



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΕΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ, ΜΕ ΘΕΜΑ:

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ
ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΥΪΚΟ (ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟ) ΙΣΤΟ, ΝΕΑΡΩΝ
ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ
ΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ.**

**ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN TISSUES
(BRAIN-QUADRICEPS) FROM SHEEPS CONSUMED FEED
WITH POLYPHENOLIC ADDITIVES IN ABLACTATION
PERIOD**



ΤΕΡΖΟΠΟΥΛΟΥ ΖΩΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Στάγκος: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κωνσταντίνος Πετρωτός: Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ/Λάρισας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία, εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβολές που μου μετέδωσε καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος σπουδών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον Λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο, για την συνεχή και ουσιαστική παρουσία και υποστήριξη του, τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στην συγγραφή αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ ακόμη όλη την ομάδα του εργαστηρίου, για τη συνεργασία και το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τους Υποψήφιους Διδάκτορες, Νίκο Γκουτζουρέλα και Κωνσταντίνο Γερασόπουλο, τον Ιωάννη Καφαντάρη που εκτελεί το μεταδιδακτορικό του πρόγραμμα και τα δείγματα προήλθαν από το δικό του πρόγραμμα, που συνέβαλαν στα μέγιστα τόσο στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας όσο και στην ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, ήταν η εκτροφή στο στάδιο του απογαλακτισμού είκοσι οχτώ (28) προβάτων, της Ελληνικής φυλής «Χιώτικα», με πολυφαινολικά πρόσθετα από στέμφυλα και στη συνέχεια έλεγχος της αντιοξειδωτικής τους δράσης στον εγκεφαλικό και τετρακέφαλο ιστό. Τα είκοσι οχτώ (28) πρόβατα που εκτράφηκαν χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες. Σε αυτές τις δύο ομάδες χορηγήθηκε διαφορετικό σιτηρέσιο. Η πρώτη ομάδα αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου ενώ η δεύτερη ομάδα αποτελούνταν από τα νεαρά πρόβατα στο σιτηρέσιο των οποίων, περιέχονταν επιπλέον στέμφυλα, τα οποία περιέχουν πολυφαινόλες. Τα πρόβατα εκτράφηκαν με το πειραματικό σιτηρέσιο για πενήντα (50) ημέρες, διότι τις πρώτες 15 ημέρες, τρέφονταν μόνο με το μητρικό γάλα. Πραγματοποιήθηκαν 3 ιστοληψίες. Η πρώτη ιστοληψία πραγματοποιήθηκε δέκα πέντε (15) ημέρες μετά την γέννηση των προβάτων, από τέσσερα (4) ζώα, με σκοπό τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής τους άμυνας σε πρόωρη ηλικία. Τα υπόλοιπα πρόβατα διαχωρίστηκαν σε δύο ισοδύναμες (2) ομάδες, των δώδεκα (12) ατόμων. Όπως αναφέρθηκε ήδη, η πρώτη ομάδα είναι η ομάδα ελέγχου που λαμβάνει το κανονικό σιτηρέσιο και η δεύτερη ομάδα λαμβάνει το πολυφαινολικό σιτηρέσιο απογαλακτισμού. Η δεύτερη ιστοληψία πραγματοποιήθηκε σε δώδεκα (12) πρόβατα, έξι (6) από την κάθε ομάδα, ηλικίας σαράντα δύο (42) ημερών ενώ η τελευταία ιστοληψία έγινε σε δώδεκα (12) πρόβατα ηλικίας εξήντα πέντε (65) ημερών, έξι (6) από κάθε ομάδα. Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που ελέγχθηκαν ήταν: η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) και η δραστηριότητα της καταλάσης (CAT) για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – Total antioxidant capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric acid reactive substances), για τον προσδιορισμό της υπεροξείδωσης των λιπιδίων και τέλος τα πρωτεϊνικά καρβονύλια για τον προσδιορισμό της υπεροξείδωσης των πρωτεϊνών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα εξετάστηκε τελικά αν ο εγκεφαλικός και ο τετρακέφαλος ιστός, παρουσιάζει βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των προβάτων τα οποία τρέφονταν με το σιτηρέσιο το οποίο περιείχε τα στέμφυλα. Τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα που καταγράφηκαν, ήταν η αύξηση της δραστηριότητας της GSH στον τετρακέφαλο ιστό 65 ημερών κατά 29,62% των πολυφαινολικών ομάδων σε σχέση με τις ομάδες control. Από την άλλη η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του εγκεφαλικού ιστού, βρέθηκε να μειώνεται στατιστικά σημαντικά στις πολυφαινολικές ομάδες 65 ημερών,

κατά 29,90%, αντίθετα με τις τιμές που παρατηρήθηκαν για τον τετρακέφαλο ιστό, χωρίς όμως να είναι σημαντικές. Αντίστοιχα οι τιμές των TBARS αυξήθηκαν σημαντικά στον εγκεφαλικό ιστό 42 και 65 ημερών, σε ποσοστά 251,3% και 98,8% αντίστοιχα, των πολυφαινολικών ομάδων σε σχέση με τις ομάδες control, υπογραμμίζοντας μαζί και με την παραπάνω παρατήρηση, την ιδιαίτερη ευαισθησία αυτού του οργάνου στην παρουσία των ROS και συνεπώς το διαφορετικό πρότυπο δράσης των αντιοξειδωτικών του συστημάτων σε σχέση με τα άλλα όργανα. Για τις υπόλοιπες μετρήσεις, οι μεταβολές στα πρωτεϊνικά καρβονύλια και τη δραστηριότητα της καταλάσης δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

ABSTRACT

The aim of the present study was to raise young sheeps with feed containing polyphenolic additives from grapes, in order to examine the effects on the redox status in tissues (Brain and Quadriceps), using oxidative stress markers.

For this purpose, feed containing polyphenolic additives was given to twenty eight (28) young sheeps at the stage of ablactation. The twenty eight (28) sheeps were divided into two (2) groups. In these two groups, different diets were given. The first group was the control group with the basic diet, while the other group was received special feed with polyphenolic additives from grapes. The sheeps were fed with the experimental diet for fifty (50) days. Tissues were collected from the experimental animals at 3 different time-points. The first time-point was fifteen (15) days after the birth of sheeps in order to check their antioxidant status at early age. The second time-points was at forty two (42) days after birth, and the last time-point was at sixty five (65) days after birth. The following oxidative stress biomarkers were assessed in tissues: reduced glutathione (GSH), catalase activity (CAT), total antioxidant capacity (TAC), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyls.

Regarding the results obtained in the study of the respective biomarkers of oxidative stress in the muscle (quadriceps) and brain tissue, it should be noted that the activity of the GSH, the 65-day quadriceps tissue increased by 29.62% compared to the control group. Conversely, TAC levels in brain tissue showed a statistically significant decrease in the level of 29.9% compared to the corresponding control group, while during TBARS assay, noted an increase of their concentrations (nmol/mg) in polyphenolic groups of brain tissue of both 42 and 65 days, at a rate of 251.3% and 98.8% respectively. Finally, the concentration of protein carbonyls as the activity of catalase seemed not to show statistically significant changes in both tissues.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	6
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1. Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικές Μόρια Οξυγόνου (ΔΜΟ).....	9
2. Μηχανισμοί Παραγωγής Ελευθέρων Ριζών	14
2.1 Μιτοχονδριακοί μηχανισμοί παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου	14
2.3 Ενζυμικά Συστήματα Οξειδασών	17
2.4 Οξειδοαναγωγή της Ξανθίνης.....	19
2.5 Κυτόχρωμα P450	20
3. Οι συνέπειες της παραγωγής των ελευθέρων ριζών στους οργανισμούς -Οξειδωτικό στρες.....	22
4. Κλινική Σημασία Οξειδωτικού Στρες	26
5. Αντιοξειδωτική Άμυνα των Οργανισμών	31
5.1 Αντιοξειδωτικά Ένζυμα.....	31
5.2 Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά	35
6. Πολυφαινόλες.....	42
7. Κατηγορίες Φυτικών Πολυφαινολών.....	43
7.1 Φλαβονοειδή.....	43
7.2 Πολυφαινολικά Οξέα.	45
7.3 Στιλβένια.....	47
7.4 Λιγνάνες.....	48
8. Αντιοξειδωτική Δράση Πολυφαινολών.....	49
9. Κυτταρικές δράσεις των πολυφαινολών.	54
10. Βιοδιαθεσιμότητα Πολυφαινολών.	59
11. Τοξικότητα Φυτικών Πολυφαινολών.	64
12. Μορφολογικά χαρακτηριστικά και σύσταση σταφυλιών.....	67
13. Φαινολικά Συστατικά Σταφύλης και Στέμφυλων.....	72
14. Εναλλακτικές χρήσεις Στέμφυλων	75
15. Παραγωγή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών	78
B. Πειραματικό Μέρος	80
1. Γενικά.....	80
1.2 Αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των αμνών κατά την πειραματική πορεία.....	81

2. Βιολειτουργική Ζωοτροφή	86
2.1 Παρασκευή ενσιρώματος στεμφύλων.	86
2.3 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των παρασκευασμένων ζωοτροφών για τα πρόβατα Ελληνικής φυλής, «Χιώτικα».	88
3. Λήψη Ιστών από ζωτικά όργανα.	91
3.1 Ομογενοποίηση Ιστών.	93
4. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες	94
4.1 Μέθοδοι	94
5. Αποτελέσματα	108
5.1 Συνολικά αποτελέσματα της αποτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ζωοτροφών	108
5.2 Σύγκριση των δύο μεθόδων κατά Spearman	108
5.3 Αποτελέσματα Μετρήσεων σε Εγκεφαλικό και Τετρακέφαλο Ιστό	109
6. Συζήτηση.....	119
Βιβλιογραφία	125

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικές Μόρια Οξυγόνου (ΔΜΟ)

Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια, τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα. Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό, ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό εμφανίζοντας *μικρότερη ενεργειακή κατάσταση*, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο γίνεται ασταθές, εμφανίζοντας *μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση*, με αποτέλεσμα να είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια.

Άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται παραμαγνητικά, ενώ όταν δεν διαθέτουν τέτοια ηλεκτρόνια, διαμαγνητικά. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων. Τέτοιες αντιδράσεις ονομάζονται οξειδοαναγωγικές (*redox*), εκ των οποίων κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων από ένα άτομο.

Ως ελεύθερη ρίζα (free radical), λοιπόν ορίζεται κάθε είδος ατόμου (όπως οξυγόνο, άζωτο), μορίου ή ιόντος που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, στην εξωτερική στιβάδα, είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Gilbert, 2000, Halliwell & Gutteridge, 1990). Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, που καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό, παριστάνεται συνήθως με μία τελεία πάνω και δεξιά ή αριστερά από το χημικό τύπο της ελεύθερης ρίζας. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικές, λόγω της παρουσίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων και τείνουν να "αποσπασούν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια. Όταν συμβεί αυτό, το μόριο που έχασε το ηλεκτρόνιό του μετατρέπεται σε νέα ρίζα η οποία με τη σειρά της "αποσπά" ηλεκτρόνιο με

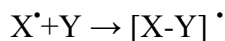
αντιπαράλληλη στροφορμή (spin) από άλλο μόριο κ.ο.κ.. Η αλυσιδωτή αυτή αντίδραση μπορεί να συνεχιστεί επί μακρόν. Το υπόβαθρο για τη διεργασία αυτή αποτελεί η εγγενής τάση ατόμων, ιόντων, μορίων και γενικά ενεργειακών συστημάτων, φυσικά και των ριζών, να διατηρούνται στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Η δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών εξαρτάται από τα μόρια ή τις άλλες ρίζες στο περιβάλλον, καθώς και από τη φύση (π.χ. πολικότητα) του περιβάλλοντος μέσου. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με τους παρακάτω τρόπους:

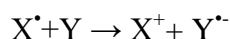
1. Απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $X \rightarrow e^- + X^\bullet$
2. Λήψη ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $Y + e^- \rightarrow Y^\bullet$
3. Ομολυτική σχάση ομοιοπολικού δεσμού: $A:B \rightarrow A^\bullet + B^\bullet$

Ενώ, μπορούν να αντιδράσουν με μόρια ή άτομα με τους εξής τρόπους:

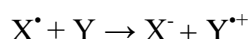
1. Προσθετικώς, όταν η ελεύθερη ρίζα συνδέεται με ένα μόριο ή άτομο (π.χ. προσθήκη της ρίζας OH^\bullet στη βάση γουανίνη του DNA):



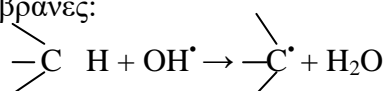
2. Αναγωγικώς, όταν η ελεύθερη ρίζα δρα ως αναγωγικός παράγοντας, παραχωρώντας το ασύζευκτό της ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο ή άτομο:



3. Οξειδωτικώς, όταν η ελεύθερη ρίζα δρα ως οξειδωτικός παράγοντας, δεχόμενη ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο ή άτομο :



4. Αφαιρετικώς, όταν η ελεύθερη ρίζα αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από τον ανθρακικό σκελετό μιας οργανικής ένωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας αντίδρασης είναι η προσβολή των πλευρικών αλυσίδων λιπαρών οξέων από την ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου, με την οποία αρχίζει η σειρά αντιδράσεων της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων, που είναι ο κύριος μηχανισμός πρόκλησης οξειδωτικών βλαβών σε βιολογικές μεμβράνες:



Στις ελεύθερες ρίζες, συγκαταλέγονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS), περιγράφοντας αυτές που έχουν σαν κεντρικό μόριο το

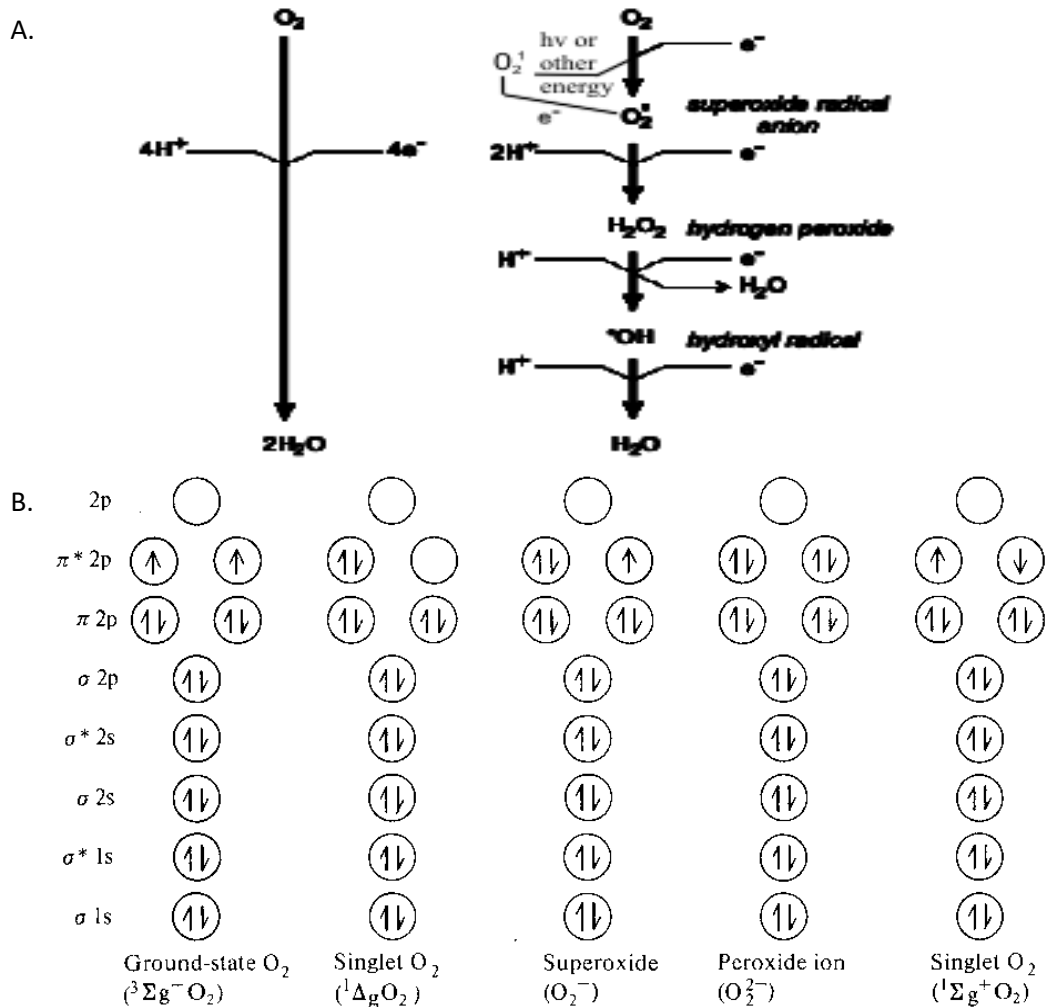
οξυγόνο, οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) που προέρχονται από το χλώριο, με τις τρεις αυτές τελευταίες κατηγορίες ριζών να μπορούν να προέλθουν από αντίδραση με τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (Giles & Jacob, 2002).

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο. Το μόριο του οξυγόνου, που αναπνέουμε, στη βασική του (μη διεγερμένη) κατάσταση (ground-state O_2) εμπίπτει στον ορισμό της ελεύθερης ρίζας αφού διαθέτει δύο μονήρη (ή ασύζευκτα) ηλεκτρόνια με ίδιας κατεύθυνσης στροφορμές (spin), που καταλαμβάνουν το καθένα ένα διαφορετικό μοριακό τροχιακό. Η κατανομή αυτή προσδίδει στην όλη δομή υψηλού βαθμού χημική σταθερότητα, αφού προκειμένου το O_2 να αντιδράσει απευθείας με κάποια ένωση, θα πρέπει η ένωση αυτή να διαθέτει επίσης δύο μονά ηλεκτρόνια με στροφορμή αντίθετη ως προς αυτή των ασύζευκτων ηλεκτρονίων του O_2 . Ο περιορισμός αυτός (spin restriction), που εξηγεί την αδυναμία του οξυγόνου να προσβάλλει απευθείας τα διάφορα βιολογικά μόρια και γενικότερα ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες, μπορεί να αρθεί με το σχηματισμό δραστικότερων παραγώγων O_2 με τους εξής δύο τρόπους:

α) Με πρόσληψη ενέργειας από το O_2 βασικής κατάστασης, το οποίο έτσι μεταπίπτει στη διεγερμένη κατάσταση του μονήρους οξυγόνου (singlet oxygen). Η απορροφούμενη ενέργεια σε πρώτη φάση αντιστρέφει τη στροφορμή του ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου (ενδιάμεση μορφή μονήρους οξυγόνου, $^1\Sigma_g^+O_2$). Αμέσως μετά, τα δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, έχοντας πλέον αντίθετες στροφορμές και κατάλληλη ενέργεια, καταλήγουν σε κοινό τροχιακό, δίνοντας την τελική μορφή μονήρους οξυγόνου ($^1\Delta_gO_2$) που είναι ένας ιδιαίτερα δραστικός οξειδωτικός παράγοντας. Η μετάπτωση του μοριακού οξυγόνου από τη βασική στη μονήρη κατάσταση είναι κατά κανόνα συζευγμένη με την αποδιέγερση κάποιου κατάλληλου μορίου, το οποίο είχε προηγουμένως διεγερθεί με την απορρόφηση φωτεινής ή άλλης ακτινοβολίας υψηλής ενέργειας. Το συνολικό φαινόμενο καλείται αντίδραση φωτοευαισθητοποίησης (photosensitization reaction) και μπορεί να λάβει χώρα in vivo με τη μεσολάβηση διαφόρων μορίων όπως φλαβινομάδες (FMN, FAD, ριβοφλαβίνη), πορφυρίνες, χολερυθρίνη κ.α.

β) Με διαδοχική αναγωγή του μοριακού οξυγόνου με πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου τη φορά. Η σταδιακή αυτή μονοσθενής αναγωγή μπορεί να συνεχισθεί μέχρι την προσθήκη τεσσάρων συνολικά ηλεκτρονίων και καταλήγει στη μετατροπή ενός

μορίου O_2 σε δύο μόρια H_2O , με το σχηματισμό ενδιάμεσων, μερικώς ανηγμένων, δραστικών μορφών O_2 . Οι μορφές αυτές είναι, σε σειρά σχηματισμού, η ρίζα υπεροξειδίου $O_2^{\cdot -}$ (superoxide radical), το υπεροξειδίο του υδρογόνου H_2O_2 (hydrogen peroxide) και η ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου $^{\cdot}OH$ (hydroxyl radical).



Εικόνα 1: Α. Προϊόντα αναγωγής και διέγερσης του μοριακού οξυγόνου, Β. Ηλεκτρονιακή κατανομή του μοριακού οξυγόνου βασικής κατάστασης και των παραγώγων του (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Το μονήρες οξυγόνο στη σταθερή του μορφή ($^1\Delta_g O_2$) και το υπεροξειδικό ανιόν (O_2^{2-}) δεν έχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια και έτσι δεν αποτελούν ελεύθερες ρίζες αλλά εντάσσονται σε μία ευρεία ομάδα παραγώγων του οξυγόνου με την γενική ονομασία “δραστικές μορφές οξυγόνου” (ΔΜΟ), που αφορά τα ενδιάμεσα προϊόντα ατελούς αναγωγής του οξυγόνου και περιλαμβάνει όχι μόνο τα πρωτογενή δραστικά παράγωγα του οξυγόνου αλλά και όλα εκείνα (ρίζες ή μη) που προκύπτουν δευτερογενώς κατά τις διάφορες χημικές αλληλεπιδράσεις με τα στοιχεία του κυτταρικού περιβάλλοντος (π.χ. οι υπεροξυλικές $RCOO^{\cdot}$ και αλκοξυλικές ρίζες RCO^{\cdot} ,

ενδιάμεσα προϊόντα της υπεροξειδωσης λιπιδίων). Ανάλογα και το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν είναι ρίζα (non-radical), αλλά η σημασία του για την οξειδοαναγωγική κατάσταση (status) του οργανισμού οφείλεται, αφενός μεν, στο ότι αποτελεί υπόστρωμα για την παραγωγή άλλων ενδιάμεσων μορίων με οξειδοαναγωγικό δυναμικό, αφετέρου δε στη συμμετοχή του στις διαβιβαστικές οδούς ορμονών και παραγόντων ανάπτυξης οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων ευαίσθητων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού (redox sensitive genes).

Η ταξινόμηση των ΔΜΟ γίνεται, στις εξής τέσσερις κατηγορίες: (i) τις ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), (ii) τα ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-), που προκύπτει από τη διάσταση του υποχλωριώδους οξέως (HClO), (iii) τους συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν σουπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$) και (iv) μόρια μη ρίζες (non-radicals), όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). Οι ελεύθερες ρίζες ως ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής, αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, παίρνοντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο για να ζευγαρώσουν το δικό τους, με αποτέλεσμα και τα παρακείμενα μόρια να μετατρέπονται επίσης σε ελεύθερες ρίζες και με αυτόν τον τρόπο να διαταράσσεται η μοριακή τάξη, ξεκινώντας μία αλυσιδωτή αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη (J. G. Salway et.al., 2006).

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Ελεύθερες Ρίζες (Free Radicals)	Μη-ρίζες (Non-radicals)
Ρίζα υπεροξειδίου (O_2^- , superoxide radical)	Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2 , hydrogen peroxide)
Ρίζα υδροξυλίου (OH^\cdot , hydroxyl radical)	Υποχλωριώδες οξύ (HOCl^a , hypochlorous acid)
Υπεροξυλική ρίζα (RO_2^\cdot , peroxy radical)	Όζον (O_3)
Αλκοξυλική ρίζα (RO^\cdot , alcoxyl radical)	Μονήρες οξυγόνο ($^1\text{O}_2$, singlet oxygen).
Υδροϋπεροξυλική ρίζα (HO_2^\cdot , hydroperoxyl radical)	Υπεροξυνιτρώδες (ONOO^- , peroxy nitrite)

^a Μπορεί να χαρακτηριστεί και ως δραστική μορφή χλωρίου (reactive chlorinating species, RCIS)

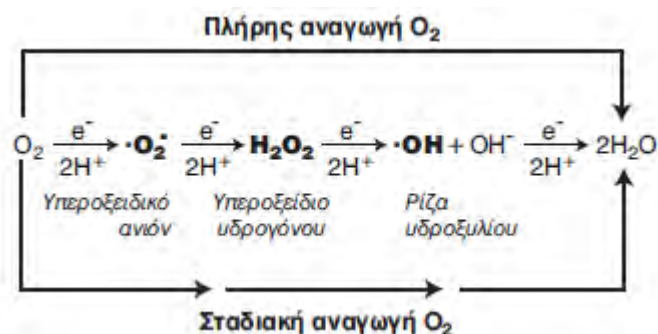
^β Μπορεί να χαρακτηριστεί και ως δραστική μορφή αζώτου (reactive nitrogen species, RNS)

2. Μηχανισμοί Παραγωγής Ελευθέρων Ριζών

2.1 Μιτοχονδριακοί μηχανισμοί παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου

Οι ελεύθερες ρίζες στον ανθρώπινο οργανισμό μπορούν να σχηματιστούν τόσο ενδογενώς όσο και εξωγενώς. Ενδογενώς, σχηματίζονται μέσω των φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών, από όλα τα αερόβια κύτταρα μέσω της δράσης πολλών ενζύμων και πολλές φορές ως αποτέλεσμα παθολογικών καταστάσεων. Πιο συγκεκριμένα, το 95% του οξυγόνου που καταναλώνει ο οργανισμός χρησιμεύει για την παραγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια η οποία αποθηκεύεται υπό μορφή δεσμών υψηλής ενέργειας, στο μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate, ATP), με τη διεργασία της "οξειδωτικής φωσφορυλίωσης". Η παραγωγή του ATP, προωθείται με μεταφορά ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα όπου το καθένα λειτουργεί διαδοχικά ως δέκτης και δότης ηλεκτρονίων και ταυτόχρονη μετατροπή του NADH και του FADH₂, στην ανηγμένη μορφή τους, που χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη σταθερότητα. Η "αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων" (electron transport chain) αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, τα οποία μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Τελικός σταθμός των μεταφερομένων ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο το οποίο ανάγεται (προσθήκη ηλεκτρονίων) και παρουσία και πρωτονίων (ιόντων υδρογόνου) σχηματίζεται νερό. Η διαδικασία μεταφοράς των ηλεκτρονίων στο μοριακό (O₂) γίνεται άμεσα, δηλαδή τα 4 ηλεκτρόνια που "συλλέγει" το σύμπλεγμα IV (κυταροχρωμικής-C οξειδάσης) αποδίδονται στο μοριακό οξυγόνο (το ανάγουν πλήρως) και με την προσθήκη 4 H⁺ σχηματίζουν, σε μια συντονισμένη αντίδραση, δύο μόρια H₂O χωρίς το σχηματισμό ενδιάμεσων μορίων. Αυτό αφορά το 95-99% του οξυγόνου. Εντούτοις, ιδίως από τα συμπλέγματα I και III, διαφεύγουν μικρές ποσότητες μονήρους οξυγόνου (¹O₂, singlet oxygen) και υπεροξειδίου (O₂⁻), τα οποία όμως εξουδετερώνονται από τοπικά αντιοξειδωτικά συστήματα που υπάρχουν στη θεμέλια ουσία: την υπεροξειδική δισμουτάση που περιέχει μαγνήσιο (MnSOD), η οποία μετατρέπει το υπεροξείδιο σε H₂O₂, το σύστημα θεωροδοξίνης-περο-ξυρεδοξίνης (theoredoxin-peroxyredoxin) και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, τα οποία μετατρέπουν το υπεροξείδιο σε H₂O. Ένα μικρό ποσοστό του H₂O₂, όπως και το παραγόμενο σε άλλους ιστούς, διαφεύγει στο κυτταρόπλασμα και κινητοποιεί συγκεκριμένες σηματοδοτικές οδούς. Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στα μιτοχόνδρια, στον υπόλοιπο οργανισμό η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου γίνεται σταδιακά, δηλαδή σε κάθε βήμα προστίθεται και ένα ηλεκτρόνιο, με

συνέπεια το σχηματισμό ενδιάμεσων προϊόντων, τα σπουδαιότερα από τα οποία είναι το υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\cdot-}$) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Αναγωγή του μοριακού οξυγόνου εκτός μιτοχονδρίων.

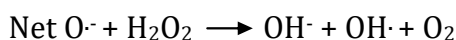
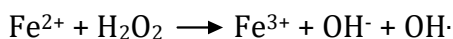
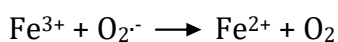
Εντούτοις παρά την ικανότητα των μιτοχονδρίων να ανάγουν το μοριακό οξυγόνο πλήρως, τα οργανίδια αυτά αποτελούν την μεγαλύτερη πηγή ελεύθερων ριζών του οργανισμού. Η παραγωγή ελεύθερων ριζών από τα μιτοχόνδρια εξαρτάται από την μερική τάση του οξυγόνου αλλά αυξάνεται σημαντικά σε βλάβη των μιτοχονδρίων και ιδιαίτερα στην κατάσταση που περιέγραψαν για πρώτη φορά το 1979 οι Haworth και Hander γνωστή ως "μιτοχονδριακή μεταβολή της διαπερατότητας" (mitochondrial transition permeability). Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από αύξηση της διαπερατότητας της έσω μιτοχονδριακής μεμβράνης σε μόρια με $MB < 1500$ Da, που οδηγεί σε οξείδωση των μιτοχονδρίων. Στην ουσία πρόκειται για μεταβολή του συμπλέγματος πρωτεϊνών της έσω μεμβράνης γνωστού ως "μεταβολή της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών πόρων" (mitochondrial permeability transition pore). Το αποτέλεσμα της διαταραχής αυτής είναι η μη-χρησιμοποίηση (uncoupling) της παραγόμενης ενέργειας, από την μεταφορά των ηλεκτρονίων, για την σύνθεση ATP και η μεγάλη παραγωγή υπεροξειδίου, με συνέπεια την απόπτωση του κυττάρου (Παπαγαλάνης, 2014). Η υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και κυρίως H_2O_2 , από τα μιτοχόνδρια αυξάνεται επίσης πολύ σε καταστάσεις σήψης (Taylor DE, 1995).

2.2 Κυτταροπλασματικοί μηχανισμοί παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου

Όσον αφορά την παραγωγή ελεύθερων ριζών εκτός των μιτοχονδρίων, φαίνεται πως αυτή επιτελείται από ενζυμικά συστήματα, για την παραγωγή υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και H_2O_2 στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Στα συστήματα αυτά περιλαμβάνονται, η NADH-οξειδάση, η οξειδάση του κυτταροχρώματος P450, η κυκλοξυγενάση, η ξανθινοξειδάση και η λιποξυγενάση. Τα παραπάνω ένζυμα,

συμβάλουν στην παραγωγή σε ένα πρώτο στάδιο ενός ενδιάμεσου προϊόντος, δηλαδή O_2^- και σε ένα δεύτερο στάδιο H_2O_2 (σχήμα 1). Επειδή όμως τα πρώτα αυτά ενδιάμεσα προϊόντα είναι τοξικά για τους ιστούς, η συμβίωση του οργανισμού μαζί τους έχει διασφαλισθεί με την ανάπτυξη μηχανισμών εξουδετέρωσής τους, από τα ένζυμα της οικογένειας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (superoxide dismutase, SOD) (Mn-SOD στα μιτοχόνδρια, Cu,Zn-SOD στο κυτταρόπλασμα και EC-SOD στην κυτταρική μεμβράνη) μετατρέπουν το O_2^- σε H_2O_2 στο οποίο στη συνέχεια δρουν αφενός η καταλάση και αφετέρου η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase) και το μετατρέπουν σε νερό. Παρ' όλα αυτά, τα δύο πρωτοσηματιζόμενα προϊόντα της ατελούς αναγωγής του μοριακού οξυγόνου (και ιδίως το H_2O_2) αποτελούν σηματοδοτικά μόρια και δευτερογενή διαβιβαστικά μόρια (second messenger) στην σηματοδοτική διαδικασία αυξητικών παραγόντων (growth factors) και ορμονών, υπό συγκεκριμένες παθολογικές συνθήκες αποτελούν και υπόστρωμα για το σχηματισμό νέων ενδιάμεσων προϊόντων έναντι των οποίων ο οργανισμός διαθέτει περιορισμένη αμυντική ικανότητα. Μεταξύ των ριζών αυτών κυριότερες είναι: η υδροξυλική ρίζα (OH^-) η οποία παράγεται από το H_2O_2 , με την καταλυτική δράση του δισθενούς σιδήρου (ferrous state), που δίνει ένα ηλεκτρόνιο και μετατρέπεται σε τρισθενή (ferric state) κατά την αντίδραση:

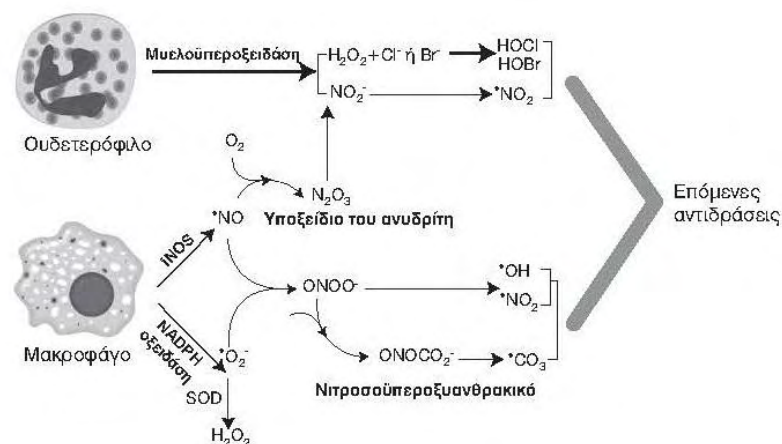
Αντίδραση Haber-Weiss:



το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$) που παράγεται με τη δράση της μυελοϋπεροξειδάσης και υπεροξυνιτρικό ($ONOO^-$) που παράγεται από το O_2^- παρουσία του μονοξειδίου του αζώτου (Παπαγαλάνης, 2014). Ειδικότερα, το υπεροξυνιτρικό ανιόν ($ONOO^-$), σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ($ONOOH$) (Korpenol, 1998) και από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες $OH\cdot$ και $NO_2\cdot$. Τέλος, η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη (UQH_2) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης (UQH), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου ($O_2\cdot^-$) (Boveris & Cadenas, 1997).

2.3 Ενζυμικά Συστήματα Οξειδασών

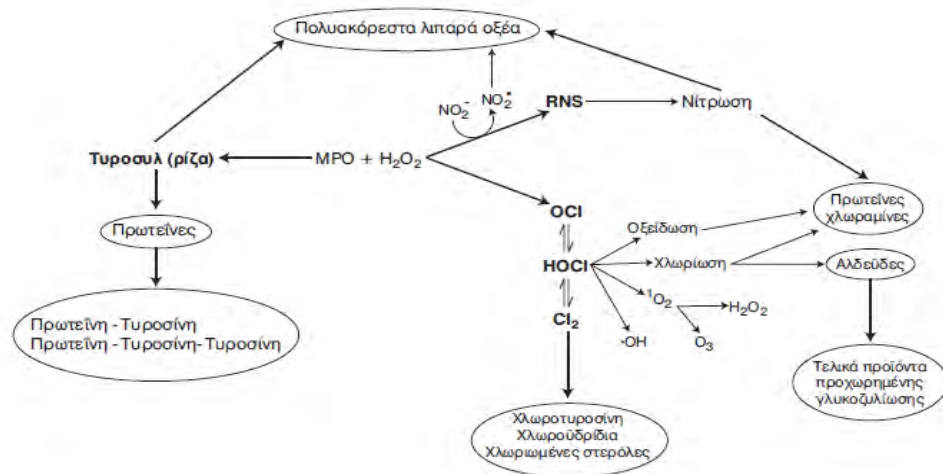
Βέβαια, οι ελεύθερες ρίζες δεν αποτελούν απλώς παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού, αλλά η παραγωγή τους γίνεται με λεπτομερώς προγραμματισμένο μηχανισμό από εξειδικευμένα ένζυμα, τις οξειδάσες NOX (NADPH-oxidase) και DUOX (dual-oxidase), εξυπηρετώντας την φυσική ανοσία, συγκεκριμένες σηματοδοτικές λειτουργίες και τη βιοσύνθεση ορμονών. Χαρακτηριστικά, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος με φαγοκυτταρική λειτουργία (ουδετερόφιλα και μακροφάγα), όταν έρθουν σε επαφή με μικρόβια, αυξάνουν απότομα και σε πολύ μεγάλο βαθμό ("εκρηκτικά") την κατανάλωση οξυγόνου, η οποία δεν φαίνεται να αναστέλλεται από την παρουσία κυανίου, που αναστέλλει την μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, με αποτέλεσμα την ανεύρεση του ενζύμου της φαγοκυτταρικής NADPH-οξειδάσης, η οποία καταναλώνει το οξυγόνο και ευθύνεται για την μεγάλη παραγωγή O_2^- , H_2O_2 και HOCl στο φαγόσωμα για την καταστροφή των μικροβίων. Τα συγκεκριμένα ενζυμικά συμπλέγματα, βρέθηκε να εντοπίζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Mohazzab και συν.), στα λεία μυϊκά κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος (Griendling και συν.), στα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου (colon epithelial cells) και έκτοτε σε όλα σχεδόν τα κύτταρα του οργανισμού, συμμετέχοντας στην παθογένεια διάφορων νοσημάτων είτε λόγω ανεπάρκειάς τους (κοκκιωματώδεις νόσοι) είτε λόγω υπερδραστηριότητάς τους και υπερπαραγωγής ROS. Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι μεταξύ του ενζυμικού συμπλέγματος που εκφράζεται στα φαγοκύτταρα και αυτού που εκφράζεται σε άλλους ιστούς υπάρχει μια ουσιαστική λειτουργική διαφορά: στα φαγοκύτταρα η ενεργοποίησή του γίνεται ανάλογα με τις αμυντικές ανάγκες του οργανισμού, ενώ στα υπόλοιπα κύτταρα η δραστηριότητά του είναι ιδιοσυστασιακή (constitutive) δηλαδή συνεχής και παράγει ένα "βασικό" επίπεδο ελεύθερων ριζών. Σήμερα είναι γνωστές επτά ισομορφές των ενζυμικών αυτών συστημάτων. Οι πέντε από αυτές έχουν ως κεντρική καταλυτική μονάδα την NADPH οξειδάση (NOX), και αναφέρονται ως NOX-1, NOX-2, NOX-3, NOX-4 και NOX-5, και οι δύο υπόλοιπες την διπλή (dual) οξειδάση και αναφέρονται ως DUOX-1 και DUOX-2. Το υπεροξειδίο είναι το προϊόν των NOX1, NOX2 και NOX5 ενώ οι οξειδάσες NOX4, DUOX1 και DUOX2 παράγουν H_2O_2 . Λόγω στερεοχημικής δομής των NOX4, DUOX1 και DUOX2 το παραγόμενο υπεροξειδίο καθυστερεί να απελευθερωθεί από το μόριο της οξειδάσης ώστε να συντίθεται και ένα δεύτερο μόριο υπεροξειδίου πριν αποσπασθεί το πρώτο, και να δημιουργείται H_2O_2 με τη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης.



Εικόνα 2: Οξειδωτικά μόρια που παράγονται από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα σε φλεγμονή (N. Παπαγαλάνης, 2015).

Η μυελοϋπεροξειδάση, είναι μια λυσοσωμική πρωτεΐνη (ένζυμο) που υπάρχει στα κοκκία των πολυμορφοκυττάρων και ανήκει στην οικογένεια "υπεροξειδάσης-κυκλοξυγενάσης" των οξειδοαναγωγικών ενζύμων, μαζί με την ηωσινοφιλική υπεροξειδάση (eosinophil peroxidase, EPO) και τη γαλακτική υπεροξειδάση (lacto peroxidase, LPO), που δρουν ως παράγοντες φυσικής ανοσίας. Η EPO είναι υπεύθυνη για την παραγωγή υποβρομιώδους οξέος (hypobromous acid, HOBr) από τα ενεργοποιημένα ηωσινόφιλα και η μυελοϋπεροξειδάση για την παραγωγή υποχλωριώδους οξέος (hypochlorous acid, HOCl) από τα πολυμορφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα και χρησιμοποιούν H_2O_2 και το αντίστοιχο αλογόνο (βρώμιο ή χλώριο). Τα παραγόμενα οξέα κατά την "αναπνευστική έκρηξη" διοχετεύονται στο φαγόσωμα συμβάλλοντας στην καταστροφή των μικροβίων. Εκτός από το υποχλωριώδες οξύ, η MPO είναι υπεύθυνη, για την παραγωγή υδροξυλικής ρίζας ($\cdot OH$), μοριακού χλωρίου, μονήρους οξυγόνου (singlet oxygen, 1O_2) και όζοντος (O_3). Τα μόρια αυτά δεν περιορίζονται μόνο στο φαγόσωμα, αλλά διοχετεύονται στον εξωκυττάριο χώρο και προκαλούν οξειδωτική βλάβη πρωτεϊνών και λιπών (Σχ. 2). Μάλιστα η χλωροτυροσίνη (που είναι αποτέλεσμα της δράσης της MPO στην τυροσίνη των πρωτεϊνών) αποτελεί και δείκτη της τοξικής δράσης του ενζύμου, ενώ οι ισχυρές οξειδωτικές ικανότητας ρίζες (HOCl, $\cdot OH$), που απελευθερώνονται στην τελευταία περίπτωση αντιδρούν άμεσα με μόρια του παρακείμενου περιβάλλοντος και κυρίως με τις λευκοματίνες και επακόλουθα η οξειδωτική τους δράση εξαντλείται στα άμεσα περιβάλλον του λυθέντος πολυμορφοκύτταρου. Δεν ισχύει όμως το ίδιο για το H_2O_2 και τις χλωραμίνες οι οποίες λόγω μικρότερης οξειδωτικής ισχύος μεταφέρονται εύκολα σε μεγαλύτερη απόσταση. Η MPO και η EPO είναι ισχυρές βάσεις και

συνδέονται με τις αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές μεμβράνες όπου φθάνει και το H_2O_2 και με αυτό τον τρόπο το σύστημα MPO- H_2O_2 ενεργοποιείται στην επιφάνεια κυττάρων που ευρίσκονται μακριά από το λυθέν πολυμορφοπύρηνιο προκαλώντας ιστική βλάβη (N. Παπαγαλάνης, 2014).



Σχήμα 2: Επίδραση της μυελοϋπεροξειδάσης στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια

2.4 Οξειδοαναγωγή της Ξανθίνης

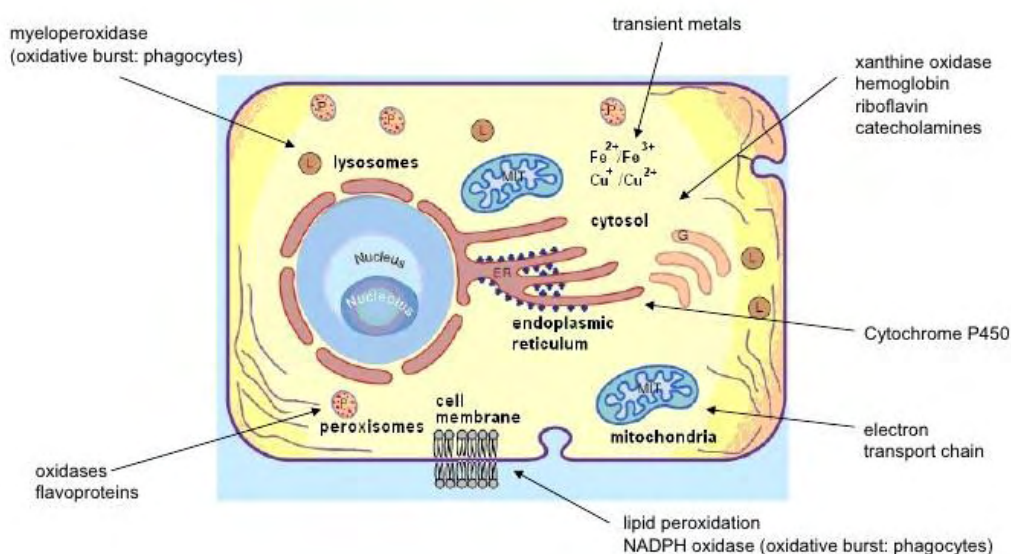
Η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης ανακαλύφθηκε το 1902 από τον Schardinger και αποτελεί μέλος της ομάδας των ενζύμων που περιέχουν μολυβδαίνιο. Είναι το ένζυμο που κατά τη διαδικασία καταβολισμού των πουρινών υδροξυλιώνει την υποξανθίνη σε ξανθίνη και την τελευταία σε ουρικό οξύ, με ταυτόχρονη αναγωγή ή του NAD^+ ή του οξυγόνου. Διακρίνονται δύο τύποι του ενζύμου, ανάλογα με την επιλογή του υποστρώματος που θα αναχθεί: Η αφυδρογονάση της ξανθίνης (xanthine dehydrogenase, XDH), η οποία έχει ως υπόστρωμα το NAD^+ και η οξειδάση της ξανθίνης (xanthine oxidase), η οποία έχει ως υπόστρωμα το οξυγόνο. Το σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (ischemia-reperfusion, I-R), πρόκειται για τη διεργασία κατά την οποία η νέκρωση των κυττάρων μιας ισχαιμούσας περιοχής επισυμβαίνει, όχι κατά την περίοδο της ισχαιμίας, αλλά κατά την περίοδο της επαναιμάτωσης. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Jennings και συν. το 1960 και διαπιστώθηκε ότι στην ανάπτυξή του ενέχεται η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης (xanthine oxidoreductase, XOR). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το ATP αποφωσφορυλιώνεται σε ADP και AMP εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται λόγω της σύσπασης του μυοκαρδίου. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ, με τη δράση της οξειδοαναγωγής της ξανθίνης να αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα στην παραπάνω διεργασία

(rate-limiting enzyme). Οι μελέτες έδειξαν ότι στη φάση της επαναιμάτωσης, παρατηρούνται "εκρήξεις" παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), υπεροξειδίου του οξυγόνου ($O_2^{\cdot -}$), υδροξυλικής ρίζας (OH^{\cdot}) και υπεροξυνιτρώδους ρίζας (peroxynitrite, $ONOOH^{\cdot}$), ενώ η αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα της XOR στους ιστούς όσο και τα υψηλά επίπεδά της στην κυκλοφορία συνδυάστηκαν με αυξημένη παραγωγή ουρικού οξέος. Επιπλέον, με βάση τα αποτελέσματα περαιτέρω ερευνών, διαπιστώθηκε πως κατά την ιστική βλάβη ενεργοποιείται και η NADH-οξειδάση και υποστηρίχθηκε έτσι ότι στο σύνδρομο I-R η παραγωγή υπεροξειδίου σε ποσότητες ικανές να προκαλέσουν ιστική βλάβη προέρχεται κατά μεγάλο ποσοστό στην NADH οξειδάση η οποία διεγείρεται από την XOR, λόγω του ότι η αφυδρογονάση της ξανθίνης έχει μεγαλύτερη συγγένεια με την NADH-οξειδάση από ότι με την ξανθίνη όταν το pH είναι $\leq 6,7$ (όπως συμβαίνει σε ισχαιμία). Συνεπώς φαίνεται ότι οι ποσότητες του υπεροξειδίου που απαιτούνται για την πρόκληση ιστικής βλάβης εξασφαλίζονται απόλυτα μέσω της οδού XOR-NADH οξειδάσης χωρίς να απαιτείται η μετατροπή της αφυδρογονάσης σε οξειδάση. Ας σημειωθεί επίσης, ότι η διέγερση της NADH οξειδάσης από την XOR είναι ανεξάρτητη από την παρουσία μολυβδαινίου και σιδήρου στο μόριο της τελευταίας, τα οποία όμως είναι απαραίτητα για την παραγωγή των ROS (N. Παπαγαλάνης, 2014).

2.5 Κυτόχρωμα P450

Οικογένειες των ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (cytochrome P450, CYP-450) ευρίσκονται σε κάθε μορφή ζωής και είναι πολυπληθής: στα ζώα έχουν βρεθεί 69 οικογένειες και στα θηλαστικά ειδικά 18 οικογένειες και 43 υποοικογένειες. Πρόκειται για εγγενείς μεμβρανικές πρωτεΐνες που εκφράζονται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο και αποτελούν ισχυρά οξειδωτικά (οξυγενάσες) και καταλύουν την υδροξυλίωση κεκορεσμένων δεσμών άνθρακα-υδρογόνου και την εποξείδωση, (δηλαδή προσθήκη ενός ατόμου οξυγόνου σε ένα διπλό δεσμό δύο ατόμων άνθρακα). Σήμερα είναι γνωστό ότι διάφορα μέλη της οικογένειας αυτής έχουν καθοριστική συμμετοχή στον οξειδωτικό μεταβολισμό πλήθους ξеноβιοτικών ουσιών (χημικών καρκινογόνων, φαρμάκων κ. ά.), αλλά και ενδοβιοτικών ουσιών όπως είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και οι βιταμίνες A και D3 τις οποίες μετατρέπουν σε δραστικές ορμόνες. Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας απαιτούν την παρουσία ενός δότη ηλεκτρονίων για την αναγωγή του σιδήρου της ομάδας αίμης που διαθέτουν και τελικά του μοριακού οξυγόνου και επομένως τα ένζυμα αυτά

αποτελούν τμήμα μιας αλυσίδας πρωτεϊνών η οποία μεταφέρει ηλεκτρόνια (N. Παπαγαλάνης, 2014). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων παράγουν ROS μέσω του κυτοχρώματος P₄₅₀ (Yu, 1994). Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας O₂^{·-} το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε H₂O₂ (Chance et al., 1979). Ο ρυθμός παραγωγής του H₂O₂ είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα (Halliwell & Gutteridge, 1989). Παρουσία ADP και Fe³⁺ η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O₂ παράγοντας O₂^{·-}.



Εικόνα 3: Κυτταρικές πηγές ελεύθερων ριζών (ROS) (Peter Kaplan, 2009).

Αξίζει, βέβαια να υπογραμμιστεί το γεγονός πως η παραγωγή των ελεύθερων ριζών μπορεί να ενισχυθεί και από την επίδραση εξωτερικών παραγόντων, όπως ο καπνός του τσιγάρου, οι ακτίνες-X, η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορες χημικές ενώσεις και φάρμακα καθώς επίσης και από το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (όζον, νιτροξειδία) (Battin et al., 2009).

3. Οι συνέπειες της παραγωγής των ελευθέρων ριζών στους οργανισμούς -Οξειδωτικό στρες.

Όπως συνάγεται από τις αντιδράσεις τους, οι ελεύθερες ρίζες και κυρίως οι πολύ δραστικές, όπως η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να προσβάλλουν μεγάλη ποικιλία μορίων όπως σάκχαρα, αμινοξέα, φωσφολιπίδια και γενικά λιπίδια, βάσεις DNA και οργανικά οξέα. Οι λιγότερο δραστικές ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή δραστικότερων καταλήγοντας τελικά στο ίδιο αποτέλεσμα. Γενικότερα, η διαταραχή της ισορροπίας προ-οξειδωτών και αντιοξειδωτικών προς όφελος των πρώτων, καταλήγοντας σε οξειδωτικές βλάβες (oxidative damage), ονομάζεται οξειδωτικό στρες (oxidative stress) (Sies et al., 1991). Η υπερπαραγωγή των ελευθέρων ριζών που συνεπάγεται αυτή η κατάσταση, παρατηρείται και κατά τη μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού, όπως του μηχανισμού της ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης(GSH/GSSG). Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από την έκταση των μεταβολών αυτών. Το κύτταρο είναι ικανό να ανακτήσει την αρχική του κατάσταση μετά από περιορισμένη οξειδωτική βλάβη. Σοβαρότερες διαταραχές, ωστόσο οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο, είτε με τη διαδικασία της απόπτωσης, είτε με άμεση κυτταρική νέκρωση.

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ), όπως η ρίζα υπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο πυρηνικό, μιτοχονδριακό DNA, καθώς και στο DNA των χλωροπλαστών. Οι βλάβες μπορεί να είναι εγχοπές στη μία έλικα του DNA (DNA nicks) ή σπασίματα και στις δύο αλυσίδες του (DNA fragments), καθώς επίσης και πληθώρα χημικών τροποποιήσεων στις βάσεις πουρίνης [για παράδειγμα η 8 υδρόξυ-γουανίνη (8-OH-guanine)] και πυριμιδίνης [για παράδειγμα η 5-υδρόξυ-6-υδροθυμίνη (5-hydroxy-6-hydrothymine)]. Εναλλακτικά, η προσβολή των πρωτεϊνών του DNA από ελεύθερες ρίζες μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό ομοιοπολικών ενώσεων DNA-πρωτεϊνών (DNA-protein cross-links), όπως για παράδειγμα μεταξύ θυμίνης και τυροσίνης, ενώ η υπερϊώδης ακτινοβολία (UV) μπορεί να προκαλέσει ομοιοπολική δέσμευση και διμερισμό μεταξύ γειτονικών πυριμιδινών (pyrimidine dimers). Άμεσο επακόλουθο της βλάβης του DNA είναι η μεταλλαξιγένεση που με τη σειρά της οδηγεί σε δυσλειτουργία του κυττάρου και καρκινογένεση.

Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στο DNA, ο σχηματισμός υπεροξειδίων είτε στον πεπτιδικό κορμό είτε στις πλευρικές αλυσίδες ορισμένων αμινοξέων αποτελεί έναν μόνο από τους πολλούς τύπους οξειδωτικών βλαβών που έχουν παρατηρηθεί στις πρωτεΐνες. Παρ' όλα αυτά, ο όρος υπεροξείδωση πρωτεϊνών έχει προσλάβει μια ευρύτερη έννοια και δηλώνει όλα τα είδη ομοιοπολικών τροποποιήσεων που προκαλούνται στις πρωτεΐνες από τα διάφορα είδη ΔΜΟ (OH•, ONOO-, HClO, ¹O₂) ή άλλα παραπροϊόντα του οξειδωτικού στρες (π.χ. από προϊόντα της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, όπως οι αλδεϋδες MDA και HNE). Οι χημικές μεταβολές που επέρχονται στις πρωτεΐνες ως συνέπεια του οξειδωτικού στρες ποικίλουν ανάλογα με το προσβαλλόμενο σε κάθε περίπτωση αμινοξύ αλλά και το είδος του δραστικού μορίου που επιφέρει τη βλάβη (Stadtman, 2006). Χαρακτηριστικά, πρωτεΐνες που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν πιο εύκολα με ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα τη μεταβολή της δομής τους και της λειτουργίας τους (Lygas et al, 1977).

Πίνακας 2: Γενικοί τύποι οξειδωτικής τροποποίησης πρωτεϊνών.

Οξείδωση θειολικών ομάδων
Σχηματισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων
Σχηματισμός διτυροσινών, γλωρινίωση, νιτροσυλίωση, υδροξυλίωση
Τροποποιήσεις της τρυπτοφάνης
Υδρο(υπερό)ξυ παράγωγα αλειφατικών αμινοξέων
Σχηματισμός γλωραμινών, οξειδωτική απαμίνωση
Διαμετατροπές αμινοξέων (π.χ. His σε Asn, Pro σε OH-Pro)
Προσθήκη προϊόντων υπεροξείδωσης λιπιδίων (MDA, HNE)
Προσθήκη προϊόντων οξείδωσης (π.χ. p-hydroxyphenylacetaldehyde)
Αντιδράσεις γλυκίωσης και γλυκοξειδίωσης (π.χ. Maillard browning)
Cross-links, συμπλοκοποίηση, διάσπαση πεπτιδικών δεσμών

Πίνακας 4: Βιοχημικές συνέπειες οξειδωτικής τροποποίησης πρωτεϊνών.

1. Μείωση ή αύξηση ενζυμικής δραστηριότητας
2. Απώλεια λειτουργικότητας (π.χ. fibrinogen/fibrin clotting)
3. Απώλεια ενεργότητας αναστολέα πρωτεασών (π.χ. a-1-antitrypsin, a-2-macroglobulin)
4. Συμπλοκοποίηση (π.χ. IgG, LDL, a-synuclein, amyloid protein, prion protein)
5. Αυξημένη (π.χ. του πρωτεϊνικού μεταγραφικού ρυθμιστή IRP-2) ή μειωμένη ευαισθησία σε πρωτεόλυση
6. Μη φυσιολογική πρόσληψη ουσιών από τα κύτταρα (π.χ. LDL)
7. Τροποποιημένη μεταγραφή γονιδίων (π.χ. SoxR, IκB)
8. Αυξημένη ανοσογονικότητα (π.χ. ovalbumin, HNE- ή acrolein-LDL)

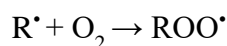
Οι περισσότερες οξειδωτικές επιδράσεις οδηγούν στη δυσλειτουργία πολλών πρωτεϊνών, η οποία μπορεί να οφείλεται σε αυτή την άμεση μεταβολή/αλλαγή αμινοξέων που βρίσκονται σε μια λειτουργική περιοχή για την πρωτεΐνη ή σε μερική αποδιάταξή της (Εικόνα 3). Αν οι πρωτεΐνες δεν αποδομηθούν εγκαίρως σ' αυτό το στάδιο, τείνουν να δημιουργούν συσσωματώματα τα οποία μακροπρόθεσμα σχηματίζουν ομοιοπολικές ενώσεις (cross links) μεταξύ τους και με τη συσσώρευσή τους, μπορούν να οδηγήσουν ακόμα και στον κυτταρικό θάνατο (Jung et al., 2007).



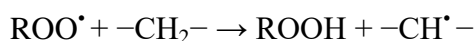
Εικόνα 4: Το οξειδωτικό στρες και οι επιπτώσεις του στην πρωτεϊνική δομή.

Όσον αφορά τα λιπίδια, έχει βρεθεί πως ένας από τους κύριους στόχους των ελευθέρων ριζών και λοιπών δραστικών μορφών οξυγόνου (ΔΜΟ) που σχηματίζονται στο κύτταρο είναι η φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταροπλασματικής και των ενδοκυττάρων μεμβρανών. Ως γνωστόν, το υδρόφοβο τμήμα των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων αποτελείται από λιπαρά οξέα με μακριές (14-24 άτομα C), αλειφατικές υδρογοναναθρακικές αλυσίδες, ένα μεγάλο ποσοστό των οποίων έχει έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς σε cis διάταξη (μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αντιστοίχως). Όσο αυξάνεται ο αριθμός των διπλών δεσμών της αλειφατικής αλυσίδας τόσο μειώνεται το σημείο τήξης του αντίστοιχου λιπαρού οξέος. Έτσι, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) συνεισφέρουν σημαντικά στη ρευστότητα των μεμβρανών, η οποία είναι άρρηκτα συνυφασμένη με όλες σχεδόν τις βιολογικές τους λειτουργίες. Την ίδια στιγμή όμως, τα PUFAs είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στην οξειδωτική προσβολή από διάφορα είδη ΔΜΟ, με την οποία ξεκινά μια αλληλουχία αντιδράσεων ελευθέρων ριζών με καταστροφικά αποτελέσματα για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των μεμβρανών γνωστή ως υπεροξειδωση λιπιδίων. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων αποτελεί, αν όχι την πιο σημαντική, τουλάχιστον την πιο

μελετημένη εκδήλωση του οξειδωτικού στρες και των αλληλεπιδράσεων ελευθέρων ριζών στα κύτταρα. Περιλαμβάνει το στάδιο έναρξης (initiation) και το στάδιο διάδοσης (propagation stage). Η συνήθης τύχη της ρίζας άνθρακα που σχηματίζεται (R^{\bullet}) είναι να συνδυαστεί με ένα μόριο O_2 με επακόλουθη παραγωγή υπεροξυλικής ρίζας, με βάση την αντίδραση:



Η ελεύθερη υπεροξυλική ρίζα είναι πολύ δραστική και μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από κάποιο γειτονικό μόριο PUFA, μετατρέπόμενη στο αντίστοιχο υδροϋπεροξειδίο (ROOH) :

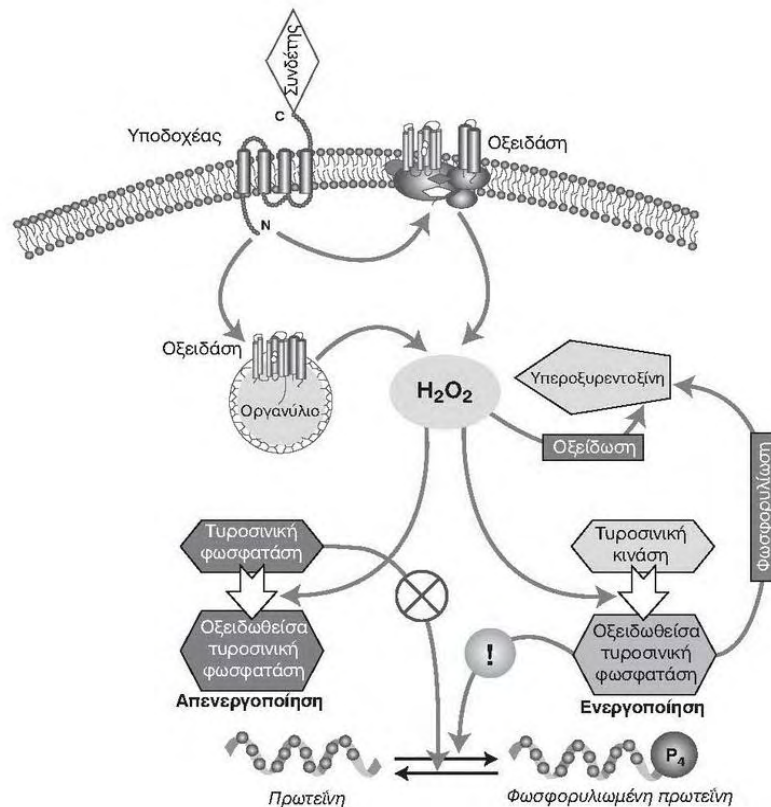


Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας νέας ελεύθερης ρίζας άνθρακα, η οποία μπορεί να αντιδράσει με O_2 και να δώσει εκ νέου υπεροξυλική ρίζα, που με τη σειρά της μπορεί να αποσπάσει ένα υδρογόνο από άλλο μόριο PUFA, συνεχίζοντας έτσι την αλυσίδα αντιδράσεων που ξεκίνησε από την προσβολή ενός αρχικού μορίου PUFA από OH^{\bullet} .

Η έκθεση των λιπιδικών υπεροξειδίων σε ιόντα Fe ή Cu του μεμβρανικού περιβάλλοντος μπορεί να προκαλέσει την αποικοδόμησή τους σε μια πληθώρα προϊόντων, τα οποία θεωρούνται ως τελικά προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται εποξειδία, κορεσμένες αλδεΐδες (π.χ. εξανάλη), ακόρεστες αλδεΐδες αλκενάλες, (π.χ. 4-υδροξυονενάλη ή HNE), κετόνες (βουτανόνες, πεντανόνες κ.α.), υδρογονάνθρακες (πεντάνιο, αιθάνιο, αιθυλένιο), μαλονική διαλδεΐδη (MDA) και ισοπροστάνες. Πολλά από αυτά τα προϊόντα ή μεταβολικά παράγωγά τους είναι εξαιρετικά τοξικά και ευθύνονται για μεγάλο μέρος των βιοφυσικών και βιοχημικών διαταραχών που έπονται της υπεροξειδωσης των λιπιδίων.

4. Κλινική Σημασία Οξειδωτικού Στρες

Οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, τόσο ενδοκυτταρικά όσο και διακυτταρικά (Sen et al., 1996; Rimbach et al., 1999; Reid, 2001; Sen, 2001; Linnane et al., 2002). Για παράδειγμα, έχουν τη δυνατότητα τροποποίησης της δραστηριότητας πρωτεϊνών προκαλώντας το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Οι πρωτεΐνες στόχοι των ROS ανήκουν σε πολλές κατηγορίες όπως φωσφατάσες, MAP κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες ή μεθυλάσες ιστονών.



Εικόνα 5: Σηματοδοτική οδός του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) για την τροποποίηση της δράσης τυροσινικών κινασών και φωσφατασών.

Επίσης, οι ROS έχουν καίριο ρόλο σε ορισμένους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής (Finaud et al., 2006), ενώ σε περίπτωση τραύματος, τα αιμοπετάλια που βρίσκονται σε περιοχή που έχει υποστεί πληγή απελευθερώνουν ROS τα οποία αποτελούν σήμα για τη στρατολόγηση κι άλλων αιμοπεταλίων στην περιοχή καθώς και λευκοκυττάρων. Επιπλέον ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό, την αγγειογένεση και την απόπτωση. Υπάρχουν πολλά δεδομένα που συνηγορούν υπέρ της συμμετοχής των ROS στην απόπτωση. Πρώτον, η προσθήκη

ROS ή η στέρηση των αντιοξειδωτικών προκαλεί απόπτωση. Δεύτερον, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αναστέλλεται από τα ενδογενή ή τα εξωγενή αντιοξειδωτικά. Τρίτον, σε μερικές περιπτώσεις η απόπτωση συνδυάζεται με αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων των ROS. Πράγματι, πολλά από τα χημικά και φυσικά ερεθίσματα που προκαλούν απόπτωση φαίνεται ότι οφείλονται στο οξειδωτικό stress, που αυξάνει την συγκέντρωση των ROS στο κύτταρο, ενώ ορισμένοι προαποπτωτικοί παράγοντες, αν και δεν είναι ελεύθερες ρίζες, προκαλούν την παραγωγή ROS ή/και ελαττώνουν την ικανότητα του κυττάρου για αναγωγή. Χαρακτηριστικά, η μείωση των ενδοκυττάρων αντιοξειδωτικών, όπως της γλουταθειόνης (GSH), καθιστά το κύτταρο ευάλωτο στο οξειδωτικό stress και στην επαγόμενη από αυτό απόπτωση. Τα μιτοχόνδρια με τη σειρά τους, παίζουν καθοριστικό στη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, με βάση ένα μοντέλο που περιλαμβάνει τρία στάδια. Το πρώτο αφορά στην ενεργοποίηση των οδών μεταγωγής του σήματος και ρυθμίζεται από τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών BCL-2. Το δεύτερο αφορά στη διαταραχή της ομοιόστασης των μιτοχονδρίων και τη διαφυγή στο κυτταρόπλασμα πρωτεϊνών, οι οποίες θα ενεργοποιήσουν τις κασπάσες, ενώ συγχρόνως μεταβάλλεται η μιτοχονδριακή μεταφορά των ηλεκτρονίων, η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η παραγωγή ATP. Το τρίτο στάδιο αφορά στην ενεργοποίηση των κασπασών και των νουκλεασών, που προκαλούν τον κερματισμό του DNA.

Ο ρόλος όμως του οξειδωτικού stress έχει καταστεί πλέον αποδεκτός ακόμα και στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρυνσης της στεφανιαίας νόσου, της καρδιακής ανεπάρκειας, του σακχαρώδους διαβήτη, της αρτηριακής υπέρτασης, της νόσου Alzheimer, της νόσου του Parkinson, της παγκρεατίτιδας, του συνδρόμου ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος, της προεκλαμψίας, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και του συνδρόμου επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS) (Halliwell, 2001). Οι καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου, όπως το κάπνισμα, η υπερχοληστερολαιμία και η υπεργλυκαιμία, σχετίζονται με το οξειδωτικό stress (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007). Η φλεγμονή, η διεργασίες της γήρανσης και ορισμένες μορφές καρκίνου, όπως ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού και τη μεταστατική του ικανότητα έχουν αποδοθεί εν μέρει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Ειδικότερα, το καρκίνωμα των ηπατοκυττάρων σχετίζεται με τη χρόνια λοίμωξη από τους ιούς HBV και HCV ή την επίδραση της αφλατοξίνης. Στοιχεία λοιπόν, υποδεικνύουν την εμπλοκή του

οξειδωτικού στρες στην παθογένεια του καρκινώματος του ήπατος (Gulam and Haseeb, 2006).



Εικόνα 6: Ασθένειες προκαλούμενες από το οξειδωτικό στρες.

Ανάλογα, σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες ορισμένων φαρμάκων αποδίδονται στο οξειδωτικό stress (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007). Χαρακτηριστικά, κατά την έκθεση των κυττάρων σε αντικαρκινικά φάρμακα, δηλαδή σε συνθήκες στρες, το H_2O_2 προάγει την απόπτωση (Jabs, 1999) ενεργοποιώντας τις JNK και p38 (Benhar et al., 2001; Davis et al., 2001; Tobiume et al., 2001). Η μεταγωγή σήματος μέσω των JNK παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση που εξαρτάται από τα μιτοχόνδρια ή/και υποδοχείς (Tournier et al., 2000). Το H_2O_2 παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση που επάγεται από την πρωτεΐνη p53 (Polyak et al., 1997), πιθανώς μέσω φωσφορυλίωσής της από τις JNK και p38 (Fuchs et al., 1998; Sanchez-Prieto et al., 2000). Τέλος, μπορεί να δρα απευθείας στον αποπτωτικό μηχανισμό, προκαλώντας την εκπόλωση και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων (Jabs et al., 1999). Ωστόσο, υπάρχουν και δεδομένα που απουσία στρες, αποδίδουν στις JNK θετικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Shaulian et al., 2001). Πρόσφατα προτάθηκε ένα

μοντέλο για την εξήγηση των διαφορικών δράσεων των ROS ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους σε καρκινικά και φυσιολογικά κύτταρα, το οποίο εμπλέκει τις JNK και τον AP-1. Σύμφωνα με αυτό, τα επίπεδα των ενδογενών ROS στα φυσιολογικά κύτταρα είναι σχετικά χαμηλά. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων σε καρκινικά οδηγεί σε αύξηση των βασικών επιπέδων των ROS και ενίσχυση της δραστηριότητας των JNK. Αυτή η ενδιάμεση κατάσταση ευνοεί μιτογόνα σήματα μέσω του AP-1 ή/και άλλων μονοπατιών. Μικρή αύξηση στις ROS δύναται να προάγει περαιτέρω την αύξηση των κυττάρων, με τα φυσιολογικά κύτταρα να εμφανίζουν μεγαλύτερη δεκτικότητα λόγω χαμηλότερου κατωφλίου. Υψηλότερα όμως επίπεδα των ROS (όπως στην περίπτωση αντικαρκινικών φαρμάκων), οδηγούν σε περαιτέρω ενεργοποίηση των JNK και αποπτωτική απόκριση των κυττάρων (Benhar M et al., 2002).

Τέλος, η αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής και αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης (Reid, 2001; Linnane et al., 2002), ενώ η απόκριση στο stress, η οποία εκφράζεται με την επαγωγή των πρωτεϊνών του θερμικού shock (heat shock proteins, HSP), επάγεται ιδιαίτερα σε ασθενείς με σηπτική καταπληξία, τραύμα ή σύνδρομο οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας. Ανωμαλίες στην έκφραση των HSP έχουν παρατηρηθεί σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς.

Συμπερασματικά διακρίνεται πως, δεν είναι σαφές εάν αυτές οι κλινικές παρατηρήσεις υποδηλώνουν ειδικές ενδογενείς προσπάθειες κυτταρικής και ιστικής προστασίας ή μη ειδική απόκριση στο stress. Εντούτοις, δείχνουν ότι η κυτταρική απόκριση στο stress εκδηλώνεται κατά τη διάρκεια της νόσου και επομένως μπορεί να επηρεάσει ή να τροποποιήσει την πορεία της. Η συσχέτιση μιας νοσολογικής οντότητας με το οξειδωτικό stress προέρχεται από την παρατήρηση της ύπαρξης αυξημένης ποσότητας προϊόντων αντίδρασης ελευθέρων ριζών, ιδίως δεικτών υπεροξειδωσίας λιπιδίων, στα βιολογικά υγρά. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η υπεροξειδωσία αποτελεί δευτερογενές φαινόμενο και συνεπώς δεν υποδηλώνει άμεσο ρόλο του οξειδωτικού stress στη νόσο. Προκειμένου να αιτιολογηθεί ο πρωτογενής ρόλος του οξειδωτικού stress σε μια νόσο, πρέπει να υπάρχει ένας εύλογος μηχανισμός, σύμφωνα με τον οποίο να δικαιολογείται αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών ή μείωση των αντιοξειδωτικών εφεδρειών. Επιπλέον, το οξειδωτικό stress πρέπει να ανιχνεύεται πριν από την έναρξη της ιστικής βλάβης και η αύξηση

της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε πρώιμο στάδιο πρέπει να μπορεί να εμποδίσει ή να μειώσει την ιστική βλάβη. Σύμφωνα με τα ανωτέρω, ο πρωτογενής ρόλος του οξειδωτικού stress είναι σαφής στη διεργασία της καρκινογένεσης, αλλά αποτελεί αντικείμενο έρευνας για τις άλλες νοσολογικές οντότητες (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007).

5. Αντιοξειδωτική Άμυνα των Οργανισμών

Όπως έγινε σαφές από τα παραπάνω, οι ελεύθερες ρίζες είναι τοξικές για τους οργανισμούς και κυρίως για τους αερόβιους, οι οποίοι έρχονται σε άμεση επαφή με το O₂. Έτσι, η συνεχής έκθεση στις βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών τους οδήγησε στην ανάπτυξη μιας σειράς προστατευτικών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν σε προληπτικούς μηχανισμούς, σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης, σε φυσικά μέτρα προστασίας και σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Ειδικότερα, οι οργανισμοί που διαθέτουν δυνατότητα κίνησης μπορούν έμμεσα να αποφύγουν το οξειδωτικό στρες, αποφεύγοντας περιοχές υψηλής πίεσης O₂, όπως έχει παρατηρηθεί στα βακτήρια *Escherichia coli* και *Salmonella typhimurium* που διαθέτουν κατάλληλους αισθητήρες, ενώ στους πολυκύτταρους οργανισμούς έχουν αναπτυχθεί αποδοτικοί τρόποι μεταφοράς και τροφοδότησης των ιστών με οξυγόνο διατηρώντας όσο το δυνατόν τα επίπεδα του χαμηλά. Εκτός όμως από αυτούς, έχουν εξελιχθεί ειδικότεροι κυτταρικοί βιοχημικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας που αντισταθμίζουν άμεσα την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία, η οποία, όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων (Kaplan, M., et al., 2001). Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών, όπως προκύπτει από τον ορισμό, είναι η αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών, ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα αντιοξειδωτικά που διασπούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις και τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν τα μεταβατικά μέταλλα.

5.1 Αντιοξειδωτικά Ένζυμα

Πρόκειται για παράγοντες που καταλυτικά απομακρύνουν ελεύθερες ρίζες και δραστικές μη-ρίζες οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε παραγωγή ελευθέρων ριζών (προ-οξειδωτές). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ένζυμα όπως η δισμουτάση της ρίζας υπεροξειδίου, η καταλάση, οι υπεροξειδάσες και ένζυμα που ρυθμίζουν τη θειολική οξειδοαναγωγική κατάσταση (ΘΟΚ) του κυττάρου και έχουν στην πλειονότητα τους ως υπόστρωμα το μόριο της γλουταθειόνης για τα οποία θα γίνει λόγος στη συνέχεια.

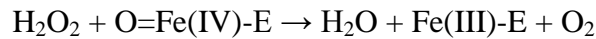
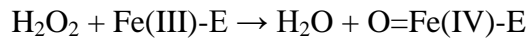
5.1.1. Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD).

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η οποία καταλύει τη μετατροπή ανιόντων υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ($2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ = \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$), αποτελεί ένα από τα πιο αποτελεσματικά ενδοκυττάρια ενζυμικά συστήματα. Αν και το ένζυμο αυτό απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1939, μόλις το 1969 οι McCord και Fridovich απέδειξαν την αντιοξειδωτική δράση της SOD. Η δισμουτάση του υπεροξειδίου απαντάτε σε αρκετές ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη φύση του μετάλλου του ενεργού κέντρου, τη σύνθεση των αμινοξέων, καθώς και τον αριθμό των υπομονάδων, τους συμπαραγόντες και άλλα χαρακτηριστικά. Στον άνθρωπο διακρίνονται τρεις μορφές SOD, η κυτταροπλασματική CuZnSOD, η μιτοχονδριακή MnSOD και η εξωκυττάρια SOD. Το $\text{O}_2^{\cdot-}$, λοιπόν που παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (MnSOD), ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD (CuSOD), η οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα.

Η CuZnSOD είναι ένα ένζυμο με μοριακό βάρος περίπου 32 kDa, το οποίο αποτελείται από δύο ταυτόσημες υπομονάδες. Φέρει στο ενεργό κέντρο ιόντα χαλκού και ψευδαργύρου και η ενζυμική της δραστηριότητα είναι σχετικά ανεξάρτητη από το pH στο εύρος 5–9,5. Εκτός από το κυτταρόπλασμα απαντά και στο διάμεσο χώρο των μιτοχονδρίων. Αντίθετα, η MnSOD είναι ένα ομοτετραμερές, με μοριακό βάρος 95 kDa, το οποίο περιέχει από ένα άτομο μαγγανίου στο ενεργό κέντρο κάθε υπομονάδας. Απαντά στη θεμέλια ουσία των μιτοχονδρίων, όπου και απομακρύνει τις ρίζες O_2^- που σχηματίζονται τόσο στη θεμέλια ουσία όσο και στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Τέλος η εξωκυττάρια SOD είναι μια τετραμερής γλυκοπρωτεΐνη, η οποία φέρει χαλκό και ψευδάργυρο στο ενεργό κέντρο και έχει υψηλή συγγένεια για ορισμένες γλυκοζαμινογλυκάνες, όπως η ηπαρίνη και η θειική ηπαράνη. Η ρύθμισή της στους ιστούς των θηλαστικών φαίνεται να διενεργείται από τις κυτταροκίνες και όχι από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου. Ένα νέο συνένζυμο SOD, το οποίο περιέχει νικέλιο στο ενεργό κέντρο (Ni-SOD), απομονώθηκε πρόσφατα στο *Streptomyces* και στα κυανοβακτήρια. Η Ni-SOD είναι μια μικρή πρωτεΐνη, που αποτελείται από 117 αμινοξέα και δεν εμφανίζει ομολογία με τις άλλες SOD.

5.1.2. Καταλάση.

Η καταλάση απαντάτε στα αερόβια βακτήρια, στους μύκητες, στα κύτταρα των φυτών και των ζώων. Εντοπίζεται στα υπεροξεισώματα αλλά και στα μιτοχόνδρια της καρδιάς, δεν ανευρίσκεται όμως στα μιτοχόνδρια των κυττάρων άλλων ιστών. Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες, άνω των 500 αμινοξέων, καθεμία από τις οποίες περιέχει και μία ομάδα αίμης στην ενεργό περιοχή τους. Επίσης, κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH, το οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου. Τα υπεροξειδιοσώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας H₂O₂ (Antunes et al., 2002), σε δύο στάδια. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει ένα εκατομμύριο μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου κάθε min.



(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεδεμένη στο ένζυμο).

Αναστέλλεται από αμινοτριαζόλη (Cohen and Somerson, 1967), αλλά και από GSH ή κυστεΐνη (Sun and Oberley, 1989). Η καταλάση των θηλαστικών έχει και δράση υπεροξειδάσης για ορισμένα υποστρώματα που μπορούν να προσεγγίσουν την αίμη.

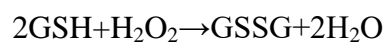
5.1.3. Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR).

Τόσο η ενζυμική (διά των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης) όσο και η μη ενζυμική αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών από την αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH) οδηγεί σε παραγωγή οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG). Η GSSG απομακρύνεται από το κύτταρο, με αποτέλεσμα μείωση της ολικής ενδοκυττάριας γλουταθειόνης. Προκειμένου η γλουταθειόνη να εκπληρώσει το ρόλο της ως αντιοξειδωτική ουσία, απαιτείται η διατήρηση υψηλής ενδοκυττάριας αναλογίας αναχθείσας (GSH) προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Αυτό επιτυγχάνεται με μια βιοχημική αντίδραση, η οποία εξαρτάται απόλυτα από τη NADPH. Η δραστηριότητα της GR μπορεί να αυξηθεί με δύο μηχανισμούς: Αύξηση των επιπέδων/δραστικότητας της GR ή αύξηση των επιπέδων NADPH.

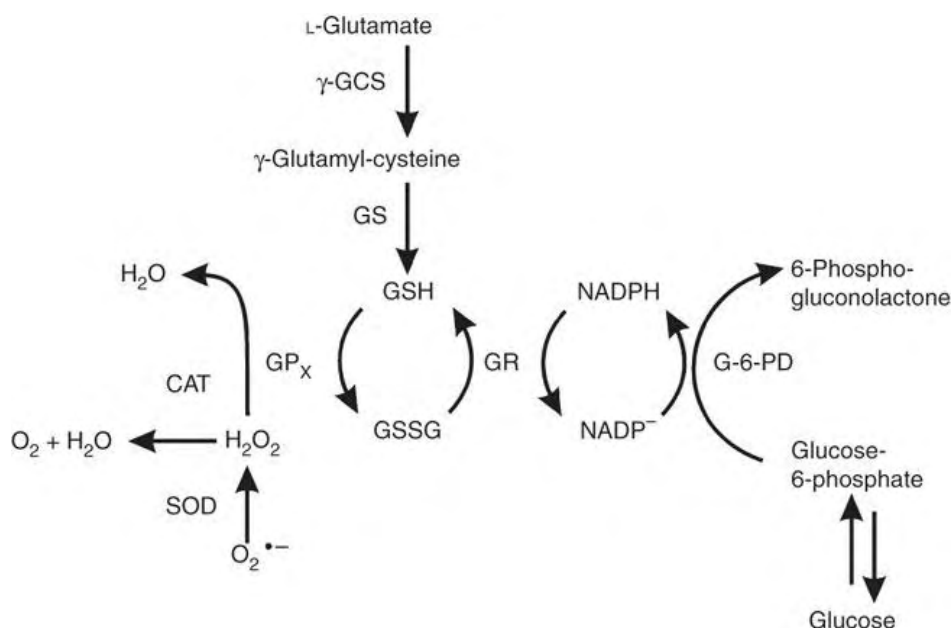


5.1.4. Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPxs).

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο και είναι άφθονο στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο. Η δραστηριότητα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης αναγνωρίστηκε από τον Mills το 1957 και αποδόθηκε το 1973 σε ένα σελινοένζυμο από τους Flohe et al και Rotruck et al. Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο μορφές του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης: η μία μορφή εξαρτάται από το σελήνιο GPxs, ενώ η άλλη είναι ανεξάρτητη του σεληνίου (glutathione S-transferase GST). Αυτές οι δύο μορφές διαφέρουν ως προς τον αριθμό των υπομονάδων, τη φύση του δεσμού με το σελήνιο στο ενεργό κέντρο, καθώς και ως προς τους μηχανισμούς κατάλυσης. Σήμερα είναι πλέον γνωστές τέσσερις διαφορετικές GPxs (GPxs1-4) στα θηλαστικά, φέρουν όλες στην ενεργό θέση κυστεΐνη συνδεδεμένη με σελήνιο και συνεπώς η δράση τους εξαρτάται από την επάρκεια της τροφής σε σελήνιο. Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης καταλύουν την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου ή των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων, χρησιμοποιώντας ως αναγωγική ουσία τη γλουταθειόνη.



Αν και η αναγωγή του H_2O_2 γίνεται και από την καταλάση, τα σχετικά επίπεδα GPxs και καταλάσης διαφέρουν από ιστό σε ιστό. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο εγκέφαλος έχει πολύ χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας καταλάσης και υψηλά επίπεδα δραστηριότητας GPxs, ενώ το ήπαρ έχει υψηλά επίπεδα και των δύο ενζύμων.



Εικόνα 7: Απεικόνιση δράσης των GR, GPx, SOD, CAT

5.1.5. Υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης και αναγωγή της θειορεδοξίνης.

Η υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης ανάγει τόσο το H_2O_2 όσο και τα αλκυλδροϋπεροξειδία σε συνδυασμό με την αναγωγή της θειορεδοξίνης, τη θειορεδοξίνη και τη NADPH.

5.1.6. Συνένζυμο Q.

Αποτελεί πηγή O_2^- όταν είναι μερικώς αναχθέν υπό τη μορφή της ημικινόνης, ενώ έχει αντιοξειδωτική δράση όταν έχει αναχθεί πλήρως.

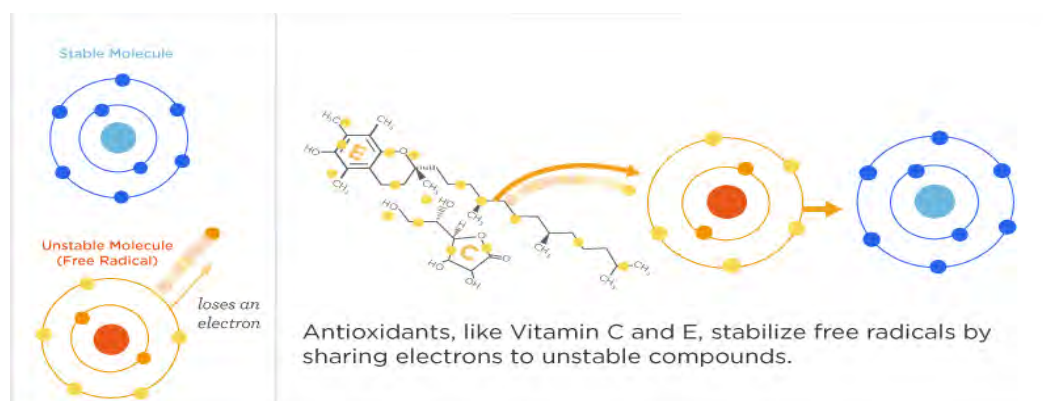
5.1.7. Ένζυμα της οδού της φωσφορικής πεντόζης.

Καταλύουν τις βιοχημικές αντιδράσεις της μεταβολικής οδού της φωσφορικής πεντόζης, η οποία αποτελεί την κύρια ενδοκυττάρια πηγή της NADPH.

5.2 Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

Όταν μια δραστική ρίζα αντιδρά με ένα μόριο παράγονται δευτερογενείς ρίζες, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλους στόχους προς παραγωγή ακόμη περισσότερων ριζών. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσής των λιπιδίων, η οποία συνεχίζεται έως ότου δύο ρίζες ενωθούν προς σταθερό προϊόν ή εξουδετερωθούν από τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.

Τα λιποδιαλυτά και τα υδατοδιαλυτά μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά που διακόπτουν την αλυσιδωτή αντίδραση είναι μικρά μόρια, π.χ. γλουταθειόνη, βιταμίνη E, που μπορούν να λάβουν ηλεκτρόνιο από μια ρίζα ή να δώσουν ηλεκτρόνιο προς σχηματισμό σταθερών παραπροϊόντων. Η αντίδραση οδηγεί σε οξείδωση του αντιοξειδωτικού, το οποίο πρέπει να αναγεννηθεί ή να αντικατασταθεί. Εξ ορισμού, η αντιοξειδωτική ρίζα είναι σχετικά αδρανής και δεν μπορεί να αντιδράσει με άλλα μόρια.



Εικόνα 8: Απεικόνιση της δράσης των Αντιοξειδωτικών .

5.2.1. Γλουταθειόνη.

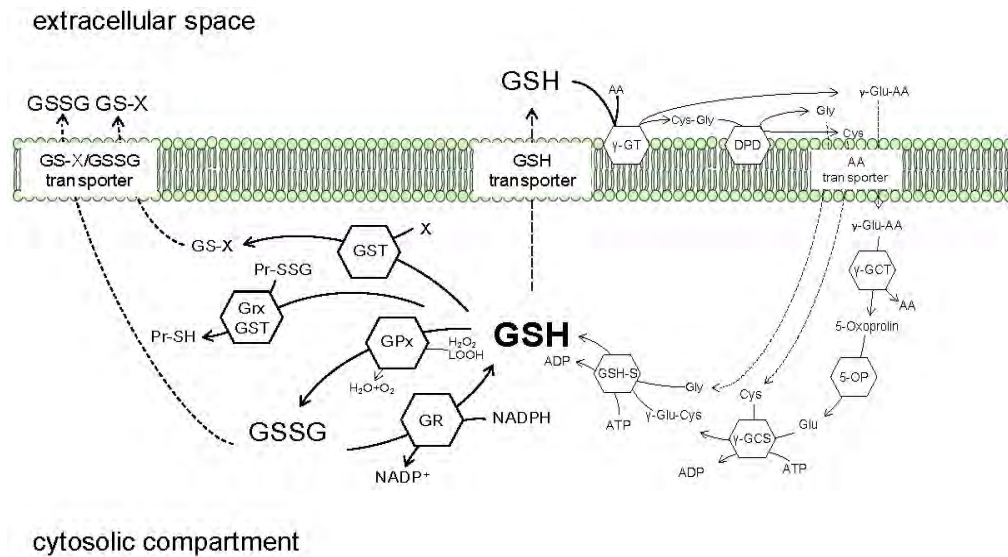
Η ιστορία της γλουταθειόνης αρχίζει το 1888, όταν ο de Ray Pailhand ανακάλυψε την ουσία “hydrogenant de soufflé”, η οποία είχε την ιδιότητα να ανάγει το στοιχειακό θείο, και την οποία ονόμασε “philothion”. Αργότερα, η ουσία αυτή απομονώθηκε από το χημικό Hopkins και ονομάστηκε γλουταθειόνη. Τέλος, η ανακάλυψη της γλουταθειονυλοσπερμιδίνης από τους Tabor το 1975 και της τρυπανοθειόνης από τους Fairlamb et al το 1985 αποτέλεσε την αρχή των μελετών για τις αντιοξειδωτικές δράσεις της γλουταθειόνης.

Η γλουταθειόνη, ένα τριπεπτίδιο με αναγωγικές και νουκλεόφιλες ιδιότητες, αποτελεί την κύρια αντιοξειδωτική θειόλη και τον κύριο ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Αποτελείται από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη και περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα. Η σουλφυδρυλική κυστεΐνη λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων και είναι υπεύθυνη για τη βιολογική δραστηριότητα της γλουταθειόνης. Η κυστεΐνη είναι περιοριστικός παράγοντας στην κυτταρική σύνθεση της γλουταθειόνης, δεδομένου ότι αυτό το αμινοξύ είναι σχετικά σπάνιο στα τρόφιμα. Ωστόσο, σε ελεύθερη μορφή, η κυστεΐνη είναι τοξική και καταβολίζεται στο γαστρεντερικό σωλήνα και στο πλάσμα αίματος. Η γλουταθειόνη είναι ένα υδατοδιαλυτό μόριο, το οποίο συντίθεται στο ήπαρ και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρεται στους ιστούς. Απαντά είτε ως αναχθείσα (GSH) είτε ως οξειδωμένη (GSSG) μορφή και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αναστρέψιμης οξείδωσης της ενεργού θειόλης της. Ο λόγος GSH/ GSSG αποτελεί αξιόπιστο μέτρο του οξειδωτικού stress ενός οργανισμού. Σε κύτταρα που δεν έχουν υποβληθεί σε stress, το μεγαλύτερο μέρος (99%) αυτού του οξειδοαναγωγικού ρυθμιστή βρίσκεται σε αναχθείσα μορφή. Η γλουταθειόνη συντίθεται σε κυτταρικό επίπεδο στο κυτταρόπλασμα από αμινοξέα σε δύο διαδοχικά βήματα, που καταλύονται από τα ένζυμα συνθετάση του διπεπτιδίου γ-γλουταμυλ-κυστεΐνη και συνθετάση της γλουταθειόνης. Η σύνθεσή της ελέγχεται από επανατροφοδοτική αναστολή (feedback) των ενζύμων που την συνθέτουν. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της γλουταθειόνης κυμαίνεται ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και απαντά σε αφθονία στο κυτταρόπλασμα (0,5–11 mM), στον πυρήνα (3–15 mM) και στα μιτοχόνδρια (5–11 mM), όπου αποτελεί και την κύρια διαλυτή αντιοξειδωτική ουσία. Στον πυρήνα, η γλουταθειόνη διατηρεί την οξειδοαναγωγική

κατάσταση των πρωτεϊνών που φέρουν σουλφυδρυλικές ομάδες και είναι απαραίτητες για την επιδιόρθωση και την έκφραση του DNA.

In vitro η GSH αντιδρά άμεσα και εξουδετερώνει τη ρίζα υδροξυλίου, το υποχλωριώδες οξύ, το υπεροξυνιτρώδες (peroxynitrite), υπεροξυλικές και αλκοξυλικές ρίζες, ελεύθερες ρίζες με κέντρο το άτομο του άνθρακα και το μονήρες οξυγόνο (Halliwell and Gutteridge, 1999). Επίσης ανάγει άμεσα το οξειδωμένο ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) ή μέσω της αναγωγάσης του διϋδροασκορβικού (May, Qu and Neel, 2003). Επιπλέον, υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι συμμετέχει στην ανακύκλωση της βιταμίνης E σε ορισμένα μεμβρανικά συστήματα (Halliwell and Gutteridge, 1999). Γενικά, εμποδίζει την οξείδωση των -SH ομάδων στις πρωτεΐνες, ενώ έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την καταλάση (Sun and Oberley, 1989) και εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως στη μεταγωγή κυτταρικών σημάτων, στην έκφραση γονιδίων και στην απόπτωση (Sies, 1999). Σε πολλές περιπτώσεις έχει βρεθεί ότι η έκφραση γονιδίων βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο της θειολικής οξειδοαναγωγικής κατάστασης (ΘΟΚ) (Sies, 1999). Μερικά παραδείγματα μεταγραφικών παραγόντων η λειτουργία των οποίων επηρεάζεται από τη ΘΟΚ λόγω της παρουσίας κυστεϊνών στο μόριο τους είναι οι παράγοντες NF-κB, AP-1, HSF-1, p53, NF-1, USF, E2F, IIC, κU, Egr-1, vETS, Sp1, PB2/CBF, που μπορεί να χάσουν την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, καθώς επίσης έχει βρεθεί ότι επηρεάζονται και οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών και των οιστρογόνων (Sies, 1999). Εκτός όμως από τα παραπάνω, η γλουταθειόνη, σχηματίζοντας S-νιτρωδογλουταθειόνη (S-nitrosoglutathione, GSNO), χρησιμεύει ως αποθήκη και μεταφορέας NO και εμπλέκεται επίσης στη μεταφορά του χαλκού στο εσωτερικό του κυττάρου καθώς τον δεσμεύει και εμποδίζει ταυτόχρονα την αντίδρασή του με ελεύθερες ρίζες.

Τα επίπεδα γλουταθειόνης στο αίμα ελαττώνονται κατά 17% από την ηλικία των σαράντα μέχρι την ηλικία των εξήντα. Σε χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης υπάρχει 33% μεγαλύτερος κίνδυνος για χρόνια νοσήματα. Στα χρόνια νοσήματα το 77% των ασθενών έχουν ανεπάρκεια γλουταθειόνης. Η κατανάλωση λίπους αυξάνει τις ανάγκες του οργανισμού για γλουταθειόνη.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος της γλουταθειόνης (GSH). Η ομοίωση της GSH, περιλαμβάνει ενδοκυτταρικούς και εξωκυτταρικούς μηχανισμούς. Τα συζυγή γλουταθειόνης (GS-X) και η GSSG, μεταφέρονται έξω από το κύτταρο μέσω GS-X / GSSG αντλιών. Η NADPH-εξαρτώμενη GSH αναγωγή (GR) είναι υπεύθυνη για την ενδοκυτταρική ανακύκλωση της GSH, ενώ η εξωκυτταρική GSH διαδοχικά υδρολύεται από τη γ -γλουταμυλο τρυσπεπτιδάση (γ -GT) και τη διπεπτιδάση (DPD), για την ανακύκλωση των αμινοξέων γλυκίνη, κυστεΐνη και γλουταμινικό για την σύνθεση της GSH.

Η αύξηση της γλουταθειόνης με χορήγηση πρόδρομων ουσιών για τη βιοσύνθεση της ή η ενδοφλέβια χορήγηση γλουταθειόνης είναι στρατηγικές που αναπτύχθηκαν για την αντιμετώπιση καταστάσεων όπως ανεπάρκεια του τριπεπτιδίου, υψηλό οξειδωτικό στρες και ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος.

5.2.2. Θειοαναγωγάσες TRX.

Οι θειοαναγωγάσες είναι μικρές, πλειοτρόπες σουλφυδρυλικές πρωτεΐνες με δραστηριότητα οξειδοαναγωγής. Στον άνθρωπο έχουν αναγνωριστεί τρία γονίδια θειρορεδοξίνης (TRX1, TRX2 και sp TRX, η οποία παρουσιάζει υψηλή έκφραση στα σπερματοζώαρια). Οι TRX όλων των οργανισμών διαθέτουν ένα εξελικτικά συντηρητικό ενεργό κέντρο, το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα Cys-Gly-Pro-Cys. Ειδικοί πρωτεϊνικοί δισουλφιδικοί στόχοι αναγωγής από την ομάδα των TRX είναι πρωτεΐνες όπως η ριβονουκλεοτιδική αναγωγή, η δισουλφιδική ισομεράση και αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των p53, NF- κ B και AP-1. Επιπλέον, οι TRX αποτελούν δότες ηλεκτρονίων για πολλές υπεροξειδοαναγωγάσες, ιδιαίτερα σημαντικές για την αναγωγή των υπεροξειδίων, ενώ μπορεί άμεσα να ανάγει μερικές δραστικές ρίζες οξυγόνου καθώς και να αναδιπλώσει οξειδωμένες πρωτεΐνες. Επίσης, επάγει αυτοκρινείς δράσεις ανάλογες με εκείνες των αυξητικών παραγόντων και των κυτταροκινών.

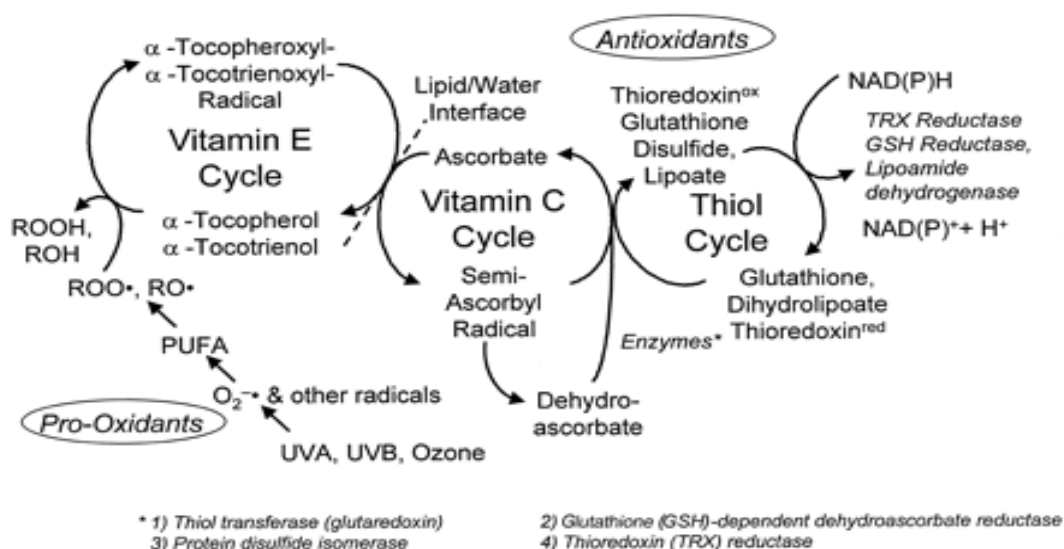
5.2.3. Βιταμίνη C.

Η βιταμίνη C ή αλλιώς, ασκορβικό οξύ, είναι υδατοδιαλυτή και ο κύριος ρόλος της είναι η συμμετοχή στη σύνθεση του κολλαγόνου, καθώς αποτελεί ένα συμπαράγοντα ή συνένζυμο οχτώ ενζυμικών αντιδράσεων που συμβαίνουν στον οργανισμό. Πέρα, λοιπόν από τη βιοσύνθεση του κολλαγόνου, φαίνεται να συμβάλει στη σύνθεση της καρτινίνης, το μεταβολισμό της τυροσίνης καθώς στη σύνθεση ορμονών και την απελευθέρωσή τους από τα επινεφρίδια. Ανήκει στα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά και φαίνεται να βρίσκεται στη πρώτη γραμμή άμυνας κατά των οξειδωτικών βλαβών (Suvana Kimnrite Wattanapitayakul, 2001). Η αναγωγική μορφή της βιταμίνης C είναι ένα σακχαρικό οξύ και κατατάσσεται στους μονοσακχαρίτες και έχει τη δυνατότητα να μπορεί να ανάγει το σουπεροξειδίο, τις υδροξυλικές ρίζες, το υποχλωριώδες οξύ καθώς και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου μέσα και έξω από τα κύτταρα. Το ασκορβικό οξύ μπορεί να ανάγει τόσο το Fe^{3+} σε Fe^{2+} όσο και το Cu^{2+} . Έτσι, μίγμα σιδήρου ή χαλκού με ασκορβικό οξύ προάγει *in vitro* την παραγωγή ελευθέρων ριζών και μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια. Η συγκεκριμένη προ-οξειδωτική δράση, που εμφανίζει το ασκορβικό οξύ *in vitro* έχει μεγάλη σημασία επειδή σχετίζεται με την περιεκτικότητα του ασκορβικού στα τρόφιμα, με αποτέλεσμα σε υψηλές συγκεντρώσεις να παρουσιάζει τοξική δράση και η περίσσεια αποβάλλεται μέσω των ούρων (Suvana Kimnrite Wattanapitayakul, 2001). Αντίθετα, στο κυτόπλασμα το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειονίνη παρουσιάζουν συνεργό δράση για να προστατέψουν το κύτταρο από οξειδωτικές βλάβες, ενώ εκτός του κυττάρου, το ασκορβικό οξύ πιθανώς να δρα σε σύζευξη με τη βιταμίνη E, όπως θα αναφερθεί παρακάτω, η οποία βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να τις προστατεύει από τη λιπιδική υπεροξείδωση, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες.

5.2.4. Βιταμίνη E.

Η βιταμίνη E είναι λιποδιαλυτή και απαντά σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Η α-τοκοφερόλη είναι η πλέον δραστική μορφή της βιταμίνης E στους ανθρώπους και αποτελεί ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Η κύρια αντιοξειδωτική της δράση αφορά στην προστασία κατά της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Φαίνεται ότι το ασκορβικό οξύ και η βιταμίνη E λειτουργούν μαζί ως αντιοξειδωτικές ουσίες σε μια κυκλικού τύπου αντίδραση. Πιο συγκεκριμένα η βιταμίνη E, δεν δρα απομονωμένη από τα άλλα αντιοξειδωτικά αλλά αποτελεί μέρος ενός συνόλου οξειδοαναγωγικών κύκλων, αντιοξειδωτικών που ονομάζεται ‘αντιοξειδωτικό δίκτυο’. Η βιταμίνη C μπορεί να

συμβάλλει στην αναγέννηση της βιταμίνης E άμεσα, ενώ τα αντιοξειδωτικά θειόλης όπως η γλουταθειόνη και το λιποϊκό οξύ μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην αναγέννησή της έμμεσα μέσω της βιταμίνης C, ώστε από την οξειδωμένη της μορφή να μετατραπεί στην ανηγμένη. Τα συστήματα αυτά δρουν συνεργικά για τη σταθερή διατήρηση της συγκέντρωσης σε χαμηλά επίπεδα των ριζών της βιταμίνης E, αλλά και για να περιοριστεί η κατανάλωση ή η απώλεια της. Η βιταμίνη E, συνεπώς που βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες τις προστατεύει από τη λιπιδική υπεροξείδωση, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες. Στις μεμβράνες η φαινολική υδροξυλική ομάδα της βιταμίνης E βρίσκεται μεταξύ της μεμβράνης και της υδατικής φάσης, όπως συμβαίνει και με τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων. Με ανάλογο τρόπο η βιταμίνη E προστατεύει και τις LDL από τη λιπιδική υπεροξείδωση και έτσι συμβάλλει στην πρόληψη του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών (Παπαγεωργίου 2005).



Εικόνα 10: Το “αντιοξειδωτικό δίκτυο” και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της βιταμίνης C, της βιταμίνης E και των οξειδοαναγωγικών κύκλων θειόλης (Packer, 2001).

5.2.5. Μεταλλοθειονίνες.

Φαίνεται ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στα ιόντα μετάλλων και στην αντίσταση στο οξειδωτικό stress. Αυτή η συσχέτιση ερμηνεύεται βιολογικά με βάση το ρόλο των ιόντων μετάλλων, ιδίως του Cu^{2+} και του Zn^{2+} , στην παραγωγή οξειδωτικών ουσιών. Οι μεταλλοθειονίνες είναι μια ομάδα μικρών πρωτεϊνών, πλούσιων σε κυστεΐνη, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να συνδέουν διαφορετικά ιόντα

μετάλλων. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ιδιαίτερη σημασία στην αντιμετώπιση της τοξικότητας των μετάλλων, όπως ο Cu.

5.2.6. Καροτενοειδή.

Πρόκειται για χρωστικές, που απαντούν στα φυτά και σε μικροοργανισμούς, αλλά δεν συντίθενται από τα ζώα. Ευθύνονται για το ερυθρό, το κίτρινο και το πορτοκαλί χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Στη φύση απαντούν περίπου 600 καροτενοειδή και ταξινομούνται στα καροτένια, τα ξανθόφιλα (περιέχουν οξυγόνο) και το λυκοπένιο. Η β-καροτίνη είναι λιποδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες και μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη Α. Πιστεύεται ακόμα, ότι και αυτή μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και το σελήνιο (Halliwell & Gutteridge, 1998).

5.2.7. Μέταλλα, όπως το σελήνιο, ο χαλκός, ο ψευδάργυρος.

6. Πολυφαινόλες

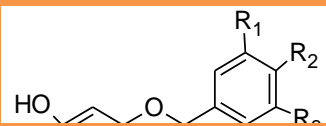
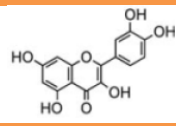
Οι φαινολικές ενώσεις, είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών που εντοπίζονται κυρίως σε βότανα και φρούτα όπως τα μούρα, τα μήλα, τα εσπεριδοειδή, το κακάο, τα σταφύλια, τα λαχανικά όπως τα κρεμμύδια, ελιές, ντομάτες, μπρόκολο, μαρούλι, σόγια, δημητριακά και σιτηρά, το πράσινο και μαύρο τσάι και κόκκους καφέ (Brit et al., 2001, Clifford, 1999, Hertog et al., 1993, Kris-Etherton et al., 2002, Rencher et al., 2001, Rice-Evans et al., 2000, Robak και Gryglewski, 1996 και Ross και Kasum, 2002). Πολλές από αυτές τις φαινολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για το ελκυστικό χρώμα των φύλλων, των φρούτων, των λουλουδιών (Hermann, 1993) και για αρκετές επιπτώσεις στους φυτικούς ιστούς όπως είναι η καταστολή αυξητικών ορμονών, η προστασία από την UV ακτινοβολία και από τη σήψη, την η πρόληψη μικροβιακών μολύνσεων και τη συμμετοχή σε διαδικασίες ανάπτυξης (Huber., B., et al., 2003). Περιλαμβάνουν περίπου 8000 φυσικώς ενυπάρχουσες ενώσεις, με όλες τους να διαθέτουν ένα κοινό δομικό χαρακτηριστικό, μία φαινόλη (έναν αρωματικό δακτύλιο που φέρει τουλάχιστον έναν υποκαταστάτη υδροξύλιο). Με περαιτέρω ταξινόμησή τους, σύμφωνα με τη δομή τους, κατατάσσονται σε πολυφαινόλες και απλές φαινόλες, ανάλογα με τον αριθμό των υπομονάδων φαινόλης. Οι απλές φαινόλες περιλαμβάνουν τα φαινολικά οξέα (Robbins, 2003). Οι πολυφαινόλες που έχουν τουλάχιστον δύο υπομονάδες φαινόλης περιλαμβάνουν τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια, και εκείνες οι ενώσεις που έχουν τρεις ή περισσότερες υπομονάδες φαινόλης αναφέρονται ως οι τανίνες (King & Young, 1999).

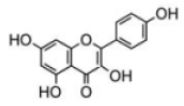
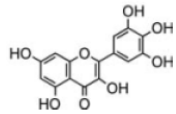
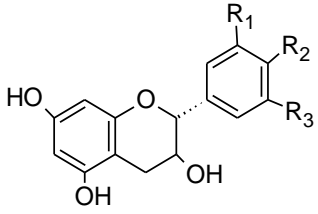
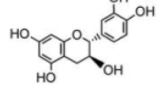
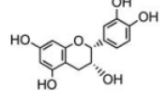
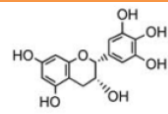
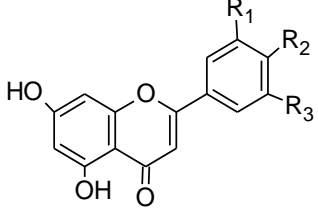
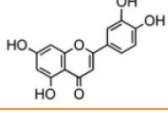
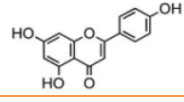
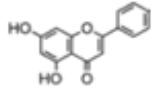
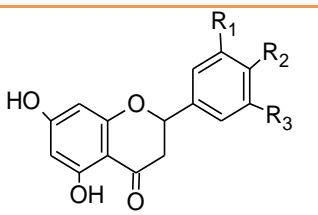
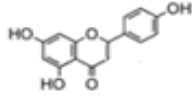
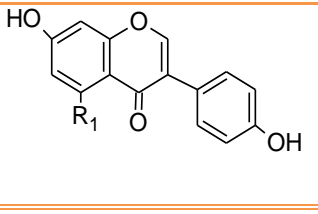
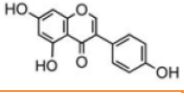
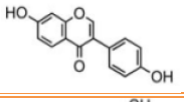
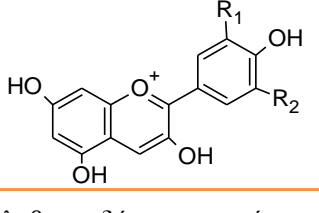
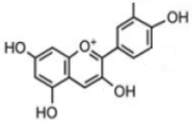
Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν προσελκύσει το παγκόσμιο ενδιαφέρον μετά την ανακάλυψη του λεγόμενου «γαλλικού παράδοξου», δηλαδή την παρατήρηση ότι, ακόμα και αν οι Γάλλοι έχουν την τάση καπνίσματος και μια διατροφή πλούσια σε λιπαρά, παρουσιάζουν πολύ μειωμένους συντελεστές στεφανιαίας νόσου σε σύγκριση με τις βόρειες ευρωπαϊκές χώρες, όπως το Ηνωμένο Βασίλειο και τη Γερμανία (Renaud & de Lorgeril, 1992). Η πιο δημοφιλής εξήγηση που έχει επικρατήσει, σχετίζεται με την υψηλή ημερήσια κατανάλωση των ερυθρών οίνων πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις, από το γαλλικό πληθυσμό, όπου κατά κάποιο τρόπο τους προστατεύει από τις καρδιακές παθήσεις (Frankel et al., 1993 και Hertog et al., 1993).

7. Κατηγορίες Φυτικών Πολυφαινολών

7.1 Φλαβονοειδή.

Είναι η καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών, περιλαμβάνει περισσότερες από 5000 ενώσεις και χωρίζεται σε 13 υποκατηγορίες. Συγκεκριμένα, είναι μια μεγάλη κατηγορία οργανικών ενώσεων που μπορεί να υπάρχουν είτε ως μονομερή είτε πολυμερίζονται αντιδρώντας με άλλα φλαβονοειδή, με σάκχαρα, όπως η D-γλυκόζη, η L-ραμνόζη, η γαλακτόζη, η αραβινόζη και η λιγνίνη και να σχηματίζουν γλυκοσυλιωμένες μορφές (Lea et al., 1979; Soleas et al., 1997; Ferguson 2001; Cooke and Samman 1996), με μη φλαβονοειδή ή με συνδυασμούς αυτών των ενώσεων. Χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου που περιέχει οξυγόνο. Τα φλαβονοειδή περιέχονται σε σχεδόν όλα τα τρόφιμα και ποτά φυτικής προέλευσης. Ο ρόλος των ενώσεων αυτών, έχει χαρακτήρα προστατευτικό ενάντια των βλαβών που προκαλούνται στα κύτταρα από τη δράση των ελευθέρων ριζών. Ειδικότερα, φαίνεται να συμβάλλουν στη χαμηλή συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, χωρίς βέβαια σε κάθε περίπτωση η δράση τους να είναι αμιγώς αντιοξειδωτική αλλά να παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση. Αυτό το φαινόμενο εξηγείται με βάση την *in vivo* τοξικότητα ορισμένων φλαβονοειδών. Ακόμα και σε αυτή τη περίπτωση, η δράση τους μπορεί να είναι ωφέλιμη, δεδομένου ότι μια ήπιου βαθμού αύξηση του οξειδωτικού στρες θα ενεργοποιήσει ταυτόχρονα και την αύξηση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού (D. Procházková a 2011). Τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε έξι (6) κατηγορίες τις φλαβονόλες (όπως η κερκετίνη, ρουτίνη, καμπφερόλη και μυρικετίνη), τις φλαβόνες (όπως η απιγενίνη και η λουτεολίνη), τις ισοφλαβόνες (όπως η γενιστεΐνη και δαϊντζεΐνη), τις φλαβανόνες (όπως η ναριγενίνη και εσπεριτίνη), τις ανθοκυανιδίνες (όπως η κυανιδίνη, δελφινιδίνη και μαλβιδίνη) και τις φλαβανόλες (όπως η κατεχίνη, επικατεχίνη και γαλλοκατεχίνη).

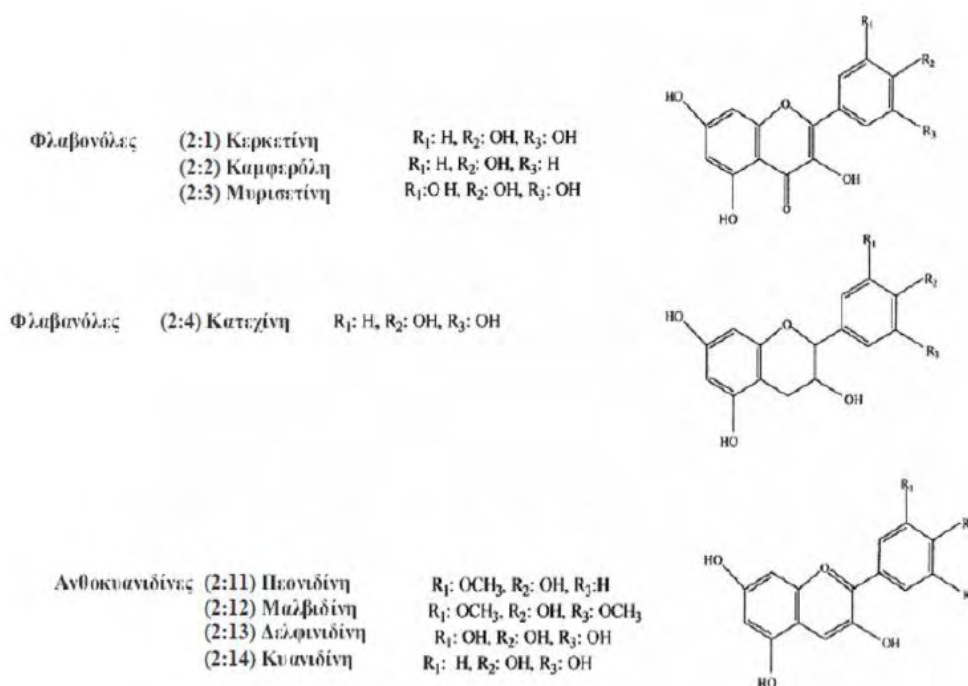
Τάξη των φλαβονοειδών	Γενική χημική δομή R1,2,3: -OH ή -H	Χαρακτηριστικά φλαβονοειδή
Φλαβονόλες		Κερκετίνη 

		Καιμπφερόλη	
		Μυρικετίνη	
Φλαβανόλες		(+)-Κατεχίνη	
		(-)-Επικατεχίνη	
		Επιγαλλοκατεχίνη	
Φλαβόνες		Λουτεολίνη	
		Απιγενίνη	
		Χρυσίνη	
Φλαβανόνες		Ναριγενίνη	
Ισοφλαβόνες		Γενιστεΐνη	
		Ντετζεΐνη	
Ανθοκυανιδίνες		Κυανιδίνη	

Πίνακας 5: Γενική χημική δομή φλαβονοειδών και των κύριων ενώσεων που ανήκουν σε αυτές.

Τα φλαβονοειδή που συναντώνται στα σταφύλια είναι κυρίως οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες (κατεχίνες), οι ανθοκυανίνες και οι φλαβαν-3,4-διόλες (λευκοανθοκυανίνες) που είναι παράγωγα των ανθοκυανινών. Οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στη φλούδα ενώ οι κατεχίνες και οι λευκοανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στα σπέρματα και στο μίσχο των σταφυλιών.

Στις ανθοκυανίνες οφείλεται ο χρωματισμός των ανθέων και των καρπών. Οι προκυανιδίνες υπάρχουν κυρίως ως διμερή στα σταφύλια ενώ στο κρασί πολυμερίζονται επιπλέον και σχηματίζουν τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι πολυμερείς αυτές ενώσεις σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες της σιέλου, στα οποία οφείλεται η στυπτικότητα στη γεύση των σταφυλιών και του κρασιού.

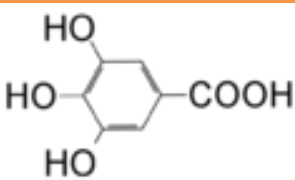
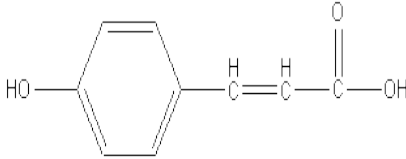
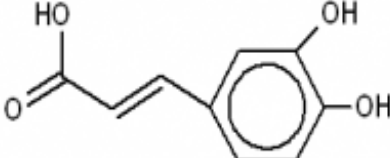
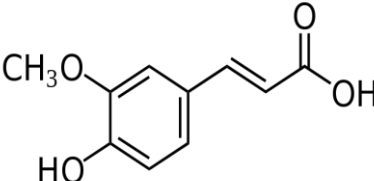


Εικόνα 11: Κυριότερες ομάδες φλαβονοειδών που εντοπίζονται στα σταφύλια και τους οίνους (Monagas M., 2005).

7.2 Πολυφαινολικά Οξέα.

Είναι η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή και περιλαμβάνει τα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκινναμικού οξέος. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (όπως το γαλλικό οξύ και το πρωτοκατεχοϊκό οξύ) βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που μπορούν να καταναλωθούν από τον άνθρωπο με την εξαίρεση ορισμένων φυτών (π.χ. τσάι), ενώ αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες ταννίνες (Clifford και Scalbert 2000). Τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά, και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φεουλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Συνήθως τα υδροξυκινναμικά οξέα γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουνικό οξύ,

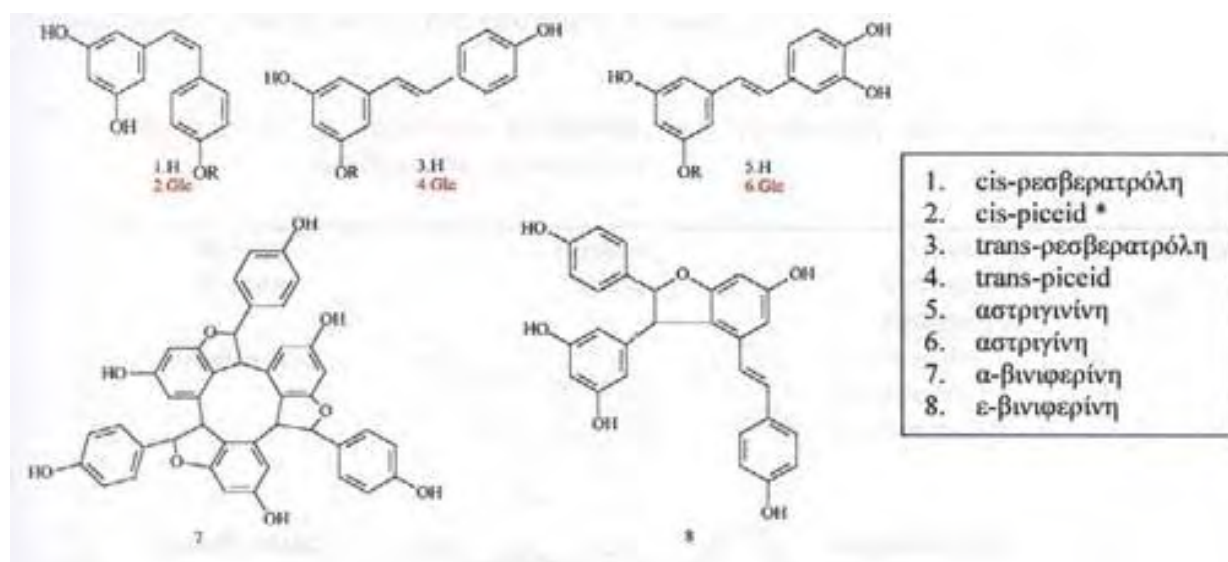
το σικιμικό οξύ και το ταρταρικό οξύ. Τα πολυφαινολικά οξέα εντοπίζονται στα σταφύλια είτε σαν ετεροζίτες είτε σαν εστέρες. Στην διάρκεια της οινοποίησης και την συντήρησης των οίνων λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της μια βραδείας υδρόλυσης γιατί στους οίνους, αν και συνεχίζουν να εντοπίζονται με τις παραπάνω μορφές τα συναντάμε και ελεύθερα. Συγκεκριμένα, τα κινναμωνικά οξέα, βρίσκονται στους οίνους συνδεδεμένα με τις ανθοκυάνες και το τρυγικό οξύ με τα οποία παράγονται οξέα ρ-κουμαρυλοτρυγικό καφεύλοτρυγικό και φερουλυτρυγικό. Τα πολυφαινολικά οξέα είναι αντισηπτικά, συντηρητικά ενώ διακρίνονται και για την αντιμικροβιακή τους δράση. Βέβαια στις ποσότητες που υπάρχουν στα σταφύλια, δεν γίνεται να γίνει παραδεχτό πως επεμβαίνουν στην οινοποιητική τεχνική, ωστόσο συγκαταλέγονται στους παρεμποδιστές της ανάπτυξης των βακτηρίων και ερμηνεύουν μερικώς τις δυσκολίες εκδήλωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης γιατί τα βακτήρια, που έχουν ενζυμικό εξοπλισμό λιγότερο πλήρη σε σύγκριση με τις ζύμες, είναι ευαίσθητα σε μικρότερες δόσεις αντισηπτικών και αντιβιοτικών (Βράκας, 2012).

Πολυφαινολικά Οξέα	Συστηματική Ονομασία	Χημική Δομή	Μοριακός Τύπος
Γαλλικό Οξύ	3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ		$C_7H_6O_5$
Κουμαρικό Οξύ	3 - (4 -υδροξυφαινυλο) -2 ακρυλικό		$C_9H_8O_3$
Καφεϊκό οξύ	3 - (3,4-διυδροξυφαινυλ)-2-προπενοϊκό οξύ		$C_9H_8O_4$
Φερουλικό οξύ	4 - υδροξυ-3 - μεθοξυ-κινναμικό οξύ		$C_{10}H_{10}O_4$

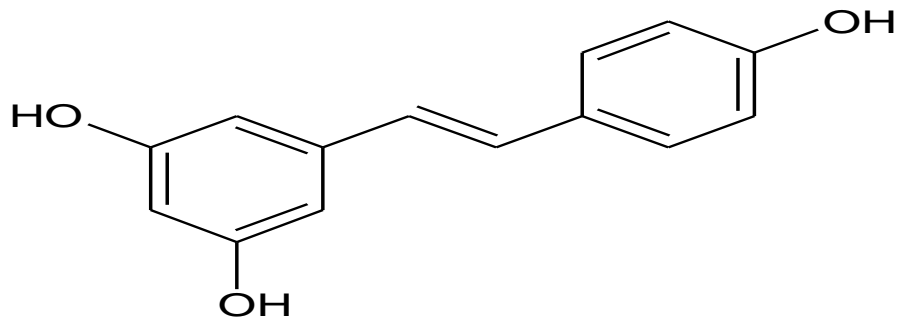
Πίνακας 6: Ορισμένα από τα κύρια παράγωγα υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκινναμικού οξέος που ανήκουν στα πολυφαινολικά οξέα.

7.3 Στιλβένια.

Τα στιλβένια τα συναντάμε σε έναν αρκετά μεγάλο αριθμό φυτών μεταξύ των οποίων και το *Vitis vinifera* που είναι το πιο σημαντικό είδος για παραγωγή σταφυλιών και οίνων. Τα στιλβένια βρίσκονται στο αμπέλι και είναι δομικά συστατικά στα ξύλινα μέρη όπως οι ρίζες οι κληματόβεργες και οι βλαστοί αλλά και ως ουσίες, στα φύλλα και τον καρπό, που δρουν σαν φυτοαλεξίνες (βακτηριοστατικά) στους μηχανισμούς αντίστασης του σταφυλιού ενάντια συγκεκριμένων παθογεννέσεων (Bavaresco et al 1999). Στα στιλβένια ανήκει η αστριγγίνη, η πικεΐδη αλλά και η ρεσβερατρόλη, το σημαντικότερο μέλος τους που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου (Bertelli και συν., 1998). Είναι μια από τις καλύτερα μελετημένες πολυφαινόλες γιατί έχει παρουσιάσει σημαντική αντικαρκινική δράση (Bhat και Pezzuto 2002). Η ρεσβερατρόλη στα σταφύλια βρίσκεται είτε ως μονομερές είτε πολυμερίζεται σχηματίζοντας τις βινιφερίνες (Soleas et al., 1997). Με αυτή ακριβώς τη μορφή πολυμερικών μορίων εντοπίζεται στους ερυθρούς οίνους ως *trans*-ρεσβερατρόλη σε τιμές της τάξης των 0,1-15 mg/l.



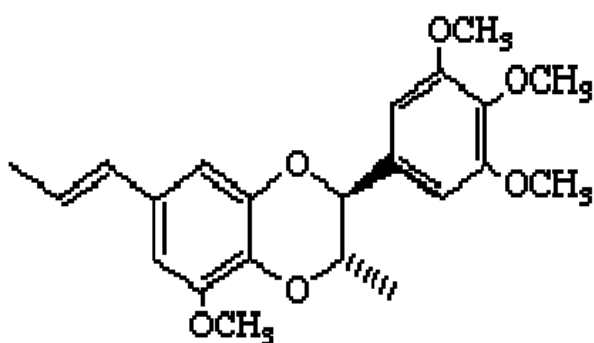
Εικόνα 12: Χαρακτηριστικά Στιλβένια που εντοπίζονται στους οίνους (Fremont 2000).



Εικόνα 13: Χαρακτηριστική δομή trans- ρεσβερατρόλης.

7.4 Λιγνάνες.

Οι λιγνάνες αποτελούν την κατεξοχήν τάξη φυτοοιστρογόνων, μαζί με τα φλαβονοειδή και τις κουμεστάνες, που εμφανίζονται στα φυτά κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών. Οι φυτικές λιγνάνες που εντοπίζονται στις περισσότερες φυτικές τροφές όπως τα δημητριακά ολικής άλεσης (κριθάρι, σιτάρι και σίκαλη), ξηροί καρποί, σπόροι, όσπρια και λαχανικά είναι η ματαιρεσινόλη και η (matairesinol) και η σεκοΐσολαρισρεσινόλη (secoisolariciresinol). Αυτές όταν επιδράσουν με τα βακτήρια του εντερικού σωλήνα σχηματίζουν την εντερολακτόνη (enterolactone) και την εντεροδιόλη (enterodiol) που αποτελούν τις λεγόμενες λιγνάνες των θηλαστικών που διαθέτουν οιστρογονικές βιολογικές ιδιότητες, αφού εμφανίζουν ένα διφαινυλικό δακτύλιο που καθιστά τη δομή τους όμοια με τα ενδογενή οιστρογόνα.

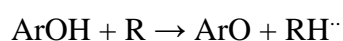


Εικόνα 14: Η χημική δομή λιγνανών (αριστερά) και ο λιναρόσπορος (δεξιά), η κύρια πηγή προέλευσής τους.

8. Αντιοξειδωτική Δράση Πολυφαινολών

Η μοριακή βάση για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών, σχετίζεται με τρεις κύριους μηχανισμούς, που προκύπτουν από την άμεση αντίδραση με ελεύθερες ρίζες (Leopoldini et al., 2004a, Leopoldini et al., 2004, Leopoldini et al., 2004β και Wright et al. , 2001), και από την αποσιδήρωση (χηλίωση) των ελεύθερων μετάλλων, με το τελευταίο να εμπλέκεται σε αντιδράσεις που τελικά δημιουργούν ελεύθερες ρίζες (Jovanovic, Steenken, Simic, & Hara, 1998).

Ως πρωτογενή αντιοξειδωτικά, οι πολυφαινόλες αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες, με μεταφορά ατόμου υδρογόνου (HAT) (1^{ος} μηχανισμός) ή με ενιαία μεταφορά ηλεκτρονίων (SET) (2^{ος} μηχανισμός) (Εικόνα 15). Στην πρώτη περίπτωση, το αντιοξειδωτικό, ArOH, αντιδρά με την ελεύθερη ρίζα R, με μεταφορά σε αυτήν ενός ατόμου υδρογόνου, μέσω ομολυτική ρήξη του δεσμού O-H:



Τα προϊόντα της αντίδρασης είναι αβλαβή είδη RH και η οξειδωμένη ArO[·] ρίζα. Ακόμη και αν η αντίδραση οδηγεί στο σχηματισμό μιας άλλης ρίζας, τότε και αυτή θα είναι λιγότερο δραστική σε σχέση με την R[·], λόγω σταθεροποίησής της από άλλους παράγοντες.

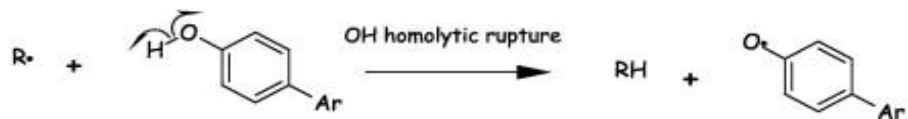
Κατά το δεύτερο μηχανισμό προβλέπετε η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στην ρίζα, R:



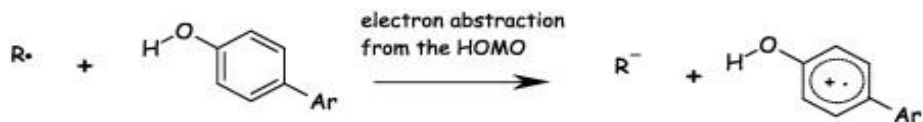
Το ανιόν R^{·-} είναι ένα σταθερό είδος, ενώ η κατιονική ρίζα ArOH^{·+}, ανήκει επίσης στα λιγότερο αντιδραστικά είδη ριζών.

Και στις δύο περιπτώσεις υπάρχουν παράμετροι που επηρεάζουν την διεξαγωγή κάθε πορείας. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τον πρώτο μηχανισμό, η ενθαλπία διάσπασης δεσμού (BDE), του φαινολικού O-H δεσμού, αποτελεί σημαντικό κριτήριο για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης, με την τιμή της όσο να μειώνεται, τόσο ευκολότερα να επιτυγχάνεται η διάσπαση του φαινολικού O-H δεσμού και άρα η αντίδραση με τις ελεύθερες ρίζες. Όσον αφορά το δεύτερο μηχανισμό, το δυναμικό ιονισμού αποτελεί αντίστοιχα μια κύρια παράμετρο για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Με ανάλογο τρόπο όσο πιο μικρή είναι η τιμή του, τόσο πιο εύκολα διεξάγεται η απόσπαση του ηλεκτρονίου και άρα η αντίδραση με τις ελεύθερες ρίζες (Monica Leopoldini, 2011).

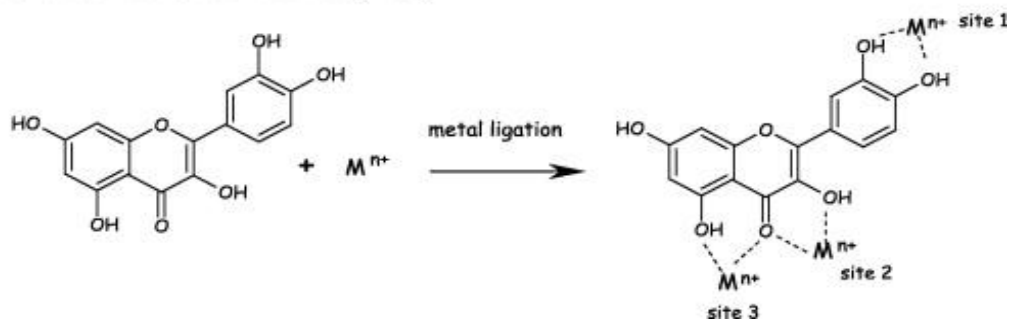
1. Hydrogen Atom Transfer (HAT)



2. Single Electron Transfer (SET)



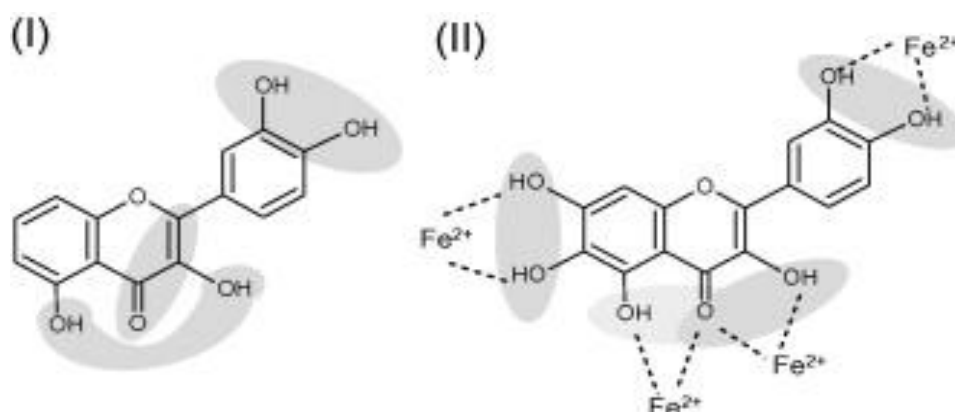
3. Transition Metals Chelation (TMC)



Εικόνα 15: Μηχανισμοί Αντιοξειδωτικής Δράσης Πολυφαινολών (Monica Leopoldini, 2011).

Το πρότυπο δυναμικό αναγωγής E° , αντιπροσωπεύει την τάση της οξειδωμένης μορφής ενός μορίου ή ατόμου (ελεύθερης ρίζας, σ' αυτήν την περίπτωση) να περιοριστεί με τη λήψη ενός ηλεκτρονίου. Το E° υπολογίζεται σε βιολογικές συνθήκες (E°) για κάθε μία από τις ενώσεις που εμπλέκονται σε αντιδράσεις εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη, επίτευξης μιας τέτοιας αντιοξειδωτικής αντίδρασης. Συγκρίνοντας το E° δύο ενώσεων, αυτή με την υψηλότερο E° θα λάβει το ηλεκτρόνιο από την άλλη με το χαμηλότερο E° . Το E° για τις πολυφαινόλες κυμαίνεται στα 330-840 mV, με αυτές τις σχετικά χαμηλές τιμές να αποτελούν τις κινητήριες δυνάμεις για την μετακίνηση ηλεκτρονίων. Τελικά η σταθερότητα του τελικού μορίου που προκύπτει, καθορίζει τη δραστηριότητα της αρχικής πολυφαινόλης, στη διακοπή αλυσιδωτών αντιδράσεων που οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως οι αντιδράσεις οξείδωσης λιπιδίων. Δηλαδή, μια μη δραστηκή ρίζα θα αναστείλει ή θα μειώσει το ποσό της οξείδωσης, ενώ μια δραστηκή μπορεί να συμβάλλει στη πορεία αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης. Με βάση αυτό το σκεπτικό έχουν προσδιοριστεί για τα μόρια των φλαβονοειδών, ορισμένα δομικά χαρακτηριστικά, ώστε τελικά να συμβάλλουν στη

δημιουργία σταθερών μη δραστικών ριζών που αποτρέπουν τη συνέχιση αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης λιπαρών οξέων (Cesar G. Fraga, 2010).



Εικόνα 16: Διαρθρωτικά χαρακτηριστικά που ορίζουν την μέγιστη αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών, όπως φαίνεται στις σκουρόχρωμες περιοχές (I), ενώ οι διακεκομμένες γραμμές και έντονες περιοχές στη δεύτερη περίπτωση (II) παρουσιάζουν τις ομάδες που συμμετέχουν στη χηλίωση.

Υπάρχει και ένας τρίτος μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών, που σχετίζεται όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με την ικανότητά τους να αντιδρούν με τα ιόντα των μετάλλων μετάπτωσης, με αποτέλεσμα το σχηματισμό σταθερών συμπλοκοποιημένων ενώσεων, που παρεμποδίζουν την αντίδραση των μετάλλων με τις ελεύθερες ρίζες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν μέταλλα, τα οποία ακόμα και σε χαμηλή οξειδωμένη κατάσταση, όπως κυρίως ο Fe^{+2} , συμμετέχουν σε αντιδράσεις Fenton με το υπεροξειδίο του υδρογόνου και παράγουν υψηλής δράσης ρίζες οξυγόνου:



Η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}) είναι γενικά αποδεκτό πως είναι μία από τις πιο δραστικές ρίζες, με βραχύ χρόνο ημιζωής, που όμως δεν μπορεί να εξουδετερωθεί ενζυμικά και συνεπώς μπορεί να αντιδράσει με οποιοδήποτε υπόστρωμα (Palmer & Paulson, 1997). Μέταλλα μετάπτωσης όπως ο χαλκός, το μαγγάνιο, το κοβάλτιο είναι ικανά να καταλύουν την αντίδραση αυτή, υπό ορισμένες συνθήκες, όταν αυτά τα ιόντα μετάλλων δεν δεσμεύονται με πρωτεΐνες ή χηλικοποιητές. Η Fenton αντίδραση μπορεί να λάβει χώρα και να προκαλέσει ειδική συσσώρευση των ελεύθερων ριζών και ταυτόχρονα να προκαλέσει βλάβη στα βιομόρια. Οι χηλικές ενώσεις μετάλλων απομακρύνουν τα μέταλλα και μπορούν να αλλάξουν οξειδοαναγωγικό δυναμικό, καθιστώντας τα ανενεργά. Επιπλέον η χρήση φυσικών χηλικοποιητών, όπως τα φλαβονοειδή, πρέπει να ευνοείται έναντι άλλων συνθετικών χηλικοποιητών που

μπορεί να παρουσιάζουν κάποια προβλήματα τοξικότητας, ενώ βρέθηκε πως οι ομάδες υδροξυλίου και καρβονυλίου στις πολυφαινόλες παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τα ιόντα μετάλλων (Cesar G. Fraga, 2010). Χαρακτηριστικά, τα φλαβονοειδή με πολλαπλές ομάδες υδροξυλίου και την ομάδα καρβονυλίου στη θέση 4 επί του δακτυλίου C μπορεί να προσφέρουν διάφορες διαθέσιμες θέσεις για συμπλοκοποίηση μετάλλων (Monica Leopoldini,2011). Παρ' όλα αυτά έχουν βρεθεί πολλές διαφορές όσον αφορά την ικανότητα συμπλοκοποίησης των πολυφαινολών, ενώ είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη πως η χηλίωση των μετάλλων μετάπτωσης δεν έχει πάντα σαν αποτέλεσμα αντιοξειδωτική δράση (Cesar G. Fraga, 2010). Οι οξειδοαναγωγικές ιδιότητες ενός μετάλλου αλλάζουν με τη χηλίωση και τελικά το E^o του συμπλόκου πολυφαινόλης-μετάλλου είναι αυτό που καθορίζει την συμπεριφορά του.

Ο πιο σημαντικός περιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών είναι η περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα τους, ακόμα και μετά από την κατανάλωση τροφών πλούσιων σ' αυτές. Στον άνθρωπο, χαρακτηριστικά οι υψηλότερες συγκεντρώσεις που παρατηρήθηκαν, κυμαίνονταν σε κλίμακα nanomolar, με τη μεγαλύτερη τιμή να σημειώνεται 2- 4 ώρες μετά την πρόσληψη της τροφής, με τη μείωση στη συνέχεια στο πλάσμα να είναι τάχιστα. Κάτι τέτοιο οδηγεί σε μία δυσμενή κινητική κατάσταση των πολυφαινολών σε σχέση με άλλες ενώσεις, με παρόμοια αντιοξειδωτική δράση, που βρίσκονται όμως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε ιστούς και αίμα, όπως το ασκορβικό οξύ (50μM). Για παράδειγμα μπορεί το ασκορβικό και η κερκετίνη να έχουν παρόμοιες τιμές E^o αλλά φαίνεται πως η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα και η σταθερά ταχύτητας (K), ορίζουν το ρυθμό της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Συνεπώς, το δυναμικό δράσης των πολυφαινολών, δεν φαίνεται να είναι σημαντικό στα διάφορα όργανα εκτός από εκείνα το εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτών όπως η γαστρεντερική οδός και το αίμα (Cesar G. Fraga, 2010).

Antioxidant reactions ^a	$-E^{\circ}_{(AH/A^{\bullet})}$ ^b (mV)	Rate law	k ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	[AH] ^c (μM)	Relative rate ^d (s^{-1})
$\text{LOO}^{\bullet} + \text{Asc} \rightarrow \text{LOOH} + \text{Asc}^{\bullet}$	282	$v_{\text{ASC}} = k_{\text{ASC}} [\text{LOO}^{\bullet}] [\text{Asc}]$	1.0	50	50
$\text{LOO}^{\bullet} + \text{TP} \rightarrow \text{LOOH} + \text{TP}^{\bullet}$	500	$v_{\text{TP}} = k_{\text{TP}} [\text{LOO}^{\bullet}] [\text{TP}]$	1.0	28	28
$\text{LOO}^{\bullet} + \text{EC} \rightarrow \text{LOOH} + \text{EC}^{\bullet}$	570	$v_{\text{EC}} = k_{\text{EC}} [\text{LOO}^{\bullet}] [\text{EC}]$	7.3	0.3	2.0
$\text{LOO}^{\bullet} + \text{QC} \rightarrow \text{LOOH} + \text{QC}^{\bullet}$	330	$v_{\text{QC}} = k_{\text{QC}} [\text{LOO}^{\bullet}] [\text{QC}]$	15.0	0.1	1.5
$\text{LOO}^{\bullet} + \text{RV} \rightarrow \text{LOOH} + \text{RV}^{\bullet}$	650	$v_{\text{RV}} = k_{\text{RV}} [\text{LOO}^{\bullet}] [\text{RV}]$	0.03	0.4	0.01

^a Reaction of antioxidants (AH) with peroxy radicals (LOO^{\bullet}). Asc = ascorbic acid; TP = α -tocopherol; EC = (-)-epicatechin; QC = quercetin; and RV = resveratrol.

^b Reduction potentials are defined for $\text{A}^{\bullet} \rightarrow \text{AH}$; the minus sign makes E° consistent with the proposed antioxidant reactions ($\text{AH} \rightarrow \text{A}^{\bullet}$).

^c Estimated plasma concentration of antioxidant compounds.

^d Relative rate is defined as rate divided by $[\text{LOO}^{\bullet}]$.

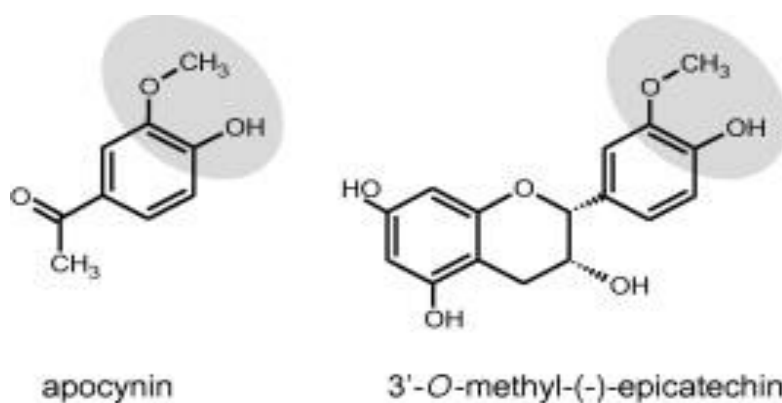
Πίνακας 7: Θερμοδυναμικές και κινητικές πτυχές χαρακτηριστικών πολυφαινολών (Cesar G. Fraga, 2010).

9. Κυτταρικές δράσεις των πολυφαινολών.

Οι αλληλεπιδράσεις των πολυφαινολών με τα λιπίδια της μεμβράνης και τις πρωτεΐνες θα μπορούσαν να συγκαταλεχθούν στις βιολογικές τους επιδράσεις, όπως προτείνεται μετά από συνεπής παρατηρήσεις. Η παρουσία υδρόφιλων και υδρόφοβων περιοχών στις περισσότερες πολυφαινόλες τις επιτρέπει να εντοπίζονται σε διαφορετικά επίπεδα των μεμβρανών: α) στην επιφάνεια της λιπιδικής διπλοστιβάδας μαζί με τις πολικές κεφαλές των λιπιδίων, ή/και β) στο εσωτερικό της διπλοστιβάδας, αλληλεπιδρώντας με τις υδρόφοβες αλυσίδες των λιπιδίων. Τα δομικά χαρακτηριστικά των πολυφαινολών και συνεπώς και η τρισδιάστατη δομή τους, καθορίζουν την προσρόφηση ή διείσδυση στη μεμβράνη. Ειδικότερα, φαίνεται πως η αλληλεπίδραση με τις κεφαλές λιπιδίων σχετίζεται θετικά με τον αριθμό των υδροξυλικών ομάδων και αντιστρόφως με την υδροφοβικότητα των μορίων, ενώ ακόμα και τροποποιήσεις όπως η μεθυλίωση των ομάδων υδροξυλίου θα μπορούσαν να αποτρέψουν την αλληλεπίδραση με την κυτταρική μεμβράνη. Κατ' αυτόν τον τρόπο οι πολυφαινόλες μπορούν να επηρεάσουν τις κυτταρικές λειτουργίες, μέσω τροποποίησης της δομής της μεμβράνης ή των φυσικών της χαρακτηριστικών, όπως η ρευστότητα και οι ηλεκτρικές ιδιότητες. Αυτές οι αλλαγές μπορούν με τη σειρά τους να επηρεάσουν περαιτέρω τις αντιδράσεις με τα ένζυμα, τις αλληλεπιδράσεις υποδοχέα- προσδέτη, τη ροή ιόντων ή/και μεταβολιτών, τη διαμόρφωση μεταγωγής σήματος, ενώ με βάση τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες μπορούν να αποτελέσουν ένα φυσικό εμπόδιο για τις υδροδιαλυτές ρίζες. Ακόμα και ενσωματωμένες στη λιπιδική διπλοστιβάδα, μπορούν άμεσα να εξουδετερώσουν λιποδιαλυτές ρίζες, προστατεύοντας τα συστατικά των μεμβρανών από την οξείδωση, με πρόσφατες ενδείξεις να αποδεικνύουν επιλεκτικότητα των πολυφαινολών για εξειδικευμένες περιοχές της μεμβράνης.

Συνεπώς η χημική δομή κάθε πολυφαινόλης, συνδέεται με ένα συγκεκριμένο μηχανισμό δράσης. Η αλληλεπίδραση των πολυφαινολών με πρωτεΐνες, αποτελεί ένα τέτοιο χαρακτηριστικό παράδειγμα, με βιολογικά αποτελέσματα ανάλογα με τη δράση της πρωτεΐνης που εμπλέκετε. Τα αντιοξειδωτικά αυτά μόρια φαίνεται να στοχεύουν σε πολλές περιπτώσεις πλούσιες σε προλίνη πρωτεΐνες, με μία διαδικασία που ξεκινά από το σχηματισμό μιας αρχικής υδρόφοβης ένωσης μεταξύ των καταλοίπων προλίνης και των φαινολικών δακτυλίων, ακολουθεί η δημιουργία μικρών συσσωματωμάτων και τελικά η καταβύθιση της πρωτεΐνης.

Ανάλογα οι πολυφαινόλες αποτελούν ισχυρούς αναστολές, της δράσης μιας ευρείας κλίμακας ενζύμων, μεταξύ των οποίων φαίνεται να συγκαταλέγονται: 1) ένζυμα που έχουν πουρίνες ως υποστρώματα (αδενυλική κυκλάση, αντίστροφη μεταγραφάση, οξειδάση της ξανθίνης, RNA και DNA πολυμεράσες, ριβονουκλεάση) καθώς και 2) ένζυμα με NADPH ως συμπράγοντα (αναγωγάσης αλδόζης, μηλική αφυδρογονάση, γαλακτική αφυδρογονάση). Ειδικότερα, έχει προταθεί ότι ορισμένες πολυφαινόλες δρουν αναστέλλοντας ATP- εξαρτώμενα ένζυμα, με ανταγωνιστική δράση για την θέση δέσμευσης του ATP και λόγω της ομοιότητας των δομών ATP και NADPH, συνεπάγεται ότι με τον ίδιο τρόπο δρουν και για τα NADPH-εξαρτώμενα ένζυμα.

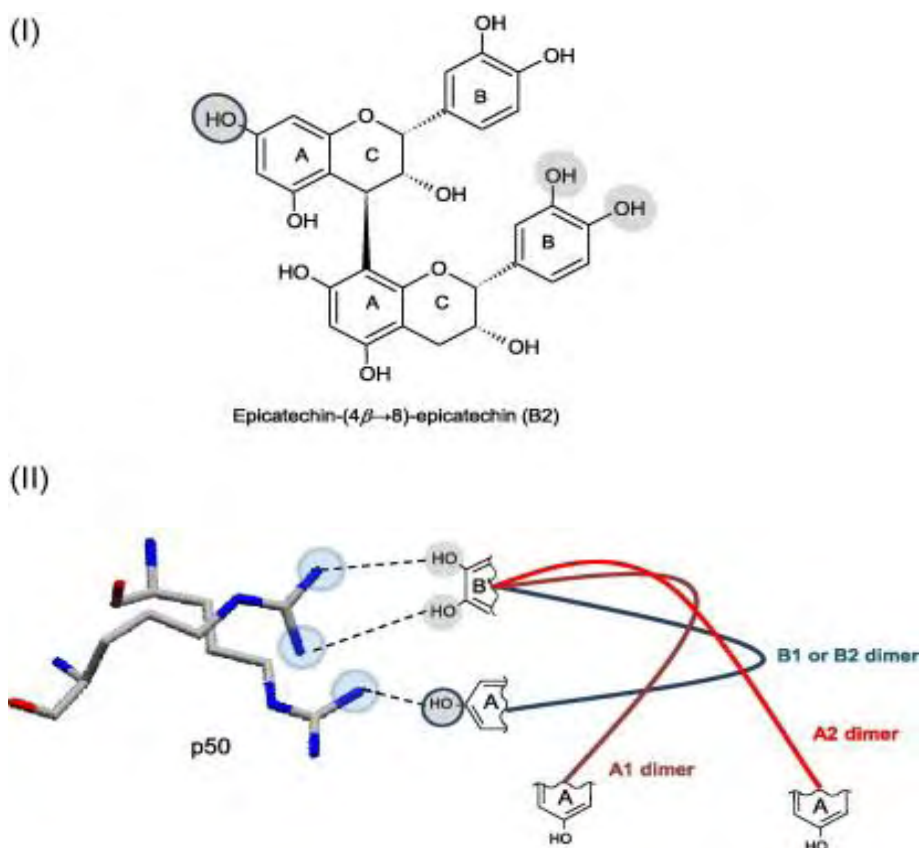


Εικόνα 17: Δομικά χαρακτηριστικά αποκυνίνης και 3'-Ο-μεθυλ -επικατεχίνη ως αναστολείς της οξειδάσης του NADPH (NOX). Οι τονισμένες περιοχές δείχνουν τις δομικές ομοιότητες μεταξύ της 3'-Ο-μεθυλ-επικατεχίνης και αποκυνίνης που σχετίζονται με την αναστολή της δραστηριότητας NOX (Cesar G. Fraza. 2010).

Ωστόσο, πολλές άλλες επιδράσεις των πολυφαινολών όπως οι αντι-φλεγμονώδεις και αντι-καρκινικές τους ικανότητες δεν μπορούσαν να εξηγηθούν αποκλειστικά βάσει των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους. Έρευνες για την μηχανισμό δράσης αυτών των μορίων έχουν αποδείξει ότι οι πολυφαινόλες μπορεί απλώς να μην ασκούν τις επιδράσεις τους ως μόρια που δεσμεύουν και εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, αλλά συμμετέχουν επίσης στη ρύθμιση διαδικασιών κυτταρικής σηματοδότησης όπως κατά τη φλεγμονή ή μπορούν να δράσουν και οι ίδιες ως παράγοντες σηματοδότησης, αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες και υποδοχείς. Ανάμεσα στις πολυφαινόλες, φαίνεται πως οι φλαβονόλες αποτελούν τους κύριους

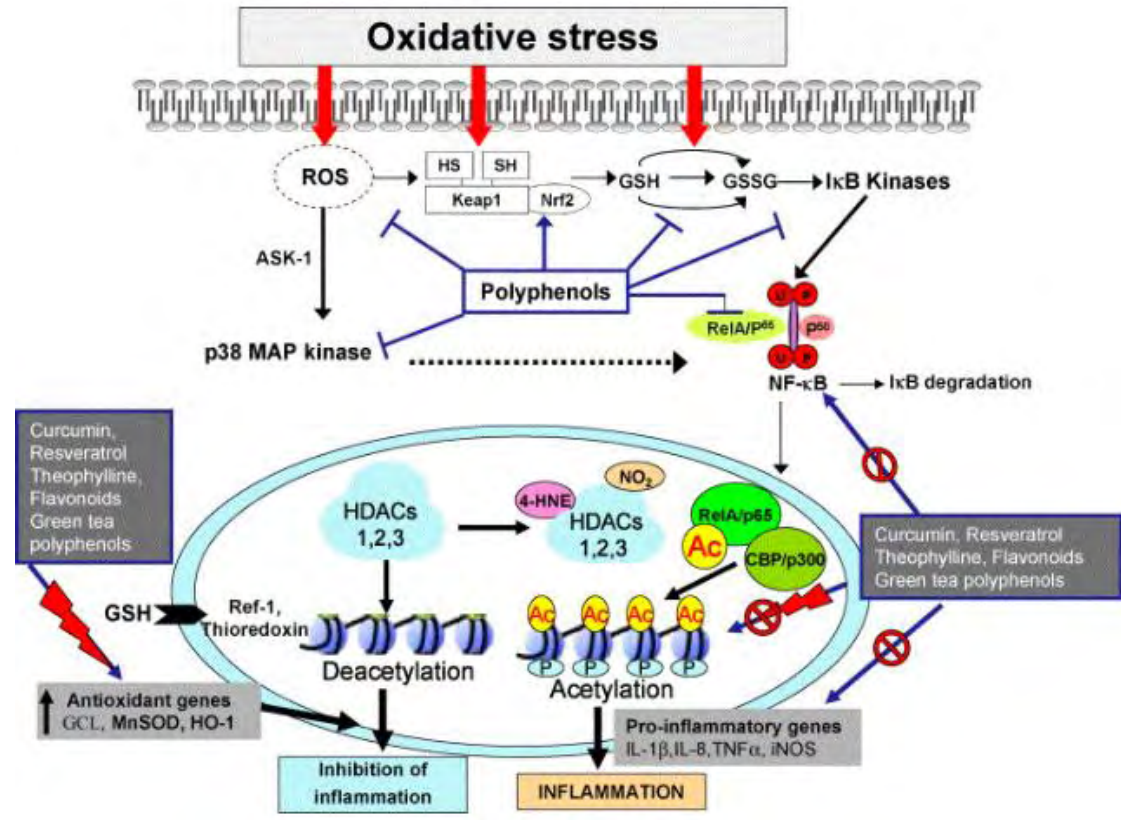
ρυθμιστές της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB, που εμπλέκονται στη φλεγμονή και την καρκινογένεση.

Τα διμερή προκυανιδίνης B1 και B2, βρέθηκαν να αναστέλλουν με επιλεκτική δράση την ενεργοποίηση του NF-κB σε πολλαπλά επίπεδα, με ένα υποθετικό μοριακό μοντέλο να προτείνει την αποτροπή σύνδεσης του σε περιοχές κB του DNA. Η ελάχιστης ενέργειας διαμόρφωση, των B1 και B2, τους επιτρέπει να εμφανίζουν μια αναδιπλωμένη δομή δύο δακτυλίων με τις ομάδες υδροξυλίου να προσανατολίζονται προς την ίδια κατεύθυνση. Τόσο ο τρόπος σύνδεσης των δύο δακτυλίων, όσο και η θέση των υδροξυλομάδων, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση των διμερών πολύ στενά στους δακτυλίους γουανίνης των ομόλογων περιοχών του NF-κB. Οι διαφορές λοιπόν στη στερεοχημεία των μορίων, είναι καθοριστικές για την ανασταλτική τους δράση και αποτελούν ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα που αποδεικνύει ότι οι αλληλεπιδράσεις, εξαρτώνται όχι μόνο από τη χημική σύνθεση αλλά και από τα δομικά χαρακτηριστικά των πολυφαινολών (Cesar G. Fraga, 2010).



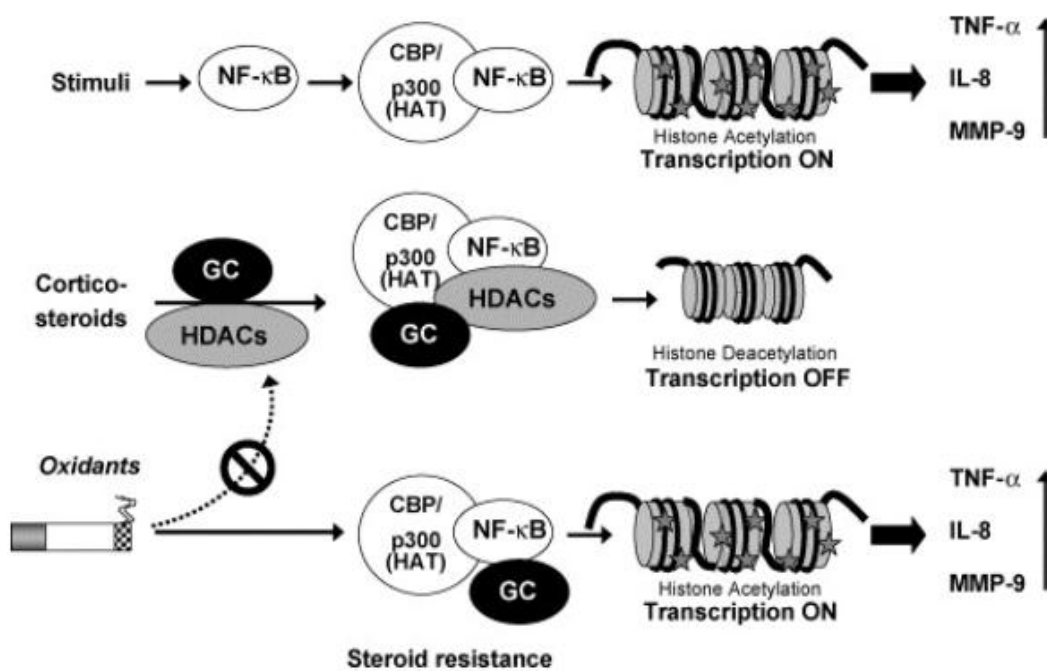
Εικόνα 18: Αλληλεπίδραση των διμερών (-) - επικατεχίνης με τους NF-κB παράγοντες. I) Χημική δομή του διμερούς προκυανιδίνης B2. Οι τονισμένες ομάδες υδροξυλίου είναι κεντρικής σημασίας για την αλληλεπίδραση του B2 με τις NF-κB πρωτεΐνες RelA και p50. II) Πιθανές αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου (υποδεικνύονται ως διακεκομμένες γραμμές) μεταξύ των καταλοίπων αργινίνης της p50 και RelA και των διάφορα διμερή (A1, A2, B1 ή B2) (Cesar G. Fraga, 2010).

Οι πολυφαινόλες αντιμετωπίζουν, λοιπόν την προφλεγμονώδη γονιδιακή έκφραση, όχι μόνο με αναστολή των NF-κβ, αλλά και με ενεργοποίηση των αποακετυλασών ιστόνης (HDACs) για την καταστολή της γονιδιακής μεταγραφής. Και αυτό γιατί η φλεγμονή που προκαλείται λόγω ROS, σχετίζεται και με την ενεργοποίηση MAP κινασών, που επηρεάζουν ποικίλες διεργασίες κυτταρικής σηματοδότησης, με παραγωγή μεσολαβητών (IL-1β, IL-8, TNFα και iNOS) και αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (Εικόνα 19). Ειδικότερα, προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες ενεργοποιούν παράγοντες μεταγραφής, όπως τους NF-κβ, οι οποίοι στρατολογούν συν-μεταγραφικά μόρια, ενεργοποιητές CBP / p300 που διαθέτουν ενδογενή δραστηριότητα ακετυλασών (HAT) καταλήγοντας σε ακετυλίωση των ιστονών και ξετύλιγμα του DNA, επιτρέποντας στις DNA πολυμεράσες την πρόσβαση στο DNA και την προ-φλεγμονώδη γονιδιακή έκφραση (Εικόνα 20). Αυτός ο μηχανισμός έχει ιδιαίτερη σημασία, για τη δράση των γλυκοκορτικοειδών και τη σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων τους καθώς σχετίζονται με χρόνια φλεγμονώδεις και ανοσολογικές παθήσεις, όπως το άσθμα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια.



Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση της μεσολαβούμενης, από πολυφαινόλες και φλαβονοειδή, κυτταρική σηματοδότηση (Irfan Rahman, 2006).

Η ιδέα ότι η ανισσοροπία ακετυλασών- αποακετυλασών (HAT-HDAC), επηρεάζει την εμφάνιση φλεγμονωδών αντιδράσεων, επιβεβαιώνεται και από ανεξάρτητες εκθέσεις. Χαρακτηριστικά, η κουρκουμίνη σε υψηλές συγκεντρώσεις (100μM), μπορεί να αναστείλει τη δράση των HAT, αποτρέποντας την NF-κ β μεσολαβούμενη ακετυλίωση της χρωματίνης. Ωστόσο, άλλοι πιθανοί μηχανισμοί με τη μεσολάβηση των πολυφαινολών για την αναστολή της φλεγμονώδους απόκρισης δεν πρέπει να παραβλέπονται, όπως η καταστολή ή αναστροφή μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Irfan Rahman, 2006).



Εικόνα 20: Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες σχετικά με τη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης και της προ-φλεγμονώδους γονιδιακή έκφραση (Irfan Rahman, 2006).

10. Βιοδιαθεσιμότητα Πολυφαινολών.

Το σημερινό ενδιαφέρον για τις πολυφαινόλες έχει προκύψει κυρίως από τις επιδημιολογικές μελέτες, όπου αποδεικνύουν με σημαντικά στοιχεία για την αποτελεσματικότητα των πολυφαινολών της διατροφής στην πρόληψη κυρίως εκφυλιστικών ασθενειών όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ο καρκίνος. Γι' αυτόν ακριβώς τον λόγο κρίνεται αναγκαίος ο καθορισμός της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών, έτσι ώστε να είναι δυνατή η αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης.

Η βιοδιαθεσιμότητα διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διάφορων φαινολικών ενώσεων και μάλιστα οι περισσότερες από αυτές που προσλαμβάνονται διατροφικά δεν φαίνεται να έχουν το καλύτερο προφίλ απορρόφησης και βιοδιαθεσιμότητας. Κατά συνέπεια, δεν είναι μόνο σημαντική η γνώση κατά πόσο μία θρεπτική ουσία είναι παρούσα στα τρόφιμα και τα διατροφικά συμπληρώματα αλλά είναι σημαντικότερη η γνώση κατά πόσο αυτή είναι βιοδιαθέσιμη. Ο όρος βιοδιαθεσιμότητα χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην φαρμακολογία για να οριστεί η έννοια του ποσοστού και της έκτασης στην οποία μία δραστική ουσία φτάνει στο σημείο δράσης της. Αν και έχουν παραταθεί διάφοροι ορισμοί ο καταλληλότερος περιλαμβάνει την έννοια της πρόσληψης του θρεπτικού συστατικού και στη συνέχεια τη μεταφορά του από τη συστηματική κυκλοφορία στις ειδικές περιοχές στόχους όπου μπορεί να ασκήσει τη βιολογική του δράση (Massimo D'Archivio, 2010).

Οι περισσότερες μελέτες έχουν δείξει ταχεία απορρόφηση των πολυφαινολών όπως της κερκετίνης και των φλαβονών από τα σταφύλια στο πλάσμα, με τις συγκεντρώσεις τους να αυξάνονται, σ' αυτό μέσα σε δύο με τρεις ώρες μετά την πρόσληψή τους. Αξιοσημείωτη ήταν και η ανίχνευση της επερχόμενης αύξησης των λιπιδίων που δεσμεύονται από τις πολυφαινόλες στον ορό, με παράλληλη μείωση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, ως αποτέλεσμα της βιοδραστικότητάς τους. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί πειραματικά πως μετά από δύο εβδομάδες συστηματικής κατανάλωσης κρασιού (375mL) καθημερινά, οδηγεί σε αύξηση των συνολικών συγκεντρώσεων των πολυφαινολών στο πλάσμα των ατόμων, όπως και τα επίπεδα των μεταβολιτών κυρίως γλυκουρονιδίων και μέθυλο-γλυκουρονιδίων της (+)-κατεχίνης και (-)-επικατεχίνης, μια αύξηση που δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχα στις ομάδες ελέγχου. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να απορροφηθούν από το σύστημα πέψης και να περάσουν στην κυκλοφορία του αίματος επιτυχώς, ώστε να ασκήσουν τη βιολογική τους δράση σε παρακείμενους

ιστούς στόχους. Η διαθεσιμότητα των φαινολικών ενώσεων δεν επηρεάζεται από σιελογόνους παράγοντες ή το γαστρικό περιεχόμενο αλλά κατά την εντερική πέψη, χωρίς βέβαια οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη διαδικασία της πέψης και της απορρόφησης στον εντερικό αυλό να είναι απόλυτα σαφείς. Συγκεκριμένα, ορισμένα στοιχεία έδειξαν πως οι φαινολικές ενώσεις είναι σε θέση να σχηματίσουν χηλικές ενώσεις με το σίδηρο. Η παρουσία φαινολικών ενώσεων στον εντερικό αυλό κατά την πέψη, οδηγεί σε αλληλεπίδραση με το σίδηρο προς το σχηματισμό χηλικών συμπλόκων σιδήρου, που με τη σειρά τους προκαλούν εντονότερη μείωση της συγκέντρωσης ύδροξυ-κινναμωνικών παραγώγων φλαβονών και φλαβονολών. Αυτή η σχέση αλληλεπίδρασης ουσιαστικά οφείλεται στις υδροξυλομάδες των φλαβονοειδών.

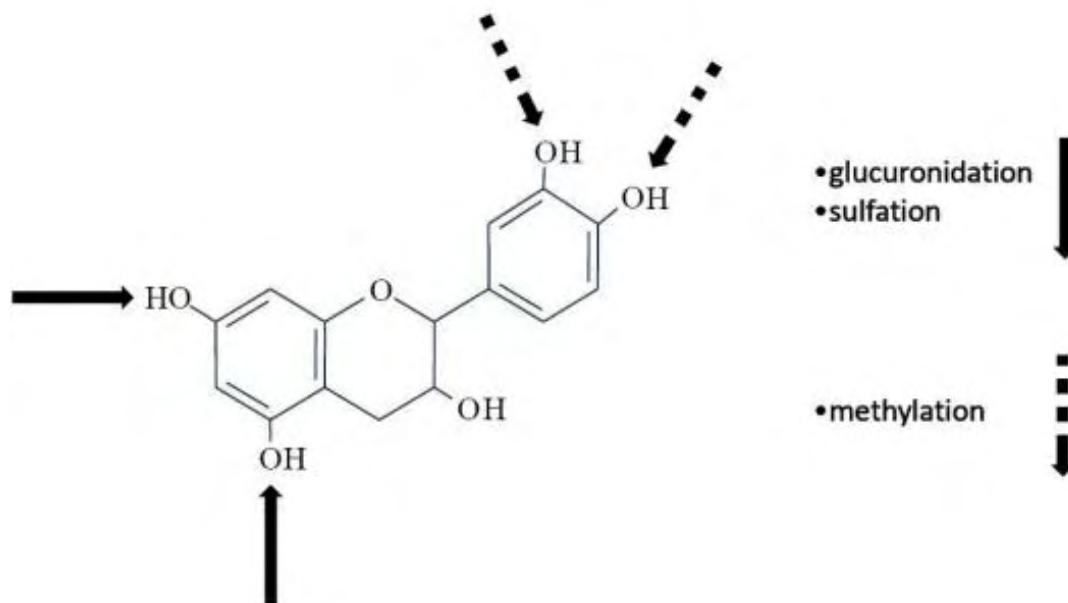
Αποσύνθεση των φαινολικών ενώσεων προκαλείται από τις αλλαγές του pH κατά την πέψη στον εντερικό αυλό. Ειδικότερα, τα φαινολικά συστατικά είναι σταθερά σε pH 7, αλλά το 20% των διμερών ενώσεων τους φαίνεται να αποσυντίθενται σε pH 7,4 και μάλιστα να εξαφανίζονται εντελώς σε pH 8,5. Αντίστοιχα, το 15-24% των επιπέδων της επικατεχίνης μειώνονται σε pH 7,5, με τα επίπεδα όμως της κατεχίνης να παραμένουν σταθερά. Αντίθετα με αυτές τις παρατηρήσεις, σε όξινο pH και πιο συγκεκριμένα σε pH 2 τα μονομερή και τα διμερή των φλαβονολών είναι σταθερά ενώ οι ανθοκυανίνες απορροφούνται πλήρως εντερικά με κύριους μεταβολίτες το συριγγικό οξύ, τη 2,4,6-τριυδροξυβενζοαλδεΐδη και το 3-μεθυλ-γαλλικό οξύ (En-Qin Xia, 2010).

Συνεπώς, μετά την πρόσληψη η απορρόφηση των περισσότερων διατροφικών πολυφαινολών, όχι όμως όλων συμβαίνει στο λεπτό έντερο. Η υδρόλυση των γλυκοζιτών μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο μηχανισμούς. Ο πρώτος περιλαμβάνει τη δράση της υδρολάσης της λακτάσης (LPH), που εντοπίζεται στα κύτταρα που καλύπτουν τις λάχνες του λεπτού εντέρου και φέρει δύο καταλυτικές θέσεις, μία για την υδρόλυση της λακτόζης (LH) και μία για την απογλυκοζυλίωση των πολυφαινολών. Οι αγλυκόνες που απελευθερώνονται εισάγονται στα επιθηλιακά κύτταρα με παθητική διάχυση, ως αποτέλεσμα της αυξημένης τους λιποφιλίας. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την κυτοσολική-β γλυκοσιδάση (CBG) που είναι παρούσα στο εσωτερικό των επιθηλιακών κυττάρων όπου τα πολικά γλυκοσίδια μεταφέρονται μέσω του ενεργού Na^+ εξαρτώμενου-μεταφορέα γλυκόζης SGT1.

Οι πολυφαινόλες που δεν απορροφώνται στο λεπτό έντερο, φθάνουν στο κόλον όπου υφίστανται σημαντικές δομικές τροποποιήσεις από την κολονική μικροχλωρίδα που υδρολύει γλυκοζίτες σε αγλυκόνες και τελικά την αποικοδόμηση αυτών σε απλά φαινολικά οξέα. Αυτή η δραστηριότητα έχει μεγάλη σημασία για τη βιολογική δράση των πολυφαινολών, δεδομένου ότι οι ενεργοί μεταβολίτες που παράγονται όπως η δαϊδζεϊνη μετασχηματίζεται στο δραστικό μεταβολίτη εκουόλη. Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί πως υπάρχει μεγάλη διακύμανση μεταξύ των ατόμων όσον αφορά στην παραγωγή αυτών των δραστικών μεταβολιτών, η οποία φαίνεται να σχετίζεται με γενετικά χαρακτηριστικά. Μάλιστα για τα άτομα που παράγουν μηδενικές ποσότητες εκουόλης, μια σύντομη έρευνα οδήγησε στην παραγωγή φυσικού συμπληρώματος εκουόλης, ως φαρμακευτικό προϊόν διατροφής, μετά την ανακάλυψη στελεχών βακτηρίων που είναι ικανά να παράγουν εκουόλη *in vitro*, όταν επωάζονται με ισοφλαβόνες σόγιας.

Πριν τη διέλευση στη ροή του αίματος, οι πολυφαινόλες που έχουν μετασχηματιστεί σε αγλυκόνες υφίστανται δομικές τροποποιήσεις με τη μέθοδο της σύζευξης που συμβαίνει ως επί το πλείστον στο ήπαρ αλλά και στο λεπτό έντερο. Η σύζευξη μπορεί να πρόκειται για μεθυλίωση, σύνδεση με ομάδες θείου ή για γλυκουρονιδίωση, μεταβολικές διεργασίες απαραίτητες για τον περιορισμό πιθανών τοξικών επιδράσεων. Κατ' αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η απέκκριση στη χολή ή τα ουροφόρα σωληνάκια, χάριν στην υψηλή τους διαλυτότητα και το υψηλό μοριακό τους βάρος.

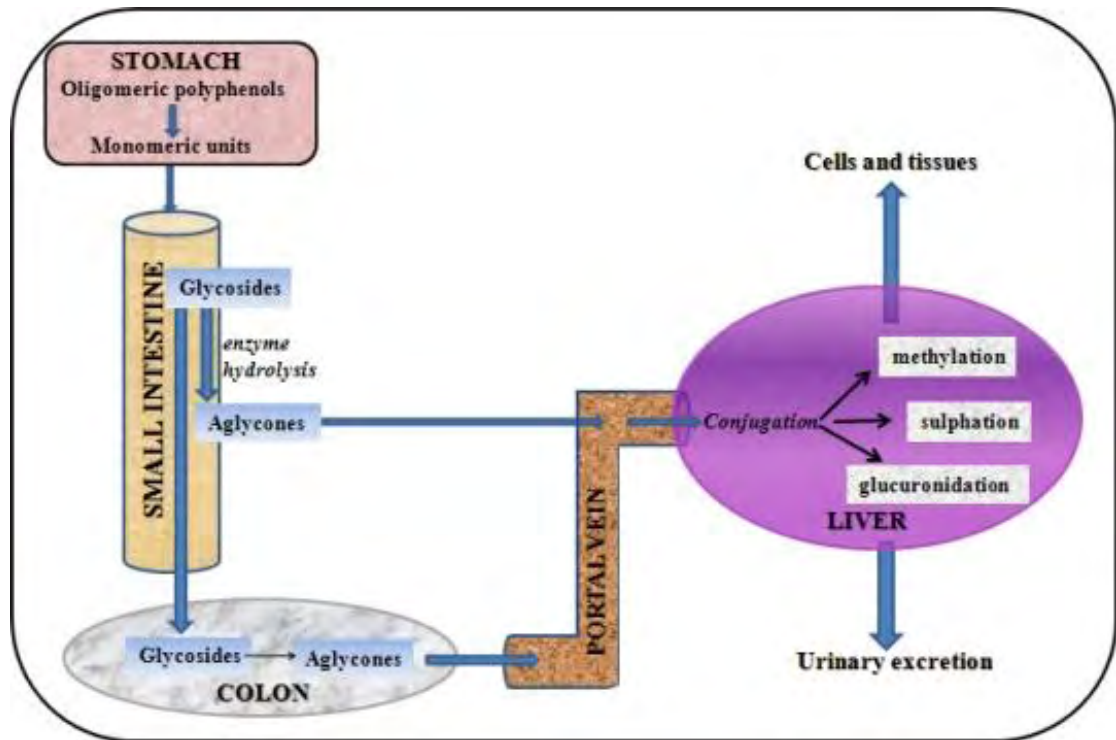
Η κατεχολ-Ο- μεθυλοτρανσφεράση (COMT) καταλύει τη μεταφορά μιας ομάδας μεθυλίου από μία αδένου- μεθειωνίνη, σε πολυφαινόλες όπως η κερκετίνη, η κατεχίνη, το καφεϊκό οξύ και η κυανιδίνη. Αυτό το ένζυμο είναι παρόν σε ένα ευρύ φάσμα ιστών αλλά η δραστηριότητά του είναι μεγαλύτερη στο ήπαρ και τα νεφρά. Αντίστοιχα οι σουλφοτρανσφεράσες (SULT) καταλύουν τη μεταφορά μιας θειικής ομάδας σε μία ομάδα υδροξυλίου σε διάφορα υποστρώματα, όπως οι πολυφαινόλες, μία διεργασία που λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ. Τέλος οι ουριδινο-5'-διφωσφορικές γλυκουρονοσυλοτρανσφεράσες (UGTs), που βρίσκονται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου σε πολλούς ιστούς, καταλύουν τη μεταφορά ενός γλυκουρονικού οξέος από το UDP- γλυκουρονικό οξύ σε πολυφαινόλες. Η γλυκουρονιδίωση των πολυφαινολών συμβαίνει πρώτα στα εντεροκύτταρα πριν την περαιτέρω σύζευξή τους στο ήπαρ.



Εικόνα 21: Πιθανές θέσεις σύζευξης των πολυφαινολών (Massimo D'Archivio,2010).

Αν και η διαδικασία της σύζευξης αφενός παράγει ενεργούς μεταβολίτες από τις πολυφαινόλες από την άλλη μειώνει το συνολικό ποσό των πολυφαινολών στο αίμα, αυξάνοντας την απέκρισή τους. Η σχετική σημασία του τύπου σύζευξης ποικίλει ανάλογα με τον τύπο του υποστρώματος, δηλαδή της πολυφαινόλης καθώς και από την ποσότητα που προσλαμβάνεται. Ακόμα η ισορροπία μεταξύ της σύζευξης με θεικές ομάδες και της γλυκουρονιδίωσης φαίνεται να επηρεάζεται ακόμα και από το είδος και το φύλο.

Ο μηχανισμός της σύζευξης είναι εξαιρετικά αποτελεσματικός, ώστε τελικά οι αγλυκόνες να απουσιάζουν ή να εντοπίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα. Εξαιρεση αποτελούν οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού των οποίων οι αγλυκόνες μπορούν να φτάσουν στο πλάσμα σε ποσοστά έως και 77%. Συνεπώς κάθε μεμονωμένη πολυφαινόλη, παράγει διαφορετικούς μεταβολίτες, όπως χαρακτηριστικά στην περίπτωση των γλυκοζιτών της κερκετίνης όπου παράγονται είκοσι διαφορετικοί μεταβολίτες. Όλες αυτές οι τροποποιήσεις επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη βιολογική δράση των πολυφαινολών και κατά συνέπεια, οι ενώσεις που φθάνουν στα κύτταρα και στους ιστούς να είναι χημικά, βιολογικά και σε πολλές περιπτώσεις λειτουργικά διαφορετικές από την αρχική μορφή ((Massimo D'Archivio, 2010).



Εικόνα 22: Απορρόφηση και τροποποίηση των πολυφαινόλων (Massimo D'Archivio, 2010).

11. Τοξικότητα Φυτικών Πολυφαινολών.

Τις τελευταίες δεκαετίες συσσωρεύονται τα δεδομένα που αποδεικνύουν την ευεργετική δράση των πολυφαινολών. Αυτό ενίοτε οδηγεί στην υπερεκτίμηση των σημερινών γνώσεων σχετικά με τις επιπτώσεις τους. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαία η διεξαγωγή κάθε συμπληρωματικής μελέτης με επίκεντρο τις επιπτώσεις στην υγεία από την κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινόλες, όπως η σόγια, ή συμπληρωμάτων με συνδυασμό διαφόρων τύπων πολυφαινολών.

Σε συστάσεις που έγιναν, ως αναφορά τα διατροφικά συμπληρώματα, πλέον συστήνεται η κατανάλωση 50mg/d ισοφλαβονών ή 100-300 mg/d εκχυλισμάτων σπόρων σταφυλιού πλούσιων σε προανθουανιδίνες. Αυτά τα συμπληρώματα μπορεί να εμφανίζονται ως ασφαλή όταν απομονώνονται από φυτικά τρόφιμα, αλλά η μέθοδος εκχύλισης που μπορεί να χρησιμοποιείται για την παραγωγή αυτών των συμπληρωμάτων μπορεί να επηρεάσει η φύση αυτών των ενώσεων και κατά συνέπεια την ασφάλεια του προϊόντος. Μια εμπεριστατωμένη αξιολόγηση του κινδύνου (risk assessment) για τις πολυφαινόλες είναι περίπλοκη όχι μόνο γιατί υπάρχουν πολλές διαφορετικές χημικές ενώσεις που ανήκουν σ' αυτές, αλλά και γιατί δεν είναι κατεξοχήν διαθέσιμα όλα τα απαραίτητα εργαλεία για την εκτίμηση των στοιχείων σύνθεσης των τροφίμων. Μία επίσης εκτίμηση της έκθεσης μέσω μέτρησης βιοδεικτών έχει αποδειχθεί εξίσου δύσκολη, λόγω της μεταβολικής εξειδίκευσης των πληθυσμών αλλά και των ατόμων ξεχωριστά ενώ τεχνικές για απλές μετρήσεις τέτοιων βιοδεικτών και των αντίστοιχων στοιχείων εγκυρότητας, εκλείπουν. Συνεπώς είναι εξαιρετικά δύσκολο να γνωρίζουμε κατά πόσον η προτεινόμενη πρόσληψη είναι ασφαλή ή ποιοι είναι οι πιθανοί κίνδυνοι με αυτές τις προσλήψεις.

Πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες φαινολικών ενώσεων έχουν παρατηρηθεί μετά από *in vitro* μελέτες σε ζωικά και κυτταρικά μοντέλα, χωρίς αυτά τα αποτελέσματα να έχουν επιβεβαιωθεί μεταξύ των ανθρώπων, αφού η διατροφική πρόσληψη των πολυφαινολών βρίσκεται σε χαμηλότερες δόσεις από αυτές που χρησιμοποιούνται στις μελέτες. Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα πρέπει επίσης να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη, όσο σοβαρά λαμβάνονται και οι ευεργετικές επιπτώσεις. (Louise I Mennen, 2005).

Η πιθανή τοξικότητα μερικών πολυφαινολών από σταφύλια, όπως η επικατεχίνη έχει διερευνηθεί σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών και κερατινοκυττάρων, μετά από

επώασή τους μ' αυτήν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα 24, 48 και 72 ωρών. Αρνητικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τελικά όταν η συγκέντρωση της επικατεχίνης ήταν τρεις ή επτά φορές υψηλότερη από εκείνη στην οποία εκφράζει τη θετική αντιοξειδωτική της δράση, ενώ παράλληλα σημειώθηκε πως οι ενώσεις με μία ομάδα γαλλικού εκτίθενται περισσότερο σε μία πιθανή τοξικότητα (Ugartondo, 2006). Επίσης, αισθητή βλάβη του DNA έχει παρατηρηθεί σε κύτταρα σπλήνας ποντικών όταν επώάζονται με υψηλές συγκεντρώσεις κατεχίνης (150 $\mu\text{mol/L}$), αποτελέσματα που έρχονται σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις που προκύπτουν κατά την επώαση τους σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις κατεχίνης, γαλλικού οξέος ή προκυανιδίνης B4, όπου βρέθηκαν λιγότερο αισθητές βλάβες του DNA σε σχέση με αυτές που επάγονται από το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) (Fan P., 2004). Αξιοσημείωτη μελέτη έχει προσδιορίσει επίσης την επίδραση εκχυλισμάτων, κλασμάτων σταφυλιών πλούσιων σε πολυφαινόλες όπως το καφεϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ και η ένυδρη ρουτίνη όπως και τη μεμονωμένη δράση αυτών, στην πρόκληση κυτταρογενετικών βλαβών σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από την επίδραση της μεταλλαξιγόνου ουσίας μιτομυκίνης C (Stagos, 2007). Μία από τις βλάβες που φάνηκε λοιπόν να επάγεται είναι η αύξηση των χρωματιδικών ανταλλαγών (SCEs) που πρόκειται για ένα φυσικό βιολογικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια διπλασιασμού του DNA στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, πριν ακόμα οι χρωματίδες ξεχωρίσουν σε δύο αυτοτελή χρωμοσώματα. Προϋπόθεση για τη δημιουργία των SCEs είναι η ρήξη των αλυσίδων του DNA και η επανασύνδεσή τους, με επακόλουθο να αυξάνεται η πιθανότητα γενετικών λαθών κατά την αύξηση των SCEs από τη μεταλλαξιγόνο δράση της μιτομυκίνης C που δρα μέσω παραγωγής ελεύθερων ριζών. Αντίθετα, με αυτές τις παρατηρήσεις η επίδραση του φερουλικού οξέος, του πρωτοκατεχοϋκού οξέος, της (+)-κατεχίνης, της (-)-επικατεχίνης και trans- ρεσβερατρόλης ήταν μηδενική σε συγκεντρώσεις μεταξύ 5 και 100 μM . Βέβαια τα εκχυλίσματα δεν παρουσίαζαν μεμονωμένα γονιδιοτοξικότητα αλλά μόνο παρουσία μεταλλαξιγόνων παραγόντων, γεγονός που υποδεικνύει την επιλεκτική τους δράση (Stagos, 2007).

Επίσης τα φυτοοιστρογόνα των πολυφαινολικών ενώσεων είναι ένα από τα πιο κοινά διατροφικά συστατικά του ανθρώπου και των ζώων. Στην πλειονότητά τους αυτές οι χημικές ουσίες εμφανίζουν λιγότερη ισχυρή δράση από τα ενδογενή οιστρογόνα αλλά ασκούν τις βιολογικές τους επιδράσεις μέσω παρόμοιων μηχανισμών. Τα φυτοοιστρογόνα και ειδικότερα η σόγια, πλούσια σε γενιστεΐνη και δαΐδζεϊνη,

χρησιμοποιείται ως κύρια πηγή πρωτεΐνης σε ζωοτροφές. Το σχετικά αυξημένο ενδιαφέρον για τα φυτοοιστρογόνα, έχει προκύψει λόγω συσσώρευσης πληροφοριών για τις δυσμενείς επιδράσεις τους στο αναπαραγωγικό σύστημα. Τα πρώτα στοιχεία αναφέρθηκαν το 1946 από τον Bennetts (Bennetts et al. , 1946), τα οποία έδειξαν πως η κατάποση τριφυλλίου πλούσιων σε φυτοοιστρογόνα σε βοσκότοπους προκαλεί στειρότητα στα πρόβατα. Είκοσι χρόνια μετά παρόμοιες παρατηρήσεις σημειώθηκαν και για τις αγελάδες, συμπεριλαμβανομένων και των προβλημάτων που εντοπίστηκαν ακόμα και κατά την κυοφορία τους. Οι επιδράσεις των φυτοοιστρογόνων επηρεάζονται από διαφορετικούς παράγοντες και κυρίως τη δόση και την οδό έκθεσης, καθορίζοντας τις τελικές συγκεντρώσεις των βιοδραστικών ενώσεών τους στον ορό. Ο χρόνος έκθεσης από την άλλη είναι κρίσιμος για τον καθορισμό των επιδράσεων στους ιστούς που φαίνεται να έχουν διαφορετική ευαισθησία σε μορφολογικές και λειτουργικές διαταραχές (Izabela Wocławek-Potocka, 2013).

Σήμερα λοιπόν, η βιοδιαθεσιμότητα και η αξιολόγηση της δράσης των πολυφαινόλων αποκτά όλο και αυξανόμενο ενδιαφέρον καθώς βιομηχανίες εμπλέκονται στην ανάπτυξη νέων καινοτόμων προϊόντων που ορίζονται ως «λειτουργικά τρόφιμα». Είναι σαφές με βάση και τα προαναφερθέντα ευρήματα των πειραματικών μελετών, πως θα πρέπει να εξετάζεται προσεκτικά κάθε δόση που χρησιμοποιείται. Τον 17^ο αιώνα ο Παράκελσος, είπε: «Όλες οι χημικές ουσίες είναι δηλητήρια, δεν υπάρχει καμία που να μην είναι δηλητήριο. Η δόση είναι αυτή που διακρίνει ένα δηλητήριο από ένα φάρμακο». Μία δόση συνεπώς μπορεί μεν να επιφέρει ευεργετικά αποτελέσματα σε μία πειραματική μελέτη κυτταρικών καλλιεργειών, αλλά μπορεί από την άλλη να έχει αρνητικές επιπτώσεις κατά την εφαρμογή της στο ανθρώπινο περιβάλλον. Αντίστοιχα μια δόση που χρησιμοποιείται πειραματικά, μπορεί να αδυνατεί να δράσει στον ανθρώπινο οργανισμό επειδή η πρόσληψή της δεν μπορεί να φτάσει στο ίδιο επίπεδο, λόγω της χαμηλής της βιοδιαθεσιμότητας ή διότι δεν μπορεί τελικά να φτάσει στην περιοχή-στόχο. Επίσης η μορφή της πολυφαινόλης παίζει κυρίαρχο ρόλο (Louise,2005).

12. Μορφολογικά χαρακτηριστικά και σύσταση σταφυλιών.

Η ρόγα προέρχεται από την ανάπτυξη των ιστών του νουκέλλου της ωοθήκης. Είναι ένας σαρκώδης καρπός που φέρει μη- αποσχιζόμενο, σε όλο του το βάθος, σαρκώδες περικάρπιο και περιλαμβάνει δύο συγκαρπικά καρπόφυλλα. Το κάθε καρπόφυλλο αποτελείται από δύο ανάτροπους σπερματικές βλάστες, διατεταγμένες σε αξονική θέση, οι οποίες κατά την ωρίμανση μετατρέπονται σε γίγαρτα (Δημοπούλου, 2008). Υπάρχει ένα μεγάλο σύνολο βιβλιογραφικών αναφορών για την ονοματολογία των ιστών της ράγας (Pratt, 1971, Viala και Pechoutre 1910, Guillon 1905, Ribereau-Gayon et al. 1998), σύμφωνα όμως με τον Fournioux (1982) ο καρπός αποτελείται από τρία κύρια τμήματα: α) το περικάρπιο ή φλοιό, που δομείται από την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και το υπόδερμα β) το μεσοκάρπιο ή αλλιώς σάρκα και γ) το ενδοκάρπιο, δηλαδή το εσωτερικό στρώμα της σάρκας.

Η σύσταση κάθε τμήματος είναι διαφορετική. Γενικά, ο φλοιός χαρακτηρίζεται από μικρή περιεκτικότητα σε σάκχαρα αλλά πλούσια περιεκτικότητα σε οξέα και κατιόντα, το μεσοκάρπιο εμφανίζει εντελώς αντίστροφη σύσταση, ενώ το ενδοκάρπιο περιέχει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σακχάρων καθώς και κατιόντων μαζί με οξέα, συγκριτικά με το μεσοκάρπιο (Δημοπούλου, 2008). Πιο αναλυτικά:

I. Ο Φλοιός.

Αποτελεί το 5-10% του συνολικού βάρους της ράγας. Είναι ένα δερματώδες σύστημα που περιλαμβάνει την εφυμενίδα, την εξωτερική επιδερμίδα του περικάρπιου, το κολλεγχυματικό υπόδερμα (Considine 1979, Knox 1981) και άλλους ιστούς πλούσιους σε βιταμίνη C και ουσίες που συνεισφέρουν στο χρώμα, το άρωμα και τη γεύση (Mullins et al. , 1990). Η επιδερμίδα αποτελείται από μία ή δύο στιβάδες εφαπτόμενων επιμηκυμένων κυττάρων, που αποτελούν το στρώμα του φλοιού στο οποίο περιέχονται αρωματικές και πρόδρομες αρωματικές ενώσεις κάθε ποικιλίας. Αντίστοιχα, το υπόδερμα αποτελείται από έξι έως δέκα στιβάδες κυττάρων, στα πρώτα επίπεδα των οποίων εντοπίζονται οι ανθοκυάνες στις οποίες οφείλεται το κόκκινο χρώμα των σταφυλιών. Τα κύτταρα του φλοιού είναι ενεργά μεταβολικά, καθώς διεξάγουν πολλές βιοχημικές και φυσιολογικές μεταβολές κατά την πορεία ανάπτυξης των ραγών. Ο αριθμός των στιβάδων του φλοιού και το μέγεθός τους αποτελεί χαρακτηριστικό κάθε ποικιλίας (Δημοπούλου, 2008).

Ο φλοιός αποτελείται κυρίως από νερό κατά 75-80%, αδιάλυτες πηκτίνες, κυτταρίνη, πρωτεΐνες και οξέα όπως είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό οξύ. Σε γενικές γραμμές αν και η πολυφαινολική σύσταση είναι διαφορετική σε κάθε ποικιλία, επηρεαζόμενη σε κάθε περίπτωση και από τις συνθήκες καλλιέργειας, ο φλοιός φαίνεται να περιέχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα τανινών στο σταφύλι. Οι τανίνες στα σταφύλια διακρίνονται από το μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού τους και από το μικρότερο ποσοστό εστέρων γαλλικού οξέος. Η κατεχίνη, η επικατεχίνη και η γαλλική επικατεχίνη είναι τα συστατικά της τανίνης. Η κερκετίνη, οι γλυκοζίτες, τα γλυκουρονίδια, το γαλλικό οξύ και η ρεσβερατρόλη ολοκληρώνουν τη φαινολική σύσταση του φλοιού (Arnous, Meyer, 2009).

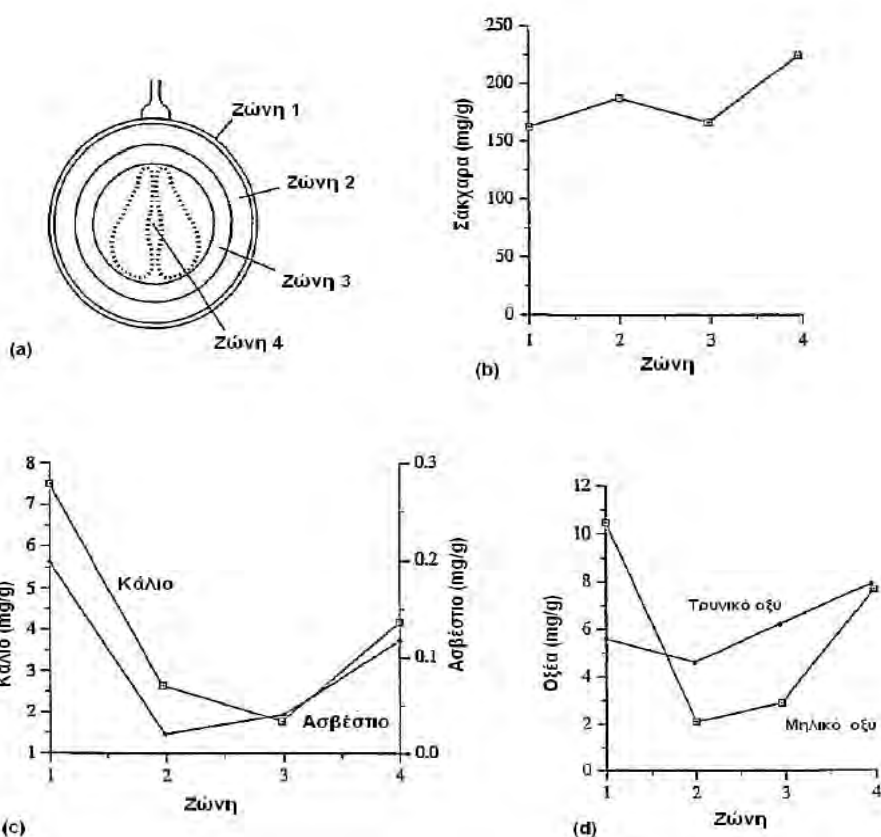


Εικόνα 23: Τομή ρόγας σταφυλιού, όπου διακρίνεται ο φλοιός, η σάσκα και τα γίγαρτα (Γιαννόπουλος, 2012).

II. Η Σάρκα.

Περιέχει νερό κατά 65-80%, σάκχαρα σε ποσοστό 10-30%, οργανικά οξέα, ανόργανα συστατικά αζωτούχες ουσίες, πτητικές ύλες, αρωματικές ουσίες και τανίνες (Δημοπούλου, 2008). Πιο συγκεκριμένα, τα σημαντικότερα σάκχαρα της σάρκας είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, σε συγκέντρωση 150-250 g/l. Τα άλλα σάκχαρα της σάρκας υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες. Η σακχαρόζη υπάρχει σε περιεκτικότητα 1-3 g/l. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία. Όσο αναφορά τα οξέα, το τρυγικό και το μηλικό οξύ έχουν την ίδια κατανομή. Το κιτρικό οξύ βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα κυτταρικά τοιχώματα και παραλαμβάνεται πιο δύσκολα. Τα οξέα και οι βάσεις (κάλιο) έχουν αντίθετη κατανομή στα διάφορα μέρη της ρόγας. Από τα ανόργανα ιόντα, το κάλιο, εκφρασμένο σε οξείδιο, αποτελεί το 50% του συνόλου των ανόργανων ιόντων και

βρίσκεται προς την περιφέρεια της ρόγας. Τα αζωτούχα συστατικά της σάρκας είναι το $\frac{1}{4}$ με $\frac{1}{5}$ των αζωτούχων συστατικών της ρόγας. Βρίσκονται σε μορφή ανόργανη (NH_4) ή σε οργανική ως αμινοξέα, πολυπεπίδια και πρωτεΐνες. Οι μέσες τιμές των κυριότερων αμινοξέων είναι: αργινίνη 327 mg/l (χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο), προλίνη 266 mg/l, θρεονίνη 258 mg/l, γλουταμινικό οξύ 173 mg/l (Καλλή, 2008). Τα παρεγχυματικά κύτταρα που δομούν τη σάρκα, αποτελούνται από κυτταρικές κύστες που περιέχουν τον κυτταρικό χυμό (γλεύκος). Ο κυτταρικός χυμός αντιπροσωπεύει το 64-90% του βάρους των ραγών. Η σάρκα απαρτίζεται από κύτταρα του μεσοκαρπίου και από κύτταρα της εξωτερικής και εσωτερικής στιβάδας του ενδοκαρπίου. Αυτά σχηματίζουν είκοσι με τριάντα περίπου στιβάδες πενταγωνικών ή εξαγωνικών κυττάρων, στα πρώτα επίπεδα των οποίων, τα τοιχώματα τους είναι λεπτά και εύθραυστα, με αποτέλεσμα να δημιουργείται κάτω από το φλοιό μια πλήρη ζώνη υγρού (Δημοπούλου, 2008). Επιπλέον οι μεμβράνες των συνεχόμενων κυττάρων δεν είναι ενωμένες μεταξύ τους σε όλη την περιφέρεια, αλλά αφήνουν στις γωνίες μικρούς, επικοινωνούντες χώρους μέσα από τους οποίους γίνονται οι εναλλαγές αερίων με το εξωτερικό περιβάλλον.



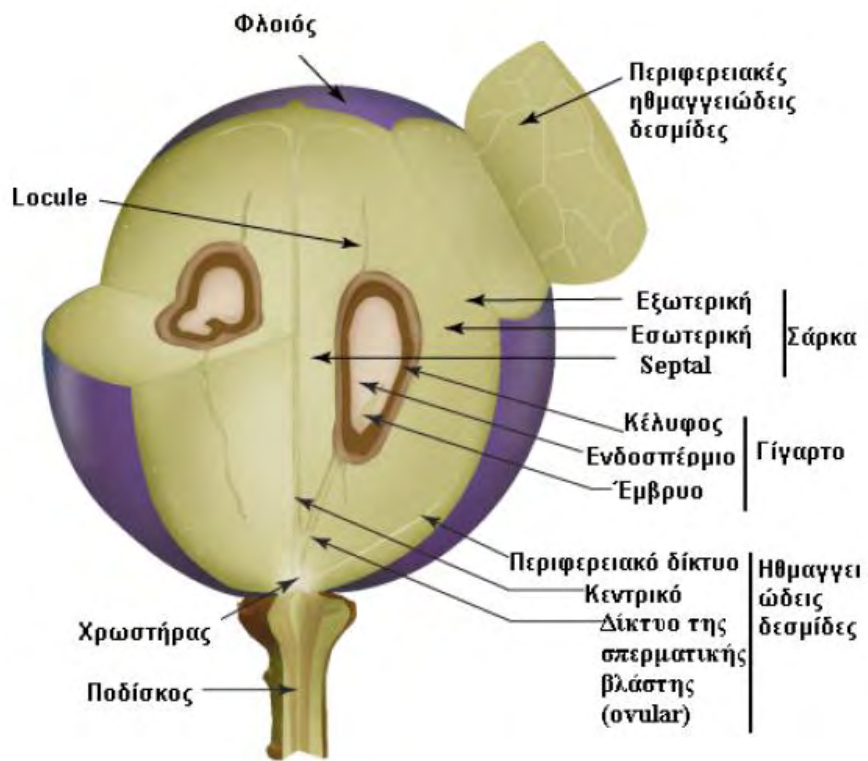
Εικόνα 24: Ανάλυση των κυριότερων συστατικών της ράγας: (b) σακχάρων, (c) κατιόντων και (d) οξέων, εκφρασμένων σε mg/g νωπού βάρους στα διαφορετικά της τμήματα (a, ζώνες). Η ζώνη (1) αντιστοιχεί στο φλοιό, η ζώνη (2) και (3) στο μεσοκάρπιο και η ζώνη (4) στο ενδοκάρπιο (Possner και Kliewer, 1985).

III. Τα Γίγαρτα.

Προέρχονται από τη γονιμοποίηση της σπερματικής βλάστης. Η ωοθήκη, όπως ήδη αναφέρθηκε, αποτελείται από δύο καρπόφυλλα και το κάθε καρπόφυλλο από δύο σπερματικές βλάστες. Συνεπώς, ο αριθμός των γιγάρτων κυμαίνεται από μηδέν έως τέσσερα. Τα γίγαρτα αποτελούνται από ένα οξύ μέρος, το ράμφος και από το ωοειδές τμήμα που καλείται σώμα. Το σώμα διαιρείται από ένα αυλάκι σε δύο λοβούς. Το γίγαρτο εσωτερικά εμπεριέχει τη σάρκα ή τον ιστό, όπως ονομάζεται διαφορετικά, που εσωτερικά του οποίου βρίσκεται το έμβρυο που αναπτύσσεται από τον εμβρυόσακκο και προστατεύεται εσωτερικά από το κέλυφος. Το κέλυφος αποτελείται από τρία στρώματα: το εξωτερικό, το μεσαίο και το εσωτερικό.

Το εξωτερικό στρώμα που αποτελεί το φλοιό, είναι μαλακό και περιέχει κόκκους αμύλου και ραφίδες οξαλοξικού ασβεστίου. Το μεσαίο στρώμα είναι σκληρό, αδιαπέραστο από το νερό, πλούσιο σε τανίνες και φέρει δύο με τρεις στιβάδες κυττάρων με πολύ παχιά τοιχώματα, ενώ τέλος το εσωτερικό στρώμα περιέχει μικρές ποσότητες αμύλου μαζί με δύο- τρεις στιβάδες κυττάρων με μαλακά τοιχώματα.

Τα γίγαρτα αποτελούν το 10% του βάρους των ραγών. Γενικά είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά όπως οι κατεχίνες και οι τανίνες. Οι τανίνες των σπόρων έχουν την ίδια συστατική μονάδα, όπως οι τανίνες του φλοιού αλλά εντοπίζονται σε μονομερή μορφή και όχι πολυμερισμένες. Η ποσότητά τους μειώνεται σημαντικά στο στάδιο της ωρίμανσης ενώ το επίπεδο των εστέρων γαλλικού οξέος παραμένει 30% πιο υψηλό από εκείνο του φλοιού και των μίσχων. Η ανάπτυξη αγίγαρτων ραγών ή ραγών με γίγαρτα τα οποία στερούνται των εμβρύων οφείλεται στο φαινόμενο της εξερεθισμού παρθενοκαρπίας και στενοσπερμοκαρπίας, αντίστοιχα. Έχει διαπιστωθεί, λοιπόν στις εγγίγαρτες ποικιλίες υψηλότερος ρυθμός αύξησης των ραγών κατά την αρχική φάση ανάπτυξης και εντονότερη επίσχεση του ρυθμού αύξησης κατά τη φάση II. Αυτή η παρατήρηση συνάδει με το γεγονός πως σ' αυτές τις ποικιλίες εντοπίζονται υψηλότερες συγκεντρώσεις αυξητικών ουσιών και αμψισικού οξέος σε σχέση με τις αγίγαρτες ποικιλίες. Γενικά το μέγεθος και η σύνθεση των ραγών επηρεάζεται από την παρουσία των γιγάρτων, με αποτέλεσμα όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των γιγάρτων τόσο μεγαλύτερου όγκου να είναι η ράγα, με συγκριτικά μικρότερες συγκεντρώσεις σακχάρων και νιτρωδών συστατικών αλλά με μεγαλύτερα επίπεδα οξύτητας (Δημοπούλου, 2008).



Εικόνα 25: Δομικά χαρακτηριστικά ώριμης ράγας (Kennedy, 2002).

13. Φαινολικά Συστατικά Σταφύλης και Στέμφυλων.

Το 1963 ο Herрман ανέφερε, ότι τα σταφύλια περιέχουν και άλλες ουσίες εκτός των ανθοκυανών. Τέτοιες ουσίες είναι το χλωρογενικό οξύ, το ισοχλωρογενικό οξύ, το νεόχλωρογενικό οξύ, ο εστέρας του π-κουμαρικού οξέος, φλαβονοδιόλες και οι προανθοκυανιδίνες, φλαβονόλες, φλαβονόνες όπως η ισοκερκετίνη, η κερκετίνη, η μυρικτρίνη, η γλυκοσιδάση της καμφερόλης και άλλα φαινολικά συστατικά όπως το γαλλικό, το ελαγικό οξύ και το προκατεχικό οξύ.

Τα σταφύλια περιέχουν επίσης βενζοϊκά και κινναμωμικά οξέα, που οι συγκεντρώσεις τους σε ερυθρούς οίνους κυμαίνεται στα 100-200 mg/L. Έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά επτά βενζοϊκά οξέα, ανάμεσα σ' αυτά το σαλικυλικό και γεντισικό οξύ. Τα διάφορα οξέα διαφοροποιούνται ως προς την υποκατάσταση στο βενζοϊκό δακτύλιο και στο σταφύλι βρίσκονται σε συνδυασμό με γλυκοσιδάσες (Galvin, 1993). Αντίστοιχα από τα κινναμωμικά οξέα, το π-κουμαρικό, το καφεϊκό και το φερουλικό έχουν ανιχνευτεί στα σταφύλια σε ελεύθερη μορφή σε μικρές συγκεντρώσεις, αλλά και κυρίως εστεροποιημένα με τρυγικό οξύ (Ribereau-Gayon, 1965), σχηματίζοντας εστέρες τρυγικού, όπως το καφταρικό οξύ, που είναι ιδιαίτερα οξειδώσιμα συστατικά του σταφυλικού χυμού. Τα κινναμωμικά οξέα συνδυάζονται επίσης με μονογλυκοζίτες των ανθοκυανινών, σχηματίζοντας ακυλιωμένες ανθοκυάνες, μέσω εστεροποίησης του καφεϊκού οξέος και του π-κουμαρικού με τη γλυκόζη του γλυκοζίτη.

Μια άλλη πολύπλοκη οικογένεια πολυφαινολών στα σταφύλια είναι τα στυλβένια, που διαθέτουν δύο βενζοϊκούς δακτυλίους, ενωμένους με αιθάνιο ή πιθανότατα αιθυλένιο. Μεταξύ των trans-ισομερών συστατικών, η ρεσβερατρόλη ή 3,5,4-τρι-υδροξυστυλβένιο, παράγεται από την άμπελο ως προστατευτικό σε μία μυκητολογική ασθένεια (Langcake, 1989) ενώ έχουν εντοπιστεί πολλά ολιγομερή αυτών στα είδη *Vitis Vinifera* (Jeandet et al., 1995, Bourhis et al., 1996).

Η άμπελος (*Vitis Vinifera*) είναι ένα από τα πιο καλλιεργούμενα φρούτα στο κόσμο, με ετήσια παραγωγή περίπου εξήντα εκατομμύρια τόνους (FAD STAT Database, 2002). Τα κύρια υποπροϊόντα που λαμβάνονται κατά την αποβοστρύχωση, σύνθλιψη και συμπίεση των σταφυλιών είναι τα στέμφυλα (A. Brenes et al, 2007). Τα στέμφυλα, λοιπόν αποτελούν τα στερεά υπολείμματα οινοποίησης, που απομένουν μετά την έκθλιψη και πίεση των σταφυλιών για την παραλαβή του γλεύκους κατά την

οινοποίηση. Περιλαμβάνουν τον φλοιό, τα γίγαρτα και τους βοστρύχους των σταφυλιών, αντιπροσωπεύοντας το 12% του βάρους των λευκών και το 14% του βάρους των ερυθρών οινοποιηθέντων σταφυλιών.



Εικόνα 26: Στέμφυλα, κόκκινων σταφυλιών, μετά τη διαδικασία σύνθλιψης και απομάκρυνσης του χυμού τους.

Κατά την ερυθρά οινοποίηση τα στέμφυλα εξαιρουμένων των βοστρύχων που διαχωρίζονται πριν την πίεση των σταφυλιών, συμμετέχουν στη ζύμωση του γλεύκους σε οίνο προκειμένου να εκχυλιστούν οι χρωστικές και άλλες ουσίες που επηρεάζουν θετικά τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου. Δηλαδή οι φλοιοί και οι σπόροι βρίσκονται σε επαφή για αρκετές ημέρες κατά τη ζύμωση του κρασιού, υπόκεινται έτσι σε μία απλή αλλά παρατεταμένη αιθανολική εξόρυξη, παρέχοντας στο κρασί υψηλή περιεκτικότητα σε φαινόλες. Παρ' όλα αυτά τα κατάλοιπα που απομένουν μετά τη ζύμωση, οι φλούδες, οι σπόροι και ο πυρήνας των σπόρων, εξακολουθούν να περιέχουν υψηλά επίπεδα πολυφαινολών, με τις περισσότερες να διατηρούνται στο κεντρικό μέρος του φλοιού (Pinelo et al, 2006). Η σύνθεση λοιπόν των στέμφυλων όπως εξέρχονται από τις δεξαμενές ζύμωσης- εκχύλισης (ερυθροί οινοποιητές) είναι συνήθως η εξής:

Σύνθεση Στέμφυλων

Περιεκτικότητα εκφρασμένη σε
ποσοστό%

Φλοιοί	50
Γίγαρτα	20
Αλκοόλη	5
Υγρασία	25
Σύνολο	100

Πρόσφατες έρευνες έχουν τονίσει τη σημασία των υποπροϊόντων οινοποίησης καθώς αναγνωρίζονται ως φυτικές ύλες ιδιαίτερα πλούσιες σε ένα ευρύ φάσμα πολυφαινόλων. Οι φλοιοί των σταφυλιών καθώς και τα γίγαρτα περιέχουν μεγάλα ποσοστά φλαβονοειδών, συμπεριλαμβανομένων και των μονομερών φαινολικών ενώσεων όπως η (+)-κατεχίνη, η (-)- επικατεχίνη- 3-O- γαλλικό καθώς και διμερείς, τριμερείς και τετραμερείς προακυανιδίνες (A.Brenes et al, 2007).

Ένωση	Στέμφυλα	Φλοιός	Σπόρια	Μίσχος
Γαλλικό οξύ	0,03-0,11	0,03	0,10-0,11	-
Κουταρικό οξύ	0-1,23	0,03-1,23	-	-
Καφταρικό οξύ	0-6,97	0,11-6,97	-	0,04
Κατεχίνη	0-0,18	0-0,16	2,14-2,15	0,06
Επικατεχίνη	0-0,16	0-0,13	0,88-0,91	0,28
Επικατεχίνη-3-γαλλική	0-0,03	0,04	0,25-0,31	0,07
Ταννίνες	0,22-2,32	1,61	3,56-6,15	0,22-0,89
Ολικές φλαβαν-3-όλες	0,34-4,25	0,12-3,38	3,56-6,15	0,22-0,89
Ολικές ανθοκυανίνες	11,47-29,82	11,47-29,82	-	-
Ολικές φλαβονόλες	0,03-0,63	0,48-0,63	0,02-0,05	0-0,22

Πίνακας 8: Οι φαινολικές ενώσεις στα σταφύλια. Οι τιμές του πίνακα είναι εκφρασμένες σε mg/g (Pinelo et al, 2006).

14. Εναλλακτικές χρήσεις Στέμφυλων

Μεγάλες ποσότητες παραγόμενων καταλοίπων οινοποίησης, προκαλούν προβλήματα τόσο από οικονομική όσο και από περιβαλλοντική και οικολογική άποψη. Πειραματικά αποτελέσματα, έχουν καταδείξει πως τα στέμφυλα και τα προϊόντα αποστράγγισής τους, μπορούν να αλλοιώσουν τη δομή του εδάφους λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων καλίου αλλά και να προκαλέσουν μόλυνσή του, όπως και των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων λόγω παρουσίας υψηλών συγκεντρώσεων αζώτου, φωσφόρου και οργανικών συστατικών. Τόσο τα νιτρικά όσο και τα φωσφορικά ιόντα κάτω από υπέρμετρη αύξηση της συγκέντρωσής τους μπορούν συμβάλλουν στον εμπλουτισμό των υδάτων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση του περιβαλλοντικού προβλήματος του ευτροφισμού, την πτώση της ποιότητας των υδάτων όπως και τη μεταβολή της χλωρίδας και πανίδας σ' αυτά.



Εικόνα 27 : Εναπόθεση των υποπροϊόντων της οινοποίησης (στέμφυλα) στο περιβάλλον.

Από την ανάλυση των υπολειμμάτων της βιομηχανίας οίνου (Bustamande et al., 2008), διαπιστώθηκε σ' αυτά χαμηλό pH, με τις τιμές του να κυμαίνεται από 3,8 έως 6,8 , ηλεκτρική αγωγιμότητα $1,62-6,15 \text{ dSm}^{-1}$, υψηλό οργανικό περιεχόμενο από $669-920 \text{ gkg}^{-1}$ που οφείλεται στην προσθήκη ουσιών και μικροοργανισμών όπως οι πρωτεΐνες και οι ζύμες κατά την οινοποίηση , μεγάλες συγκεντρώσεις

μακροθρεπτικών και ιδίως καλίου ($11,9-72,8 \text{ gkg}^{-1}$) κυρίως λόγω καθίζησης του όξινου τρυγικού καλίου κατά τη διαδικασία της οινοποίησης, όπως και πολυφαινολών ($1,2-19,0 \text{ gkg}^{-1}$), ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων (Fe, Cu, Mn, Zn), όπως του Cu λόγω καθίζησης του θείου και του σιδήρου, αλλά και βαριών μετάλλων (κυρίως Pb) επίσης εντοπίστηκαν. Όσον αναφορά τα βαρέα μέταλλα, τα επίπεδά τους παρουσίαζαν μεταβλητότητα, κάτι που μπορεί να οφείλεται στο έδαφος, στα εξαρτήματα του εξοπλισμού οινοποίησης και απόσταξης, στο υλικό των φιαλών, στα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στο αμπέλι, όπως ακόμα και στη βροχή ειδικά στην περίπτωση του Pb (Zoecklein et al., 1999). Τα υψηλά επίπεδα υπολειμματικών φαινολικών ενώσεων, μπορεί να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον, κυρίως λόγω της αναστολής της βλάστησης και της ακινητοποίησης του αζώτου που προκαλείται από τη δράση τους. Οι πολυφαινόλες σχετίζονται με τον κύκλο του αζώτου. Συγκεκριμένα, έχουν την ικανότητα να προκαλούν καθίζηση πρωτεϊνών, καθώς δεσμεύονται μ' αυτές, μέσω υψηλής συγγένειας για τις ομάδες αμιδίου, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται σύμπλοκα που είναι αδύνατο να χρησιμοποιηθούν από τη βιοκοινότητα και από την άλλη λόγω της χημικής τους δραστηριότητας, αφού επιδρούν άμεσα στους μικροοργανισμούς του εδάφους που εμπλέκονται στην ανοργανοποίηση- ακινητοποίηση του αζώτου (Scalbert, 1991). Αυτό έχει σαν συνέπεια την αύξηση των επιπέδων του ανόργανου αζώτου, με επιβράδυνση της διαδικασίας ακινητοποίησης του, κάτι που φαίνεται να εξαρτάται τόσο από τον τύπο του εδάφους όσο και από τα υπολείμματα, παράγοντες που επιδρούν αντίστοιχα και στην ανοργανοποίηση του άνθρακα (Bustamante et al., 2006). Οι ιδιότητες αυτές είναι ασύμβατες με τις γεωργικές απαιτήσεις και ως εκ τούτου τα υποπροϊόντα αυτά θα πρέπει να υφίστανται κατάλληλη επεξεργασία πριν τη χρήση (Bustamante et al., 2008).

Συνεπώς, κάθε χρήσιμη επαναξιοποίηση των υποπροϊόντων οινοποίησης αφορά, μια ενδιαφέρουσα πρόοδο στη διατήρηση της περιβαλλοντικής ισορροπίας όπως επίσης και μία οικονομική επανεκτίμηση της πρώτης ύλης. Τα στέμφυλα μπορούν αξιοποιηθούν με διαφορετικούς τρόπους (R. Deversa-Rey, 2011):

- Ως λίπασμα μετά από κομποστοποίηση τους, με βέλτιστες αναλογίες 1:1 υδρολυμένα στέμφυλα- οινολάσπης και $5 \text{ g CaCO}_3/100 \text{ g}$ υδρολυμένων στέμφυλων ώστε τελικά το pH να αυξηθεί σε 7,1 έως 8,1 και η αρχική φυτοτοξικότητα να εξαλειφθεί.

- Για καύση με σκοπό την ανάκτηση του ενεργειακού τους περιεχομένου.
- Για διαχωρισμό και ανάκτηση της περιεχόμενης αιθυλικής αλκοόλης και του όξινου τρυγικού καλίου, ένα σταθερό οξύ, που έχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών αφού χρησιμοποιείται εναλλακτικά αντί του κιτρικού και φωσφορικού οξέος.
- Για την παραγωγή γιγαρτέλαιου, που θεωρείται υψηλής ποιότητας εδώδιμο προϊόν.
- Για την παραγωγή εκχυλίσματος ανθοκυανών αναγνωρισμένων χρωστικών για τα τρόφιμα (φυσική χρωστική E163), ειδικά από στέμφυλα ερυθρών ποικιλιών.
- Για παραγωγή άλλων εκχυλισμάτων σταφύλης.
- Ως ζωοτροφή, όπως χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

15. Παραγωγή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών

Τα τελευταία χρόνια, με σκοπό την βελτιστοποίηση της αποδοτικότητας της κτηνοτροφικής και ζωικής παραγωγής και την ευζωία των ζωικών οργανισμών, η ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών φυτικής και ζωικής προέλευσης, ως πρόσθετες ύλες, για την δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον, αφού σε αυτά αποδίδεται μεγάλη ποικιλία ευεργετικών και θεραπευτικών ωφελειών. Ως ζωοτροφή, ορίζεται κάθε ύλη η οποία μετά την πρόσληψή και την πέψη της μπορεί να απορροφηθεί και να χρησιμοποιηθεί από τον οργανισμό του ζώου. Στην ηλικία απογαλακτισμού τα νεαρά ζώα είναι επιρρεπή σε ασθένειες λόγω της μειωμένης αντιοξειδωτικής τους άμυνας, που παρουσιάζουν σε σύγκριση με τα ενήλικα, με αποτέλεσμα εξαιτίας του στρες απογαλακτισμού να θεωρείται απαραίτητη η χορήγηση θρεπτικών βιοδραστικών συστατικών που θα έχουν και αντιοξειδωτική δράση. Η χορήγηση λοιπόν αντιοξειδωτικών μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική και χαμηλού κόστους παρέμβαση για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων των κτηνοτροφικών ζώων στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες (Lykkesfeldt and Svendsen 2007).

Πρόσφατα, έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς τις ευεργετικές ιδιότητες εκχυλισμάτων από στέμφυλα, και ιδιαίτερα αυτά τα οποία προέρχονται κυρίως από τα κόκκινα σταφύλια, λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης η οποία βασίζεται κυρίως στην σημαντικά υψηλή περιεκτικότητα τους σε πολυφαινόλες. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες έδειξαν ότι εκχύλισμα στέμφυλων, πλούσιο σε πολυφαινόλες, ενισχύει τους ενδοκυττάριους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς όπως αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH), επιδρώντας στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων, ενώ προσφέρει προστασία υπό την παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (Tert-butylhydroperoxide) (Goutzourelas et al., 2014).



Εικόνα 28: Υποπροϊόντα οινοποίησης, στέμφυλα.

Η ορθή επιλογή, η κατάρτιση των ζωοτροφών και η ακριβή γνώση της θρεπτικής τους αξίας, είναι απαραίτητα ώστε να καλύπτουν επαρκώς τις διατροφικές ανάγκες των ζώων, συμπιέζοντας παράλληλα το κόστος παραγωγής. Αυτό βέβαια, προϋποθέτει τον ακριβή καθορισμό των αναγκών των ζώων σε ενέργεια και θρεπτικά συστατικά. Έτσι, για την κατάρτιση των παρακάτω βιολειτουργικών ζωοτροφών, χρησιμοποιήθηκαν συστατικά που περιέχουν όλες τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες που πληρούν τις ενεργειακές ανάγκες και εξασφαλίζουν την υγεία των προβάτων, ενώ ενσωματώθηκαν, ως πρόσθετες ύλες, βιοδραστικά συστατικά φυτικής και ζωικής προέλευσης με αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική δράση.

B. Πειραματικό Μέρος

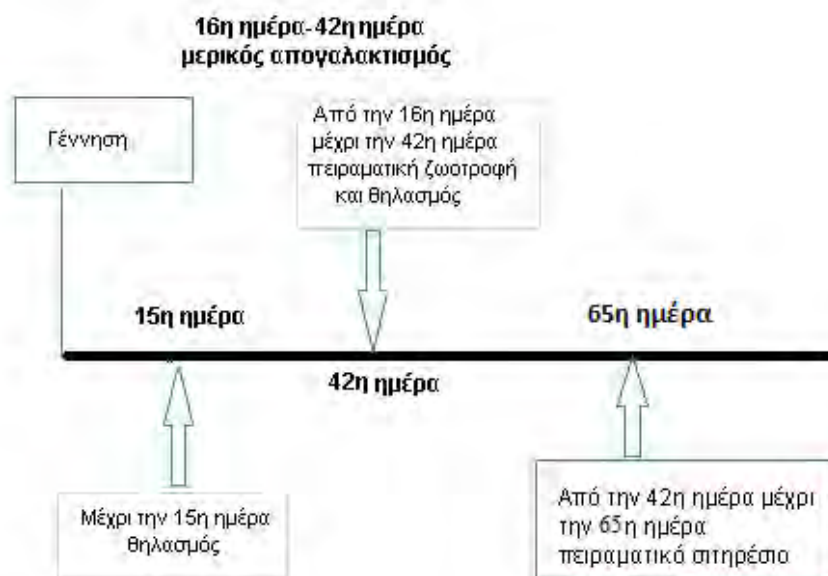
1. Γενικά

Για το σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε εκτροφή νεαρών προβάτων με εφαρμογή σιτηρεσίου και συνθηκών ομαλής διαβίωσης και ανάπτυξης στις πειραματικές εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής Γιαννιτσών του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ.

Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν 24 αρσενικά αρνιά φυλής Χίου, ηλικίας περίπου 15 ημερών, από το ποίμνιο του Ινστιτούτου Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής Γιαννιτσών. Τα αρνιά χωρίστηκαν σε δύο (2) ομοιόμορφες πειραματικές ομάδες, ως προς το σωματικό βάρος ($7,99 \pm 1,801$ Kg) και την ηλικία ($15,4 \pm 3,53$ ημέρες) και παρέμειναν με τις μητέρες τους για θηλασμό, μέχρι την ηλικία απογαλακτισμού, σε ομαδικά κελιά, έχοντας ταυτόχρονα πρόσβαση σε πειραματικό μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΜΣΖ) και σανό μηδικής, για κατανάλωση κατά βούληση. Η πειραματική διαδικασία χωρίστηκε σε δύο (2) φάσεις. Στην πρώτη φάση, στην ομάδα του μάρτυρα (ομάδα Α, n=12) χορηγήθηκε σύνηθες ΜΣΖ ανάπτυξης, ενώ στην ομάδα Β (n=12) χορηγήθηκε ΜΣΖ, στο οποίο ενσωματώθηκε ενσίρωμα μίγματος αραβόσιτου και στέμφυλων οινοποιίας, σε αντικατάσταση του καρπού αραβοσίτου. Τα πειραματικά ΜΣΖ ήταν ισοενεργειακά και ισοπρωτεϊνικά και ισόρροπα ως προς τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων αρνιών.

Από την έναρξη της πειραματικής πορείας και μέχρι τον απογαλακτισμό (ηλικία 42 ημερών) τα αρνιά είχαν συνεχή πρόσβαση στο πειραματικό σιτηρέσιο σε ξεχωριστό χώρο, στην οποία δεν είχαν πρόσβαση οι μητέρες τους. Τα αρνιά απομακρύνονταν από τις μητέρες τους καθημερινά μια ώρα το πρωί και μια ώρα το απόγευμα κατά τη διάρκεια του ταΐσματος των μητέρων.

Στην ηλικία των 42 ημερών πραγματοποιήθηκε ο απογαλακτισμός τους και έτσι έξι αρνιά από κάθε ομάδα οδηγήθηκαν στη σφαγή, ενώ τα υπόλοιπα έξι (6) διατηρήθηκαν μέχρι την ηλικία των 65 ημερών (φάση δεύτερη), που τα ζώα εσφάγησαν. Στην τελευταία αυτή φάση συνεχίστηκε η χορήγηση των ίδιων πειραματικών σιτηρεσίων με εκείνα της πρώτης φάσης, για κατανάλωση κατά βούληση.



Εικόνα 29: Σχεδιάγραμμα πειραματικής πορείας για την εκτροφή και απογαλακτισμό των αναπτυσσόμενων αρνιών.

Η χορήγηση του σιτηρεσίου γινόταν καθημερινά και στις δύο περιόδους, με την ποσότητά του να αυξάνεται ανάλογα με την κατανάλωση. Ταυτόχρονα, έγινε και προσδιορισμός της κατανάλωσης της τροφής, όπως παρουσιάζεται παρακάτω, μετρώντας και ζυγίζοντας επί καθημερινή βάση, τα υπολείμματα, από την προηγούμενη μέρα ενώ τα αρνιά ζυγίζονταν περιοδικά, καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

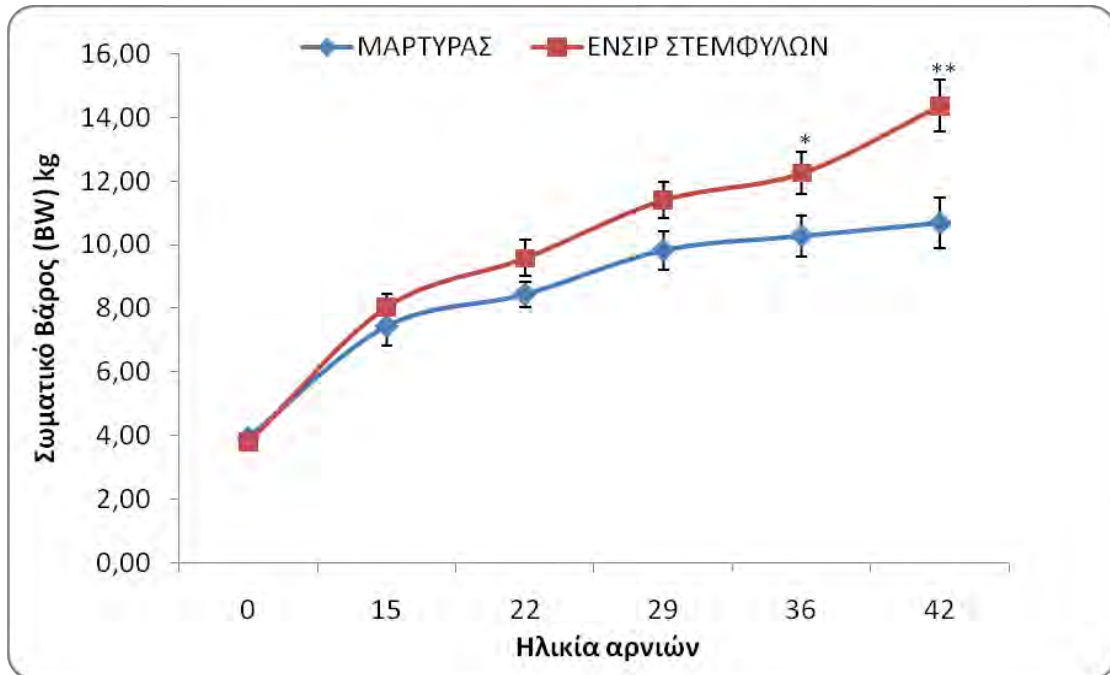


Εικόνα 30: Οι αναπτυσσόμενοι αμνοί στο χώρο των εγκαταστάσεων.

1.2 Αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των αμνών κατά την πειραματική πορεία.

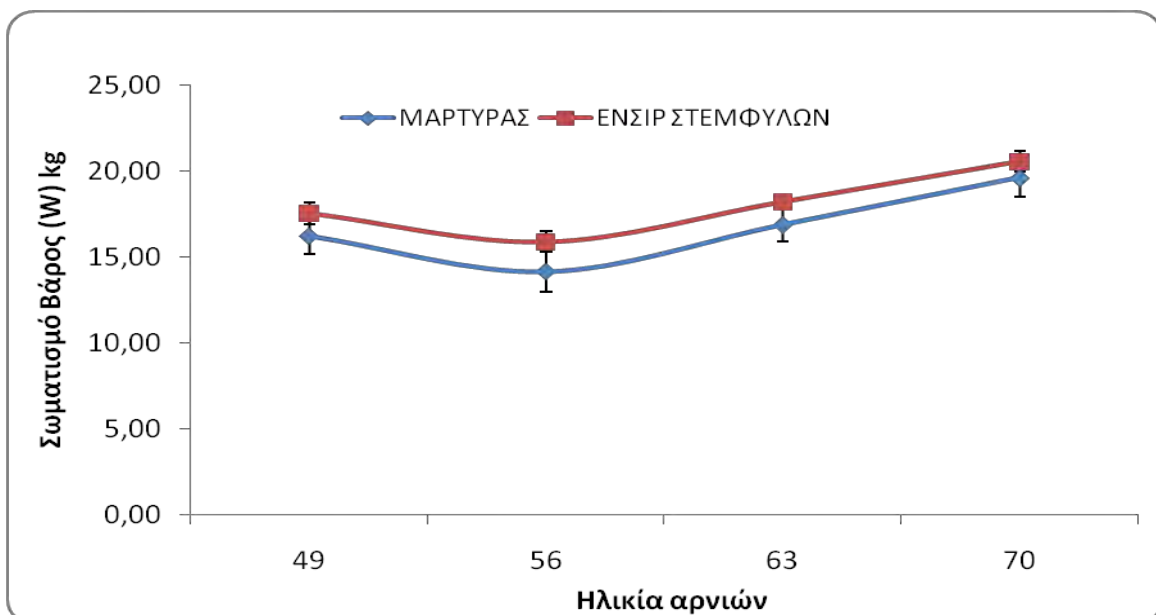
Αυτά τα οποία προσδιορίστηκαν ήταν, η εξέλιξη του σωματικού βάρους τόσο καθ' όλη την περίοδο της ανάπτυξής τους όσο και η ημερήσια αύξηση, όπως και η ημερήσια κατανάλωση τροφής. Πιο συγκεκριμένα, η μεταβολή του σωματικού βάρους αρχικά μελετήθηκε κατά την πρώτη φάση, δηλαδή από τη γέννηση μέχρι τον

απογαλακτισμό όλων των αρνιών (n=12/ομάδα), με την παρατήρηση ότι τα αρνιά, στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο, στο οποίο ενσωματώθηκε ενσίρωμα αραβοσίτου-στέμφυλων οινοποιίας, παρουσίασαν μεγαλύτερα σωματικά βάρη από την 36^η ημέρα (P<0,05) μέχρι τον απογαλακτισμό (P<0,01), σε σχέση με την ομάδα μάρτυρα (διάγραμμα 1).



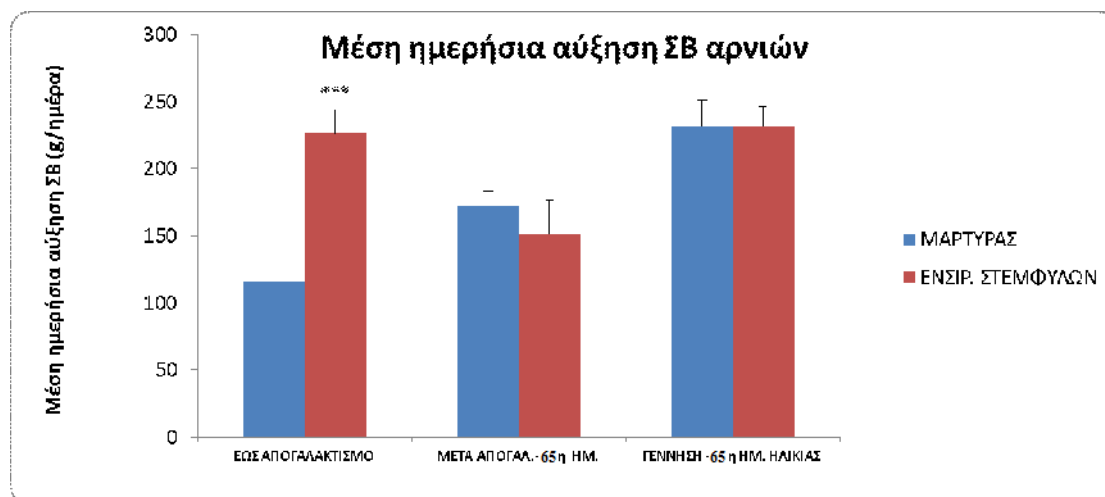
Διάγραμμα 1: Εξέλιξη του σωματικού βάρους των αρνιών (n=12/ομάδα) από τη γέννηση μέχρι τον απογαλακτισμό (φάση πρώτη).

Αντίθετα, μετά τον απογαλακτισμό το σωματικό βάρος των αρνιών δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων (διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2: Εξέλιξη του σωματικού βάρους των αρνιών (n=6/ομάδα), κατά τη δεύτερης φάσης του πειραματισμού, από τον απογαλακτισμό μέχρι και την ηλικία των 65 ημερών.

Ανάλογα η μεταβολή του σωματικού βάρους, προσδιορίστηκε και ημερησίως (ADG) τόσο από την έναρξη του πειραματισμού μέχρι τον απογαλακτισμό, όσο και μέχρι την ηλικία των 65 ημερών, με τις παρατηρήσεις να είναι αντίστοιχες όπως και προηγουμένως όσον αφορά την πρώτη φάση. Δηλαδή η ομάδα στην οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο, στο οποίο ενσωματώθηκε ενσίρωμα αραβοσίτου-στέμφυλων οινοποιίας, να σημειώνει μεγαλύτερο ημερήσιο ρυθμό ανάπτυξης ($P < 0,001$) (διάγραμμα 3). Αντιστρόφως, ο ημερήσιος ρυθμός ανάπτυξης μετά τον απογαλακτισμό και μέχρι την ηλικία των 65 ημερών (δεύτερη φάση) παρουσιάστηκε λίγο υψηλότερος στην ομάδα του μάρτυρα, με αποτέλεσμα στο σύνολο από την έναρξη του πειραματισμού μέχρι την ηλικία των 65 ημερών να μη διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων (διάγραμμα 3).

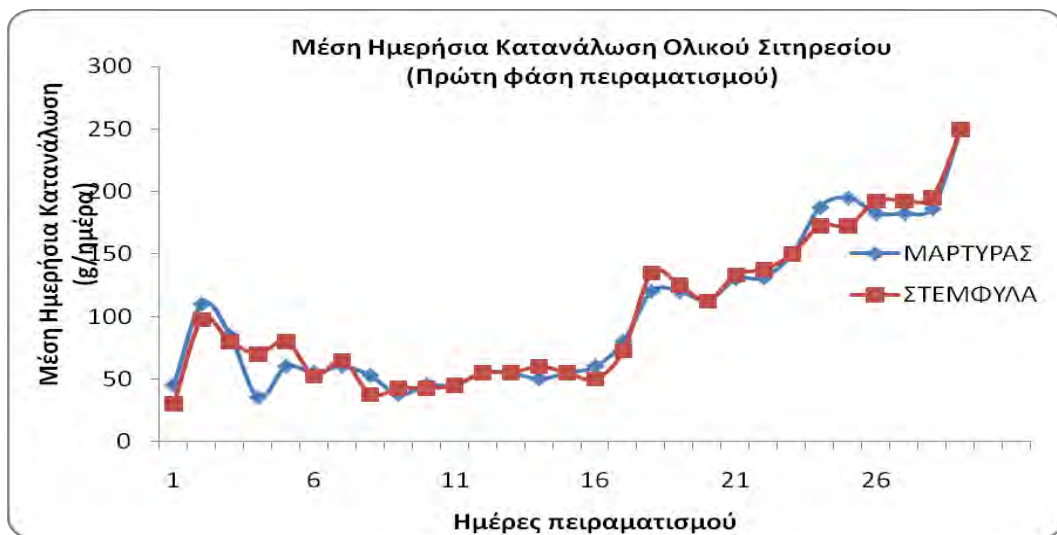


Διάγραμμα 3: Ημερήσια αύξηση σωματικού βάρους (ADG) αρνιών.

Όπως προαναφέρθηκε, όμως σε καθημερινή βάση έγινε και καταγραφή της μέσης ημερήσιας κατανάλωσης τροφής, όπως παρουσιάζεται στα παρακάτω διαγράμματα, αντίστοιχων διατροφικών φάσεων, δηλαδή: κατά την ημερήσια κατανάλωση του ΜΣΖ στην πρώτη φάση του πειραματισμού (έναρξη έως τον απογαλακτισμό) (διάγραμμα 4), κατά την ημερήσια κατανάλωση του ολικού σιτηρεσίου (ΜΣΖ και σανό μηδικής) πάλι στην πρώτη περίοδο (διάγραμμα 5) και τέλος κατά την ημερήσια κατανάλωση των πειραματικών ΜΣΖ και των ολικών σιτηρεσίων, στη δεύτερη φάση (διαγράμματα 6 και 7 αντίστοιχα), χωρίς όμως να σημειώνονται σημαντικές διακυμάνσεις. Βέβαια δεδομένου ότι η διατροφή των αρνιών ήταν ομαδική, δεν ήταν δυνατή η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της κατανάλωσης τροφής.



Διάγραμμα 4: Μέση ημερήσια κατανάλωση του ΜΣΖ κατά την πρώτη φάση του πειραματισμού.



Διάγραμμα 5: Μέση ημερήσια κατανάλωση ολικού σιτηρεσίου κατά την πρώτη φάση του πειραματισμού.



Διάγραμμα 6: Μέση ημερήσια κατανάλωση του ΜΣΖ κατά την δεύτερη φάση του πειραματισμού.



Διάγραμμα 7: Μέση ημερήσια κατανάλωση του ολικού σιτηρεσίου κατά την δεύτερη φάση του πειραματισμού.

Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, εκτιμήθηκε και ο συντελεστής εκμετάλλευσης ή αξιοποίησης της τροφής (Feed Conversion Rate:FCR) που ορίζεται ως ο λόγος της καταναλισκόμενης ποσότητας τροφής προς το βάρος του παραγόμενου προϊόντος ή την αύξηση του σωματικού βάρους. Έτσι από τον απογαλακτισμό και μέχρι την ηλικία των 65 ημερών ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής (FCR) ήταν 5,7 και 6,9 για την ομάδα μάρτυρα και την ομάδα στις οποίες προστέθηκε στο σιτηρέσιο το ενσίρωμα αραβοσίτου-στέμφυλων οινοποιίας, αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, λοιπόν γίνεται κατανοητό πως οι βιολειτουργικές ζωοτροφές εμπλουτισμένες με πολυφαινόλες (στέμφυλα) συνεισφέρουν σημαντικά στην ανάπτυξη των αναπτυσσόμενων αρνιών ιδιαίτερα κατά την περίοδο του απογαλακτισμού τους. Συγκεκριμένα από την μία αυξάνεται η παραγωγικότητα τους (μεγαλύτερος ρυθμός ανάπτυξης), στην φάση του απογαλακτισμού και από την άλλη το οικονομικό όφελος είναι σημαντικό, αφού όπως προκύπτει από τις τιμές τις μετατρεψιμότητας της τροφής σε βάρος των ζώων, απαιτείται λιγότερη τροφή για να επιτευχθεί μεγαλύτερο κέρδος βάρους.

2. Βιολειτουργική Ζωοτροφή

Για το σκοπό της μελέτης παρασκευάστηκαν δύο είδη σιτηρεσίων, κανονικό σιτηρέσιο (χορήγηση σε ομάδα Α, ελέγχου-control) και σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με ενσίρωμα στέμφυλων (χορήγηση σε ομάδα Β). Η σύσταση του σιτηρεσίου για την ομάδα control (Α) είναι: καλαμπόκι, γάλα φυράματος, σογιάλευρο, πίτυρα, ισορροπιστής αρνιών, μονοφωσφορικό ασβέστιο, μαρμαρόσκονη, άλας ενώ για την ομάδα (Β): καλαμπόκι ενσιρωμένο με εκχύλισμα στεμφύλων, γάλα φυράματος, σογιάλευρο, πίτυρα, ισορροπιστής αρνιών, μονοφωσφορικό ασβέστιο, μαρμαρόσκονη και άλας, με τα ακριβή ποσοστά αυτών να παρουσιάζονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες.

ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ ΕΛΕΓΧΟΥ (ΟΜΑΔΑ Α)	
ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%
ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΣ	45
ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ	9
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	21
ΓΑΛΑ	20
ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5
ΑΛΑΣ	0,5
ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ	1,2
ΦΩΣΦ. ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ	0,8
ΣΥΝΟΛΟ	100

Πίνακας 9 Σύσταση παρασκευασμένων σιτηρεσίων, ομάδα control.

ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ ΜΕ ΕΝΣΙΡΩΜΑ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ (ΟΜΑΔΑ Β)	
ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%
ΕΝΣΙΡΩΜΑ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ	45
ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ	9
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	21
ΓΑΛΑ	20
ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5
ΑΛΑΣ	0,5
ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ	1,2
ΦΩΣΦ. ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ	0,8
ΣΥΝΟΛΟ	100

Πίνακας 10 Σύσταση παρασκευασμένων σιτηρεσίων, ομάδα στεμφύλων.

2.1 Παρασκευή ενσιρώματος στεμφύλων.

Η ενσίρωση είναι η διαδικασία ζύμωσης φυτικών προϊόντων με υψηλό ποσοστό υγρασίας και υπό αναερόβιες συνθήκες, με σκοπό τη διατήρηση του προϊόντος αλλά και τη βελτίωση της θρεπτικής του αξίας, για χρήση ως ζωοτροφή. Το ενσίρωμα στεμφύλων παρασκευάστηκε πριν την δημιουργία των ζωοτροφών και η σύστασή είναι: καλαμπόκι (άλευρο), στέμφυλα (ποικιλία μοσχάτο - κόκκινο) και νερό, καλά καθορισμένη με συνυπολογισμό της υγρασίας των στέμφυλων και του καλαμποκιού, ώστε το τελικό προϊόν να έχει ποσοστό 60% στερεών. Με την ανάμειξη των συστατικών το ενσίρωμα τοποθετήθηκε σε σακούλες κενού αέρος και παρακολούθησε διαδικασία ζύμωσης, χάριν στη προσθήκη βακτηρίων (*Lactobacillus*) τα οποία επιβιώνουν σε αναερόβιες συνθήκες. Μετά το πέρας 2-4

ημερών (ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος), ήταν αναγκαίο οι σακούλες να ανοίγονται και να κλείνουν ξανά αεροστεγώς. Αυτή η διαδικασία εκτελέστηκε τέσσερις (4) φορές και ήταν απαραίτητη λόγω της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα από τη δράση των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η ενσίρωση είναι μία πορεία που πραγματοποιείται κάτω από αναερόβιες συνθήκες και έτσι η μη αφαίρεση του διοξειδίου, αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για το άνοιγμα των συσκευασιών, την επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα και την αναστολή της αντίδρασης.



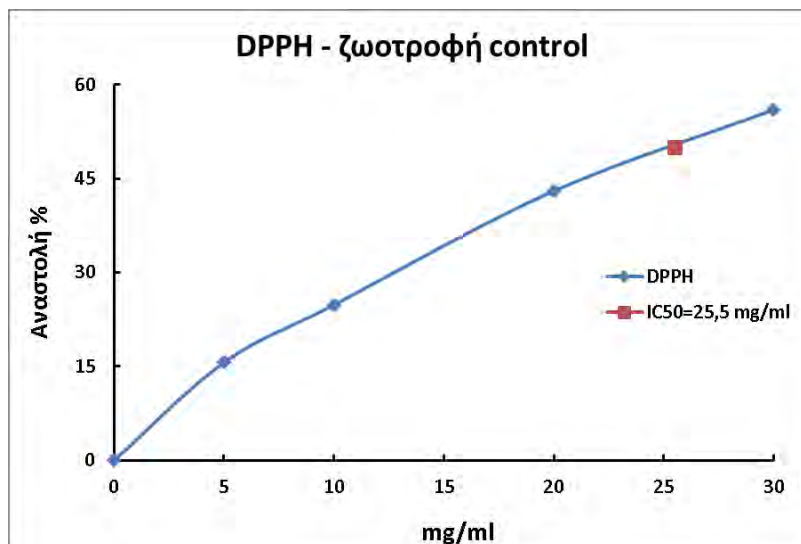
Εικόνα 31: Συσκευασία ενσιρώματος στεμφύλων.

Το pH του τελικού ενσιρώματος, θα πρέπει να είναι μικρότερο του 4,1 για τη διατήρηση των όξινων συνθηκών που εξασφαλίζουν την διατήρηση της υγρασίας και της γεύσης του. Γι' αυτό το σκοπό ανά τακτά χρονικά διαστήματα, λαμβάνονταν δείγματα με σκοπό τη μέτρηση και τη ρύθμιση του pH. Ο προσδιορισμός του έγινε με 2 μεθόδους. Στην πρώτη μέθοδο έγινε αραιώση 1/10 του ενσιρώματος. Δηλαδή σε 1 γραμμάριο ενσιρώματος προστέθηκαν 9 ml απεσταγμένου νερού και το μίγμα αναδεύθηκε έντονα με vortex για τουλάχιστον 20 λεπτά, με την τιμή του pH τελικά να είναι 3,82. Με την δεύτερη μέθοδο έγινε αραιώση 1/2 του ενσιρώματος. Δηλαδή σε 5 γραμμάρια ενσιρώματος προστέθηκαν 5 ml απεσταγμένου νερού και ανάλογα όπως αναφέρθηκε πιο πάνω ακλούθησε έντονη ανάδευση με vortex για τουλάχιστον 20 λεπτά. Τέλος μετρήθηκε το pH με την τιμή του να είναι 3,80, παρόμοια σε σχέση με την πρώτη μέθοδο. Χωρίς να παρουσιάζονται λοιπόν σημαντικές διαφορές στην τιμή του pH, τελικά η διαδικασία ολοκληρώθηκε με τον τερματισμό της παραγωγής

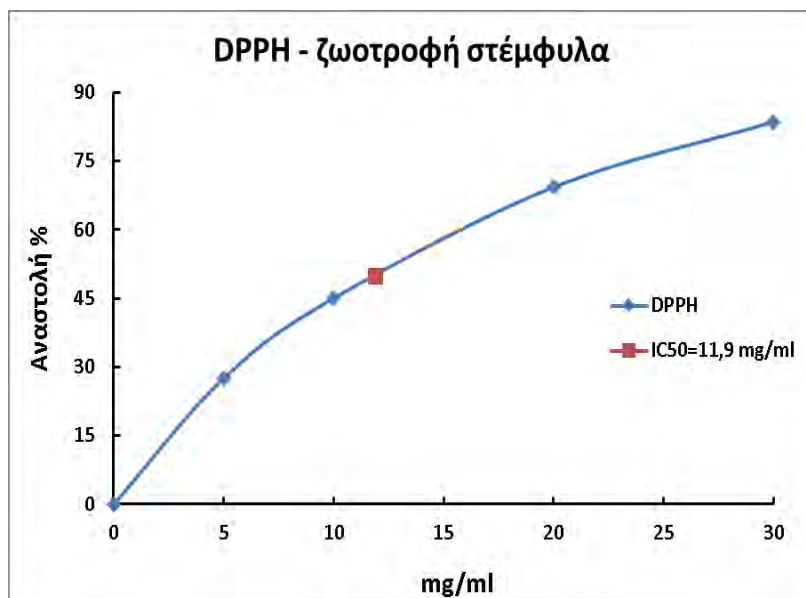
του διοξειδίου του άνθρακα από τα βακτήρια, με το τελικό προϊόν να χαρακτηρίζεται από την μη παρουσία διοξειδίου, από σκούρο χρώμα, από μεγάλα ποσοστά υγρασίας και οργανικών οξέων, όπως το γαλακτικό οξύ.

2.3 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των παρασκευασμένων ζωοτροφών για τα πρόβατα Ελληνικής φυλής, «Χιώτικα».

Η αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των πειραματικών ζωοτροφών πραγματοποιήθηκε, σύμφωνα τη μέθοδο προσδιορισμού εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH και τη μέθοδο εκτίμησης της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS, τόσο για την ζωοτροφή control όσο και για την εμπλουτισμένη ζωοτροφή. Η πρώτη μέθοδος βασίζεται στη χρήση της ρίζας του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), η οποία παρουσία μιας αντιοξειδωτικής ένωσης, που λειτουργεί ως δότης ιόντων υδρογόνου, ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η μετατροπή της ρίζας (DPPH[•]) υπολογίστηκε με φωτομέτρηση στα 520 nm (Apostolou et al., 2013), με τα αποτελέσματα να φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα 8 και 9.

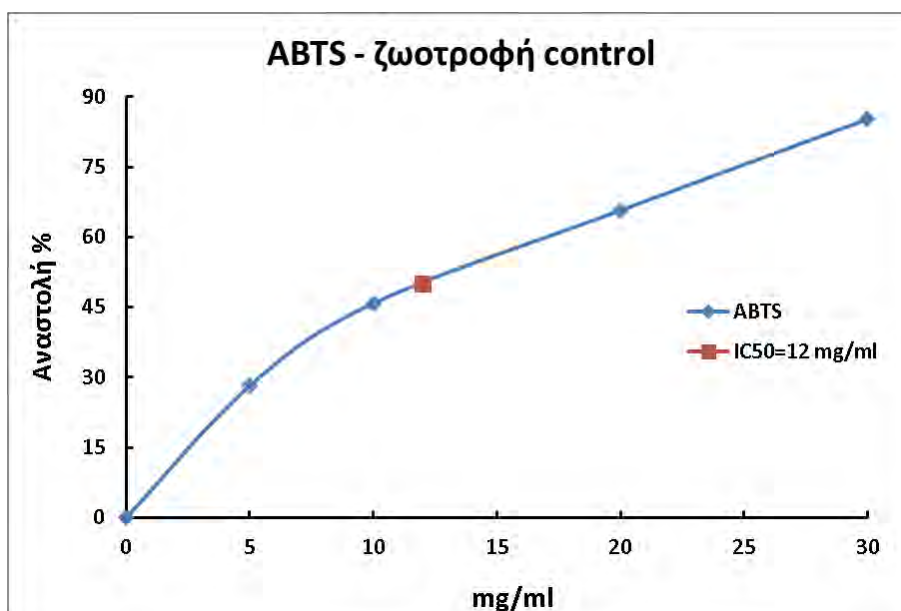


Διάγραμμα 8: % εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.

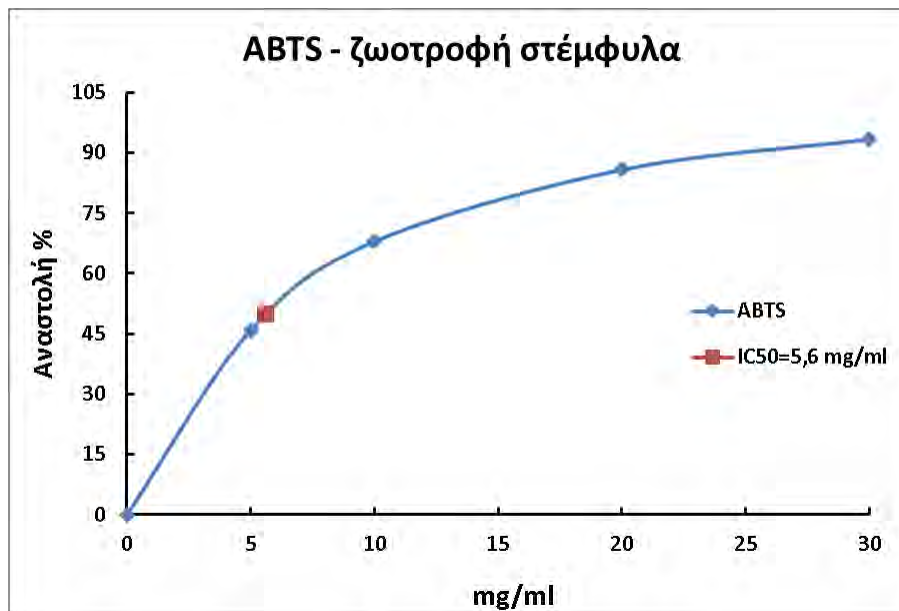


Διάγραμμα 9: % εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με στέμφυλα.

Ανάλογα η μέθοδος ABTS, χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων με την σταθερή ρίζα $ABTS^{*+}$. Η ρίζα του $ABTS^{*+}$ παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS) μέσω δράσης περοξειδάσης (HRP) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), με το φωτομετρικό προσδιορισμό να γίνεται στα 730nm.



Διάγραμμα 10 : η % εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.

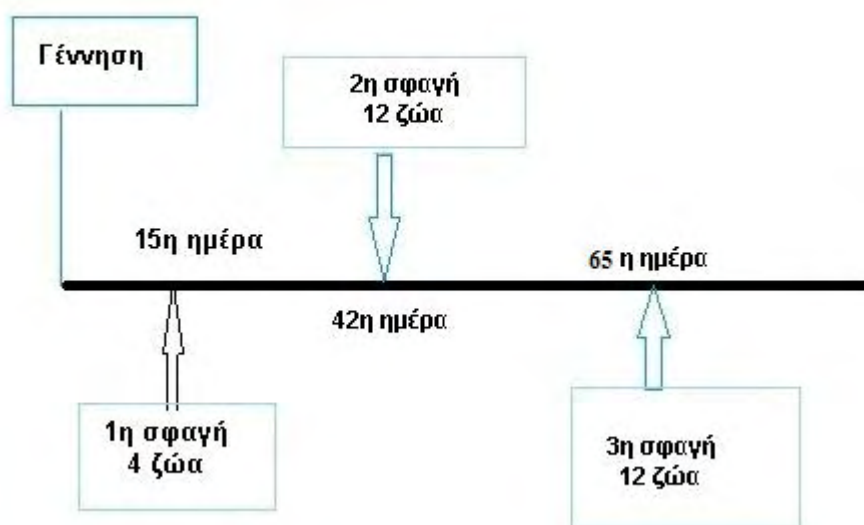


Διάγραμμα 11: η % εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με στέμφυλα.

Μέσω των παραπάνω μεθόδων προσδιορίζεται τελικά και η τιμή IC_{50} , η οποία σημειώνεται πάνω στα διαγράμματα, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών που εξουδετερώνει την ρίζα (DPPH, ABTS) κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC_{50} τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση της ουσίας. Έτσι υπολογίζοντας το IC_{50} των ζωοτροφών μπορούμε να εκτιμήσουμε την δραστηκότητα και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

3. Λήψη Ιστών από ζωτικά όργανα.

Οι σφαγές, πραγματοποιήθηκαν από εξειδικευμένο προσωπικό στο σφαγείο του Ινστιτούτο Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής Γιαννιτσών, ακολουθώντας τους απαραίτητους κανονισμούς περί χειρισμού, μεταφοράς και θανάτωσης εργαστηριακών ζώων, που πραγματοποιήθηκαν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε τα ζώα να υποστούν την λιγότερη καταπόνηση καθώς και λιγότερο άγχος. Το χρονικό σχεδιάγραμμα των σφαγών παρουσιάζεται παρακάτω, αφού οι σφαγές πραγματοποιήθηκαν σε συγκεκριμένη ηλικία των ζώων με σκοπό την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής άμυνας στην πρόωρη ηλικία, την εκτίμηση της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στην ευζωία, δηλαδή κατά τον απογαλακτισμό και τέλος, την εκτίμηση της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στο τελικό βάρος (βάρος σφάγιου) και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του κρέατος.



Εικόνα 32: Σχεδιάγραμμα πειραματικής διαδικασίας των ιστολησιών για τα αναπτυσσόμενα αρνιά.

Οι ιστοί των ζωτικών οργάνων του εγκέφαλου και του τετρακέφαλου αφαιρέθηκαν χειρουργικά με τη βοήθεια νυστεριού, μεταφέρθηκαν σε ειδικές κασέτες, σε υγρό άζωτο και τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -80°C μέχρι τη βιοχημική ανάλυσή τους.



Εικόνα 33: Διατήρηση και αποθήκευση των ιστών σε κασέτες.

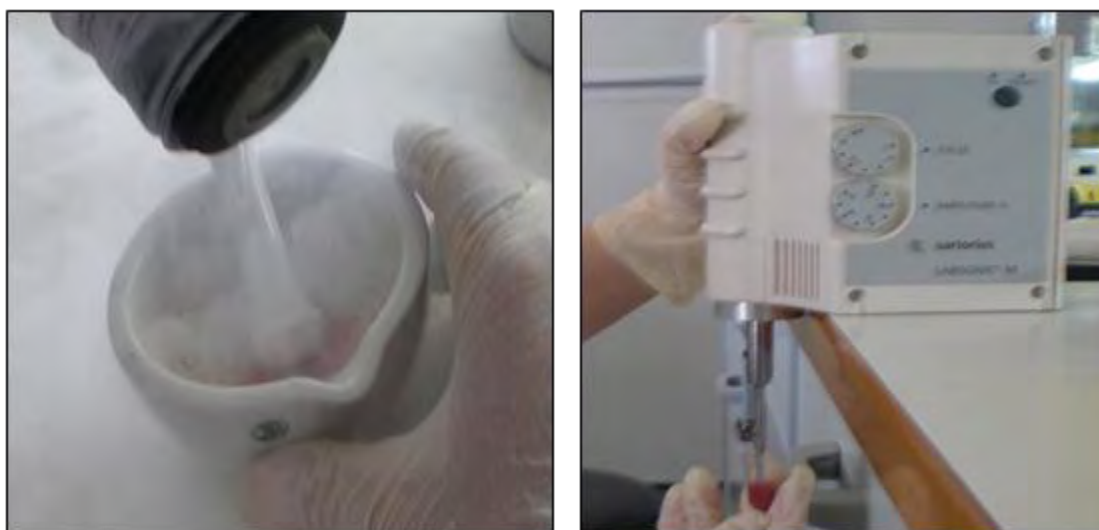
Επίσης έγινε υπολογισμός του βάρους θερμού σφαγείου και ψυχρού σφαγείου για τον μάρτυρα και για την πολυφαινολική ομάδα, παρατηρώντας μια μικρή αύξηση στη δεύτερη, η οποία ωστόσο δεν είναι στατιστικά σημαντική.

ΒΑΡΟΣ ΣΦΑΓΙΟΥ			
ΗΛΙΚΙΑ ΣΦΑΓΗΣ	ΟΜΑΔΑ ΜΑΡΤΥΡΑ	ΟΜΑΔΑ ΕΝΣΙΡ. ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ	ΕΠΙΠΕΔΟ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΑΠΟΓΑΛΑΚΤΙΣΜΟΣ (θερμό σφάγιο)	8,08±1,135	9,33±2,355 15,47%	NS
ΑΠΟΓΑΛΑΚΤΙΣΜΟΣ (ψυχρό σφάγιο)	7,83±2,534	8,97±2,229 14,55%	NS
ΗΛΙΚΙΑ 65 ΗΜΕΡΩΝ (θερμό σφάγιο)	10,40±1,697	10,73±1,041 3,17%	NS
ΗΛΙΚΙΑ 65 ΗΜΕΡΩΝ (ψυχρό σφάγιο)	9,97±1,617	10,33±1,025 3,61%	NS

Πίνακας 11: Βάρος σφαγίου στις ομάδες των αρνιών, στον απογαλακτισμό και στη 65^η ηλικία.

3.1 Ομογενοποίηση Ιστών.

Τόσο ο εγκεφαλικός όσο και ο τετρακέφαλος ιστός ομογενοποιήθηκαν, χρησιμοποιώντας γουδί και γουδοχέρι, με αναλογία 1/2 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7,4 που περιείχε 138mM NaCL, 2,7mM KCL και 1mM EDTA καθώς και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH). Ακολούθως, το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε (15.000g-5 min-4°C), ενώ η φύλαξη του πραγματοποιήθηκε σε φιαλίδια Eppendorf 1,5mL, ψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.



Εικόνα 34: Ομογενοποίηση ιστών με γουδί και χρήση υπερήχων.

4. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες

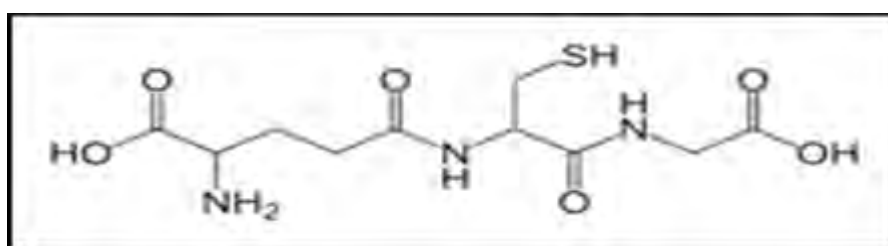
Γενικά

Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστικότητα της καταλάσης, ενώ για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των ιστών. Αντίστοιχα, για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες, ένας από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων, είναι οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, ενώ για την καταστροφή των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

4.1 Μέθοδοι

4.1.1 Μέτρηση Γλουταθειόνης.

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεϊνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου, με ενδοκυτταρική συγκέντρωση 1-15 mM. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) της ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG). Συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Η GSH χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Pastore., A., et al., 2003).



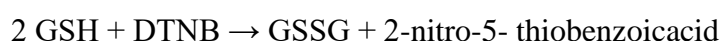
Εικόνα 35: Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης.

Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battinetal, 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι επίσης ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξеноβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση

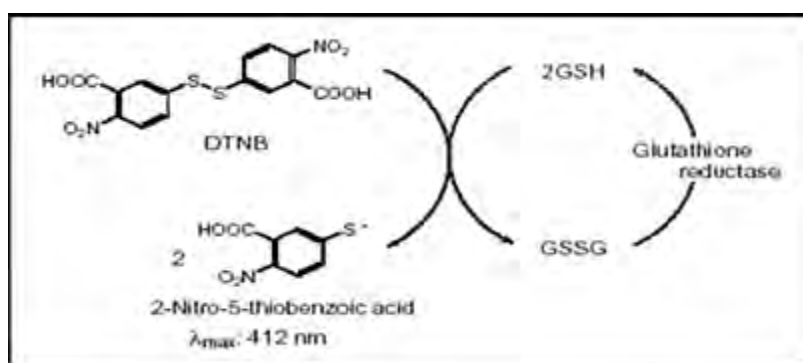
των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών (Sengupta, A., et al., 2004).

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειόδυο νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετريέται σε αιμόλυμα. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm (Reddy., Y.N., 2004).



Η GSH παράγεται από την GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.



Εικόνα 36: Ανακύκλωση και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.

Αντιδραστήρια

- **Phosphate buffer** 67 mM (pH 7,95). MB (KH₂PO₄): 136 MB (Na₂HPO₄): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH₂PO₄ (67 mM) και 500 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0,227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 5,94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7,95.
- **DTNB** (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό. (39,6 mg DTNB σε 100 ml του 1% διαλύματος του κιτρικού νατρίου, για να δώσει

μία συγκέντρωση του 1 mM). DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396,35

- **Κιτρικό Νάτριο.** ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB: 294,10. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

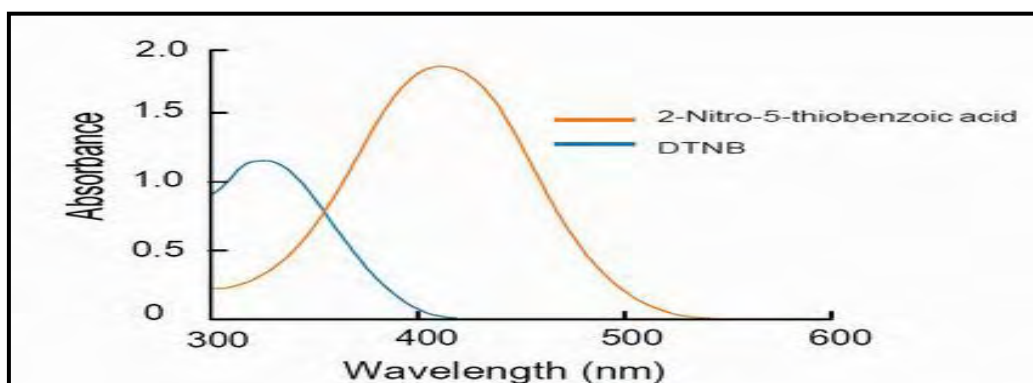
Πειραματικό πρωτόκολλο

Αρχικά, 100μL ιστού προστέθηκαν σε 100μL TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 5 min στους 5°C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο erpendorf. 20 μL ιστού, αραιωμένου 1/2 αναμίχθηκαν με 660 μL ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 8.0) και 330μL DTNB. Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια erpendorf:

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μL	660 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL	-
Ομογενοποιημένος Ιστός	-	20 μL

Πίνακας 12 : Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της GSH.

Αναδεύουμε τα αντιδραστήρια και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Φυγοκεντρούμε στα 15.000g για 5 min στους 5°C και τέλος μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm (Roland., F., et al., 1952).



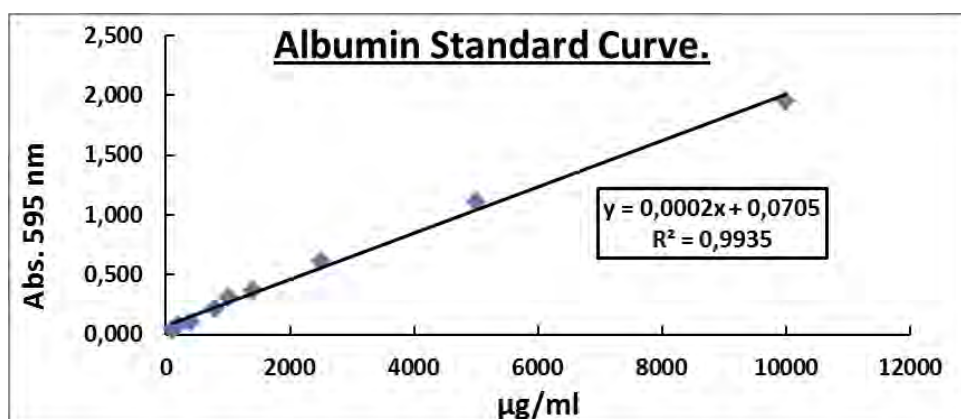
Διάγραμμα 11: Φάσμα απορρόφησης του 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκού οξέος (Dojindo Molecular Technologies).

Υπολογισμοί

Δραστικότητα GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ total prot.) = $(\text{Absδείγματος} - \Delta\text{abstυφλού}/13.6) \times 2 \times 3$ (λόγω αραιώσεων) $\times 50.5 / \text{Συγκ. πρωτεΐνης}$ (mg/mL).

Όπου το 50.5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του ιστού (20 μL) (1010/20=50.5), πολλαπλασιάζουμε με 2 και την πρώτη αραιώση που έγινε από το TCA 5% (1:1), πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και εγκεφαλικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, υπολογίστηκε βάσει της πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης, με εξίσωση $y=0,0002x + 0,0705$ και $R^2= 0,9935$, όπου ο άξονας $y = \text{Abs}$ στα 595 nm και ο $x = \text{Συγκέντρωση}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Κατόπιν, με το Bradford test, λαμβάνονταν η τιμή της απορρόφησης και υπολογίζονταν αντίστοιχα η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.



Διάγραμμα 12: Πρότυπη καμπύλη Αλβουμίνης.

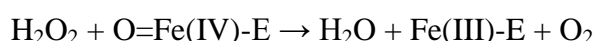
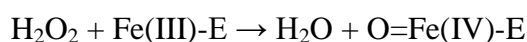
4.1.2 Δραστηριότητα της Καταλάσης.

Αρχή της μεθόδου.

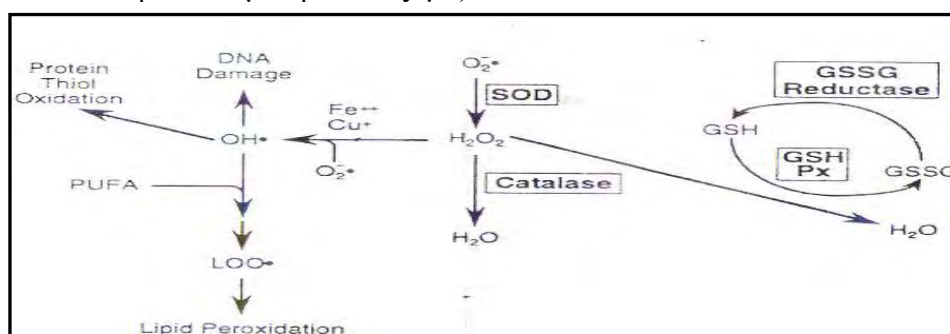
Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Για να διαχειριστεί αυτό το πρόβλημα, η ενζυμική καταλάση καταλύει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου, σε αβλαβή οξυγόνο και νερό. Chelikani P, et. al., (2004). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα

μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Boon EM, et. al. (2007). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H₂O₂. Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H₂O₂ από την καταλάση είναι η ακόλουθη: 2 H₂O₂ → 2 H₂O + O₂

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεμένη στο ένζυμο).



Εικόνα 37: Μονοπάτι αναγωγής του H₂O₂ σε H₂O.

Επίσης η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το H₂O₂ για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών (H₂A) με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος (αιθανόλη), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

CAT



Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της καταλάσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Aebi et al., (1984).

Διαλύματα

Phosphate buffer 67mM (pH 7.4) MB (KH₂PO₄): 136 και MB (Na₂HPO₄): 178. Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL KH₂PO₄ (67 mM) και 400 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν

χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂).

Το διάλυμα H₂O₂ είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2955 μL
Ομογενοποιημένος Ιστός	40 μL

Πίνακας 13: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης.

Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση. Κατόπιν, μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV). Τέλος, προσθέτουμε 5 μL 30% H₂O₂ στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = ($\Delta Abs_{\text{sample per min}} / 40$) x (75 x 1000 x 3 x 2) / Conc. Protein (mg/mL).

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μmol/mL. Το 75 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000μL) με τον όγκο του δείγματος (40μL) (3000/40=75). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και εγκεφαλικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης.

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης. $\Delta Abs = \eta$ μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H₂O₂ στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

$U = \mu\text{mol}/\text{min}$. $\Delta\text{Abs}_{\text{blank}}$ είναι πάντοτε μηδέν και έτσι δεν απαιτείται μέτρηση του τυφλού (One Unit decomposes one micromole of hydrogen peroxide per minute at 25 °C pH 7.0).

4.1.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC).

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο επίπονος τρόπος επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο.

Αρχή της μεθόδου.

Η TAC των ιστών στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH^{*}) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Ο προσδιορισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszweska και Bartosz, (2002). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

Διαλύματα

- **Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4).** MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178. Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH_2PO_4 (10 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (10 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 0.712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.4.

- **DPPH 0.1 mM.** MB: 394.32

Διαλύουμε 0.02 g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200 μ L του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19.8 mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα, συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο). Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 mL είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως, στο οποίο φτιάχνουμε το DPPH για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

- **Ασκορβικό οξύ 10 mM.** Είναι έτοιμο προς χρήση.

Φυσιολογικά, η τιμή της απορρόφησης για το δείγμα που περιέχει το ασκορβικό οξύ (Positive Control) θα πρέπει να είναι χαμηλότερη και από την τιμή των δειγμάτων αλλά και του τυφλού. Ο λόγος είναι η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος (ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο) που έχουμε επιλέξει. Η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων, θα πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές του τυφλού (η μεγαλύτερη τιμή) και του θετικού ελέγχου (η μικρότερη τιμή).

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

	Blank	Θετικός control	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μL	495 μL	460 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL	500 μL
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	-	5 μL	-
Ιστός (Αραίωση 1/5)	-	-	40 μL

Πίνακας 14: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC.

Ανακινούμε τα Eppendorfs μερικές φορές και τα επωάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης η αντιοξειδωτικές ουσίες του ιστού, εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη. Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρουμε 900 mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του

χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

Υπολογισμοί.

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ,

$$\% \text{ Abs μείωση} = (\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} \times 100$$

ii) $\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL πλάσματος} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 25 \times 3 \times 5] / 1000.$

α) Διαιρούμε με το 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol/L}$ της κυψελίδας.

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 25 διότι η αραιώση του ιστού στην κυψελίδα είναι 25 πλάσια ($1000 \mu\text{L}$ στην κυψελίδα / $40 \mu\text{L}$ ιστού του δείγματος στην κυψελίδα = 25).

δ) Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και για τον εγκεφαλικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 5 επειδή το δείγμα αραιώνεται 1/5 κατά τη μέτρηση.

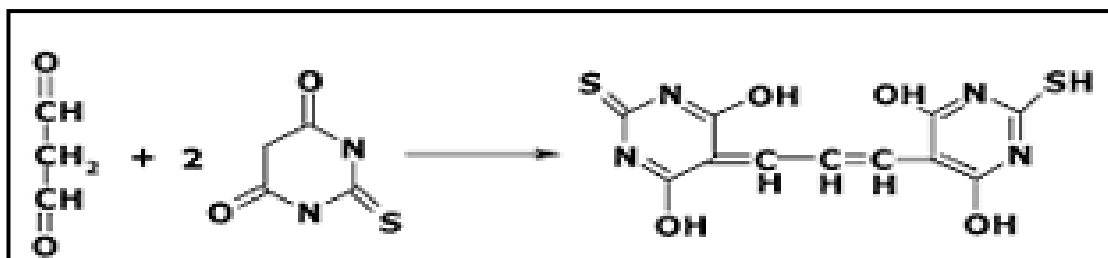
ε) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L σε mL.

Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο:
 $\text{mmol DPPH} / \text{mg total prot.}$

4.1.4 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).

Αρχή της μεθόδου.

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΰδη. Η μαλονδιαλδεΰδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΰδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΰδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΰδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξείδωσης των λιπιδίων.



Εικόνα 38: Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA.

Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος του Keles et al., (2001). Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95 °C.

Διαλύματα

- **Tris-HCl 200 mM (pH 7.4).** MB (Tris): 121.14. MB (HCl): 36.46 (stock 37%) [10.1 N]. Για να παρασκευάσουμε ≈100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0.1 N). Για το Tris ζυγίζουμε 0.61 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0.42 mL του stock 37% HCl (10.1 N) σε 42 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25 mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42 mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100 mL. Ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7.4.

Το Tris είναι συντομογραφία του τρισυδροξυμεθυλαμινομεθάνιου (trishydroxymethylaminomethane). Το Tris είναι κατάλληλο για τη δημιουργία ρυθμιστικών διαλυμάτων με pH από 6,5 μέχρι 9,7.

- **Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM).** MB (TBA): 144.1 και MB (Na₂SO₄): 142.04. Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος, ζυγίζουμε 2.84 g Na₂SO₄ και 0.08 g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

- **TCA 35%:** Ζυγίζουμε 35 g TCA και τα διαλύουμε σε απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

- **TCA 70%:** Ζυγίζουμε 70 g TCA και τα διαλύουμε σε απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

Πειραματικό Πρωτόκολλο.

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL ομογενοποιημένου ιστού (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό). Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1 mL Na_2SO_4 – TBA και επωάζουμε στους 95 $^\circ\text{C}$ για 45 min στο υδατόλουτρο. Κατόπιν, μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1 mL σε eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25 $^\circ\text{C}$ για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί.

Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg total protein) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 x 31 x 3 x 3, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (100 μL) (3100 / 100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156 (mol/L) διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε $\mu\text{mol/L}$. Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και εγκεφαλικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 3 ξανά επειδή το δείγμα αραιώνεται 3 φορές κατά τη μέτρηση.

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

4.1.5 Πρωτεϊνικά καρβονύλια

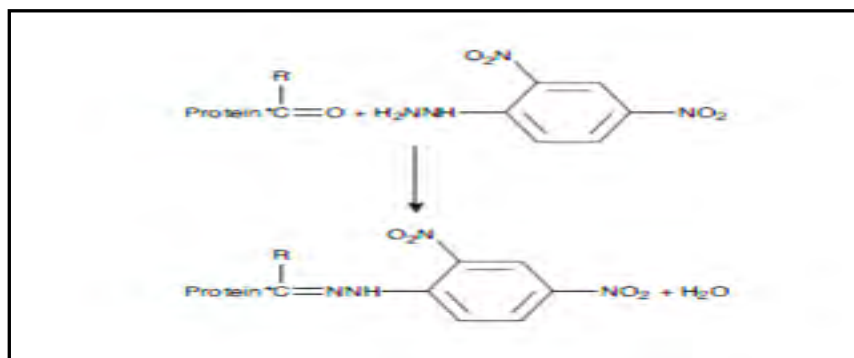
Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας δείκτης της οξειδωσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεϋδες και κετόνες) που αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα σε διπλό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου $\text{C} = \text{O}$, 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). Είναι ένας αξιόπιστος δείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες καθώς εκτρέπονται από τη φυσιολογική τους λειτουργία. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε μέτριο βαθμό, διασπώνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν υποστούν πολύ δριμείες βλάβες τότε δεν μπορούν να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους.

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών όχι μόνο επηρεάζει τη δική τους λειτουργία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που επισκευάζουν το DNA ή οι DNA πολυμεράσες, το DNA δε θα επιδιορθώνεται ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη πιστότητα. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4-δίνιτριφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου. Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο Patsoukis et. al., (2004).



Εικόνα 39: Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (2,4-δίνιτριφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου.

Διαλύματα

- **Διάλυμα HCl 2.5 N.** HCl: MB 36.46; stock 37% (10.1 N)

Για να παρασκευάσουμε 100 mL διαλύματος 2.5 N HCl, προσθέτουμε αργά 24.6 mL του 37% HCl (ίσο με 10.1 N HCl) σε ≈70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του 37 % είναι πολύ καυστικό. Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φορώντας γάντια.

- **DNPH 14 mM.** (MB: 198.1)

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0.2833 g DNPH σε 100 mL 2.5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Όταν το

ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτούνται 0.5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάχνουμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.

- **Ουρία 5 M (pH 2.3).** (MB: 60.06)

Για να φτιάξουμε 100 mL 5 M ουρίας (pH 2.3, το οποίο ρυθμίζεται με 2N HCl), διαλύουμε 30 g ουρίας in \approx 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό.

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Σε 50 μ L ομογενοποιημένου ιστού προσθέτουμε 50 μ L 20% TCA σε eppendorfs και αναδεύουμε στο vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του)*. Το 20% TCA προστίθεται με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Το TCA (τριχλωροξικό οξύ) χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμνιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.

Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Κατόπιν, προσθέτουμε στο ίζημα (πελέτα) 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCL) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N HCL για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Μετά την πάροδο της μίας ώρας, φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 mL από το 10% TCA, αναδεύουμε (διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα αν χρειάζεται) και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού ειθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει. Αυτήν την διαδικασία την επαναλαμβάνουμε άλλες δύο (2) φορές και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37°C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4°C. Τέλος, μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.

*(Το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0.5 mL DNPH, τα οποία αντικαθίστανται 0.5 mL HCL 2.5 N).

Υπολογισμοί.

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg total prot.)= Αδείγματος-Ατυφλού/0.022×1000/50 x 2 ή 3 x 2/Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL).

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM x cm⁻¹. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μL στην κυψελίδα /50 μL δείγματος). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και με 4 για καρδιακό – ηπατικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 2 επειδή το δείγμα αραιώνεται 2 φορές κατά τη μέτρηση, διότι προσθέτουμε TCA 20% αρχικά).

4.1.6 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

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

Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm (Bradford M.M 1976 A rapid sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein- Dye Binding. Anal Biochem 72:248-254).

5. Αποτελέσματα

5.1 Συνολικά αποτελέσματα της αποτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ζωοτροφών

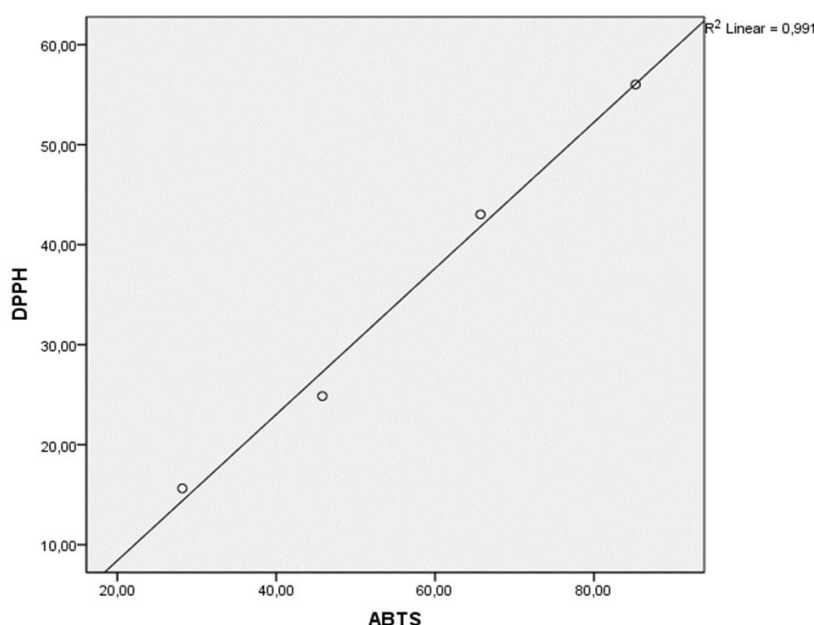
Παρατηρώντας στον πίνακα τα συνολικά αποτελέσματα διαπιστώνετε ότι τα βιοδραστικά συστατικά των στεμφύλων (πολυφαινόλες) προσδίδουν στις ζωοτροφές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα κάτι το οποίο αναμένουμε να παρατηρήσουμε και στους δείκτες ευζωίας των προβάτων. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm SEM και εκτελέστηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (one way ANOVA), με το πρόγραμμα PASW Statistics 18 (πρώην SPSS Statistics), κατά Tukey και Dunett. Το επίπεδο σημαντικότητας προσδιορίστηκε σε $*p < 0,05$.

Ζωοτροφής	DPPH(IC ₅₀) mg/ml	ABTS(IC ₅₀) mg/ml
Ελέγχου (πρόβατα)	25,5	12
Στέμφυλα (πρόβατα)	11,9	5,6

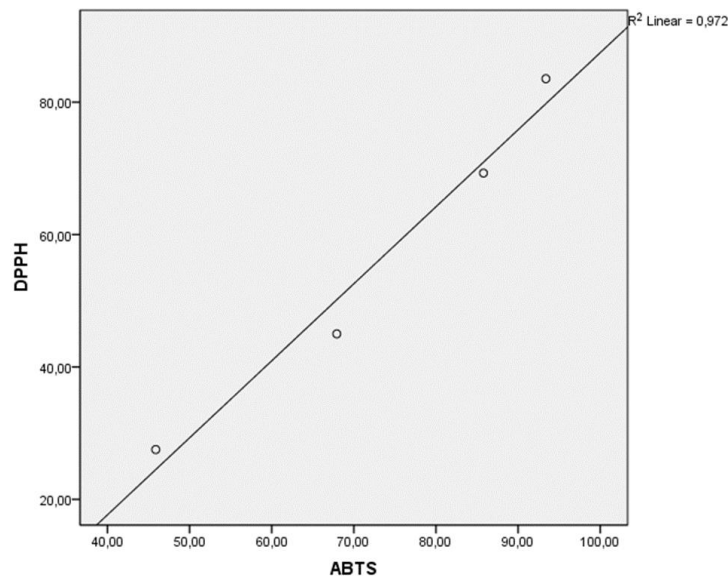
Πίνακας 17: Τιμές IC₅₀ των ζωοτροφών με τη μέθοδο DPPH και ABTS.

5.2 Συσχέτιση των δύο μεθόδων κατά Spearman

Για την συσχέτιση των δύο ζωοτροφών και τον προσδιορισμό της ικανότητάς τους να εξουδετερώνουν και τις δύο ρίζες DPPH και ABTS, πραγματοποιήθηκε υπολογισμός του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα στατιστικής SPSS18. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης.



Διάγραμμα 12: Η συσχέτιση των τιμών IC₅₀ της μεθόδου DPPH με τη μέθοδο του ABTS ($r=0,991$, $p < 0,05$), για τη ζωοτροφή ομάδας ελέγχου (control).



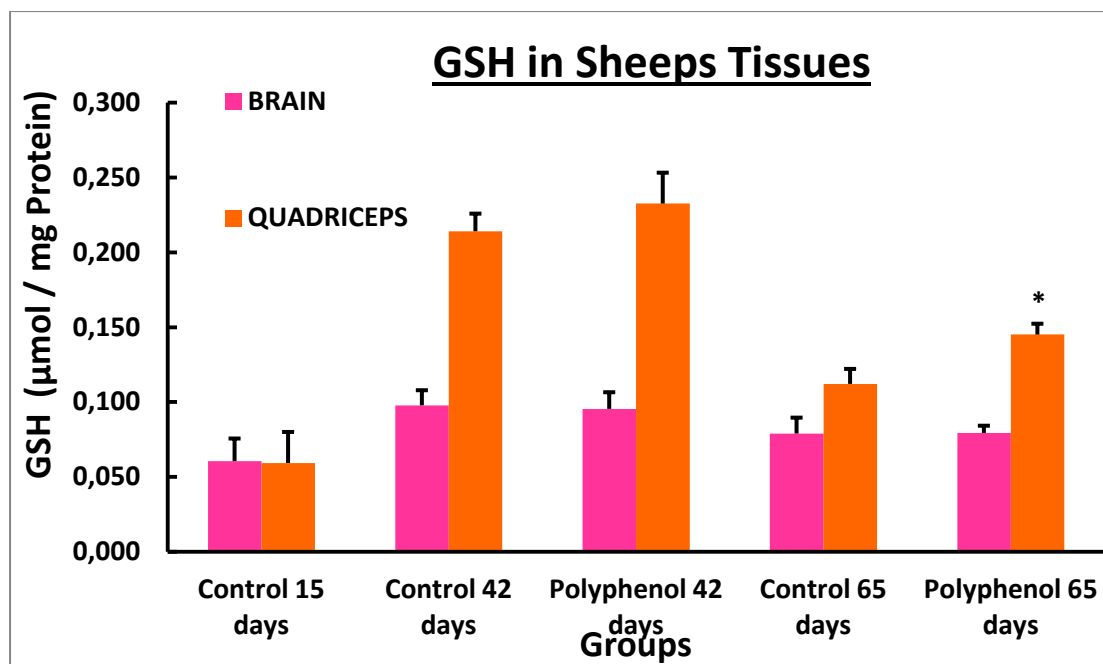
Διάγραμμα 13:Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ της μεθόδου DPPH με τη μέθοδο του ABTS ($r=0,972$, $p<0,05$), για τη ζωοτροφή εμπλουτισμένη με στέμφυλα.

Υπολογίζοντας τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, ανάμεσα στις τιμές IC₅₀ που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους (DPPH, ABTS), τόσο στην ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου ($r=0,99$) όσο και στην ζωοτροφή εμπλουτισμένη με το ενσίρωμα στεμφύλων ($r=0,97$), παρατηρείται μια μεγάλη συσχέτιση που σημαίνει ότι τα ίδια πιθανώς βιοδραστικά συστατικά των ζωοτροφών εξουδετερώνουν και τις δύο ρίζες.

5.3 Αποτελέσματα Μετρήσεων σε Εγκεφαλικό και Τετρακέφαλο Ιστό

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν, ως μέση τιμή \pm SEM ενώ στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου IBM SPSS 22. Συγκεκριμένα, εκτελέστηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (One-Way ANOVA), προσδιορίζοντας το επίπεδο σημαντικότητας σε $*p < 0.05$.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των πέντε (5) δεικτών οξειδωτικού στρες για τους δύο ιστούς των προβάτων που μελετώνται στην παρούσα διπλωματική εργασία, (εγκεφαλικός ιστός και τετρακέφαλος) φαίνονται στα παρακάτω συγκεντρωτικά διαγράμματα. Η σύγκριση πραγματοποιείται τόσο στις πολυφαινολικές ομάδες και ομάδες control ξεχωριστά για την παρατήρηση των μεταβολών στα αναπτυξιακά τους στάδια, όσο και μεταξύ τους για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας της βιολειτουργικής ζωοτροφής.



Διάγραμμα 14: Τα επίπεδα δραστικότητας της GSH (μmol/mg συνολικής πρωτεΐνης) στον εγκεφαλικό και τετρακέφαλο ιστό διαφορετικών ομάδων ηλικίας προβάτων κρεατοπαραγωγής. Οι Στατιστικά Σημαντικές τιμές * $p < 0.05$ ορίζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές Control κάθε ομάδας.

Για την σύγκριση των ομάδων control αλλά και τη σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων, σε όλες τις παρακάτω περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε πάλι το στατιστικό πακέτο IBM SPSS 22, εκτελώντας αυτή τη φορά μονόδρομη ανάλυση διασποράς (One-Way ANOVA), με την επιλογή των παραμέτρων tukey και Dunnett's T3 προσδιορίζοντας το επίπεδο σημαντικότητας σε * $p < 0.05$.

(Σύγκριση Ομάδων Control στον Εγκεφαλικό Ιστό)

Κατά τη σύγκριση των ομάδων control του εγκεφαλικού ιστού δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή ανάμεσα στα ζώα 15 ημερών, 42 και 65.

GSH (μmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	0.061 ± 0.015	0.098 ± 0.010	0.079 ± 0.011

(Σύγκριση Πολυφαινολικών Ομάδων στον Εγκεφαλικό Ιστό)

Η ίδια παρατήρηση έγινε και για τον εγκεφαλικό ιστό των ζώων που σιτίστηκαν με το εμπλουτισμένο σιτηρέσιο, 42 και 65 ημερών.

GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}$)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. \pm SEM	0.095 \pm 0.011	0.079 \pm 0.005

(Σύγκριση Ομάδων Control στον Τετρακέφαλο Ιστό)

Για τον τετρακέφαλο ιστό των ομάδων control τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά σημαντικά κατά τη σύγκριση μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, παρατηρείτε αύξηση της GSH από τις 15 μέρες στις 42 και στη συνέχεια μια μείωση της δράσης της στις 65 ημέρες.

GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}$)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. \pm SEM	0,059 \pm 0,021	0,214 \pm 0,012	0,112 \pm 0,010

(Σύγκριση Πολυφαινολικών Ομάδων στον Τετρακέφαλο Ιστό)

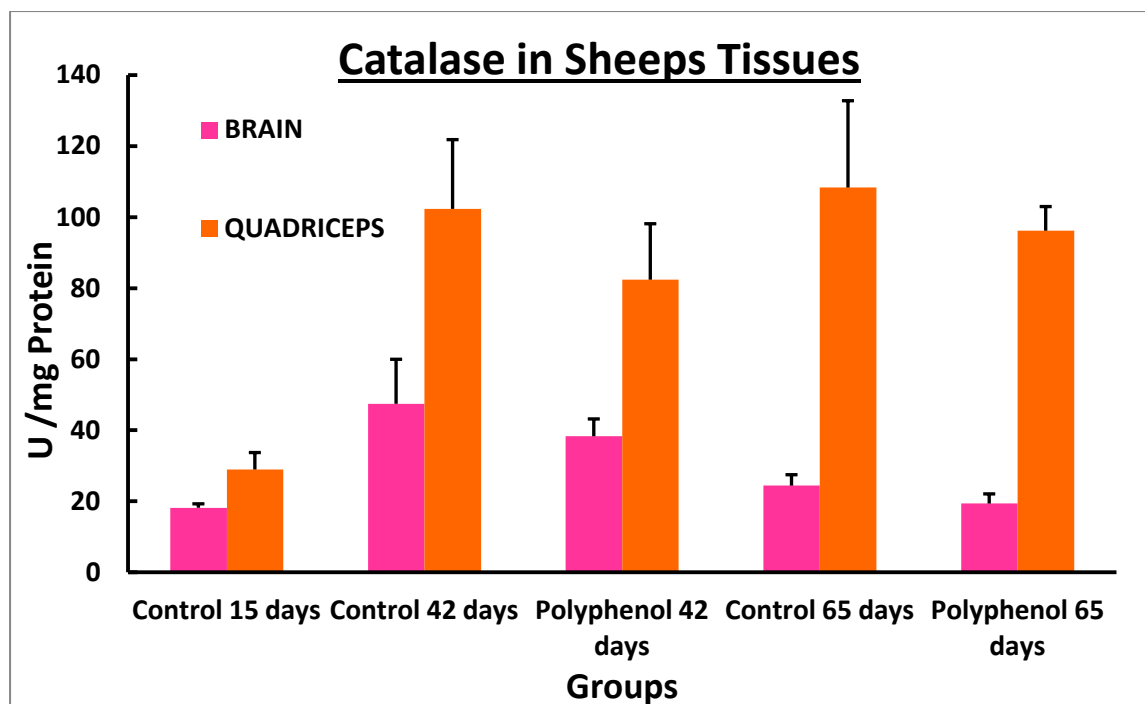
Αντίστοιχα και η μείωση που σημειώνεται κατά τη σύγκριση των ομάδων 42 και 65 ημερών, είναι στατιστικά σημαντική.

GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}$)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. \pm SEM	0,233 \pm 0,021	0,145 \pm 0,007

Στον παρακάτω πίνακα καταγράφηκαν επιπλέον οι στατιστικά σημαντικές μεταβολές κατά τη σύγκριση της πολυφαινολικής ομάδας με την αντίστοιχη ομάδα control, τόσο για τις 42 μέρες όσο και για τις 65, για κάθε ιστό.

ΠΟΣΟΣΤΑ % ΑΥΞΗΣΗΣ Ή ΜΕΙΩΣΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ GSH ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ (CONTROL).

GROUP	ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	ΜΥΪΚΟΣ (ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ) ΙΣΤΟΣ
42 ΗΜΕΡΩΝ	Μείωση δραστηριότητας κατά 2,39%	Αύξηση δραστηριότητας κατά 8,63%
65 ΗΜΕΡΩΝ	Ελάχιστη αύξηση δραστηριότητας κατά 0,41%	Αύξηση δραστηριότητας κατά 29,62%



Διάγραμμα 15: Τα συνολικά επίπεδα δραστικότητας καταλάσης (U/mg πρωτεΐνης) σε εγκεφαλικό και τετρακέφαλο ιστό, διαφορετικών ηλικιακών ομάδων προβάτων κρεατοπαραγωγής.

(Σύγκριση Ομάδων Control για τον Εγκεφαλικό Ιστό)

Η δραστικότητα της καταλάσης κατά τη σύγκριση των ομάδων control μεταξύ τους, φαίνεται να αυξάνεται, προοδευτικά με την αύξηση της ηλικίας των αμνών, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η αύξηση.

CAT (U/mg Protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	18.187 ± 1.107	47.450 ± 12.531	24.414 ± 3.072

(Σύγκριση Πολυφαινολικών Ομάδων για τον Εγκεφαλικό Ιστό)

Αντίθετα, στις πολυφαινολικές ομάδες σημειώνεται μια μικρή μείωση χωρίς όμως να είναι επίσης στατιστικά σημαντική.

CAT (U/mg Protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	38,307 ± 4,882	19,364 ± 2,722

(Σύγκριση Ομάδων Control για τον Τετρακέφαλο Ιστό)

Για τον τετρακέφαλο ιστό φαίνεται, όπως και παραπάνω για την δραστικότητα της GSH, πως σημειώνεται προοδευτική αύξηση η οποία είναι μεγαλύτερη από τις 15

στις 42 ημέρες και στατιστικά σημαντική και πιο μικρή για τις 65, όχι στατιστικά σημαντική.

CAT (U/mg Protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	28,956 ± 4,772	102,323 ± 19,495	108,320 ± 24,447

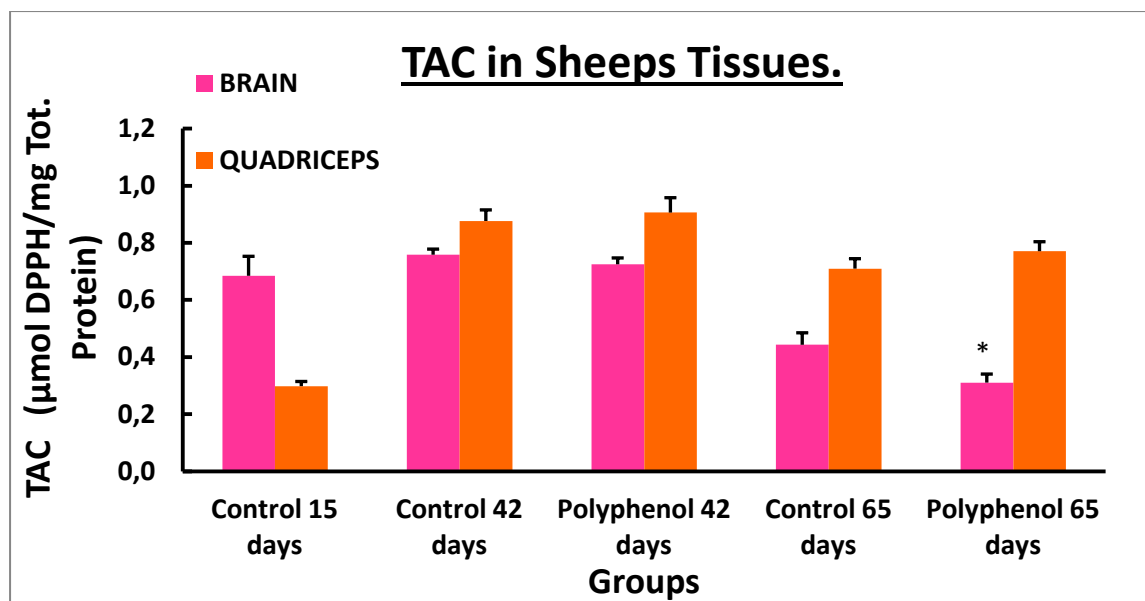
(Σύγκριση Πολυφαινολικών Ομάδων για τον Τετρακέφαλο Ιστό)

Και για τις πολυφαινολικές ομάδες, στον τετρακέφαλο ιστό υπογραμμίζεται αύξηση όχι στατιστικά σημαντική κατά τη σύγκριση 42 και 65 ημερών.

CAT (U/mg Protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	82,391 ± 15,747	96,182 ± 6,792

ΠΟΣΟΣΤΑ % ΜΕΙΩΣΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ,
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΣ ΟΜΑΔΕΣ
ΕΛΕΓΧΟΥ (CONTROL), ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΕ ΙΣΤΟ.

GROUP	ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	ΜΥΪΚΟΣ (ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ) ΙΣΤΟΣ
42 ΗΜΕΡΩΝ	Μείωση δραστηριότητας καταλάσης κατά 19,26%	Μείωση δραστηριότητας καταλάσης κατά 19,47%
65 ΗΜΕΡΩΝ	Μείωση δραστηριότητας καταλάσης κατά 20,68%	Μείωση δραστηριότητας καταλάσης κατά 11,20%



Διάγραμμα 16: Τα μmol του DPPH που απομακρύνθηκαν ανά mg συνολικής πρωτεΐνης, για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), σε εγκεφαλικό και τετρακέφαλο ιστό προβάτων κρεατοπαραγωγής, διαφορετικών ηλικιακά ομάδων. Οι Στατιστικά Σημαντικές τιμές * $p < 0.05$ ορίζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές Control κάθε ομάδας.

(Σύγκριση Ομάδων Control για τον Εγκεφαλικό Ιστό)

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του εγκεφαλικού ιστού των ομάδων control, φαίνεται να αυξάνεται από τις 15 στις 42 ημέρες αλλά στις 65 ημέρες τελικά να παρουσιάζει μια μείωση στατιστικά σημαντική.

TAC (mmol DPPH/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	0,685± 0,068	0,758± 0,020	0,443± 0,042

(Σύγκριση Πολυφαινολικών Ομάδων στον Εγκεφαλικό Ιστό)

Η ίδια παρατήρηση προκύπτει από το διάγραμμα 16 και για τον εγκεφαλικό ιστό των πολυφαινολικών αμνών, με τη μείωση να είναι επίσης στατιστικά σημαντική.

TAC (mmol DPPH/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	0,725± 0,022	0,311± 0,030

(Σύγκριση Ομάδων Control για τον Τετρακέφαλο Ιστό)

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του τετρακέφαλου των ζώων που ταϊστήκαν με την κανονική ζωοτροφή, παρουσιάζει με βάση το διάγραμμα 16 μία αύξηση από τις 15 στις 42 ημέρες και στη συνέχεια μία μείωση στις 65 όπως πραγματοποιήθηκε και για τον εγκεφαλικό ιστό, με τις μεταβολές να είναι στατιστικά σημαντικές.

TAC (mmol DPPH/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	0,298± 0,016	0,877± 0,039	0,710± 0,035

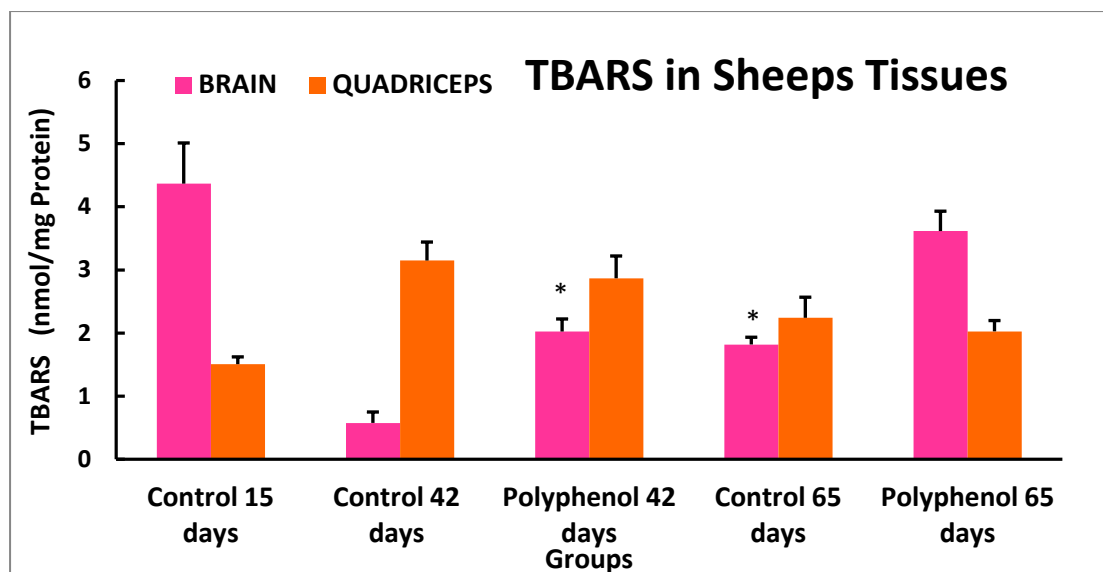
(Σύγκριση Πολυφαινολικών Ομάδων για τον Τετρακέφαλο Ιστό)

Επίσης όπως σημειώθηκε και για τον εγκεφαλικό ιστό των πολυφαινολικών ομάδων, έτσι και για τον τετρακέφαλο των προβάτων που σιτιστήκαν με πολυφαινόλες, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα μειώνεται από τις 42 στις 65 ημέρες.

TAC (mmol DPPH/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	0,906± 0,052	0,771± 0,033

ΠΟΣΟΣΤΑ % ΑΥΞΗΣΗΣ Ή ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ μmol ΤΟΥ DPPH ΠΟΥ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΘΗΚΑΝ ΑΝΑ mg ΣΥΝ. ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ, ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ (CONTROL).

GROUP	ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	ΜΥΪΚΟΣ (ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ) ΙΣΤΟΣ
42 ΗΜΕΡΩΝ	Μείωση κατά 4,42%	Αύξηση κατά 3,37%
65 ΗΜΕΡΩΝ	Μείωση κατά 29,90%	Αύξηση κατά 8,60%



Διάγραμμα 17: Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg πρωτεΐνης) σε εγκεφαλικό και τετρακέφαλο ιστό προβάτων κρεατοπαραγωγής, διαφορετικών ηλικιακά ομάδων.

(Σύγκριση Ομάδων Control για τον Εγκεφαλικό Ιστό)

Για τη δοκιμή TBARS, συγκρίνοντας τη συγκέντρωσή τους στον εγκεφαλικό ιστό των προβάτων control, φαίνεται από το διάγραμμα 17 πως ενώ μειώνονται τα επίπεδά τους από τις 15 στις 42 ημέρες τελικά στις 65 ημέρες αυξάνονται, με τις μεταβολές να είναι στατιστικά σημαντικές.

TBARS (nmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	4.367± 0.644	0.576± 0.173	1.819± 0.114

(Σύγκριση Πολυφαινολικών Ομάδων για τον Εγκεφαλικό Ιστό)

Ανάλογη αύξηση σημειώνεται και για τις πολυφαινολικές ομάδες, κατά την ηλικιακή αύξηση των ζώων, με τα επίπεδα να είναι στατιστικά σημαντικά.

TBARS (nmol/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	2.024± 0.198	3.615± 0.315

(Σύγκριση Ομάδων Control για τον Τετρακέφαλο Ιστό)

Τα επίπεδα των TBARS, στον τετρακέφαλο ιστό των ομάδων control κινήθηκαν αντίθετα. Πιο συγκεκριμένα, αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά από τις 15 στις 42 ημέρες αλλά από τις 42 στις 65 ημέρες μειώθηκαν.

TBARS (nmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	1,507± 0,116	3,148± 0,293	2,241± 0,326

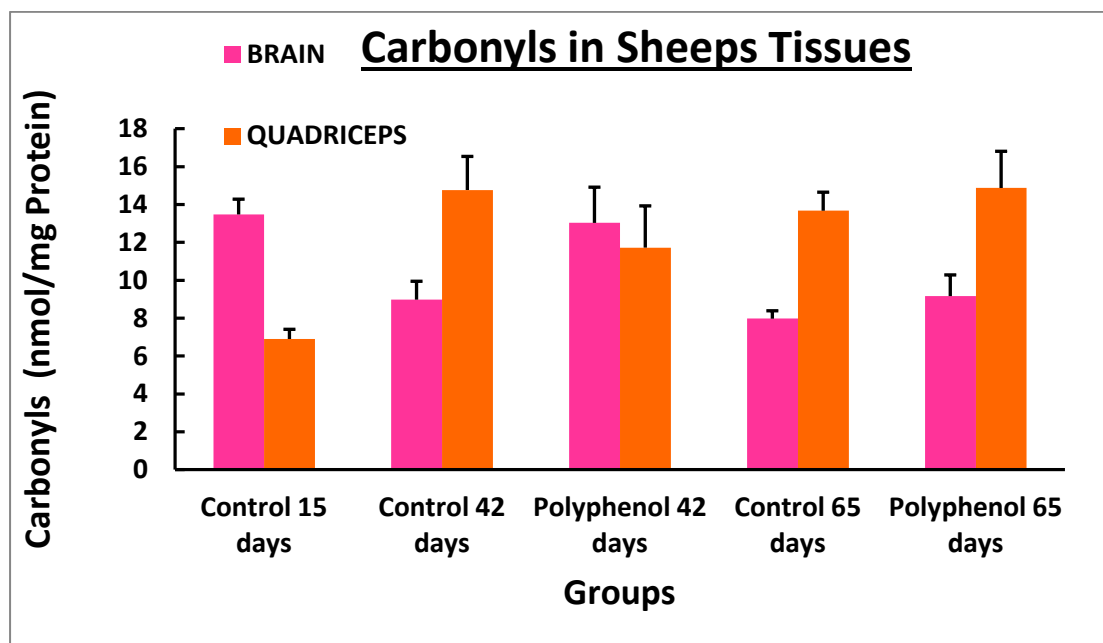
(Σύγκριση Πολυφαινολικών Ομάδων για τον Τετρακέφαλο Ιστό)

Για τις πολυφαινολικές ομάδες η μεταβολή σύμφωνα και με το διάγραμμα 17 είναι ελάχιστη και όχι στατιστικά σημαντική.

TBARS (nmol/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	2,867± 0,353	2,026± 0,171

ΠΟΣΟΣΤΑ % ΑΥΞΗΣΗΣ Ή ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ TBARS (nmol/mg), ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ (CONTROL).

GROUP	ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	ΜΥΪΚΟΣ (ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ) ΙΣΤΟΣ
42 ΗΜΕΡΩΝ	Αύξηση κατά 251,3%	Μείωση κατά 8,93%
65 ΗΜΕΡΩΝ	Αύξηση κατά 98,8%	Μείωση κατά 9,57%



Διάγραμμα 18: Τα συνολικά επίπεδα συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg συνολικής πρωτεΐνης), σε εγκεφαλικό και τετρακέφαλο ιστό προβάτων κρεατοπαραγωγής διαφορετικών ηλικιακά ομάδων.

(Σύγκριση Ομάδων Control για τον Εγκεφαλικό Ιστό)

Τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, στον εγκεφαλικό ιστό σημειώνουν όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 18 σταδιακή μείωση ανάμεσα στις ομάδες control και ιδιαίτερα αυτή η μείωση από τις 15 στις 42 ημέρες να είναι στατιστικά σημαντική.

CARB (nmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	13,477± 0,805	8,979± 0,969	7,974± 0,418

(Σύγκριση Πολυφαινολικών Ομάδων για τον Εγκεφαλικό Ιστό)

Και για τον εγκεφαλικό ιστό των πολυφαινολικών ομάδων, οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μειώνεται από τις 42 στις 65 ημέρες.

CARB (nmol/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	13,029± 1,886	9,166± 1,118

(Σύγκριση Ομάδων Control για τον Τετρακέφαλο Ιστό)

Αντίθετα στον τετρακέφαλο ιστό των πολυφαινολικών ομάδων, τα επίπεδά τους παρουσιάζουν αυξομειώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση από τις 15 ημέρες στις 42, στατιστικά σημαντική και στη συνέχεια μια μείωση στις 65 ημέρες.

CARB (nmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	6,902± 0,511	14,766± 1,774	13,673± 0,978

(Σύγκριση Πολυφαινολικών Ομάδων για τον Τετρακέφαλο Ιστό)

Ανάλογα αύξηση σημειώθηκε και για τον τετρακέφαλο ιστό των πολυφαινολικών ομάδων, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική.

CARB (nmol/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	11,725± 2,204	14,871± 1,938

ΠΟΣΟΣΤΑ % ΑΥΞΗΣΗΣ Ή ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΩΝ (nmol/mg protein), ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ (CONTROL).

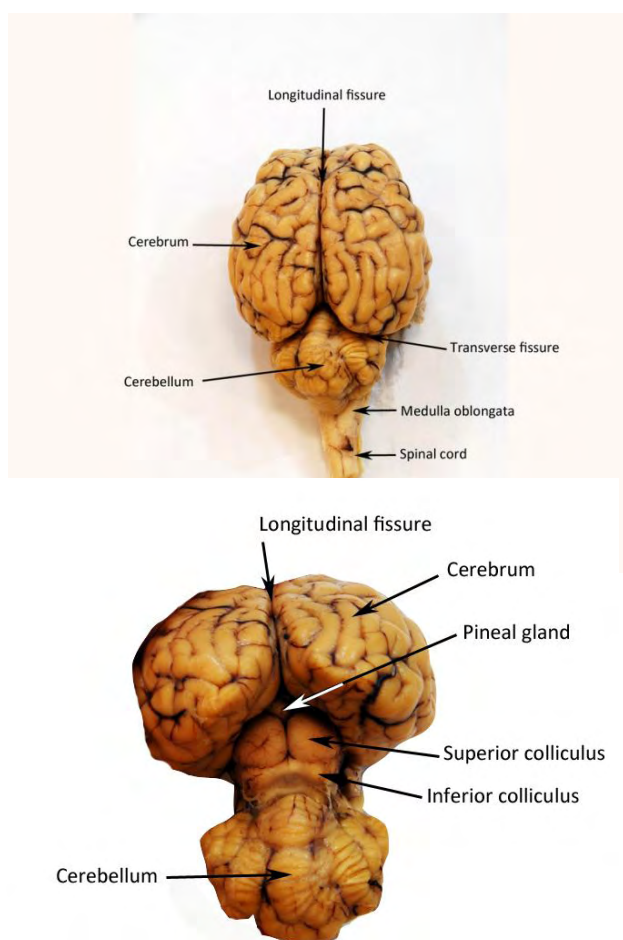
GROUP	ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	ΜΥΪΚΟΣ (ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ) ΙΣΤΟΣ
42 ΗΜΕΡΩΝ	Αύξηση κατά 45,10%	Μείωση κατά 20,59%
65 ΗΜΕΡΩΝ	Αύξηση κατά 14,95%	Μείωση κατά 8,76%

6. Συζήτηση

Σκοπός, της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης νεαρών προβάτων κρεατοπαραγωγής, Ελληνικής φυλής «Χιώτικα», με στόχο τον έλεγχο των δεικτών του οξειδωτικού στρες στον εγκεφαλικό και τετρακέφαλο ιστό, μετά την χορήγηση ζωοτροφής ενισχυμένη με πολυφαινολικά πρόσθετα. Η εκτροφή των αμνών πραγματοποιήθηκε ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκαν, με διαφορετικό σιτηρέσιο. Η πρώτη ομάδα (ομάδα ελέγχου), σιτίστηκε με το βασικό σιτηρέσιο ενώ η δεύτερη με σιτηρέσιο που περιλάμβανε πολυφαινολικά πρόσθετα από στέμφυλα. Συνολικά είκοσι οχτώ (28) πρόβατα χρησιμοποιήθηκαν στα οποία έγιναν τρεις (3) ιστοληψίες σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της ανάπτυξής τους, συγκεκριμένα: στις δέκα πέντε (15), σαράντα δύο (42) και εξήντα πέντε (65) ημέρες από τη γέννησή τους. Μέχρι και τις δέκα πέντε (15) ημέρες από τη γέννηση τους, τα πρόβατα τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα. Από εκείνη τη μέρα και μέχρι την τεσσαρακοστή δεύτερη (42) ημέρα, η τροφή τους εκτός από γάλα περιείχε και το σιτηρέσιο απογαλακτισμού. Τέλος, ο πλήρης απογαλακτισμός πραγματοποιήθηκε από την τεσσαρακοστή δεύτερη (42) ημέρα μέχρι και την εξηκοστή πέμπτη (65) ημέρα από τη γέννηση τους.

Οι δείκτες οξειδωτικού στρες που ελέγχθηκαν, για τον εγκεφαλικό και τετρακέφαλο ιστό των νεαρών προβάτων, ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστηριότητα της καταλάσης (CAT), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC- Total antioxidant capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric acid reactive substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης πραγματοποιήθηκε και για την βιολειτουργική ζωοτροφή, μέσω των μεθόδων προσδιορισμού εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH και ABTS καθώς και συσχέτιση μεταξύ της κανονικής ζωοτροφής με το εμπλουτισμένο σιτηρέσιο. Τελικά, με βάση τα παρατηρούμενα αποτελέσματα, δίνεται η δυνατότητα για αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής κατάστασης των ζώων στα διάφορα αναπτυξιακά τους στάδια, συγκρίνοντας τις τιμές των δεικτών οξειδωτικού στρες, του κάθε ιστού των ζώων control ή των πολυφαινολικών ξεχωριστά, της αντιοξειδωτικής δράσης του τροποποιημένου σιτηρεσίου, συγκρίνοντας τις ομάδες control με τις πολυφαινολικές για κάθε ιστό και τέλος της ποιότητας των σφαγίων που λήφθηκαν.

Ο εγκέφαλος των προβάτων, μπορεί να είναι μικρότερος του ανθρώπου αλλά φαίνεται να παρουσιάζει παρόμοια χαρακτηριστικά. Το στέλεχος του εγκεφάλου είναι συνέχεια του νωτιαίου μυελού και διακρίνεται από τον προμήκη μυελό, στον οποίο εντοπίζονται τα αντανακλαστικά κέντρα που ελέγχουν την αναπνοή και το καρδιαγγειακό σύστημα, τη γέφυρα, το τετράδυμο πέταλο, τα εγκεφαλικά σκέλη, το θάλαμο και τον υποθάλαμο. Από αυτόν ξεκινούν και τα εγκεφαλικά νεύρα (αισθητικά, κινητικά και μεικτά νεύρα).



Εικόνα 40: Ανατομία Εγκεφάλου Προβάτων.

Είναι ένα όργανο, με τον υψηλότερο κίνδυνο πρόκλησης οξειδωτικής βλάβης, καθώς περιέχει μεγάλες ποσότητες ακόρεστων λιπιδίων και χρησιμοποιεί περίπου το 20% των συνολικών αναγκών O_2 . Μερικές από τις παθήσεις του νευρικού συστήματος που χαρακτηρίζουν τους αμνούς, είναι η λιστερίωση, που σχετίζεται με την κακής ποιότητας ενσίρωση, λοιμώξεις που σχετίζονται με την πρόκληση βλαβών στην

περιοχή του θαλάμου και επηρεάζουν την όραση και την ισορροπία (NADIS, 2015) καθώς και η υποξική- ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια, που οφείλει την εμφάνισή της στην αλλαγή του μεταβολικού ρυθμού του εγκεφάλου λόγω οξειδωτικού στρες στα έμβρυα (Tomoaki Ikeda et al., 1999).

Ο εγκέφαλος δεν φαίνεται να είναι ιδιαίτερα πλούσιος σε αντιοξειδωτικά ένζυμα (SOD, καταλάση, γλουταθειόνη, υπεροξειδάση). Περισσότερο εμπλουτισμένα είναι τα νευρογλοιακά κύτταρα σε GSH, τα οποία έχουν και μεγαλύτερη δραστικότητα της SOD, γι' αυτό και η αυξημένη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες στον εγκέφαλο έχει συσχετιστεί με τη χαμηλή δραστικότητα της γλουταθειόνης (Tomoaki Ikeda et al., 1999). Η γλουταθειόνη είναι το κυριότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό που παράγεται από τα κύτταρα, συμμετέχοντας απευθείας στην εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών και ενεργών μορφών του οξυγόνου και συνεπώς μία αύξηση της δράσης της συνδέεται με ενισχυμένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα της GSH του εγκεφαλικού ιστού στις 65 ημέρες φάνηκαν να αυξάνονται ελάχιστα στις πολυφαινολικές ομάδες σε σχέση με τις ομάδες control, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική αυτή η μεταβολή, υποδεικνύοντας μία πιθανή ευεργετική δράση των πολυφαινολών της εμπλουτισμένης ζωοτροφής.

Όσον αφορά τον τετρακέφαλο ιστό, διαθέτει επίσης ενδογενή αντιοξειδωτικά στα οποία συμπεριλαμβάνονται: η τοκοφερόλη, διπεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη (καρνοσίνη, ανσερίνη), αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδική δισμουτάση και η καταλάση. Παρά την παρουσία αντιοξειδωτικών συστημάτων, η οξείδωση των λιπιδίων στους μυς, εμπλέκετε στη μοριακή βάση ασθενειών όπως η μυϊκή δυστροφία. Τα λιπίδια στους μυς κυμαίνονται σε μεγάλα όρια (1-20%) και εντοπίζονται κυρίως στο επίπεδο κυτταρικών μεμβρανών, όπως στα μιτοχόνδρια, το σαρκοπλασματικό δίκτυο και τα μικροσώματα. Επειδή η συγκέντρωση και η δραστικότητα πολλών ενδογενών αντιοξειδωτικών των μυών μπορεί να επηρεαστεί από τη διατροφή του ζώου, κρίνεται αναγκαία η κατανόηση της σχέσης διατροφής και συνολικού αντιοξειδωτικού τόνου του μυός, τόσο για την μείωση συχνότητας εμφάνισης σοβαρών ασθενειών όσο και για την ενίσχυση της οξειδωτικής σταθερότητας, για μεγαλύτερη διάρκεια ζωής του ζώου και την ασφάλεια των τροφίμων που θα προέλθουν από αυτά. Στην παρούσα μελέτη υπογραμμίζεται έντονα η ενίσχυση της δράσης της GSH, στον τετρακέφαλο ιστό μετά από χορήγηση ζωοτροφής εμπλουτισμένης με ενσίρωμα στεμφύλων, ανάμεσα

στις πολυφαινολικές ομάδες και τις ομάδες control. Συγκεκριμένα η αύξηση είναι της τάξης του 29,62%, στατιστικά σημαντική.

Η υψηλή περιεκτικότητα σιδήρου στα πρόδρομα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα, η δράση των μακροφάγων και της μικρογλοία, η οποία απελευθερώνει προφλεγμονώδεις κυτοκίνες συμπεριλαμβανομένων των IL-1b, IL-18 και TNF-a, ανήκουν στους παράγοντες που συμβάλλουν στην αυξημένη παραγωγή των ROS. Τα υψηλά επίπεδα των ROS στον εγκέφαλο έχουν σαν αποτέλεσμα την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων της μεμβράνης της λευκής ουσίας, την αύξηση των επιπέδων του υπεροξειδίου του υδρογόνου και των θειοβαρβιτουρικών δραστικών ουσιών (TBARS) (Anna Karin Welin, 2004). Στην παρούσα μελέτη, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, σημειώνεται μια στατιστικά σημαντική αύξηση, για τον εγκεφαλικό ιστό κατά 251,3% στις 42 ημέρες και κατά 98,8% στις 65 μέρες των πολυφαινολικών ομάδων σε σχέση με τις control κάτι που δεν αναμένεται, αλλά μπορεί να οφείλεται στην μεγάλη ευαισθησία των λιπαρών οξέων της μεμβράνης λευκής ουσίας στην οξείδωση, με κατάσταση που φαίνεται να ενισχύεται και με την πάροδο της ηλικίας. Ειδικότερα, όσον αφορά τον ηλικιακό παράγοντα, όντως αποδεικνύεται να συμβάλλει σ' αυτή την κατάσταση αφού συγκρίνοντας και τις ομάδες control μεταξύ τους παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 42 στις 65 ημέρες. Αντίθετα, για τον τετρακέφαλο ιστό δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, αλλά παρ' όλα αυτά αξίζει να υπογραμμιστεί πως τα επίπεδα των TBARS παρουσιάζουν προοδευτική μείωση από τις 42 στις 65 ημέρες.

Όσον αφορά την καταλάση, η μεγαλύτερη δραστηριότητα αυτού του ενζύμου παρατηρείται στο ήπαρ, αφού πρόκειται για ζωτικό όργανο του συστήματος της πέψης, που διασπά τα τοξικά υπεροξειδία του υδρογόνου, παράγοντας νερό και οξυγόνο. Στον εγκέφαλο η δραστηριότητα της καταλάσης παρουσιάζει διακυμάνσεις, πιθανότατα λόγω του μικρού χρόνου ημιζώης του ενζύμου (<10min) και συνεπώς οι ερευνητικές απόψεις είναι αντικρουόμενες πάνω στο συγκεκριμένο ζήτημα. Χρησιμοποιώντας διαφορετικά ζωικά μοντέλα (όπως αρουραίους και ποντίκια), άλλες υποστηρίζουν πως η δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου, με την πάροδο του χρόνου και άρα της ηλικίας, συνολικά παραμένει αμετάβλητη σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου (Carrilo et al, 1992) (Hussain, 1995) ενώ σε άλλες υποστηρίχθηκε πως η δράση της μειώνεται κατά την ενηλικίωση του ζώου, παρουσιάζοντας μια τάση στη συνέχεια για αύξηση. Όσον αφορά τον τετρακέφαλο

ιστό σε ανάλογη μελέτη (Goutzourelas et.al., 2015), φάνηκε ότι η χορήγηση εκχυλισμάτων σπόρων σταφυλιού(GPE), δεν ασκεί αντιοξειδωτική δράση μέσω της ρύθμισης των αντιοξειδωτικών ενζύμων CAT, SOD και HO-1 ένζυμα. Σε αυτή τη μελέτη, η θεραπεία με GPE μείωσε τόσο την έκφραση και τη δραστικότητα του ενζύμου CAT σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ στα μυϊκά κύτταρα, δεν είχε κανένα αποτέλεσμα. Σε αντιστοιχία λοιπόν με τα παραπάνω συμπεράσματα και σ' αυτή την πειραματική έρευνα, οι μεταβολές στη δραστικότητα της καταλάσης τόσο για τον εγκεφαλικό όσο και για τον τετρακέφαλο ιστό, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, συγκρίνοντας τις πολυφαινολικές ομάδες με τις ομάδες control.

Για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης. Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού. Ο πρώτος τρόπος προσέγγισης της TAC σχετίζεται με το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο επίπονος τρόπος επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο, όπως πραγματοποιήθηκε και για την παρούσα μελέτη, καταδεικνύοντας μια στατιστικά σημαντική μείωσή της στον εγκεφαλικό ιστό, 65 ημερών του επιπέδου 29,9% ανάμεσα στις πολυφαινολικές ομάδες και τις ομάδες control. Αντίθετα, για τον τετρακέφαλο ιστό δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή ούτε στις 42 και 65 ημέρες.

Τέλος, η οξειδωτική βλάβη στις πρωτεΐνες έχει σαν αποτέλεσμα ενός πλήθους προϊόντων που προκύπτουν από την τροποποίηση ενός μεγάλου φάσματος αμινοξέων. Η οξειδωτική βλάβη μπορεί να συσχετιστεί με τις ομάδες θείου, τα αρωματικά και αλειφατικά αμινοξέα. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν μια μη αναστρέψιμη μορφή τροποποίησης πρωτεϊνών που έχει αποδεχθεί πως είναι πολύ σταθερές, σε αντίθεση με τα προϊόντα υπεροξειδωσίας των λιπιδίων που εξουδετερώνονται μέσα σε λίγα λεπτά. Ο σχηματισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων λαμβάνει χώρα πολύ γρήγορα, χωρίς να είναι το αποτέλεσμα συγκεκριμένης δράσης οξειδωτικού και έτσι μπορεί να χαρακτηριστεί ως δείκτης

συνολικής οξειδωσης των πρωτεϊνών. Αξίζει να σημειωθεί τα προϊόντα που σχηματίζονται με την οξείδωση των πρωτεϊνών (φορμαλδεΰδη, ακεταλδεΰδη, ακετόνη) απομακρύνονται γρήγορα και είναι δύσκολο να προσδιοριστούν. Γι' αυτό και σε αυτήν την περίπτωση δεν παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Συνοψίζοντας, τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν στην άποψη των ευεργετικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων από στέμφυλα λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης η οποία βασίζεται κυρίως στην σημαντικά υψηλή περιεκτικότητα τους σε πολυφαινόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, ουριδίνη, γενιστεΐνη, γενιστίνη, τυροσόλη, γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, συριγκικό οξύ, μηλικό οξύ, π-μεθόξικουμαρικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, τρυγικό οξύ), (Soquet et al., 2000; Vivas et al., 2004; Apostolou et al., 2013). Η θετική επίδραση, ήταν κυρίως εμφανής στον τετρακέφαλο ιστό και όχι τόσο στον εγκέφαλο, καθώς πρόκειται για ένα όργανο που εμφανίζει ευαισθησία έναντι των ROS και συνεπώς η δράση των αντιοξειδωτικών συστημάτων με την πάροδο της ηλικίας, παρουσιάζει ένα διαφορετικό πρότυπο δράσης σε σχέση με τα άλλα όργανα. Οι συγκεκριμένες παρατηρήσεις δεν θα πρέπει να εξετάζονται μεμονωμένα αλλά θα πρέπει να ληφθεί υπόψη πως και άλλοι παράγοντες επηρεάζουν τις τελικές τιμές. Ειδικότερα, εκτός από τη διατροφή, σημαντικό ρόλο στην ευζωία και στην ανάπτυξη των παραγωγικών ζώων παίζει και το περιβάλλον εκτροφής, δηλαδή οι συνθήκες ενσταβλισμού καθώς, η μεταχείριση των ζώων όπως και το γενετικό προφίλ το κάθε ζώου.

Βιβλιογραφία

- Giles GI, Jacob C, Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress, *Biol Chem.* 2002 Mar-Apr
- Halliwell B, Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept, *Nutr Rev.* 1999 Apr
- Halliwell and Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 1999.
- Taylor DE, Ghio AJ, Piantadosi CA., Reactive Oxygen species produced by liver, mitochondria of rats in sepsis, 1995 *Arch Biochem Biophys*
- BOVERIS A, CADENAS E (1997) Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCH LB, MASSARO DJ (eds) *Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function*. NY: Marcel Dekker
- BOVERIS A, COSTA L, CADENAS E (1999a) The mitochondrial production of oxygen radicals and cellular aging. In: CADENAS E, PACKER L (eds) *Understanding the process of aging*. NY: Marcel Dekker
- Griendling, K. K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*
- Yu, *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species*, 1994
- Chance B, Sies H, Boveris A, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol Rev.* 1979
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 2. Clarendon Press, Oxford
- Tom J. Battin, Sebastiaan Luyssaert, Louis A. Kaplan, Anthony K. Aufdenkampe, Andreas Richter & Lars J. Tranvik, The boundless carbon cycle, *Nature Geoscience*, 2009.
- Sies, H. (1991). Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *Amer. J. Med.* 91, 31-38.
- Earl R. Stadtman, Protein Oxidation in Aging and Age-Related Diseases, 25 JAN 2006
- Rimbach, M. , and F. Liebert. 1999. N-metabolism parameter of current broiler chicken genotypes in different age period. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 8:49.
- Reid MB, Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction, *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2001.
- Sen CK, Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction, *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2001.
- Linnane, A.W. *et al.*, Aging and global function of coenzyme, *N.Y. Acad. Sci*, 2002.
- Julien Finaud, Gérard Lac, Edith Filaire, *Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training*, *Sports Medicine*, 2006.
- Halliwell B, Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging in press*, 2001.
- Gulam Waris and Haseeb Ahsan, Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions, *Journal of Carcinogenesis* 2006.

- Jabs T Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol*, 1999.
- Benhar M., Dalyot I., Engelberg D. and Levitzki A., Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol. Cell Biol.*, 2001.
- Davis R.J, Signal transduction by the JNK group of MAP kinases, *Cell*, 2000.
- Cathy Tournier, Requirement of JNK for Stress- Induced Activation of the Cytochrome c-Mediated Death Pathway, *Science*, 5 May 2000.
- Kornelia Polyak, Yong Xia, Jay L. Zweier, Kenneth W. Kinzler and Bert Vogelstein, A model for p53-induced apoptosis, *Nature*,1997.
- Fuchs S.Y., Dolan L.,Davis R.J., Ronai Z., Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene*, 1996.
- Ricardo Sanchez-Prieto, Jose M. Rojas, Yoichi Taya, and J. Silvio Gutkind, A Role for the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in the Transcriptional Activation of p53 on Genotoxic Stress by Chemotherapeutic Agents, *American Association for Cancer Research*, 2000.
- Shaulian E, Karin M, AP-1 in cell proliferation and survival, *Oncogene* 2001.
- Moran Benhar, David Engelberg, Alexander Levitzki, ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer, *EMBO reports*, 2002.
- M. Kaplan, T. Hayek, A. Raz, R. Coleman, L. Dornfeld, M. Vaya, *et al*, Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis, *Journal of Nutrition*, 2001.
- Cohen G, Somerson NL, *Mycoplasma pneumoniae*: hydrogen peroxide secretion and its possible role in virulence. *Ann N Y Acad Sci.* , 1967 Jul 28.
- Yi Sun, Larry W. Oberley, The inhibition of catalase by glutathione, *Free Radical, Biology and Medicine*, 1989.
- James M. May, Zhi-chao Qu,Dustin R. Neel, Xia Li, Recycling of vitamin C from its oxidized forms by human endothelial cells, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2003.
- Helmut Sies' Glutathione and its role in cellular functions, *Free Radical Biology and Medicine*, 1999.
- Suvara Kimnate Wattanapitayakul, John Anthony Bauer, Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications, *Pharmacology & Therapeutics*, 2001.
- Lester Packer, Stefan U. Weber, and Gerald Rimbach, *Molecular Aspects of α -Tocotrienol Antioxidant Action and Cell Signalling*, *The American Society for Nutritional Sciences*,2001.
- K. Hermann, Flavonoid antioxidants in food of plant origin, *Gordian*, 1993.
- A. King, G. Young, Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals, *Journal of American Dietetic Association*, 1999.

- M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo, M. Toscano, Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism, *The Journal of the Physical Chemistry A*, 2004
- Leopoldini, T. Marino, N. Russo, M. Toscano, Density functional computations of the energetic and spectroscopic parameters of quercetin and its radicals in the gas phase and in solvent, *Theoretical Chemistry Accounts*, 2004.
- M. Leopoldini, I. Prieto Pitarch, N. Russo, M. Toscano, Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study, 2004
- J.S. Wright, E.R. Johnson, G.A. DiLabio, Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *Journal of the American Chemical Society*, 2001.
- S.V. Jovanovic, S. Steenken, M.G. Simic, Y. Hara, Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoids radicals, *Flavonoids in health and disease*, Marcel Dekker, New York, 1998.
- Monica Leopoldini, Nino Russo, Marirosa Toscano, The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants, *Food Chemistry*, 2011.
- Cesar G. Fraga et al, Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols, *Molecular Aspects of Medicine*, 2010.
- H.J. Palmer, K.E. Paulson, Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression, *Nutrition Reviews*, 1997.
- Irfan Rahman et al, Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols, *Biochemical Pharmacology*, 2006.
- Massimo D'Archivio, Carmelina Filesi, Rosaria Vari, Beatrice Scazzocchio, and Roberta Masella, Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies, *Int J Mol Sci.*, 2010.
- En-Qin Xia, Gui-Fang Deng, Ya-Jun Guo, and Hua-Bin Li, Biological Activities of Polyphenols from Grapes, *Int J Mol Sci.* 2010.
- Louise I Mennen, Ron Walker, Catherine Bennetau-Pelissero, and Augustin Scalbert, Risks and safety of polyphenol consumption, *American Society for Clinical Nutrition*, 2005.
- Ugartondo, V.; Mitjans, M.; Lozano, C.; Torres, J.L.; Vinardell, M.P., Comparative study of the cytotoxicity induced by antioxidant, epicatechin conjugates obtained from grape. *J. Agric. Food Chem.*, 2006
- Fan P, Lou H., Effects of polyphenols from grape seeds on oxidative damage to cellular DNA, *Mol Cell Biochem*, 2004.
- D. Stagos, C. Spanou, M. Margariti et al., "Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007.
- Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL., A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western Australia, 1946.

- Izabela Wocławek-Potocka, Chiara Mannelli, Dorota Boruszewska, Ilona Kowalczyk-Zieba, Tomasz Waśniewski, and Dariusz J. Skarżyński, Diverse Effects of Phytoestrogens on the Reproductive Performance: Cow as a Model, *International Journal of Endocrinology*, 2013.
- M.A. Bustamante, R. Moral, C. Paredes, A. Pérez-Espinosa, J. Moreno-Caselles, M.D. Pérez-Murcia, Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry, *Waste Management*, 2008.
- Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H., Nury, F.S., 1999. Wine analysis and production. Aopen Publishers, Inc., Garthersburg, ML, USA. ,1999.
- A. Scalbert, Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry*, 1991.
- R. Devesa-Rey, X. Vecino, J.L. Varela-Alende, M.T. Barral, J.M. Cruz, A.B. Moldes, Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling, *Waste Management*, 2011.
- Lykkesfeldt J, Svendsen O, Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 173(3):502-11, 2007.
- Goutzourelas N, Stagos D, Demertzis N, Mavridou P, Karterolioti H, Georgadakis S, Kerasioti E, Aligiannis N, Skaltsounis L, Tsatsakis A.M, Hayes A.W, Kouretas D. Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Human and Experimental Toxicology.* 33(11):1099-112, 2014.
- Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, Trizoglou I, Wallace Hayes A, Tsatsakis A.M, Kouretas D. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts *Food and Chemical Toxicology.* 61: 60–68, 2013.
- Pastore A., Fedetici G., Bertini E., Piemonte F. Analysis of Glutathione: Implication in Redox and Detoxification, 2003.
- Sengupta A., Ghosh S., Bhattacharjee S. Allium Vegetables in Cancer Prevention: An Overview, 2004.
- Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R., Prabhakar, M.C. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients, 2004.
- Roland F. Beers, Jr. and Irwin W. Sizer. A Spectrophotometric Method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by Catalase, 1952.
- Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure, 2004.
- N. Παπαγαλάνης, Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα, I. Δραστικές ρίζες οξυγόνου, *Ελληνική Νεφρολογία* 2014; 26 (3): 151 – 194.
- N. Παπαγαλάνης, Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα III. Η τοξικότητα των ελεύθερων ριζών, *Ελληνική Νεφρολογία* 2015; 27 (1): 17 – 50.
- E. Γιαννακοπούλου, Οξειδωτικό stress – αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί Κλινική σημασία, *Archives of Hellenic Medicine* 2009, 26(1):23–35.
- Δημοπούλου Ειρήνη, Μελέτη Ταννινών των Γίγαρτων της ποικιλίας Cabernet Sauvignon, Εφαρμογή και Ανάπτυξη μεθόδων Ανάλυσης, Αθήνα 2008.

- Βράκας Αναστάσιος, Διδακτορική Διατριβή, με θέμα: Μελέτη της τροποποίησης ποιοτικών και βιολογικά δραστικών συστατικών του οίνου από την έκθεσή του σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία. Δυνατότητα εισαγωγής νέων όρων διασφάλισης ποιότητας των οίνων, Αργίνιο 2012.
- Bhat KP¹, Pezzuto JM., Cancer chemopreventive activity of resveratrol, Ann N Y Acad Sci. 2002.
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM, Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?, Clin Biochem. 1997.
- Arnous, A & Meyer, AS, Grape skins (Vitis vinifera L.) catalyze the in vitro enzymatic hydroxylation of p-coumaric acid to caffeic acid' Biotechnology Letters,2009.
- Γιαννόπουλος Νικόλαος, Εκχύλιση Στέμφυλων για ανάκτηση φαινολικών ενώσεων, ποσοτικός προσδιορισμός τους και μέτρηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης., Θεσσαλονίκη 2012.
- ΚΑΛΛΗ ΕΛΛΗ, ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΟΙΝΟΥ ΣΕ ΧΩΡΕΣ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΗΣ ΚΑΙ ΤΑ ΟΦΕΛΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ,2008.
- Possner D, Kliewer WM,The localisation of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. Vitis,1985 24: 229–240.
- Pinelo M, Arnous A, Meyer AS. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. Trends Food Sci Tech. 2006.
- Tania Brenes-Arguedas,Phyllis D. Coley and Thomas A. Kursar, Divergence and diversity in the defensive ecology of Inga at two Neotropical sites, Journal of Ecology,2007.
- Tomoaki Ikeda,Ben H Choi, Simon Yee,Yuji Murata,Edward J Quilligan, Oxidative stress, brain white matter damage andintrauterine asphyxia in fetal lambs, International Journal of Developmental Neuroscience,1999.
- NADIS,Nervous Disease in Sheep,2015
- Anna-Karin Welin, Mats Sandberg, Anna Lindblom, Pernilla Arvidsson, Ulf A Nilsson, Ingemar Kjellmer and Carina Mallard, White Matter Injury Following Prolonged Free Radical Formation in the 0.65 Gestation Fetal Sheep Brain,2005.

