53–55]. Shortly after the preparation of the slides, they were treated with 0.65% normal melting agarose (NMA) prepared in PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Mg}^{2+}$ -free). Isolated lymphocytes were mixed with 100  $\mu\text{L}$  LMA at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  to form a cell suspension. After gently removing the coverslip, the slides were immersed in cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 10 mM Tris, pH = 10) including 1% Triton X and 10% DMSO overnight.

The slides were then removed from the lysing solution, drained and placed in a horizontal gel electrophoresis tank near the anode. Electrophoresis was performed at 1.6 V/cm for 20 min (300 mA) at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  room temperature under dimmed light.

After electrophoresis, the slides were taken from the tank. Tris buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) was gently added drop-wise, and the slides were allowed to sit for 5 min; this procedure was repeated three times.

Each slide was stained with 50  $\mu$ L ethidium bromide and stored in a humidified air-tight container until being analyzed within 3–4 h. In total, 3 slides prepared for each subject and 100 cells per subject were analyzed at  $\times 400$  magnification, under an Olympus fluorescent microscope equipped with an excitation filter of 546 nm and a barrier filter of 590 nm. The Comet Assay IV image analysis system (Perceptive Instruments) was used blindly by one slide reader in order to score DNA damage. The analysis software (Comet Assay IV, <https://www.instem.com/solutions/genetic-toxicology/comet-assay.php>, accessed on 12 May 2023) provides automated analysis of comet size, shape and the amount of DNA that has been formed due to the fragmentation. Specifically, it provides a range of parameters including the tail length, tail intensity and tail moment [56]. The tail intensity is defined as the percentage of DNA that migrates to the tail, and it is a widely favored measurement for the comet assay because of its advantages. Therefore, this parameter was selected for measuring DNA damage at the single-cell level [56].

#### 4.5. Statistical Methods

The tail intensity is expressed as the mean and standard deviation, while median values are also used. One-way analysis of variance (one-way ANOVA) was applied to examine differences in the intensity or micronuclei counts between exposure groups, while additional Kruskal–Wallis analyses were performed. Spearman's  $r_s$  coefficients were applied to examine associations between the intensity and micronuclei counts. LSD (least square differences) adjusted t-tests followed by ANOVA were performed for the pairwise comparisons between groups. Repeated measures ANOVA using the exposure groups as factors was applied to establish associations between micronuclei counts at baseline and 3, 6 and 12 months after the experiment and the glyphosate exposure groups.

IBM SPSS Statistics 24.0 was used for statistical analysis of the data, and  $\alpha = 0.05$  was set as the level of significance.

## 5. Conclusions

In the last five years, the European Union has made substantial efforts in EDC testing and screening methods to identify endocrine-disrupting chemicals, coordinating a cluster group of eight research projects (EURION) [57]. In the current study, we aimed to determine the DNA damage caused to rabbits' lymphocytes after 12-month exposure to GLY, BPA, MePB, PrPB, MePB, TCS and DEHP using two different approaches: micronuclei assay and comet assay. The results from the different samplings through the *in vivo* experiment showed that MN formation increased in a dose- and time-dependent manner. The same also applied to the tail intensity, but this was only related to the dose, as there was only one sampling (the last one). Group 3 seemed to be the most affected regarding the tail intensity, probably due to the synergic effect of the administered substances. In all exposure groups, the MN counts were positively associated with the tail intensity. This study is one of the few that have attempted to identify the risks that exposure to both low and high dose levels of EDC mixtures pose to humanity. There is a great way forward for science in order to thoroughly investigate the real-life risks.

**Author Contributions:** Investigation, validation, formal analysis, writing—original draft, V.K.; methodology, data curation, writing—review and editing, E.O.; supervision, methodology, data curation, M.N.T.; methodology, E.V. and I.F.; resources, methodology, A.K. (Aikaterini Kalliantasi), C.C., P.S. and A.K. (Aikaterini Karzi); formal analysis, data curation, A.A.; conceptualization, visualization, writing—review and editing, A.M., A.O.D., D.C. and A.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Committee of Ethics and Academic and Scientific Deontology of the University of Medicine and Pharmacy of Craiova (4/17 January 2020) and has been registered in the Animal Study Registry (DOI: 10.17590/asr.0000259 (accessed on 1 June 2022)).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to ethical and privacy restrictions.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Tsatsakis, A.M.; Docea, A.O.; Tsitsimpikou, C. New Challenges in Risk Assessment of Chemicals When Simulating Real Exposure Scenarios; Simultaneous Multi-Chemicals' Low Dose Exposure. *Food Chem. Toxicol.* **2016**, *96*, 174–176. [CrossRef]
2. Goumenou, M.; Djordjevic, A.B.; Vassilopoulou, L.; Tsatsakis, A.M. Chapter 14—Endocrine Disruption and Human Health Risk Assessment in the Light of Real-Life Risk Simulation. In *Toxicological Risk Assessment and Multi-System Health Impacts from Exposure*; Tsatsakis, A.M., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2021; pp. 147–162. ISBN 978-0-323-85215-9.
3. Tsatsakis, A.; Tyshko, N.V.; Docea, A.O.; Shestakova, S.I.; Sidorova, Y.S.; Petrov, N.A.; Zlatian, O.; Mach, M.; Hartung, T.; Tutelyan, V.A. The Effect of Chronic Vitamin Deficiency and Long Term Very Low Dose Exposure to 6 Pesticides Mixture on Neurological Outcomes—A Real-Life Risk Simulation Approach. *Toxicol. Lett.* **2019**, *315*, 96–106. [CrossRef]
4. Hernández, A.F.; Docea, A.O.; Goumenou, M.; Sarigiannis, D.; Aschner, M.; Tsatsakis, A. Application of Novel Technologies and Mechanistic Data for Risk Assessment under the Real-Life Risk Simulation (RLRS) Approach. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *137*, 111123. [CrossRef] [PubMed]
5. Koller, V.J.; Fürhacker, M.; Nersisyan, A.; Mišik, M.; Eisenbauer, M.; Knasmueller, S. Cytotoxic and DNA-Damaging Properties of Glyphosate and Roundup in Human-Derived Buccal Epithelial Cells. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86*, 805–813. [CrossRef]
6. Lopes, A.; Benwindo-Souza, M.; Carvalho, W.F.; Nunes, H.F.; de Lima, P.N.; Costa, M.S.; Benetti, E.J.; Guerra, V.; Saboia-Morais, S.M.T.; Santos, C.E.; et al. Evaluation of the Genotoxic, Mutagenic, and Histopathological Hepatic Effects of Polyoxyethylene Amine (POEA) and Glyphosate on *Dendropsophus Minutus* Tadpoles. *Environ. Pollut.* **2021**, *289*, 117911. [CrossRef]
7. Van Bruggen, A.H.C.; He, M.M.; Shin, K.; Mai, V.; Jeong, K.C.; Finckh, M.R.; Morris, J.G. Environmental and Health Effects of the Herbicide Glyphosate. *Sci. Total Environ.* **2018**, *616–617*, 255–268. [CrossRef]
8. Mikó, Z.; Hettyey, A. Toxicity of POEA-Containing Glyphosate-Based Herbicides to Amphibians Is Mainly Due to the Surfactant, Not to the Active Ingredient. *Ecotoxicology* **2023**, *32*, 150–159. [CrossRef]
9. Nowak, K.; Ratajczak-Wrona, W.; Górska, M.; Jabłońska, E. Parabens and Their Effects on the Endocrine System. *Mol. Cell Endocrinol.* **2018**, *474*, 238–251. [CrossRef] [PubMed]
10. Weatherly, L.M.; Gosse, J.A. Triclosan Exposure, Transformation, and Human Health Effects. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* **2017**, *20*, 447–469. [CrossRef] [PubMed]
11. Rowdhwal, S.S.S.; Chen, J. Toxic Effects of Di-2-Ethylhexyl Phthalate: An Overview. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 1750368. [CrossRef]
12. Ma, Y.; Liu, H.; Wu, J.; Yuan, L.; Wang, Y.; Du, X.; Wang, R.; Marwa, P.W.; Petlulu, P.; Chen, X.; et al. The Adverse Health Effects of Bisphenol A and Related Toxicity Mechanisms. *Environ. Res.* **2019**, *176*, 108575. [CrossRef]
13. Tzatzarakis, M.N.; Karzi, V.; Vakonaki, E.; Goumenou, M.; Kavvalakis, M.; Stivaktakis, P.; Tsitsimpikou, C.; Tsakiris, I.; Rizos, A.K.; Tsatsakis, A.M. Bisphenol A in Soft Drinks and Canned Foods and Data Evaluation. *Food Addit. Contam. Part B* **2017**, *10*, 85–90. [CrossRef] [PubMed]
14. Amir, S.; Shah, S.T.A.; Mamoulakis, C.; Docea, A.O.; Kalantzi, O.-I.; Zachariou, A.; Calina, D.; Carvalho, F.; Sofikitis, N.; Makrigiannakis, A.; et al. Endocrine Disruptors Acting on Estrogen and Androgen Pathways Cause Reproductive Disorders through Multiple Mechanisms: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 1464. [CrossRef] [PubMed]
15. Ayanda, O.I.; Tolulope, A.; Oniye, S.J. Mutagenicity and Genotoxicity in Juvenile African Catfish, *Clarias Gariepinus* Exposed to Formulations of Glyphosate and Paraquat. *Sci. Prog.* **2021**, *104*, 003685042110217. [CrossRef] [PubMed]
16. Tsatsakis, A.; Docea, A.O.; Constantin, C.; Calina, D.; Zlatian, O.; Nikolouzakis, T.K.; Stivaktakis, P.D.; Kalogeraki, A.; Liesivuori, J.; Tzanakakis, G.; et al. Genotoxic, Cytotoxic, and Cytopathological Effects in Rats Exposed for 18 Months to a Mixture of 13 Chemicals in Doses below NOAEL Levels. *Toxicol. Lett.* **2019**, *316*, 154–170. [CrossRef]
17. Ilyushina, N.A.; Egorova, O.V.; Masaltsev, G.V.; Averianova, N.S.; Revazova, Y.A.; Rakitskii, V.N.; Goumenou, M.; Vardavas, A.; Stivaktakis, P.; Tsatsakis, A. Genotoxicity of Mixture of Imidacloprid, Imazalil and Tebuconazole. *Toxicol. Rep.* **2020**, *7*, 1090–1094. [CrossRef]
18. Li, X.; Yin, P.; Zhao, L. Effects of Individual and Combined Toxicity of Bisphenol A, Dibutyl Phthalate and Cadmium on Oxidative Stress and Genotoxicity in HepG 2 Cells. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *105*, 73–81. [CrossRef]
19. Falfushynska, H.; Khatib, I.; Kasianchuk, N.; Lushchak, O.; Horyn, O.; Sokolova, I.M. Toxic Effects and Mechanisms of Common Pesticides (Roundup and Chlorpyrifos) and Their Mixtures in a Zebrafish Model (*Danio Rerio*). *Sci. Total Environ.* **2022**, *833*, 155236. [CrossRef]
20. Dinca, V.; Docea, A.O.; Drocas, A.I.; Nikolouzakis, T.K.; Stivaktakis, P.D.; Nikitovic, D.; Golokhvast, K.S.; Hernandez, A.F.; Calina, D.; Tsatsakis, A. A Mixture of 13 Pesticides, Contaminants, and Food Additives below Individual NOAELs Produces Histopathological and Organ Weight Changes in Rats. *Arch. Toxicol.* **2023**, *97*, 1285–1298. [CrossRef]
21. Al-Saleh, I.; Al-Rajudi, T.; Al-Qudaihi, G.; Manogaran, P. Evaluating the Potential Genotoxicity of Phthalates Esters (PAEs) in Perfumes Using in Vitro Assays. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2017**, *24*, 23903–23914. [CrossRef]



22. Stivaktakis, P.; Vlastos, D.; Giannakopoulos, E.; Matthopoulos, D.P. Differential Micronuclei Induction in Human Lymphocyte Cultures by Imidacloprid in the Presence of Potassium Nitrate. *Sci. World J.* **2010**, *10*, 80–89. [CrossRef]
23. Ozcagli, E.; Alpertunga, B.; Fenga, C.; Berktaş, M.; Tsitsimpikou, C.; Wilks, M.E.; Tsatsakis, A.M. Effects of 3-Monochloropropane-1,2-Diol (3-MCPD) and Its Metabolites on DNA Damage and Repair under in Vitro Conditions. *Food Chem. Toxicol.* **2016**, *89*, 1–7. [CrossRef]
24. Vardavas, A.I.; Ozcagli, E.; Fragkiadaki, P.; Stivaktakis, P.D.; Tzatzarakis, M.N.; Alegakis, A.K.; Vasilaki, E.; Kaloudis, K.; Tsiaoussis, J.; Kouretas, D.; et al. The Metabolism of Imidacloprid by Aldehyde Oxidase Contributes to Its Clastogenic Effect in New Zealand Rabbits. *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2018**, *829–830*, 26–32. [CrossRef] [PubMed]
25. Duarte, N.d.A.A.; de Lima, L.E.; Maraslis, E.T.; Kundi, M.; Nunes, E.A.; Barcelos, G.R.M. Acute Toxicity and DNA Instability Induced by Exposure to Low Doses of Triclosan and Phthalate DEHP, and Their Combinations, in Vitro. *Front. Genet.* **2021**, *12*, 649845. [CrossRef] [PubMed]
26. Yu, H.; Liu, Y. Impact of Extended and Combined Exposure of Bisphenol Compounds on Their Chromosome-Damaging Effect—Increased Potency and Shifted Mode of Action. *Environ. Sci. Technol.* **2023**, *57*, 498–508. [CrossRef] [PubMed]
27. Mesnage, R.; Ferguson, S.; Brandsma, I.; Moelijker, N.; Zhang, G.; Mazzacava, F.; Caldwell, A.; Halket, J.; Antoniou, M.N. The Surfactant Co-Formulant POEA in the Glyphosate-Based Herbicide RangerPro but Not Glyphosate Alone Causes Necrosis in Caco-2 and HepG2 Human Cell Lines and ER Stress in the ToxTracker Assay. *Food Chem. Toxicol.* **2022**, *168*, 113380. [CrossRef] [PubMed]
28. Navarro, C.D.C.; Martínez, C.B.R. Effects of the Surfactant Polyoxyethylene Amine (POEA) on Genotoxic, Biochemical and Physiological Parameters of the Freshwater Teleost *Prochilodus Lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *165*, 83–90. [CrossRef] [PubMed]
29. Wang, F.; Xu, R.; Zheng, F.; Liu, H. Effects of Triclosan on Acute Toxicity, Genetic Toxicity and Oxidative Stress in Goldfish (*Carassius auratus*). *Exp. Anim.* **2018**, *67*, 219–227. [CrossRef]
30. Güzel Bayülken, D.; Ayaz Tüylü, B.; Sinan, H.; Sivas, H. Investigation of Genotoxic Effects of Paraben in Cultured Human Lymphocytes. *Drug Chem. Toxicol.* **2019**, *42*, 349–356. [CrossRef]
31. Oláh, M.; Farkas, E.; Székács, L.; Horváth, R.; Székács, A. Cytotoxic Effects of Roundup Classic and Its Components on NE-4C and MC3T3-E1 Cell Lines Determined by Biochemical and Flow Cytometric Assays. *Toxicol. Rep.* **2022**, *9*, 914–926. [CrossRef]
32. Hemalatha, D.; Nataraj, B.; Rangasamy, B.; Shobana, C.; Ramesh, M. DNA Damage and Physiological Responses in an Indian Major Carp *Labeo Rohita* Exposed to an Antimicrobial Agent Triclosan. *Fish Physiol. Biochem.* **2019**, *45*, 1463–1484. [CrossRef]
33. Martínez-Paz, P.; Morales, M.; Martínez-Guitarte, J.L.; Morcillo, G. Genotoxic Effects of Environmental Endocrine Disruptors on the Aquatic Insect *Chironomus Riparius* Evaluated Using the Comet Assay. *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2013**, *758*, 41–47. [CrossRef]
34. Gyimah, E.; Dong, X.; Qiu, W.; Zhang, Z.; Xu, H. Sublethal Concentrations of Triclosan Elicited Oxidative Stress, DNA Damage, and Histological Alterations in the Liver and Brain of Adult Zebrafish. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 17329–17338. [CrossRef]
35. Cirigliola, C.; Cascone, C.; Giudice, R.L.; Pinto, G.; Pollio, A. Application of Methods for Assessing the Geno- and Cytotoxicity of Triclosan to *C. Ehenbergii*. *J. Hazard. Mater.* **2005**, *122*, 227–232. [CrossRef] [PubMed]
36. Durovcova, I.; Spackova, J.; Puskar, M.; Galova, E.; Sevcovicova, A. Bisphenol A as an Environmental Pollutant with Dual Genotoxic and DNA-Protective Effects. *Neuro Endocrin. Lett.* **2018**, *39*, 294–298. [PubMed]
37. Song, P.; Gao, J.; Li, X.; Zhang, C.; Zhu, L.; Wang, J.; Wang, J. Phthalate Induced Oxidative Stress and DNA Damage in Earthworms (*Eisenia Fetida*). *Environ. Int.* **2019**, *129*, 10–17. [CrossRef]
38. Afzal, G.; Ahmad, H.I.; Hussain, R.; Jamal, A.; Kiran, S.; Hussain, T.; Saeed, S.; un Nisa, M. Bisphenol A Induces Histopathological, Hematobiochemical Alterations, Oxidative Stress, and Genotoxicity in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2022**, *2022*, 5450421. [CrossRef]
39. Zheng, Y.; Zhou, K.; Tang, J.; Liu, C.; Bai, J. Impacts of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate on *Folsomia Candida* (Collembola) Assessed with a Multi-Biomarker Approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2022**, *232*, 113251. [CrossRef]
40. Kim, S.; Park, G.-Y.; Yoo, Y.J.; Jeong, J.S.; Nam, K.T.; Jee, S.-H.; Lim, K.-M.; Lee, Y.-S. Di-2-Ethylhexylphthalate Promotes Thyroid Cell Proliferation and DNA Damage through Activating Thyrotropin-Receptor-Mediated Pathways in Vitro and in Vivo. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *124*, 265–272. [CrossRef] [PubMed]
41. Vardavas, A.I.; Stivaktakis, P.D.; Tzatzarakis, M.N.; Fragkiadaki, P.; Vasilaki, E.; Tzardi, M.; Datseri, G.; Tsiaoussis, J.; Alegakis, A.K.; Tsitsimpikou, C.; et al. Long-Term Exposure to Cypermethrin and Piperonyl Butoxide Cause Liver and Kidney Inflammation and Induce Genotoxicity in New Zealand White Male Rabbits. *Food Chem. Toxicol.* **2016**, *94*, 250–259. [CrossRef]
42. Stivaktakis, P.D.; Kavvalakis, M.P.; Tzatzarakis, M.N.; Alegakis, A.K.; Panagiotakis, M.N.; Fragkiadaki, P.; Vakonaki, E.; Ozcagli, E.; Hayes, W.A.; Rakitskii, V.N.; et al. Long-Term Exposure of Rabbits to Imidacloprid as Quantified in Blood Induces Genotoxic Effect. *Chemosphere* **2016**, *149*, 108–113. [CrossRef] [PubMed]
43. Ghisi, N.d.C.; de Oliveira, E.C.; Prioli, A.J. Does Exposure to Glyphosate Lead to an Increase in the Micronuclei Frequency? A Systematic and Meta-Analytic Review. *Chemosphere* **2016**, *145*, 42–54. [CrossRef] [PubMed]
44. Karzi, V.; Tzatzarakis, M.N.; Alegakis, A.; Vakonaki, E.; Fragkiadoulaki, I.; Kaloudis, K.; Chalkiadaki, C.; Apalaki, P.; Panagiotopoulou, M.; Kalliantasi, A.; et al. In Vivo Estimation of the Biological Effects of Endocrine Disruptors in Rabbits after Combined and Long-Term Exposure: Study Protocol. *Toxics* **2022**, *10*, 246. [CrossRef] [PubMed]
45. Opinion on BPA | EFSA. Available online: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3978> (accessed on 27 April 2023).

46. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC) Related to Para Hydroxybenzoates (E 214-219) | EFSA. Available online: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/83> (accessed on 27 April 2023).
47. Update of the Risk Assessment of Di-butylphthalate (DBP), Butyl-benzyl-phthalate (BBP), Bis(2-ethylhexyl)Phthalate (DEHP), Di-isononylphthalate (DINP) and Di-isodecylphthalate (DIDP) for Use in Food Contact Materials | EFSA. Available online: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5838> (accessed on 27 April 2023).
48. Glyphosate. Available online: [https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/approval-active-substances/renewal-approval/glyphosate\\_en](https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/approval-active-substances/renewal-approval/glyphosate_en) (accessed on 27 April 2023).
49. Canada, H. Triclosan-Information Sheet. Available online: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/chemical-substances/fact-sheets/chemicals-glance/triclosan.html> (accessed on 27 April 2023).
50. Fenech, M. The Cytokinesis-Block Micronucleus Technique: A Detailed Description of the Method and Its Application to Genotoxicity Studies in Human Populations. *Mutat. Res.* **1993**, *285*, 35–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Fenech, M. The Advantages and Disadvantages of the Cytokinesis-Block Micronucleus Method. *Mutat. Res.* **1997**, *392*, 11–18. [[CrossRef](#)]
52. Surrallés, J.; Xamena, N.; Creus, A.; Catalán, J.; Norppa, H.; Marcos, R. Induction of Micronuclei by Five Pyrethroid Insecticides in Whole-Blood and Isolated Human Lymphocyte Cultures. *Mutat. Res.* **1995**, *341*, 169–184. [[CrossRef](#)]
53. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 184–191. [[CrossRef](#)]
54. Garaž-Vrhovac, V.; Zeljezic, D. Evaluation of DNA Damage in Workers Occupationally Exposed to Pesticides Using Single-Cell Gel Electrophoresis (SCGE) Assay. Pesticide Genotoxicity Revealed by Comet Assay. *Mutat. Res.* **2000**, *469*, 279–285. [[CrossRef](#)]
55. Özcagli, E.; Sardas, S.; Biri, A. Assessment of DNA Damage in Postmenopausal Women under Hormone Replacement Therapy. *Maturitas* **2005**, *51*, 280–285. [[CrossRef](#)]
56. Kumaravel, T.S.; Vilhar, B.; Faux, S.P.; Jha, A.N. Comet Assay Measurements: A Perspective. *Cell Biol. Toxicol.* **2009**, *25*, 53–64. [[CrossRef](#)]
57. Improving Identification of Endocrine Disruptors | EURION. Available online: <https://eurion-cluster.eu/> (accessed on 27 May 2023).

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.