

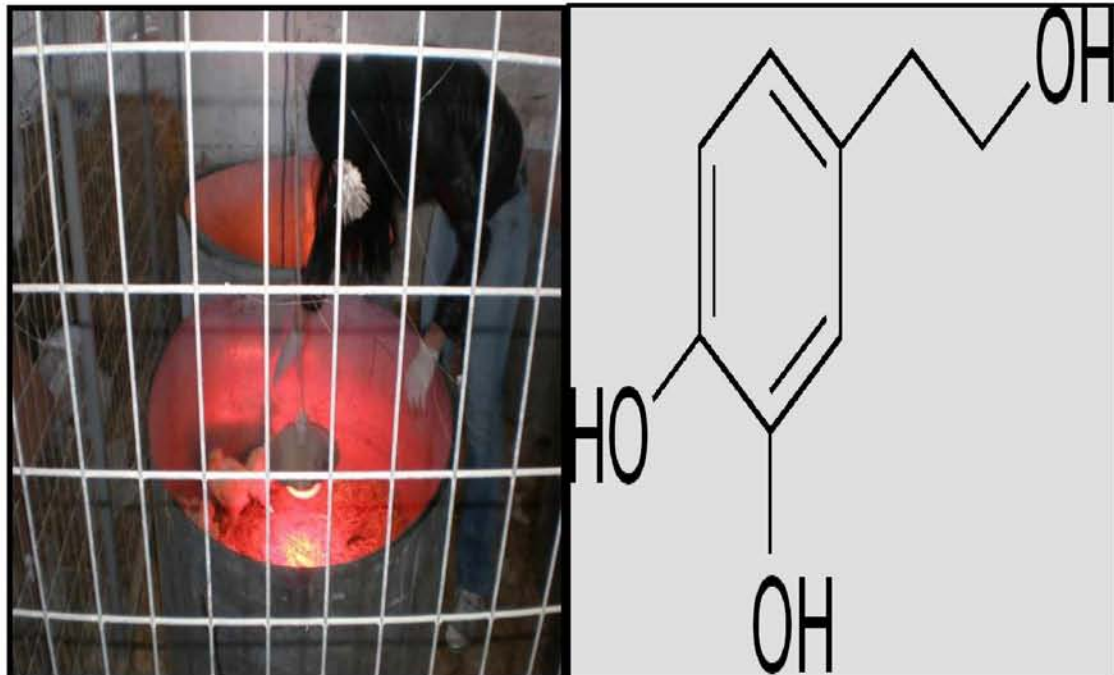


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ  
ΑΠΟ ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ  
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ

ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN CHICKEN  
TISSUES TREATED WITH POLYPHENOLIC ADDITIVES



ΜΠΑΡΔΑ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

Λάρισα 2014

### **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 & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Κων/νος Πετρωτός:** Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ/Λάρισας.

## **Ευχαριστίες.**

Η παρούσα διπλωματική εργασία, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτρη Κουρέτα, εκπονήθηκε στα εργαστήρια: Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων - Βιοσυστημάτων και στο αγρόκτημα του ΤΕΙ / Θεσσαλίας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του, όπως επίσης και για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Ευχαριστώ 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 επίσης, τον Επίκουρο Καθηγητή του ΤΕΙ/Λάρισας κ. Κωνσταντίνο Πετρωτό.

Ευχαριστώ ακόμη όλη την ομάδα του εργαστηρίου, για το συνεργατικό και ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τον υποψήφιο Διδάκτορα, Κώστα Γερασόπουλο που βοήθησε τα μέγιστα τόσο στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας όσο και στην ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας .

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις τελευταίες δεκαετίες, υπάρχει σημαντική αύξηση στην παραγωγή των προϊόντων διατροφής φυτικής προέλευσης. Ο κύριος λόγος είναι το πολυφαινολικό περιεχόμενο τους, στο οποίο αποδίδεται από μελέτες, σημαντική βιολογική δράση.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διατροφή των κοτόπουλων πάχυνσης, με ζωοτροφές που περιείχαν πολυφαινολικά πρόσθετα, από επεξεργασμένα ΥΑΕ (υγρά αποβλήτα ελαιολιβεύου) και από υπολείμματα απόσταξης τριαντάφυλλου, προκειμένου να ελεγχθούν οι δείκτες του οξειδωτικού στρες στους ιστούς τους. Για τον λόγο αυτό, τα κοτόπουλα χωρίστηκαν σε τέσσερις (4) ομάδες των δώδεκα (12) ατόμων. Η ομάδα Α ήταν η ομάδα ελέγχου, με τη βασική διαίτα σε όλο το πείραμα. Οι άλλες τρεις (3) ομάδες είχαν λάβει ειδική τροφή με πολυφαινολικά πρόσθετα, βέβαια διαφορετική για την κάθε μία.

Πενήντα δύο (52) ημέρες μετά την γεννησή τους, εκτελέστηκε συλλογή δειγμάτων από τον τετρακέφαλο μυ, τον καρδιακό μυ και το ήπαρ. Στη συνέχεια εκτελέστηκε έλεγχος των δεικτών του οξειδωτικού στρες, για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), της δραστηριότητας της καταλάσης, των TBARS, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας έδειξαν ότι τα πολυφαινολικά πρόσθετα επηρεάζουν τη συμπεριφορά των δεικτών οξειδωτικού στρες, μεταξύ των διαφορετικών ομάδων. Συγκεκριμένα, η ομάδα C, που ελάμβανε το πλήρως εμπλουτισμένο σε πολυφαινόλες εκχύλισμα από ΥΑΕ, παρουσίασε στατιστικά αυξημένες τιμές τιμές TAC, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, μέχρι και 19,2% στον καρδιακό ιστό, στον τετρακέφαλο κατά 18,1% και στον ηπατικό κατά 14,8%. Κατά συνέπεια, η παρουσίαση πολυφαινολών στη διατροφή της ομάδας αυτής βοηθά στην αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

## **ABSTRACT**

During the past several years, there has been an increased interest for the production of plant origin food products. One of the main reasons is that plant foods contain polyphenols, phytochemicals with important biological properties.

The aim of the present study was to examine the effect on the antioxidant status in tissues (quadriceps – cardiac – hepatic) of raising broiler chickens after administration of feed containing polyphenolic additives from processed olive mill waste waters (OMWW) and distilling rose residues. For this reason, the broiler chickens were divided into four (4) groups of twelve (12) subjects each. Group A was the control group receiving the basic diet throughout the whole experiment. Each of the other three (3) groups (B, C and D) was receiving a different special feed containing polyphenolic additives.

Fifty-two (52) days after birth, tissue collection was performed in 105 samples (quadriceps, heart and liver). An assessment of oxidative stress markers was performed, for the determination of oxidative stress biomarkers such as reduced glutathione (GSH), the activity of catalase, TBARS, protein carbonyls and total antioxidant capacity (TAC).

In summary, the results of the present study showed that the antioxidant status of the broiler chickens fed with the polyphenolic extracts was increased because of the polyphenolic additives. Specifically, the group C receiving the fully enriched polyphenol extract from OMWW showed an increase in TAC by 19.2% in the cardiac tissue, 18.1% in the quadriceps and 14.8% in the liver. Therefore, the addition of polyphenols in the diet of this group helped to increase the total antioxidant capacity of the raising broiler chickens.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΣΕΛΙΔΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.</b>	<b>5</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.</b>	<b>6</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.</b>	<b>8</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.</b>	<b>9</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.</b>	<b>10</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.</b>	<b>11</b>
1.1. Πολυφαινόλες.	12
1.1.1 Ορισμός.	12
1.1.2 Φυσικές Ιδιότητες.	12
1.2. Φυτικές Πολυφαινόλες - Κατηγορίες.	12
1.3. Οξειδωτικό Στρες.	16
1.3.1 Ιστορική Αναδρομή.	16
1.3.2 Ελευθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη O <sub>2</sub> .	16
1.3.3 Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες στον Οργανισμό μας.	18
1.3.4 Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ), στον Οργανισμό μας.	20
1.3.5. Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.	21
1.4. Σκοπός.	23
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.</b>	<b>24</b>
2.1. Γενικά.	24
2.2. Περιγραφή Σιτηρεσίου.	24
2.3. Λήψη Ιστών – Ομογενοποίηση.	25
2.3.1. Επεξεργασία Ιστών.	27
2.3.2. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες.	27
2.3.2.1 Γενικά.	27
2.4 Μέθοδοι.	27
2.4.1 Πρωτόκολλα Δεικτών Οξειδωτικού Στρες	27
2.4.1.1 Γενικά	27
2.4.2 Μέτρηση Γλουταθειόνης	28

2.4.3	Δραστηριότητα της καταλάσης	31
2.4.4	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)	34
2.4.5	Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβουριτικό οξύ (TBARS)	36
2.4.6	Πρωτεϊνικά καρβονύλια	38
<b>3.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>42</b>
<b>3.1.</b>	Μέτρηση γλουταθειόνης στους ιστούς	<b>42</b>
<b>3.2.</b>	Δραστηριότητα της καταλάσης στους ιστούς	<b>43</b>
<b>3.3.</b>	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στους ιστούς	<b>44</b>
<b>3.4.</b>	Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβουριτικό οξύ στους ιστούς	<b>45</b>
<b>3.5.</b>	Πρωτεϊνικά καρβονύλια στους ιστούς.	<b>46</b>
<b>4.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>50</b>

## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.**

<b>Πίνακας 1.</b> Κυριότερες Πολυφαινόλες στα ΥΑΕ και στα Τριαντάφυλλα.	<b>13</b>
<b>Πίνακας 2.</b> Ενώσεις που περιέχονται, από την απόσταξη ροδοπετάλων.	<b>15</b>
<b>Πίνακας 3.</b> Σιτηρέσιο κοτόπουλων πάχυνσης.	<b>24</b>
<b>Πίνακας 4.</b> Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της GSH.	<b>30</b>
<b>Πίνακας 5.</b> Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης.	<b>33</b>
<b>Πίνακας 6.</b> Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC.	<b>35</b>



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.

<b>Εικόνα 1.</b> Φαινολικό (Φαινικό οξύ): Η απλούστερη φαινόλη	<b>12</b>
<b>Εικόνα 2.</b> Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων	<b>14</b>
<b>Εικόνα 3.</b> Ταννίνες και άλλες πολυφαινόλες από Αγριοτριανταφυλλιά	<b>16</b>
<b>Εικόνα 4.</b> Το DNA, οι Πρωτεΐνες και τα Λιπίδια, Αποτελούν τους Στόχους των Ελευθέρων Ριζών	<b>19</b>
<b>Εικόνα 5.</b> Τρόποι Σχηματισμού των Ελευθέρων Ριζών	<b>19</b>
<b>Εικόνα 6.</b> Οξειδωτικό Στρες	<b>20</b>
<b>Εικόνα 7.</b> Δράση Χημειοπροστατευτικών Παραγόντων	<b>22</b>
<b>Εικόνα 8.</b> Κλωβοί ανάπτυξης	<b>24</b>
<b>Εικόνα 9.</b> Πτηνοτροφείο Κακανούδη	<b>26</b>
<b>Εικόνα 10.</b> . Αναισθητοποίηση για λήψη Ιστών	<b>26</b>
<b>Εικόνα 11.</b> Ομογενοποίηση Ιστών με Υγρό Άζωτο	<b>26</b>
<b>Εικόνα 12.</b> Ομογενοποίηση Ιστών	<b>26</b>
<b>Εικόνα 13.</b> Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης	<b>28</b>
<b>Εικόνα 14.</b> Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης	<b>29</b>
<b>Εικόνα 15.</b> Φάσμα απορρόφησης του 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκού οξέος	<b>30</b>
<b>Εικόνα 16.</b> Μονοπάτι αναγωγής του H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> σε H <sub>2</sub> O	<b>32</b>
<b>Εικόνα 17.</b> Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA	<b>37</b>
<b>Εικόνα 18.</b> Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου	<b>39</b>

## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.**

<b>Γράφημα 1.</b> Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης	<b>31</b>
<b>Γράφημα 2.</b> Μέτρηση Γλουταθειόνης στους ιστούς	<b>43</b>
<b>Γράφημα 3.</b> Δραστηριότητα Καταλάσης	<b>44</b>
<b>Γράφημα 4.</b> Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα	<b>45</b>
<b>Γράφημα 5.</b> Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ.	<b>46</b>
<b>Γράφημα 6.</b> Πρωτεϊνικά Καρβονύλια	<b>47</b>

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ερευνητικό ενδιαφέρον σχετικά με το πολυφαινολικό προφίλ των Υ.Α.Ε. (Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου), είναι ιδιαίτερα αυξημένο. Αυτό ισχύει διότι οι πολυφαινόλες παρέχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, η οποίες μπορεί να σχετίζονται με την πρόληψη ασθενειών που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Giacosa A. et.al. 2012., Scoditti, E., et. al. 2012., Castaner O., et. al., 2011., Yamada K, et.al. 2009).

Τα Υ.Α.Ε. χαρακτηρίζονται από βαρύ φορτίο ρύπων. Οι πολυφαινόλες είναι η βασική παράμετρος της ρύπανσης (Mebirouk et. al., 2007, Robards 1998, Tsimidou et. al. 1992). Η απομόνωση των πολυφαινολών από το φορτίο των Υ.Α.Ε., δημιουργεί ένα προϊόν κατάλληλο για πολλές γεωργικές εφαρμογές, π.χ. υδρολίπανση, ενσίρωση. (Gkoutsidis et al., 2011), ενώ το πολυφαινολικό προϊόν μπορεί να διαχειρισθεί ανάλογα, με γνώμονα πάντα την αντιοξειδωτική του δράση. Στην βιβλιογραφία, από το 1992 μέχρι και σήμερα υπάρχουν δεκαοκτώ (18) μελέτες, που αναφέρονται σε πολυφαινολικά πρόσθετα σε κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, με πρόσφατες των Worapol & Maitree 2013, Xiao et. al., 2013, Zhou et. al., 2012, Viveros et. al. 2011. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη όπου πολυφαινολικά πρόσθετα από επεξεργασμένα Υ.Α.Ε. και υπολείμματα απόσταξης τριαντάφυλλου, προστίθενται στην διατροφή των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, με σκοπό ανάλυση των δεικτών του οξειδωτικού στρες στους ιστούς τους.

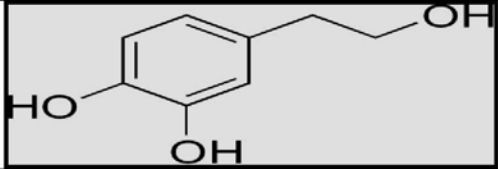
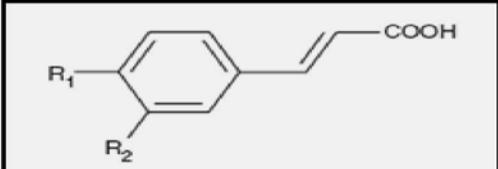
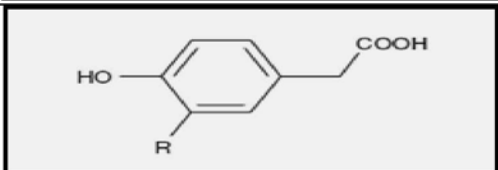
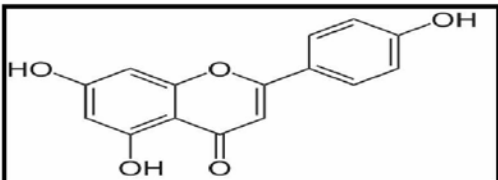
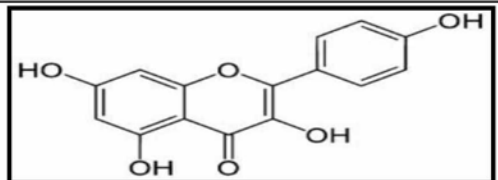
Επίσης, τα εκχυλίσματα από φύλλα και πέταλα τριαντάφυλλου, είναι μια πλούσια πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη των επιβλαβών επιδράσεων που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες (Nowak 2007, Schieber et.al. 2005).

### 1.1. Φυτικές Πολυφαινόλες - Κατηγορίες.

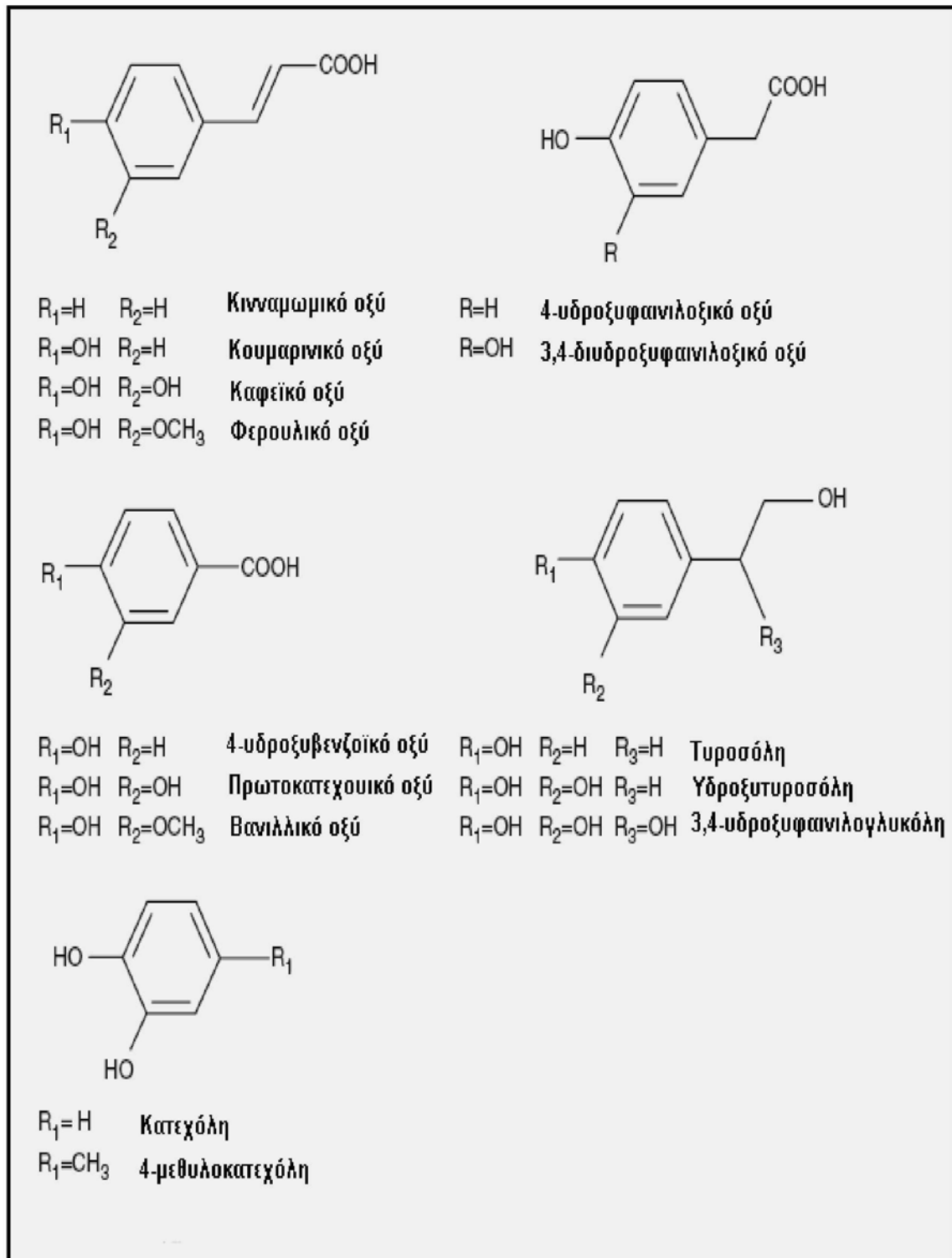
Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά (Bravo 1998). Έχουν αναγνωριστεί ως τώρα χιλιάδες τέτοιων ενώσεων στα ανώτερα φυτά, και ιδιαίτερα σε εδώδιμα φυτά, τα προϊόντα των οποίων αποτελούν τρόφιμα της καθημερινής διατροφής.

Φρούτα, λαχανικά καθώς και ροφήματα όπως το κόκκινο κρασί, και το τσάι, αποτελούν καλές πηγές πολυφαινολών. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, που οφείλεται κυρίως στην

αναγνώριση των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων καθώς και της πιθανής χημειοπροστατευτικής τους επίδρασης στην ανθρώπινη υγεία (Dew et. al., 2005). Οι φυτικές πολυφαινόλες, ποικίλουν για κάθε είδος φυτού και στα διάφορα μέρη του. Τα ΥΑΕ και τα τριαντάφυλλα, περιέχουν πολυφαινόλες, των οποίων οι κυριότερες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

α/α	Κατηγορία	Πολυφαινόλες	Χημικοί Τύποι
1	Υ.Α.Ε.	Υδροξυτυροσόλη	
		Καφεϊκό Οξύ	
		Υδροξυφαινολικό Οξύ	
2	Τριαντάφυλλα	Απιγενίνη	
		Καμφερόλη	

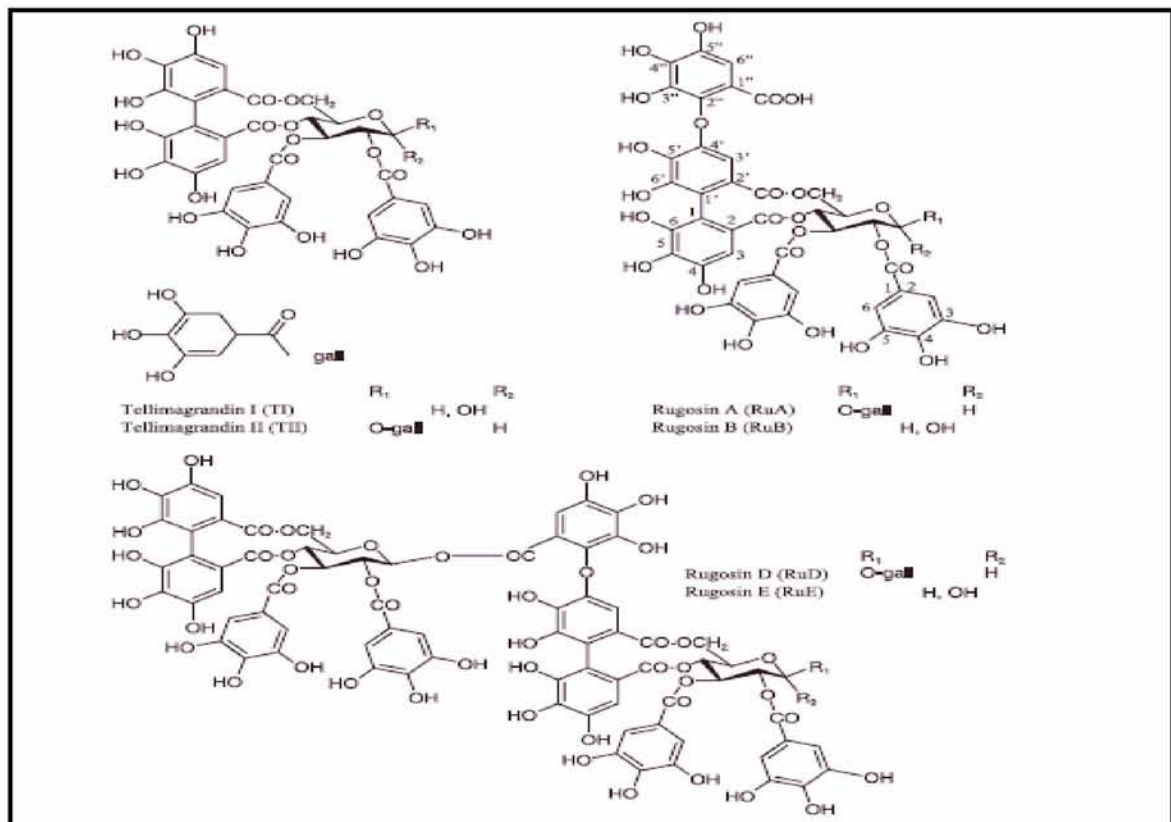
**Πίνακας 1.** Κυριότερες Πολυφαινόλες στα ΥΑΕ και στα Τριαντάφυλλα.



**Εικόνα 1:** Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων. (Niaounnakis & Halvadakis, 2006).

Compound	Identity	Retention time [min]	HPLC-DAD $\lambda_{max}$ [nm]	$[M-H]^-$ $m/z$	MS <sup>2</sup> fragments $m/z$	Content [mg/kg dw]
1	Quercetin galloylhexoside	30.0	231, 256, 263sh, 302sh, 353	615	463/301	60 ± 5
2	Quercetin 3-O-rutinoside	32.6	231, 256, 264sh, 302sh, 354	609	301	117 ± 29
3	Quercetin 3-O-galactoside	33.1	231, 256, 264sh, 302sh, 353	463	301	1228 ± 32
4	Quercetin 3-O-glucoside	33.9	231, 256, 263sh, 302sh, 353	463	301	883 ± 73
5	Quercetin 3-O-xyloside	35.8	231, 256, 264sh, 302sh, 354	433	301	137 ± 1
6	Kaempferol hexoside	37.0	231, 265, 300sh, 347	447	284	1331 ± 43
7	Kaempferol disaccharide	37.4	232, 265, 300sh, 348	593	285	587 ± 26
8	Quercetin disaccharide	37.9	231, 256, 264sh, 302sh, 354	609	301	476 ± 18
9a	Quercetin 3-O-rhamnoside	38.9	—	447	301	Trace
9b	Kaempferol 3-O-glucoside	38.9	231, 265, 300sh, 347	447	285	4156 ± 61
10	Kaempferol hexoside	40.0	231, 265, 298sh, 347	447	284	74 ± 2
11	Kaempferol galloylhexoside	41.1	231, 265, 300sh, 347	599	285	301 ± 9
12	Kaempferol pentoside	41.7	232, 265, 300sh, 347	417	284	521 ± 53
13	Kaempferol disaccharide	43.2	231, 265, 301sh, 348	593	285	439 ± 23
14	Kaempferol pentoside	43.5	232, 265, 298sh, 348	417	285	828 ± 40
15	Kaempferol deoxyhexoside	44.9	231, 265, 300sh, 347	431	285	743 ± 33
16	Quercetin acetyldisaccharide	46.4	230, 258, 264sh, 298sh, 354	651	609/301	88 ± 1
17	Quercetin disaccharide	49.7	231, 256, 264sh, 302sh, 354	609	301	58 ± 1
18	Kaempferol acetyldisaccharide	51.9	231, 265, 300sh, 348	635	593/285	492 ± 11
19	Quercetin	52.9	230, 255, 266sh, 302sh, 371	301	179/151	189 ± 50
20	Kaempferol disaccharide	55.1	231, 265, 300sh, 347	593	285	1723 ± 60
21	Kaempferol disaccharide	56.2	231, 265, 301sh, 348	593	285	204 ± 6
22	Kaempferol	59.9	231, 265, 301sh, 367	285	257	1339 ± 39

**Πίνακας 2:** Ενώσεις που περιέχονται, από την απόσταξη ροδοπετάλων (Schieber A. et al., 2005).



**Εικόνα 2:** Ταννίνες και άλλες πολυφαινόλες από Αγριοτριανταφυλλιά. (Fecka I., 2009).

### 1.3 Οξειδωτικό Στρες.

#### 1.3.1 Ιστορική Αναδρομή.

Η συνεχής έκθεση στο οξυγόνο 'μπορεί να σβήσει το κερί της ζωής πολύ γρήγορα.' (Priestley 1775). Η προφητική αυτή παρατήρηση από τον άνθρωπο που ανακάλυψε το οξυγόνο, έβαλε ουσιαστικά τα θεμέλια για τη λύση ενός προβλήματος, από τα σημαντικότερα της σύγχρονης επιστήμης: αυτό που ονομάζουμε «παράδοξο του οξυγόνου».

Το  $O_2$ , ένα τόσο κρίσιμο στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής, μπορεί να γίνει κάποια στιγμή **τοξικό**. Αρχικά, έγινε αντιληπτό ότι έκθεση του οργανισμού σε αυξημένες συγκεντρώσεις οξυγόνου, προκαλεί ανεπιθύμητες αντιδράσεις για την υγεία, ενώ λίγο αργότερα, υπήρξαν ενδείξεις ότι οι επιπτώσεις από **ιοντίζουσες ακτινοβολίες** ήταν παρόμοιες με αυτές της «δηλητηρίασης» από το  $O_2$ .

Σε άρθρο με τίτλο: Δηλητηρίαση από Οξυγόνο και από Ακτινοβολία Χ: Ένας παρόμοιος Μηχανισμός (Gerschman et.al., 1954.), που δημοσιεύτηκε στο περιοδικό *Science*, προτάθηκε για πρώτη φορά, ότι ο παράγοντας που ενοποιούσε τα αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με αυτά της «δηλητηρίασης» από το  $O_2$ , ήταν αυτό που αποκαλούμε **ελεύθερες ρίζες**.

Τα τελευταία χρόνια, συγκεντρώνονται όλο και περισσότερα ερευνητικά δεδομένα, για τη συμμετοχή των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην παθογένεση πολλών ασθενειών, καθώς και για τη σχετική προστατευτική δράση αντιοξειδωτικών συστατικών του οργανισμού και των τροφίμων.

#### 1.3.2 Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη $O_2$ .

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 σε - *μικρότερη ενεργειακή κατάσταση*- και ως εκ τούτου 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 -σε μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση- και συνεπώς 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. Οι αντιδράσεις αυτές λέγονται οξειδοαναγωγικές (*redox*). Κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων, από ένα άτομο.

Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία, λέγεται **ελεύθερη ρίζα** και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια. Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης (Halliwell & Gutteridge, 1990). Η βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο ή τον άνθρακα. Το ίδιο το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του  $O_2$ , που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (*triplet state*) και συμβολίζεται με  $3O_2$ , δεν είναι ιδιαίτερα δραστική. Το μοριακό όμως αυτό οξυγόνο μπορεί να ενεργοποιηθεί, έτσι ώστε τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (*singlet state*) και συμβολίζεται με  $*O_2$ . Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ).

Τα κυριότερα ΔΕΟ είναι:

- η ρίζα σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ),



- η ρίζα υδροξυλίου ( $-\text{OH}^\bullet$ ),
- η ρίζα υπεροξειδίου ( $-\text{ROO}^\bullet$ ),
- το  $\text{O}_2$  απλής κατάστασης,
- το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
- και το υποχλωριώδες οξύ ( $\text{HOCl}$ ).

Στα δραστικά αυτά μοριακά είδη συμπεριλαμβάνεται επίσης και η δραστική μορφή αζώτου, το μονοξειδίο του αζώτου ( $\text{NO}^\bullet$ ), το οποίο είναι ελεύθερη ρίζα (με τελεία συμβολίζεται η ελεύθερη ρίζα, ενώ με (-) συμβολίζεται το αρνητικό φορτίο της ρίζας και με R, ένα άτομο ή μία ομάδα ατόμων, κυρίως αλυσίδα ατόμων άνθρακα).

### 1.3.3 Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες στον Οργανισμό μας

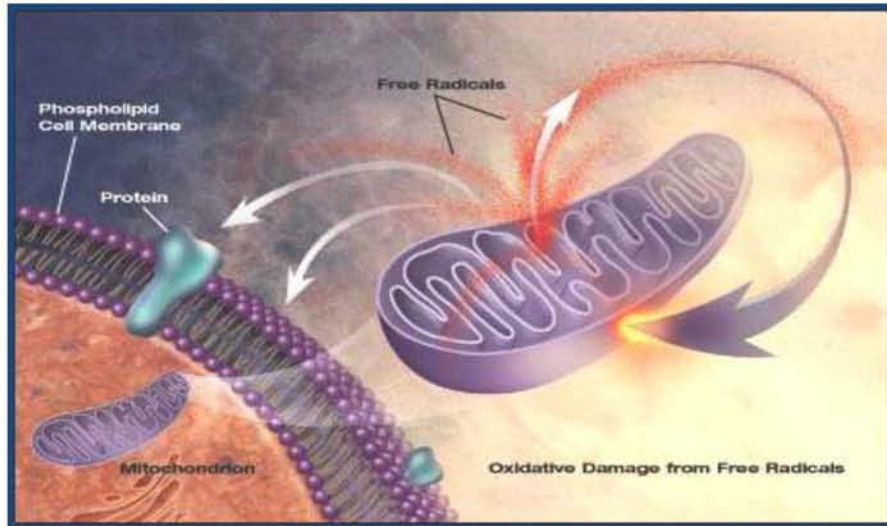
Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται στον οργανισμό μας, είτε από φυσιολογικές διαδικασίες του είτε από εξωτερικές πηγές. Οι κυριότερες από τις φυσιολογικές διαδικασίες παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν:

(α) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου, ως παραπροϊόν ή «χημικό ατύχημα» κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή ορισμένα ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από τα μόρια που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα και περνούν στο οξυγόνο, ανάγοντάς το σε σουπεροξείδιο.

(β) Τη φυσιολογική δράση οξειδωτικών ενζύμων όπως, οι λιποξυγονάσες, οι κυκλοοξυγονάσες, οι υπεροξειδάσες και οι αφυδρογονάσες όπου παράγονται ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων.

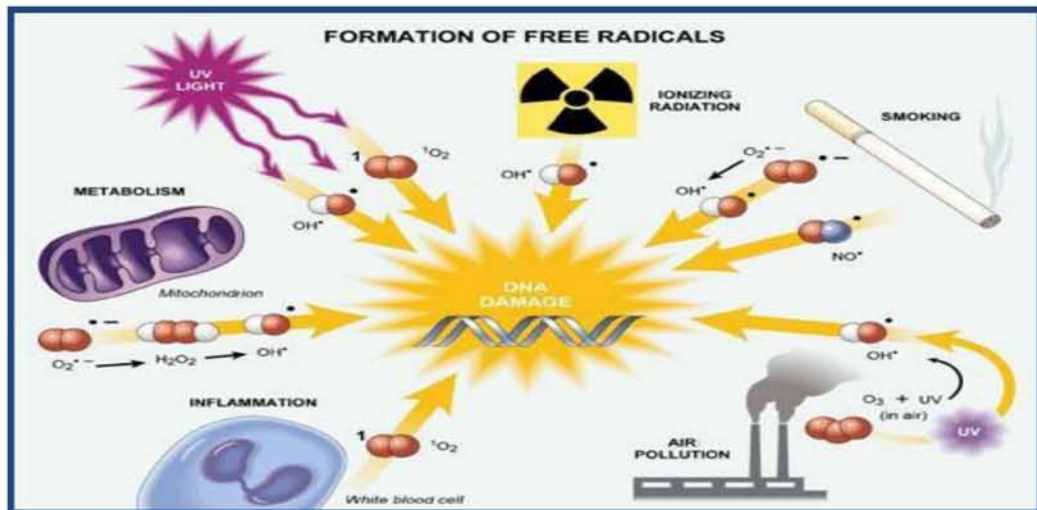
(γ) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, οι οποίες είναι και οι πλέον δραστικές, με χημικές αντιδράσεις παρουσία μεταλλικών ιόντων.

(δ) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς. Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα.



**Εικόνα 3:** Το DNA, οι Πρωτεΐνες και τα Λιπίδια, Αποτελούν τους Στόχους των Ελευθέρων Ριζών.

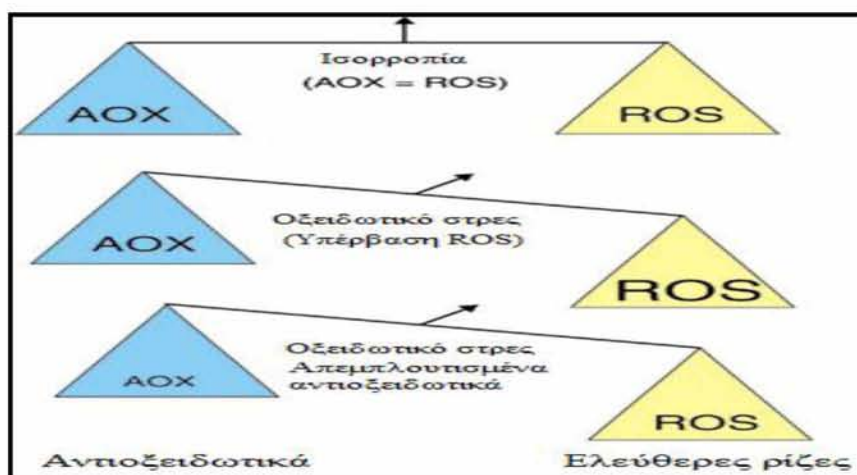
Ένας αριθμός παραγόντων που βρίσκεται εκτός του σώματος μας μπορεί επίσης να αποτελέσει πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών από τη στιγμή που θα έρθει σε επαφή με το σώμα μας. Μερικά παραδείγματα τέτοιων πηγών αποτελούν ο καπνός του τσιγάρου, οι ακτίνες-X, η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορες χημικές ενώσεις και φάρμακα καθώς επίσης το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (όζον, νιτροξειδία).



**Εικόνα 4 :** Τρόποι Σχηματισμού των Ελευθέρων Ριζών.

### 1.3.4 Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ), στον Οργανισμό μας

Σε κάθε βιολογικό σύστημα, πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης των ΔΕΟ. Η αύξηση των οξειδώσεων από τα ΔΕΟ οδηγεί τα κύτταρα σε μία κατάσταση που λέγεται **οξειδωτικό στρες** και είναι παράγοντας πρόκλησης ασθενειών. Λόγω της συνεχούς έκθεσης σε ΔΕΟ και για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες, ο οργανισμός μας, όπως όλα τα φυτά και τα ζώα, έχει αναπτύξει για προστασία διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στους οποίους παίρνουν μέρος αντιοξειδωτικές ουσίες.



**Εικόνα 5 :** Οξειδωτικό Στρες.

Γενικά χαρακτηρίζουμε ως **αντιοξειδωτική ουσία** κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. (Vaya J. and Aviram M., 2001).

Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους:

- (1) είτε παρεμποδίζουν τη δημιουργία ΔΕΟ,
- (2) είτε σταματούν τη διάδοση των ελεύθερων ριζών που προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Επίσης είναι δυνατόν, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού (για παράδειγμα της βιταμίνης C), να συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού, όπως της τοκοφερόλης.

Στην περίπτωση αυτή, έχουμε συνεργιστική δράση των δύο αντιοξειδωτικών.

Ο όρος **οξειδωτικό στρες** περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας, ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου *Reactive Oxygen Species* - (ROS) και

των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών ενός οργανισμού (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, et.al., 2004).

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως από:

(1) Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.

(2) Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS). Αυτό συμβαίνει είτε λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS, λόγω της ύπαρξης παραγόντων που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.

### **1.3.5. Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.**

Έχει γίνει πλέον επιστημονικά αποδεκτό ότι η παραβίαση της απαραίτητης οξειδοαναγωγικής ισορροπίας των κυττάρων μας προς την κατάσταση του οξειδωτικού στρες, έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, ενώ επιπλέον, συμμετέχει και στη διαδικασία της γήρανσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε οξείδωση των βασικών βιοχημικών συστατικών του κυττάρου, όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA με αποτέλεσμα τη μεταβολή των δομικών και λειτουργικών τους ιδιοτήτων.

Ο κατάλογος των ασθενειών για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό οι ελεύθερες ρίζες, αυξάνεται συνεχώς και περιλαμβάνει καρδιαγγειακές παθήσεις, τον καρκίνο, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τον καταρράκτη, τον διαβήτη και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες.

Για παράδειγμα, τα ΔΕΟ αρχικά μπορούν να οξειδώσουν τα φωσφολιπίδια της LDL. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μονοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο και τη μετατροπή τους σε μακροφάγα κύτταρα. Στη συνέχεια έχουμε οξείδωση και της πρωτεΐνης της LDL, οπότε λέμε ότι η LDL είναι πλήρως οξειδωμένη. Η οξειδωμένη LDL μεταφέρεται στο εσωτερικό των μακροφάγων μέσω ειδικών υποδοχέων, 3-4 φορές ταχύτερα από τη μη-οξειδωμένη LDL, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων οξειδωμένης LDL μέσα στα μακροφάγα τα οποία μετατρέπονται έτσι σε αφρώδη κύπαρα. Καθώς τα αφρώδη κύπαρα συσσωρεύονται κάτω από το ενδοθήλιο έχουμε την έναρξη του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας, η οποία και οδηγεί περαιτέρω στην κλινική εκδήλωση της νόσου.

Στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών, στο οποίο εκπονήθηκε η παρούσα εργασία, έχουν μελετηθεί τα τελευταία χρόνια, πλήθος φυτικών εκχυλισμάτων, σχετικά με την πιθανή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους, που οφείλονταν κυρίως στις φυτικές πολυφαινόλες που περιείχαν (Stagos et.al., 2012). Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν η αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση της αμπέλου, σε εκχυλίσματα από τον καρπό του φυτού, τόσο από τα γίγαρτα και τους βόστρυχους όσο και από τα στέμφυλα. Επιπλέον, εξετάστηκε η βιολογική δράση εκχυλισμάτων (μεθανολικών και υδατικών) και πολυφαινολικών κλασμάτων από Ελληνικές ποικιλίες αμπέλου, Μανδηλαριά Σαντορίνης (κόκκινα σταφύλια) και Ασύρτικο Σαντορίνης (άσπρα σταφύλια), καθώς και μονομερών φυτικών πολυφαινολών που ανιχνεύτηκαν σε αυτά. Τα περισσότερα εκχυλίσματα επέδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς και εξαιρετική προστατευτική δράση έναντι της επαγόμενης από τις ελεύθερες ρίζες, βλάβη του DNA. ( Stagos et al., 2007; Spanou et al. 2007). Ακόμη και στα πλαίσια της αναζήτησης από το εργαστήριο νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων, μελετήθηκαν υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα, που προέκυψαν από έναν μεγάλο αριθμό φυτών Ελληνικών ψυχανθών. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι, τα εκχυλίσματα μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, παρουσίασαν σημαντική ικανότητα να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες και να παρεμποδίζουν την επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Επιπλέον, επηρέαζαν τη δραστηριότητα ενζύμων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Spanou et al., 2012; Spanou et al., 2008 ).

#### **1.4 Σκοπός.**

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η προσθήκη πολυφαινολικών προσθέτων στο σιτηρέσιο κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, από επεξεργασμένα Υ.Α.Ε. και υπολείμματα απόσταξης τριαντάφυλλου και η μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες στους ιστούς τους, έτσι ώστε με την ανάλυση των αποτελεσμάτων να διερευνηθεί αν θα υπήρχε ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών τους.

Έτσι λοιπόν, πραγματοποιήθηκε διατροφή τεσσάρων (4) ομάδων κοτόπουλων πάχυνσης, με ζωοτροφές που περιείχαν πολυφαινολικά πρόσθετα, από επεξεργασμένα

Υ.Α.Ε. και από υπολειμμάτα απόσταξης τριαντάφυλλου, προκειμένου με ιστολογική μελέτη (τετρακέφαλος – ηπατικός - καρδιακός) να ελεγχθούν οι δείκτες του οξειδωτικού στρες, έτσι ώστε να εξεταστεί αν οι συγκεκριμένες ζωοτροφές ενίσχυαν την αντιοξειδωτική ικανότητα των ζώων.



## 2. Υλικά και Μέθοδοι.

### 2.1 Γενικά.

Από τον Νοέμβριο του 2012, έως και τον Ιούνιο του 2013 εκτελέστηκαν τα παρακάτω:

Στο εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων - Βιοσυστημάτων και στο αγρόκτημα του ΤΕΙ / Θεσσαλίας:

- Εκτροφή κοτόπουλων (Εφαρμογή σιτηρεσίου και συνθηκών ομαλής διαβίωσης – ανάπτυξης).
- Παρακολούθηση ανάπτυξης κοτόπουλων (Ημερήσια αύξηση ζωϊκού βάρους, ημερήσια κατανάλωση τροφής).
- Εκτέλεση λήψης ιστών (Στις 02 Ιαν. 2013).

Στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας:

- Επεξεργασία των ιστών (Ομογενοποίηση).
- Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.

### 2.2. Περιγραφή σιτηρεσίου.

Στις 16-11-2012 παρελήφθησαν στο αγρόκτημα του ΤΕΙ Λάρισας σαρανταοκτώ (48) κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής (Hubbard), ηλικίας έξι (6) ημερών, από το πτηνοτροφείο Κακανούδη Ανδρέα με έδρα τις Νέες Καρυές Λάρισας. Μέχρι και στις 22-11-2012 τα κοτόπουλα ελάμβαναν κοινό σιτηρέσιο. Από τις 23-11-2012, δημιουργήθηκαν τέσσερις ομάδες οι οποίες ελάμβαναν το παρακάτω σιτηρέσιο.

Name	Share %	Weight	250 Kg
Καλαμπόκι Α/Β/Γ/Δ ομάδας.	55,2	552	138,00
Σογιάλευρο 42/8	31,8	318	79,50
Λίπος Σκόνη (Λεκιθ)	5,0	50	12,50
Ιχθυάλευρο 70/10	4,0	40	10,00
Ισορροπιστής Broiler 2,5%	2,5	25	6,25
Μαρμαρόσκονη	1,5	15	3,75
ΣΥΝΟΛΟ	100	1000	250,00



**Πίνακας 3:** Σιτηρέσιο κοτόπουλων πάχυνσης. **Εικόνα 8:** Κλωβοί ανάπτυξης.

Ως καλαμπόκι, αναφέρεται το ενσίρωμα όπου περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας, οργανικά οξέα, όπως γαλακτικό οξύ και χορηγείται στα ζώα σαν χονδροειδής ζωοτροφή. Η ενσίρωση είναι μια μέθοδος διατήρησης των χλωρών ζωοτροφών σε αναερόβιες συνθήκες.

1. Καλαμπόκι Α ομάδας: (Νερό + Καλαμπόκι). Σύνολο 60% Στερεά.
2. Καλαμπόκι Β ομάδας: (**Διήθημα** επεξεργασμένων υγρών απόβλητων ελαιοτριβείου, μερικώς αποφαινολοποιημένο, που προήλθε από μικροδιήθηση με κεραμικά φίλτρα, με 4% στερεά + Καλαμπόκι με 56% στερεά). Σύνολο 60% Στερεά.
3. Καλαμπόκι Γ ομάδας: (**Κατακράτημα** επεξεργασμένων υγρών απόβλητων ελαιοτριβείου, που προήλθε από μικροδιήθηση με κεραμικά φίλτρα, πολυφαινολοποιημένο με 4% στερεά + Καλαμπόκι με 56% στερεά). Σύνολο 60% Στερεά.
4. Καλαμπόκι Δ ομάδας: (**Υπολείμματα απόσταξης** τριαντάφυλλου με 20% στερεά + Καλαμπόκι με 40% στερεά). Σύνολο 60% Στερεά.

Σημείωση: Προστέθηκαν γαλακτικά βακτήρια ενσίρωσης.

### **2.3. Λήψη Ιστών - Ομογενοποίηση.**

Στις 02 Ιαν. 2013 τα κοτόπουλα και σε ηλικία 52 ημερών, μεταφέρθηκαν από το αγρόκτημα του Τ.Ε.Ι. Θεσσαλίας, στο πτηνοτροφείο Κακανούδη Ανδρέα με έδρα τις Νέες Καρυές Λάρισας. Κατόπιν, οδηγήθηκαν στο συγκρότημα σφαγής. Όλες οι διαδικασίες (αναισθητοποίησης, σφαγής, αφαιμάξης, απομάκρυνσης πούπουλων, εκσπλαχνισμός, διαχωρισμός εντοσθίων και πλύση), πραγματοποιήθηκαν από ειδικά μηχανήματα και καταρτισμένο προσωπικό που ελέγχε στο σύνολο την ορθή διεξαγωγή της διαδικασίας, σύμφωνα με την οδηγία 2007/43/EK.

Τα 105 δείγματα του τετρακέφαλου, του ήπατος και της καρδιάς, αφαιρέθηκαν χειρουργικά, τοποθετήθηκαν σε Eppendorf Tubes 1,5mL, ψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.



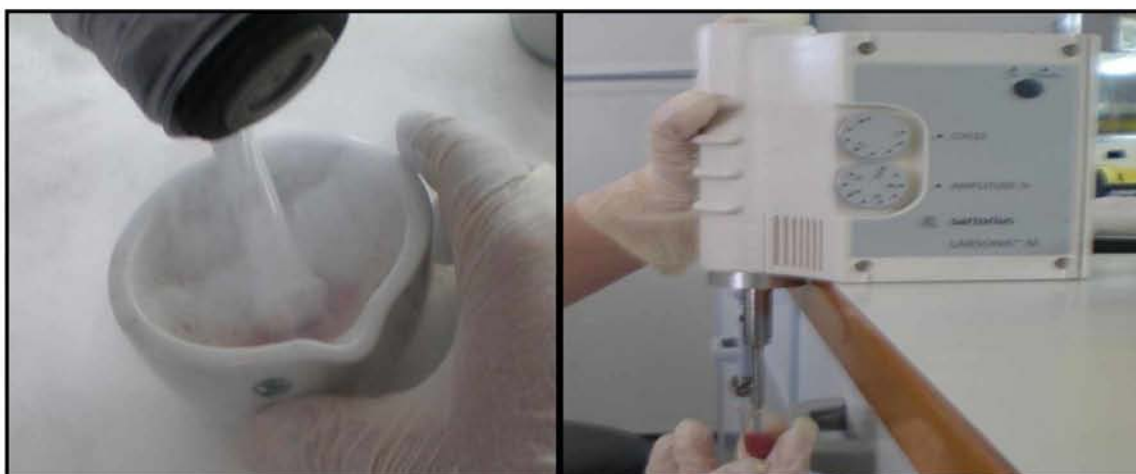


**Εικόνες 9 & 10 :** Πτηνοτροφείο Κακανούδη. Αναισθητοποίηση για λήψη Ιστών.

Ο ιστοί ομογενοποιήθηκαν (Μυϊκός 1:2 και Ηπατικός – Καρδιακός 1:3) 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), όπως:

- Απρωτινίνη (10mg/mL), η οποία αναστέλει την θρυψίνη και άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα.
- Λιουπεπτίνη (1mg/mL), η οποία αναστέλει πεπτιδάσες όπως την κυστεΐνη, την σερίνη και την θρεονίνη.
- PMSF (9mg/mL), κλπ.

Κατά την προετοιμασία για τη βιοχημική ανάλυση του ιστού τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με γουδί και γουδοχέρι χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο.



**Εικόνες 11 & 12:** Ομογενοποίηση Ιστών με Υγρό Άζωτο.

### 2.3.1 Επεξεργασία Ιστών.

Ακολούθως, το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε.(15.000 g - 5 min - 4°C).

### 2.3.2 Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες.

#### 2.3.2.1 Γενικά.

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

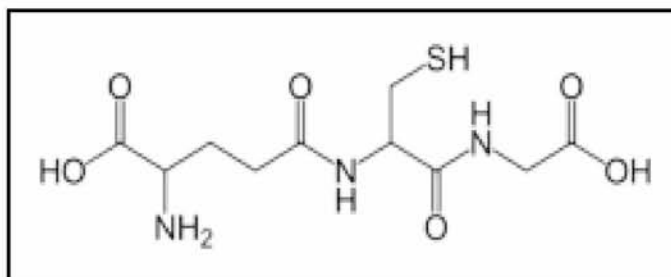
### 2.4 Μέθοδοι.

Οι δείκτες οξειδωτικού στρες μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά και η αρχή προσδιορισμού του καθενός αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω.

#### 2.4.1 Πρωτόκολλα Δεικτών Οξειδωτικού Στρες.

#### 2.4.2 Μέτρηση Γλουταθειόνης.

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεϊνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου. 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 et al. (2003).

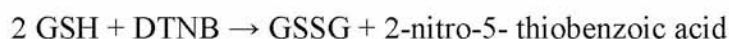


Εικόνα 13: Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης.

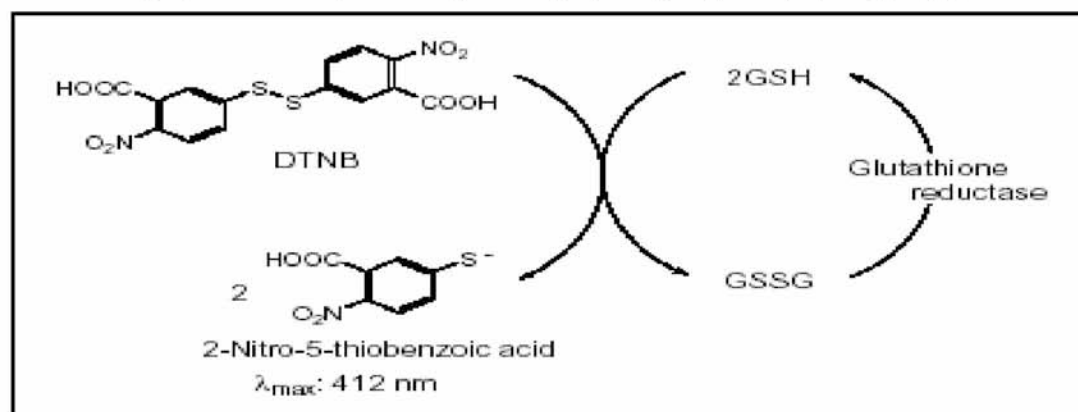
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι επίσης ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών.

### Αρχή της μεθόδου.

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειώδες νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετρίεται σε ιστούς. 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. Y.N. Reddy, et.al. (2004).



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



**Εικόνα 14:** Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης.

### Διαλύματα

- **Phosphate buffer** 67 mM (pH 8). MB (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 136 MB (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (67 mM) και 500 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (67 mM). Για το KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ζυγίζουμε 0.227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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 για pH = 8.

- **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.**

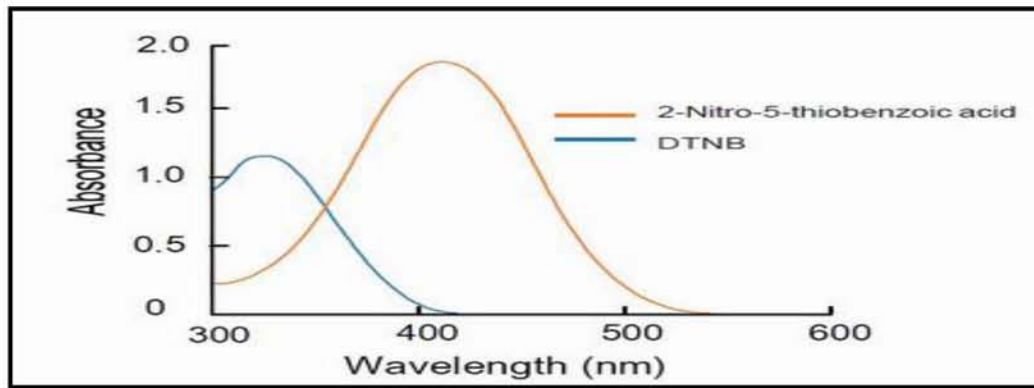
100μL ιστού προστέθηκαν σε 100μL TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000g για 5 min στους 5°C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο erpendorf. 20 μL ιστού, αραιωμένου 1/2 αναμίχθηκαν με 660 μL ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 8.0) και 330μL DTNB.

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια erpendorf:

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

**Πίνακας 4:** Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της GSH.

Αναδεύουμε τα erpendorfs 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. Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm. (Roland and Irwin 1952).



**Εικόνα 15:** Φάσμα απορρόφησης του 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκού οξέος (Dojindo Molecular Technologies).

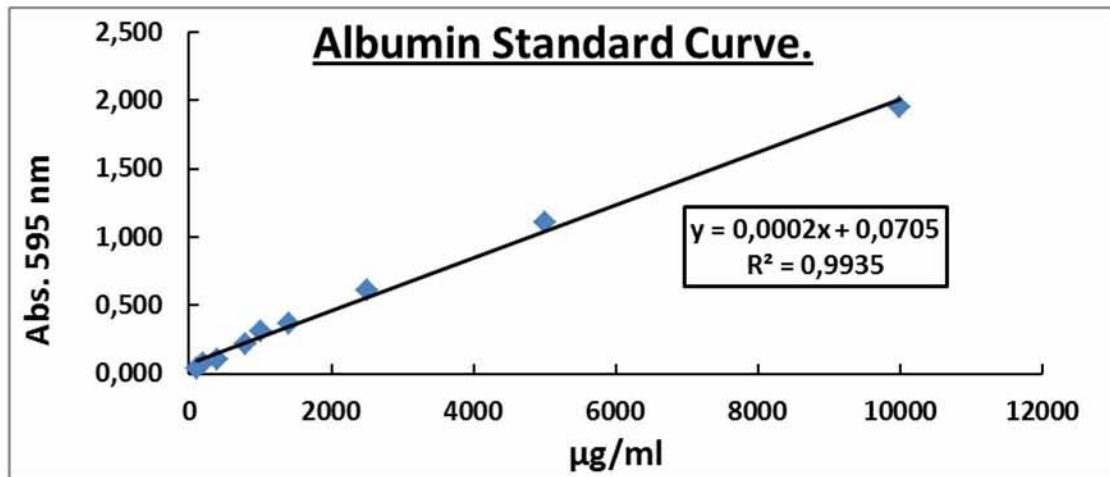
### Υπολογισμοί

Δραστικότητα GSH ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  total prot.) =  $(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta_{\text{abstυφλού}}/13.6) \times 2 \times 3$  ή  $4$  (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 $\mu\text{L}$ ) με τον όγκο του ιστού (20 $\mu\text{L}$ ) (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 με 4 για καρδιακό – ηπατικό 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.





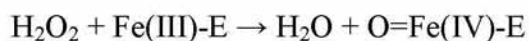
Γράφημα 1: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης

### 2.4.3 Δραστηριότητα της Καταλάσης.

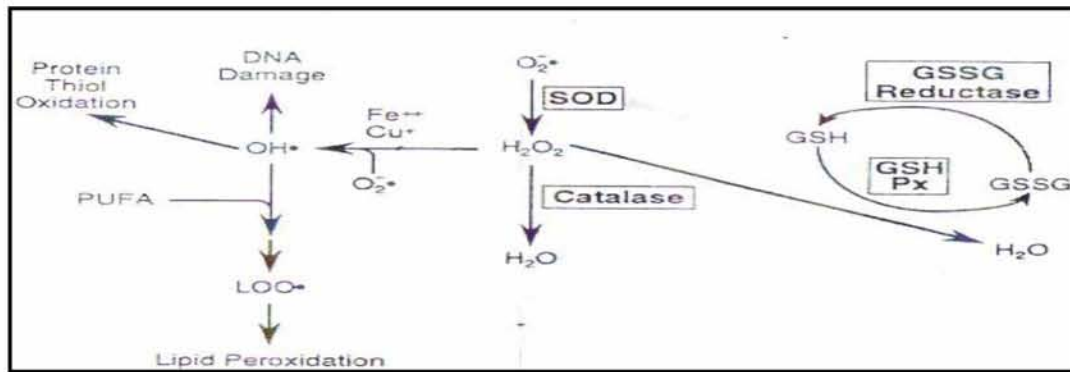
#### Αρχή της μεθόδου.

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  $H_2O_2$ . Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του  $H_2O_2$  από την καταλάση είναι η ακόλουθη:  $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:

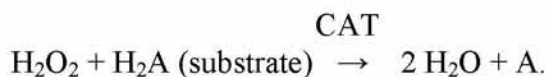


(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεδεμένη στο ένζυμο).



**Εικόνα 16:** Μονοπάτι αναγωγής του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$

Επίσης η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το  $H_2O_2$  για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών ( $H_2A$ ) με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος (αιθανόλη), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



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

### Διαλύματα

**Phosphate buffer 67mM (pH 7.4)**  $KH_2PO_4$ : 136 και  $Na_2HPO_4$ : 178. Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL  $KH_2PO_4$  (67 mM) και 400 mL  $Na_2HPO_4$  (67 mM). Για το  $KH_2PO_4$  ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το  $Na_2HPO_4$  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 ( $H_2O_2$ ).

Το διάλυμα  $H_2O_2$  είναι έτοιμο προς χρήση.

### Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2955 $\mu\text{L}$
Ομογενοποιημένος Ιστός	40 $\mu\text{L}$

**Πίνακας 5:** 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  $\mu\text{L}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  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) =  $(\Delta\text{Abs}_{\text{sample}} \text{ per min} / 40) \times (75 \times 1000 \times 3 \text{ ή } 4 \times 2) / \text{Conc. Protein (mg/mL)}$ .

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε  $\mu\text{mol/mL}$ . Το 75 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 $\mu\text{L}$ ) με τον όγκο του δείγματος (40 $\mu\text{L}$ ) (3000/40=75). 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.

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.  $\Delta \text{Abs} = \eta$  μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

U =  $\mu\text{mol/min}$ .  $\Delta\text{Abs}_{\text{blank}}$  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).

#### **2.4.4 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<sup>•</sup>) 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 136 και MB (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 178. Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mM) και 400 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10 mM). Για το KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ζυγίζουμε 0.136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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 μL 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 αραίωσης, 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 $\mu$ L	495 $\mu$ L	460 $\mu$ L
DPPH 0.1 mM	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	-	5 $\mu$ L	-
Ιστός (Αραίωση 1/5)	-	-	40 $\mu$ L

**Πίνακας 6:** 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)  $\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL πλάσματος} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 25 \times 3 \text{ ή } 4 \times 5] / 1000.$

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 με 4 για καρδιακό – ηπατικό 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.

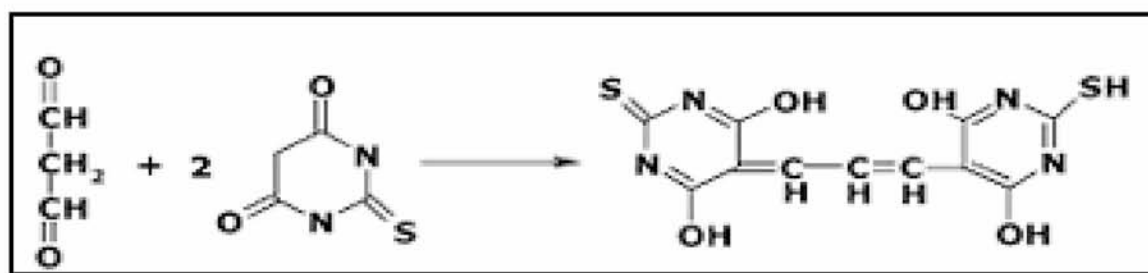
ε) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L σε mL.

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

#### 2.4.5 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 μαλονδιαλδεύδη. Η μαλονδιαλδεύδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεύδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεύδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεύδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξείδωσης των λιπιδίων.



Εικόνα 17: 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  $\approx 100$  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  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (2 M) – TBA (55 mM).** MB (TBA): 144.1 και MB ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ): 142.04. Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος, ζυγίζουμε 2.84 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  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  $\mu\text{L}$  ομογενοποιημένου ιστού (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό). Προσθέτουμε 500  $\mu\text{L}$  TCA 35% και 500  $\mu\text{L}$  Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1 mL  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  – TBA και επωάζουμε στους 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο. Κατόπιν, μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυσώσουν για 5 min. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1 mL σε eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25°C για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900  $\mu\text{L}$  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 2 ή 3 x 3, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραιώσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100  $\mu$ L) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (100  $\mu$ L) (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  $\mu$ mol/L. Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και με 4 για καρδιακό – ηπατικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 3 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.

#### **2.4.6 Πρωτεϊνικά καρβονύλια**

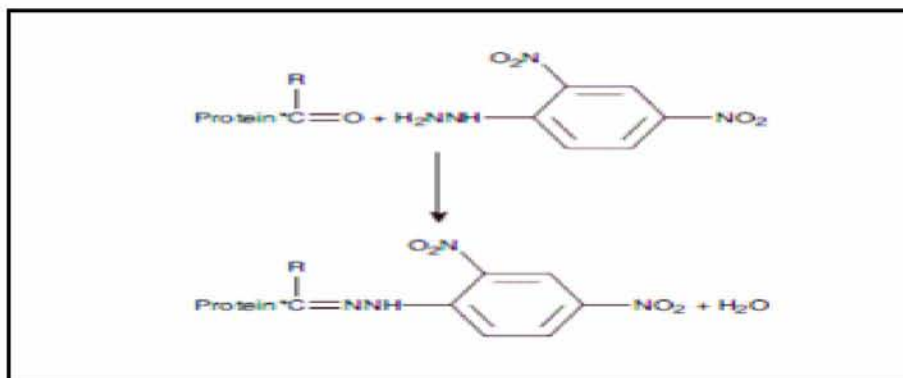
##### **Αρχή της μεθόδου**

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 (αλδεύδες και κετόνες) που αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα σε διπλό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου C = O, ως συνήθως αποτελούν μέρος σε άλλες μεγαλύτερες λειτουργικές ομάδες. Παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr). Είναι ένας αξιόπιστος δείκτης οξειδωσης 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 18:** Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPΗ (δίνιτριφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του 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  $\approx 70$  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.

- **DNPΗ 14 mM.** (MB: 198.1)

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPΗ διαλύουμε 0.2833 g DNPΗ 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  $\mu\text{L}$  ομογενοποιημένου ιστού προσθέτουμε 50  $\mu\text{L}$  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 (τριχλωροοξικό 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 απορόφηση 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.**

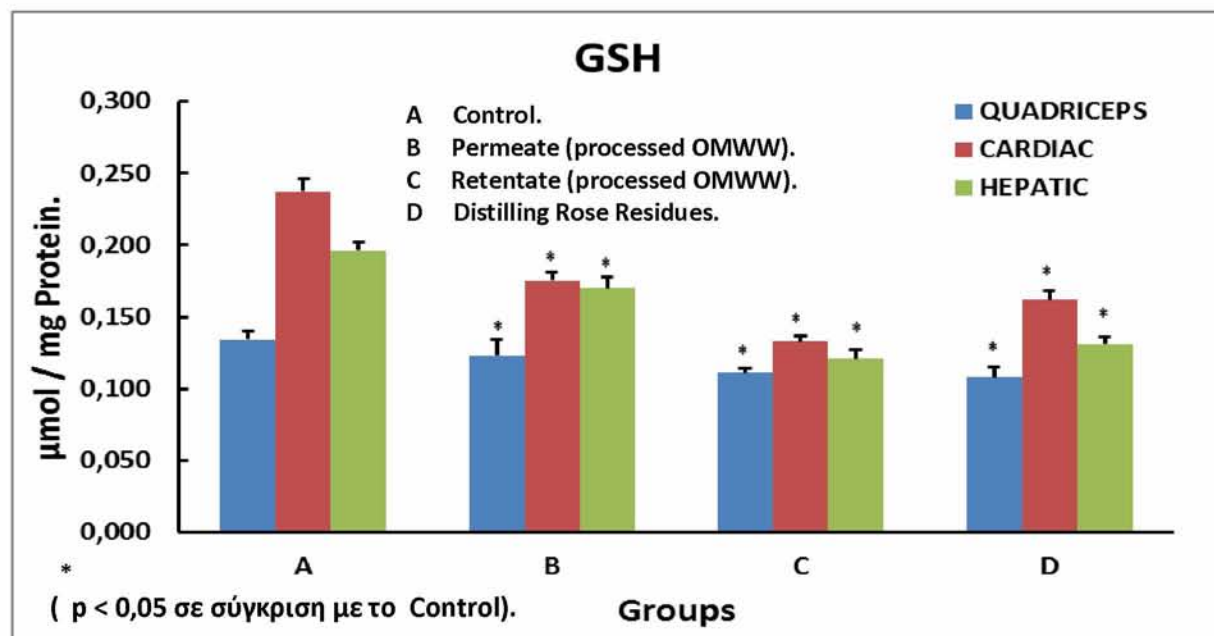
Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg total prot.)= Αδείματος-Ατυφλού/0.022×1000/50 x 2 ή 3 x 2/Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL).

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

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Μέτρηση Γλουταθειόνης στους ιστούς.

Η μεγαλύτερη τιμή της GSH παρατηρείται στον καρδιακό ιστό στην ομάδα ελέγχου ( $0,237 \pm 0,01 \mu\text{mol}/\text{mg Protein}$ ), ενώ η μικρότερη στον τετρακέφαλο της D ομάδας ( $0,108 \pm 0,009 \mu\text{mol}/\text{mg Protein}$ ).



Γράφημα 2. GSH στους ιστούς των κοτόπουλων.

#### **ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ (ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ):**

Η Β ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	8,2 %
Η C ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	17,2%
Η D ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	19,4%

#### **ΚΑΡΔΙΑΚΟΣ (ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ):**

Η Β ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	26,2 %
Η C ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	43,8 %
Η D ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	31,5%

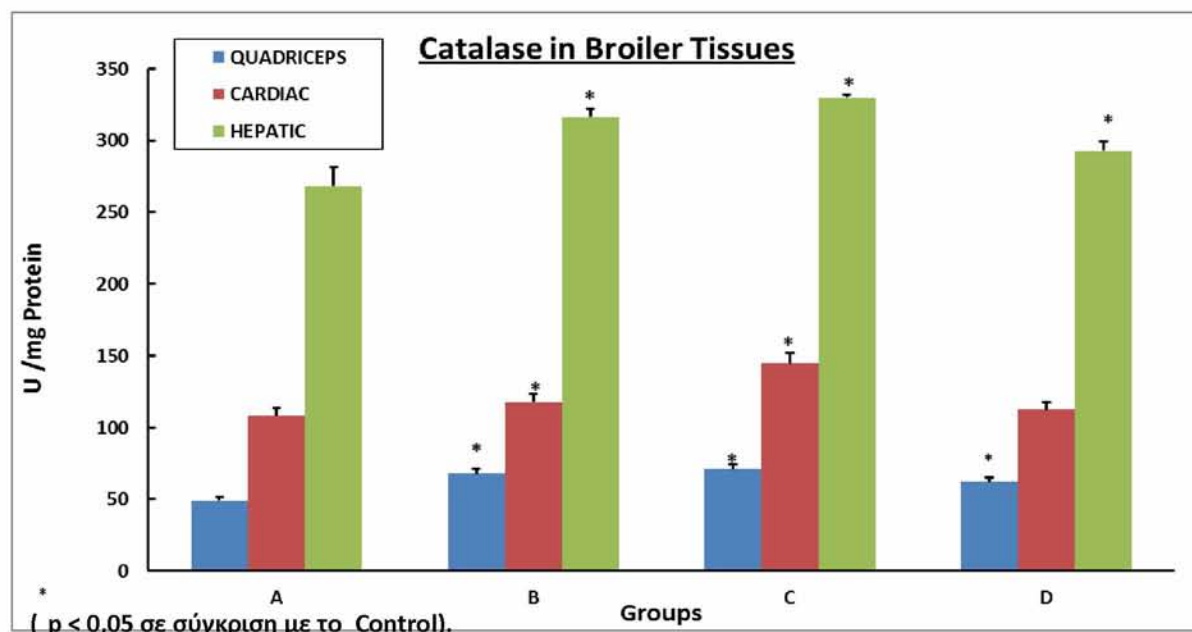
#### **ΗΠΑΤΙΚΟΣ (ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ):**

Η Β ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	13 %
Η C ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	38,1%
Η D ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	31,6%



### 3.2 Δραστηκότητα Καταλάσης

Η μεγαλύτερες τιμές στη δραστηκότητα της καταλάσης παρατηρούνται στην ομάδα C, με την μεγαλύτερη στον ηπατικό ιστό ( $329,94 \pm 0,86$  U/mg Protein), ενώ η μικρότερη τιμή παρατηρείται στον τετρακέφαλο της ομάδας ελέγχου ( $49,04 \pm 0,24$  U/mg Protein).



Γράφημα 3. Καταλάση στους ιστούς των κοτόπουλων.

- A. Control.
- B. Permeate (processed OMWW).
- C. Retentate (processed OMWW).
- D. Distilling Rose Residues.

#### **ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ (ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ):**

Η Β ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑ 38,5%  
Η C ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑ 44,3%  
Η D ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑ 26,7%

#### **ΚΑΡΔΙΑΚΟΣ (ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ):**

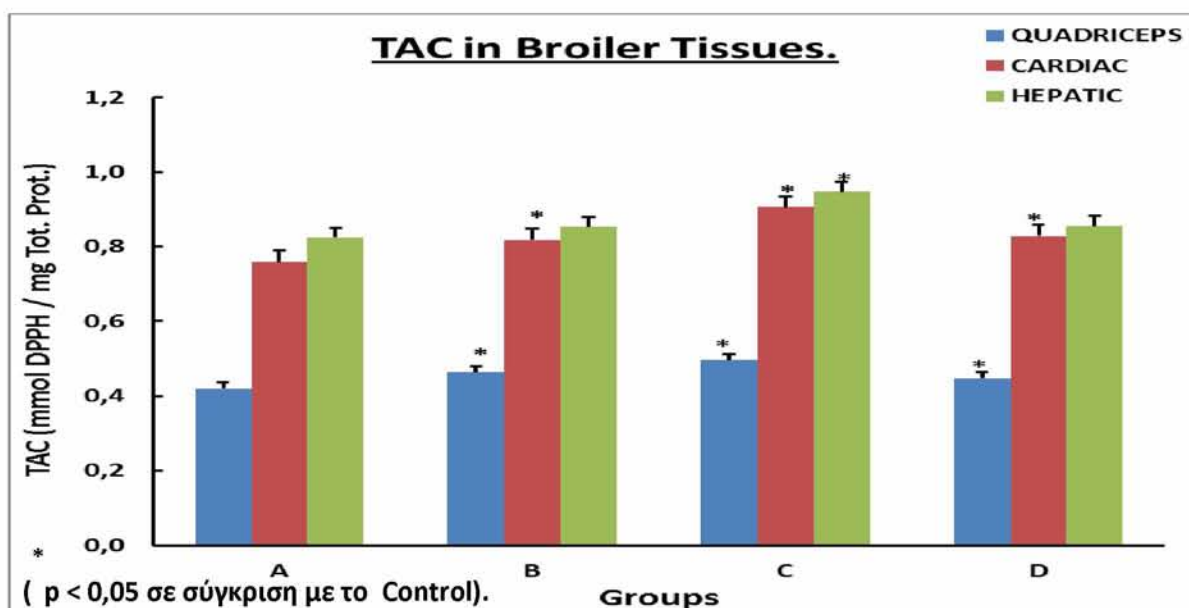
Η Β ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑ 9,3%  
Η C ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑ 33,9%  
Η D ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑ 4%

#### **ΗΠΑΤΙΚΟΣ (ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ):**

Η Β ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑ 17,9%  
Η C ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑ 23,0 %  
Η D ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑ 9,2%

### 3.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα.

Οι μεγαλύτερες τιμές στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και στους τρεις ιστούς παρατηρούνται στην ομάδα C, με την μεγαλύτερη και στατιστικά σημαντική στον ηπατικό ιστό ( $0,710 \pm 0,006$  mmol DPPH/mg Protein) αυξημένη κατά 14,8% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ η μικρότερη τιμή παρατηρείται στον τετρακέφαλο της ομάδας ελέγχου ( $0,280 \pm 0,017$  mmol DPPH/mg Protein).



Γράφημα 4. TAC στους ιστούς των κοτόπουλων.

- A. Control.
- B. Permeate (processed OMWW).
- C. Retentate (processed OMWW).
- D. Distilling Rose Residues.

#### **ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ (ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ):**

Η Β ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 10,5%  
 Η C ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 18,1%  
 Η D ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 6,4%

#### **ΚΑΡΔΙΑΚΟΣ (ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ):**

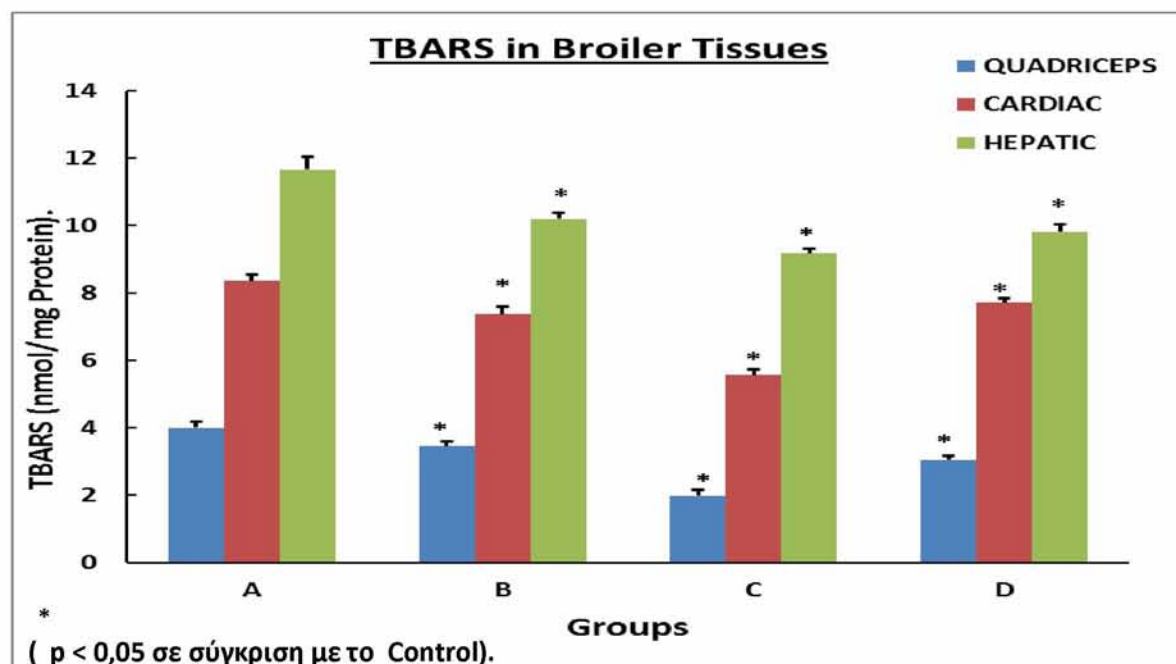
Η Β ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 7,6%  
 Η C ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 19,2%  
 Η D ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 9,1%

#### **ΗΠΑΤΙΚΟΣ (ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ):**

Η Β ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 3,4%  
 Η C ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 14,8%  
 Η D ΟΜΑΔΑ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 3,8%

### 3.4 TBARS

Οι μικρότερες τιμές των TBARS στους ιστούς, που είναι και στατιστικά σημαντικές, παρατηρούνται στην ομάδα C με την μικρότερη τιμή στον τετρακέφαλο ( $1,973 \pm 0,193$  nmol/mg Protein), μειωμένη κατά 50,2% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μεγαλύτερη τιμή παρατηρείται στον ηπατικό ιστό της ομάδας ελέγχου ( $11,683 \pm 0,377$  nmol/mg Protein).



Γράφημα 5. TBARS στους ιστούς των κοτόπουλων.

- A. Control.
- B. Permeate (processed OMWW).
- C. Retentate (processed OMWW).
- D. Distilling Rose Residues.

#### **ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ (ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ):**

Η Β ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 13,6%  
 Η C ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 50,7%  
 Η D ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 23,8%

#### **ΚΑΡΔΙΑΚΟΣ (ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ):**

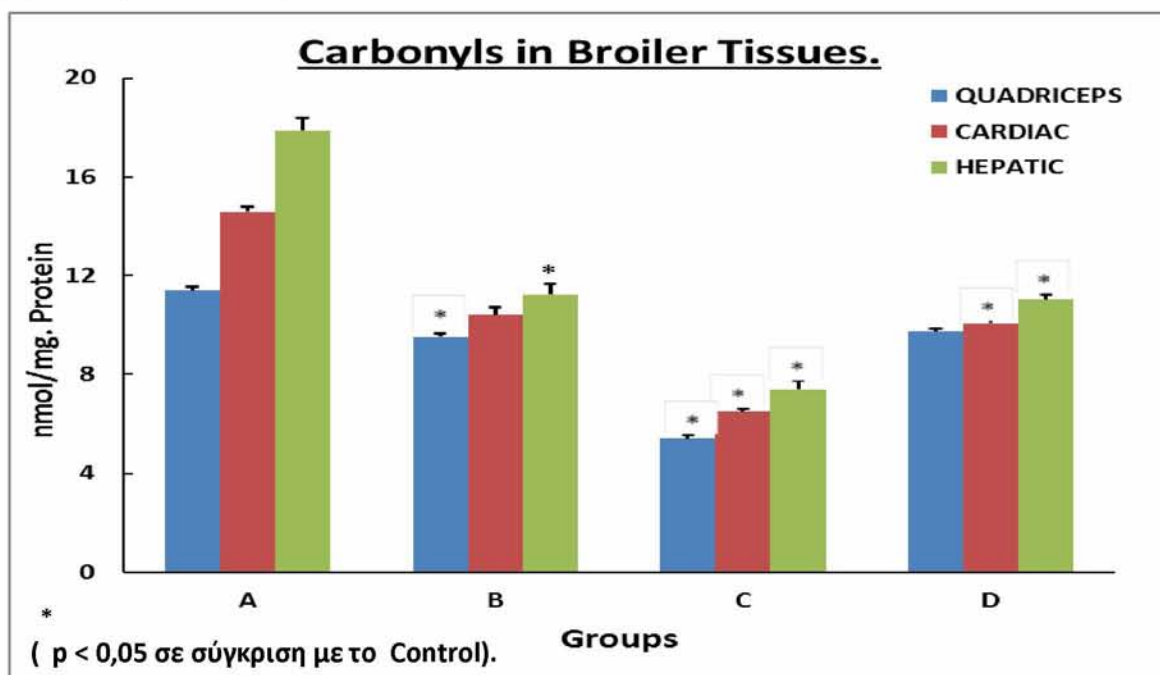
Η Β ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 11,8%  
 Η C ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 33,5%  
 Η D ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 7,8%

#### **ΗΠΑΤΙΚΟΣ (ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ):**

Η Β ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 12,5%  
 Η C ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 21,4 %  
 Η D ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ 16%

### 3.5 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια

Οι μικρότερες τιμές των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους ιστούς, που είναι και στατιστικά σημαντικές, παρατηρούνται στην ομάδα C με την μικρότερη τιμή στον τετρακέφαλο ( $5,398 \pm 0,158$  nmol/mg Protein), μειωμένη κατά 52,7% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μεγαλύτερη τιμή παρατηρείται στον ηπατικό ιστό της ομάδας ελέγχου ( $17,857 \pm 0,156$  nmol/mg Protein).



**Γράφημα 6.** Καρβονύλια στους ιστούς των κοτόπουλων. A. Control. B. Permeate (processed OMWW). C. Retentate (processed OMWW). D. Distilling Rose Residues.

<b>ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ (ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ):</b>	
Η Β ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	16,6 %
Η C ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	52,7 %
Η D ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	14,6 %
<b>ΚΑΡΔΙΑΚΟΣ (ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ):</b>	
Η Β ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	26,8 %
Η C ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	55,4 %
Η D ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	30,9 %
<b>ΗΠΑΤΙΚΟΣ (ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ):</b>	
Η Β ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	37,1 %
Η C ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	58,6 %
Η D ΟΜΑΔΑ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΤΑ	38,2 %



#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εκτραφούν τέσσερις (4) ομάδες κοτόπουλων πάχυνσης με πολυφαινολικά πρόσθετα και να ελεγχθούν οι δείκτες του οξειδωτικού στρες, στους ιστούς των (τετρακέφαλος – καρδιακός – ηπατικός), έτσι ώστε να εξεταστεί αν θα βελτιωθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των ζώων.

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που ελέγχθηκαν ήταν: Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστηριότητα της καταλάσης (Catalase activity), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC–Total antioxidant capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS – Thiobarbituric acid reactive substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Το σπουδαιότερο σε αυτήν την εργασία είναι πως τα πολυφαινολικά πρόσθετα διαφοροποιούν τους δείκτες μεταξύ των ομάδων.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά στην συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), διαπιστώνεται πως η ομάδα ελέγχου παρουσιάζει αυξημένες τιμές, στατιστικά σημαντικές, σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Την μεγαλύτερη συγκέντρωση την παρουσιάζει ο καρδιακός ιστός της ομάδας ελέγχου (0,237  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Tot. Protein) και την μικρότερη η ομάδα C, στην οποία χορηγήθηκε το πλήρως εμπλουτισμένο σε πολυφαινόλες εκχύλισμα από ΥΑΕ. Το ίδιο παρατηρείται και στον ηπατικό ιστό με μείωση συγκέντρωσης κατά 38,1% στην ομάδα C. Τέλος, στον τετρακέφαλο παρατηρείται η μικρότερη μείωση στην συγκέντρωση της GSH, στην ομάδα C κατά 17,2%, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Έτσι οι ομάδες B,C και D παρουσιάζουν μικρότερες τιμές, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Πρέπει εδώ να αναφερθεί ότι σε προηγούμενη εργασία, που εκτέλεσε το εργαστήριό μας (Δ. Οικονομίδης 2013), όπου εξετάστηκαν οι δείκτες οξειδωτικού στρες στο αίμα των κοτόπουλων, στην αιμοληψία που εκτελέστηκε τρεις (3) ημέρες πριν την λήψη των ιστών και η ηλικία των κοτόπουλων ήταν 50 ημερών, παρατηρήθηκαν μεγάλες τιμές GSH στην ομάδα ελέγχου, σε αντίθεση με την αιμοληψία που εκτελέστηκε είκοσι τρεις (23) ημέρες νωρίτερα και οι ομάδες με τα πολυφαινολικά πρόσθετα, παρουσίασαν αυξημένες τιμές στην συγκέντρωση της GSH. Συγκεκριμένα, η ομάδα C, είχε αυξημένες τιμές γλουταθειόνης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου περίπου στο τετραπλάσιο (από 1,1 σε 4  $\mu\text{mol}/\text{gr}$  αιμοσφαιρίνης). Αυτό σημαίνει πως τα νεαρά κοτόπουλα μέχρι και την ηλικία των 30 ημερών, με την χορήγηση πολυφαινολικών προσθέτων, αυξάνουν τα επίπεδα της γλουταθειόνης.

Όσον αφορά στην καταλάση, οι πολυφαινολικές ομάδες παρουσιάζουν αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μεγαλύτερη τιμή στην

δραστηριότητα της καταλάσης (330 Units/mg Prot.), παρουσιάζεται στην ομάδα C στον ηπατικό ιστό, με μία αύξηση 23%, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Την μεγαλύτερη εκατοστιαία αύξηση παρουσιάζει ο τετρακέφαλος της ομάδας C κατά 44,3% και ακολουθεί ο καρδιακός κατά 33,9%, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αυτό σημαίνει πως όλες οι πολυφαινολικές ομάδες και ιδιαίτερα η ομάδα C, αυξάνουν τη δραστικότητα του ενζύμου, με αποτέλεσμα την αύξηση της διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο.

Οι τιμές της TAC στους ιστούς, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και ερμηνεύονται ως ακολούθως: παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένες τιμές, και στους τρεις (3) ιστούς, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα, η ομάδα C παρουσίασε αύξηση κατά 19,2% στον καρδιακό, κατά 18,1% στον τετρακέφαλο και τέλος κατά 14,8% στον ηπατικό ιστό. Οι ομάδες B και D, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά τον ηπατικό ιστό. Παρουσίασαν όμως στατιστικά αυξημένες τιμές TAC στον καρδιακό κατά 7,6% και 9,1%, και στον τετρακέφαλο κατά 10,5% και 6,4% αντίστοιχα.

Η ομάδα C παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές TBARS σε σχέση με τις άλλες ομάδες, πιθανώς λόγω των πολυφαινολών στα YAE τα οποία δρουν αντιοξειδωτικά και μειώνουν τη λιπιδική υπεροξείδωση. Η ομάδα με τη δεύτερη χαμηλότερη τιμή TBARS είναι η D.

Όσον αφορά την οξείδωση των πρωτεϊνών, η ομάδα ελέγχου παρουσιάζει αυξημένες τιμές, στατιστικά σημαντικές σε σχέση με τις άλλες ομάδες. Η ομάδα C παρουσιάζει την μικρότερη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, που σημαίνει πως οι πολυφαινόλες που υπάρχουν σ' αυτήν την ομάδα υποβοηθούν στην μείωση της οξείδωσης των πρωτεϊνών. Η ομάδα D παρουσιάζει την δεύτερη χαμηλότερη τιμή συγκέντρωσης των καρβονυλίων.

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα πως τα πολυφαινολικά πρόσθετα, στο σιτηρέσιο των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, δρουν ως αντιοξειδωτικά διότι, για παράδειγμα, η ομάδα C σε σχέση με την ομάδα ελέγχου αυξάνει την τιμή της TAC, παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές μειωμένες συγκεντρώσεις στην οξείδωση των πρωτεϊνών, στην οξείδωση των λιπιδίων, αλλά και αυξημένη δραστικότητα της καταλάσης. Όσον αφορά την η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) εμφανίζει μεγαλύτερες τιμές στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί ως απόκριση του οργανισμού στα εξωγενή αντιοξειδωτικά, που χορηγούνται με το

σιτηρέσιο. Δηλαδή, λόγω της ενίσχυσης της αντιοξειδωτικής άμυνας των ζώων από τα πολυφαινολικά πρόσθετα, μειώνεται η ανάγκη τους να διατηρούν αυξημένα επίπεδα GSH. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν πως η χρήση των πολυφαινολικών προσθέτων από τα επεξεργασμένα ΥΑΕ και τα υπολείμματα της απόσταξης τριαντάφυλλου ενισχύουν την αντιοξειδωτική δράση των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής.

Ένα άλλο σπουδαίο όμως σημείο που πρέπει να επισημανθεί, είναι πως οι πολυφαινόλες αποτελούν την κύρια ρυπαντική παράμετρο, η οποία ευθύνεται για τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις των ΥΑΕ. Άρα, εάν προκύψουν μέθοδοι απομόνωσης των πολυφαινολών, τότε τα απόβλητα ελαιοτριβείου, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για παράδειγμα στην ενσίρωση για τα οικότροφα ζώα και στην υδρολίπανση. Ενώ από την άλλη πλευρά, οι απομονωμένες πολυφαινόλες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία προϊόντων με αυξημένη προστιθέμενη αξία όπως ζωοτροφών με αντιοξειδωτική δράση.

## 5.Βιβλιογραφία.

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Boon E M, Downs A and Marcey D. 2007. Proposed Mechanism of Catalase  
In *Catalase: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oxidoreductase. Catalase Structural Tutorial Text.*
- Castañer, O., Fitó, M., López-Sabater, M.C., Poulsen, H.E., Nyssönen, K., Schröder, H., Salonen, J.T., Covas, M.I. 2011. The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition* 30 (4), pp. 490-493.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (2) , pp. 192-208.
- Dew T., Day A., Morgan M. 2005. Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components. Department of Food Science, University of Leeds.
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk. 2004. Lipid peroxidation cannot be used as universal criterion of oxidative stress. *Progr. Lipid Res*, 43: 200 -227.
- Fecka I. 2009. Qualitative and Quantitative Determination of Hydrolysable Tannins and Other Polyphenols in Herbal Products from Meadowsweet and Dog Rose. *Phytochem. Anal.*; 20: 177–190.
- Gerschman R., Gilbert D.L., Nye S.W., Dwyer P. and Fenn W.O. 1954. Oxygen poisoning and x-irradiation: A mechanism in common. *Science Magazine.*
- Giacosa, A., Barale, R., Bavaresco, L., Gatenby, P., Gerbi, V., Janssens, J., Johnston, B., Rondanelli, M. 2012. Cancer prevention in Europe: The Mediterranean diet as a protective choice. *European Journal of Cancer Prevention.* Article in Press.
- Gkoutsidis, P.E., Petrotos, K.B., Kokkora, M.I., Tziortziou, A.D., Christodouloulis, K., Goulas, P. 2011. Olive mill waste water (OMWW) treatment by diafiltration desalination and water treatment. Volume 30, Issue 1-3, Pages 237-246.
- Greenwald P, Kelloff G, Burch Whitman C, Kramer BS. 1995. Chemoprevention. *CA Cancer J Clin*, 45: 31-49.



Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology* 186, pp. 1-85.

Ison A. J., Spiegle S. J., Sara J., Morishita T. Y. 2005. Poultry Blood Collection. *Veterinary Preventive Medicine*. VME-23-05.

Janaszewska, A., Bartosz, G., 2002 .Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 62, 231–236.

Kararli T. T. 1995. Comparison of the Gastrointestinal Anatomy, Physiology and Biochemistry of Humans and Commonly used Laboratory Animals. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, vol. 16, 351-380.

Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F. 2001. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF Malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci.*; 28: 141-143.

Kerbel, R.S., Man, M.S., Dexter, D. A. 1984. Model of human cancer metastasis: Extensive spontaneous and artificial metastasis of a human pigmented melanoma and derived variant sublines in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute* 72 (1), pp. 93-108.

Mebirouk, M., Sbai, L., Lopez, M., Gonzalez, J. 2007. The absorption of polyphenols from olive oil mill wastewaters by sawdust and biodegradation by the fungus *phanerochaetae chrysosporium*. *Grasas y Aceites* 58(4), pp. 366-371.

Niaounakis, M., Halvadakis C.P. *Olive Processing Waste Management*. 2006. Literature Review and Patent Survey, Second Edition, Elsevier.

Nowak R., Gawlik-Dziki U., 2007. Polyphenols of *Rosa L.* leaves extracts and their radical scavenging activity. *Pub. Med. Z. Naturforsch* 62(1-2):32-8.

Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. 2004. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse

hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett.*; 357: 83-86.

Ramnath V., Rekha P. S., Sujatha K. S. 2007. Amelioration of Heat Stress Induced Disturbances of Antioxidant Defense System in Chicken by Brahma Rasayana. *Advance Access Publication eCAM* 2008; 5(1)77–84.

Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R., Prabhakar, M.C., 2004. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J. Tuberc.* 51, 213–218.

Roland F. Beers, Jr. and Irwin W. Sizer. 1952. A Spectrophotometric Method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by Catalase. *Article. Biol. Chem.* 1952, 195:133-140.

Rosen, G.M., Pou, S., Cohen, M.S., Hassett, D.J., Britigan, B.E., Barber, M.J., Cao, G.-L., Halpern, 1999. H.J. 14N-Spin trapping of free radicals in the presence of 15N-spin labeled *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2* (2), pp. 297-300.

Ryan, D., Robards, K. 1998. Phenolic compounds in olives. *Analyst* 123 (5), pp. 31R-44R.

Schieber A., Mihalev K., Berardinia N., Mollovb P., Carlea R. 2005. Flavonol Glycosides from Distilled Petals of *Rosa damascena* Mill. *Z. Naturforsch.* 60c, 379-384.

Spanou C, Bourou G, Dervishi A, Aligiannis N, Angelis A, Komiotis D, Skaltsounis AL, Kouretas D. 2008. .Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts. *Agric. Food Chem.* 56(16):6967-76.

Spanou C, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E, Kouretas D. 2011. Effects of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative stress regulation. *In Vivo.* 25(4):657-62.

Stagos D, Spanou C, Margariti M, Stathopoulos C, Mamuris Z, Kazantzoglou G, Magiatis P, Kouretas D. J. 2007. Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes. *Agric. Food Chem.* 55(13):5246-52.

Trosko, J.E., Chang, C.C. 1989. Stem cell theory of carcinogenesis. *Toxicology Letters* 49 (2-3), pp. 283-295.

Tsimidou, M., Papadopoulos, G., Boskou, D. 1992. Phenolic compounds and stability of virgin olive oil. *Food Chemistry* 45 (2), pp. 141-144.

Vaclavikova R, Soucek P, Svobodova L., Anzenbacher P., Simek P., Guengerich F. P., Gut I. 2004. Different in vitro metabolism of paclitaxel and docetaxel in human, rats, pigs and minipigs. *Drug metabolism and disposition*, vol. 32, 666-674.

Vaya, J., Aviram M. Nutritional Antioxidants Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. 2001. *Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*, Volume 1, pp. 99-117(19).

Worapol A., Maitree S. 2013. Effect of polyphenols extracted from tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed coat on pathophysiological changes and red blood cell glutathione peroxidase activity in heat-stressed broilers. *Int J Biometeorol* 57:137-143.

Xiao H. B., Fang J., Lu X. Y., Sun Z. L. 2013. Kaempferol improves carcass characteristics in broiler chickens by regulating ANGPTL3 gene expression. *British Poultry Science*. Vol. 53, Nr. 6, pp. 836-842.

Yamada K, Ogawa H, Hara A, Yoshida Y, Yonezawa Y, Karibe K, Nghia VB, Yoshimura H, Yamamoto Y, Yamada M, Nakamura K, Imai K. 2009. Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral Res.* 83(1):35-44.

Zhou Yi-Bin, Wan X.-C., Shang Y.-Y., Hu J.-W., Shao L., Chen W., Li D..X. Polyphenol Content of Plasma and Litter after the Oral Administration of Green Tea and

Tea Polyphenols in Chickens. 2012. J. Agric.Food Chem. 60, 1619–1627.

Οικονομίδης Δημ.,2013. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες σε Αίμα από Κοτόπουλα Κρεατοπαραγωγής, που Υπέστησαν Αγωγή με Πολυφαινολικά Πρόσθετα.