



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
Φυσιολογίας
Ζωικών
Οργανισμών



ΤΜΗΜΑ
Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ “ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ
(ΗΠΑΡ, ΔΙΑΦΡΑΓΜΑ, ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ, ΨΟΪΤΗΣ) ΜΙΚΡΩΝ
ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**



ΑΛΕΞΙΟΥ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2024

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων): Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αρσένος Γεώργιος: Καθηγητής του Τμήματος Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Σκαπέρδα Ζωή- Βασιλική: Εντεταλμένη Διδάσκουσα του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία διεξήχθη τα ακαδημαϊκά έτη 2019-2021 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, κ. Δημητρίου Κουρέτα στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος της Τοξικολογίας του εν λόγω τμήματος.

Σκοπός της εργασίας ήταν η προσπάθεια εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας – άμυνας σε τέσσερις διαφορετικούς ιστούς (ήπαρ, διάφραγμα, ψοϊτης, τετρακέφαλος) μικρών μηρυκαστικών (αίγα, πρόβατο). Ο τύπος εκτροφής, το είδος και η ηλικία των ζώων, το στάδιο παραγωγής που βρίσκεται το ζώο σε συνδυασμό με την διατροφή του και τις περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν την εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων και συνδέονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα όχι μόνο των προαναφερθέντων ιστών αλλά του οργανισμού ως σύνολο και κατ' επέκταση την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων στην προκειμένη περίπτωση του κρέατος αλλά και του γάλακτος.

Για τον προσδιορισμό των βασικών επιπέδων οξειδοαναγωγικής κατάστασης των δειγμάτων ιστών χρησιμοποιήθηκαν σφάγια αιγών και προβάτων ελληνικών εκτροφών στην εξέταση των οποίων εφαρμόστηκαν συγκεκριμένα βιοχημικά πρωτόκολλα όπως περιγράφονται στη συνέχεια ευελπιστώντας ως συνέχεια τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων μας με την ποιότητα του παραγόμενου κρέατος και τη σύνδεση αυτών με την αγορά και κατά πόσο μπορούμε να παρέμβουμε βελτιώνοντας με τη χρήση βιοδεικτών την ποιότητα αυτή.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ξεκινώντας με καλούς οiwονούς και σε ώριμη ηλικία το δεύτερο κατά σειρά μεταπτυχιακό το 2019 με κίνητρο τη μάθηση και την απόδραση από τη ρουτίνα εμφανίστηκαν στην πορεία οι συμπληγάδες πέτρες...με κυριότερο εμπόδιο την καραντίνα ευρισκόμενος ξαφνικά από τις αίθουσες διδασκαλίας πίσω από την οθόνη ενός υπολογιστή σκέφτηκα το δις εξ αμαρτείν ούκ ανδρός σοφού αλλά παρα ταύτα επέμεινα με πολλές καθυστερήσεις και εμπόδια στη συγγραφή αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ τους γονείς μου, τους συναδέλφους μου και όσους ανέχθηκαν τις συχνές απουσίες μου από τα καθημερινά μου καθήκοντα και τα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τους συμφοιτητές μου στο μεταπτυχιακό που ανέχθηκαν.....την παρουσία μου χωρίς να κατανοεί κανείς τους την απόφαση μου να κάνω ένα μεταπτυχιακό στα τότε 36 μου χρόνια.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Κ. Κουρέτα Δημήτριο ως επιβλέποντα αυτής της εργασίας και στις κ. Μακρή Σωτηρίνα, Σκαπέρδα Ζωή, Αλβανού Μαρία και Πατούνα Αναστασία που με βοήθησαν να ξεπεράσω τις όποιες... μαθησιακές μου δυσκολίες και να περατώσω αυτή την εργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή	2
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	11
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	13
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1.1 Ελεύτερες ρίζες	15
1.1.1 Τρόπος παραγωγής των ελευθέρων ριζών	15
1.1.2 Δραστικές μορφές	17
1.1.2.1 Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species)	17
1.1.2.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου (Reactive Nitrogen Species)	18
1.1.2.3. Δραστικές μορφές θείου	20
1.2 Δημιουργία δραστικών μορφών in vivo	21
1.2.1. Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	21
1.2.1.1. Μιτοχόνδρια	23
1.2.1.2 Φαγοκυττάρωση – Αναπνευστική έκρηξη	24
1.2.1.3. Υπεροξειδιοσώματα	25
1.2.1.4. Οξειδάσες της ξανθίνης	25
1.2.1.5. Αιμοσφαιρίνη	26
1.2.2. Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	26
1.3. Βιολογική δράση ελευθέρων ριζών	27
1.3.1. Αρνητικές επιδράσεις	28
1.3.1.1. Επιδράσεις στα νουκλεϊκά οξέα	29
1.3.1.2. Επιδράσεις στα λιπίδια	30
1.3.1.3. Επιδράσεις στις πρωτεΐνες	31
1.3.2. Θετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών	32
1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	33
1.4.1. Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	35
1.4.1.1. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	35
1.4.1.2. Καταλάση (CAT)	35

1.4.1.3.Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)	36
1.4.1.4. Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)	36
1.4.2. Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	36
1.4.2.1. Γλουταθειόνη (GSH)	36
1.4.2.2 Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ)	37
1.4.2.3 Βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)	37
1.4.2.4 Πολυφαινόλες	37
1.4.2.5 Ουβικινόνη ή συνένζυμο Q	38
1.4.2.6 Ουρικό οξύ	38
1.5. Οξειδωτικό στρες	38
1.5.1 Οξειδωτικό στρες και υγεία μηρυκαστικών	39
1.5.2 Οξειδωτικό στρες και στάδια ανάπτυξης	40
1.5.2.1 Από το κύημα στο θηλασμό	42
1.5.2.2. Απογαλακτισμός και ενήβωση	43
1.5.2.3. Οξειδωτικό στρες και ανάπτυξη	44
2. Σκοπός	46
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
3.1 Πειραματικός σχεδιασμός	47
3.2 Δειγματοληψία	47
3.2.1 Επεξεργασία ιστών - Ομογενοποίηση	48
3.3 Μέθοδοι	48
3.3.1 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη χρήση του αντιδραστηρίου Bradford	48
3.3.2. Προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης(GSH)	49
3.3.3. Προσδιορισμός του ρυθμού αποικοδόμησης του H ₂ O ₂ μέσω της δραστηριότητας του ενζύμου της καταλάσης	50
3.3.4. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC- TotalAntioxidantCapacity)	51
3.3.5. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	53
3.3.6. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων	55
3.4 Στατιστική Ανάλυση	56
4. Αποτελέσματα	58
4.1 Επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)	58

4.2 Ρυθμός αποικοδόμησης H_2O_2 μέσω της δραστηριότητας του ενζύμου της Καταλάσης (CAT)	59
4.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)	61
4.4 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	63
4.5 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS)	65
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	68
Βιβλιογραφία	76

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με την κλιματική αλλαγή και τις επακόλουθες φυσικές καταστροφές να γίνονται πλέον αισθητές, την αύξηση του κόστους παραγωγής, τις συνθήκες ευζωίας των ζώων και της βιοασφάλειας, τα κινήματα ακτιβισμού και τις αναδυόμενες ασθένειες, η παραγωγικότητα των εκτρεφόμενων ζώων με τον ίδιο ή μικρότερο αριθμό, ολοένα και αυξάνεται, αξιοποιώντας με τον καλύτερο δυνατό τρόπο τους διαθέσιμους φυσικούς πόρους. Έτσι αυξάνεται η δυνατότητα παραγωγής όλο και πιο ποιοτικών, για τον καταναλωτή, προϊόντων και την επίτευξη καλύτερης τιμής παραγόμενου προϊόντος για τον κτηνοτρόφο. Στην παρούσα εργασία, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα οξειδοαναγωγικής κατάστασης στους ιστούς μικρών μηρυκαστικών (αιγών και προβάτων) σε τέσσερα στάδια ανάπτυξης: θηλάζοντα (25%), απογαλακτισμένα (35%), νεαρά ενήλικα (70%) και ενήλικα (100%) με κριτήριο την ηλικία τους και το σωματικό τους βάρος. Οι ιστοί που μελετήθηκαν είναι το ήπαρ, ο ψοίτης μυς, ο τετρακέφαλος μυς και το διάφραγμα και οι δείκτες που εκτιμήθηκαν, αφορούσαν την αντιοξειδωτική ικανότητα, και την οξείδωση σημαντικών βιομορίων όπως είναι τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες. Όσον αφορά τα αποτελέσματα στις αίγες, στατιστικώς σημαντικές μεταβολές παρατηρήθηκαν στο οξειδοαναγωγικό προφίλ των εξετασθέντων ιστών στο πρώτο στάδιο ανάπτυξης. Συγκεκριμένα οι δείκτες που σχετίζονται τόσο με την αντιοξειδωτική ικανότητα (GSH, CAT, TAC), όσο και με οξειδωτικές βλάβες σε λιπίδια και πρωτεΐνες (TBARS, CARBS) ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένοι στα δύο τελευταία στάδια ανάπτυξης. Στα πρόβατα οι δείκτες δεν φάνηκε να ακολουθούν ένα σταθερό μοτίβο ανά στάδιο ανάπτυξης στους διάφορους ιστούς. Επιπλέον, η εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής ικανότητας των εκτρεφόμενων ζώων, εν προκειμένω των μικρών μηρυκαστικών θα μπορούσε να συνδεθεί με την ευζωία, τις συνθήκες εκτροφής τους και την ποιότητα του σιτηρεσίου τους. Σε αυτό μπορούν να συμβάλλουν λιγότερο επεμβατικές μέθοδοι όπως η εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο αίμα και στο γάλα. Περαιτέρω έρευνα για την εξαγωγή συμπερασμάτων θα μπορούσε να συμβάλει και στην προστιθέμενη αξία του παραγόμενου κρέατος.

ABSTRACT

With the effects of climate change and the ensuing natural disasters already felt, growing production costs, conditions for animal welfare and biosecurity, activist movements, and new diseases, farmed animals are becoming more productive in the same or smaller numbers while utilizing the natural resources that are available to them. As a result, there is a greater chance that consumers will receive products of ever-higher quality and that farmers will obtain better prices. In the present study, the redox levels in the tissues of small ruminants (goats and sheep) at four developmental stages: suckling (25%), weaned (35%), young adult (70%) and adult (100%), were evaluated according to their age and body weight. Diaphragm, liver, quadriceps muscle and psoas major were the tissues examined. The markers evaluated included antioxidant capacity and the oxidation of significant macromolecules, including proteins and lipids. Markers related to both antioxidant capacity (GSH, CAT, TAC) and oxidative damage to lipids and proteins (TBARS, CARBS) were statistically significantly decreased in the last two growth stages. Concerning sheep, the markers did not appear to exhibit a consistent pattern throughout the various tissues according to growth stage. Concerning goats, the markers did not appear to exhibit a consistent pattern throughout the various tissues according to growth stage. Additionally, the welfare, raising environment, and ration quality of farmed animals—in this study, small ruminants—may be related to the evaluation of their redox capacity. Less invasive methods such as assessing the redox status of blood and milk production can contribute to this. The additional value of the meat produced may also be increased by further investigation to reach conclusions.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου	18
Πίνακας 2. Δραστικές μορφές αζώτου	18
Πίνακας 3 Ευρεία έννοια "δραστικών μορφών θείου"(Giles et al., 2017)	21
Πίνακας 4. Σωματικό βάρος και στάδιο ανάπτυξης των ζώων που επιλέχθηκαν για τη μελέτη	47
Πίνακας 5. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό των επιπέδων της GSH	49
Πίνακας 6. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό του ρυθμού αποικοδόμησης του H_2O_2	51
Πίνακας 7. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό της TAC	52
Πίνακας 8. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδωσής	54
Πίνακας 9. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό των επιπέδων της πρωτεϊνικής οξειδωσής	55

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό δραστικών μορφών αζώτου (Pate et al., 1999)	19
Εικόνα 2. Ενδογενής παραγωγή ελευθέρων ριζών (Rivera A., 2022)	22
Εικόνα 3. Δημιουργία διαρροής ηλεκτρονίων και πρωτονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Zhao et al., 2019)	23
Εικόνα 4. Εξωγενής παραγωγή ελευθέρων ριζών (Rivera A., 2022)	27
Εικόνα 5. Η κυτταρική και μοριακή ροή πληροφοριών που χαρακτηρίζει το φαινόμενο της όρμησης (Mattson M.P., 2008)	28
Εικόνα 6. Αρνητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών (Rivera A., 2022)	29
Εικόνα 7. Σχηματισμός MDA και μεταβολισμός λιπαρών οξέων (Ayala et al., 2014)	31
Εικόνα 8. Διάσπαση των πρωτεϊνών από ελεύθερες ρίζες (Hawkins C.L. et al. 2019)	32
Εικόνα 9. Κατηγορίες αντιοξειδωτικών (Bunaciu, 2015)	34
Εικόνα 10. Βιοδείκτες φλεγμονής και οξειδωτικού στρες (Menzel A., et al. 2021)	39
Εικόνα 11. Οξειδωτικό στρες και ζώα παραγωγής (Durand D., et al. 2022)	41
Εικόνα 12. Κυφορία προβάτου 50 ημερών - έμβρυο (προσωπικό αρχείο Αλεξίου Ιωάννη)	42
Εικόνα 13. Μεταβολή των επιπέδων της GSH ανάμεσα στα 4 στάδια ανάπτυξης των εριφίων, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. * στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.05$, ** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.01$, *** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.001$, **** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.0001$	58
Εικόνα 14. Μεταβολή των επιπέδων της GSH ανάμεσα στα 4 στάδια ανάπτυξης των αμνών, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. ** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.01$.	59
Εικόνα 15. Μεταβολή του ρυθμού αποικοδόμησης του H_2O_2 ανάμεσα στα 4 στάδια ανάπτυξης των εριφίων, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. * στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.05$, ** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.01$.	60

- Εικόνα 16. Μεταβολή του ρυθμού αποικοδόμησης τους H_2O_2 ανάμεσα στα 4 στάδια αναπτυξης των αμνών, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. * στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.05$, ** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.01$. _____ 61
- Εικόνα 17. Μεταβολή της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ανάμεσα στα 4 στάδια αναπτυξης των εριφίων, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. *** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.001$, **** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.0001$. _____ 62
- Εικόνα 18. Μεταβολή της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ανάμεσα στα 4 στάδια αναπτυξης των αμνών, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. * στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.05$, ** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.01$, *** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.001$. _____ 63
- Εικόνα 19. Μεταβολή των επιπέδων των TBARS ανάμεσα στα 4 στάδια αναπτυξης των εριφίων, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. * στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.05$, ** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.01$, *** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.001$. _____ 64
- Εικόνα 20. Μεταβολή των επιπέδων των TBARS ανάμεσα στα 4 στάδια αναπτυξης των αμνών, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. * στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.05$. _____ 65
- Εικόνα 21. Μεταβολή των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα 4 στάδια αναπτυξης των εριφίων, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. * στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.05$, *** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.001$, **** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.0001$ _____ 66
- Εικόνα 22. Μεταβολή των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα 4 στάδια αναπτυξης των αμνών, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. ** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.01$ _____ 67

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ROS Reactive Oxygen Species Δραστικές μορφές οξυγόνου

RNS Reactive Nitrogen Species Δραστικές μορφές αζώτου

O₂•- Superoxide radical Ρίζα σουπεροξειδικού ανιόντος

HO• Hydroxyl radical Ρίζα υδροξυλίου

H₂O₂ Hydrogen peroxide Υπεροξειδίο του υδρογόνου

NO Nitric oxide Νιτρική οξειδάση

SOD Superoxide dismutase Υπεροξειδική δισμουτάση

CAT Catalase Καταλάση

GSH Reduced glutathione Ανηγμένη γλουταθειόνη

GSSG Oxidized glutathione Οξειδωμένη γλουταθειόνη

DPPH• 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 1,1 διφαινυλ-2-πυκνιδραζύλιο

ABTS 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulphonic acid

2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ

HRP Horseradish peroxidase Περοξειδάση του χρένου

EDTA Ethylene diamine tetraacetic acid Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικόξύ

TAC Total antioxidant capacity Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα

TBARS Thiobarbituric Reactive Substances Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ

TBA Thiobarbituric acid Θειοβαρβιτουρικό οξύ

MDA Malondialdehyde Μηλονικήδιαλδεϋδη

CARB Protein carbonyls Πρωτεϊνικά καρβονύλια

TCA Trichloroacetic acid Τριχλωροοξικό οξύ

DNPH 2,4-di-nitro-phenyl-hydrazine 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη

PBS Phosphate buffer saline Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

Hb Hemoglobin Αιμοσφαιρίνη

DTNB 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) διθειο-δυνιτρο-βενζοϊκόξύ

CDNB 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene 1-χλωρο, 2,4-δινιτροβενζόλιο

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ελεύθερη ρίζα (Free radical) νοείται κάθε άτομο ή μόριο που έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια σε ένα ή περισσότερα, ατομικά ή μοριακά τροχιακά (*Παπαγεωργίου Γ., 2005*). Προκύπτουν είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή τους στοιβάδα. Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν μία ετερογενή ομάδα μορίων και η δραστηριότητά τους οφείλεται: 1). στην τάση που έχουν να αποσπών ηλεκτρόνια από άλλα γειτονικά μόρια με σκοπό να συμπληρώσουν το ισοζύγιο ηλεκτρονίων τους, 2). στην αντίδρασή τους με συγκεκριμένα μόρια στόχους διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στις φυσιολογικές διεργασίες ενός οργανισμού (*Halliwell, 2007 Γάλαρης, 2015*).

Η αναφορά σε αυτές πολλές φορές έχει αρνητική έννοια λόγω της εν μέρει επιβλαβούς δράσης τους (μηχανισμοί που προκαλούν τοξικότητα αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις). Ωστόσο έχειδειχθεί ότι συμμετέχουν και σε φυσιολογικές διαδικασίες του οργανισμού όπως η συμμετοχή σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος σε κυτταρικό επίπεδο ως διαμεσολαβητές (redox signaling). Οι βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες σε κυτταρικό επίπεδο οφείλονται στην αλληλεπίδραση αυτών με τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA των κυττάρων επάγοντας αλυσιδωτές αντιδράσεις που οδηγούν μέχρι την καταστροφή του κυττάρου.

Σε έναν οργανισμό η επιβλαβής δράση των ελευθέρων ριζών μπορεί να αναχαιτιστεί από διάφορα μόρια όπως η τρανσφερίνη, η λακτοφερίνη, η απτοσφαιρίνη, η λευκωματίνη και η σερουλοπλασμίνη ή να εξουδετερωθεί από τα καροτενοειδή, ή μέσω δραστηριότητας σημαντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση, οι υπεροξειδάσες και οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης. Ο οργανισμός επίσης έχει αναπτύξει επιδιορθωτικούς μηχανισμούς απέναντι στη δράση των ελευθέρων ριζών με τη δράση ενζύμων όπως λιπάσες, πρωτεάσες και ενζύμων επισκευής του DNA.

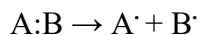
1.1.1 Τρόπος παραγωγής των ελευθέρων ριζών

Οι κύριοι μηχανισμοί σύνθεσης των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό είναι:

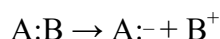
- I. η ομολυτική διάσπαση
- II. η ετερολυτική διάσπαση

III. η σύνθεσή τους με τη βοήθεια οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων.

Κατά την ομολυτική διάσπαση ένας ομοιοπολικός δεσμός διασπάται ώστε τα ηλεκτρόνια που συνιστούσαν το δεσμό διασπώνται όπως φαίνεται παρακάτω:

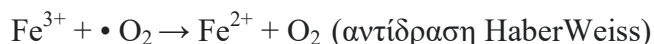


Κατά την ετερολυτική διάσπαση το ζεύγος ηλεκτρονίων του ομοιοπολικού δεσμού αποδίδεται αποκλειστικά σε ένα μόνο από τα προϊόντα της αντίδρασης, ώστε τελικά σχηματίζονται ένα ανιόν και ένα κατιόν:



Για να επιτευχθεί ομολυτική ή ετερολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού απαιτείται μεγάλη ποσότητα ενέργειας π.χ. ιοντισμός, θερμότητα και ηλιακή και η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (*Παπαγεωργίου Γ., 2005*).

Ο τρίτος μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την παραγωγή των ελευθέρων ριζών γίνεται με τη βοήθεια οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Ο Fenton 1894 περιέγραψε μια τέτοια αλυσίδα αντιδράσεων με τελικά παράγωγα μια ρίζα υδροξυλίου και μια ρίζα υπεροξειδίου αφού προηγηθεί η οξείδωση του δισθενούς σιδήρου σε τρισθενή και έπειτα η αναγωγή του τελευταίου σε δισθενή. Αυτή η αλυσίδα αντιδράσεων χρησιμοποιώντας τις ιδιότητες του υπεροξειδίου του υδρογόνου έχει πολλές εφαρμογές όπως η εξυγίανση υδάτινων αποβλήτων, τη δημιουργία συνθετικών πολυμερών απομακρύνοντας την περίσσεια οργανικής ύλης από απόβλητα κ.α. (*Chen Y., 2020*).



Τέτοιου τύπου αντιδράσεις όμως, όταν συμβαίνουν μέσα σε έναν οργανισμό μπορεί να οδηγήσουν σε ένα φαύλο κύκλο παραγωγής ελευθέρων ριζών ή και δραστικών μορφών ενδεχόμενα επιβλαβών για τον οργανισμό. Οι ελεύθερες ρίζες μέσω της ικανότητάς τους να αντιδρούν με τα βασικά συστατικά των κυττάρων (λιπίδια,

πρωτεΐνες, DNA), μπορούν να προκαλέσουν καταστροφικές συνέπειες σε αυτά, ταυτόχρονα όμως είναι και απαραίτητες έχοντας αποκτήσει ρυθμιστικό ρόλο συμμετέχοντας σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος ως διαμεσολαβητές σε κυτταρικό επίπεδο. Ουσιαστικός τρόπος αναστολής της επιβλαβούς δράσης τους θα ήταν να σχηματιστεί ένας ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ δύο ελευθέρων ριζών εφικτό με τη συνεισφορά δύο ηλεκτρονίων αλλά σπάνιο ή την αντίδραση με έναν αντιοξειδωτικό παράγοντα και το σχηματισμό μιας λιγότερο ή και καθόλου δραστηκής ρίζας.

1.1.2 Δραστηκές μορφές

Οι δραστηκές μορφές εντάσσονται σε τέσσερις επιμέρους κατηγορίες σύμφωνα με το κεντρικό τους άτομο. Πιο αναλυτικά αυτές είναι οι δραστηκές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), οι δραστηκές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), οι δραστηκές μορφές θείου (Reactive Sulphur Species, RSS) και οι δραστηκές μορφές χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RCS), οι οποίες έχουν κεντρικό τους άτομο το O, το N, το S και το Cl, αντιστοίχως. Οι ενώσεις που προκύπτουν είναι πιο δραστηκές από τα αρχικά μόρια. Βέβαια πρέπει να γίνει σαφές ότι όλα τα δραστηκά μόρια που προκύπτουν δεν είναι απαραίτητα ελεύθερες ρίζες ενώ οι ελεύθερες ρίζες είναι όλες λιγότερο ή περισσότερο δραστηκά μόρια.

1.1.2.1 Δραστηκές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species)

Το οξυγόνο (O₂) αποτελεί το 21% του ατμοσφαιρικού αέρα και είναι το δεύτερο σε αφθονία μετά το άζωτο. Παρήχθη πριν από 2,5 εκατομμύρια χρόνια απ' τα κυανοβακτήρια (κυανοφύκη) τα οποία με τη χρήση της ηλιακής ενέργειας και τη φωτοσύνθεση διασπούν το μόριο του H₂O σε μόρια υδρογόνου και οξυγόνου παράγοντας όμως και επιζήμιες μορφές του οξυγόνου. Με την πάροδο των ετών τα κυανοβακτήρια με την μεγάλη προσαρμοστικότητα τους περιορίστηκαν στους ωκεανούς και κάτω από τους παγετώνες της Ανταρκτικής ενώ οι νέοι οργανισμοί που εμφανίστηκαν κατάφεραν μέσω της εξελικτικής διαδικασίας να χρησιμοποιήσουν το O₂ προς όφελός τους, αναπτύσσοντας παράλληλα μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας. Ακόμη και το μοριακό οξυγόνο λόγω δομής της ηλεκτρονιακής του στοιβάδας έχει ασθενή οξειδωτικό χαρακτήρα ενώ η διεγερμένη μορφή του (μονήρες οξυγόνο) είναι εξαιρετικά δραστηκό οξειδωτικό μέσο (*Γάλαρης, 2015*). Τρεις πολύ

σημαντικές δραστικές μορφές οξυγόνου που παράγονται *in vivo* από το μοριακό οξυγόνο, είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου ($\text{ROO}^\cdot$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και η υδροξυλική ρίζα ($\text{OH}^\cdot$), που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

Δραστικές Μορφές Οξυγόνου	
Ελεύθερες ρίζες	Δραστικά μόρια-Μη ρίζες
Ανιόν Υπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}^\cdot$)	Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα υπεροξειδίου ($\text{ROO}^\cdot$)	Υποχλωριώδες οξύ (HClO)
Ρίζα Αλκοξειδίου ($\text{RO}^\cdot$)	Όζον (O_3)
Υδροϋπεροξειδική Ρίζα ($\text{HO}_2^\cdot$)	

Συμπερασματικά οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι και οι ενδιάμεσες μορφές αναγωγής του μοριακού οξυγόνου όπως π.χ. συμβαίνει με το υποχλωριώδες οξύ. Το οξυγόνο καταναλώνεται στα μιτοχόνδρια κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Από την κυτταρική αναπνοή παράγεται μεταξύ άλλων το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η ρίζα του υδροξυλίου. Στις ωφέλιμες λειτουργίες των δραστικών μορφών οξυγόνου είναι η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B από τον παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF- α (Gutteridge J.M.C., 2018) από το H_2O_2 και την ενδοκυτταρική σηματοδότηση ενώ το ανιόν σουπεροξειδίου συμμετέχει στη φαγοκυττάρωση (Halliwell, 2015).

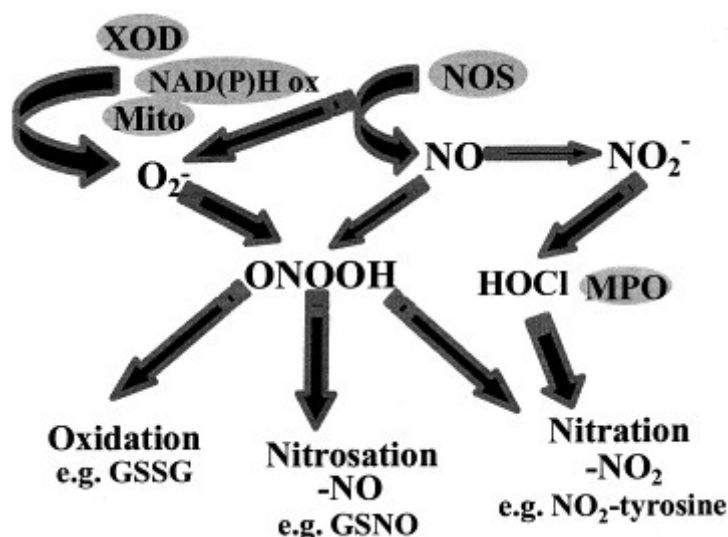
1.1.2.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου (Reactive Nitrogen Species)

Πίνακας 2. Δραστικές μορφές αζώτου

Δραστικές μορφές αζώτου	
Ελεύθερες ρίζες	Δραστικά Μόρια
Μονοξειδίο Αζώτου, $\text{NO}^\cdot$	Νιτροσύλιο, NO^+
Διοξειδίο Αζώτου, $\text{NO}_2^\cdot$	Νιτρικό οξύ, HONO
	Οξείδιο του Αζώτου (III), N_2O_3

	Υπεροξυνιτρίδιο, ONOO^-
	Αλκυλοπεροξυνιτρίδιο, ROONO^-

Στις Δραστικές μορφές αζώτου οι οποίες έχουν το άζωτο ως κεντρικό άτομο συγκαταλέγονται το μονοξείδιο και το διοξείδιο του αζώτου αλλά και αζωτούχες ενώσεις που μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες ή δρουν ως οξειδωτικοί παράγοντες (Πίνακας2). Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) διαχέεται εύκολα διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών. Το NO προκύπτει μέσα στα κύτταρα των οργανισμών με την δράση του ενζύμου συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Το NO έχει καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση (Patel et al., 1999, Παπαγεωργίου Γ., 2005) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό δραστικών μορφών αζώτου (Patel et al., 1999)

Οι τελικές αντιδράσεις που προκύπτουν είναι βιολογικά σημαντικές, δεδομένου ότι μπορούν να μεταβάλουν την κυτταρική σηματοδότηση.. Η νιτροσιλίωση είναι αντιστρεπτή διαδικασία και συμμετέχει στις διεργασίες μεταγωγής σημάτων στα κύτταρα. Προκαλεί αγγειοχάλαση και πτώση της αρτηριακής πίεσης καταλύοντας και νιτροσιλίωση του κυτοχρώματος c. Ένας τρόπος απομάκρυνσης του NO από τον οργανισμό είναι η αντίδραση του NO (εξουδετέρωση της ρίζας του) με την οξυαιμοσφαιρίνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων και τη μετατροπή της σε μεθαιμοσφαιρίνη με συνακόλουθη την παραγωγή ανιόντος του νιτρικού οξέος (NO_3^-) (Παπαγεωργίου Γ.,2005).

Αντιθέτως η νίτρωση είναι μη αντιστρεπτή διαδικασία και εμπλέκεται σε τοξικές διεργασίες στα βιολογικά συστήματα. Κατά τη διαδικασία της νίτρωσης μία ομάδα NO₂ ενώνεται μη αντιστρεπτά με ένα υπόλειμμα τυροσίνης ή τρυπτοφάνης ασκώντας έτσι μη αντιστρεπτές μεταβολές στη δομή και κατά συνέπεια στο φυσιολογικό ρόλο πολλών πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν αυτά τα αμινοξέα (Παπαγεωργίου Γ., 2005). Το NO μπορεί να αντιδράσει με το σουπεροξειδίο (O₂⁻) με αποτέλεσμα την παραγωγή υπεροξυνιτρώδους (ONOO⁻). Κατά την πρωτονίωση του σταθερού υπεροξυνιτρώδους σε σταθερές υπεροξυνιτρώδες οξύ, παράγονται ενδιάμεσες ενώσεις με χαρακτηριστικά που προσομοιάζουν αυτά της υδροξυλικής ρίζας (OH[•]) άρα η παρουσία του NO συμβάλλει στην πρόκληση οξειδωτικού στρες.

1.1.2.3. Δραστικές μορφές θείου

Το θείο μέχρι πρόσφατα ήταν γνωστό μόνο ως δομικό συστατικό των πρωτεϊνών και ενώσεις του θεωρούνταν περιβαλλοντικοί ρύποι. Με την πάροδο όμως των ετών πληθώρα οργανικών και ανόργανων ενώσεων του θείου απασχόλησαν τη βιολογία της οξειδοαναγωγής που μαζί με το σελήνιο κατέχουν σημαντικό ρόλο.

Ενώ οι ROS και οι RNS, πλην εξαιρέσεων όπως τα υπεροξείδια των λιπιδίων (ROOH) είναι ανόργανα μόρια, οι RSS έχουν μεν ανόργανα μόρια με την έννοια των ελευθέρων ριζών όπως το διοξειδίο του θείου, αλλά και πολύ πιο δραστικές ομάδες... Το θείο (S) ως συστατικό πολλών οργανικών μορίων, εμπλέκεται σε μεταβολικά μονοπάτια ενώ καθορίζει και τη δραστηριότητα πολλών ενζύμων όπως της καταλάσης. Το σουλφιδικό υδρογόνο H₂S παράγεται ενδογενώς και έχει ρόλο νευροδιαβιβαστή, στην φλεγμονή και στην αγγειοχάλαση (Giles et al., 2017).

Ευρεία έννοια δραστικών μορφών θείου (RSS)				Παραδείγματα
Reactive sulfane species	–	Δραστικές μορφές σουλφενίου	RSxR', RSxH (R ≠ H, x ≥ 2)	
Reducing sulfur species	–	Αναγωγικές μορφές θείου	H ₂ S, GSH, θειόλες	
Radical sulfur species	–	Ελεύθερες Ρίζες Θείου	RS [•] , GSSG ^{•-} , R'SR ^{•+} , HS [•]	
Reactive sulfide species	–	Δραστικές Μορφές Σουλφιδίου	H ₂ Sx	

Reprocessed sulfur species – Επανεπεξεργασμένες μορφές θείου	Βιολογικά δραστικοί μεταβολίτες θείου που παράγονται από το μικροβίωμα
Reactive sulfur substances – Δραστικές ενώσεις Θείου	SO ₂ , SO ₃ , S ₂ O ₃ ²⁻ , H ₂ SO ₅
Reactive sulfur secondary metabolites – Δευτερογενείς μεταβολίτες δραστικών μορφών θείου	Allicin, DADS, DATS, DATTS
Recreational sulfur substances – Ψυχοτρόπες Θειούχες ενώσεις	Haarlem oil, 1,2-διθειολ-3-θειόνη
Regulatory sulfur species	Δισουλφίδια, σουλφινικό και σουλφενικό οξύ σε πρωτεΐνες και ένζυμα

Πίνακας 3 Ευρεία έννοια "δραστικών μορφών θείου" (Giles et al., 2017)

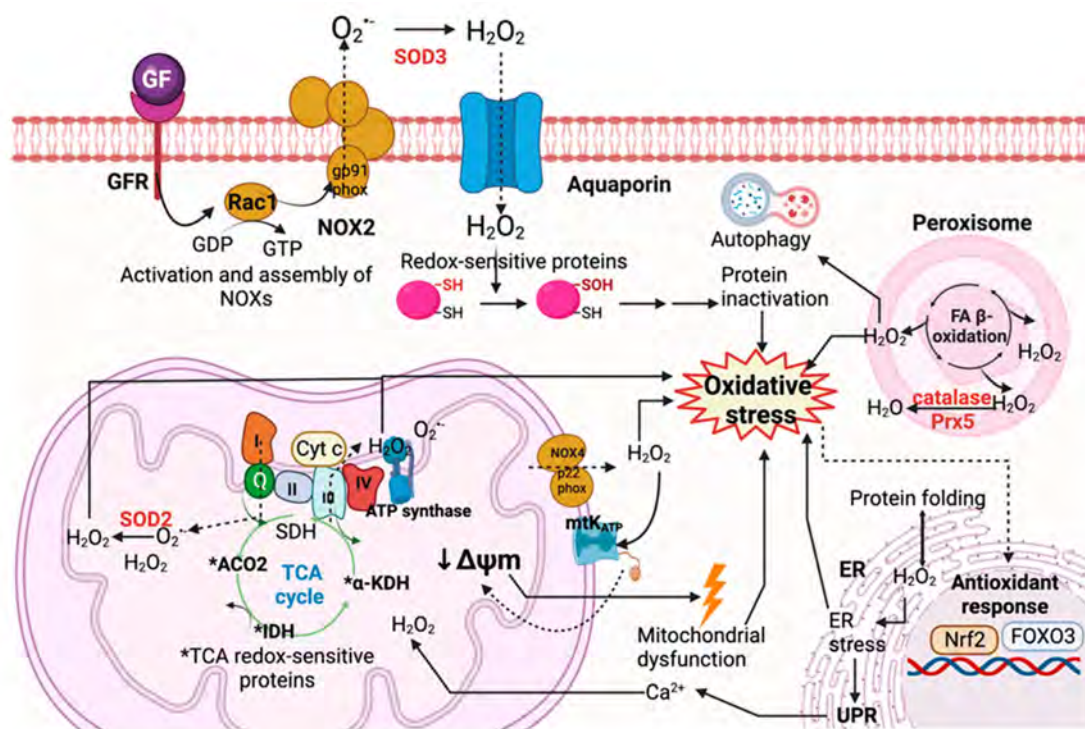
1.1.2.4 Δραστικές μορφές χλωρίου

Οι Δραστικές Μορφές Χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RCS) περιλαμβάνουν εκτός των άλλων και τις εξής ενώσεις: υποχλωριώδες οξύ (HClO), υποχλωριώδες ανιόν (OCl⁻) και χλωραμίνες (RNHCl). Το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) αποτελεί τη σημαντικότερη δραστική μορφή της οικογένειας και έναν εξαιρετικά ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα, που αλληλεπιδρά με θειολικές ομάδες, οξειδώνοντάς τις, σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων και οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό συσσωμάτων. Ακόμη, έχει τη δυνατότητα να χλωριώνει αμινικές ομάδες πρωτεϊνών, παράγοντας χλωραμίνες όπως και νουκλεοτίδια. Πολλές από αυτές τις ενώσεις χρησιμοποιούνται ευρέως ως απολυμαντικές ουσίες με μικροβιοκτόνο δράση. Ενώ αυτή η δράση τους έχει μελετηθεί εκτενώς οι μηχανισμοί αντίδρασης των βακτηρίων στις RCS άρχισε να ερευνάται σχετικά πρόσφατα (Gray MJ, 2013).

1.2 Δημιουργία δραστικών μορφών in vivo

1.2.1. Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

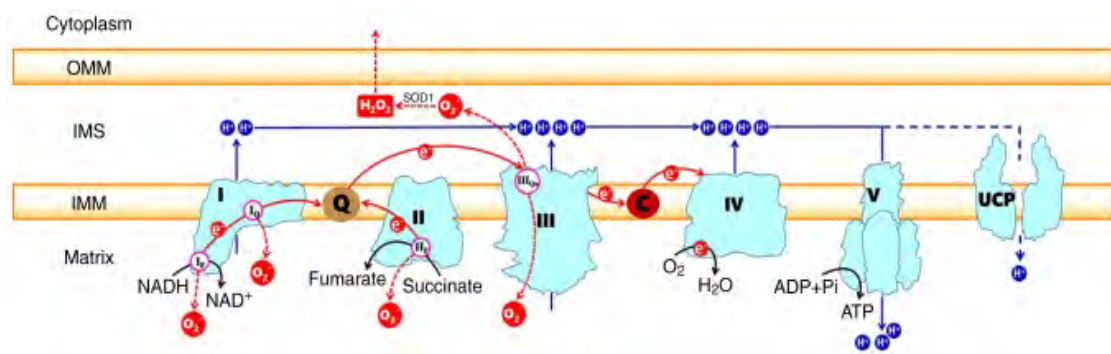
Ενδεικτική της πολυπλοκότητας της ενδογενούς παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι η παρακάτω εικόνα (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Ενδογενής παραγωγή ελευθέρων ριζών (Rivera A. 2022)

1.2.1.1. Μιτοχόνδρια

Η σημαντικότερη ενδογενής πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων προκειμένου να συντεθεί το 70% της ενέργειας (ATP) που απαιτούν οι αερόβιοι οργανισμοί. Το ATP είναι η αποθήκη ενέργειας του κυττάρου, συντελεί στην ενεργητική μεταφορά ουσιών μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, στη σύνθεση χημικών ουσιών εντός του κυττάρου και στην εκτέλεση μηχανικού έργου από τα κύτταρα όπως πχ συμβαίνει στους μύς (*Σμοκοβίτης Αθ., 1993*). Το ATP χάνει μια φωσφορική ομάδα και μετατρέπεται σε ADP ταυτόχρονα όμως γίνεται και ανασύνθεση του ATP από το ADP. Κατά τη διαδικασία παραγωγής του ATP πολλά ηλεκτρόνια μπορούν να διαφύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων. Επειδή το οξυγόνο καταναλώνεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες ανήκουν στις ROS. Υπάρχουν δύο οδοί μεταφοράς ηλεκτρονίων στο ETC: το σύμπλοκο I/III/IV, με το NADH ως υπόστρωμα και το σύμπλοκο II/III/IV, με το ηλεκτρικό οξύ ως υπόστρωμα. Εκτός από τις ROS, στα μιτοχόνδρια μπορεί να παραχθεί και μονοξείδιο του αζώτου ($\text{NO}\cdot$) από τη συνθάση του NO το οποίο είναι επίσης ένας πολύ ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Δημιουργία διαρροής ηλεκτρονίων και πρωτονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Zhao et al., 2019)

Κατά τη διάρκεια αυτής, συμβαίνει σταδιακή μεταφορά ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο (O_2) προκειμένου να αναχθεί σε νερό (H_2O), διαδικασία που διαμεσολαβείται από φορείς ηλεκτρονίων που ονομάζονται αναπνευστική αλυσίδα (σύμπλοκο NADH δεϋδρογονάσης του συνένζυμου Q (I), συνένζυμο Q, σύμπλοκο αναγωγής κυτοχρώματος c (II), κυτόχρωμα c και σύμπλοκο οξειδάσης

κυτοχρώματος c (III) (*Zhao et al., 2019*). Ουσιαστικά τα μιτοχόνδρια περιέχουν τρία κύρια συστήματα ενζύμων: 1) τα ένζυμα του κύκλου του Krebs (μεταβολισμός γλυκόζης, λιπαρών οξέων και αμινοξέων) που βρίσκονται στην ενδομιτοχονδριακή ουσία ενώ τα παρακάτω βρίσκονται στα οξυσωμάτια ή στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου 2) του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων (κυτοχρώματα) και 3) της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (*Μιχαήλ Σ., 1996*). Να σημειωθεί ότι τα μιτοχόνδρια έχουν την τάση να συγκεντρώνονται στα μέρη του κυττάρου που έχει τις μεγαλύτερες ενεργειακές ανάγκες (*Μιχαήλ Σ., 1996*). Τα μιτοχόνδρια αξιοποιούν το 95% του καταναλισκόμενου οξυγόνου για την παραγωγή ενέργειας ενώ το υπόλοιπο 5% αποτελεί υπόστρωμα ενζυμικών αντιδράσεων στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER). Το ER παράγει κυρίως H_2O_2 κατά την αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Ο σχηματισμός του H_2O_2 αποδίδεται στις δισουλφιδικές ισομεράσεις, οι οποίες παράγουν ένα ισοδύναμο οξειδώσεως για κάθε δισουλφίδιο που σχηματίζεται. Ως εκ τούτου, το H_2O_2 είναι το υποπροϊόν που προκύπτει από την αναδίπλωση των πρωτεϊνών.

1.2.1.2 Φαγοκυττάρωση – Αναπνευστική έκρηξη

Κατά την είσοδο ενός παθογόνου π.χ. βακτηρίου ή ιού από μια πύλη εισόδου στον οργανισμό π.χ. βλεννογόνοι, λύσεις συνεχείας του δέρματος έχουμε χημειοτακτική προσέλευση του κυρίαρχου φαγοκυτταρικού πληθυσμού του αίματος, των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων σε συνδυασμό με τα μονοκύτταρα/μακροφάγα προκειμένου να αντιμετωπιστεί η κατάσταση. Μέσω μιας διαδικασίας που καταλύεται από το ενζυμικό σύμπλοκο της NADPH οξειδάσης που βρίσκεται στα φαγοκύτταρα παράγονται μεγάλες ποσότητες ρίζας του σουπεροξειδίου (O_2^-) (*Magnani and Mattevi, 2019*). Για να επιτευχθεί αυτό τα φαγοκύτταρα καταναλώνουν τεράστιες ποσότητες οξυγόνου από ένα ενζυμικό σύστημα στην κυτταρική μεμβράνη τους που δε συσχετίζεται με την αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Εκτός των παραγόμενων ενζυμικών ή μη ενώσεων εκλύονται και άλλα κυτταροπλασματικά κυστίδια στα οποία περιέχεται η αιμοπρωτεΐνη με ενζυμική δράση “μυελοπεροξειδάση” (MPO).

Η μυελοϋπεροξειδάση εκφράζεται στα φαγοκύτταρα και έχει μικροβιοκτόνο δράση κατά των παθογόνων μέσω του παραγόμενου υποχλωριώδους οξέος ($HOCl$). Η ενεργοποίηση της μυελοϋπεροξειδάσης σχετίζεται επίσης στενά με την

αθηροσκλήρωση και τις καρδιαγγειακές παθήσεις και των φλεγμονωδών συμβάντων σε νεφρικές και πνευμονικές παθήσεις (*Anatoliotakis N. et al., 2013*).

1.2.1.3. Υπεροξειδιοσώματα

Τα υπεροξειδιοσώματα ευρισκόμενα κυρίως στα λιποκύτταρα παίζουν ρόλο σε συνεργασία και με τα μιτοχόνδρια στο μεταβολισμό των λιπιδίων και την λιπογένεση. Διερευνάται επίσης ο ρόλος τους στην αντιμετώπιση της παχυσαρκίας. Παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου βοηθώντας όμως και στην απομάκρυνση αυτών από τον οργανισμό (*Liu J., et al., 2019*). Τέτοια υποστρώματα δράσης των υπεροξειδιοσωμάτων είναι οι πουρίνες, τα λιπαρά οξέα, τα d-αμινοξέα και το ουρικό οξύ που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης, την οξειδάση του ακετυλοσυνενζύμου A, την οξειδάση των d-αμινοξέων και την ουρική οξειδάση. Όλες οι παραπάνω αντιδράσεις συμβάλουν στην παραγωγή H_2O_2 .

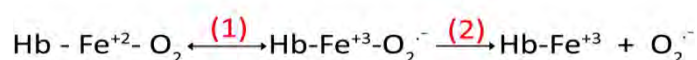
Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα ROS που προκαλούνται από υπεροξειδιοσώματα μπορεί να ρυθμίζουν την αυτοφαγία, μια διαδικασία που περιλαμβάνει την αποδόμηση και την ανακύκλωση κυτταρικών συστατικών (*Rivera A. et al., 2022*). Σε κάποια κύτταρα και κυρίως στα ηπατικά, μπορούν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες κατά τις αντιδράσεις του συστήματος του κυτοχρώματος P-450. Τα κυτοχρώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών με κύριο μηχανισμό τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH στο O_2 .

1.2.1.4. Οξειδάσες της ξανθίνης

Οι οξειδάσες της ξανθίνης (XO) εμπλέκονται στον καταβολισμό των νουκλεοτιδίων πουρίνης και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Το τελικό προϊόν του καταβολισμού πουρίνης είναι το ουρικό οξύ ενώ παράλληλα μέσω της αναγωγής του O_2 παράγεται και $O_2^{\bullet-}$. Τα H_2O_2 και $O_2^{\bullet-}$ που απελευθερώνονται μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση λιπιδίων ή πρωτεϊνών, μεταβάλλοντας την ομοιότητα επηρεάζοντας τις οδούς σηματοδότησης ή διαταράσσοντας την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Έχουν παρατηρηθεί επιβλαβείς συνέπειες σχετικά με την υπερενεργοποίηση του XO σε καρδιαγγειακές παθήσεις επειδή παράγονται H_2O_2 και $O_2^{\bullet-}$, τα οποία μειώνουν την παραγωγή νιτρικού οξειδίου. Σε όργανα όπως η καρδιά και τα νεφρά, τα υποστρώματα υποξανθίνης και ξανθίνης παράγονται από τη διάσπαση του ATP κατά τη διάρκεια ισχαιμικών επεισοδίων (*Bredemeier, M., et al., 2018*).

1.2.1.5. Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη βρίσκεται εντός των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Αυτή της η θέση της εξασφαλίζει μεγαλύτερη ημιπερίοδο ζωής και μεγαλύτερη δραστηριότητα λόγω του ελαφρώς πιο όξινου pH των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Κατά την δίοδο των ερυθροκυττάρων από τους πνεύμονες η αιμοσφαιρίνη συνδέεται με το οξυγόνο και σχηματίζει την οξυαιμοσφαιρίνη και φθάνοντας με το αρτηριακό αίμα στους ιστούς χάνει το οξυγόνο και μετατρέπεται πάλι σε αιμοσφαιρίνη (*Σμοκοβίτης Αθ., 1993, Orrico F, 2023*). Η αιμοσφαιρίνη φαίνεται να υφίσταται οξείδωση καθημερινά σε ποσοστό που φτάνει το 3%. Ο μηχανισμός οξείδωσης απεικονίζεται παρακάτω:

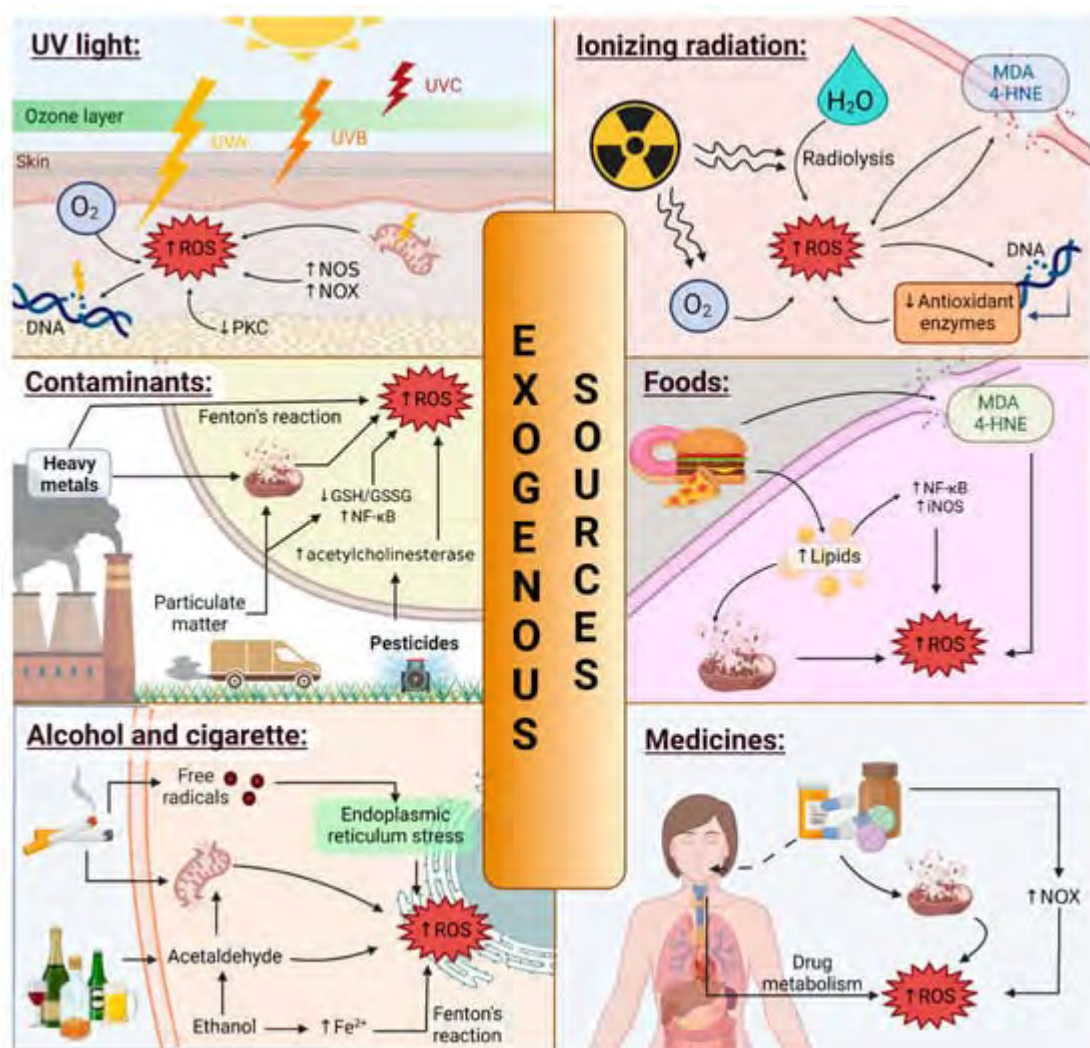


Μια άλλη ένωση που σχηματίζεται κατά την οξείδωση του δισθενούς σιδήρου της αιμοσφαιρίνης σε τρισθενή είναι η μεθαιμοσφαιρίνη που παράγεται αυτόματα σε δείγματα αίματος ή αυξάνεται η παραγωγή της στο αίμα μετά τη χορήγηση φαρμάκων π.χ. σουλφοναμιδών. Εδώ φαίνεται και ο ρόλος των δισθενών κατιόντων μετάλλων όπως του σιδήρου (αντιδράσεις Fenton, Haberweiss) αλλά και του χαλκού στην ενδογενή παραγωγή $\text{OH}\cdot$ και ενός ιόντος οξειδωμένου μετάλλου. Ακολουθώς, κατά την αντίδραση Haber–Weiss, η οξειδωμένη μορφή του μετάλλου ανάγεται από το O_2^- και η ανηγμένη μορφή που προκύπτει αλληλεπιδρά με H_2O_2 δημιουργώντας επίσης $\text{OH}\cdot$. Επιπλέον, ορισμένα μεταλλικά ιόντα μπορούν να αντιδράσουν άμεσα με κυτταρικά μόρια και να δημιουργήσουν ελεύθερες ρίζες ή να επάγουν μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης (*Rivera A. et al., 2022*).

1.2.2. Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Η έκθεση σε εξωτερικούς παράγοντες όπως η ιονίζουσα (IR) και η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), οι ρύποι, τα τρόφιμα, τα φάρμακα και τα φάρμακα όπως το αλκοόλ και ο καπνός μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (*Εικόνα 4*). Οι μηχανισμοί παραγωγής ROS από εξωτερικούς παράγοντες περιλαμβάνουν τη μιτοχονδριακή βλάβη, τη μειωμένη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, την αυξημένη δραστηριότητα ενζύμων και την αυξημένη συγκέντρωση οξειδοαναγωγικά ενεργών μετάλλων όπως ο σίδηρος (Fe^{2+}). Η παραγωγή ROS

προκαλεί βλάβη στο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και την οξείδωση λιπιδίων (Rivera A. *et al.*, 2022).

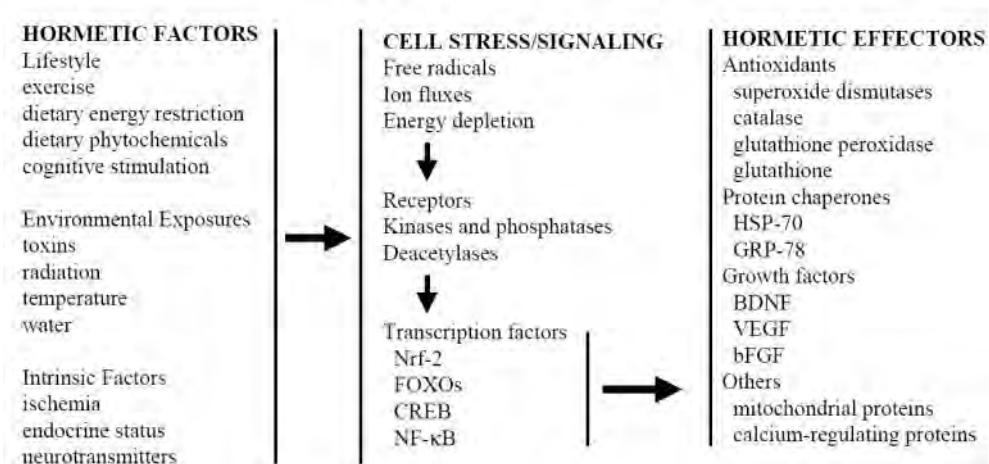


Εικόνα 4. Εξωγενής παραγωγή ελευθερών ριζών (Rivera A, 2022)

1.3. Βιολογική δράση ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες και γενικότερα δραστικές μορφές παράγονται είτε ενδογενώς είτε εξωγενώς διαρκώς από τους ζώντες οργανισμούς ως αποτέλεσμα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και της απόκρισης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι αντιδράσεις στις οποίες εμπλέκονται μπορεί να είναι είτε ενζυμικές, όπως αυτές της αναπνευστικής αλυσίδας, της φαγοκύτωσης και του κυτοχρώματος P-450, είτε μη ενζυμικές αλληλεπιδράσεις του οξυγόνου με οργανικές ενώσεις και η επίδρασή τους να ποικίλει ανάλογα με τη δόση και τη διάρκεια έκθεσης. Ανάλογα με

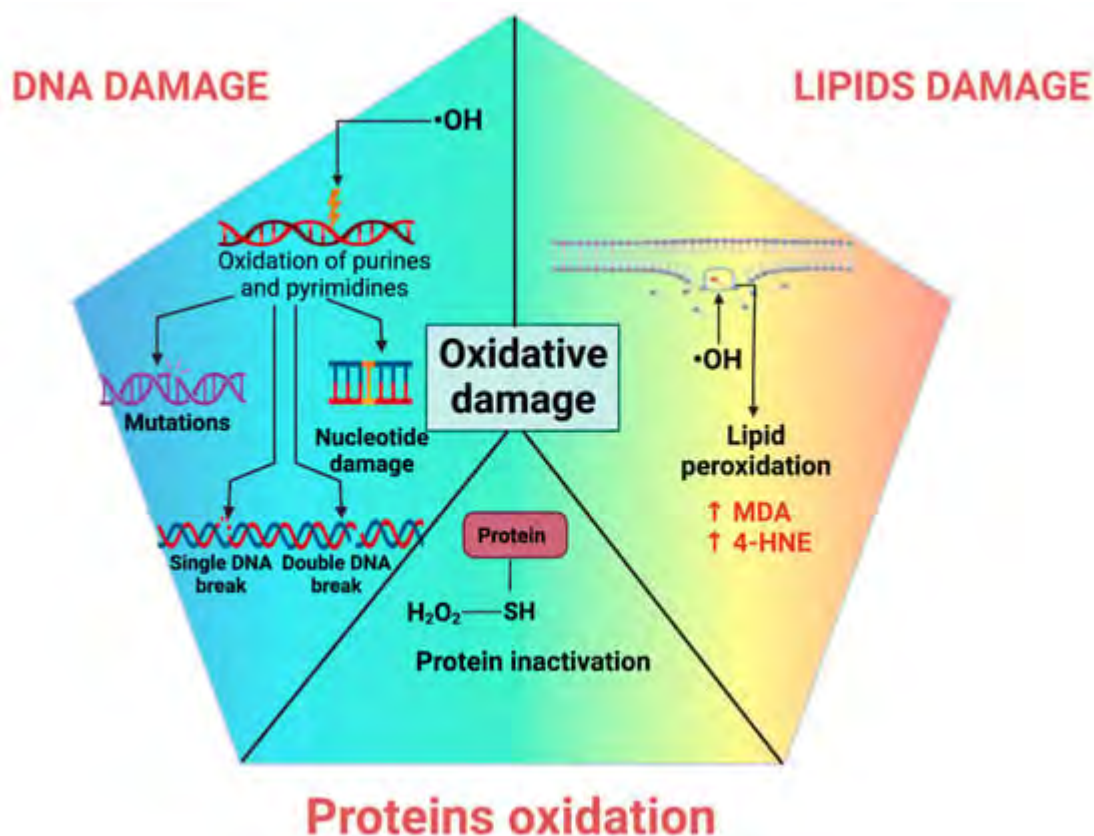
το όργανο στόχο χρησιμοποιούνται οι ανάλογοι βιοδείκτες για την εκτίμηση αυτής της “αλληλεπίδρασης”.



Εικόνα 5. Η κυτταρική και μοριακή ροή πληροφοριών που χαρακτηρίζει το φαινόμενο της όρμησης(Mattson MP., 2008)

1.3.1. Αρνητικές επιδράσεις

Οι αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό κινούνται ουσιαστικά σε τρεις άξονες: βλάβη στο DNA, οξείδωση λιπιδίων και οξείδωση των πρωτεϊνών (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Αρνητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών (Rivera A. 2022)

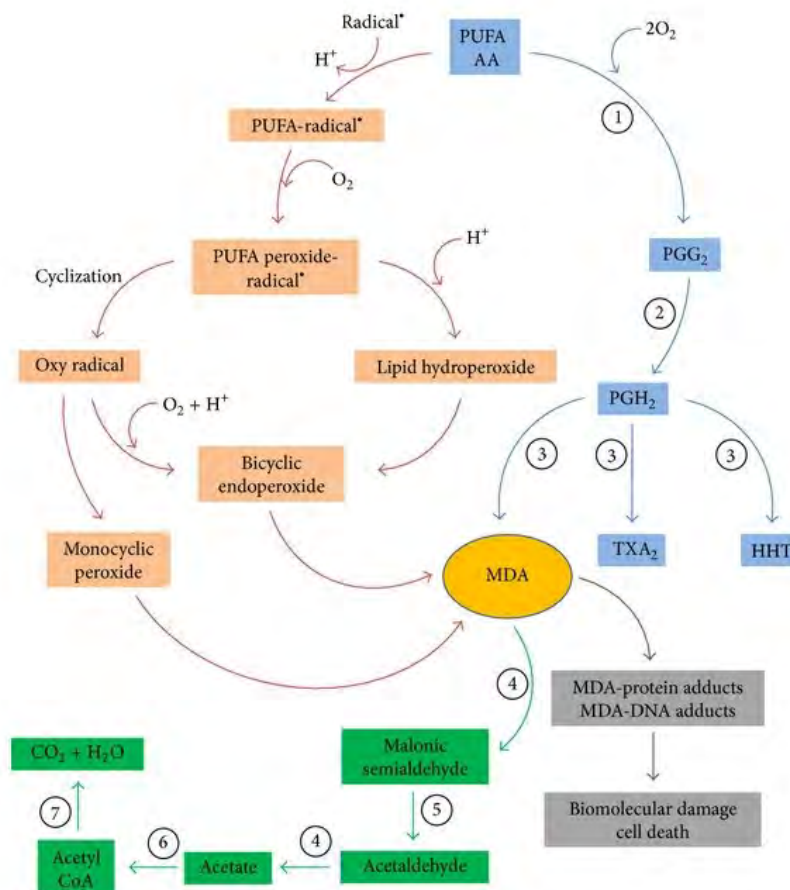
1.3.1.1. Επιδράσεις στα νουκλεϊκά οξέα

Η αντιγραφή του DNA είναι μια κυτταρική διαδικασία που καθιστά το DNA ευάλωτο. Οποιαδήποτε αιτία γενωμικής αστάθειας στο γονιδίωμα μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις και πιθανή καρκινογένεση (Gaillard H, *et al.*, 2015). Το ριβονουκλεϊκό γονιδίωμα RNA λόγω της μονόκλωνης φύσης του και το μιτοχονδριακό DNA λόγω εγγύτητας με την κυτταρική μεμβράνη είναι πιο ευάλωτα στη δράση των ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με τις ετεροκυκλικές βάσεις του DNA με κυριότερη τη ρίζα υδροξυλίου. Προκαλούνται από αυτή μονόκλωνα ή και δίκλωνα θραύσματα στη διπλή έλικα του DNA, τροποποιήσεις των αζωτούχων βάσεων (Οι αζωτούχες βάσεις θυμίνη και κυτοσίνη είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες) (8,5' -cyclopurine-2' -deoxynucleosides, tandem lesions, clustered sites και DNA-protein cross-links) αλλά και βλάβες στο μηχανισμό επιδιόρθωσης ενδεχομένων λαθών (Dizdaroglu M., *et al.*, 2012).

1.3.1.2. Επιδράσεις στα λιπίδια

Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από φωσφολιπίδια με κύριο στόχο των ελευθέρων ριζών τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) που έχουν διπλό δεσμό μεταξύ ατόμων άνθρακα. Η οξείδωση των PUFA είναι η εναρκτήρια αντίδραση του καταρράκτη των αντιδράσεων της λιπιδικής υπεροξείδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου $\text{ROO}\bullet$, συζυγών διενίων, μηλονικής διαλδεΐδης (Malonyldialdehyde, MDA) και 4-υδροξυενενάλης (4-HNE) συμβάλλοντας στη μειωμένη ρευστότητα και αυξημένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης σε μόρια όπως το Ca^{2+} και τα H^+ . Επιπλέον οδηγεί σε απενεργοποίηση μεμβρανικών ενζύμων (Γάλαρης, 2015). Αυτές οι κυτταρικές βλάβες πυροδοτούν το σχηματισμό βλαβών στις πρωτεΐνες και στο DNA αλλά και νέκρωση, απόπτωση του κυττάρου εξαρτώμενη από το σίδηρο λόγω της συσσώρευσης λιπιδικών υπεροξειδίων. Αυτό οδηγεί στη γήρανση του κυττάρου σε νευροεκφύλιση, καρκίνο και καρδιαγγειακές παθήσεις ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου (GuangLei et al., 2024)

Η MDA παράγεται *in vivo* με την αποσύνθεση του αραχιδονικού οξέος (AA) και μεγαλύτερων PUFA ως παραπροϊόν ενζυματικών διεργασιών κατά τη βιοσύνθεση της θρομβοξανής A_2 (TXA_2) και του 12-L-υδροξυ-5,8,10-επτατριενοϊκού οξέος (HHT) ή μέσω μη ενζυματικών διεργασιών από δικυκλικά ενδοϋπεροξείδια που παράγονται κατά τη διάρκεια της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Η σχηματισμένη MDA μπορεί να μεταβολιστεί ενζυμικά. Βασικά ένζυμα που εμπλέκονται στο σχηματισμό και το μεταβολισμό της MDA είναι οι κυκλοοξυγενάσες, η υδροϋπεροξειδάση προστακυκλίνης, η συνθάση της θρομβοξανής, η αφυδρογονάση της αλδεΐδης, η αποκαρβοξυλάση, η συνθάση του ακετυλο CoA και ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος (Εικόνα 7) (Ayala, A. et al., 2014).

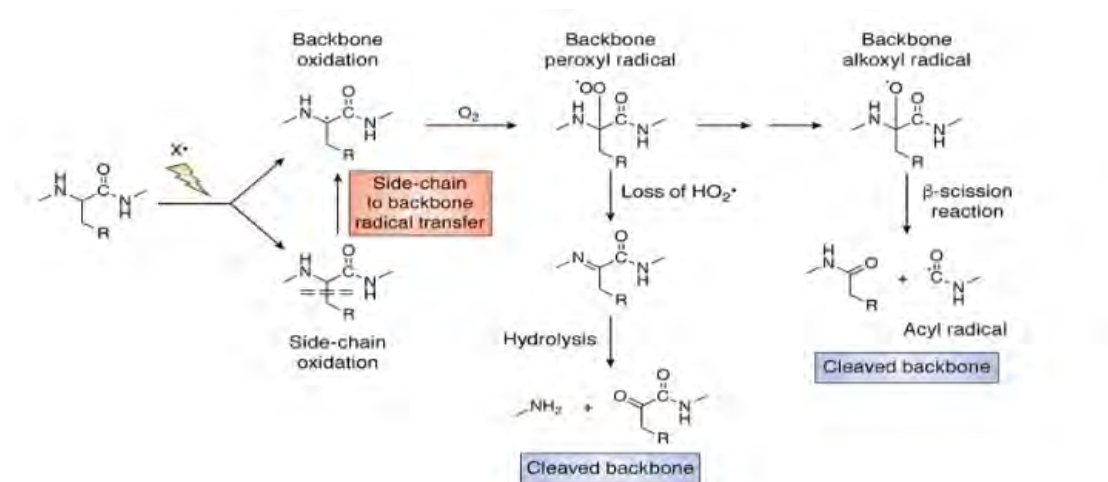


Εικόνα 7. Σχηματισμός MDA και μεταβολισμός λιπαρών οξέων (Ayala et. al., 2014)

1.3.1.3 Επιδράσεις στις πρωτεΐνες

Όταν οι ελεύθερες ρίζες μέσα στον οργανισμό βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα, μπορούν να οξειδώσουν τα αμινοξέα των πρωτεϊνών δημιουργώντας πρωτεϊνικά καρβονύλια και οξειδωμένα αμινοξέα. Η πιο συχνή βλάβη είναι η οξείδωση της σουλφυδριλικής ομάδας αμινοξέων όπως η κυστεΐνη και η μεθειονίνη. Λόγω της ποικίλης φύσεως των πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων των πρωτεϊνών και των πολλαπλών θέσεων στόχων των ελευθέρων ριζών σε αυτές τα προϊόντα οξείδωσης ποικίλουν αντίστοιχα. Από τα πιο ευπαθή αμινοξέα είναι η λυσίνη, η θρεονίνη, η προλίνη και η αργινίνη, τα οποία μετατρέπονται σε αλδεϋδικές και κετονικές ομάδες (Bayr, H., 2005). Τα παραγόμενα πρωτεϊνικά καρβονύλια προέρχονται είτε από την απευθείας οξείδωση των αμινοξέων πλάγιας αλυσού είτε από τις παραγόμενες από τη λιπιδική υπεροξείδωση αλδεϋδες (Yuan, Q. et al., 2005). Οι τρόποι αντίδρασης των ελευθέρων ριζών με τις πρωτεΐνες είναι οι εξής: (1) αφαιρώντας ένα άτομο

υδρογόνου σε θέσεις γειτονικές σε ομάδες σουλφυδρικές -SH, υδροξυλιομάδες (σε σερίνη και θρεονίνη), καρβοξύλια και αμίδια (σε ασπαρτικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, ασпараγίνη, γλουταμίνη), και η ομάδα γουανιδίνης στην αργινίνη. (2) αφαίρεση ηλεκτρονίων από θέσεις πλούσιες σε ηλεκτρόνια. και (3) προσθήκες σε θέσεις πλούσιες σε ηλεκτρόνια με αποτέλεσμα το σχηματισμό συσσωμάτων, μεταβολή ή απώλεια της λειτουργικότητας ενζύμων, υποδοχέων και διαμεμβρανικών φορέων (Hawkins, C.L., et al. 2019).



Εικόνα 8. Διάσπαση των πρωτεϊνών από ελεύθερες ρίζες (Hawkins C.L. et al. 2019)

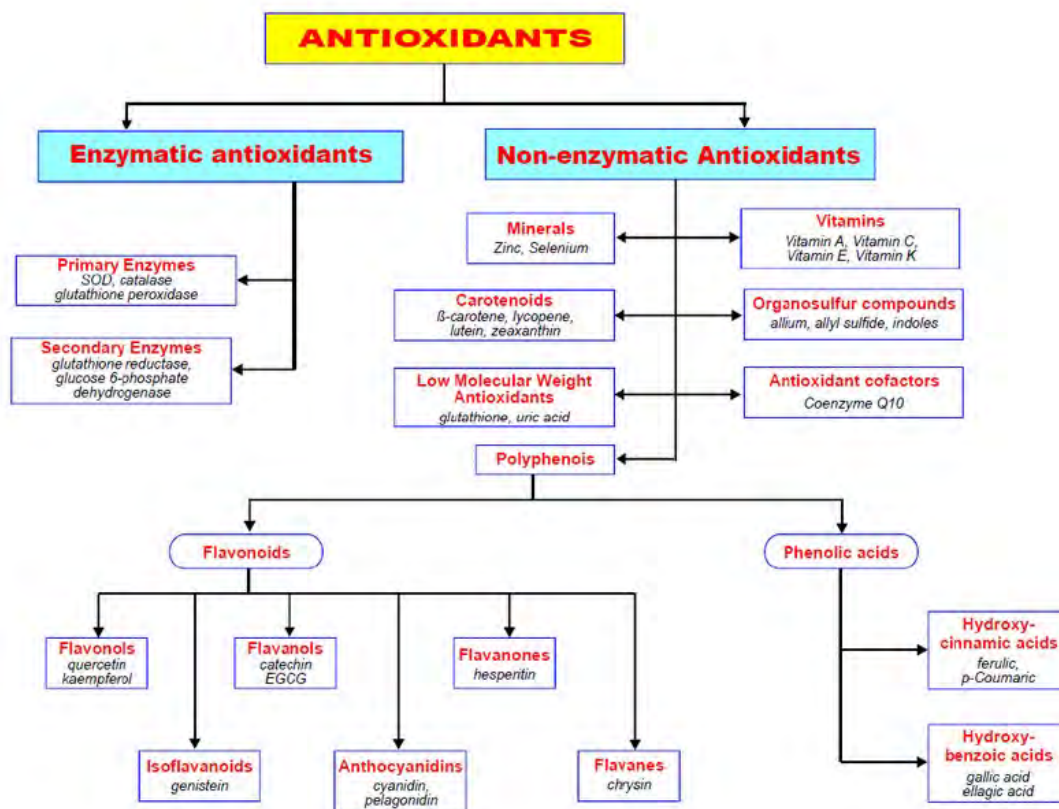
1.3.2. Θετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν συνδεθεί, κυρίως, με την επιβλαβή δράση τους στον οργανισμό, ωστόσο έχειδειχθεί ότι συμμετέχουν και σε φυσιολογικές διαδικασίες αυτού. Από τις κυριότερες φυσιολογικές δράσεις τους είναι η εξουδετέρωση των παθογόνων που εισέρχονται στον οργανισμό από τα φαγοκύτταρα (Jenkins 1988) η κυτταρική σηματοδότηση MAP κινασών, φωσφατασών τυροσίνης, η ενδοκυτταρική σηματοδότηση σε μη φαγοκύτταρα (ινοβλάστες, ενδοθήλιο, λείες μυϊκές ίνες αγγείων, καρδιακά μυοκύτταρα και κύτταρα θυρεοειδούς) (Pham-Huy LA., et al. 2008, Phaniendra A., et al. 2015). Σημαντικός είναι και ο ρόλος τους στον κυτταρικό θάνατο και την απόπτωση όπως συμβαίνει με το πέρας της ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων και την αποικοδόμηση τους από τα μακροφάγα του σπλήνα (Σμοκοβίτης Αθ., 1993).

1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται «οποιαδήποτε ουσία, η παρουσία της οποίας σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, μπορεί να καθυστερήσει, να αναστείλει ή να απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη σε ένα μόριο στόχο» (*Halliwell, 2015*). Εναλλακτικά αντιοξειδωτικό ορίζεται «κάθε ουσία που δύναται να εξουδετερώσει τις ελεύθερες ρίζες ή άμεσα αντιδρώντας με αυτές ή έμμεσα εμποδίζοντας την παραγωγή δραστικών ειδών ή/και ενισχύοντας την αντιοξειδωτική άμυνα» (*Halliwell, 2003*).

Τα αντιοξειδωτικά διαχωρίζονται σε δυο κύριες κατηγορίες, τα ενζυμικά και τα μη ενζυμικά (*Εικόνα 9*). Στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά ανήκουν οι οικογένειες της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx), το ένζυμο της καταλάσης (CAT) και της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD). Στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά ανήκουν: η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, οι βιταμίνες (A,C,E), οι πολυφαινόλες. Υπάρχει και μια κατηγορία αντιοξειδωτικών πρωτεϊνικής φύσεως τα οποία έχουν ειδικότητα υποστρώματος, η οποία περιορίζει την αντιοξειδωτική τους δράση. Τέτοιες είναι ορισμένες πρωτεΐνες όπως η λακτοφερρίνη, η φερριτίνη και η καερούλοπλασμίνη που εμποδίζουν το σχηματισμό RONS απομονώνοντας προοξειδωτικά όπως τα μεταλλικά ιόντα ή την ομάδα της αίμης (*Ighodaro, O.Metal., 2018*).



Εικόνα 9. Κατηγορίες αντιοξειδωτικών (Bunaciya. 2015)

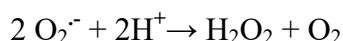
Αναφορικά με τη διάκριση τους, κατηγοριοποιούνται με βάση α) την προέλευση: σε ενδογενή και εξωγενή όπως αυτά που προσλαμβάνονται με την τροφή β) τις φυσικές ιδιότητες: σε υδρόφιλα και λιπόφιλα, γ) τη χημική φύση: ενζυμικά και μη (Ali et al., 2020). Ένας ακόμη τρόπος κατηγοριοποίησης των αντιοξειδωτικών που αναφέρεται στην βιβλιογραφία είναι σύμφωνα με τον μηχανισμό δράσης τους, σε πρωτογενή και σε δευτερογενή. Οι λειτουργίες των πρωτογενών αφορούν την άμεση εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών ως δότες ηλεκτρονίων, τη διακοπή των αλυσιδωτών αντιδράσεων και την ανάκτηση σταθερών μορίων με τη δωρεά ατόμων υδρογόνου (Hamidetal., 2010). Οι λειτουργίες των δευτερογενών μηχανισμών αφορούν την αναγέννηση των πρωτογενών αντιοξειδωτικών και την απομάκρυνση του μονήρους οξυγόνου, τον περιορισμό της διαθεσιμότητας χηλικών μεταβατικών μετάλλων (σιδήρου και χαλκού), την αναστολή των λιπιδικώνυδροϋπεροξειδίων και την επιδιόρθωση οξειδωτικών βλαβών σε σημαντικά βιομόρια (μεμβρανικά λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA) (Santos-Sánchez F.et al., 2019). Βασικό είναι επίσης να διατηρείται η οξειδοαναγωγική ισορροπία ώστε η δράση των αντιοξειδωτικών να μην

αναστέλλει τις ευεργετικές επιδράσεις ή και τον φυσιολογικό ρόλο των ελευθέρων ριζών π.χ. στην κυτταρική σηματοδότηση.

1.4.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

1.4.1.1. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

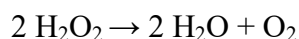
Η SOD είναι ένα μεταλλοένζυμο που στα θηλαστικά απαντάται σε τρεις τύπους υπεροξειδική δισμουτάση του Cu-Zn (SOD1), υπεροξειδική δισμουτάση του Mn(SOD2) και υπεροξειδική δισμουτάση του Fe(SOD3) αντίστοιχα με τη SOD1 να βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, την SOD2 στα μιτοχόνδρια και την SOD3 στο εξωκυττάριο υγρό. Τα μέταλλα αυτά χρησιμοποιούνται ως συμπράγοντες (*He, L., et al. 2017*), καταλύοντας τη μετατροπή ανιόντων υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, εξουδετερώνοντας έτσι τις ελεύθερες ρίζες του $O_2^{\cdot-}$. Στη συνέχεια, το H_2O_2 μπορεί να απομακρυνθεί από άλλα ενζυμικά συστήματα (π.χ καταλάση) (*Sheng, Y., et al. 2014*)



Το μεγαλύτερο μέρος του $O_2^{\cdot-}$ παράγεται στα μιτοχόνδρια κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση και ανάγεται από την μιτοχονδριακή SOD. Καταλύεται ένας κύκλος αντιδράσεων όπου το $O_2^{\cdot-}$ από τη μια ανάγει τα μεταλλικά ιόντα Cu, Zn, Mn και από την άλλη τα οξειδώνει δυσανάλογα παράγοντας O_2 και H_2O_2 . Η διαφυγή του H_2O_2 στο κυτταρόπλασμα μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό RONS με υψηλή δραστηριότητα όπως οι $\cdot OH$ και $ONOO^-$ κατανοώντας έτσι τη σημασία αναγωγής του $O_2^{\cdot-}$ από τις δισμουτάσες προλαμβάνοντας το σχηματισμό RONS. Οι υπεροξειδικές δισμουτάσες παίζουν ρόλο σε ισχαιμικές βλάβες του μυοκαρδίου, του εγκεφάλου, στη φλεγμονή, το Alzheimer's και στην πρόληψη προκαρκινικών αλλαγών στα κύτταρα (*Younus, H., 2018*).

1.4.1.2. Καταλάση (CAT)

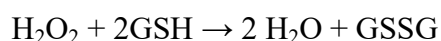
Η καταλάση βρίσκεται στα υπεροξειδιοσώματα των κυττάρων κυρίως των ερυθροκυττάρων και των κυττάρων του ήπατος. Αποικοδομεί το H_2O_2 όπως κάνει και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης GPx και άλλες υπεροξειδάσες. Η αποικοδόμηση από την καταλάση γίνεται με την παρακάτω αντίδραση:



Τα επίπεδα H_2O_2 δεν προκαλούν κορεσμό της αντίδρασης καθιστώντας την αποδοτική σε μεγάλο βαθμό (*Aebi H., 1984*).

1.4.1.3. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Είναι μια πρωτεΐνη που χρησιμοποιεί ως συμπαράγοντα το ιχνοστοιχείο σελήνιο που είναι απαραίτητο για την ενζυμική της δράση. Η κυριότερη αντίδρασή στην οποία συμμετέχει η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης αφορά τη μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O με ταυτόχρονη οξείδωση δύο μορίων γλουταθειόνης (GSH), όπως φαίνεται παρακάτω:



Απαντώνται οκτώ ισοένζυμα (GPX1-8) με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά το καθένα. Τα GPX1, 2, 3 και 4 περιέχουν σεληνοκυστεΐνη όπου το άτομο θείου της κυστεΐνης αντικαθίσταται από σελήνιο. Το GPX6 περιέχει σελήνιο μόνο στον άνθρωπο, αλλά όχι στα τρωκτικά. ενώ τα GPX5, 7 και 8 δεν έχουν σελήνιο, αλλά μια «φυσιολογική» κυστεΐνη (*Sharifi-Rad, M. et al. , 2020*)

1.4.1.4. Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγάση της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνη για την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στην ανοιγμένη της μορφή (GSH) και συνεπώς για τη διατήρηση της φυσιολογικής αναλογίας GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί σε φυσιολογικά επίπεδα το λόγο GSH/GSSG ενδοκυτταρικά.

1.4.2. Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

1.4.2.1. Γλουταθειόνη (GSH)

Η γλουταθειόνη είναι η πιο σημαντική μη ενζυμική, μη πρωτεϊνική ενδογενώς παραγόμενη θειόλη που βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο ήπαρ. Διαδραματίζει ρόλο κλειδί στην κυτταρική σηματοδότηση, την απομάκρυνση ξενοβιοτικών, τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την κυτταρική απόπτωση, την λειτουργία του ανοσοποιητικού και την επούλωση τραυμάτων. Οφείλει την αντιοξειδωτική της δράση στη σουλφυδρυλική ομάδα του καταλοίπου της κυστεΐνης, που ως δότης πρωτονίων προκαλεί αναγωγή οξειδωτικών μορίων (*Lobo et al., 2010*). Ενδοκυτταρικά, συναντάται κυρίως στην ανηγμένη της μορφή (GSH), ενώ ένα μικρό ποσοστό, μόλις 5%, μπορεί να οξειδωθεί και να σχηματίσει το

δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG) μέσω αντίδρασης με δεύτερο μόριο γλουταθειόνης ή άλλες θειόλες (Lu 2013). Σημασία έχει η αναλογία GSH/GSSG. Σε συνθήκες υπερπαραγωγής ελευθέρων ριζών, τροποποιείται το δυναμικό οξειδοαναγωγής, είτε λόγω μείωσης των επιπέδων GSH είτε/ και λόγω αυξημένης παραγωγής GSSG. Η ανηγμένη μορφή αποκαθίσταται τελικά με τη δράση του ενζύμου αναγωγάση της γλουταθειόνης (Lu 2013).

1.4.2.2 Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C (l- ασκορβικό οξύ) είναι ένα υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό μόριο που μπορεί να δρα εντός και εκτός των κυττάρων, εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες δρώντας ως δότης ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας σε δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (όπως ρίζα υδροξυλίου, υπεροξείδιο του υδρογόνου) παράγοντας ένα σταθερότερο μόριο (Pizzino *et al.*, 2017). Συμμετέχει στην αναγέννηση της μη οξειδωμένης μορφής της βιταμίνης E ανάγοντας τις ρίζες τοκοφεροξυλίου προστατεύοντας έτσι τις μεμβράνες και άλλα διαμερίσματα του κυττάρου.

1.4.2.3 Βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)

Είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Η πιο δραστική αλλά και πιο άφθονη είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυτταροπλασματική και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια και τη βιταμίνη A από την οξείδωση που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες (Halliwell and Gutteridge 2015). Μεταξύ αυτών, η α-τοκοφερόλη παρουσιάζει περισσότερο ενδιαφέρον καθώς έχει την υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα και προστατεύει τη κυτταρική μεμβράνη από λιπιδική υπεροξείδωση. Αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα προστασίας της κυτταρικής μεμβράνης δίνοντας ένα άτομο υδρογόνου στη ρίζα λιπιδίου υδροϋπεροξυλίου (LOO•) σχηματίζοντας μια ρίζα βιταμίνης E, η οποία περαιτέρω αντιδρά με μια άλλη ρίζα λιπιδίου υδροϋπεροξυλίου (LOO•) σχηματίζοντας αδρανή προϊόντα (Ayala, A. *et al.*, 2014).

1.4.2.4 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινολικές ενώσεις παράγονται ως δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού των φυτών προκειμένου να ενισχυθεί η άμυνά τους σε εξωτερικούς παράγοντες και απαντώνται σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης αλλά και ποτά (καφές,

κακάο, κρασί, τσάι) που αποτελούν πολύ σημαντικές πηγές πολυφαινόλων. Σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες δρώντας ως δότες ηλεκτρονίου ή ατόμου υδρογόνου. Δρουν επίσης μέσω της χηλίωσης μετάλλων όπως ο σίδηρος II (Fe^{2+}), μειώνοντας την εμφάνιση δραστικών ριζών υδροξυλίου και υπεροξυλίου (*Zhang and Tsao, 2016*).

1.4.2.5 Ουβικινόνη ή συνένζυμο Q

Το συνένζυμο Q (CoQ, ουβικινόνη) είναι ένα λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που δρα ως συμπαραγοντας στην αναπνευστική αλυσίδα, στη σειρά αντιδράσεων οξειδοαναγωγής που εμπλέκονται στη σύνθεση της τριφωσφορικής αδενοσίνης. Η αντιοξειδωτική δράση που ασκεί είναι είτε άμεση εξουδετερώνοντας ρίζες υπεροξυλίου ή έμμεση αναγεννώντας τις βιταμίνες C και E (*Halliwel and Gutteridge 2015*).

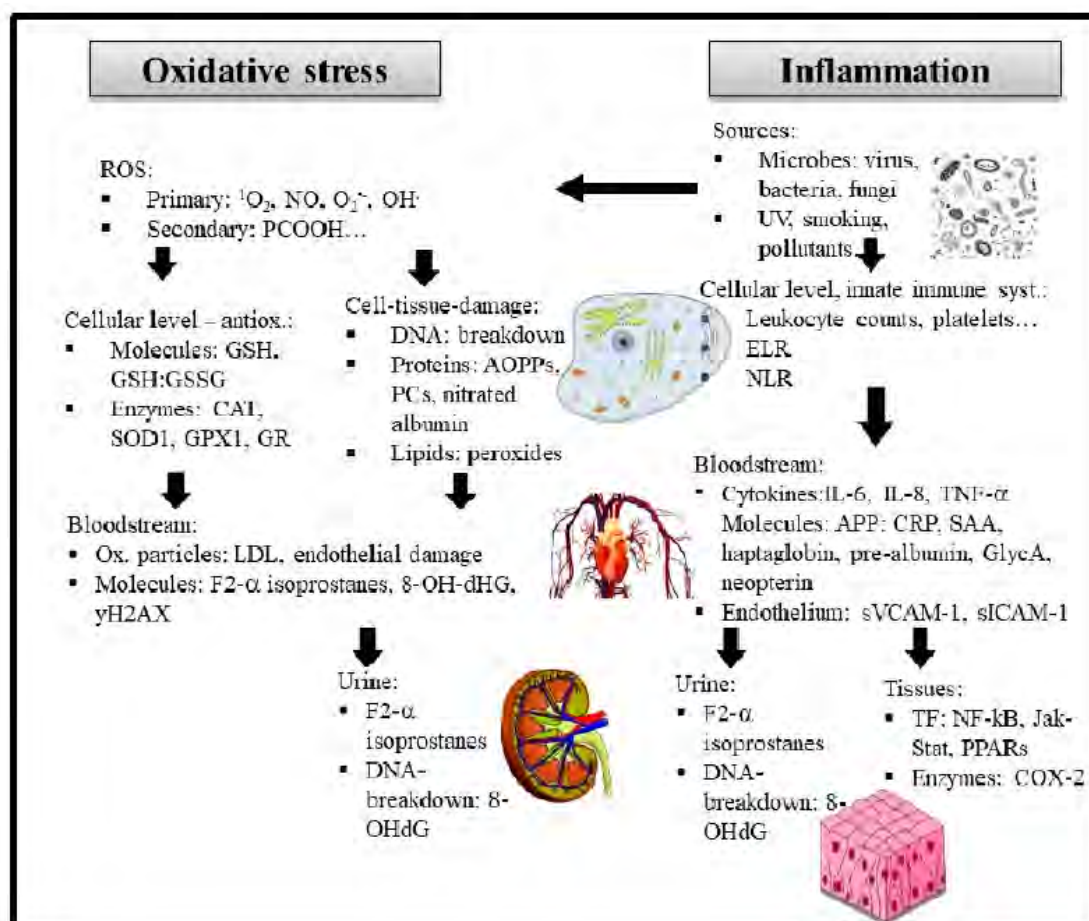
1.4.2.6 Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης τα επίπεδα του ουρικού οξέος αυξάνονται στο πλάσμα του αίματος. Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα ασκώντας προστατευτικό ρόλο ενάντια στις ROS.

1.5. Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες διατυπώθηκε από τον Helmut Sies το 1991 ως «η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων». Η ανισορροπία αυτή αφορά την παραγωγή δραστικών ειδών (κυρίως οξυγόνου και αζώτου) και την ικανότητα του οργανισμού να τα εξουδετερώνει και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή των ελευθέρων ριζών είτε σε μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα είτε σε συνδυασμό αυτών (*Sies, 1991*). Το 2006, ο Dean Jones εισήγαγε έναν νέο ορισμό στην επιστημονική κοινότητα, εκείνον της διαταραχής της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης (*Jones, 2006*). Το 2015, ο Helmut Sies επαναδιατύπωσε το οξειδωτικό στρες με πιο ακριβή τρόπο ως «η διαταραχή προ-οξειδωτικής/αντιοξειδωτικής ισορροπίας υπέρ των οξειδωτικών, που οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου ή/και σε μοριακή βλάβη» (*Sies, 2015*).

Αρχικά δεν ήταν σαφές αν το οξειδωτικό στρες ήταν η αιτία ή το αποτέλεσμα πολλών παθολογικών καταστάσεων. Στην πορεία επιβεβαιώθηκε ότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, οι νευρολογικές διαταραχές, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η ισχαιμία/αιμάτωση, ο διαβήτης, το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και το άσθμα (Birben E., 2012).



Εικόνα 10. Βιοδείκτες φλεγμονής και οξειδωτικού στρες (Menzel A., et al. 2021)

1.5.1 Οξειδωτικό στρες και υγεία μηρυκαστικών

Οι κακές συνθήκες υγιεινής και η μη τήρηση κανόνων βιοασφάλειας έχουν χαρακτηριστεί ως παράγοντες κινδύνου για την υγεία των ζώων που εκτρέφονται σε κλειστούς χώρους. Αυξημένες συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα και αμμωνίας προκαλούν συστηματική φλεγμονώδη απόκριση. Στα πρόβατα η έντονη σωματική καταπόνηση και μεταφορά τους προκαλεί αυξημένη έκκριση κορτιζόλης με αποτέλεσμα την κινητοποίηση του μεταβολισμού των υδατανθράκων και λιπιδίων.

Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση οξειδωτικού στρες που αποδείχθηκε από αυξημένη παραγωγή MDA και χαμηλότερο TAS. Στα μηρυκαστικά έχει παρατηρηθεί η ικανότητά τους να επιλέγουν και να καταναλώνουν συγκεκριμένα φυτά με θεραπευτικές ιδιότητες με σκοπό να θεραπεύσουν νοσογόνες καταστάσεις (αυτοϊαση) όπως φυτά με αντιπαρασιτική δράση (*Villalba et al, 2014*). Φυτικά εκχυλίσματα πλούσια σε πολυφαινόλες ή/και βιταμίνης E χορηγήθηκαν σε σιτηρέσια αγελάδων και προβάτων πλούσιων σε n3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων για να δοκιμαστεί η ικανότητα μείωσης του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τη μεταφορά και τη φυσική δραστηριότητα. Αν και από μόνες τους οι πολυφαινόλες ή η βιταμίνη E δεν ανέστειλαν τη λιπιδική υπεροξείδωση ο συνδυασμός τους ελάττωσε την αυξημένη παραγωγή MDA στο πρόβατο και τις αγελάδες (*Gobert et al., 2009*) εξ αιτίας του συνδυασμού της λιπόφιλης βιταμίνης E και των υδρόφιλων πολυφαινολών.

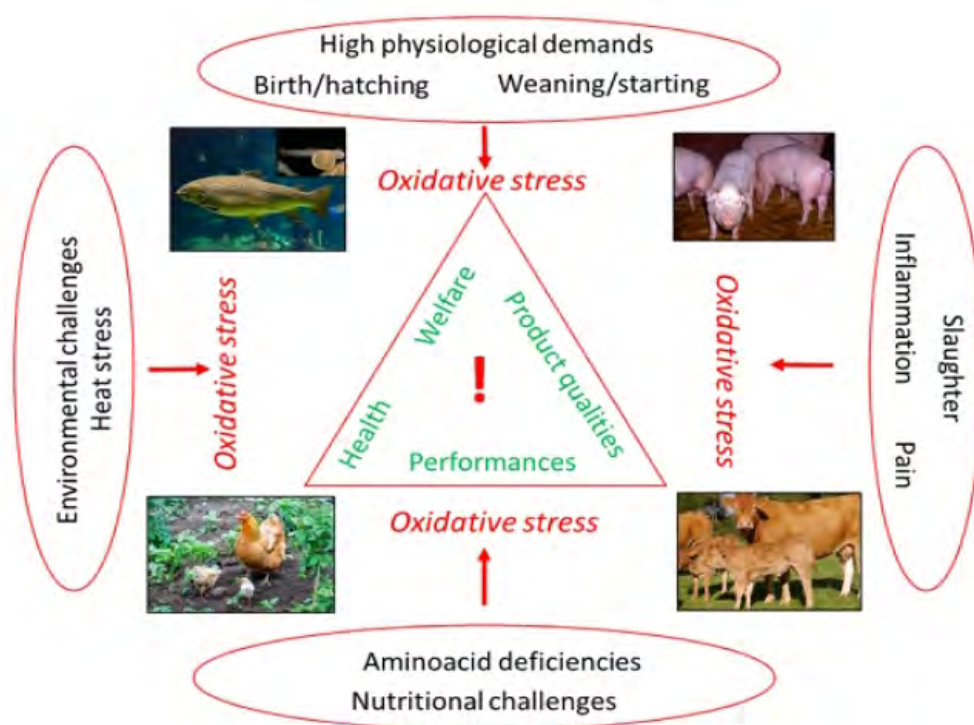
Στην περίπτωση χειρουργικών επεμβάσεων στα πρόβατα παρατηρήθηκαν ενδείξεις οξείδωσης με χαμηλότερο τον λόγο GSH/GSSG και παραγωγή οξειδίου του αζώτου χωρίς όμως να έχουμε αύξηση της λιπιδικής υπεροξείδωσης (*Faure et al., 2017*). Αρα επώδυνοι χειρισμοί πρέπει να γίνονται μόνο όταν απαιτείται χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα αναλγητικά και τηρώντας τους κανόνες ευζωίας. Σε πληθώρα μελετών έχει καταγραφεί πως το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις των κτηνοτροφικών ζώων (μαστίτιδα, σήψη, εντερίτιδα, παθήσεις αρθρώσεων, φλεγμονές αναπνευστικής οδού, πνευμονία) (*Lykkesfeldt & Svendsen, 2007*). Ένα χαρακτηριστικό αυτών των παθήσεων είναι η χρονιότητα και ότι το ζώο δεν οδηγείται στο θάνατο οπότε μπορεί να μελετηθεί μέσω αυτών η σχέση οξειδωτικού στρες και χρόνιας φλεγμονής

1.5.2 Οξειδωτικό στρες και στάδια ανάπτυξης

Από τις πιο κρίσιμες περιόδους σε μια εκτροφή είναι η περίοδος των τοκετών. Υποβάλλεται σε καταπόνηση τόσο η μητέρα όσο και το νεογέννητο το οποίο μας απασχολεί στην παρούσα εργασία σε ότι αφορά τα μικρά μηρυκαστικά. Σε μια τέτοια περίοδο υψηλών απαιτήσεων τεράστια σημασία έχει η ισορροπημένη διατροφή της μητέρας η οποία επηρεάζει τη βιωσιμότητα αλλά και την περαιτέρω ανάπτυξη του νεογέννητου με στόχο την βέλτιστη παραγωγή γάλακτος από την μητέρα και σφάλγιου από το ερίφιο ή τον αμνό. Επιπλέον στρεσογόνοι παράγοντες είναι το θερμικό στρες, η ομαδοποίηση των ζώων με βάση την ηλικία και το παραγωγικό στάδιο που βρίσκονται, η εφαρμογή ή όχι τεχνητής γαλουχίας και οι συνθήκες υγιεινής και

ευζωίας που σχετίζονται και με τον τύπο εκτροφής (εντατική, ημιεντατική, εκτατική) (Εικόνα 11) (Durand D., et al., 2022).

Το οξειδωτικό στρες έχει αναδειχθεί ως ένας νέος δείκτης προσαρμοστικότητας (Abuelo et al., 2019). Οι ROS ακόμη και μέσω της ευεργετικής επίδρασης τους στην ομοιόσταση του κυττάρου και την διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων μέσω της κυτταρικής σηματοδότησης ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση επηρεάζοντας την ανάπτυξη και εξέλιξη των κυττάρων (Dalton et al., 2002). Όμως και η υπέρμετρη παραγωγή ROS δημιουργεί βλάβες σε δομικά στοιχεία του κυττάρου και τη κυτταρική σηματοδότηση- επικοινωνία που πρέπει να αποφευχθεί. Είναι πολύ σημαντικό να καθοριστούν/ταυτοποιηθούν οι κρίσιμες περίοδοι που έχουν επιπτώσεις στην παραγωγή, την υγεία και την ευζωία και εάν αυτές έχουν προσωρινό ή μόνιμο αντίκτυπο στις κυτταρικές λειτουργίες και ολόκληρο τον οργανισμό. Οι περίοδοι αυτοί συνοδεύονται από αλλαγές στην διατροφή, τη διαχείριση και τη φυσική κατάσταση οδηγώντας ενδεχομένως σε αλλαγές στο μεταβολισμό (Salin, K., et al., 2015).



Εικόνα 11. Οξειδωτικό στρες και ζώα παραγωγής (Durand D., et al. 2022)

1.5.2.1 Από το κύημα στο θηλασμό

Κατά την κύηση το έμβρυο αναπτύσσεται σε ένα υποξικό περιβάλλον μέσω της εμβρυομητρικής κυκλοφορίας θρεπτικών συστατικών και αμέσως μετά τον τοκετό υπό φυσιολογικές συνθήκες γίνεται έκπτυξη των πνευμόνων και αρχίζει η αυτόματη πνευμονική αναπνοή. Όσο απαραίτητες είναι οι συνθήκες υποξίας για την ανάπτυξη του κυήματος τόσο απαραίτητος είναι ο αερόβιος μεταβολισμός στο νεογέννητο για την περαιτέρω ανάπτυξή του (*Morton and Brodsky, 2016*). Αυτή η μεταβολή συνοδεύεται από την παραγωγή ROS από τα κύτταρα του νεογεννήτου (*Friel et al., 2004*). Η δεύτερη αλλαγή που καλείται να ανταποκριθεί το νεογέννητο είναι η λήψη τροφής από το στόμα και μάλιστα το πρώτο δίωρο από τη γέννησή του. Πρόκειται για το πρωτόγαλα που παράγει ο μαστός τις πρώτες ημέρες. Το πρωτόγαλα μεταξύ άλλων έχει υψηλή περιεκτικότητα σε ανοσοσφαιρίνες (IgG) οι οποίες συμβάλλουν στην παθητική ανοσοποίηση του νεογεννήτου στα πρώτα στάδια της ζωής του και είναι ύψιστης σημασίας στα μηρυκαστικά. Αυτή η ανοσία επιτυγχάνεται με τη λήψη



πρωτογάλακτος ποσότητας ίση με έως και 10% του βάρους του νεογέννητου το πρώτο 12ωρο ώστε οι ανοσοσφαιρίνες να μπορούν να διαπεράσουν τον εντερικό φραγμό (*Osorio, 2020; Rosa et al., 2021*). Πέρα από την πυκνότητα θρεπτικών συστατικών και ανοσοσφαιρινών το πρωτόγαλα βρίθει βιοενεργών μορίων που περνάνε από τη μητέρα στο νεογνό με σκοπό την ωρίμανση του εντέρου του νεογέννητου παρέχοντας προστασία αλλά αυξάνοντας και τις προκλήσεις για το νεογέννητο.

Εικόνα 12. Κυοφορία προβάτου 50 ημερών - έμβρυο (προσωπικό αρχείο Αλεξίου Ιωάννη)

Προηγούμενες έρευνες σε μυρिकाστικά ζώα, έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί κατά των ROS αναπτύσσονται κατά την κύηση ή πριν την εκκόλαψη στα πτηνά. Στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής το 75% των παθήσεων εμφανίζεται περί του τοκετού και το διάστημα τριών εβδομάδων πριν και μετά τον τοκετό θεωρείται μεταβατική περίοδος αποτελούμενη από ενδοκρινικές-μεταβολικές, διατροφικές αλλαγές, απορρύθμιση του ανοσοποιητικού, την μετάβαση από την ξηρά περίοδο στη γαλακτική. Οι μη ιδανικές συνθήκες κυοφορίας επηρεάζουν σε κάποιο βαθμό την ανάπτυξη του ενδογενούς αντιοξειδωτικού μηχανισμού στο έμβρυο και κατ' επέκταση την οξειδοαναγωγική ισορροπία στο νεογέννητο μόσχο (*Abuelo A. et al., 2019*). Κατ' επέκταση, η πολυδυμία στα πρόβατα σχετίζεται με μεγαλύτερο οξειδωτικό στρες όπως εκτιμήθηκε στο ομφαλικό αίμα (*Salesetal., 2018*).

Σε καταστάσεις πολυδυμίας και παθολογικές καταστάσεις που οδηγούν σε μειωμένη γαλακτοπαραγωγή από την προβατίνα ακόμη και η χορήγηση υποκατάστατου γάλακτος δεν κατάφερε να φέρει την αντιοξειδωτική ικανότητα των νεογέννητων αμνών σε φυσιολογικά επίπεδα (*Mialon et al., 2021*). Παθολογικές καταστάσεις όπως το διαρροϊκό σύνδρομο, οι λοιμώξεις του αναπνευστικού, σεληνιοπενία και αρθρίτιδες παθήσεις δηλαδή πολύ συχνές στα νεογέννητα πρέπει να διερευνηθεί το πώς αλληλεπιδρούν με τους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας του νεογέννητου.

1.5.2.2. Απογαλακτισμός και ενήβωση

Η απομάκρυνση του νεογέννητου από την μητέρα του και η χορήγηση σε αυτό ξηράς τροφής (συμπύκνωμα, χονδροειδείς τροφές) προκαλούν καταστάσεις οξειδωτικού στρες το οποίο σχετίζεται περισσότερο με φλεγμονώδεις καταστάσεις και ανοσολογικές αντιδράσεις που μπορεί να επηρεάσουν τον οργανισμό στο σύνολό του. Από πειραματισμούς που έγιναν σε χοιρίδια (*McCrackenetal., 1999; Gilbert et al., 2019*) έδειξαν ότι η ανορεξία και απροθυμία λήψης στερεάς τροφής, η ποσότητα και συχνότητα της χορηγούμενης τροφής και η σύνθεσή της μπορεί να οδηγήσουν σε φλεγμονή των εντερικών λαχνών.

Εκτός αυτής της κατάστασης εντερικής δυσλειτουργίας παρατηρείται και γενικευμένη φλεγμονή που μπορεί να διαρκεί μέχρι και ένα μήνα μετά τον απογαλακτισμό. Τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες ήταν υψηλότερα σε χοιρίδια με

διάρροια κατά τον απογαλακτισμό (*Buchet et al., 2017*) και η αντιοξειδωτική άμυνα (δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια) μειωμένη στα ελλιποβαρή σε σχέση με την υπόλοιπη τοκετοομάδα γεννηθέντα χοιρίδια (*Novais et al., 2021*). Η μειωμένη όρεξη κατά τον απογαλακτισμό οδηγεί και σε μειωμένη λήψη αντιοξειδωτικών με την τροφή που θα μπορούσαν να ισορροπήσουν τις ελεύθερες ρίζες που παράγει η φλεγμονή (*Amazan et al., 2012*). Στη διαχείριση αυτής της κατάστασης μπορεί να βοηθήσει η χορήγηση βιταμινών Α και Ε κατά τις πρώτες ημέρες της ζωής (*Buchet et al., 2017*).

1.5.2.3. Οξειδωτικό στρες και ανάπτυξη

Η επιλογή παραγωγικών ζώων τις τελευταίες δεκαετίες γίνεται με κριτήριο το ρυθμό ανάπτυξης και τις αυξημένες αποδόσεις κατι που έχει και αυξημένες απαιτήσεις από τον οργανισμό. Σε κυτταρικό επίπεδο αυτό θα σήμαινε αύξηση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας για την κάλυψη των ενεργειακών απαιτήσεων από τη μια πλευρά και αυξημένο ρίσκο οξειδωτικού στρες από την άλλη. Αυτό έρχονται να το υποστηρίξουν μελέτες σε ταχέως αναπτυσσόμενα χοιρίδια που έδειξαν αυξημένες συγκεντρώσεις υδροϋπεροξειδίων στο πλάσμα του αίματος (*Buchet et al., 2017*) και μειωμένη αντιοξειδωτική προστασία σε ταχέως αναπτυσσόμενες φυλές σε σχέση με τις βραδεία αναπτυσσόμενες (*Brambilla et al., 2002; Merlot et al., 2012*). Παρά ταύτα σε αυτές τις υψηλής γενετικής αξίας φυλές χοίρων δεν παρατηρήθηκε αύξηση νοσηρότητας παρότι θεωρούνται πιο ευαίσθητες.

Το πρωτεϊνικό προφίλ των μιτοχονδρίων που απομονώθηκε από σκελετικούς μύες χοίρων υψηλών αποδόσεων έδειξε αύξηση της αντιοξειδωτικής αμυντικής ικανότητας σε σύγκριση με τους χοίρους χαμηλών αποδόσεων (*Grubbs et al., 2013*). Σε καλές συνθήκες σταβλισμού οι χοίροι υψηλών αποδόσεων έχουν χαμηλότερες αντιοξειδωτικές ενζυμικές δραστηριότητες, όπως η αναγωγή της γλουταθειόνης και η καταλάση στον λιπώδη ιστό και η δισμουτάση υπεροξειδίου στους μυς, και όταν εκτρέφονται σε υποβαθμισμένες συνθήκες υγιεινής που προκαλούν φλεγμονώδη αντίδραση, οι χοίροι υψηλών αποδόσεων παρήγαγαν λιγότερες ROS από τους χοίρους χαμηλών αποδόσεων (*Sierzanetal., 2019*). Ομοίως, οι ταύροι υψηλότερων αποδόσεων είχαν χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση στο ήπαρ, γεγονός που ερμηνεύεται ως συνέπεια της χαμηλότερης παραγωγής ROS σε αυτά τα ζώα σε σύγκριση με τους ταύρους χαμηλών αποδόσεων (*McKenna et al., 2021*). Συνεπώς, με βάση τα ευρήματα σε επίπεδο μιτοχονδριακής δραστηριότητας από τους χοίρους εικάζεται ότι δεν υπάρχει απόλυτη σχέση μεταξύ υψηλών παραγωγικών αποδόσεων

και οξειδωτικού στρες. Οποιαδήποτε ανεπάρκεια ή περίσσεια μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών μπορεί να δημιουργήσει ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS και της αντιοξειδωτικής άμυνας στους ιστούς εξ αιτίας στενών σχέσεων μεταξύ της χρήσης θρεπτικών ουσιών για την παραγωγή κυτταρικής ενέργειας, της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και της αντιοξειδωτικής άμυνας.

Σημαντικός είναι ο ρόλος των θειούχων αμινοξέων όπως η μεθειονίνη και η κυστεΐνη λόγω της συμμετοχής τους στη σύνθεση πρωτεϊνών στα διάφορα είδη και λαμβάνοντας υπόψη ότι οι περισσότερες ζωοτροφές όπως το σογιάλευρο έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε αυτά. Αυτά τα αμινοξέα μπορούν να μετριάσουν άμεσα την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ζωικών ιστών λόγω της συμμετοχής τους στη σύνθεση της GSH και της ταυρίνης (*Durand D., et al. 2022*).

Στα σιτηρέσια αγελάδων γαλακτοπαραγωγής υψηλής απόδοσης μπορεί να χορηγηθεί συμπλήρωμα μεθειονίνης, η οποία σε αυτή τη μορφή διατροφικού συμπληρώματος παρουσιάζει ενδιαφέρον για τη βελτίωση της απόδοσης των αγελάδων και του μεταβολισμού του ήπατος (*Durand et al., 1992; Bauchart et al., 1998*). Ωστόσο, σε αναπτυσσόμενους ταύρους που διατρέφονται με αυξημένη ποσότητα χονδροειδών τροφών η χορηγούμενη μεθειονίνη δεν έδειξε να βελτιώνεται τον ενδογενή μηχανισμό αντιοξειδωτικής άμυνας ή να μεταβάλλει την οξειδοαναγωγική κατάσταση (*Cantalapiedra-Hijar et al., 2020*). Αυτά τα πειράματα δείχνουν τη δυνατότητα ορισμένων αμινοξέων να ρυθμίσουν το οξειδωτικό στρες σε εκτρεφόμενα είδη όπως μπορεί να συμβεί βρίσκοντας την ισορροπία και στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (n-6/n-3).

Επίσης περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η υποξία είτε λόγω θέσης εκτροφής π.χ. βόσκηση για μεγάλο χρονικό διάστημα σε μεγάλο υψόμετρο είτε λόγω συνωστισμού και κακού αερισμού όπως επίσης και η θερμική καταπόνηση χρήζουν διερεύνησης.

2. Σκοπός

Στόχος της παρούσας διπλωματικής ήταν ο προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης δειγμάτων ιστών ήπατος, τετρακέφαλου μυός, διαφράγματος και ψοϊτή μυός που προήλθαν από αμνούς και ερίφια σε τέσσερα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης (25%, 35%, 70% και 100%) με τη χρήση συγκεκριμένων βιοδεικτών με σκοπό τη συμβολή στη δημιουργία μιας βάσης δεδομένων βιοδεικτών για την υγεία των μικρών μηρυκαστικών, χωρίς κάποια διατροφική παρέμβαση πλαισιώνοντας αντίστοιχες εργασίες. Έτσι μπορεί να επιτευχθεί μια εκτίμηση της επάρκειας της αντιοξειδωτικής άμυνας των παραγωγικών ζώων. Αυτό από τη μία θα βοηθήσει στο να σχηματιστεί μια εικόνα των συνθηκών ευζωίας, σταβλισμού και διατροφικής διαχείρισης και από την άλλη πως αυτές οι συνθήκες επηρεάζουν την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων (γάλα, κρέας), καθώς και στην περίπτωση που υπάρχει συσχέτιση με την οξειδοαναγωγική κατάσταση των εκτρεφόμενων ζώων, τι πιθανότητες βελτίωσης υπάρχουν.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Η λήψη των ιστών έγινε από σφάγια 48 εριφίων και 96 αμνών από την περιοχή της Μακεδονίας. Η διαδικασία σφαγής τους πραγματοποιήθηκε στο πλησιέστερο σφαγείο ώστε να μην υφίστανται περαιτέρω καταπόνηση κατά τη μεταφορά. Επιλέχθηκαν ζώα ζώντος βάρους όπως περιγράφεται στον πίνακα (Πίνακας 4). Το στάδιο ανάπτυξης 25% αφορά αμνούς και ερίφια μέχρι τον απογαλακτισμό, το δεύτερο στάδιο 35% αμέσως μετά τον απογαλακτισμό ενώ τα δύο τελευταία στάδια (70% και 100%) αφορούν νεαρά ενήλικα και ενήλικα, αντίστοιχα. Πρόκειται για ζώα και των δύο φύλων σε ίσους αριθμούς χωρίς στην παρούσα μελέτη να λαμβάνεται υπόψη η φυλή, ο τύπος εκτροφής και το σιτηρέσιο τους. Στη διατροφή αυτών των ζώων δεν έγινε καμία χορήγηση πρόσθετων/ αντιοξειδωτικών.

Πίνακας 4. Σωματικό βάρος και στάδιο ανάπτυξης των ζώων που επιλέχθηκαν για τη μελέτη

	Πρόβατα				Αίγες			
Σωματικό βάρος (Kg)	<17,6	17,6 - 23.5	39.6– 55	>55	<17.1	17.1– 23.5	32.6– 42.5	>42.5
Στάδιο ανάπτυξης	25%	35%	70%	100%	25%	35%	70%	100%

3.2 Δειγματοληψία

Για τη λήψη των ιστών, τα αιγοπρόβατα μεταφέρθηκαν σε ειδικά κελιά. Πραγματοποιήθηκε η αναισθητοποίησή τους με ειδική συσκευή ηλεκτρναναισθησίας προ της σφαγής με σκοπό την ελαχιστοποίηση του πόνου. Η διαδικασία τελέστηκε από απόλυτα εξειδικευμένο προσωπικό τηρώντας την προβλεπόμενη νομοθεσία περί σφαγής και ευζωίας.

Μετά την αναισθητοποίηση των αιγοπροβάτων ακολούθησε η μεταφορά τους στην ειδική γραμμή σφαγής όπου και πραγματοποιήθηκε η σφαγή, η αφαίμαξη τους εντός 60 δευτερολέπτων από την στιγμή της αναισθητοποίησης και ο εκσπλαχνισμός των ζώων. Από κάθε σφάγιο, με χρήση νυστεριού, συλλέχθηκαν 10 g από κάθε ιστό από όσο το δυνατόν αντίστοιχο σημείο ανα ζώο. Λήφθηκαν οι εξής ιστοί: ήπαρ,

ψοϊτης, τετρακέφαλος μυς και διάφραγμα. Τα δείγματα των παραπάνω ιστών τοποθετήθηκαν σε ειδικές κασέτες και μεταφέρθηκαν σε υγρό άζωτο και αμέσως μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας σε βαθειά κατάψυξη (-80°C), όπου και διατηρήθηκαν μέχρι την εργαστηριακή τους ανάλυση.

3.2.1 Επεξεργασία ιστών - Ομογενοποίηση

Βγάζοντας τις κασέτες των δειγμάτων από τη βαθειά κατάψυξη τοποθετήθηκαν σε πάγο όπου γίνεται και ο χειρισμός τους. Ζυγίστηκαν 0,2-0,25 g ιστού και τοποθετήθηκαν μέσα σε ειδικά σωληνάρια ομογενοποίησης στα οποία προστέθηκε διάλυμα 600–750 µL PBS με μείγμα αναστολέων πρωτεασών (αναλογία 1:3). Τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν σε ειδικό ομογενοποιητή για χρονικό διάστημα 30 δευτερολέπτων στην υψηλότερη ταχύτητα. Έγινε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 15.000 g σε θερμοκρασία 5 °C και το υπερκείμενο από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο Eppendorf το οποίο και διατηρήθηκε στην βαθειά κατάψυξη των -80°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους. Τονίζεται ότι το σύνολο των διαδικασιών πραγματοποιήθηκε μέσα στο πάγο.

3.3 Μέθοδοι

Οι δείκτες που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν οι εξής: ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ο ρυθμός αποικοδόμησης H₂O₂ (καταλάση), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – Total Antioxidant Capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARBS- Protein Carbonyls).

3.3.1 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη χρήση του αντιδραστηρίου Bradford

Για να προσδιοριστεί η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης του εκάστοτε δείγματος ήταν απαραίτητη η δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης με τη χρήση της πρωτεΐνης αλβουμίνης. Έπειτα χρησιμοποιώντας την καμπύλη αλβουμίνης ως πρότυπη πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας της πρωτεΐνης των δειγμάτων με τη χρήση του αντιδραστηρίου Bradford.

Η συγκεκριμένη μέθοδος μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των

πρωτεϊνών. Ως αποτέλεσμα παρατηρείται σχηματισμός προϊόντος το οποίο έχει μπλε χρώμα. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 595 nm (Bradford, 1976). Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις.

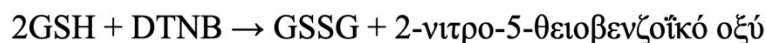
Για τη διεξαγωγή του πειράματος πραγματοποιήθηκε:

- Αραίωση των δειγμάτων 1/30 (10 μl δείγματος σε 290 μl PBS)
- Προσθήκη 20 μl αραιωμένου δείγματος και 1 ml αντιδραστήριο Bradford (Blank: αντί για 20 μL δείγμα, προσθέτω 20 μL PBS)
- Vortex
- Επώαση 15 λεπτών στο σκοτάδι
- Μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 595nm με γυάλινη κυψελίδα

3.3.2. Προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης(GSH)

Αρχή μεθόδου

Η μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης προκύπτει από την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος το οποίο απορροφάει στα 412 nm. Πιο αναλυτικά, όταν η GSH αντιδρά με το DTNB παράγονται GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ. Η χημική αντίδραση είναι η εξής :



Όπως φαίνεται παραπάνω η GSH οξειδώνεται από το DTNB και το έγχρωμο προϊόν που προκύπτει είναι το 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ. Έπειτα η GSH ανακυκλώνεται από την αναγωγή της GSSG με τη δράση του ενζύμου αναγωγάση της γλουταθειόνης.

Πειραματική διαδικασία

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5) αναγράφεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 5. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό των επιπέδων της GSH

Προσδιορισμός GSH
Καθαρισμός δειγμάτων: Ανάμιξη 100 μl ομογενοποιημένου ιστού και 100 μl 5% TCA Φυγοκέντρηση του δείγματος στα 15000 g για 5 λεπτά στους 25 °C
Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf

Ανάμιξη αντιδραστηρίων		
	Τυφλό	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 67 mM pH 7,95	660 μl	660 μl
PBS	20 μl	-
Καθαρισμένο ομογενοποίημα	-	20 μl
DTNB 1mM σε 1% κιτρικό νάτριο σε dH ₂ O	330 μl	330 μl
Επώαση 15 λεπτών στο σκοτάδι		
Μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 412 nm		

Υπολογισμοί

Για τον υπολογισμό των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στους ιστούς πραγματοποιήθηκαν οι εξής υπολογισμοί:

$$GSH \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg total protein}} \right) = \frac{\frac{(Abs_{\text{Δείγματος}} - Abs_{\text{Τυφλού}})}{13,6} \times 2 \times 50,5 \times 4}{\text{Ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης δείγματος}}$$

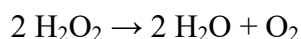
Όπου:

- Δια 13,6 (L / mmol / cm): συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB
- Επί 50,5: συντελεστής αραίωσης (DF), προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μl) με τον όγκο του δείγματος (20 μl) (1010/20 = 50,5)
- Επί 4: αραίωση κατά την ομογενοποίηση
- Επί 2: αραίωση με TCA 5% (50 μl / 50 μl)

3.3.3. Προσδιορισμός του ρυθμού αποικοδόμησης του H₂O₂ μέσω της δραστηριότητας του ενζύμου της καταλάσης

Αρχή μεθόδου

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου προκύπτει από το μεταβολισμό και είναι ένα ιδιαίτερα τοξικό μόριο για τον οργανισμό. Η αποικοδόμηση του πραγματοποιείται από πληθώρα ενζύμων και μεταξύ αυτών η καταλάση. Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε δύο μη τοξικά μόρια για τον οργανισμό, το νερό και το οξυγόνο. Η αντίδραση που καταλύεται από την καταλάση είναι η εξής :



Πειραματική διαδικασία

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6) αναγράφεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 6. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό του ρυθμού αποικοδόμησης του H_2O_2

Δοκιμή καταλάσης (CAT)	
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών φωσφορικών 67 mM pH 7,4	2990 μ l
Ομογενοποίηση ιστού (Ήπαρ 1:40)	5 μ l
Ανάδευση και επώαση 10 min στους 37 °C	
Μεταφορά περιεχομένου σε κυψελίδα Quartz + 5 μ l 30% H_2O_2	
Ανάκνηση με parafilm και μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 240 nm για 125sec	

Υπολογισμοί

Η δραστηριότητα της καταλάσης ορίζεται ως εξής:

$$\Delta\text{ραστ. καταλάσης} \left(\frac{U}{mg \text{ total prot.}} \right) = \frac{\frac{\Delta Abs \text{ δείγματος}}{40} \times 75 \times 1000 \times 4}{\text{Συγκέντρωση πρωτεΐνης δείγματος}}$$

Όπου:

- 40 (L / mol / cm): μοριακός συντελεστής απόσβεσης του H_2O_2 , που πολλαπλασιάζεται με το 1000 για να μετατραπεί από mol / L σε μ mol / ml
- 75: συντελεστής αραίωσης, προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (3000 μ l) με τον όγκο του δείγματος (40 μ l) ($3000/40 = 75$)
- 4: αραίωση του δείγματος (1/4) κατά την ομογενοποίηση
- U = μ mol / λεπτό, ΔAbs (min) = η μεταβολή στην απορρόφηση σε ένα λεπτό.

3.3.4. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC-TotalAntioxidantCapacity)

Αρχή μεθόδου

Διάφορα συστατικά που περιέχονται στους ιστούς έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν ένα μέρος ελευθέρων ριζών στο κυτταρικό περιβάλλον. Ο πιο συχνός και αξιόπιστος τρόπος προσδιορισμού της παραπάνω ικανότητας είναι η μέτρηση της TAC σαν σύνολο αλλά και το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας

κάθε συστατικού ξεχωριστά. Αναφέρεται στην συνολική ικανότητα των συστατικών των ιστών ως προς την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών. Συνεπώς, αποτελεί μέτρο της συνολικής εκτίμησης της αντιοξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού και οφείλεται στη συνεισφορά πολλών μορίων (π.χ. ουρικό οξύ).

Στη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, η αναγωγή της ρίζας DPPH[•] (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) προς σχηματισμό της υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine) προσδιορίστηκε με φωτομετρηση στα 520 nm.

Πειραματική διαδικασία

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7) αναγράφεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 7. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό της TAC

Δοκιμή Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC)		
	Τυφλό	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM (pH 7,4)	500 μl	460 μl
DPPH 0,1 mM	500 μl	500 μl
Ομογενοποιημένος ιστός αραίωση 1/2	—	40 μl
Επώαση 60 min σκοτάδι		
Φυγοκέντρηση 15000 g (3 min, 25 °C)		
Μέτρηση απορρόφησης στα 520 nm		

Υπολογισμοί

Η μείωση της απορρόφησης σε σχέση με το τυφλό υπολογίζεται ως εξής:

$$\frac{\text{mmol DPPH (που εξουδετερώθηκαν)}}{\text{mg total protein}} = \frac{\left(\frac{\% \text{ Abs (μείωση)}}{100} \times 50 \times 25 \times 4 \times 2 \right)}{1000 \text{ ολική πρωτεΐνη (mg)}}$$

Όπου:

- 100: μετατροπή της μείωσης της απορρόφησης σε ποσοστό απορρόφησης

- 50: συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol} / \text{L}$ κυψελίδας.
- 25: αραίωση του δείγματος στην κυψελίδα (1000 μl στην κυψελίδα / 40 μl δείγματος / στην κυψελίδα = 25)
- 4: αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίηση
- 2: αραίωση του δείγματος κατά $\frac{1}{2}$ στη μέθοδο
- 1000: μετατροπή των L του δείγματος σε ml του δείγματος

Η κανονικοποίηση για τη συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης έγινε με τον ακόλουθο τύπο: $\text{mmolDPPH} (\text{mmol} / \text{mg συνολικής πρωτεΐνης}) = \text{mmolDPPH} \text{nmol} / \text{ml} / \text{συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης} \text{mg} / \text{ml}$

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

Αρχή της μεθόδου

Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες στο περιβάλλον του κυττάρου δημιουργούνται υπεροξείδια των λιπιδίων, τα οποία προκύπτουν από την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Όταν τα υπεροξείδια των λιπιδίων διασπαστούν παράγεται η μαλονδιαλδεΰδη, η οποία αντιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΰδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ $\frac{1}{2}$. Το προϊόν που παράγεται μετράται φωτομετρικά στα 530nm και η μέθοδος αποτελεί δείκτη υπεροξείδωσης των λιπιδίων.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8) αναγράφεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα διατριβή.

Διαδικασία TBARS		
Σε Falcon 15 mL προστέθηκαν		
	Τυφλό	Δείγμα

TCA 35%	500 μ L	500 μ L
PBS	100 μ L	-
Ομογενοποίημα ιστού	-	100 μ L
Tris – HCL 200 nM, pH 7,4	500 μ L	500 μ L
Vortex και επώαση 10 min θ δωματίου		
Προσθήκη 1 mL Na ₂ SO ₄ (2M)-TBA(55mM)		
Vortex και επώαση 45 min 95 °C υδατόλουτρο		
Επώαση 15 min σε πάγο		
Προσθήκη 1 mL TCA και Vortex		
1 mL από Falcon σε eppendorf και φυγοκέντρηση (11.200 g, 3 min, 25 °C)		
Μεταφορά υπερκειμένου με πιπέτα και φωτομέτρηση στα 530 nm		

Πίνακας 8. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδωσής

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Συγκέντρωση TBARS } \left(\frac{\text{mmol}}{\text{mg total prot.}} \right) = \frac{\frac{(\text{Abs Δείγματος} - \text{Abs Τυφλού})}{0,156} \times 31 \times 4 \times 3}{\text{Συγκέντρωση πρωτεΐνης δείγματος}}$$

Όπου:

- 31: συντελεστής αραίωσης (προκύπτει από 3100 μ L τελικό όγκο / 100 μ L όγκο του ομογενοποιημένου ιστού = 31)
- 0.156: συντελεστής μοριακής απόσβεσης* της MDA
- 10-6: μετατροπή των mol/L σε μ mol/L
- 4: αραίωση ομογενοποίησης,
- 3: 3 φορές αραίωση δείγματος κατά τη μέτρηση

* Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

3.3.6. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Αρχή της μεθόδου

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας αξιόπιστος δείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της σταθερότητας αυτών των μορίων. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) που αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα σε διπλό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου $C = O$, ως συνήθως αποτελούν μέρος σε άλλες μεγαλύτερες λειτουργικές ομάδες. Παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr). Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δινιτροφαινυλδραζονίου, που απορροφά στα 375nm. Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο Patsoukis et. al., (2004).

Πειραματικό πρωτόκολλο

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9) αναγράφεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 9. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό των επιπέδων της πρωτεϊνικής οξείδωσης

Διαδικασία καρβονυλίων (CARBS)		
Σε eppendorf: 50 μ L ομογενοποιημένου ιστού και 50 μ L 20% TCA (κατακρήμνιση πρωτεϊνών)		
Επώαση 15 min σε πάγο – φυγοκέντρηση (15.000g, 5 min 4 $^{\circ}$ C)		
Απομάκρυνση υπερκεμένου κ προσθήκη στο ίζημα:		
	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
DNPH 14 mM (σε HCL 2,5N)	-	500 μ l
HCL 2,5N	500 μ L	-
Διάλυση ιζήματος με πιπέτα και vortex		
Επώαση 60 min σε σκοτάδι και vortex κάθε 15 min		
Φυγοκέντρηση (15.000 g, 5 min 4 $^{\circ}$ C)		
Απομάκρυνση υπερκεμένου και προσθήκη 1 mL 10% TCA		

Vortex και Φυγοκέντρωση (15.000 g, 5 min 4 °C) 3 φορές
Απομάκρυνση υπερκειμένου και προσθήκη 1mL διαλύματος ιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία 1:1 v/v). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε 3 φορές
Vortex και Φυγοκέντρωση (15.000 g, 5 min 4 °C) 3 φορές
Απομάκρυνση υπερκειμένου+1mL Δμ ουρίας (5M)(pH 2,3)
Ανάδευση και επώαση (15 min 37 °C)
Φυγοκέντρωση (15.000 g, 3 min 4 °C)
Μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 375 nm

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Συγκ. πρωτ. καρβονυλίων} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{mg total prot.}} \right) = \frac{\frac{(\text{Abs Δείγματος} - \text{Ab Τυφλού})}{0,022} \times \frac{1000}{50} \times 4 \times 2}{\text{Συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης}}$$

Όπου:

- 0,022: 22 L / mmol / cm = με 22 mL / μmol / cm = 0,022 ml / nmol / cm. Ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM / cm
- 1000/50: συντελεστής αραίωσης (1000 μl στην κυψελίδα / 50 μl του δείγματος)
- 4: αραίωση (1/4) κατά την ομογενοποίηση
- 2: αραίωση του δείγματος (1/2)

Η κανονικοποίηση για τη συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με τον ακόλουθο τύπο: **Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol / mg πρωτεΐνης) = συγκέντρωση καρβονυλίων nmol / ml / συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης mg / ml**

3.4 Στατιστική Ανάλυση

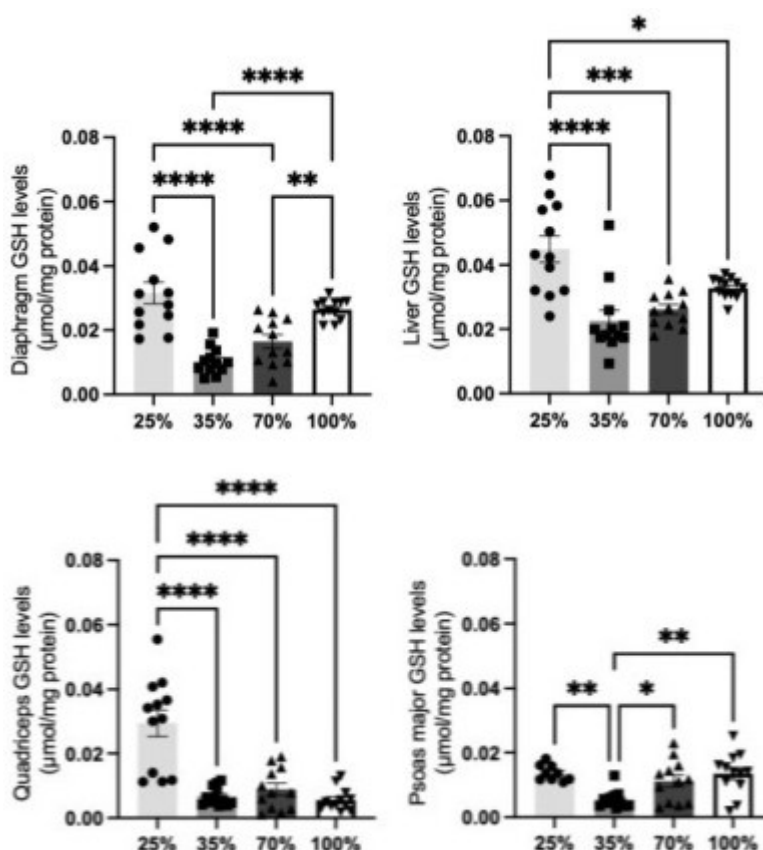
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του one-way ANOVA test και στη συνέχεια εκτιμήθηκε η σημασία της όποιας διαφοράς των αποτελεσμάτων για κάθε ιστό που χρησιμοποιήθηκε και για τα στάδια ανάπτυξης χωριστά. Συγκεκριμένα έγινε σύγκριση ανάμεσα στα στάδια ανάπτυξης των αιγοπροβάτων και συγκεκριμένα μεταξύ του σταδίου ανάπτυξης 25%, 35%, 70% και

100% (ανεξάρτητη μεταβλητή) για τον κάθε ξεχωριστό δείκτη οξειδοαναγωγικής κατάστασης (εξαρτημένη μεταβλητή). Στην περίπτωση που δεν σχηματίζονταν καμπύλη κανονικής κατανομής με το Shapiro Wilk test εφαρμόστηκε το Kruskal – Wallis test κάνοντας πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων σταδίων ανάπτυξης. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως $p < 0.05$. Η στατιστική ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 8.0.0.

4. Αποτελέσματα

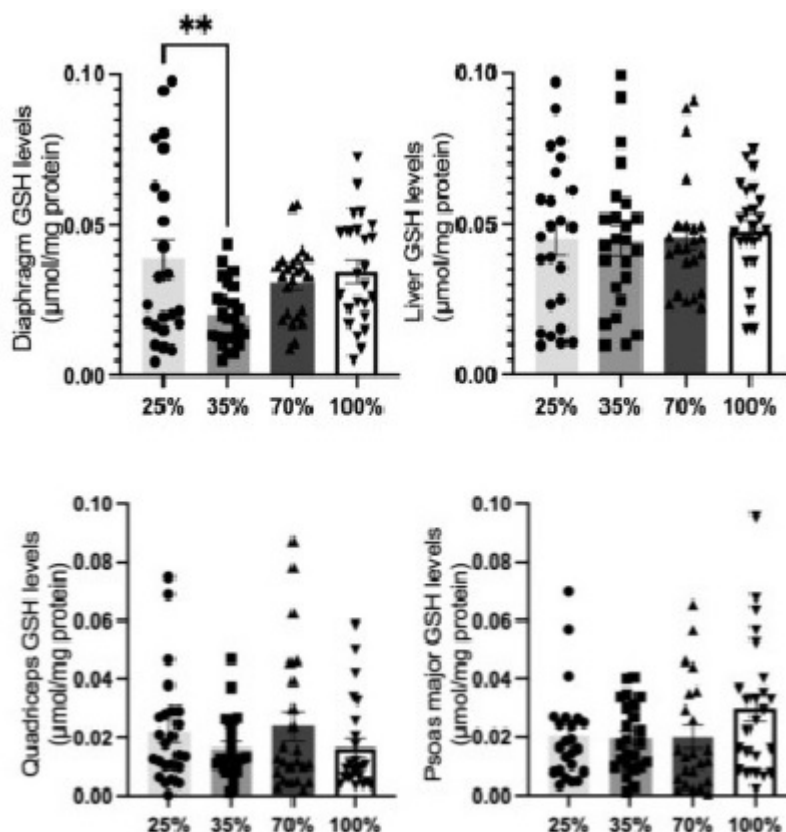
4.1 Επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 13* παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$) αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης στα ερίφια του σταδίου ανάπτυξης 25% σε όλους του ιστούς.



*Εικόνα 13. Μεταβολή των επιπέδων της GSH ανάμεσα στα 4 στάδια ανάπτυξης των εριφίων, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. * στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.05$, ** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.01$, *** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.001$, **** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.0001$*

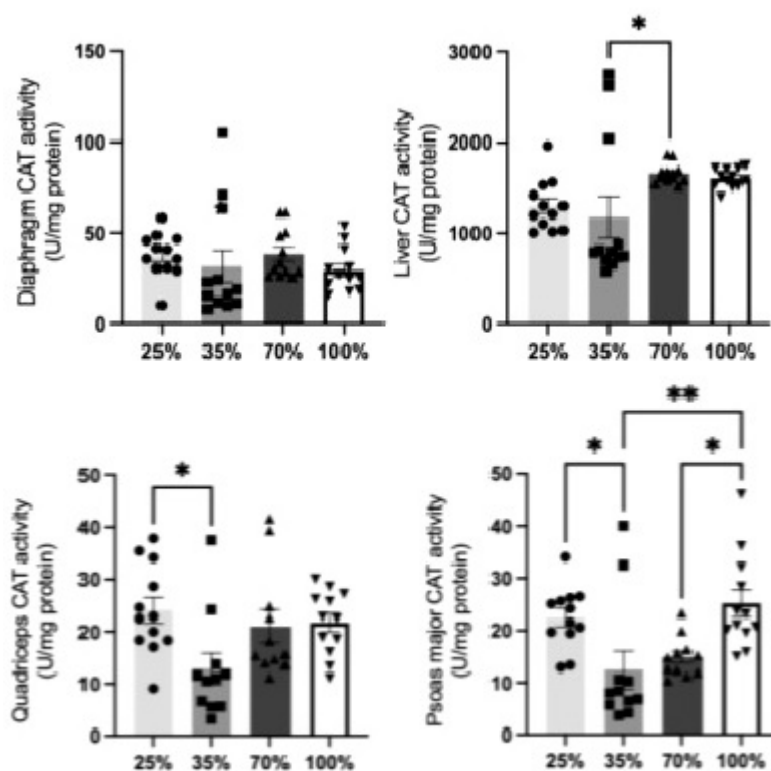
Στους αμνούς η μόνη στατιστικά σημαντική μείωση ($p < 0.05$) της GSH παρατηρήθηκε στο διάφραγμα στο στάδιο του απογαλακτισμού (35%) σε σχέση με το στάδιο του θηλασμού (25%) (*Εικόνα 14*).



Εικόνα 14. Μεταβολή των επιπέδων της GSH ανάμεσα στα 4 στάδια ανάπτυξης των αμνών, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. ** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.01$.

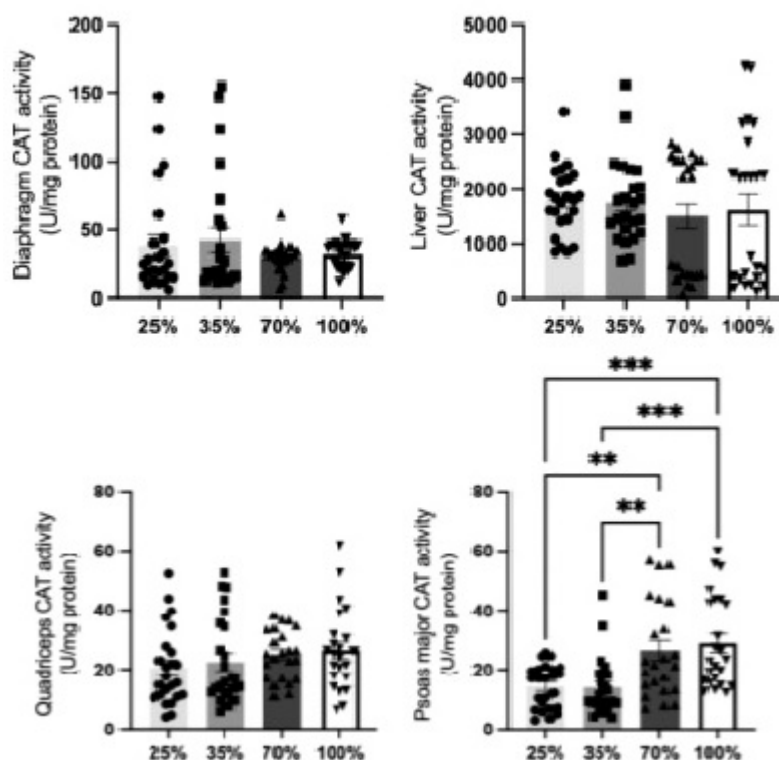
4.2 Ρυθμός αποικοδόμησης H_2O_2 μέσω της δραστηριότητας του ενζύμου της Καταλάσης (CAT)

Στα ερίφια η δραστηριότητα της καταλάσης στο στάδιο ανάπτυξης 35% μετά ήταν στατιστικώς σημαντικά ($p < 0.05$) χαμηλότερη στον τετρακέφαλο σε σχέση με το πρώτο στάδιο ανάπτυξης (25%) και επίσης μειωμένη στο στάδιο 35% στον ψοίτη σε σχέση με τα υπόλοιπα στάδια. Στο ήπαρ η δραστηριότητά της ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένη στο τρίτο στάδιο ανάπτυξης (70%) σε σχέση με το δεύτερο (35%) (Εικόνα 15). Η δραστηριότητα της καταλάσης δεν παρουσίασε καμία σημαντική μεταβολή στο διάφραγμα, σε κανένα από τα 4 στάδια ανάπτυξης.



Εικόνα 15. Μεταβολή του ρυθμού αποικοδόμησης τους H_2O_2 ανάμεσα στα 4 στάδια ανάπτυξης των εριφίων, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. * στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.05$, ** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.01$.

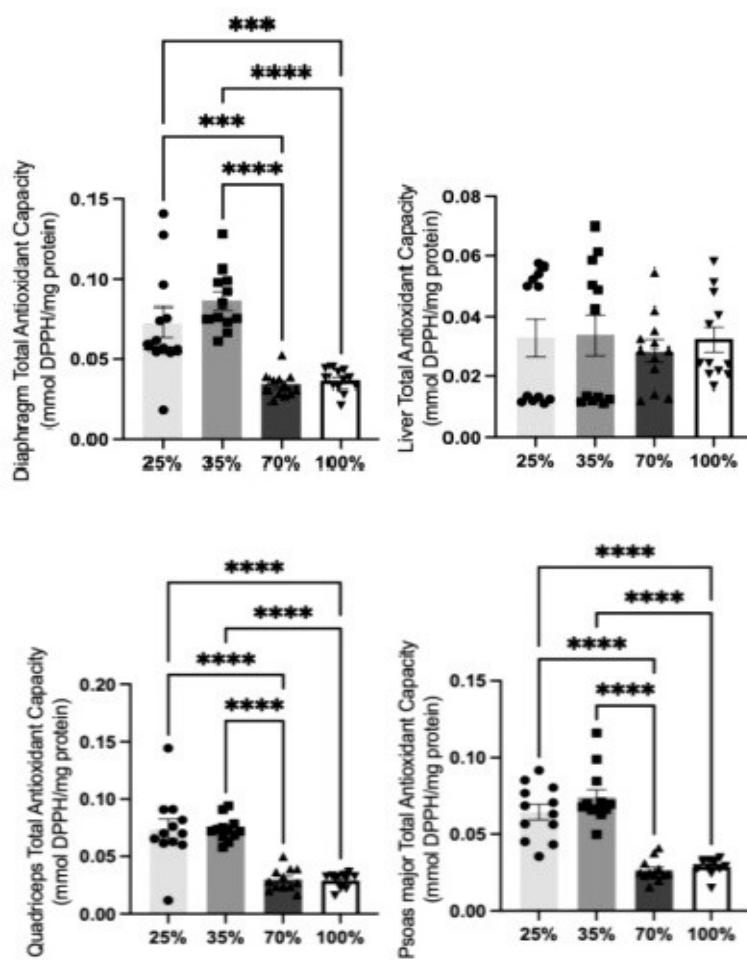
Στους αμνούς η μόνη στατιστικώς σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε στη δραστηριότητα της καταλάσης ήταν η μείωσή της δραστηριότητας της στο πρώτο (25%) και δεύτερο (35%) στάδιο ανάπτυξης στον ψοίτη μυ σε σχέση με τα δύο τελευταία στάδια. Στους υπόλοιπους ιστούς δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Μεταβολή του ρυθμού αποικοδόμησης τους H_2O_2 ανάμεσα στα 4 στάδια αναπτυξης των αμνών, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. * στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.05$, ** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.01$.

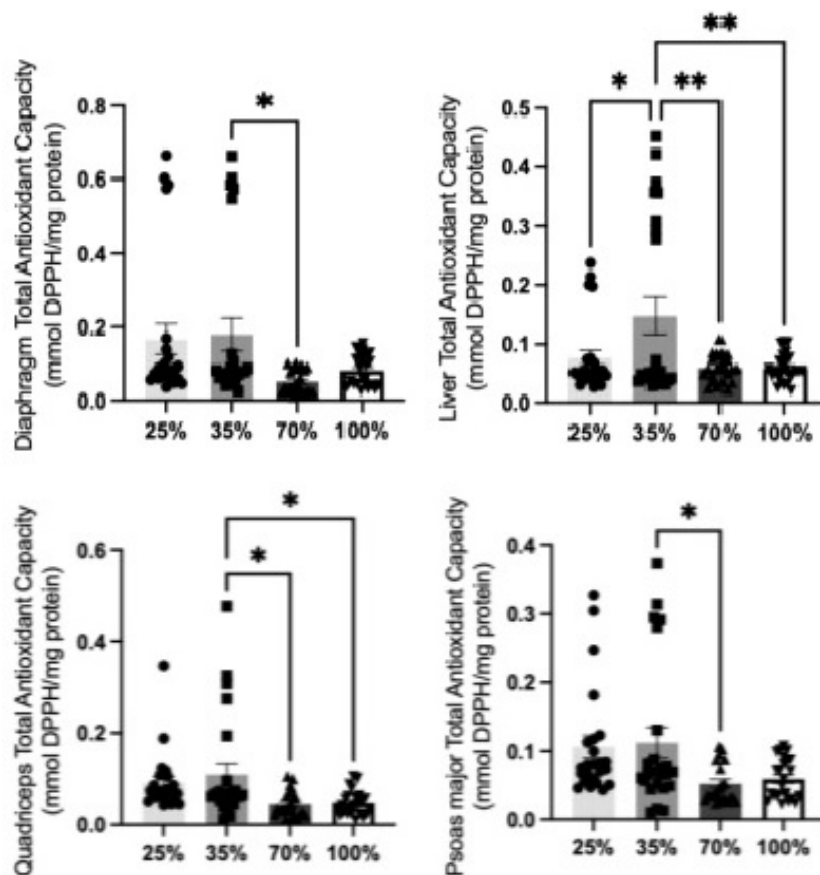
4.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Στα ερίφια παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας τους ιστούς του διαφράγματος, του τετρακεφάλου και του ψοίτη στα δύο πρώτα στάδια ανάπτυξης (25% και 35%) (Εικόνα 17)



Εικόνα 17. Μεταβολή της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ανάμεσα στα 4 στάδια ανάπτυξης των εριφίων, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. *** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.001$, **** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.0001$.

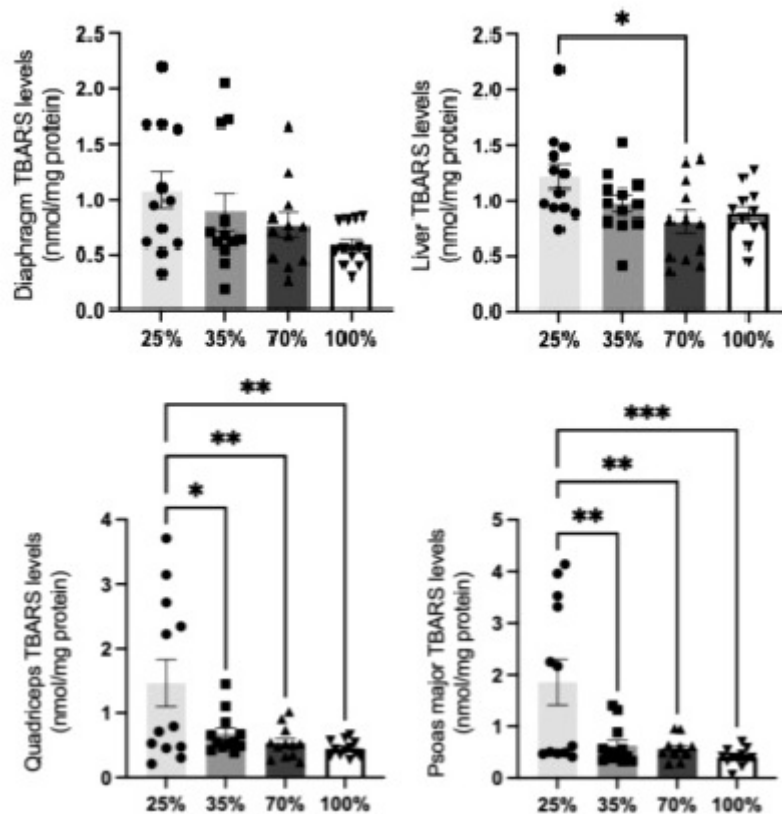
Στους αμνούς παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της TAC στο στάδιο ανάπτυξης 35% στον τετρακέφαλο και στον ψοίτη μυ σε σχέση με τα στάδια 70% και 100% ($p < 0.05$) και 70% αντίστοιχα. Στο στάδιο του απογαλακτισμού (35%) η TAC στο ήπαρ εμφανίζεται στατιστικά σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τα υπόλοιπα στάδια ανάπτυξης. Στον ιστό του διαφράγματος, στατιστικώς σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε μόνο στο στάδιο 35% σε σχέση με το 70% (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Μεταβολή της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ανάμεσα στα 4 στάδια αναπτυξης των αμνών, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοΐτης. * στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.05$, ** στατιστικώς σημαντική διαφορά.

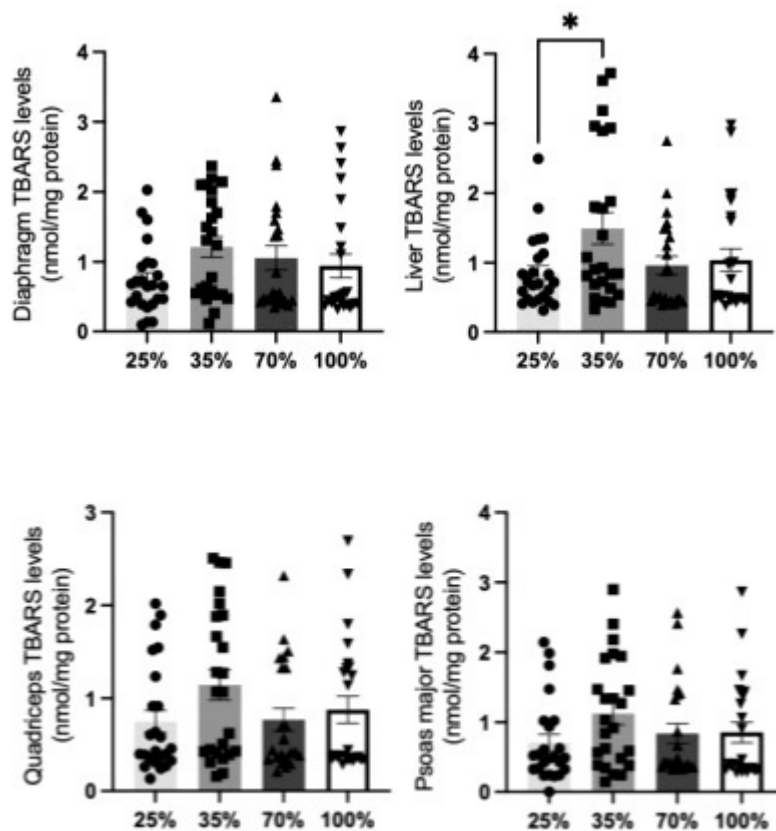
4.4 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Στα ερίφια παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση ($p < 0.05$) των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδωσης στον τετρακέφαλο και στον ψοΐτη μυ στα τρία τελευταία στάδια ανάπτυξης σε σχέση με το πρώτο και στο ήπαρ στο τρίτο στάδιο (70%) σε σχέση με το πρώτο (25%). Καμία σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC δεν παρατηρήθηκε στο διάφραγμα. (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Μεταβολή των επιπέδων των TBARS ανάμεσα στα 4 στάδια ανάπτυξης των εριφίων, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. * στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.05$, ** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.01$, *** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.001$.

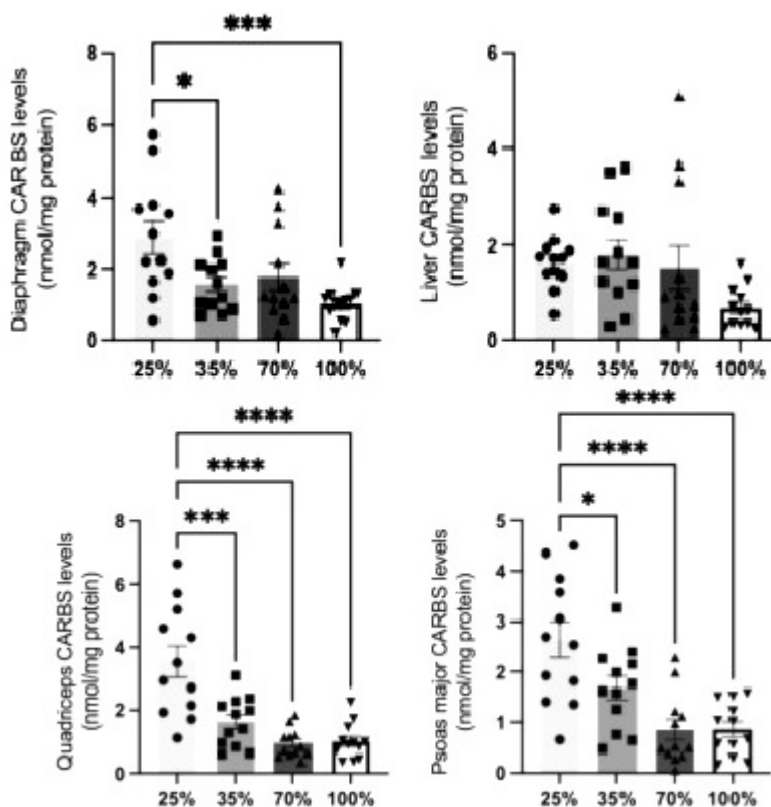
Στους αμνούς η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε στα επίπεδα των TBARS είναι η αύξηση στο στάδιο ανάπτυξης 35% στο ήπαρ, σε σχέση με το πρώτο στάδιο (25%) (Εικόνα 20)



Εικόνα 20. Μεταβολή των επιπέδων των TBARS ανάμεσα στα 4 στάδια αναπτυξης των αμνών, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. * στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.05$.

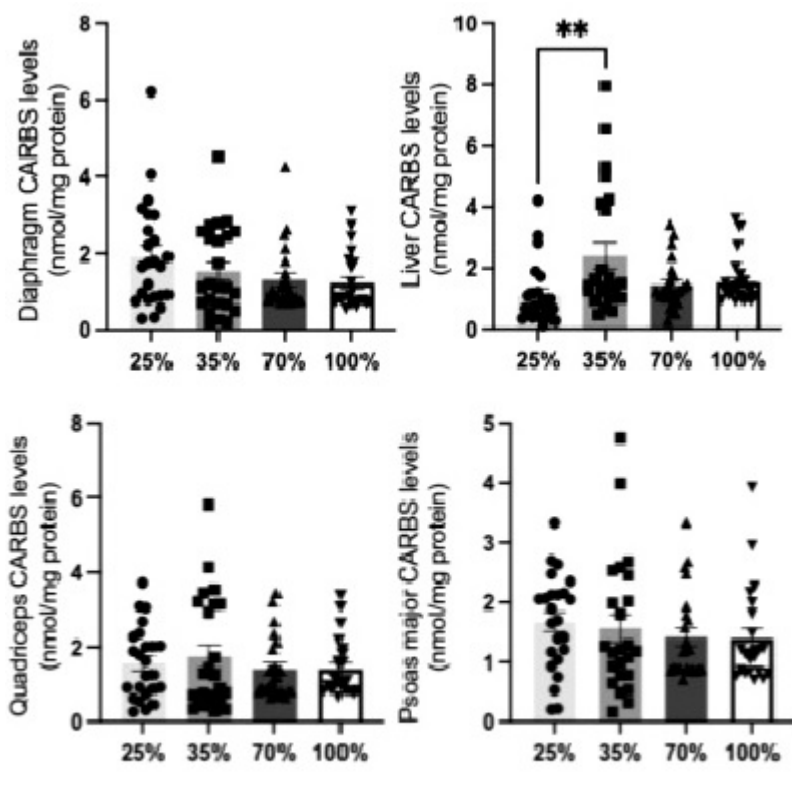
4.5 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS)

Όπως φαίνεται στα διαγράμματα της εικόνας που αφορά ιστούς εριφίων τα επίπεδα οξείδωσης πρωτεϊνών για τον τετρακέφαλο μυ και τον μείζονα ψοίτη είναι μειωμένα στα τρία τελευταία στάδια ανάπτυξης (35%, 70% και 100%) σε σχέση με το πρώτο στάδιο ανάπτυξης (25%). Στο διάφραγμα τα καρβονύλια ήταν επίσης μειωμένα στα στάδια 35% και 70% σε σχέση με το πρώτο στάδιο. Δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της πρωτεϊνικής οξείδωσης στο ήπαρ (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Μεταβολή των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα 4 στάδια ανάπτυξης των εριφίων, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. * στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.05$, *** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.001$, **** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.0001$

Στα διάφορα στάδια ανάπτυξης αμνών το μόνο αξιοσημείωτο που παρατηρείται είναι τα αυξημένα επίπεδα καρβονυλίων στο ήπαρ στο δεύτερο στάδιο ανάπτυξης (35%) σε σχέση με το πρώτο (25%) (Εικόνα 22). Στους υπόλοιπους ιστούς, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή.



Εικόνα 22. Μεταβολή των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα 4 στάδια αναπτυξης των αμνών, στους 4 ιστούς που εξετάστηκαν. Α). Διάφραγμα, Β). Ήπαρ, Γ). Τετρακέφαλος μυς, Δ). Ψοίτης. ** στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.01$

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι αίγες στην Ελλάδα εκτρέφονται κυρίως σύμφωνα με το εκτατικό σύστημα με κύριο χαρακτηριστικό τη βόσκηση και τις ελάχιστες διατροφικές παρεμβάσεις για ζώα εγχώριων φυλών και μιγάδων. Αντιθέτως τα πρόβατα, ως επί το πλείστον, ακολουθούν το ημiekτατικό ή το εντατικό σύστημα εκτροφής για ζώα εισαγωγής ή/και υψηλών αποδόσεων. Αυτό που πρέπει αρχικά να τονιστεί είναι ότι στα εξετασθέντα ζώα δεν έγινε καμία ιδιαίτερη διατροφική παρέμβαση ιδίως σε ότι αφορά τη χορήγηση αντιοξειδωτικών στο σιτηρέσιο.

Αρχικά σε ότι αφορά τους ληφθέντες ιστούς παραθέτονται κάποια στοιχεία που μπορεί να συμβάλλουν στην ερμηνεία των ευρημάτων. Ο τετρακέφαλος μύς ευρίσκεται στα οπίσθια άκρα, είναι ο μεγαλύτερος γραμμωτός μύς του σώματος και βασικός για την κίνηση. Ο ψοϊτής μύς βρίσκεται στο εσωτερικό της σπονδυλικής στήλης, γραμμωτός μύς, σχετικά αδρανής, στηρίζει τη σπονδυλική στήλη και συμβάλλει στις κινήσεις της πυέλου. Το διάφραγμα είναι ένας μυς με συνεχές μοτίβο δραστηριότητας που ακολουθεί την αναπνοή και λόγω της φύσης του υποβάλλεται σε διαρκές οξειδωτικό στρες (*Σμοκοβίτης Αθ, 1993.*).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, δείγματα αυτών των ιστών από 48 αίγες και 96 πρόβατα συλλέχθηκαν με σκοπό τη μελέτη βασικών βιοδεικτών που σχετίζονται με το οξειδοαναγωγικό τους προφίλ. Οι δείκτες που εξετάστηκαν ήταν: τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), ο ρυθμός αποικοδόμησης του H_2O_2 μέσω της δραστηριότητας του ενζύμου της καταλάσης, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) σαν δείκτης υπεροξειδωσης λιπιδίων και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια σαν δείκτης οξειδωσης των πρωτεϊνών. Το μόνο που λήφθηκε υπόψιν, και με βάση αυτό έγινε και η κατηγοριοποίηση και σύγκρισή τους ήταν το στάδιο ανάπτυξης που άνηκε το κάθε ζώο (θηλασμός (25%), απογαλακτισμός (35%), ενήβωσης (70%) και ενήλικο (100%), ανάλογα με το σωματικό τους βάρος, χωρίς κάποια διατροφική παρέμβαση στο σιτηρέσιό τους. Αυτό έγινε με σκοπό την εκτίμηση των ενδογενών επιπέδων των παραπάνω δεικτών με στόχο τη δημιουργία μιας βάσης δεδομένων για την οξειδοαναγωγική κατάσταση τέτοιων ζώων για περαιτέρω έρευνα. Τα πιο σημαντικά ευρήματα της μελέτης ήταν ότι στις αίγες παρατηρήθηκε μείωση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών μετά το στάδιο του απογαλακτισμού (35%) με

ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων οξειδωτικών βλαβών σε λιπίδια και πρωτεΐνες, κάτι το οποίο δεν φάνηκε να συμβαίνει στα πρόβατα που μελετήθηκαν.

Η συμβολή της γλουταθειόνης, του πιο σημαντικού ενδογενώς παραγόμενου αντιοξειδωτικού μορίου, ως βιοδείκτης αντιοξειδωτικής ικανότητας αφορά την εξουδετέρωση πληθώρας δραστικών μορφών και την πρόληψη της οξείδωσης βιομορίων. Στον μεταβολισμό συμμετέχει στη σύνθεση λευκοτριενίων και προσταγλανδινών (μηχανισμοί φλεγμονής), αντιδρά με οιστρογόνα και μετέχει στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών. Έχει ρυθμιστικό ρόλο στην γονιδιακή έκφραση, τη σύνθεση DNA και πρωτεϊνών και πρωτεόλυση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και απόπτωση, την παραγωγή κυτοκινών και την ανοσολογική απόκριση, την σπερματογένεση και ωρίμανση των σπερματοζωαρίων (*Wu, Guoyao Fang et al., 2004*)

Τα επίπεδα της GSH στις αίγες ήταν μειωμένα στο στάδιο του απογαλακτισμού (35%) σε όλους τους εξεταζόμενους ιστούς. Δεδομένου του ρόλου της γλουταθειόνης που είναι η αντιοξειδωτική προστασία με την απομάκρυνση ηλεκτρονιόφιλων και οξειδωτικών μορίων και των μετρήσιμων επιπέδων αυτής αποτελεί πιθανό δείκτη εμφάνισης οξειδωτικού στρες, το οποίο μπορεί να οφείλεται στο στρες που υφίστανται τα νεαρά ζώα αμνοερίφια στο στάδιο του θηλασμού εξ' αιτίας της μετάβασης από το υποξικό περιβάλλον της μήτρας στη αυτόνομη αναπνοή. Αυτή όμως η κατάσταση φαίνεται να εξισορροπείται εξ' αιτίας της διατροφής τους με γάλα και πρωτόγαλα πλούσιο σε αντιοξειδωτικές ουσίες και βιοενεργά μόρια, κάτι που δε φαίνεται να συμβαίνει στο στάδιο του απογαλακτισμού (35%) (*Gökçe E. Et al, 2022*). Πιθανές αιτίες που μπορεί να στρεσάρουν το ζώο σε αυτό το στάδιο είναι η αλλαγή της τροφής από γάλα σε στερεά τροφή και ο αποχωρισμός του από την μητέρα. Στα πρόβατα μείωση της GSH παρατηρείται μόνο στο στάδιο ανάπτυξης 35% στο διάφραγμα. Αυτή η διαφορά σε σχέση με τις αίγες μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική σύνθεση του γάλακτος και πρωτογάλακτος και σε διαφορές στα επίπεδα ενδογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας λόγω διαφορετικού είδους.

Η καταλάση σχετίζεται με την αντιοξειδωτική άμυνα και υπάρχει σε αφθονία στα κύτταρα. Έχει την ικανότητα να διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), που παράγεται μέσω των αντιδράσεων Fenton που παράγουν ρίζες σουπεροξειδίου, σε νερό (H_2O) και οξυγόνο (O_2). Προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτικές βλάβες που σχετίζονται με το γήρας, τη φλεγμονή, και διάφορες παθολογικές καταστάσεις

όπως ο καρκίνος οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές και καρδιαγγειακές νόσοι. Κατέχει σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες κυτταρικής σηματοδότησης που σχετίζονται με την ανάπτυξη, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Μείωση της δραστηριότητάς της οδηγεί σε διαταραχές του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπιδίων και της ομοιόστασης του κυττάρου (**Rasheed Z., 2024**). Στις αίγες στο στάδιο του απογαλακτισμού (35%) η δραστηριότητα της καταλάσης είναι μειωμένη στους ιστούς του τετρακέφαλου και του ψοϊτή μυός ενώ αυξάνεται στο ήπαρ στο στάδιο της ενήβωσης (70%). Το στάδιο αυτό συμπίπτει με την ενήβωση του ζώου και την παραγωγή ιστρογόνων και τεστοστερόνης που επιδρούν στο μεταβολισμό και τα ενζυμικά συστήματα του ήπατος. Στα πρόβατα η δραστηριότητα της καταλάσης αυξάνει στα δύο τελευταία στάδια ανάπτυξης στον ψοϊτή μύ.

Αρκετές φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού όπως η αναπνοή, η πέψη, η βιοσύνθεση των ορμονών και ο μεταβολισμός των ξеноβιοτικών παράγουν δραστικές μορφές κατά την κυτταρική σηματοδότηση. Αν και έχουν προταθεί αρκετοί βιοδείκτες οξειδοαναγωγής ως εκφραστές της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας δεν υπάρχει αποδεκτή γενικευμένη μέθοδος που να αντικατοπτρίζει συνολικά τα προϊόντα οξείδωσης όλων των βιομορίων. Τα μετρήσιμα επίπεδα της TAC αντικατοπτρίζουν τους μη ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς βιοδείκτες όπως η γλουταθειόνη, η βιταμίνες C και E και το ουρικό οξύ (**Silvestrini A et al., 2023**). Στις αίγες τα επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ήταν αυξημένα στους ιστούς του διαφράγματος, του τετρακεφάλου και του ψοϊτή στα δύο πρώτα στάδια ανάπτυξης που μπορεί να σχετίζεται με τη διατροφή και την ηλικία. Στα πρόβατα είναι αυξημένη στο στάδιο του απογαλακτισμού.

Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες σχηματίζονται ενεργά και ασταθή υπεροξειδία λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης – οξείδωσης των λιπιδίων είναι η μηλονική διαλδεϋδη (Malondialdehyde, MDA). Η μέτρηση ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στηρίζεται στην αντίδραση της μαλονδιαλδεϋδης (MDA) με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) με αναλογία 1:2. (**Aguilar Diaz De Leon J, et al. 2020**). Τα αυξημένα επίπεδα TBARS σχετίζονται με την υποβάθμιση της ποιότητας κρέατος αλλά και την ωρίμανση του κρέατος ως επακόλουθο της αυξημένης υπεροξειδωσίας των λιπιδίων που μπορεί να συμβαίνει και εντός του οργανισμού πχ στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης (**Skaperda et al., 2021**). Στις αίγες τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσίας ήταν

μειωμένα στα δύο τελευταία στάδια ανάπτυξης (70 & 100%) ενδεικτικό μειωμένης οξειδωτικής βλάβης. Στα πρόβατα η μόνη στατιστικά σημαντική παρατηρούμενη διαφορά είναι η αύξηση των TBARS στο στάδιο ανάπτυξης 35% στο ήπαρ που μπορεί να οφείλεται στην έναρξη χορήγησης στερεάς τροφής και στο στρες του αποχωρισμού του νεογεννήτου από την μητέρα του.

Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα οξειδώνονται και δημιουργούνται οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες. Αυτές οι πρωτεΐνες υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες, όπως για παράδειγμα αναστέλλουν την αντιγραφή και επιδιόρθωση βλαβών στο DNA. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια μπορούν να αποτελέσουν δείκτη οξείδωσης των πρωτεϊνών. Η οξείδωση των πρωτεϊνών στους ιστούς αρχίζει να αυξάνεται μεταθανάτια και κατ'επέκταση μετά τη σφαγή, συνεχίζεται κατά τη συντήρηση και την κατάψυξη των ιστών κατ'επέκταση και του κρέατος και κατά τη μετέπειτα επεξεργασία τους (*Nawaz A. et al. 2022, Ponce, J. et al., 2020*). Παράγοντες που φαίνεται να επηρεάζουν είναι μεταξύ άλλων το είδος του ιστού (περιεκτικότητα σε μυοσφαιρίνη και σίδηρο, σύνθεση και αναλογία λιπαρών οξέων) (*Cunha L. et al, 2018*) αλλά και το στάδιο ανάπτυξης. Μια ενδεχόμενη ιστική βλάβη μπορεί να δημιουργήσει μη λειτουργικά συσσωματώματα πρωτεϊνών αυξάνοντας τα επίπεδα μετρούμενων καρβονυλίων (*Berlett B.S. et. Al., 1997*). Στις αίγες παρατηρείται αύξηση των καρβονυλίων στον ιστό του διαφράγματος, του τετρακέφαλου και του ψοϊτή μυός στο στάδιο ανάπτυξης 25%) που σχετίζεται με τα επίπεδα στρες που βιώνει το θηλάζων νεογέννητο τα οποία οφείλονται στην έναρξη της αναπνοής μετά τον τοκετό, στην έκθεση σε παθογόνους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στην εκτροφή, στις συνθήκες εκτροφής (πυκνότητα πληθυσμού, συγκέντρωση αμμωνίας) και σε τυχόν χειρισμούς (ευνουχισμός, κοπή ουράς, αποκεράτωση) σε συνδυασμό με τη μη χορήγηση ή τη χορήγηση κακής ποιότητας πρωτογάλακτος (χαμηλά επίπεδα IgG ανοσοσφαιρινών)(*GökçeE. etal, 2022*). Στα πρόβατα τα επίπεδα πρωτεϊνικής οξείδωσης ήταν αυξημένα στον ιστό του ήπατος στο στάδιο του απογαλακτισμού (35%)

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα στις αίγες φαίνεται ότι τα επίπεδα GSH, CAT και TAC που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα είναι μειωμένα στα δύο τελευταία στάδια ανάπτυξης 70% και 100%. Ομοίως μειωμένα είναι τα επίπεδα οξείδωσης λιπιδίων (TBARS) και πρωτεϊνών (CARBS) στα ίδια στάδια σε σχέση με τα δύο πρώτα στάδια. Στα πρόβατα δεν παρατηρήθηκε το ίδιο μοτίβο με τις αίγες. Οι

βιοδείκτες εδώ δεν ακολουθούν ένα σταθερό μοτίβο μεταξύ των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης. Οι διαφορές αυτές μεταξύ των δύο ειδών μπορεί να σχετίζονται με διαφορές στη σύνθεση του μυϊκού ιστού (περιεκτικότητα σε μυοσφαιρίνη και σίδηρο, σύνθεση και αναλογία λιπαρών οξέων) (CunhaL., et al., 2018), στη διατροφή, τον τύπο εκτροφής και τους χειρισμούς που γίνονται στα ζώα.

Οι συνιστώσες του στρες στον απογαλακτισμό είναι ο αποχωρισμός από την μητέρα και η αλλαγή διατροφής και περιβάλλοντος. Άλλο ένα σημείο κλειδί είναι οι τυχόν φλεγμονώδεις καταστάσεις και η πιθανή ανορεξία που προκύπτει από την μετάβαση στη στερεά τροφή (Durand d., et al. 2022). Αυτή η κατάσταση εξομαλύνεται με τη χορήγηση τροφής (μίγμα εθισμού) μέχρι και δύο εβδομάδες πριν τον απογαλακτισμό χωρίς κάποια εξωγενή χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών σε αυτή, και χωρίς να έχει προηγηθεί η εξέταση των ενδογενών επιπέδων αντιοξειδωτικών γιατί τα αντιοξειδωτικά μπορεί να δράσουν ως προ-οξειδωτικοί παράγοντες (Abuelo et al., 2015; Sies, 2015). Στην επάρκεια του ενδογενούς αντιοξειδωτικού μηχανισμού κατά την περίοδο του απογαλακτισμού και έπειτα, χωρίς τη χορήγηση συμπληρωμάτων στα ερίφια, συνηγορούν τα μειωμένα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS) στα δύο τελευταία στάδια ανάπτυξης (70% και 100%). Επίσης, τα επίπεδα οξειδωσης των πρωτεϊνών στα ερίφια ακολουθούν αυτά των TBARS. Αυτό συμβαίνει επειδή το στάδιο του απογαλακτισμού αποτελεί περίοδο αυξημένου στρες εξ' αιτίας του αποχωρισμού του νεογνού από την μητέρα και οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα οξειδωτικών βλαβών σε αυτό το στάδιο (35%) (Mattioli et al., 2020). Από την άλλη, η παρατηρούμενη αύξηση στα επίπεδα της γλουταθειόνης στο στάδιο ανάπτυξης 25% μπορεί να οφείλεται και στη σύνθεση του πρωτογάλακτος με το οποίο τρέφεται το νεογνίτιο ερίφιο τις πρώτες μέρες της ζωής του.

Με τη βελτίωση του βιοτικού επιπέδου και τις αυξητικές τάσεις του παγκόσμιου πληθυσμού η κατανάλωση κρέατος και ζωικών προϊόντων αναμένεται να αυξηθεί τα επόμενα χρόνια, χωρίς όμως αυτό να συνεπάγεται αύξηση του εκτρεφόμενου ζωικού κεφαλαίου εξαιτίας κυρίως περιβαλλοντικών αιτιών αλλά και “τροφικού ανταγωνισμού” ανθρώπου και ζώων παραγωγής που προκύπτει από τη χρήση καλλιεργούμενων εκτάσεων για την παραγωγή ζωοτροφών. Επομένως, μια από τις βασικές προκλήσεις της σημερινής κοινωνίας είναι η ανάπτυξη του κτηνοτροφικού τομέα μέσω την βελτίωσης των συνθηκών της εκτροφής των ζώων,

της γενετικής βελτίωσης με στόχο την προσαρμογή στις κλιματικές συνθήκες, την αύξηση των αποδόσεων τους και την διασφάλιση παραγόμενων προϊόντων υψηλής ποιότητας. Η κτηνοτροφία συνδέεται άμεσα και με τη γεωργική παραγωγή έχοντας σημαντικό αντίκτυπο στην οικονομία, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της υπαίθρου και της οικονομίας με την παραγωγή κτηνοτροφικών προϊόντων αυξημένης προστιθέμενης αξίας. Θεμέλιος λίθος αυτής, είναι η υγεία και ευζωία των εκτρεφόμενων ζώων, αλλά και η προσπάθεια διατήρησης αυτόχthonων φυλών παράλληλα με τη γενετική βελτίωση των εντατικά εκτρεφόμενων ζώων. Αυτές οι παράμετροι καθορίζονται από λεπτομερές νομοθετικό πλαίσιο που έχει διττό ρόλο προσπαθώντας ταυτόχρονα να κερδίσει την εμπιστοσύνη του καταναλωτή με την παραγωγή ασφαλών προϊόντων.

Διάφορες, κυρίως χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις με διάρκεια συμπτωμάτων περίπου επτά ημέρεςόπως μαστίτιδες, χολότητες-αρθρίτιδες, πνευμονίες που απαντώνται συχνά στα μικρά μηρυκαστικά σχετίζονται με το οξειδωτικό στρεςχωρίς όμως να έχει τεκμηριωθεί ότι η εξωγενής χορήγηση αντιοξειδωτικών συνδέεται με μικρότερη πιθανότητα εκδήλωσης ασθενειών ή θανάτου (*Lykkesfeldt and Svendsen, 2007*). Για την αντιμετώπιση τέτοιων παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται και με την παρουσία συνθηκών οξειδωτικού στρες στα ζώα, μπορούν να συμβάλλουν και οι δοκιμέςπου πραγματοποιήθηκανστα διάφορα στάδια ανάπτυξης σε αμνούς και ερίφια με στόχο την βελτίωση της ενδογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας αυτών, συμβάλλοντας έτσι αρκετά στην αντιμετώπιση νόσων. Συγκριτικές μελέτες στα διάφορα είδη έδειξαν ότι το τελευταίο στάδιο της κυοφορίας και ο απογαλακτισμός επηρεάζουν την αντιοξειδωτική άμυνα των νεαρών ζώων, αναδεικνύοντας πόσο σημαντικός είναι ο καθορισμός των κρίσιμων σταδίων ανάπτυξης των ζώων, η ορθή επιλογή γεννητόρων και η διατροφική διαχείριση μιας εκτροφής στα πλαίσια της συνολικής διαχείρισης (*Durand D. et al., 2022*).

Για την βελτιστοποίηση της ανάπτυξης και του δείκτη μετατρεψιμότητας έχουν χρησιμοποιηθεί σε ελλιποβαρή νεογέννητα χοιρίδια συμπληρώματα πλούσια σε πρωτεΐνες (*Sarr et al., 2012*). Κατά την μετεμβρυϊκή περίοδο σε χοιρίδια, μηρυκαστικά και ανθρώπους δοκιμάστηκαν συγκεκριμένα αμινοξέα με αντιοξειδωτικές και λειτουργικές ιδιότητες και φυτικά εκχυλίσματα πλούσια σε λιποτροπικά και αντιοξειδωτικά συστατικά (*Manuelian et al., 2021; Fardet and Chardigny, 2013*). Διατροφικά συμπληρώματαπλούσια σε αντιοξειδωτικά

χορηγήθηκαν και σε ενήλικα θηλυκά (αγελάδες) κατά την κυοφορία ή την γαλουχία για να βελτιώσουν την αντιοξειδωτική άμυνα του νεογέννητου χωρίς όμως πάντα σαφή συμπεράσματα (*Abuelo et al., 2019*). Πολυφαινόλες, προμίγματα με βιταμίνες E, A, C και ιχνοστοιχεία όπως ο ψευδάργυρος και το σελήνιο έχουν χορηγηθεί με επιτυχία αυξάνοντας το ρυθμό ανάπτυξης απογαλακτισθέντων χοιριδίων (*Robert et al., 2009*). Στους μόσχους και στα αμνοερίφια είναι συνήθης πρακτική η παρεντερική χορήγηση ιχνοστοιχείων και βιταμινών συνήθως σεληνίου, δεξτρανικού σιδήρου και βιταμινών A, D3, E με αντιοξειδωτική δράση για τη βελτίωση του ανοσοποιητικού, του σωματικού βάρους (*Mattioli et al., 2020*) και την πρόληψη παθολογικών καταστάσεων όπως η μυϊκή δυστροφία και η σιδηροπενική αναιμία (στα χοιρίδια).

Ενδιαφέρον έχει η αναίμακτη μέθοδος μετρήσιμων βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο σίελο μόσχων κατά τον απογαλακτισμό με σκοπό την εκτίμηση του στρες που υφίστανται και τον περιορισμό αυτού (*Rubio et al., 2021*). Όμως η περίσσεια αντιοξειδωτικών είναι πιθανό να επηρεάσει αρνητικά την καλή διαβίωση των ζώων μέσω της δράσης αυτών ως προοξειδωτικών παραγόντων (*Abuelo et al., 2019*). Επί της ουσίας, *in vivo* κρίνεται πολύ δύσκολη η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την επίδραση των αντιοξειδωτικών. Για την ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων κρίνεται σημαντική η ένταξη μεγαλύτερου αριθμού ζώων στις μελέτες. Επιπλέον τα αποτελέσματα από το εργαστήριο στο πιάτο μπορεί να διαφέρουν υπό πραγματικές συνθήκες. Στο παραπάνω πρόβλημα, λύση μπορεί να αποτελέσει ο συνδυασμός των παραπάνω δεικτών μαζί με κάποια επιπρόσθετα ποιοτικά χαρακτηριστικά του κρέατος έτσι ώστε να εξαχθεί ένα πιο αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα.

Η οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος και των διάφορων ιστών που προέρχονται από παραγωγικά ζώα ελληνικής εκτροφής αξίζει να διερευνηθεί και να συνδεθεί με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του κρέατος αυτών των ζώων. Στα ποιοτικά χαρακτηριστικά συγκαταλέγονται τα θρεπτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρέατος. Πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη η κατάσταση της υγείας του ζώου, το φύλο και το στάδιο βιολογικής και σωματικής τους ανάπτυξης. Όσον αφορά την παράμετρο του φύλου, στην βιβλιογραφία γίνεται αναφορά σχετικά με την θετική επίδραση των φυλετικών ορμονών (οιστρογόνων και τεστοστερόνης) στην μείωση του οξειδωτικού στρες και στα αυξημένα επίπεδα των αντιοξειδωτικών. Σε ότι αφορά το οξειδωτικό στρες έχει παρατηρηθεί σεξουαλικός διμορφισμός σε ανθρώπους και

ποντίκια. Τα αρσενικά άτομα εμφανίζουν μεγαλύτερη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και μειωμένη επάρκεια αντιοξειδωτικών μηχανισμών, υψηλότερα βασικά επίπεδα φλεγμονής και μειωμένη αντίδραση σε ερεθίσματα (*Martínez I. et al. 2023*), Μεγάλη σημασία έχει στα πρόβατα και τις αίγες να διερευνηθεί η επίδραση της φυλής (πλατύουρα, λεπτόουρα), η παραγωγική κατεύθυνση (γαλακτοπαραγωγή, εριοπαραγωγή, κρεοπαραγωγή) και ο δείκτης πολυδυμίας. Έτσι θα αποκτήσουμε χρήσιμες πληροφορίες για το παραγόμενο τελικό προϊόν από ζώα τα οποία δεν έχουν υποστεί κανενός είδους παρεμβατική μέθοδο με στόχο την ανάδειξη της ποιότητας του ελληνικού κρέατος για τους καταναλωτές και την προστιθέμενη αξία στα παραγόμενα προϊόντα. Πρέπει να γίνουν περισσότερες έρευνες και να συνδεθούν αυτές οι μετρήσεις βιοδεικτών στους ιστούς με αντίστοιχους στο αίμα ώστε να μπορέσει να υπάρξει εξαγωγή συμπερασμάτων και για το κρέας που παράγεται από αυτά τα αναπτυξιακά στάδια ανάλογες με αυτές που έγιναν στα βοοειδή (*Skaperda Z., etal. 2021*).

Βιβλιογραφία

Abuelo, A., Hernández, J., Benedito, J.L., Castillo, C., 2019. Redox biology in transition periods of dairy cattle: Role in the health of periparturient and neonatal animals.

Aguilar Diaz De Leon J, Borges CR. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. J Vis Exp. 2020 May 12;(159):10.3791/61122. doi: 10.3791/61122. PMID: 32478759; PMCID: PMC9617585.

Aebi, H. Catalase In Vitro. Methods Enzymol. 1984, 105, 121–126. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Ali, S. S. et al. (2020) ‘Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players’, Journal of Food Biochemistry, 44(3), p. e13145. doi: 10.1111/JFBC.13145.

Amazan, D., Rey, A.I., Fernandez, E., Lopez-Bote, C.J., 2012. Natural vitamin E (D-alpha-tocopherol) supplementation in drinking water prevents oxidative stress in weaned piglets. Livestock Science 145, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2011.12.022>

Anatoliotakis, N.; Deftereos, S.; Bouras, G.; Giannopoulos, G.; Tsounis, D.; Angelidis, C.; Kaoukis, A.; Stefanadis, C. Myeloperoxidase: Expressing Inflammation and Oxidative Stress in Cardiovascular Disease. Curr. Top. Med. Chem. 2013, 13, 115–138.

Ayala, Antonio; Muñoz, Mario F.; Argüelles, Sandro (2014). "Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal". Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2014: 1–31. doi:10.1155/2014/360438. ISSN 1942-0900. PMC 4066722. PMID 24999379

Bauchart, D., Durand, D., Gruffat, D., Chilliard, Y., 1998. Mechanism of liver steatosis in early lactation cows, effects of hepatoprotector agents. Proceedings of Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, 20-22 October 1998, Rochester, USA, pp. 27–37

Bayr, H. Reactive oxygen species. Crit. Care Med.2005, 33, S498.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012 Jan;5(1):9-19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613. Epub 2012 Jan 13. PMID: 23268465; PMCID: PMC3488923.

Berlett B.S., Stadtman E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 1997;272:20313–20316. doi: 10.1074/jbc.272.33.20313.

Brambilla, G., Civitareale, C., Ballerini, A., Fiori, M., Amadori, M., Archetti, L.I., 2002. Response to oxidative stress as a welfare parameter in swine. *Redox Reports* 7, 159–163. <https://doi.org/10.1179/135100002125000406>.

Bredemeier, M.; Lopes, L.M.; Eisenreich, M.A.; Hickmann, S.; Bongiorno, G.K.; d'Avila, R.; Morsch, A.L.B.; da Silva Stein, F.; Campos, G.G.D. Xanthine oxidase inhibitors for prevention of cardiovascular events: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2018, 18, 24.

Buchet, A., Belloc, C., Leblanc-Maridor, M., Merlot, E., 2017. Effects of age and weaning conditions on blood indicators of oxidative status in pigs. *PlosOne* 12, e0178487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178487>.

Andrei A. Bunaciu, Andrei Florin Danet, Serban Fleschin & Hassan Y. Aboul-Enein (2015): Recent Applications for in Vitro Antioxidant Activity Assay, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, DOI: 10.1080/10408347.2015.1101369 <http://dx.doi.org/10.1080/10408347.2015.1101369>

Cantalapiedra-Hijar, G., Ortigues-Marty, I., Sepchat, B., Titgemeyer, E., Bahloul, L., 2020. Methionine-balanced diets improve cattle performance in fattening young bulls fed high-forage diets through changes in nitrogen metabolism. *British Journal of Nutrition* 124, 273–285. <https://doi.org/10.1017/S0007114520001154>.

Chen, Yan-Jhang; Fan, Tang-Yu; Wang, Li-Pang; Cheng, Ta-Wui; Chen, Shiao-Shing; Yuan, Min-Hao; Cheng, Shikun (2020). "[Application of Fenton Method for the Removal of Organic Matter in Sewage Sludge at Room temperature](#)". *Sustainability*. 12 (4): 1518. doi:10.3390/su12041518. ISSN 2071-1050

Dalton, T.P., Shertzer, H.G., Puga, A., 2002. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39, 67–101. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.67>

Leda C.M. Cunha, Maria Lúcia G. Monteiro, José M. Lorenzo, Paulo E.S. Munekata, Voster Muchenje, Francisco Allan L. de Carvalho, Carlos A. Conte-Junior. 2018. Natural antioxidants in processing and storage stability of sheep and goat meat products. *Food Research International*, Volume 111, Pages 379-390, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.041>.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996918304095>)

Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res.* 2012 Apr;46(4):382-419. doi: 10.3109/10715762.2011.653969. PMID: 22276778.

Durand, D., Chilliard, Y., Bauchart, D., 1992. Effects of lysine and methionine on in vivo hepatic secretion of VLDL in the high yielding dairy cow. Annual Meeting of the American Dairy Science Association, the Ohio State University, Columbus, USA, June 1992. *Journal of Dairy Science* 75 (Suppl. 1), 279.

D. Durand, A. Collin, E. Merlot, E. Baéza, L.A. Guilloteau, N. Le Floc'h, A. Thomas, S. Fontagné-Dicharry, F. Gondret. 2022. Review: Implication of redox imbalance in animal health and performance at critical periods, insights from different farm species, *animal*, Volume 16, Issue 6,

Fardet, A., Chardigny, J.M., 2013. Plante-based foods as a source of lipotropes for human nutrition: a survey of in vivo studies. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 53, 535–590. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.549596>

Faure, M., Paulmier, V., Boissy, A., de Boyerdes Roches, A., Durand, D., 2017. A multiparametric approach to discriminate the impacts of different degrees of invasiveness of surgical procedures in sheep. *Animal* 11, 2275–2284. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000805>.

Friel, J.K., Friesen, R.W., Harding, S.V., Roberts, L.J., 2004. Evidence of oxidative stress in full-term healthy infants. *Pediatric Research* 56, 878–882. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000146032.98120.43>

Erhan Gökçe, Pınar Cihan, Onur Atakişi, Ali Haydar Kirmizigül, Hidayet Metin Erdoğan. 2022. Oxidative stress in neonatal lambs and its relation to health status and passive colostral immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Volume 251, ISSN 0165-2427, <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2022.110470>.

Gobert, M., Martin, B., Ferlay, A., Chilliard, Y., Graulet, B., Pradel, P., Bauchart, D., Durand, D., 2009. Plant polyphenols associated with vitamin E can reduce plasma lipoperoxidation in dairy cows given n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Dairy Science* 92, 6095–6104. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2087>

Gaillard H, Garcia-Muse T, Aguilera A. Replication stress and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015 May;15(5):276-89. doi: 10.1038/nrc3916. PMID: 25907220.

Gilbert, H., Ruesche, J., Muller, N., Billon, Y., Begos, V., Montagne, L., 2019. Responses to weaning in two pig lines divergently selected for residual feed intake depending on diet. *Journal of Animal Science* 97, 43–54. <https://doi.org/10.1093/jas/sky416>

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

Gray MJ, Wholey WY, Jakob U. Bacterial responses to reactive chlorine species. *Annu Rev Microbiol*. 2013;67:141-60. doi: 10.1146/annurev-micro-102912-142520. Epub 2013 Jun 14. PMID: 23768204; PMCID: PMC3891400.

Grubbs, J.K., Fritchen, A.N., Huff-Lonergan, E., Dekkers, J.C., Gabler, N.K., Lonergan, S. M., 2013. Divergent genetic selection for residual feed intake impacts mitochondria reactive oxygen species production in pigs. *Journal of Animal Science* 91, 2133–2140. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5894>

Guang Lei¹ · Li Zhuang¹ · Boyi Gan. The roles of ferroptosis in cancer: Tumor suppression, tumor microenvironment, and therapeutic interventions. Volume 42, Issue 4p 513-534. April 08, 2024.

Gutteridge J.M.C. & Halliwell B., 2018. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? *Biochemical and Biophysical Research Communications* xxx 1-4.

Halliwell, B. (2003) 'Antioxidants in Human Health and Disease', <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nu.16.070196.000341>, 16, pp. 33–50. doi: 10.1146/ANNUREV.NU.16.070196.000341

Halliwell B. and Gutteridge J., 2007 Free radicals in biology and medicine. Fourth ed. Oxford U.K.: Oxford university press.

Halliwell B. and Gutteridge J. M. C., 2015. Free Radicals in Biology and Medicine, 5th edn. Oxford, UK: Oxford University Press.

Hamid A. A., Aiyelaagbe O. O., Usman L. A., Ameen O. M., Lawal A., 2010. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. African Journal of Pure and Applied Chemistry, 4(8), 142-151.

Hampton, M. B., Kettle, A. J. and Winterbourn, C. C. (1998) 'Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing', Blood, 92(9), pp. 3007– 3017. doi: 10.1182/BLOOD.V92.9.3007.421K47_3007_3017.

Ighodaro, O.M.; Akinloye, O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alex. J. Med. 2018, 54, 287–293. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Green Version](#)]

Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. Sports Med 5:156-70, 1988.

Jingjing Liu, Wen Lu, Bimin Shi, Samuel Klein, Xiong Su, 2019. Peroxisomal regulation of redox homeostasis and adipocyte metabolism. Redox Biology, Volume 24, 2019, 101167, ISSN 2213-2317, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101167>.

Jones, D. P. (2006). Redefining oxidative stress. Antioxidants & Redox Signaling,

Lobo, V. et al. (2010) 'Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health', Pharmacognosy Reviews, 4(8), p. 118. doi: 10.4103/0973-7847.70902.

Lu, S. C. (2013) 'Glutathione synthesis', Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1830(5), pp. 3143–3153. doi: 10.1016/J.BBAGEN.2012.09.008.

Lykkesfeldt, J. and Svendsen, O. (2007) 'Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals', *The Veterinary Journal*, 173(3), pp. 502–511. doi: 10.1016/J.TVJL.2006.06.005.

Manuelian, C.L., Pitino, R., Simoni, M., Mavrommatis, A., De Marchi, M., Righi, F., Tsiplakou, E., 2021. Plant feed additives as natural alternatives to the use of synthetic antioxidant vitamin on livestock mammals' performances, health and oxidative status: a review of the literature in the last 20 years. *Antioxidants* 10, 1461–1483. <https://doi.org/10.3390/antiox10091461>.

Magnani, F. and Mattevi, A. (2019) 'Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases', *Current Opinion in Structural Biology*, 59, pp. 91–97. doi: 10.1016/J.SBI.2019.03.001.

Martínez de Toda I., González-Sánchez M., Díaz-Del Cerro E., Valera G., Carracedo J., Guerra-Pérez N.,(2023) Sex differences in markers of oxidation and inflammation. Implications for ageing, *Mechanisms of Ageing and Development*, Volume 211,ISSN 0047-6374, <https://doi.org/10.1016/j.mad.2023.111797>

Mattioli, G.A., Rosa, D.E., Turic, E., Picco, S.J., Raggio, S.J., Minervino, A.H.H., Fazio, L.E., 2020. Effects of parental supplementation with minerals and vitamins on oxidative stress and humoral immune response of weaning calves. *Animals* 10,1–9. <https://doi.org/10.3390/ani100811298>

Manuelian, C.L., Pitino, R., Simoni, M., Mavrommatis, A., De Marchi, M., Righi, F.,Tsiplakou, E., 2021. Plant feed additives as natural alternatives to the use of synthetic antioxidant vitamin on livestock mammals' performances, health and oxidative status: a review of the literature in the last 20 years. *Antioxidants* 10,1461–1483. <https://doi.org/10.3390/antiox10091461>

Mattson MP. Hormesis defined. *Ageing Res Rev.* 2008 Jan;7(1):1-7. doi: 10.1016/j.arr.2007.08.007. Epub 2007 Dec 5. PMID: 18162444; PMCID: PMC2248601.

McCracken, B.A., Spurlock, M.E., Roos, M.A., Zuckermann, F.A., Gaskins, H.R., 1999. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *Journal of Nutrition* 129, 613–619. <https://doi.org/10.1093/jn/129.3.613>.

Menzel, Alain, Hanen Samouda, Francois Dohet, Suva Loap, Mohammed S. Ellulu, and Torsten Bohn. 2021. "Common and Novel Markers for Measuring Inflammation and Oxidative Stress Ex Vivo in Research and Clinical Practice—Which to Use Regarding Disease Outcomes?" *Antioxidants* 10, no. 3: 414. <https://doi.org/10.3390/antiox10030414>

Merlot, E., Pastorelli, H., Prunier, A., Père, M.C., Louveau, I., Lefaucheur, L., Perruchot, M.H., Meunier-Salaün, M.C., Gardan-Salmon, D., Gondret, F., Quesnel, H., 2019. Sow environment during gestation: Part I. Influence on maternal physiology and lacteal secretions in relation with neonatal survival. *Animal* 13, 1432–1439. <https://doi.org/10.1017/S1751731118002987>

McKenna, C., Keogh, K., Porter, R.K., Waters, S.M., Cormican, P., Kenny, D.A., 2021. An examination of skeletal muscle and hepatic tissue transcriptomes from beef cattle divergent for residual feed intake. *Scientific Reports* 11, 8942. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87842-3>.

Mialon, M.M., Boivin, X., Durand, D., Boissy, A., Delval, E., Bage, A.S., Clanet, C., Cornilleau, F., Parias, C., Foury, A., Moisan, M.P., Fassier, T., Marcon, D.,Guilloteau, L.A., Nowak, R., 2021. Short and mid-term effects on performance,health and qualitative behavioral assessment of Romane lambs in different milk feeding conditions. *Animal* 15, 100157. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100157>

Morton, S.U., Brodsky, D., 2016. Fetal physiology and the transition to extra-uterine life. *Clinics in Perinatology* 43, 395–407. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.04.001>.

Asad Nawaz, Sana Irshad, Iftikhar Ali Khan, Ibrahim Khalifa, Noman Walayat, Rana Muhammad Aadil, Manoj Kumar, Mingfu Wang, Feng Chen, Ka-Wing Cheng, Jose Manuel Lorenzo, 2020. Protein oxidation in muscle-based products: Effects on physicochemical properties, quality concerns, and challenges to food industry.*Food Research International*,Volume 157,ISSN 0963-9969,<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111322>

Osorio, J., 2020. Gut health, stress, and immunity in neonatal dairy calves: the host side of host-pathogen interactions. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 11, 105–120. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00509-3>

Patel, R. P. et al. (1999) 'Biological aspects of reactive nitrogen species', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1411(2–3), pp. 385–400. doi: 10.1016/S0005-2728(99)00028-6.

Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015 Jan;30(1):11-26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0. Epub 2014 Jul 15. PMID: 25646037; PMCID: PMC4310837.

Pizzino, G. et al. (2017) 'Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health', *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017. doi: 10.1155/2017/8416763.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008 Jun;4(2):89-96. PMID: 23675073; PMCID: PMC3614697.

Ponce, J., Brooks, J. C. & Legako, J. F., (2020) "Chemical Characterization and Sensory Relationships of Beef *M. longissimus lumborum* and *M. gluteus medius* Steaks After Retail Display in Various Packaging Environments", *Meat and Muscle Biology* 4(1), 27, 1–17. doi: <https://doi.org/10.22175/mmb.10481>

Rasheed Z. Therapeutic potentials of catalase: Mechanisms, applications, and future perspectives. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2024 Mar-Apr;18(2):1-6. PMID: 38455600; PMCID: PMC10915913.

Rivera Aranda, Ana Karina, Alfredo Cruz-Gregorio, Yalith Lyzet Arancibia-Hernández, Estefani Yaquelin Hernández-Cruz, and José Pedraza-Chaverri. 2022. "RONS and Oxidative Stress: An Overview of Basic Concepts" *Oxygen* 2, no. 4: 437-478. <https://doi.org/10.3390/oxygen2040030>

Robert, F., Bebin, K., Garrau, J.M., Gueriot, J.F., Foret, R., Brack, M., Garrel, C., 2009. Evaluation et correction du stress oxydatif du porcelet en post-sevrage. *Journées de la Recherche Porcine* 41, 173–178.

Rosa, F., Michelotti, T.C., St-Pierre, B., Trevisi, E., Osorio, J.S., 2021. Early life fecal microbiota transplantation in neonatal dairy calves promotes growth performance and alleviates inflammation and oxidative stress during weaning. *Animals* 11, 2704. <https://doi.org/10.3390/ani11092704>

- Rubio, C.P., Escribano, D., Mainau, E., Ceron, J.J., Navarro, E., Manteca, X., 2021. Changes in salivary biomarkers of oxidative status in calves at weaning and grouping. *BMC Veterinary Research* 17, 373. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03087-2>
- Sales, F., Peralta, O.A., Narbona, E., McCoard, S., De Los Reyes, M., Gonzales-Bulnes, A., Parraguez, V.H., 2018. Hypoxia and oxidative stress are associated with reduced fetal growth in twin and undernourished sheep pregnancies. *Animals* 8, 217. <https://doi.org/10.3390/ani8110217>
- Salin, K., Auer, S.K., Rudolf, A.M., Anderson, G.J., Cairns, A.G., Mullen, W., Hartley, R.C., Selman, C., Metcalfe, N.B., 2015. Individuals with higher metabolic rates have lower levels of reactive oxygen species in vivo. *Biology Letters* 11, 20150538 <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0538>
- Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C. and Hernández-Carlos, B. (2019) Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanisms. IntechOpen, London.
- Sarr, O., Louveau, I., Le Huërou-Luron, I., Gondret, F., 2012. Adipose tissue proteomes of intrauterine growth-restricted piglets artificially reared on a high-protein neonatal formula. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 1417–1424. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.09.002>
- Sharifi-Rad, M. et al. (2020) ‘Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases’, *Frontiers in Physiology*, 0, p. 694. doi 10.3389/FPHYS.2020.00694.
- Sheng, Y.; Abreu, I.A.; Cabelli, D.E.; Maroney, M.J.; Miller, A.-F.; Teixeira, M.; Valentine, J.S. Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem. Rev.* 2014, 114, 3854–3918. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- Sies, H. (1991) ‘Oxidative stress: From basic research to clinical application’, *The American Journal of Medicine*, 91(3), pp. S31–S38. doi: 10.1016/0002-9343(91)90281-2.
- Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180-3. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002. Epub 2015 Jan 3. P

Silvestrini A, Meucci E, Ricerca BM, Mancini A. Total Antioxidant Capacity: Biochemical Aspects and Clinical Significance. *Int J Mol Sci.* 2023 Jul 1;24(13):10978. doi: 10.3390/ijms241310978. PMID: 37446156; PMCID: PMC10341416.

Younus, H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int. J. Health Sci.* 2018, 12, 88–93. [[Google Scholar](#)]

Sierzant, K., Perruchot, M.H., Merlot, E., Le Floc'h, N., Gondret, F., 2019. Tissuespecific responses of antioxidant pathways to poor hygiene conditions in growing pigs divergently selected for feed efficiency. *BMC Veterinary Research* 15, 341. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2107-2>.

Skaperda, Zoi, Angeliki Argyriadou, Paraskevi Maria Nechalioti, Maria Alvanou, Sotiria Makri, Efterpi Bouroutzika, Ioannis D. Kyriazis, Fotios Tekos, Aristidis S. Veskoukis, Theodoros Kallitsis, and et al. 2021. "Redox Biomarker Baseline Levels in Cattle Tissues and Their Relationships with Meat Quality" *Antioxidants* 10, no. 6: 958. <https://doi.org/10.3390/antiox10060958>

Villalba, J.J., Miller, J., Ungar, E.D., Landau, S.Y., Glendinning, J., 2014. Ruminant selfmedication against gastrointestinal nematodes: evidence, mechanism, and origins. *Parasite* 21, 31. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014032>. Epub 2014 Jun 30. PMID: 24971486; PMCID: PMC4073621.

Wu, GuoyaoFang, Yun-Zhong et al (2004). Glutathione Metabolism and Its Implications for Health *The Journal of Nutrition*, Volume 134, Issue 3, 489 - 492

Yuan, Q.; Zhu, X.; Sayre, L.M. Chemical nature of stochastic generation of protein-based carbonyls: Metal-catalyzed oxidation versus modification by products of lipid oxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 2007, 20, 129–139.

Zhang, H. and Tsao, R. (2016) ‘Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects’, *Current Opinion in Food Science*, 8, pp. 33–42. doi: 10.1016/J.COFS.2016.02.002.

Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med.* 2019 Jul;44(1):3-15. doi:

10.3892/ijmm.2019.4188. Epub 2019 May 8. PMID: 31115493; PMCID: PMC6559295.MID: 25588755; PMCID: PMC4309861.

Ελληνική βιβλιογραφία

Γάλαρης Δ., 2015. Ελεύθερες ρίζες: Ορισμός και χημικές ιδιότητες. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες.

Μιχαήλ Σ., 1996. Ιστολογία. ISBN 960-343-028-5. Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε.

Παπαγεωργίου Γ., 2005. Βιοχημεία ελευθέρων ριζών, αντιοξειδωτικά και λιπιδική υπεροξείδωση. Εκδόσεις UniversityStudioPress.

Σμοκοβίτης Αθ., 1993. Φυσιολογία. ISBN 960-343-182-8. Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε.