



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ
ΣΕ ΙΣΤΟ ΣΠΛΗΝΑΣ & ΣΕ ΑΙΜΑ
ΑΠΟ ΝΕΑΡΑ ΠΡΟΒΑΤΑ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ**

**ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS
MARKERS IN SPLEEN TISSUE AND BLOOD
FROM SHEEPS CONSUMED FEED WITH
POLYPHENOLIC ADDITIVES IN ABLACTATION PERIOD**



ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ-ΝΙΚΗ Κ. ΚΟΚΚΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα και του Λέκτορα κ. Δημήτριου Στάγκου, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσαν να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα, Νίκο Γκουτζουρέλα, και τον μεταδιδακτορικό ερευνητή, Γιάννη Καφαντάρη, για την ανεκτίμητη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Για το σκοπό της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε εκτροφή στο στάδιο του απογαλακτισμού είκοσι οχτώ (28) προβάτων, της Ελληνικής φυλής «Χιώτικα», με πολυφαινολικά πρόσθετα από στέμφυλα και στη συνέχεια έγινε έλεγχος της αντιοξειδωτικής τους δράσης στον ιστό της σπλήνας και στο αίμα. 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 – αιμοληψίες. Η πρώτη αιμοληψία – 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 αιμοληψία – 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. Εξετάστηκε εάν ο ιστός της σπλήνας και το αίμα θα παρουσίαζαν βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των προβάτων τα οποία τρέφονταν με το σιτηρέσιο το οποίο περιείχε τα στέμφυλα. Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που ελέγχθηκαν ήταν: η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) και η δραστικότητα 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 υπεροξειδωσίας των λιπιδίων και τέλος τα πρωτεϊνικά καρβονύλια για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσίας των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν είναι τα εξής: Τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν στον ιστό της σπλήνας των 65 ημερών, από τις control στις πολυφαινολικές ομάδες, κατά 101,47%. Στις υπόλοιπες μετρήσεις, οι μεταβολές της GSH δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Τα TBARS παρουσιάζουν στον ιστό της σπλήνας των 65 ημερών μείωση, από τις control στις πολυφαινολικές ομάδες, κατά 26,34%. Επίσης, τα επίπεδα της καταλάσης παρουσιάστηκαν αυξημένα στο αίμα των 42 ημερών κατά 28,47%. Τα επίπεδα της TAC και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων τόσο στο αίμα όσο και στον ιστό της σπλήνας δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

ABSTRACT

The aim of the present study was to raise young sheep with feed containing polyphenolic additives from grapes, in order to examine the effects on the redox status in spleen tissue and blood, using oxidative stress markers. For this purpose, feed containing polyphenolic additives was given to twenty eight (28) young sheep at the stage of ablactation. The twenty eight (28) sheep 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 sheep 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 sheep 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. The observed results were: GSH levels in the 65 days polyphenolic group of spleen tissue was increased by 101,47% compared with the control. In TBARS assay, a reduction was found in spleen tissue of 65 days polyphenolic group by 26,34%, respectively compared with the control. The catalase activity was higher by 28,47% in blood of 42 days polyphenolic group. TAC changes and CARB changes were not statistically significant compared to control.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πίνακας περιεχομένων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT.....	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	9
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1 Οξειδωτικό στρες.....	11
1.1.1 Ιστορική αναδρομή & ορισμός.....	11
1.1.2 Ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη O ₂	11
1.1.3 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών	16
1) Οξειδωτική φωσφορυλίωση	16
3) Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ	17
4) Κυτόχρωμα P450	17
5) Αυτοοξειδωση μορίων.....	18
Εξοκυτταρικές πηγές.....	18
1.1.4 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια	19
1.1.5 Αντιοξειδωτική άμυνα.....	21
Η υπεροξειδάση της δισμουτάσης (SOD) είναι ίσως το πιο σημαντικό ένζυμο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του O ₂ ⁻ σε H ₂ O ₂ :	22
SOD.....	22
1.1.6 Οξειδωτικό στρες και διαταραχές της υγείας.....	28
1.1.7 Οξειδωτικό στρες και διαταραχή της υγείας των ζώων.....	28
1.2 Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις	28
1.2.1 Βιολογικές ιδιότητες των σταφυλιών	29
1.2.2 Ανατομία και χημική σύσταση σταφυλιών.....	30
1.2.3 Στέμφυλα και περιβάλλον.....	30
1.3 Πολυφαινόλες.....	31
1.3.1 Ετυμολογία	31
1.3.2 Ιστορικό	31
1.3.3 Ορισμός	32
1.3.4 Δομή και Τάξεις των Πολυφαινολών	32

1.3.5 Φυσικές Ιδιότητες.....	35
1.3.6 Χημειοπροστατευτική Δράση Πολυφαινολών.....	35
1.3.7 Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία.	36
1.4 Γενικές πληροφορίες για τα πρόβατα.....	37
1.4.1 Χαρακτηριστικά.....	37
1.4.2 Εγκυμοσύνη.....	37
1.4.3 Χιώτικο πρόβατο.....	38
1.5 Σκοπός.....	38
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	39
2.1 Γενικά.....	39
2.2. Περιγραφή του σιτηρεσίου.....	40
2.2.1 Παρασκευή βιολειτουργικών ζωοτροφών.....	40
2.2.2 Παρασκευή βιολειτουργικών ζωοτροφών για τα πρόβατα (Ελληνικής φυλής, «Χιώτικα»).	40
2.2.3 Παρασκευή ενσιρώματος στεμφύλων.....	41
2.2.4 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης (in vitro) των ζωοτροφών.	42
2.2.5 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των παρασκευασμένων ζωοτροφών για τα πρόβατα.....	43
2.2.6. Συσχέτιση των δύο μεθόδων κατά Spearman.....	44
2.2.7 Συνολικά αποτελέσματα της αποτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ζωοτροφών.....	46
2.3 Ομογενοποίηση ιστών.....	46
2.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.....	47
2.4.1 Γενικά.....	47
2.4.2 Μέθοδοι.....	48
1. Μέτρηση γλουταθειόνης.....	48
2. Δραστικότητα της Καταλάσης.....	52
3.Ολική Αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC).	54
4.Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).....	57
ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΤΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟ ΘΕΙΟΒΑΡΒΙΤΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ (TBARS) ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ.....	58
5.Πρωτεϊνικά καρβονύλια.....	59
6.Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.....	61
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	62
3.1 Επίπεδα Γλουταθειόνης.....	62
3.2 Επίπεδα TBARS.....	64
3.3 Επίπεδα Καταλάσης.....	66
3.4 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	68
3.5 Επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).....	70
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	72

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	77
---------------------	----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Σύστηματική ταξινόμηση προβάτων.....	37
Πίνακας 2: Σύσταση παρασκευασμένων σιτηρεσιών για την πολυφαινολική ομάδα.....	40
Πίνακας 3: Σύσταση παρασκευασμένων σιτηρεσιών, ομάδα control.....	41
Πίνακας 4: Τιμές IC50 των ζωοτροφών με τη μέθοδο DPPH και ABTS.....	46
Πίνακας 5: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της GSH.....	50
Πίνακας 6: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της GSH.....	51
Πίνακας 7: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης....	53
Πίνακας 8: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης....	54
Πίνακας 9: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC.....	55
Πίνακας 10 : Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC.....	57
Πίνακας 11 : Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της αιμοσφαιρίνης	62

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση τη ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.....	43
Διάγραμμα 2 : Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με στέμφυλα.....	43
Διάγραμμα 3 : Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.....	44
Διάγραμμα 4 : Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με στέμφυλα.....	44
Διάγραμμα 5 : Στο διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση των τιμών IC50 της μεθόδου DPPH με τη μέθοδο του ABTS ($r=0,991$, $p<0,05$).....	45
Διάγραμμα 6 : Στο διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση των τιμών IC50 της μεθόδου DPPH με τη μέθοδο του ABTS ($r=0,972$, $p<0,05$).....	45
Διάγραμμα 7 : Πρότυπη καμπύλη Αλβουμίνης.....	52
Διάγραμμα 8: Επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH). * Στατιστικά σημαντική αύξηση στις πολυφαινολικές ομάδες των 65 ημερών σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου κατά 101,47% στον ιστό της σπλήνας.....	62

<i>Διάγραμμα 9 :τα επίπεδα της γλουταθειόνης, δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές από τις 15 ημέρες στις 42 ημέρες, ούτε από της 42 στις 65 ημέρες.....</i>	<i>63</i>
<i>Διάγραμμα 10: Επίπεδα TBARS. Στατιστικά σημαντική μείωση κατά 26,34% μεταξύ των ομάδων control 65 ημερών και polyphenol 65 ημερών.....</i>	<i>64</i>
<i>Διάγραμμα 11: Επίπεδα TBARS.....</i>	<i>65</i>
<i>Διάγραμμα 12 :Επίπεδα Καταλάσης.....</i>	<i>66</i>
<i>Διάγραμμα 13: Επίπεδα Καταλάσης. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης στις 42 ημέρες στην πολυφαινολική ομάδα κατά 28,47%.</i>	<i>67</i>
<i>Διάγραμμα 14 :Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον ιστό της σπλήνας.</i>	<i>68</i>
<i>Διάγραμμα 15 :Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο αίμα.....</i>	<i>69</i>
<i>Διάγραμμα 16 :Επίπεδα TAC.....</i>	<i>70</i>
<i>Διάγραμμα 17 :Επίπεδα της TAC στο πλάσμα του αίματος.</i>	<i>71</i>

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<i>Εικόνα 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου.....</i>	<i>15</i>
<i>Εικόνα 2: Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.</i>	<i>18</i>
<i>Εικόνα 3 : Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ΔΜΟ.....</i>	<i>19</i>
<i>Εικόνα 4: Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών.</i>	<i>19</i>
<i>Εικόνα 5 : Οξειδωτικό στρες.</i>	<i>21</i>
<i>Εικόνα 6 : Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων.</i>	<i>22</i>
<i>Εικόνα 7: Απεικόνιση δράσης των GR, GPx, SOD, CAT.</i>	<i>23</i>
<i>Εικόνα 8: Δομή γλουταθειόνης</i>	<i>24</i>
<i>Εικόνα 9: Ασθένειες προκαλούμενες από οξειδωτικό στρες.</i>	<i>28</i>
<i>Εικόνα 10 : Ανατομία και σύσταση ράγας σταφυλιού.</i>	<i>30</i>
<i>Εικόνα 11: Χημικές Δομές Διαφορετικών Πολυφαινολικών Τάξεων.</i>	<i>35</i>
<i>Εικόνα 12: Πειραματικό πλάνο εκτροφής – απογαλακτισμού των αναπτυσσόμενων αρνιών.....</i>	<i>39</i>
<i>Εικόνα 13: Συσκευασία πακεταρίσματος σιτηρεσιών.....</i>	<i>42</i>
<i>Εικόνα 14: Ομογενοποίηση α) με γουδί β) χρήση υπερήχων.</i>	<i>46</i>
<i>Εικόνα 15 : Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης.</i>	<i>48</i>

<i>Εικόνα 16 :Μονοπάτι αναγωγής του H_2O_2 σε H_2O.....</i>	<i>52</i>
<i>Εικόνα 17 :Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA.....</i>	<i>57</i>
<i>Εικόνα 18:Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (2,4-δίνιτριφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου.....</i>	<i>59</i>
<i>Εικόνα 19 :Απεικόνιση του σπλήνα και οι βασικές λειτουργίες του.....</i>	<i>73</i>
<i>Εικόνα 20 :Απεικόνιση αιμοσφαιρίνης και ερυθρών αιμοσφαιρίων.....</i>	<i>73</i>

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οξειδωτικό στρες

1.1.1 Ιστορική αναδρομή & ορισμός

Το 1775 ο Priestley ανέφερε ότι «η συνεχής έκθεση στο οξυγόνο μπορεί να σβήσει το κερί της ζωής πολύ γρήγορα». Η προφητική αυτή παρατήρηση από τον άνθρωπο που ανακάλυψε το οξυγόνο, έδωσε το έναυσμα για τη λύση ενός από τα σημαντικότερα προβλήματα της σύγχρονης επιστήμης: του «παράδοξου του οξυγόνου».

Το O_2 είναι πολύ σημαντικό στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής, αλλά κάτω από κάποιες περιπτώσεις μπορεί να γίνει **τοξικό**, καθώς η έκθεση του οργανισμού σε αυξημένες συγκεντρώσεις οξυγόνου προκαλεί ανεπιθύμητες αντιδράσεις για την υγεία.

Τα αίτια των δηλητηριωδών ιδιοτήτων του οξυγόνου ήταν άγνωστα πριν τη δημοσίευση της θεωρίας των Gershaman et al το 1954, σύμφωνα με την οποία η τοξικότητα του οξυγόνου οφειλόταν σε μερικώς αναχθείσες μορφές οξυγόνου. Λίγο αργότερα, ο Denham Harman το 1956 διατύπωσε την υπόθεση ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ – ROS) μπορεί να παίζουν ρόλο στην κυτταρική βλάβη, τη μεταλλαξιγένεση, τον καρκίνο και τις εκφυλιστικές διεργασίες της βιολογικής γήρανσης. Η ανακάλυψη του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) το 1969 σήμανε μια νέα εποχή για τη διερεύνηση των δράσεων των ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς. Μια τρίτη εποχή της έρευνας σχετικά με τις δράσεις των ελευθέρων ριζών ξεκίνησε όταν το 1977 εμφανίστηκαν οι πρώτες αναφορές που περιέγραφαν τις ευεργετικές βιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Έκτοτε, είναι πλέον σαφές ότι οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν προσαρμοστεί στη συνύπαρξη με τις ελεύθερες ρίζες και έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς για τη χρησιμοποίηση αυτών σε φυσιολογικές λειτουργίες. Είναι πλέον γνωστό, ότι οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διπλό ρόλο: άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε βλαπτικές (Valko, M., et al., 2007).

Ο όρος **οξειδωτικό στρες** ορίστηκε για πρώτη φορά το 1985 ως «η διαταραχή της ισορροπίας των προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων» (Sies, H., et al., 1985).

Τα τελευταία χρόνια ο ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην παθογένεση πολλών ασθενειών κίνησε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, με αποτέλεσμα να πληθαίνουν οι έρευνες για την κατανόηση των επιβλαβών δράσεων τους, αλλά και την επίλυση αυτών με τη μελέτη των αντιοξειδωτικών συστατικών του οργανισμού και των τροφίμων, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική προστατευτική δράση.

1.1.2 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 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.

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 (Gilbert, 2000, Halliwell & Gutteridge, 1990). 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).

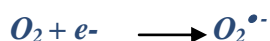
Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις. Αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και έχουν διπλό ρόλο αφού ανάλογα με το ρυθμό παραγωγής τους μπορεί να είναι είτε ευεργετικές είτε επιβλαβείς.

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta et al., 2004; Pani and Galeotti, 2010; AICR, 2007), το θείο (Battin et al., 2009; Pani and Galeotti, 2010) 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. Όμως, είναι δυνατή η ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, με αποτέλεσμα 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 υπεροξείδιο του υδρογόνου (Halliwell 2001). Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ) (Cheeseman et al, 1993; Gutteridge, 1995). Τα κυριότερα ΔΕΟ (Aqil et al., 2012; Vainio et al., 1999; Weisburger, 2001; AICR, 2007) είναι:

1) Η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$)

Το σουπεροξείδιο ($O_2^{\bullet -}$) σχηματίζεται από την αναγωγή του οξυγόνου από ένα e^- σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

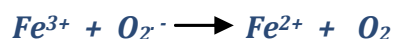


Το σουπεροξείδιο έχει παραμαγνητικές ιδιότητες λόγω του ασύζευκτου ηλεκτρονίου. Ο σχηματισμός του σουπεροξειδίου πραγματοποιείται αυθόρμητα υπό αερόβιες συνθήκες στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων κατά τη διάρκεια της λειτουργίας «της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων». Ένζυμα που παράγουν σουπεροξείδιο είναι η λιποξυγενάση, η κυκλοξυγενάση και η NADPH – οξειδάση των φαγοκυττάρων που αποτελεί ένα παράδειγμα σκόπιμης παραγωγής $O_2^{\bullet -}$. Η ρίζα του σουπεροξειδίου παίζει κεντρικό ρόλο στη βιοχημεία των ελευθέρων ριζών επειδή από τη ρίζα αυτή παράγονται πολλές δραστικές μορφές οξυγόνου. Το $O_2^{\bullet -}$, όπως και όλες οι ρίζες, έχει τη φυσική τάση να ζευγαρώσει το ασύζευκτό του ηλεκτρόνιο. Αυτό μπορεί να γίνει και αν αντιδράσουν δύο ρίζες $O_2^{\bullet -}$ μεταξύ τους. Σε υδατικά διαλύματα με ουδέτερο pH, δύο ρίζες $O_2^{\bullet -}$ αντιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν υπεροξείδιο του υδρογόνου, σύμφωνα με την αντίδραση:



2) Η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet})

Η ρίζα υδροξυλίου OH^{\bullet} είναι πολύ δραστική, όπως έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες (Bielski & Cabelli, 1995; Halliwell & Gutteridge, 1999; von Sonntag, 1987). Αυτή προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas & Kouretas, 1999). Η αντίδραση καταλύεται ως εξής:



Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις της ρίζας υδροξυλίου είναι:

- ✚ Η απόσπαση υδρογόνου,
- ✚ Η προσθήκη ηλεκτρονίου και
- ✚ Η μεταφορά ηλεκτρονίου

(Halliwell & Gutteridge, 1999)

3) Υπεροξειδικές ρίζες (ROO^{\bullet})

Οι υπεροξειδικές ρίζες ROO^{\bullet} σχηματίζονται από την προσθήκη μοριακού οξυγόνου (O_2) σε ελεύθερες οργανικές ρίζες. Είναι τοξικές για τα κύτταρα επειδή μπορούν να αφαιρέσουν άτομα υδρογόνου από τα λιπίδια και με αυτό τον τρόπο να προωθήσουν τη λιπιδική υπεροξείδωση (Παπαγεωργίου, 2005).

4) Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\bullet})

Η ρίζα υδροϋπεροξειδίου HO_2^{\bullet} προκύπτει από αναγωγή 1 e⁻ στο οξυγόνο, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



5) Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)

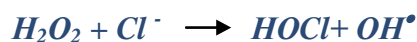
Το υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 παράγεται με αναγωγή του οξυγόνου με δύο ηλεκτρόνια, σύμφωνα με την αντίδραση:



Στο μόριο του το H_2O_2 δεν περιέχει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο γι' αυτό και δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Υπό συγκεκριμένες συνθήκες (όπως είναι η παρουσία μεταλλικών ιόντων), διασπάται και σχηματίζει υδροξυλική ρίζα (HO^\bullet), που είναι ιδιαίτερος δραστική και τοξική για τα κύτταρα. Η τοξικότητα του H_2O_2 στα κύτταρα διαφέρει, γεγονός που οφείλεται στην ικανότητα που έχουν τα διάφορα κύτταρα να απομακρύνουν το H_2O_2 . Εκτός αυτού υπάρχουν τρία αντιοξειδωτικά συστήματα, τα οποία ενεργοποιούνται για να απομακρύνουν τα μόρια H_2O_2 , μόλις αυτά παραχθούν (Παπαγεωργίου, 2005).

6) Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)

Το υποχλωριώδες οξύ HOCl είναι 100-1000 φορές πιο τοξικό από το H_2O_2 και το O_2^- και σχηματίζεται με την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων κυττάρων. Όταν ενεργοποιηθούν τα ουδετερόφιλα, η μυελο-υπεροξειδάση (ένζυμο που βρίσκεται στο κυτόπλασμα των φαγοκύτταρων), καταλύει την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) με το χλώριο (Cl), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Το υποχλωριώδες οξύ είναι ασθενές, εν τούτοις πολύ δραστικό χημικά. Ενοχοποιείται ότι οδηγεί σε κυτταρική νέκρωση μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Καταστρέφει τα αποθέματα ATP που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια, δυσχεραίνει το μηχανισμό παραγωγής ενέργειας του κυττάρου, προκαλείται «οίδημα» σ' αυτά, απώλεια δυναμικού κυτταρικής μεμβράνης και απελευθέρωση κυτοχρώματος C, οπότε επέρχεται η κυτταρική απόπτωση. Εκτός αυτών, η έκθεση των βιομορίων (λιπίδια, DNA, πρωτεΐνες) καθώς και μικρότερων μορίων (ασκορβικό οξύ, νουκλεοτίδια) στο υποχλωριώδες οξύ είναι συνυφασμένη με πρόκληση οξειδωτικών βλαβών (Whiteman Matthew, 2005).

7) Υποβρωμιώδες Οξύ (HOBr)

Το υποβρωμιώδες οξύ HOBr είναι ασθενές και ασταθές. Σε υδατικό διάλυμα, δίσταται εν μέρει στο ανιόν OBr^- και το κατιόν H^+ . Όταν καθαρό βρώμιο προστίθεται σε νερό, σχηματίζει υποβρωμιώδες οξύ και υδροβρωμικό οξύ (HBr):



Το HOBr χρησιμοποιείται ως λευκαντικό, οξειδωτικό, αποσμητικό και απολυμαντικό, εξαιτίας της ικανότητάς του να σκοτώνει τα κύτταρα πολλών παθογόνων. Η ένωση παράγεται ιδίως από ηωσινόφιλα, τα οποία το παράγουν από τη δράση της υπεροξειδάσης ηωσινόφιλων, ένα ένζυμο που χρησιμοποιεί κατά προτίμηση βρωμίδιο. Το βρωμίδιο χρησιμοποιείται επίσης σε υδρομασάζ και ιαματικά λουτρά ως μικροβιοκτόνος παράγοντας, χρησιμοποιώντας τη δράση ενός οξειδωτικού παράγοντα για να παράγουν υποβρωμιώδες με παρόμοιο τρόπο με την υπεροξειδάση των ηωσινόφιλων.

8) Όζον (O_3)

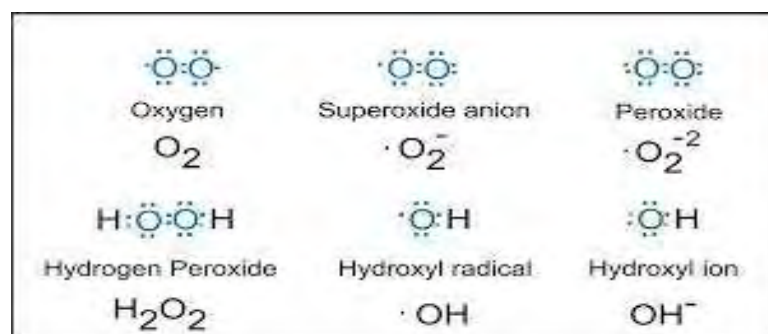
Το όζον O_3 βρίσκεται στα ανώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας και έχει μεγάλη βιολογική σημασία επειδή απορροφά τις βλαβερές για τους ζωντανούς οργανισμούς, υπεριώδεις ακτινοβολίες. Σχηματίζεται

με φωτοδιάσπαση του O_2 από την υπεριώδη ακτινοβολία σε ατομικό οξυγόνο το οποίο εν συνεχεία αντιδρά με μοριακό οξυγόνο. Το όζον δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Πρόκειται για οξειδωτικό αέριο στο μόριο του οποίου περιέχονται τρία άτομα οξυγόνου. Είναι διαμαγνητικό, έχει χαρακτηριστική οσμή και ιδιαίτερα περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό (Παπαγεωργίου, 2005).

9) Μονήρες οξυγόνο (1O_2)

Το μονήρες οξυγόνο 1O_2 (singlet oxygen) έχει όλα τα ηλεκτρόνια του συζευγμένα, πράγμα που σημαίνει ότι ουσιαστικά δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Το 1O_2 σχηματίζεται μέσω μιας αλλαγής στην κατάσταση του spin, από παράλληλη σε αντιπαράλληλη. Αυτό αυξάνει πάρα πολύ τη δραστηριότητά του, περισσότερο από το μοριακό οξυγόνο, επειδή αναιρείται ο περιορισμός του spin και παρουσιάζει αυξημένη οξειδωτική ικανότητα. Αυτό συμβαίνει επειδή το μονήρες οξυγόνο βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση. Έχει μικρή διάρκεια ημιζωής και δυνατότητα να διαπερνά τα κύτταρα (Halliwell, How to characterize an antioxidant: an update 1995). Αποτελεί το μεγαλύτερο καταλύτη για την έναρξη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, η οποία οδηγεί σε καταστροφή των μεμβρανών. Το 1O_2 σχηματίζεται κατά την άμεση μεταφορά ενέργειας από φωτοευαίσθητα μόρια.

Στα δραστικά αυτά μοριακά είδη συμπεριλαμβάνεται επίσης και η δραστική μορφή αζώτου, το μονοξείδιο του αζώτου (NO), 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).



Εικόνα 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου.

Οι ευεργετικές δράσεις των ΔΜΟ παρατηρούνται σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως στην κυτταρική απόκριση στο στρες, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή, στην απόπτωση, στη φαγοκυττάρωση κυττάρων του ανοσοποιητικού και στη σηματοδότηση για την πήξη του αίματος.

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, φωσφολίπδια και γενικά λιπίδια, βάσεις DNA και οργανικά οξέα. Οι λιγότερο δραστικές ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή δραστικότερων καταλήγοντας τελικά στο ίδιο αποτέλεσμα. Η παρουσία ασύζευκτου ηλεκτρονίου, προσδίδει στις ΔΜΟ ιδιαίτερη δραστηριότητα, αφού μπορούν είτε να δώσουν είτε να λάβουν ένα ηλεκτρόνιο σε/από άλλα μόρια, συμπεριφερόμενες έτσι ως αναγωγικά ή οξειδωτικά μέσα αντίστοιχα (Durackova, Z., et al., 2010).

1.1.3 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

Παράγονται μέσα από διάφορες εσωτερικές φυσιολογικές λειτουργίες του σώματος καθώς αποτελούν προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού του κυττάρου (ενδοκυτταρικές πηγές). Επίσης παράγονται και όταν το σώμα εκτίθεται σε συγκεκριμένης τοξικότητας περιβάλλον (εξωκυτταρικές πηγές). Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά μόρια και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε διάφορα βιολογικά μακρομόρια και κατά συνέπεια σε κυτταρικές λειτουργίες. Μάλιστα, εκτός από τις επιβλαβείς συνέπειες που έχουν για το κύτταρο, έχουν σημαντική λειτουργία και στη μεταγωγή σήματος, τόσο ενδοκυτταρικά, όσο και διακυτταρικά.

Σε γενικές γραμμές, δραστικές μορφές οξυγόνου παράγονται κατά:

- ✚ τις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας,
- ✚ τα προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα,
- ✚ τη λιπιδική οξείδωση,
- ✚ την ακτινοβολία,
- ✚ τη φλεγμονή,
- ✚ το κάπνισμα

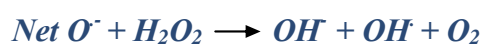
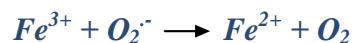
Ενδοκυτταρικές πηγές

1) Οξειδωτική φωσφορλίωση

Είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδοκυτταρική πηγή ROS. Η πλειοψηφία των ROS παράγεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια αφού το 0,1-1% του οξυγόνου μετατρέπεται σε ρίζα.

Η αφυδρογονάση του NADH (σύμπλεγμα 1) και το σύμπλεγμα κυτοχρώματος bc1 (σύμπλεγμα 3), είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 (Chance et al., 1979). Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και $FADH_2$ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $O_2^{\cdot-}$ (Chance et al., 1979). Το $O_2^{\cdot-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). Ακόμα, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $O_2^{\cdot-}$ και στο H_2O_2 δημιουργείται OH^{\cdot} .

Αντίδραση Haber-Weiss:



Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται επίσης μονοξείδιο του αζώτου (NO) από τη συνθάση του NO. Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ($ONOO^{\cdot-}$), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ($ONOOH$) (Korpenol, 1998). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες OH^{\cdot} και NO_2^{\cdot} . 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) Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη»

Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (Polymorphonuclear neutrophil, PMN) είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από την προσβολή τους από ιούς και βακτήρια (Pyne, 1994). Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά αρχίζει με την καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή άλλους μηχανισμούς (Meydani & Evans, 1979). Στην οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα καθώς και το $O_2^{\cdot-}$ κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Τα λυτικά ένζυμα διευκολύνουν την καταστροφή των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβες, ενώ το $O_2^{\cdot-}$ παράγεται από τη μυελοϋπεροξειδάση και την NADPH οξειδάση (Petroni et al., 1992).

Η κυτταροπλασματική δισμουτάση του υπεροξειδίου μετατρέπει το $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε OH^{\cdot} από ιόντα μετάλλων ή σε $HOCl$:



Αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση θεωρείται σημαντική για την απομάκρυνση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση βακτηριακής και ιικής μόλυνσης. Ωστόσο, ROS και άλλα οξειδωτικά μόρια που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξείδωση των λιπιδίων (Meydani & Evans, 1979; Meydani et al., 1992).

Η φαγοκυττάρωση βακτηρίων ή ιών, προκαλεί το φαινόμενο που είναι γνωστό και ως αναπνευστική «έκρηξη». Χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και γλυκόζης από τα κύτταρα και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή σουπεροξειδίου και εν τέλει $HOCl$.

3) Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (Downey, 1990; Kuppasamy & Zweier, 1989). 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. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύεται από σχηματισμό του $O_2^{\cdot-}$. Η οξειδάση της ξανθίνης πρέπει να μετατραπεί από την ανηγμένη στην οξειδωμένη της μορφή από μία ενδοκυτταρική πρωτεάση που ενεργοποιείται από το Ca^{2+} ενώ το μοριακό οξυγόνο είναι δέκτης ηλεκτρονίων.

4) Κυτόχρωμα P450

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων παράγουν ROS μέσω του κυτοχρώματος P₄₅₀ (Yu, 1994). Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας $O_2^{\cdot-}$ το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε H_2O_2 (Chance et al., 1979). Ο ρυθμός παραγωγής του H_2O_2 είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα (Halliwell & Gutteridge, 1989). Παρουσία ADP και Fe^{3+} η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O_2 παράγοντας $O_2^{\cdot-}$.

5) Αυτοοξειδωση μορίων

Ορισμένα μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$).

Εξωκυτταρικές πηγές

Η ηλιακή και η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία καθώς και το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα είναι σημαντικοί οξειδωτικοί παράγοντες (Koren, 1995; Victoria, 1994). Επίσης, ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από τη δράση ορισμένων φαρμάκων (Naito et al., 1998; Rav et al., 2001) και άλλων ξενοβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα καθώς ακόμα και από το αλκοόλ (Elsayed et al., 1992; Jones et al., 2000; Obata et al., 2001; Wormser et al., 2000). Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή (Ames, 1986; Kanner & Labidot, 2001; Lijinsky, 1999).

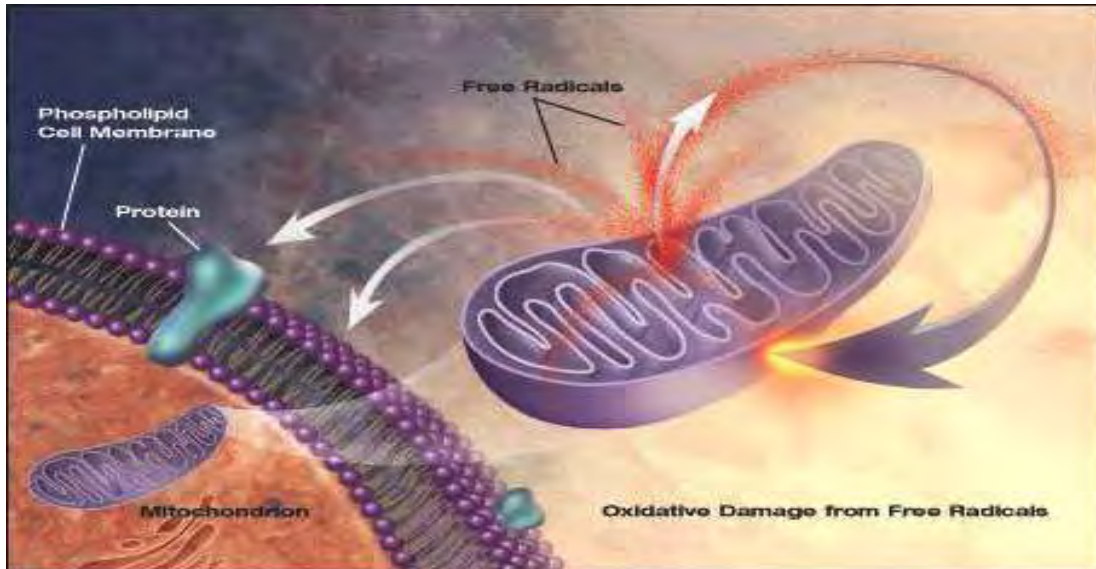


Εικόνα 2: Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.

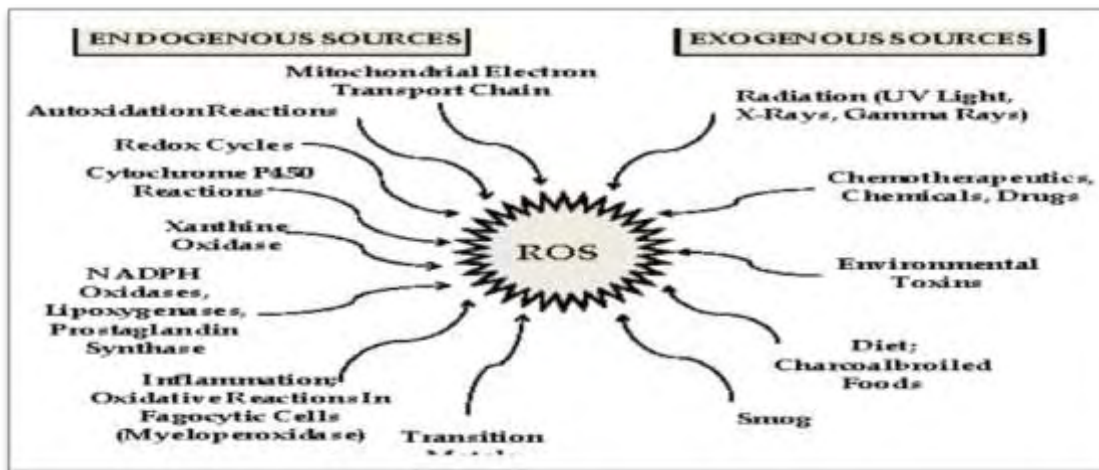
Όσο πιο σταθερή είναι μια ρίζα, τόσο πιο εύκολος είναι και ο σχηματισμός της (Valavanidis, 2006). Οι ρίζες εξουδετερώνονται είτε αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους, είτε με άλλες ρίζες, είτε με άλλα συστατικά του κυττάρου. Αν μια ρίζα αλληλεπιδράσει με μια μη ρίζα, τότε το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο θα μεταφερθεί στην δεύτερη, σχηματίζοντας μια νέα ρίζα. Αν όμως αλληλεπιδράσουν δυο ρίζες μεταξύ τους, τότε τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια θα δημιουργήσουν ένα ζεύγος, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας ένωσης που δε θα είναι ελεύθερη ρίζα. Υπάρχουν πολλοί τύποι ελευθέρων ριζών στο σώμα:

- ✚ Η ρίζα του υπεροξειδίου τείνει να προσλαμβάνει το απαραίτητο ηλεκτρόνιο από τα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Όταν τα μιτοχόνδρια καταστρέφονται, το κύτταρο χάνει την ικανότητα να παράγει ενέργεια και πεθαίνει.
- ✚ Η ρίζα του υδροξυλίου μπορεί να αντιδρά με ένζυμα, πρωτεΐνες και λίπη στις κυτταρικές μεμβράνες.
- ✚ Η ρίζα του περοξυλίου λιπιδίων προκαλεί μια αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσης των λιπιδίων, η οποία μπορεί να βλάψει την κυτταρική μεμβράνη, προκαλεί τη λύση του κυττάρου και την ελευθέρωση του περιεχομένου του.

- ✚ Το μονήρες οξυγόνο δεν είναι ουσιαστικά ελεύθερη ρίζα, αλλά μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή άλλων ελευθέρων ριζών.



Εικόνα 3 : Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ΔΜΟ.



Εικόνα 4: Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών.

1.1.4 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια

Σε κυτταρικό επίπεδο, το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες σε όλα τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια). Παράλληλα οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου, αλλοιώνοντας έτσι τη σηματοδότηση, ενώ αν οι βλάβες είναι εκτεταμένες οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, είτε με απόπτωση είτε με νέκρωση.

Ως προς τον κυτταρικό θάνατο το κύτταρο οδηγείται εκεί σε περίπτωση εκτεταμένων βλαβών είτε μέσω της νέκρωσης είτε μέσω της απόπτωσης. Κατά τη νέκρωση, το κύτταρο διογκώνεται και

διαρρηγνύεται απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του στο περιβάλλον επηρεάζοντας και τα γειτονικά κύτταρα. Στην απόπτωση τα κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και δεν προκαλούν βλάβες στα γειτονικά κύτταρα.

Λιπίδια

Όλες οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες σε οξειδωση εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την επίθεση της ελεύθερης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο.

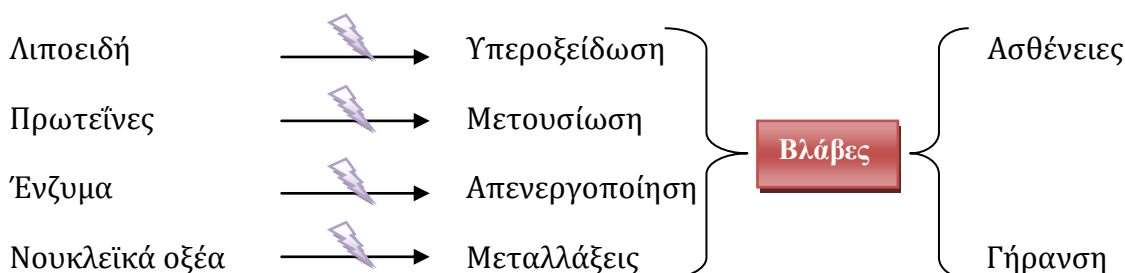
Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει ROO[·] κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες- επαναδιευθέτησης και αλληλεπίδρασης με οξυγόνο (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Πρωτεΐνες

Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το OH[·], το RO[·] και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε άμεση και έμμεση καταστροφή μετά την αλληλεπίδραση με ROS όπως είναι οι αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, ο εκφυλισμός και η καταστροφή τους τους. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι η απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, οι αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και οι αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Davis, 1987; Grune et al., 1997; Halliwell and Gutteridge, 1999; Levine et al., 2000; Stadtman, 1986).

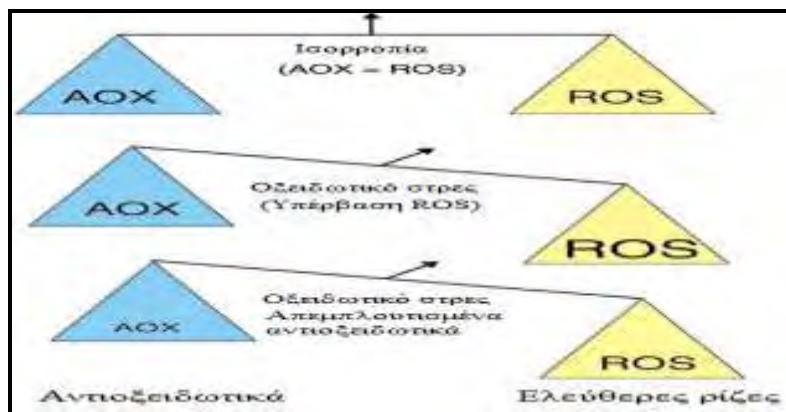
DNA

Αν και το DNA είναι ένα σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο, οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, οι θραύσεις του DNA, η απώλεια πουρινών, η ζημιά στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και η βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Η ρίζα υδροξυλίου(OH[·]) προσβάλλει τη γουανίνη στη θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν, την 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξαδενίνη. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων (Ames, 1986; Beckman and Koppenol, 1996; Dizdaroglu and Jaruga et al., 2002; Halliwell, 2001; Halliwell and Gutteridge, 1999; Helbock et al., 1999).



1.1.5 Αντιοξειδωτική άμυνα

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, ο οποίος όρος 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). 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).

1.1.5.1 Ο Ρόλος Των Αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά παίρνουν μέρος σε μια σειρά από θετικές λειτουργίες στον ανθρώπινο οργανισμό, μερικές από τις οποίες αναφέρονται:

- ✚ Προστατεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες, και συνεπώς το κύτταρο, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.
- ✚ Δρουν καρδιοπροστατευτικά, αυξάνοντας την ανθεκτικότητα των αγγείων, περιορίζοντας τους φλεγμονώδεις παράγοντες, αποτρέποντας την οξείδωση της LDL χοληστερίνης και συμβάλλοντας στον έλεγχο των επιπέδων της αρτηριακής πίεσης και της ομοκυστεΐνης.
- ✚ Ασκούν αντικαρκινική δράση με το να μπλοκάρουν ή να εμποδίζουν την προσκόλληση επικίνδυνων ενζύμων στους ιστούς, αδρανοποιούν καρκινογόνες ουσίες που προκαλούν μεταλλάξεις σε υγιή κύτταρα κι επιβραδύνουν τους μηχανισμούς καρκινογένεσης.
- ✚ Βελτιώνουν τις πνευματικές ικανότητες και την ψυχική διάθεση, προστατεύοντας τους νευροδιαβιβαστές από την οξείδωση και βελτιώνοντας την εγκεφαλική μικροκυκλοφορία.
- ✚ Διατηρούν το δέρμα ελαστικό και το προφυλάσσουν από την πρόωγη γήρανση, περιορίζοντας τη διάσπαση του κολλαγόνου.
- ✚ Προστατεύουν οστά και αρθρώσεις, περιορίζοντας οιδήματα, φλεγμονές και εκφυλιστικές αλλοιώσεις.

- ✚ Βελτιώνουν τη λειτουργική κατάσταση του αμφιβληστροειδούς χιτώνα των ματιών και ενισχύουν την όραση.
- ✚ Δρουν αντιαλλεργικά σε μεγάλο φάσμα αλλεργιών.
- ✚ Διαφυλάσσουν τα αποθέματα άλλων απαραίτητων θρεπτικών ουσιών στον οργανισμό, αποτρέπουν την καταστροφή τους και, σε ορισμένες περιπτώσεις, ενισχύουν τη δράση τους.



Εικόνα 6 : Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων.

1.1.5.2 Πηγές Αντιοξειδωτικών

Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει αντιοξειδωτικά συστήματα (ενδογενή αντιοξειδωτικά) τα οποία μπορεί να είναι ενζυμικά ή μη ενζυμικά ή τα λαμβάνει εξωγενώς (εξωγενή αντιοξειδωτικά). Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι το κυτόχρωμα C, η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης και η καταλάση.

1) Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η υπεροξειδάση της δισμουτάσης (SOD) είναι ίσως το πιο σημαντικό ένζυμο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 :



Το $O_2^{\cdot-}$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD), ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD (Cu -SOD), η οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα. Υπάρχουν διάφορες μορφές SOD στα βιολογικά συστήματα όπως η Cu,Zn-SOD στο εξωκυττάριο υγρό και η Fe-SOD στα βακτήρια και τα φυτά.

2) Καταλάση (CAT)

Η καταλάση (CAT) εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα. 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 ρόλο στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας H_2O_2 (Antunes et al., 2002). Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής

του H_2O_2 σε H_2O και O_2 .



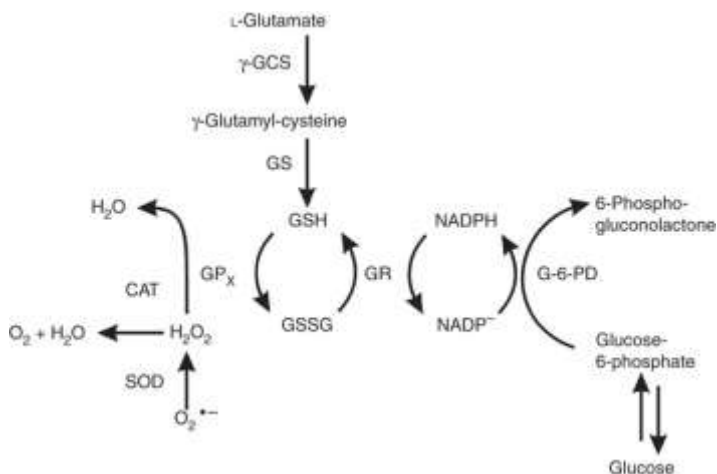
3) Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

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. Όπως και η καταλάση, έτσι και η GPX καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη, η οποία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οξειδώνεται: (Antunes et al., 2002)



4) Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Αποτελείται από δύο υπομονάδες, κάθε μία από τις οποίες περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH.



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

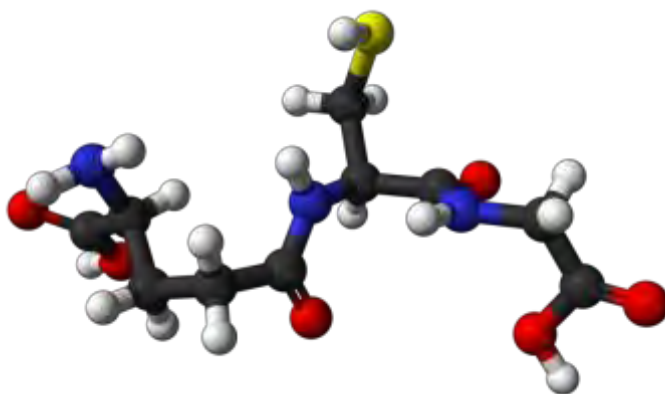
Στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνονται η α -τοκοφερόλη, το β -καροτένιο και το συνένζυμο Q10 τα οποία είναι προσαρμοσμένα στις μεμβράνες ενώ, υπάρχουν και το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ, η τρανσφερίνη, η χολερυθρίνη, η γλουταθειόνη, η λακτοφερίνη κ.α. τα οποία βρίσκονται έξω από τις μεμβράνες.

1) Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι μία ένωση που κατατάσσεται στην κατηγορία των θειολών. Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από 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. Είναι ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό καθώς συμβάλλει στην προστασία από οξειδωτική βλάβη (Scholz RW et al, 1989). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη (GSSG) προς την ανηγμένη μορφή (GSH) και το αντίστροφο. Η σύνθεσή της ελέγχεται από αυτή την επανατροφοδοτική αναστολή (feedback) του ενζύμου που την συνθέτει (συνθετάση της γ -γλουταμυλοκυστεΐνης). Η ανηγμένη μορφή είναι αυτή που έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς συμμετέχει σε αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω (Halliwell & Gutteridge, 1998). Η ανηγμένη μορφή, συναντάται συχνότερα σε σχέση με την οξειδωμένη και συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Ειδικότερα, ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη στα κύτταρα χρησιμοποιείται συχνά σαν δείκτης της παρουσίας ελεύθερων ριζών, δηλαδή της ύπαρξης οξειδωτικού στρες.



Εικόνα 8: Δομή γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη δρα ενάντια του οξειδωτικού στρες απομακρύνοντας τις δραστικές μορφές του οξυγόνου ($\text{ROOH}, \text{H}_2\text{O}_2$) και τις εξωγενείς ηλεκτρόνιοφιλες (πχ. κινόνες). Εκτός αυτού, η GSH συμβάλλει στην αναγωγή και άλλων αντιοξειδωτικών του κυττάρου (ασκορβικού οξέος, βιταμίνης E) συμμετέχοντας έτσι στη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων των συγκεκριμένων βιταμινών (Παπαγεωργίου 2005). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης ένωσης, είναι οι αναγωγικές της ιδιότητες. Ειδικότερα, αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό της γλουταθειόνης, είναι ότι χρησιμοποιείται από πολλά ένζυμα, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης.

Η κύρια αποστολή της είναι η διάσπαση και απομάκρυνση από το σώμα όλων των εν δυνάμει επικίνδυνων τοξινών που εισβάλλουν στο σώμα μας. Είναι ένα αντιοξειδωτικό που παρεμποδίζει την οξείδωση των λιπιδίων από τις ελεύθερες ρίζες στη γαστρεντερική οδό και προστατεύει τα κύτταρα από τις βλάβες που αυτές μπορεί να προκαλέσουν. 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. 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.

Συμπληρωματικά, η γλουταθειόνη είναι δυνατόν να επιτελεί και τις παρακάτω λειτουργίες:

- ✚ Μετέχει στον κύκλο μονοξειδίου του αζώτου που είναι κρίσιμος για τη ζωή.
- ✚ Χρησιμοποιείται σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις, όπως στη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, την πρωτεϊνική σύνθεση, τη σύνθεση των προσταγλανδινών, τη μεταφορά αμινοξέων και την ενεργοποίηση ενζύμων. Έτσι, κάθε σύστημα του σώματος μπορεί να επηρεαστεί από τις συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης, ιδιαίτερα το ανοσοποιητικό σύστημα, το νευρικό, το γαστρεντερικό και οι πνεύμονες.
- ✚ Παίζει ρόλο στο μεταβολισμό του σιδήρου.
- ✚ Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου.
- ✚ Βοηθά στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών.
- ✚ Συμμετέχει στην απομάκρυνση των ξеноβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό.
- ✚ Απομακρύνει υπεροξειδία και ελεύθερες ρίζες.
- ✚ Βοηθά στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών.

2) Βιταμίνες

Οι βιταμίνες είναι αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται μέσω της διατροφής και έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία. Είναι μη θερμιδικές ουσίες, απαραίτητες για το μεταβολισμό και συνήθως λειτουργούν ως συνένζυμα σε ενζυμικές αντιδράσεις. Ο οργανισμός δεν είναι σε θέση να τις παράγει γι' αυτό το λόγο και λαμβάνονται μέσω της διαίτας. Τα χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες κάθε βιταμίνης ποικίλουν όπως ποικίλει και η απαιτούμενη διαιτητική πρόσληψη για κάθε μία. (Καλογιάννης 2010)

2.1) Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Η πιο δραστική αλλά και πιο άφθονη είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυττοπλασματική αλλά και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια από την υπεροξείδωση, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, προστατεύει τη βιταμίνη A από την οξείδωση (Halliwell & Gutteridge, 1998).

2.2) Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C ή αλλιώς, ασκορβικό οξύ είναι ένα υδατοδιαλυτό, ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS (Halliwell & Gutteridge, 1998). Η αναγωγική μορφή της βιταμίνης C είναι ένα σακχαρικό οξύ και κατατάσσεται στους μονοσακχαρίτες. Πολλοί οργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν τη βιταμίνη C. Είναι ένα απαραίτητο διατροφικό στοιχείο για τον άνθρωπο, ο οποίος δε μπορεί να τη βιοσυνθέσει, επειδή το ένζυμο οξειδάση της γουλονολακτόνης, που καταλύει τη τελευταία αντίδραση της βιοσύνθεσης του ασκορβικού οξέος από γλυκόζη απουσιάζει. Το ασκορβικό οξύ αποτελεί ένα συμπαράγοντα ή συνένζυμο οχτώ ενζυμικών αντιδράσεων που συμβαίνουν στον οργανισμό. Αυτές αφορούν τη βιοσύνθεση του κολλαγόνου, της καρτινίνης, το μεταβολισμό της τυροσίνης καθώς και είναι άκρως απαραίτητες στη σύνθεση ορμονών και την απελευθέρωσή τους από τα

επιπεφρίδια. Ανήκει στα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά και φαίνεται να βρίσκεται στη πρώτη γραμμή άμυνας κατά των οξειδωτικών βλαβών (Suvana Kimnite Wattanapitayakul, 2001).

Το ασκορβικό οξύ είναι αναγωγικό αντιδραστήριο (δότης ηλεκτρονίων), πράγμα που σημαίνει ότι μπορεί να προμηθεύσει ηλεκτρόνια τόσο σε ένζυμο όσο και σε οξειδωτικές ενώσεις με τα οποία εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες. Έτσι, μπορεί να ανάγει το σουπεροξειδίο, τις υδροξυλικές ρίζες, το υποχλωριώδες οξύ καθώς και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου μέσα και έξω από τα κύτταρα.

Στο κυτόπλασμα το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειονίνη παρουσιάζουν συνεργό δράση για να προστατέψουν το κύτταρο από οξειδωτικές βλάβες. Εκτός του κυττάρου, το ασκορβικό οξύ πιθανώς να δρα σε σύζευξη με τη βιταμίνη E, η οποία βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να τις προστατεύει από τη λιπιδική υπεροξειδωση, 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 υπεροξειδωση και έτσι συμβάλλει στην πρόληψη του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών (Παπαγεωργίου 2005).

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 παράγει *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. Σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις θα παρουσιάζει τοξική δράση. Η περίσσεια της βιταμίνης C αποβάλλεται μέσω των ούρων (Suvana Kimnite Wattanapitayakul, 2001).

3) Β-καροτίνη

Η β-καροτίνη είναι λιποδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη A. Πιστεύεται ακόμα, ότι και αυτή μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και το σελήνιο (Halliwell & Gutteridge, 1998).

4) Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser, 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και με αυτό τον τρόπο τα προστατεύει από τις ROS.

5) Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell & Gutteridge, 1998).

6) Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπάρογοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Υπάρχουν πολλά τρόφιμα που περιέχουν αντιοξειδωτικές ουσίες, τα κυριότερα εκ των οποίων παραθέτονται παρακάτω:

- + Βιταμίνη Α: αυγό, βούτυρο, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, συκώτι, ιχθυέλαια.
- + Βιταμίνη C: φρούτα, κυρίως εσπεριδοειδή (πορτοκάλια, μανταρίνια, νεράντζια), φραγκοστάφυλα, φράουλες, ακτινίδια, κεράσια, μούρα, πεπόνι, ντομάτα, λάχανο, πράσινη πιπεριά, πράσινα φυλλώδη λαχανικά (μαρούλι, σπανάκι), σταυρανθή (μπρόκολο, κουνουπίδι, λαχανάκια Βρυξελλών) (Χασαπίδου 1996).
- + Β-καροτένιο: φρούτα, κυρίως εσπεριδοειδή, λαχανικά πράσινου, κίτρινου και πορτοκαλί χρώματος, ντομάτες, και επίσης (σε μικρότερες ποσότητες) βερίκοκα, γλυκοπατάτες, καρπούζι, κολοκύθα.
- + Βιταμίνη Ε: φυτικά έλαια (ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, βαμβακέλαιο) και κυρίως ελαιόλαδο, δημητριακά ανεπεξέργαστα, σόγια, αμύγδαλα, καρύδια, φουντούκια, λαχανικά σκούρα πράσινα, λαχανικά φυλλώδη, φύτρα σταριού, αυγά.
- + Σελήνιο: κρέας, συκώτι, θαλασσινά, αβοκάντο, ελιές, ξηροί καρποί, δημητριακά, σπόροι, φρούτα και λαχανικά που φυτρώνουν στο έδαφος.
- + Φλαβονοειδή: αρακάς, βατόμουρα, εσπεριδοειδή, κόκκινο κρασί, κουμ κουάτ, κρεμμύδια, μέλι, μήλα, μπρόκολο, πικρή σοκολάτα, σόγια, σταφύλια, τσάι πράσινο και μαύρο, φασολάκια πράσινα και επίσης στους ανθούς λαχανικών και λουλουδιών και στα φύκια.
- + Ψευδάργυρος: δημητριακά, συκώτι, όσπρια, θαλασσινά, σπόροι σιταριού, μαγιά μύρας, αυγά.
- + Ανθοκυανίνες: γογγύλια, κάρδαμο, κεράσια, κουνουπίδι, κραμβολάχανο, λάχανο κατσαρό, μούρα, μπρόκολο, μύρτιλλα, σπαράγγια, σταφύλια, φράουλες.
- + Ελλαγικό οξύ: βατόμουρα, κεράσια, σταφύλια, φράουλες.
- + Λυκοπένιο: ντομάτες (φρέσκες, λιαστές και επεξεργασμένα προϊόντα ντομάτας) και σε μικρότερο βαθμό γκρέιπφρουτ, καρπούζι και πιπεριές.
- + Φαινόλες: ελαιόλαδο, ελιές, εσπεριδοειδή, κακάο, κρασί, λιναρόσπορος, μπρόκολο, σκόρδο, σοκολάτα πικρή, τσάι πράσινο.
- + Συνένζυμο Q10: σαρδέλα, σκουμπρί, σόγια.
- + Πυκνογενόλη: φρούτα, λαχανικά, ξηροί καρποί, κακάο, τσάι, και κρασί.

Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους:

- + Είτε παρεμποδίζουν τη δημιουργία ΔΕΟ,
- + είτε σταματούν τη διάδοση των ελεύθερων ριζών που προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως από:

- + 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.
- + Αυξημένη παραγωγή ελεύθερων 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.

1.1.6 Οξειδωτικό στρες και διαταραχές της υγείας

Το οξειδωτικό στρες συμμετέχει σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η αθηροσκλήρυνση, νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως Parkinson και Alzheimer, ο καρκίνος και η διαδικασία της γήρανσης (Vera, D., et al., 2013). Πιο συγκεκριμένα η περίσσεια ελευθέρων ριζών μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση των κυτταρικών μεμβρανών (διακοπή της διακυτταρικής επικοινωνίας), των νουκλεϊκών οξέων (αυξημένος κίνδυνος καρκινογένεσης), των μιτοχονδρίων (αποσύζευξη ενεργειακής παραγωγής) και των πρωτεϊνών. Οι ασθένειες οι οποίες συνδέονται με τη ζημιά λόγω ελευθέρων ριζών είναι καρδιακές παθήσεις, νευρολογικές παθήσεις, αναπνευστικά προβλήματα, δερματικές παθήσεις, περιβαλλοντική ευαισθησία, φλεγμονώδης ασθένεια του εντέρου, χρόνιο σύνδρομο κόπωσης καθώς και AIDS ή παρεμφερείς ασθένειες (Poljsak, B., et al.,



Εικόνα 9: Ασθένειες προκαλούμενες από οξειδωτικό στρες.

1.1.7 Οξειδωτικό στρες και διαταραχή της υγείας των ζώων

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι στα κτηνοτροφικά ζώα το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε μία σειρά από παθολογικές καταστάσεις (σήψη, μαστίτιδα, εντερίτιδα, πνευμονία, παθήσεις των αρθρώσεων, φλεγμονή της αναπνευστικής οδού) στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και καταστάσεις που σχετίζονται άμεσα με τη ζωική παραγωγή και την ευζωία (Lykkesfeldt and Svendsen 2007). Για παράδειγμα, κοινές ασθένειες όπως, πνευμονία (Lauritzen et al., 2003), εντερίτιδα (Miller et al., 1993), πυρετός (Kataria 2012b), σήψη στους χοίρους (Basu and Eriksson 2001) και υποτροπιάζουσα απόφραξη και φλεγμονή της αναπνευστικής οδού στα άλογα (Deaton et al., 2004a, 2005), προκαλούνται από διαταραχές της αντιοξειδωτικής ομοιόστασης των ζώων. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι μαστίτιδα (Weiss et al., 2004), πανώλη (*Peste des petits ruminants*) (PPR) (Kataria A. K 2012a), πνευμονία (Wessely-Szponder et al., 2004) και μολύνσεις από παράσιτα (Celi 2010) προκαλούνται στα μηρυκαστικά λόγω οξειδωτικού στρες, ενώ πολλές έρευνες έδειξαν ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να προστατεύσει τα ζώα από τέτοιες ασθένειες ή να μειώσει τα κλινικά συμπτώματά τους (Chaiyotwittayakan et al., 2004; Bouchard et al., 1999; Hogan et al., 1992; Deaton et al., 2004b).

Έτσι, θεωρείται ότι η χορήγηση 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). Επίσης, πρόσφατες μελέτες (Jain and Flora 2012; Chan et al., 2013; Campbell et al., 2013; van der Meulen 2010) έδειξαν ότι τα πολύ νεαρά ζώα λόγω παραγόντων στρες (στρες απογαλακτισμού) έχουν μειωμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σε σύγκριση με τα ενήλικα άτομα και έτσι στα νεαρά άτομα είναι ακόμα πιο απαραίτητη η χορήγηση αντιοξειδωτικών για προστασία από ασθένειες.

1.2 Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις

Ο όρος βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις αναφέρεται σε ουσίες φυτικής προέλευσης που βρίσκονται στα τρόφιμα και έχουν ιδιότητες που τους προσδίδουν την ικανότητα να δρουν προστατευτικά σε χρόνιες παθήσεις (Bidlack et al., 2000; Meskin et al., 2002). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει

την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες έχουν αποδοθεί στις περιεχόμενες φυτοχημικές ενώσεις (Kris- Etherton et. al., 2002) (Valko et.al., 2007). Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν τις κυριότερες βιοδραστικές/ φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων και είναι εκείνες οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενέστερα για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Bidlack και συν., 2000).

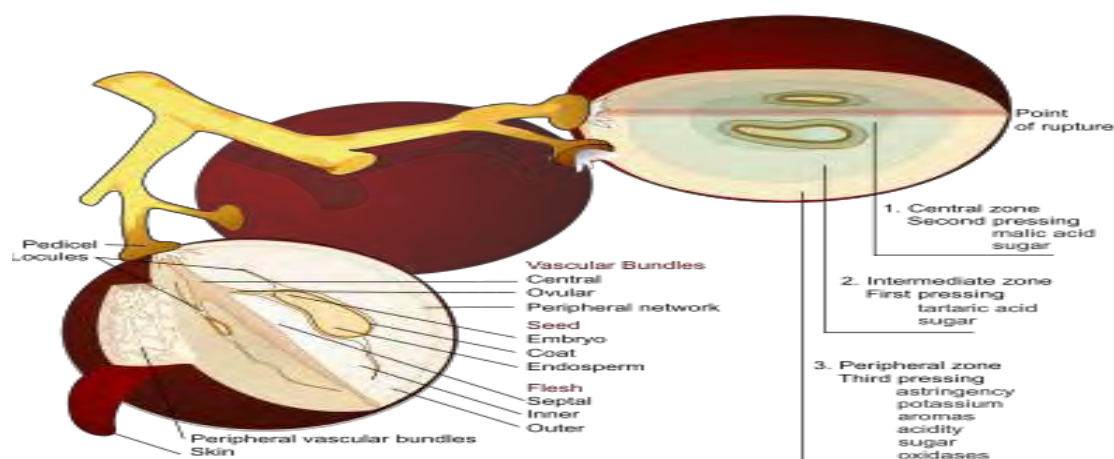
1.2.1 Βιολογικές ιδιότητες των σταφυλιών

Η άμπελος είναι ένα από τα φυτά του οποίου ο καρπός (τα σταφύλια) και το κύριο προϊόν του (το κρασί) παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Η άμπελος ανήκει στην οικογένεια *Vitaceae*, με σημαντικότερο είδος το *Vitis vinifera* από το οποίο προέρχεται και το 90% της παγκόσμιας παραγωγής σταφυλιών (Soleas et.al., 1997). Το *Vitis vinifera* πιστεύεται ότι είναι ένα από τα πρώτα φυτά που άρχισε να καλλιεργεί ο άνθρωπος και υπάρχουν ιστορικές αποδείξεις που δείχνουν ότι η συστηματική καλλιέργειά του ξεκίνησε πριν από περίπου 6.000 χρόνια (Soleas et.al., 1997). Από την αρχαιότητα ακόμα τα σταφύλια και το κρασί είχαν χρησιμοποιηθεί σε κοινωνικο-θρησκευτικές εκδηλώσεις καθώς και για θεραπευτικούς σκοπούς. Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στις βιολογικές ιδιότητες των σταφυλιών και του κρασιού κυρίως ύστερα από μία έρευνα (Renaud και de Lorgeril 1992) που πρότεινε ως εξήγηση στο λεγόμενο “γαλλικό παράδοξο” την κατανάλωση κρασιού. “Γαλλικό παράδοξο” έχει ονομαστεί η παρατήρηση ότι στη Γαλλία υπάρχουν μικρότερα ποσοστά καρδιακών παθήσεων σε σύγκριση με άλλες ανεπτυγμένες χώρες, αν και η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε λιπαρά, το κάπνισμα, η έλλειψη σωματικής άσκησης καθώς και οι τιμές άλλων δεικτών υψηλού κινδύνου για καρδιοπάθειες δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στη Γαλλία και στις άλλες χώρες. Η προστασία των σταφυλιών και του κρασιού έναντι των καρδιακών παθήσεων πιστεύεται ότι οφείλεται στην αντι-αθηρωματική δράση τους βελτιώνοντας τη λειτουργία του ενδοθηλίου (Chou et.al., 2001), αυξάνοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού και προστατεύοντας έτσι από οξειδωση τη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Day et.al., 1997), και ελαττώνοντας τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων (Keevil et.al., 2000). Επιπλέον, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μέτρια κατανάλωση κρασιού ίσως συνδέεται με προστασία από κάποιες μορφές καρκίνου (Boffetta και Garfinkel 1990; Renaud et.al., 1998) όπως ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα και του στομάχου. Οι πολυφαινόλες οι οποίες απαντώνται σε αφθονία στα εκχυλίσματα ελληνικών ποικιλιών σταφυλιού, ήταν ισχυροί αναστολείς της τοποϊσομεράσης I, (που δείχνει ότι η αναστολή αυτού του ενζύμου μπορεί να αποτελεί ένα μηχανισμό για την αντικαρκινική δράση των ενώσεων αυτών). Επιπλέον, τα εκχυλίσματα σταφυλιού ανέστειλαν τη μιτομυκίνη C (αναστέλλει τη διαίρεση του DNA με το σχηματισμό συμπλόκου με αυτό, ασκώντας έτσι αντικαρκινική δράση), γεγονός που υποδηλώνει ότι θα μπορούσαν να εμποδίζουν βλάβες από τις ROS στο DNA. Οι φυτικές πολυφαινόλες ενισχύουν τη μιτομυκίνη C που δρα ως προοξειδωτικό (Στάγκος Δημήτρης 2005). Άλλοι μηχανισμοί που έχουν προταθεί για την αντικαρκινική δράση των σταφυλιών και του κρασιού είναι η διακοπή της κυτταρικής αύξησης μέσω τροποποίησης βιοχημικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο καθώς και της δράσης διαφόρων κινασών, η επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης (Agarwal et.al., 2000β; Bagchi et.al., 2002), η αναστολή των κυκλοοξυγενασών (COX-1 και COX-2) (Waffo-Teguo et.al., 2001) και η αναστολή της αγγειογένεσης (Singh et.al., 2004). Το επίκεντρο του ενδιαφέροντος μετατοπίστηκε στη διερεύνηση της πιθανής χημειοπροστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων από σταφύλια, λόγω του υψηλού αντιοξειδωτικού περιεχομένου τους. Σε παλαιότερα πειράματα ,σε μια σειρά από in vitro και in vivo μελέτες σε διάφορες ελληνικές ποικιλίες σταφυλιών διερευνήθηκε η δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες, δηλαδή της οξειδάση της ξανθίνης (XO), της καταλάσης (CAT) και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD). Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη αντιοξειδωτικής δράση της

SOD ενώ η XO και η CAT φαίνεται ότι λειτουργούν ως προ-οξειδωτικά. Τα εκχυλίσματα φάνηκε να ασκούν προ-οξειδωτική δράση η οποία πιθανώς να εξαρτάται τόσο από τη σύνθεση όσο και από τη συγκέντρωση πολυφαινολικών συστατικών που περιέχουν (Spanou 2011). Άλλες βιολογικές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί σε εκχυλίσματα σταφυλιών αντιμικροβιακές (Weisse et.al., 1995), δράση κατά του έλκους (Saito et.al., 1998) και αντιυπερτασικές (Soares De Moura et.al., 2002).

1.2.2. Ανατομία και χημική σύσταση σταφυλιών

Το σταφύλι και πιο συγκεκριμένα ο βότρυς του σταφυλιού απαρτίζεται από το ξυλώδες μέρος, που ονομάζεται βόστρυχας ή τσαμπί και τις ράγες, που αποτελούν το εδώδιμο και οινοποιήσιμο τμήμα του σταφυλιού. Τα στέμφυλα είναι το υπόλειμμα που μένει μετά την έκθλιψη των σταφυλιών και αποτελείται από τους βοστρύχους (κοτσάνια), τα γίγαρτα (κουκούτσια) και τους φλοιούς των σταφυλιών, ενώ περικλείει και κάποιο ποσοστό γλεύκους (αζύμωτου ή εν ζυμώσει) ή κρασιού ανάλογα με το βαθμό έκθλιξης / πίεσης τους. Η επί της εκατό αναλογία των δυο αυτών μερών του σταφυλιού δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται από την ποικιλία αυτού, τις κλιματολογικές συνθήκες, το έδαφος, την ηλικία των πρεμνών, το χρόνο του τρυγητού, την προσβολή από διάφορες ασθένειες και γενικά από κάθε παράγοντα που θα επηρέαζε το μέγεθος του βότρυ. Γενικά όσο μεγαλύτερος είναι ο βότρυς, τόσο μικρότερος είναι ο βόστρυχας, σε σχέση με το σύνολο των ραγών.



Εικόνα 10 : Ανατομία και σύσταση ράγας σταφυλιού.

Αν και τα τελευταία 30-40 χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος όσον αφορά τη χημική σύσταση των σταφυλιών και του κρασιού, ωστόσο δεν είναι πλήρως γνωστή. Περισσότερες από 500 χημικές ουσίες έχουν αναγνωριστεί από τις οποίες οι 150 περίπου είναι εστέρες. Μεταξύ αυτών των ενώσεων περιλαμβάνονται το νερό (η συγκέντρωση του οποίου παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών), σάκχαρα (με κυριότερα τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη ενώ η σουκρόζη συναντάται σπανιότερα), οργανικά οξέα και διάφορες αρωματικές ενώσεις. Οι περισσότερες ενώσεις βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 10^{-1} - 10^{-6} mg/lit ενώ υπάρχουν ορισμένες σε συγκέντρωση >100 mg/lit οι οποίες καθορίζουν τη γεύση και το άρωμα των σταφυλιών. Η σημαντικότερη όμως κατηγορία χημικών ενώσεων που συναντάμε στα σταφύλια και το κρασί ιδιαίτερα όσον αφορά τη βιολογική τους δράση είναι οι φυτικές πολυφαινόλες (Jackson 1993).

1.2.3 Στέμφυλα και περιβάλλον

Τα στέμφυλα που θα χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή των ζωοτροφών παράγονται ως υποπροϊόντα κατά την διαδικασία της οινοποίησης, τα οποία είναι ρυπογόνα λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε οργανικές ενώσεις και η ανεξέλεγκτη απόρριψη τους προκαλεί τεράστια

προβλήματα στο οικοσύστημα. Συγκεκριμένα το οργανικό τους φορτίο διαθέτει σημαντική αντιμικροβιακή και φυτοτοξική δραστηριότητα, η οποία περιορίζει σημαντικά τη δράση των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη διαδικασία της βιοαποικοδόμησης με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται η βιοαποικοδόμηση και η ανεξέλεγκτη εναπόθεση των υποπροϊόντων να έχει ως επακόλουθο την εμφάνιση φαινόμενων φυτοτοξικότητας, που:

- ✚ επηρεάζει την ανάπτυξη των φυτών,
- ✚ μολύνει τον υδροφόρο ορίζοντα, υποβαθμίζοντας την ποιότητα του πόσιμου ύδατος.
- ✚ θανατώνει τους ευαίσθητους οργανισμούς των ποταμών και των θαλασσών.

Με δεδομένο λοιπόν τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι αρκετά σημαντική η επεξεργασία των υποπροϊόντων των οινοποιείων κάτι το οποίο θα οδηγήσει στην εξάλειψη προβλημάτων ρύπανσης του περιβάλλοντος, στην αξιοποίηση των προϊόντων που θα προκύψουν και την περαιτέρω χρησιμοποίησή τους, μέσω της δημιουργίας βιολειτουργικών ζωοτροφών υψηλής προστιθέμενης αξίας.

1.3 Πολυφαινόλες

1.3.1 Ετυμολογία

Το όνομα τους προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη «πολύς» και από τη λέξη φαινόλη η οποία αναφέρεται στη χημική δομή που σχηματίζεται με την προσάρτηση σε έναν αρωματικό βενζοειδή δακτύλιο μιας υδροξυλικής ομάδας (-OH) παρόμοια με εκείνη που βρέθηκε στις αλκοόλες.

1.3.2 Ιστορικό

Υπάρχουν πολλοί λόγοι για να ερευνηθεί κάποιος τις φυτικές πολυφαινόλες. Από τους βασικούς τύπους δομών τους μέχρι και τη συνεργασία τους για την περαιτέρω χημική τους μετατροπή και τη δημιουργία ολιγό-/πολυμερών συγκροτημάτων, οι φυτικές πολυφαινόλες παρουσιάζουν ένα εντυπωσιακό ευρύ φάσμα βιο-/φυσικό-χημικών ιδιοτήτων που τις καθιστά μάλλον μοναδικό και ενδιαφέρον φυσικό προϊόν. Η πρώτη ερώτηση που έρχεται στο μυαλό είναι γιατί τα φυτά επιλέγουν να βασίζονται σε τόσο μεγάλο βαθμό στην παραγωγή μεταβολιτών με πολλαπλές φαινολικές ομάδες. Η απάντηση στο ερώτημα αυτό εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο συζήτησης και πιθανότατα είναι διαφορετική ανάλογα με το είδος της πολυφαινόλης. Σε γενικές γραμμές, οι φυτικές πολυφαινόλες έχουν εμπλακεί σε διάφορους λειτουργικούς ρόλους, συμπεριλαμβανομένης και της αντίστασης των φυτών έναντι παθογόνων μικροβίων και φυτοφάγων ζώων όπως είναι τα έντομα, την προστασία έναντι της ηλιακής ακτινοβολίας (έναντι της UV ακτινοβολίας που καταστρέφει το DNA), καθώς και την αναπαραγωγή, τη διατροφή και την ανάπτυξη, ιδίως μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλους οργανισμούς πάνω και κάτω από το έδαφος (έντομα, μύκητες και συμβιωτικά βακτήρια) κατά τη διάρκεια της μακροπρόθεσμης εξέλιξης. Λόγω της υποχρεωτικής γρήγορης εποχικής προσαρμογής, τα φυτά έχουν μάθει να αντιμετωπίζουν τις μεταβαλλόμενες συνθήκες του περιβάλλοντος και τις πιέσεις επικαλούμενα το μεγάλο χημικό τους «οπλοστάσιο» μέσω του εξαιρετικά δυναμικού δευτερογενή μεταβολισμού τους.

Φυσικά ανάμεσα στις κύριες ομάδες των δευτερογενών μεταβολιτών, άλλοι, όπως τα αλκαλοειδή και τα τερπενοειδή έχουν αποδείξει τη δυνατότητα τους στην προστασία των φυτών κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τους, συμβάλλοντας στη διατήρηση της οικολογικής ισορροπίας μεταξύ των φυτών και άλλων ζωντανών οργανισμών, πολλοί εκ των οποίων τρέφονται από αυτούς, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων. Ωστόσο, οι φυτικές φαινόλες είναι ιδιαίτερα σημαντικές λόγω των λειτουργιών που προσφέρουν στα φυτά, οι οποίες είναι αποτέλεσμα των εγγενών φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων.

Αναμφισβήτητο το πιο πολυσυζητημένο χαρακτηριστικό των πολυφαινολών και γενικότερα των φαινολικών φυτών, είναι η αναγνωρισμένη ικανότητα τους να δεσμεύουν τις δραστικές ρίζες οξυγόνου

(ROS), όπως τις O_2^- , HO., NO., H_2O_2 , όπως επίσης και οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες RO και ROO. Οι φυτικές πολυφαινολικές ενώσεις μπορούν να δράουν ως αντιοξειδωτικά με χηλίωση μεταλλικών ιόντων, όπως σιδήρου, χαλκού και σιδήρου και τα ιόντα που εμπλέκονται στην μετατροπή του O_2^- και H_2O_2 στο εξαιρετικά επιθετικό HO μέσω αντιδράσεων Haber-Weiss/Fenton. Μπορούν επίσης να εμποδίσουν τη δράση ορισμένων ενζύμων υπεύθυνων για την παραγωγή του O_2 όπως και την οξειδάση της ξανθίνης και της πρωτεϊνικής κινάσης (Prof. Stéphane Quideau et.al., 2011).

1.3.3 Ορισμός

Οι πολυφαινόλες είναι χημικές ενώσεις που απαντώνται στην φύση και βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα φρούτα, στα λαχανικά, στα δημητριακά και στα ποτά. Τα φρούτα όπως τα σταφύλια, τα μήλα, τα αχλάδια, τα κεράσια και τα μούρα περιέχουν μέχρι 200-300 mg πολυφαινολών ανά 100 γραμμάρια νωπού βάρους. Τα προϊόντα που κατασκευάζονται από αυτά τα φρούτα, περιέχουν επίσης πολυφαινόλες σε σημαντικές ποσότητες.

Στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες μπορούν να συμβάλλουν στην πικρή γεύση, στη στυφότητα, στο χρώμα, στη γεύση, στην οσμή και στην οξειδωτική σταθερότητα. Δεδομένου ότι οι φαινολικές ενώσεις στη διατροφή παρουσιάζουν ισχυρές ιδιότητες απομάκρυνσης των ελεύθερων ριζών ο κύριος ρόλος τους πιστεύεται ότι είναι η ικανότητα τους ως αντιοξειδωτικά που εμπλέκονται στην προστασία και την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Ωστόσο την τελευταία δεκαετία, ο τρόπος δράσης αυτών των ενώσεων έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο περίπλοκος από ότι αρχικά αναμενόταν. Στην πραγματικότητα οι πολυφαινόλες μπορούν να ασκούν και πολλές άλλες βιολογικές επιδράσεις. Μπορούν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου και την πρόσληψη της χοληστερόλης, ρυθμίζουν διαφορετικά ένζυμα συμπεριλαμβανομένης της τελομεράσης, της κυκλοξυγενάσης και της λιποξυγενάσης, και να αλληλεπιδρούν με διάφορες οδούς της μεταγωγής σήματος. Επίσης οι πολυφαινόλες μπορούν να επηρεάσουν κασπασο-εξαρτώμενα μονοπάτια της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της ρύθμισης των αιμοπεταλίων και επίσης είναι σε θέση να αποτρέψουν ενδοθηλιακές δυσλειτουργίες (Massimo D'Archivio et.al., 2010).

1.3.4 Δομή και Τάξεις των Πολυφαινολών

Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε διάφορα φυτικά είδη. Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλανίνη, ή μια πρόδρομη ένωση, το σικιμικό οξύ. Κυρίως απαντώνται σε συζευγμένες μορφές, με ένα ή περισσότερα υπολείμματα σακχάρων που συνδέονται με υδροξυλομάδες, αν και υπάρχουν επίσης άμεσες συζεύξεις του σακχάρου (πολυσακχαρίτη ή μονοσακχαρίτη) με έναν αρωματικό άνθρακα. Συσχέτιση με άλλες ενώσεις, όπως καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες, λιπίδια και σύνδεση με άλλες φαινόλες είναι επίσης κοινή. Οι πολυφαινόλες μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές ομάδες σύμφωνα με τον αριθμό των δακτυλίων φαινόλης που περιέχουν και βάσει των δομικών στοιχείων τα οποία συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι κύριες κατηγορίες πολυφαινολών περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στυλβένια και λιγνάνες.

Οι πολυφαινόλες χωρίζονται στις εξής κατηγορίες ανάλογα με την χημική τους δομή:

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία οργανικών ενώσεων που μπορεί να υπάρχουν είτε ως μονομερή είτε πολυμερίζονται αντιδρώντας με άλλα φλαβονοειδή, με σάκχαρα, με μη φλαβονοειδή ή με συνδυασμούς αυτών των ενώσεων. Τα φλαβονοειδή είναι η καλύτερα μελετημένη κατηγορία

πολυφαινολών, περιλαμβάνει περισσότερες από 5000 ενώσεις και χωρίζεται σε 13 υποκατηγορίες. Χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου που περιέχει οξυγόνο. Τα φλαβονοειδή διακρίνονται κυρίως σε 6 κατηγορίες: τις φλαβονόλες (π.χ. κερκετίνη, ρουτίνη, καμπερόλη και μυρικετίνη), τις φλαβόνες (π.χ. απιγενίνη και λουτεολίνη), τις ισοφλαβόνες (π.χ. γενιστεΐνη και δαϊντζεΐνη), τις φλαβανόνες (π.χ. ναριγενίνη και εσπεριτίνη), τις ανθοκυανιδίνες (π.χ. κυανιδίνη, δελφινιδίνη και μαλβιδίνη) και τις φλαβανόλες (π.χ. κατεχίνη, επικατεχίνη και γαλλοκατεχίνη). 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. Τα φλαβονοειδή φαίνεται να συμβάλλουν στη χαμηλή συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, γεγονός που προέκυψε με αφορμή το γαλλικό παράδοξο (υψηλή κατανάλωση κόκκινου κρασιού, κάπνισμα, μειωμένη φυσική δραστηριότητα, υψηλή κατανάλωση λιπαρών και παραδόξως ο πληθυσμός είχε μικρά ποσοστά εμφάνισης καρδιαγγειακών).

Επίσης, τα φλαβονοειδή μπορεί να αντιδρούν 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).

Εν τούτοις, τα φλαβονοειδή δεν είναι αμιγώς αντιοξειδωτικές ενώσεις αλλά 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 ήπια αύξηση του οξειδωτικού στρες θα ενεργοποιήσει ταυτόχρονα και την αύξηση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού (D. Procházková a 2011).

Φλαβανόλες

Χαρακτηριστικό παράδειγμα φλαβανολών είναι οι κατεχίνες (μονομερή) και οι προκυανιδίνες (πολυμερή), βρίσκονται σε πολλά φρούτα (π.χ. βερύκοκα και σταφύλια) και στο κρασί αλλά οι σημαντικότερες πηγές είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα. Μάλιστα, κατά τη ζύμωση του πράσινου τσαγιού παράγονται πολύπλοκες πολυφαινόλες όπως είναι οι ταννίνες. Κύρια πηγή των φλαβανολών αποτελούν τα εσπεριδοειδή που περιέχουν την εσπεριδίνη. Στην ίδια κατηγορία πολυφαινολών συναντούμε τη ναριγενίνη και τη ταξιφολίνη.

Φλαβόνες

Οι φλαβόνες απαντώνται στο σέλινο (λουτεολίνη) καθώς επίσης και στο κόκκινο γλυκό πιπέρι (απιγενίνη). Ακόμα, στο μαϊντανό, στα δημητριακά (κυρίως σε γλυκοσυλιωμένη μορφή) και στα εσπεριδοειδή (κυρίως σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Shahidi and Naczk 1995).

Φλαβονόλες

Η κυριότερη φλαβονόλη είναι η κερκετίνη, κατατάσσονται επίσης, η καμπερόλη, μυρικετίνη, και η φισετίνη. Οι φλαβονόλες βρίσκονται στις περισσότερες φυτικές τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο και οι σημαντικότερες πηγές τους είναι τα κρεμμύδια, τα πράσσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κρασί και το τσάι (Manach et al., 2004).

Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες βρίσκονται στις τομάτες, σε αρωματικά φυτά όπως η μέντα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή (Tomas-Barberan and Clifford 2000).

Ισοφλαβόνες

Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται στη σόγια και αντιπροσωπεύονται από τη γενιστεΐνη και τη δαϊντζεΐνη. Η δομή τους είναι παρόμοια με εκείνη των οιστρογόνων. Οι ισοφλαβόνες υποστηρίζεται ότι ασκούν μια καρδιοπροστατευτική δράση. Επίσης συμβάλλουν και στη βελτίωση λειτουργίας του ενδοθηλίου. Όμως αυτή η θεωρία απορρέει από περιορισμένες μελέτες. Η πιθανή ευεργετική επίδραση των ισοφλαβονών στον ανθρώπινο οργανισμό δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Εκτός αυτού, έχει την ικανότητα να μειώνει την ενδοθηλιακή σύνθεση και δράση του μονοξειδίου του αζώτου (NO*) (Wendy L. Halli 2005).

Ανθοκυανιδίνες

Στις ανθοκυανιδίνες οφείλεται το κόκκινο και το μπλε χρώμα πολλών φρούτων και λαχανικών (κόκκινο λάχανο, μελιτζάνες, κόκκινα κρεμμύδια, φράουλες) (Clifford 2000). Οι προ-ανθοκυανιδίνες φαίνεται να μειώνουν στον ορό του αίματος, τα επίπεδα της γλυκόζης, της γλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης καθώς και της ουρίας. Επίσης, συμβάλλουν στην καταστολή της παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου ενώ παράλληλα αυξάνουν το λόγο GSH/GSSG. Επιπλέον, επιδρούν στην υπερλιπιδαιμία, μειώνοντας σημαντικά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, της ολικής χοληστερόλης και των μη απαραίτητων λιπαρών οξέων. Οι προανθοκυανιδίνες (και συγκεκριμένα τα oligομερή αυτών) ασκούν προστατευτική δράση έναντι της υπεργλυκαιμίας και της υπερλιπιδαιμίας που παρουσιάζουν οι διαβητικοί ασθενείς (και του διαβήτη τύπου I και τύπου II) και λειτουργούν ως ρυθμιστές σε φλεγμονώδεις καταστάσεις που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Takako Yokozama 2012).

Φαινολικά Οξέα

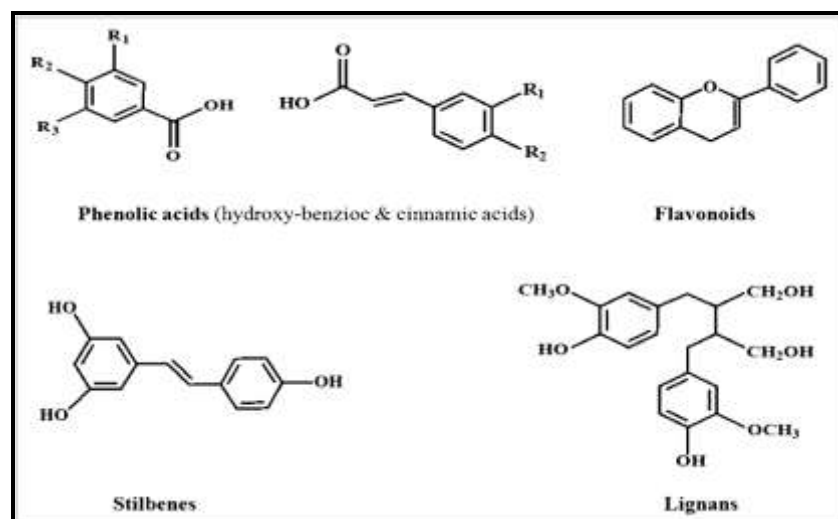
Η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή αποτελούν τα πολυφαινολικά οξέα, τα οποία είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκινναμικού οξέος. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ) βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που μπορούν να καταναλωθούν από τον άνθρωπο με 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 φερουλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Συνήθως τα υδροξυκινναμικά οξέα γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουινικό οξύ, το σικιμικό οξύ και το ταρταρικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ και το κουινικό οξύ σχηματίζουν το χλωρογενικό οξύ που συναντάται σε πολλά φρούτα καθώς και στον καφέ (Clifford 1999). Το καφεϊκό οξύ, γενικά, είναι το πιο κοινό πολυφαινολικό οξύ και αντιπροσωπεύει το 75-100% των συνολικών υδροξυκινναμικών οξέων που υπάρχουν στα περισσότερα φυτά. Το φερουλικό οξύ είναι το πιο άφθονο πολυφαινολικό οξύ των δημητριακών σπόρων, που αποτελούν και την κύρια πηγή πρόσληψής του από τον άνθρωπο (Lempereur et al., 1997).

Στιλβένια

Στην κατηγορία των στιλβενίων αντιπροσωπευτική χημική ένωση είναι η ρεσβερατρόλη. Είναι λιγότερο διαδεδομένη στη διατροφή σε σχέση με άλλες πολυφαινόλες. Βρίσκεται γενικά στο κρασί και ειδικά δε στο κόκκινο. Έρευνες έχουν δείξει την αντιοξειδωτική της δράση, κυρίως όσον αφορά τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Παπαγεωργίου 2005). Τα στιλβένια (π.χ. ρεσβερατρόλη, αστρινγίνη, πικεΐδη) αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των πολυφαινόλων που προσλαμβάνονται μέσω της διαίτας. Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου και βρίσκεται κυρίως στα σταφύλια και το κρασί (Bertelli et al., 1998). Είναι μια από τις καλύτερα μελετημένες πολυφαινόλες γιατί έχει παρουσιάσει σημαντική αντικαρκινική δράση. Η ρεσβερατρόλη στα σταφύλια βρίσκεται είτε ως μονομερές είτε πολυμερίζεται σχηματίζοντας τις βινιφερίνες (Soleas et al., 1997).

Λιγνάες

Οι λιγνάες σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες, το λινέλαιο και το λιναρόσπορο. Η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ δημητριακά, φρούτα και λαχανικά περιέχουν μικρές ποσότητες λιγνάνων (Adlercreutz and Mazur 1997). Η διαφορετικότητα τους έγκειται στο υδροξυλικό τους πρότυπο και μπορεί να είναι γλυκοσυλιωμένες ή/και ακετυλιωμένες. Το μέγεθος τους ποικίλει από μικρά μόρια (όπως η φαινόλη), έως πολυμερή (όπως οι ταννίνες) μεγάλου μοριακού βάρους (Perez-Jimenez et al., 2010)



Εικόνα 11: Χημικές Δομές Διαφορετικών Πολυφαινολικών Τάξεων.

1.3.5 Φυσικές Ιδιότητες.

Οι πολυφαινόλες είναι συνήθως μόρια μικρού μοριακού βάρους και βρίσκονται σε υγρή μορφή ή σε στερεή με χαμηλό σημείο τήξεως. Λόγω των δεσμών υδρογόνου, οι φαινόλες μικρού μοριακού βάρους, είναι υδατοδιαλυτές. Τείνουν να έχουν υψηλότερα σημεία βρασμού από τις αλκοόλες ίδιου μοριακού βάρους, λόγω του ισχυρότερου δεσμού υδρογόνου που έχουν.

1.3.6 Χημειοπροστατευτική Δράση Πολυφαινόλων.

Από την αρχαιότητα ακόμη, σε πολιτισμούς όπως ο Ελληνικός, ο Αιγυπτιακός, ο Ρωμαϊκός, ο Κινέζικος και ο Ινδικός, ήταν γνωστές οι δράσεις κάποιων φυτών για την αντιμετώπιση διαφόρων

ασθενειών (Klein et al., 2011; Chang et al.; 2012, Wells et al., 2008). Εκατοντάδες χρόνια μετά, πληθώρα ερευνών αποδεικνύει μέρα με τη μέρα πως βιοδραστικά συστατικά των τροφών μπορούν να επηρεάσουν όλες τις καρκινικές διαδικασίες σε όλα τα στάδια του καρκίνου (Kushi et al., 2011; Lee et al., 2005; Kloetzel et al. 2013; Bidinotto et al., 2012; Chang et al., 2012; Arcidiacono et al., 2012; Pauwels, 2010; La Vecchia, 2004; La Vecchia, 2009).

Η χημειοπροστασία ως όρος χρησιμοποιήθηκε πριν 35 χρόνια από τον Lee Wattenberg και είναι η χρήση φυσικών ή συνθετικών ουσιών για την πρόληψη ασθενειών και μολύνσεων (Kushi et al., 2011; Kiani et al., 2005; Lee et al., 2005; Klein et al., 2011; Baliga et al., 2011; Brownell and Warner, 2009; Wang et al., 2012).

Η χημειοπροστατευτική δράση των φυτικών τροφών οφείλεται στα φυτοχημικά τους συστατικά, τα οποία είναι μη θρεπτικά συστατικά που έχουν σημαντική βιολογική δράση, όπως η ρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης, η ενίσχυση του ανοσοποιητικού, η γονιδιακή ρύθμιση, η κυτταρική διαφοροποίηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση (Karpı et al., 2012) και δρουν ως αντιοξειδωτικά, ενώ θεωρούνται φυτοοιστρογόνα, γιατί έχουν παρόμοια δράση με τις ορμόνες. Παίζουν ρόλο στον καθορισμό της γεύσης, του αρώματος, των χρωμάτων και άλλων χαρακτηριστικών των φυτικών τροφών. Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες μελέτες αποδεικνύουν πως μόνο ένα συστατικό της τροφής δε φτάνει για να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, αλλά είναι ο συνδυασμός των συστατικών που βρίσκονται σε όλη την υγιεινή διατροφή που εμφανίζουν αυτή την ικανότητα (Banerjee et al., 2006, Baliga et al., 2011; Alexander and Cushing, 2009; Kumar et al., 2012; Cristensen et al., 2012; Kontou et al., 2012; Giacosa et al., 2012).

Επίσης, οι πολυφαινόλες παίζουν σημαντικό ρόλο και στα φυτά καθώς μπορεί να έχουν αρκετές επιπτώσεις στους φυτικούς ιστούς όπως είναι η καταστολή αυξητικών ορμονών, η προστασία από την UV ακτινοβολία, η προσθήκη χρώματος, η πρόληψη μικροβιακών μολύνσεων και η συμμετοχή σε διαδικασίες ανάπτυξης (Huber., B., et al., 2003), είναι υπεύθυνες επίσης για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών (Manach C. et al. 2004), συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών προσελκύοντας τα έντομα επικονιαστές και στη διασπορά των σπερμάτων μετά την κατανάλωση των καρπών από τα ζώα. Επιπλέον, λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων, ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα που είναι τοξικά για τα φυτά και ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων ενώ εμπλέκονται στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του καθορισμού του φύλου και της φωτοσύνθεσης (Manach et.al., 2004; Di Carlo et.al., 1999; Harborne 1986).. Επιπλέον, σε ορισμένα είδη φυτών οι πολυφαινόλες μπορούν να παρέχουν προφύλαξη έναντι της σήψης (John Hart., H., et al., 1974).

1.3.7 Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία.

Στην περίπτωση των καρδιαγγειακών διαταραχών, το οξειδωτικό στρες και οι ΔΜΟ εμπλέκονται σε ενδοθηλιακές βλάβες, σε δημιουργία αρτηριοσκλήρυνσης και σε παρατεταμένη ζημιά η οποία μπορεί να οδηγήσει σε έμφραγμα του μυοκαρδίου, καθώς και σε ισχαιμική επανέγχυση.

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει τη σημασία των φυσικών διατροφικών πολυφαινολών στη βελτίωση της καρδιαγγειακής υγείας και έχει τονιστεί ο σημαντικός ρόλος που παίζουν αυτές οι ουσίες στον περιορισμό των επιπτώσεων της κυτταρικής γήρανσης. Πολυφαινόλες όπως η ρεσβερατρόλη, επιγαλλοκατεχίνη (EGCG) και η κουρκουμίνη έχουν αναγνωριστεί και έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην καρδιαγγειακή υγεία, ενώ ορισμένες έχουν επίσης δείξει ότι είναι προστατευτικές ενάντια στη γήρανση (Sandhya, K., et al., 2013).

Η προστατευτική δράση των πολυφαινολών αποδίδεται στην αντιοξειδωτική τους δράση ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών ή ως αναστολείς των αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων. Οι φαινολικές

τους ομάδες δρουν σαν ισχυροί δέκτες ηλεκτρονίων, σχηματίζοντας σταθερές φαινοξυλικές ρίζες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες που έρχονται σε επαφή μαζί τους να δίνουν το ηλεκτρόνιο τους και να αδρανοποιούνται. Η φαινολική ρίζα που παράγεται είναι σταθερή και έχει την ικανότητα να μετατοπίζει το ηλεκτρόνιο έτσι ώστε να μην είναι δραστικό. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις, γεγονός το οποίο προσαυξάνει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών. Η ρίζα αυτή μπορεί επιπλέον να αδρανοποιήσει και την αρχική ρίζα η οποία οδήγησε στην παραγωγή της οδηγώντας στη δημιουργία ενός μη δραστικού μορίου (Ferguson et al., 2001).

1.4 Γενικές πληροφορίες για τα πρόβατα

Το οικόσιτο πρόβατο (*Ovis aries* - Πρόβατον ο κριός), το πιο κοινό μέλος της οικογένειας των προβάτων (Πρόβατον - *Ovis*), είναι ένα μηρυκαστικό, τετράποδο ζώο, που πιθανότατα κατάγεται από τα άγρια πρόβατα mouflon της Νότιας και Νοτιοδυτικής Ασίας. Για την εξημέρωση των προβάτων υπάρχουν τεκμήρια στο Ιράκ που χρονολογούνται από το 9.000 π.Χ. Τα πρόβατα συνδέθηκαν με πολλούς πολιτισμούς, κυρίως στη Βρετανία και τη Μεσόγειο, όπου αποτελούν το πιο κοινό αντικείμενο της κτηνοτροφίας. Έχουν μεγάλη οικονομική σημασία, καθώς η απόδοση εισοδήματος που προσφέρουν σε σχέση με το κόστος της εκτροφής τους είναι γύρω στο 40%. Ο παγκόσμιος πληθυσμός των προβάτων υπολογίζεται γύρω στο ένα δισεκατομμύριο.

Συστηματική ταξινόμηση

Βασίλειο	Ζώα (<i>Animalia</i>)
Συνομοταξία	Χορδωτά (<i>Chordata</i>)
Ομοταξία	Θηλαστικά (<i>Mammalia</i>)
Τάξη	Αρτιοδάκτυλα (<i>Artiodactyla</i>)
Οικογένεια	Βοοειδή (<i>Bovidae</i>)
Υποοικογένεια	Αιγώδη (<i>Caprinae</i>)
Γένος	Πρόβατον (<i>Ovis</i>)
Είδος	<i>O. aries</i>

Πίνακας 1: : Συστηματική ταξινόμηση προβάτων.

1.4.1 Χαρακτηριστικά

Ανάλογα με την ηλικία και το φύλο τους, ονομάζονται αρνιά μέχρι δυο μηνών, ζυγούρια μέχρι ενός έτους, κριάρια τα ώριμα αρσενικά και προβατίνες τα θηλυκά. Έχουν μέτριο σώμα που καλύπτεται από πυκνό τρίχωμα, απαλό στην αφή, σγουρό ή ίσιο, μακρύ ή κοντό, λευκό, μαύρο, καστανό ή γκριζό. Ζουν 10 έως 14 χρόνια, ανάλογα με τις συνθήκες διαβίωσής τους. Τρέφονται με νωπά χόρτα, τα οποία καταπίνουν σχεδόν αμάσητα, ώστε να εξασφαλιστούν κατά τη διάρκεια της ημερήσιας βοσκής οι μεγάλες ποσότητες που απαιτούνται - αργότερα όταν αναπαύονται, η τροφή επανέρχεται στο στόμα και αναμασάται.

1.4.2 Εγκυμοσύνη

Τα πρόβατα θεωρούνται πολυγαμικά ζώα. Έτσι, στο κοπάδι, σε κάθε κριάρι πρέπει να αντιστοιχούν γύρω στις 30-50 προβατίνες. Η εγκυμοσύνη διαρκεί κατά μέσο όρο 150 μέρες. Ο πρώτος τοκετός γίνεται σε ηλικία 14-17 μηνών ή 2 ετών. Τα θηλυκά γεννούν 1-2 ή σπανιότερα 3-4 μικρά, ύστερα από κύηση 5 μηνών. Οι προβατίνες γεννούν μόνο μια φορά τον χρόνο, αν και βιολογικά έχουν τη δυνατότητα να γεννούν κάθε 6-7 μήνες. Αξίζει να αναφερθεί ότι κάθε προβατίνα αναγνωρίζει το δικό της μικρό,

ανάμεσα σε πλήθος άλλων, βάσει της μυρωδιάς των μικρών της. Τα πρόβατα ενηλικιώνονται σε 2 χρόνια αν είναι αρσενικά, και σε ένα χρόνο αν είναι θηλυκά.

1.4.3 Χιώτικο πρόβατο

Το Χιώτικο πρόβατο προήλθε από το ομώνυμο νησί της Χίου, στην περιοχή του Βορειοανατολικού Αιγαίου. Αποτελεί διασταύρωση ομοιόμαλλου λεπτόουρου ελληνικού πρόβατου με παχύουρο αναμικόμαλλου μικρασιάτικου πρόβατου. Τελικά, κατατάσσεται στα ομοιόμαλλα παχύουρα πρόβατα. Λέγεται ότι παλαιότερα κτηνοτρόφοι της νήσου Χίου και της Ανατολίας, περιοχής της Μικράς Ασίας προχώρησαν σε προσμίξεις μεταξύ των ντόπιων φυλών και των φυλών Kivircik και Daglic. Το Χιώτικο πρόβατο είναι σχετικά μεγαλόσωμο με σωματικό βάρος προβατίνων 45-65 κιλά (105-155 λίβρες) και κριαριών 65-85 κιλά (145-200 λίβρες). Θεωρείται η καλύτερη ελληνική φυλή λόγω της υψηλής γαλακτοπαραγωγής και αμνοπαραγωγής. Ο χρωματισμός του είναι λευκός με χαρακτηριστικές κηλίδες μαύρου χρώματος στο κεφάλι γύρω από τα αυτιά, τα μάτια, στην κοιλιά και στα πόδια. Τα αρσενικά διαθέτουν κέρατα με μεγάλη σπείρα ενώ τα θηλυκά, όταν έχουν κέρατα, είναι μικρά σαν ένα εξόγκωμα. Το Χιώτικο πρόβατο έχει χρησιμοποιηθεί σε ευρεία κλίμακα για τη γενετική βελτίωση άλλων ελληνικών και ξένων φυλών με πολύ καλά αποτελέσματα ως προς την αύξηση της γαλακτοπαραγωγής και αμνοπαραγωγής.

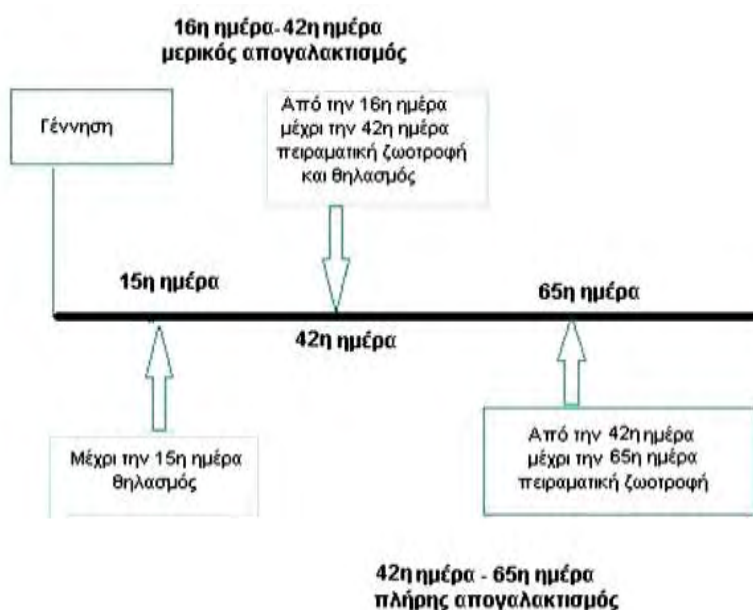
1.5 Σκοπός

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να προσδιοριστεί η επίδραση εκχυλισμάτων στέμφυλων, στους δείκτες οξειδωτικού στρες (GSH, CAT, TBARS, TAC, CARBONYLS) σε αίμα και ιστό σπλήνας νεαρών προβάτων. Για το σκοπό αυτό εκτράφηκαν 28 πρόβατα της Ελληνικής φυλής Χιώτικα, τα οποία, τράφηκαν για 65 ημέρες με ζωοτροφή εμπλουτισμένη με στέμφυλα. Έγιναν συνολικά τρεις ιστοληψίες και αιμοληψίες, στις 15 ημέρες όπου τα ζώα τρεφόντουσαν αποκλειστικά με το γάλα της μητέρας τους, στις 42 ημέρες όπου τα μισά πρόβατα λάμβαναν πολυφαινολικό σιτηρέσιο και γάλα, και τα άλλα μισά κανονικό σιτηρέσιο και γάλα και στις 65 ημέρες όπου οι δύο ομάδες τρεφόντουσαν αποκλειστικά με ζωοτροφή (control και πολυφαινολικό σιτηρέσιο).

2.Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Γενικά

Για την παρούσα εργασία εκτράφηκαν 28 πρόβατα. Η εκτροφή των προβάτων πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Επιστήμης και Ζωικής Παραγωγής των Γιαννιτσών. Κατά τον μήνα Δεκέμβριο γεννήθηκαν 28 αρνιά Ελληνικής φυλής «Χιώτικης» τα οποία μετά το πέρας των 15 ημερών από την γέννησή τους χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες (Α, Β ομάδα, 12 αρνιά ανά ομάδα) η οποίες λάμβαναν τις πειραματικές ζωοτροφές. Κανονικό σιτηρέσιο (ομάδα Α, ελέγχου), σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με ενσίρωμα καλαμποκιού-στεμφύλων (ομάδα Β). Η εκτροφή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το παρακάτω πειραματικό πλάνο.



Εικόνα 12 :Πειραματικό πλάνο εκτροφής – απογαλακτισμού των αναπτυσσόμενων αρνιών

Μετά το πέρας των 15 ημερών από την γέννηση, τα αρνιά βρίσκονταν με τις μητέρες τους. Στο διάστημα 15-42 ημερών τα αρνιά θήλαζαν και ταυτόχρονα έτρωγαν τις πειραματικές ζωοτροφές. Μια ώρα το πρωί και μια ώρα το απόγευμα τα αρνιά απομακρύνονταν από τις μητέρες τους, με σκοπό να τραφούν οι μητέρες. Τις υπόλοιπες ώρες της ημέρας όπως προαναφέρθηκε τα αρνιά θήλαζαν και τρέφονταν με τις πειραματικές ζωοτροφές οι οποίες είχαν τοποθετηθεί σε ειδικές ταΐστρες όπου παραβρίσκονταν στο διπλανό χώρο, ο οποίος ήταν ξεχωριστός και τα αρνιά εισέρχονταν μέσω μιας μικρής πόρτας. Παράλληλα με τις πειραματικές ζωοτροφές και τον θηλασμό τα αρνιά τρέφονταν με μηδική (τριφύλλι). Στο διάστημα μεταξύ των 42 και 65 ημερών, στο οποίο ολοκληρώθηκε ο πειραματισμός, απομακρύνθηκαν οι μητέρες και τα αρνιά τρέφονταν αποκλειστικά με τις πειραματικές ζωοτροφές καθώς και με μηδική τροφή.

2.2. Περιγραφή του σιτηρεσίου

2.2.1 Παρασκευή βιολειτουργικών ζωοτροφών

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η διατροφή σήμερα αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στη ζωική παραγωγή καθώς δεν επηρεάζει μόνο την υγεία και την παραγωγικότητα των αγροτικών ζώων, αλλά και το κόστος παραγωγής των παραγόμενων κτηνοτροφικών προϊόντων. Γενικά, 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. Η ορθή επιλογή και κατάρτιση των ζωοτροφών απαιτεί την ακριβή γνώση της θρεπτικής τους αξίας, ώστε να καλύπτουν επαρκώς τις διατροφικές ανάγκες των ζώων, συμπεριλαμβανομένου το κόστος παραγωγής. Αυτό ουσιαστικά προϋποθέτει τον ακριβή καθορισμό των αναγκών των ζώων σε ενέργεια και θρεπτικά συστατικά αλλά και την ακριβή γνώση της θρεπτικής αξίας των ζωοτροφών. 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 καθώς επίσης ενσωματώθηκαν, ως πρόσθετες ύλες, βιοδραστικά συστατικά φυτικής προέλευσης με αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική δράση. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή τα συγκεκριμένα βιοδραστικά συστατικά, δηλαδή οι πολυφαινόλες που εμπεριέχονται στο εκχύλισμα στεμφύλων έχουν μεγάλη ποικιλία ευεργετικών και θεραπευτικών ωφελειών. Η διατροφή των προβάτων με τις συγκεκριμένες βιολειτουργικές ζωοτροφές αναμένουμε να βοηθήσει σημαντικά ειδικότερα στην ηλικία απογαλακτισμού όπου τα νεαρά ζώα είναι επιρρεπή σε ασθένειες λόγω της μειωμένης αντιοξειδωτικής τους άμυνας και εξαιτίας του στρες απογαλακτισμού.

2.2.2 Παρασκευή βιολειτουργικών ζωοτροφών για τα πρόβατα (Ελληνικής φυλής, «Χιώτικα»).

Παρασκευάστηκαν 2 είδη σιτηρεσίων. Κανονικό σιτηρέσιο (χορήγηση σε ομάδα Α, ελέγχου-control) και σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με ενσίρωμα στεμφύλων (χορήγηση σε ομάδα Β). Ομάδα (Β): καλαμπόκι (ενσιρωμένο με εκχύλισμα στεμφύλων), γάλα φυράματος, σογιάλευρο, πίτυρα, ισορροπιστής αρνιών, μονοφωσφορικό ασβέστιο, μαρμαρόσκονη, άλας.

Πίνακας 2: Σύσταση παρασκευασμένων Πίνακας 3 :Σύσταση παρασκευασμένων σιτηρεσίων, σιτηρεσίων, ομάδα στεμφύλων. ομάδα control.

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

2.2.3 Παρασκευή ενσιρώματος στεμφύλων

Το ενσίρωμα στεμφύλων παρασκευάστηκε πριν την δημιουργία των ζωοτροφών και η σύστασή του αποτελείται από: καλαμπόκι (άλευρο), στέμφυλα (ποικιλία μοσχάτο - κόκκινο) και νερό. Η αναλογία των συστατικών ήταν τέτοια έτσι ώστε στο τελικό ενσίρωμα να έχουμε ποσοστό 60% στερεών και έτσι γι' αυτόν τον σκοπό πριν την ανάμιξη συνυπολογίστηκαν τα ποσοστά υγρασίας του καλαμποκιού και των στεμφύλων. Κατά την παρασκευή του ενσιρώματος προστέθηκαν και βακτήρια (*Lactobacillus*) τα οποία σε αναερόβιες συνθήκες προκαλούν ζύμωση.

Το ενσιρωμένο καλαμπόκι περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας, οργανικά οξέα, όπως γαλακτικό οξύ και χορηγείται στα ζώα σαν χονδροειδής ζωοτροφή. 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. Κατά την ενσίρωση δημιουργούνται όξινες συνθήκες που εξασφαλίζουν την διατήρηση της υγρασίας και της γεύσης τους.

Μετά την ανάμειξη των συστατικών το ενσίρωμα τοποθετήθηκε σε σακούλες κενού αέρος και παρακολούθηθηκε η διαδικασία της ζύμωσης. 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 που εκτελέστηκε τέσσερις (4) φορές, είναι απαραίτητη λόγω του ότι παράγεται διοξείδιο του άνθρακα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης που πραγματοποιούν τα βακτήρια, με αποτέλεσμα αν δεν αφαιρεθεί ο αέρας οι σακούλες να ανοίξουν και να έρθουν σε επαφή με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Λόγω του ότι η αντίδραση που πραγματοποιείται για την ενσίρωση του καλαμποκιού απαιτεί αναερόβιες συνθήκες, η επαφή του ενσιρώματος με τον ατμοσφαιρικό αέρα θα έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της αντίδρασης.

Κατά την διάρκεια της παραπάνω διαδικασίας λαμβάνονταν δείγματα έτσι ώστε να γίνεται ο έλεγχος του pH του ενσιρώματος. Το pH το οποίο πρέπει να έχει το τελικό ενσίρωμα πρέπει να είναι μικρότερο του 4,1. Επίσης το τελικό προϊόν της ενσίρωσης έχει πιο σκούρο χρώμα από το αρχικό και τα βακτήρια σταματούν την αντίδραση με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται ύπαρξη διοξειδίου του άνθρακα μέσα στην σακούλα που βρίσκεται το τελικό προϊόν.

Η μέτρηση του pH έγινε με 2 μεθόδους. Στην πρώτη μέθοδο γίνεται αραιώση 1/10 του ενσιρώματος. Δηλαδή σε 1 γραμμάριο ενσιρώματος προστίθενται 9 ml απεσταγμένου νερού. Το μίγμα αναδεύεται έντονα σε vortex για τουλάχιστον 20 λεπτά. Τέλος μετρήθηκε το pH το οποίο ήταν 3,82. Με την δεύτερη μέθοδο γίνεται αραιώση 1/2 του ενσιρώματος. Δηλαδή σε 5 γραμμάρια ενσιρώματος προστίθενται 5 ml απεσταγμένου νερού. Έπειτα ακολουθεί έντονη ανάδευση σε vortex για τουλάχιστον 20 λεπτά και τέλος μετρήθηκε το pH. Το pH του ενσιρώματος με την δεύτερη μέθοδο ήταν 3,80. Όπως φαίνεται και οι δύο μέθοδοι έδωσαν παρόμοιες τιμές pH και συνεπώς η διαδικασία της γαλακτικής ζύμωσης στο ενσίρωμα είχε ολοκληρωθεί και ήταν πλέον έτοιμο για να προστεθεί στο σιτηρέσιο.



Εικόνα 13 :Συσκευασία πακεταρίσματος σιτηρεσίων

2.2.4 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης (in vitro) των ζωοτροφών.

Η αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των πειραματικών ζωοτροφών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις εξής μεθόδους:

I. Προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH

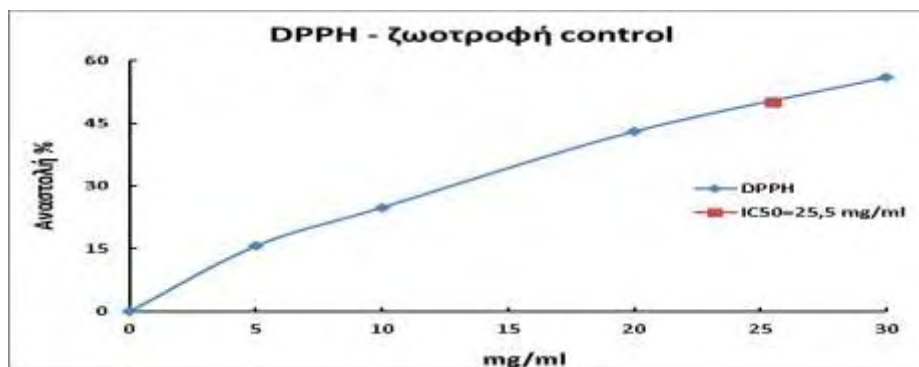
Η μέθοδος του DPPH βασίζεται στη χρήση της ρίζας του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία μιας αντιοξειδωτικής ένωσης που λειτουργεί ως δότης ιόντων υδρογόνου, η παραπάνω ρίζα (DPPH[•]) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm (Apostolou et al., 2013).

II. Προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS

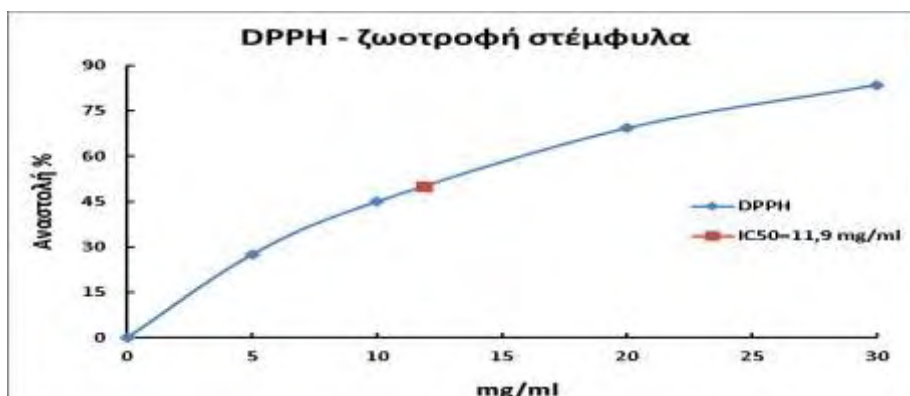
Η μέθοδος του ABTS βασίζεται στη χρήση του ενζύμου horseradish peroxidase κατά την οποία η ένωση του ABTS μετατρέπεται στη ρίζα ABTS^{•+}. Η προσθήκη μιας αντιοξειδωτικής ουσίας στο διάλυμα της ρίζας ABTS^{•+} έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή της ρίζας με τη μεταφορά ιόντων υδρογόνου. Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 730 nm (Apostolou et al., 2013).

Μέσω των παραπάνω μεθόδων προσδιορίζεται η τιμή IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών η οποία εξουδετερώνει την ρίζα (DPPH, ABTS) κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση της ουσίας. Έτσι υπολογίζοντας το IC₅₀ των ζωοτροφών μπορούμε να εκτιμήσουμε την δραστηριότητα και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

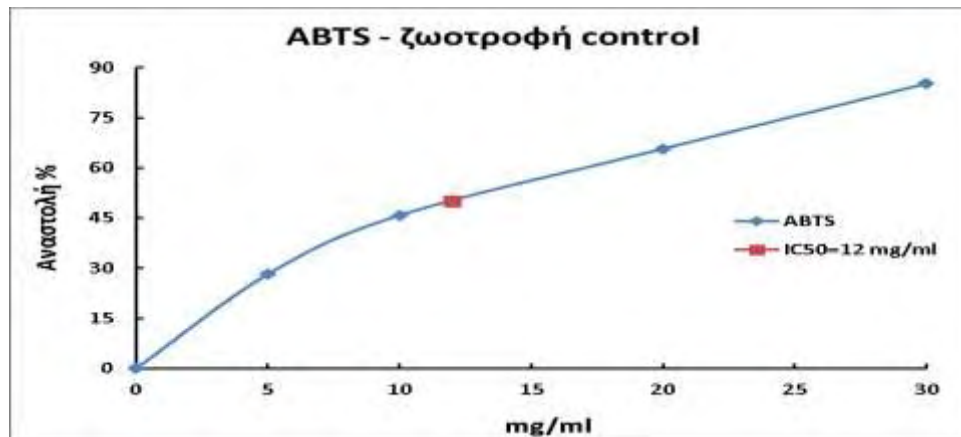
2.2.5 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των παρασκευασμένων ζωοτροφών για τα πρόβατα



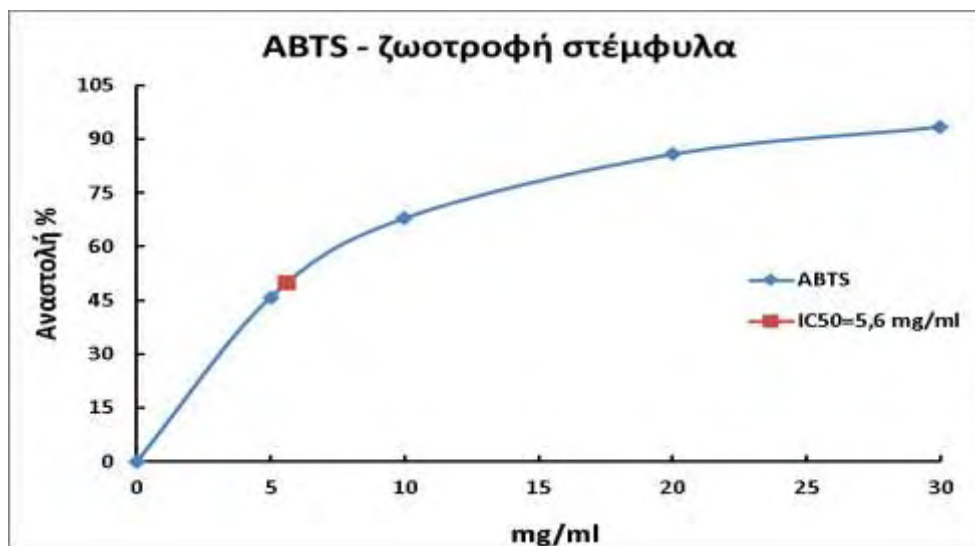
Διάγραμμα 1: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση τη ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.



Διάγραμμα 2: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με στέμφυλα



Διάγραμμα 3 : Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.



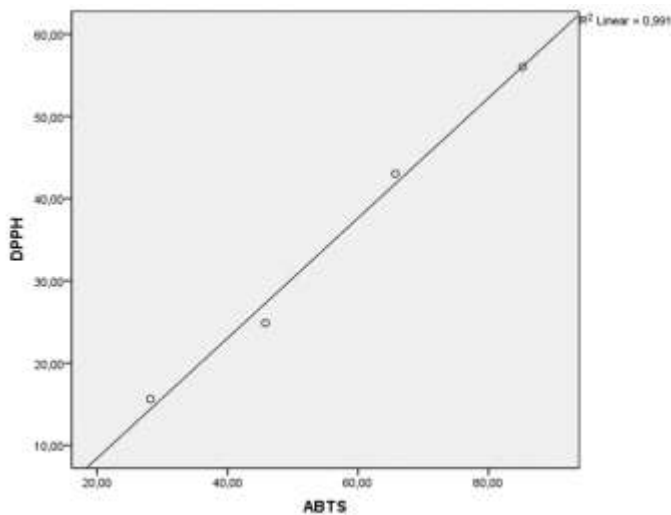
Διάγραμμα 4 : Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με στέμφυλα.

Από τις γραφικές παραστάσεις παρατηρείται ότι με την μέθοδο της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH, η ζωοτροφή εμπλουτισμένη με τα υποπροϊόντα οινοποιίας (στέμφυλα) (IC₅₀= 11,9 mg/ml) παρουσιάζει διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου (IC₅₀= 25,5 mg/ml) Με την μέθοδο της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS, οι τιμές IC₅₀ είναι πιο χαμηλές (IC₅₀=12 mg/ml και IC₅₀=5,6 mg/ml), κάτι που οφείλεται στο ότι τα βιοδραστικά συστατικά των ζωοτροφών εξουδετερώνουν με διαφορετικό τρόπο την ρίζα του ABTS σε σχέση με εκείνη του DPPH. Ωστόσο, και στη μέθοδο του ABTS η δραστηριότητα της ζωοτροφής που είναι εμπλουτισμένη με τα στέμφυλα είναι περίπου διπλάσια σε σχέση με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου.

2.2.6. Συσχέτιση των δύο μεθόδων κατά Spearman

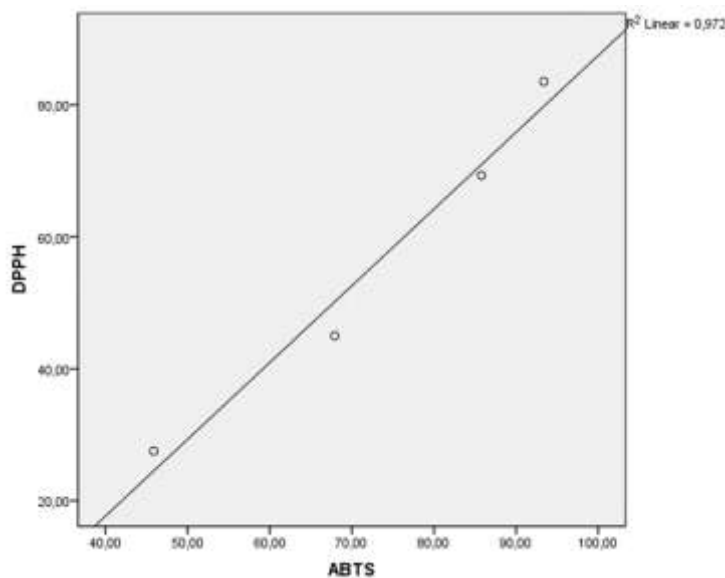
Για τον υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα στατιστικής SPSS18. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης.

Ζωοτροφή ομάδας ελέγχου (control)



Διάγραμμα 5: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση των τιμών IC₅₀ της μεθόδου DPPH με τη μέθοδο του ABTS ($r=0,991$, $p<0,05$).

Ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ενσίρωμα στεμφύλων



Διάγραμμα 6 :Στο διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση των τιμών IC₅₀ της μεθόδου DPPH με τη μέθοδο του ABTS ($r=0,972$, $p<0,05$).

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.

2.2.7 Συνολικά αποτελέσματα της αποτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ζωοτροφών

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

Πίνακας 4 :Τιμές IC₅₀ των ζωοτροφών με τη μέθοδο DPPH και ABTS.

Παρατηρώντας τον παραπάνω πίνακα των συνολικών αποτελεσμάτων διαπιστώνουμε 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 ± SEM. Εκτελέστηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (one way ANOVA), με το πρόγραμμα PASW Statistics 18 (πρώην SPSS Statistics), κατά Tukey και Dunnett. Το επίπεδο σημαντικότητας προσδιορίστηκε σε *p<0,05.

2.3 Ομογενοποίηση ιστών

Τα δείγματα του ιστού της σπλήνας και του αίματος τοποθετήθηκαν σε eppendorf tubes 1,5mL, ψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση. Ο ιστός ομογενοποιήθηκε με αναλογία 1 προς 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).

Κατά την προετοιμασία για τη βιοχημική ανάλυση του ιστού τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με γουδί και γουδοχέρι χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο. Ακολούθως, το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε(15.000 g - 5 min - 4°C).



Εικόνα 14: Ομογενοποίηση α) με γουδί β) χρήση υπερήχων.

2.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες

2.4.1 Γενικά

Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστηριότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των ιστών. 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. Εκτός από το πλάσμα και το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα οι παραπάνω δείκτες μπορούν να προσδιοριστούν σε αιώρημα κυττάρων που έχουν διαρρηχθεί με υπερήχους.

Επεξεργασία αιμολύματος:

Χρησιμοποιούμε:

- ✚ *Ολικό αίμα* για τον προσδιορισμό αιματολογικών παραμέτρων, όπως ο αιματοκρίτης και η αιμοσφαιρίνη.
- ✚ *Ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα* για τον προσδιορισμό της ανηγμένης και της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH και GSSG), της καταλάσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των TBARS.
- ✚ *Πλάσμα* για τον προσδιορισμό των TBARS, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Προετοιμασία ολικού αίματος

Βάζουμε περίπου 1 mL αίματος σε σωληνάρια με EDTA (αντιπηκτικό), το ανακινούμε και το βάζουμε στο ψυγείο ως τη χρησιμοποίησή του για τους αιματολογικούς προσδιορισμούς.

Συλλογή πλάσματος και ερυθροκυτταρικού αιμολύματος

1. Συλλέγουμε το αίμα σε σωληνάρια falcon (15 mL) με 200 μ L EDTA 7,5% και το ανακινούμε μερικές φορές (20 μ L 7,5% EDTA για κάθε 1mL αίματος).
2. Φυγοκεντρούμε στα 1370 g, για 10 λεπτά, στους 4 °C.
3. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (πλάσμα) και το χωρίζουμε σε φιαλίδια eppendorf, ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν.
4. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετά τη φυγοκέντρωση βρίσκονται στο κάτω μέρος του falcon.
5. Ανακινούμε βίαια.
6. Φυγοκεντρούμε στα 4020 g, για 15 λεπτά, στους 4 °C.
7. Συλλέγουμε το υπερκείμενο, που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μ L).

8. Χωρίζουμε σε erpendorf το αιμόλυμα ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν. Διατήρηση στους -20 °C.

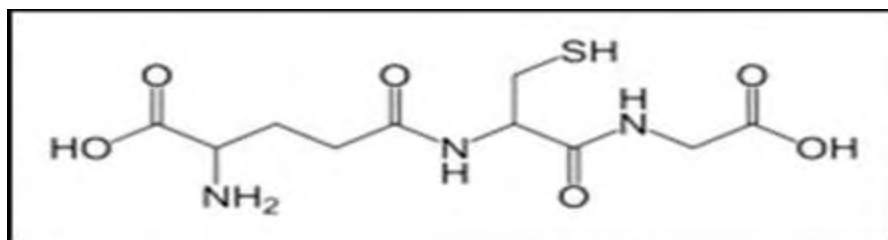
Καθαρισμός αιμολύματος για την προσδιορισμό της ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης

1. Προσθέτουμε 500 μL αιμολύματος σε 500 μL 5% TCA σε erpendorf. Ανακινούμε στο vortex.
2. Φυγοκεντρούμε στα 28620 g (16000 rpm) για 5 min στους 5 °C.
3. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε erpendorf και προσθέτουμε 5% TCA με την εξής αναλογία: 300 μL αιμολύματος / 90 μL 5% TCA ή 260 μL αιμολύματος / 60 μL 5% TCA. Ανακινούμε στο vortex.
4. Φυγοκεντρούμε στα 28620 g (16000 rpm) για 5 min στους 5 °C.
5. Μεταφέρουμε το καθαρό υπερκείμενο σε erpendorf. 100 μL για την GSH και 50 μL για την GSSG. Διατήρηση στους -20 °C.

2.4.2 Μέθοδοι

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 15: Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης.

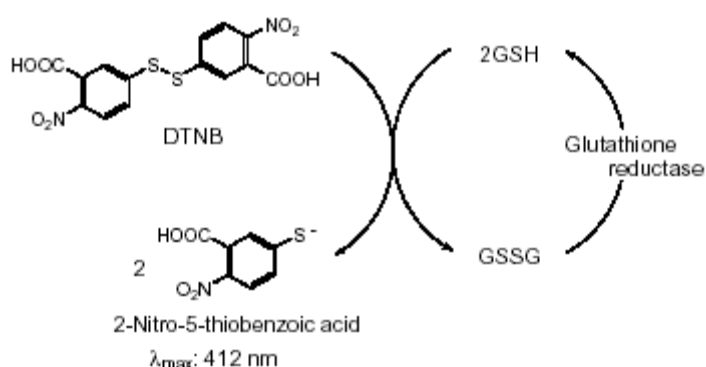
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battineta, 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και 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).

ΑΝΗΓΜΕΝΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSH) ΣΤΟ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΑΙΜΟΛΥΜΑ

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειοδου νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετριέται 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.

$2 \text{ GSH} + \text{DTNB} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{-nitro-5-thiobenzoic acid}$. Η GSH παράγεται από την GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.



Εικόνα 19: 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**. (C₆H₅Na₃O₇*2H₂O, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB: 294,10. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια Eppendorf

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μ L	660 μ L
DTNB 1 mM	330 μ L	330 μ L
Απεσταγμένο νερό	20 μ L	□
Αιμόλυμα	□	20 μ L

Πίνακας 5 : Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της GSH

Αναδεύουμε τα εppendorfs 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.

Υπολογισμοί

Δραστηκότητα της GSH (mmol/L) = $(Abs_{\text{δείγματος}} - \Delta Abs_{\text{τυφλού}} / 13,6) * 262,6$, όπου το 262,6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μ L) με τον όγκο του αιμόλυματος (20 μ L) ($1010 / 20 = 50,5$), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με $2 * 1,3$ για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500 μ L αιμολ. / 500 μ L 5% TCA) και τη δεύτερη αραίωση (390 μ L / 300 μ L ή 260 μ L / 200 μ L) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10X2, τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΗΓΜΕΝΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΣΕ ΙΣΤΟ

Η αρχή της μεθόδου και τα αντιδραστήρια είναι ίδια με εκείνα του προσδιορισμού της ανηγμένης γλουταθειόνης στο αιμόλυμα.

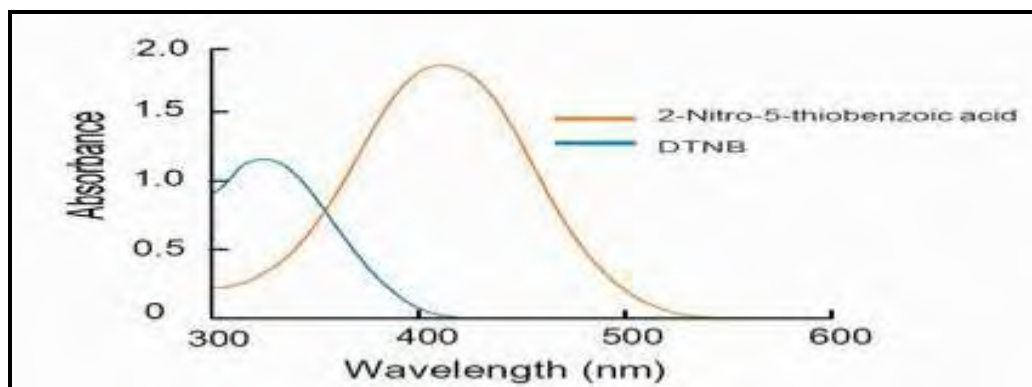
Πειραματικό πρωτόκολλο

Αρχικά, 100 μ L ιστού προστέθηκαν σε 100 μ L TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 5 min στους 5°C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο eppendorf. 20 μ L ιστού, αραιωμένου 1/2 αναμίχθηκαν με 660 μ L ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 8,0) και 330 μ L DTNB. Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια eppendorf:

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

Πίνακας 6: 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).

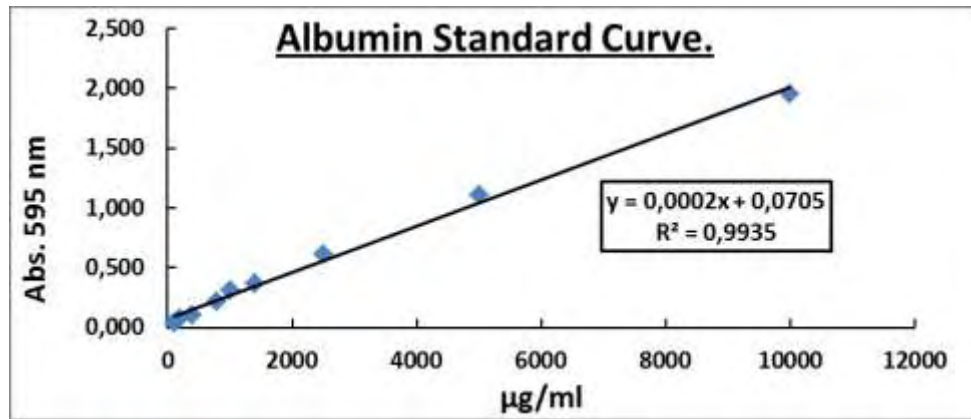


Εικόνα 20: Φάσμα απορρόφησης του 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκού οξέος (Dojindo Molecular Technologies).

Υπολογισμοί

Δραστικότητα GSH (μ mol/mg total prot.) = (Absδείγματος - Δabstυφλού/13,6) \times 2 \times 3 ή 4 (λόγω αραιώσεων) \times 50,5 / Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL). Όπου το 50,5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μ L) με τον όγκο του ιστού (20 μ 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 ιστό της σπλήνας, 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 $y = Abs$ στα 595 nm και ο $x = Συγκέντρωση$ (μ g/ml). Κατόπιν, με το Bradford test, λαμβάνονταν η τιμή της απορρόφησης και υπολογίζονταν αντίστοιχα η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.

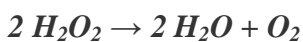


Διάγραμμα 7: Πρότυπη καμπύλη Αλβουμίνης

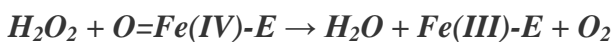
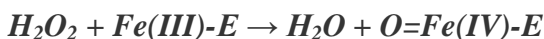
2. Δραστικότητα της Καταλάσης.

Αρχή της μεθόδου

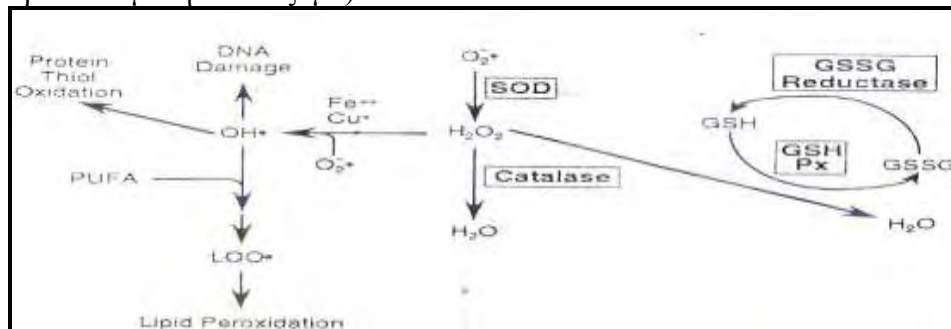
Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική 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:



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:

CAT



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

Διαλύματα

- ✚ **Phosphate buffer 67mM (pH 7,4)** MB (KH_2PO_4): 136 και MB (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 μ L
Ομογενοποιημένος Ιστός	40 μ L

Πίνακας 7 : 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 μ L 30% H_2O_2 στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστηριότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = ($\Delta Abs_{\text{sample per min}} / 40$) x (75 x 1000 x 3 ή 4 x 2) / Conc. Protein (mg/mL). Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2 πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μ mol/mL. Το 75 είναι ο παράγοντας αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μ L) με τον όγκο του δείγματος (40 μ L) (3000/40=75). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον ιστό της σπλήνας, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης.

Ο υπολογισμός της δραστηριότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης. ΔAbs = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM. U = μ mol/min. $\Delta Abs_{\text{blank}}$ 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).

ΚΑΤΑΛΑΣΗ ΣΤΟ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΑΙΜΟΛΥΜΑ

Η αρχή της μεθόδου και τα αντιδραστήρια είναι ίδια με εκείνα του προσδιορισμού της καταλάσης στον ιστό.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες και ακολουθείται η διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2991 μL
Αιμόλυμα αραιωμένο 1/10	4 μL

Πίνακας 8: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = ($\Delta Abs_{\text{sample}}$ per min / 40) * (750 * 1000 * 10 * 2) / Conc. Hb (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 750 είναι ο παράγοντας αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μL) με τον όγκο του αιμόλυματος (4 μL) (3000 / 4 = 750), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραιώση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων. Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση των TBARS που υπολογίστηκε προηγουμένως (μmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10x2, τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραιώση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων. ΔAbs (min) = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H₂O₂ στην κυψελίδα είναι 16 mM.

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 αναμειγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμειγνύουμε 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 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 9 : 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 κυβελίδα είναι 50 $\mu\text{mol/L}$ της κυβελίδας.

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 25 διότι η αραιώση του ιστού στην κυβελίδα είναι 25 πλάσια (1000 μL στην κυβελίδα / 40 μL ιστού του δείγματος στην κυβελίδα = 25).

δ) Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον ιστό της σπλήνας, 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: $\text{mmol DPPH} / \text{mg total prot.}$

ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι το μόριο που έχει τον πιο ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της τιμής της TAC στο πλάσμα (55-60%) προκαλώντας μεγάλη αύξησή της όταν η συγκέντρωσή του αυξάνεται. Το ουρικό οξύ βρίσκεται σε πολύ πιο υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα σε σχέση με άλλα μόρια με εξαίρεση τις θειόλες. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι το δεύτερο πιο ισχυρό μόριο στον καθορισμό της τιμής της TAC και ακολουθούν κατά σειρά οι βιταμίνες E και A. Οι βιταμίνες C και E μάλιστα είναι πιθανό να αποτελούν το 25 % της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.

Η αρχή της μεθόδου και τα αντιδραστήρια είναι τα ίδια με εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ιστό.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs και ακολουθείται η διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως:

	Blank	Θετικός control	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μL	495 μL	480 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL	500 μL
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	□	5 μL	□
Πλάσμα	□	□	20 μL

Πίνακας 10 : Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC.

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ % Abs μείωση = $(\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} * 100$

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

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.

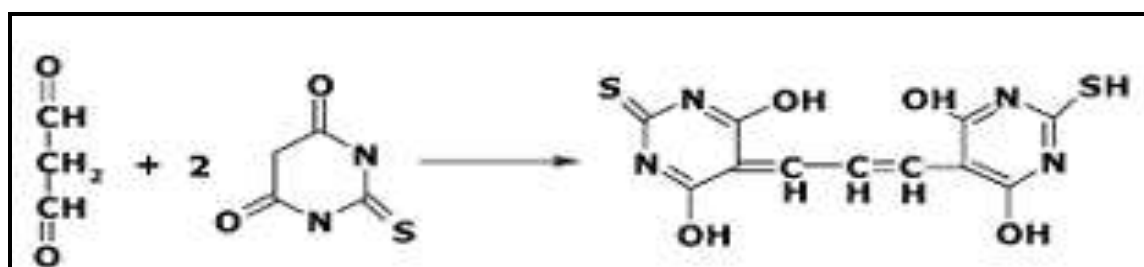
γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η αραιώση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-πλάσια (1000 μL στην κυψελίδα / 20 μL πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 50).

δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

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 μαλονδιαλδεΐδη. Η μαλονδιαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΐδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης 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 ≈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 Na₂SO₄ – TBA και επωάζουμε στους 95 °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°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 2 ή 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 μmol/L. Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον ιστό της σπλήνας για να συνυπολογίσουμε την αραίωση 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.

ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΤΙΑΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟ ΘΕΙΟΒΑΡΒΙΤΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ (TBARS) ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ

Η αρχή της μεθόδου, τα αντιδραστήρια και το πειραματικό πρωτόκολλο είναι τα ίδια με εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της μεθόδου στον ιστό.

Υπολογισμοί

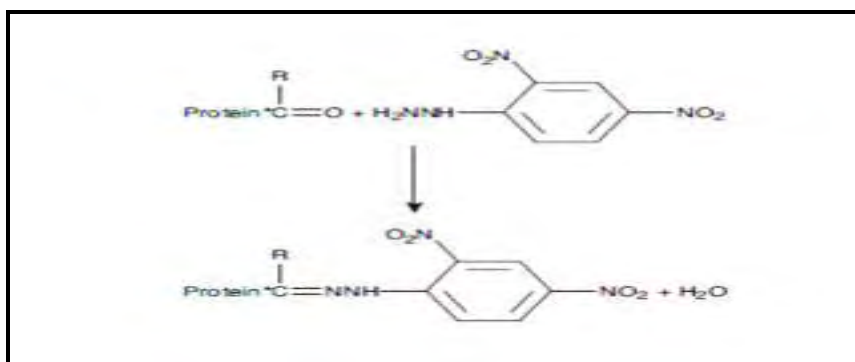
Η συγκέντρωση των TBARS ($\mu\text{mol/L}$) = $(\text{Abs δειγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0,156 * 31$, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) ($3100 / 100 = 31$). Το 0,156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L to $\mu\text{mol/L}$.

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

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 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 δριμυείς 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 DNPΗ (2,4-δίνιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου. Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο Patsoukis et. al., (2004).



Εικόνα 18 :Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPΗ (2,4-δίνιτροφαινυλδραζίνη) 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 (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 αιθυλεστέρα (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 μ L 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 \times 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 αραιώσης (1000 μ L στην κυψελίδα /50 μ L δείγματος). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον ιστό της σπλήνας, 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).

ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ

Η αρχή της μεθόδου, τα αντιδραστήρια και το πειραματικό πρωτόκολλο είναι τα ίδια με εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της μεθόδου στον ιστό.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 * 1000/50$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μL στην κυψελίδα /50 μL δείγματος). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανά πρωτεΐνη πλάσματος μπορεί να γίνει μέσω της εξίσωσης: Συγκ. πρωτ. καρβ. (nmol/mg) = συγκ. πρωτ. καρβ. nmol/mL / συγκ. πρωτ mg/mL. Συγκέντρωση πρωτεϊνών = 70 mg/mL

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).

7. Ποσοτικός προσδιορισμός της αιμοσφαιρίνης του αίματος.

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν:

✚ Potassium ferricyanide	0,60 mmol/L
✚ Potassium cyanide	0,90 mmol/L
✚ Dihydrogen potassium phosphate	2 mmol/L

Αρχή της μεθόδου

Η αιμοσφαιρίνη οξειδώνεται από το potassium ferricyanide σε μεθαιμοσφαιρίνη η οποία μετατρέπεται σε κυανομεθαιμοσφαιρίνη από το potassium cyanide. Η ένταση του χρώματος που σχηματίζεται, είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης στο δείγμα.

Πειραματικό πρωτόκολλο

- 1) Προσθέτουμε τα ακόλουθα αντιδραστήρια και αναδεύουμε τα eppendorfs με vortex.

	Sample
Kit αντιδραστήριο	1000 μL

Αιμόλυμα

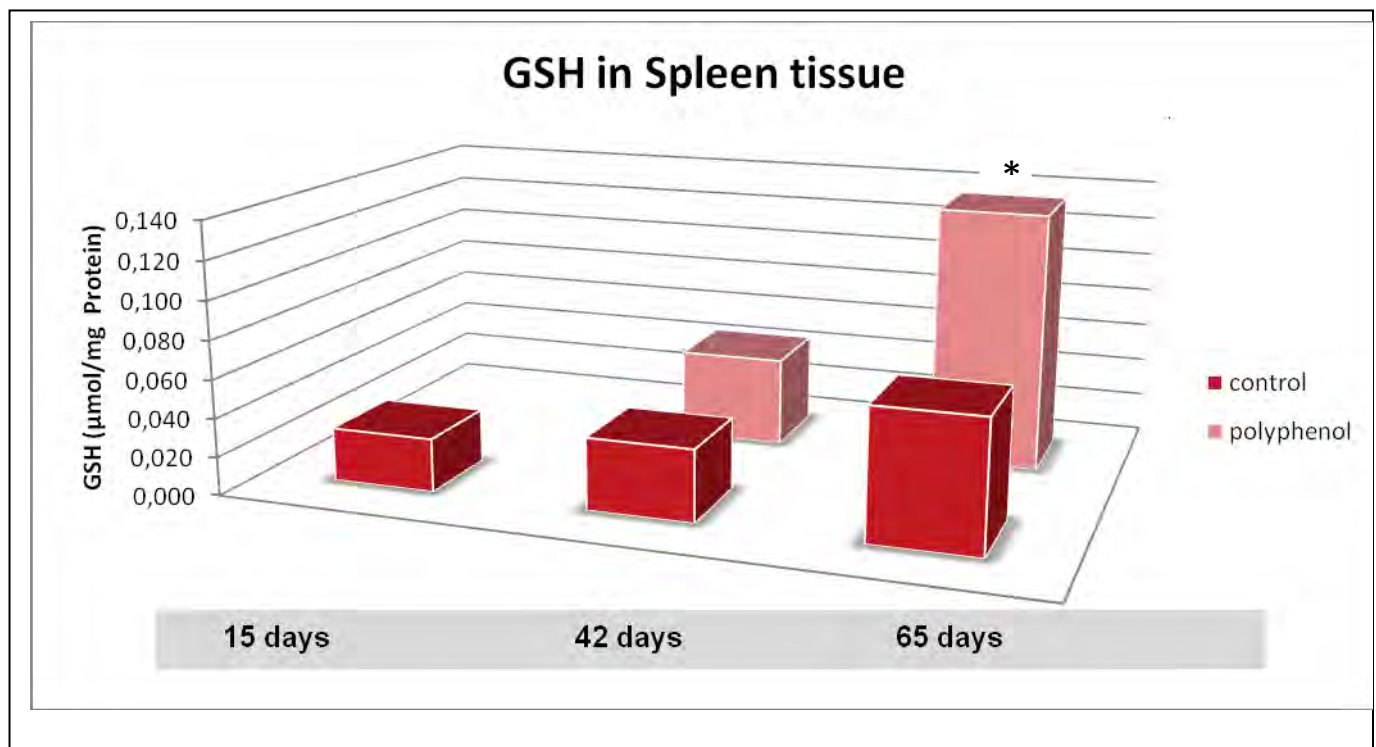
4 μ L

Πίνακας 11 : Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της αιμοσφαιρίνης.

Περιμένουμε δέκα λεπτά και κατόπιν μετρούμε την απορρόφηση στα 540 nm.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίπεδα Γλουταθειόνης



*Διάγραμμα 8: Επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH). * Στατιστικά σημαντική αύξηση στις πολυφαινολικές ομάδες των 65 ημερών σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου κατά 101,47% στον ιστό της σπλήνας.*

✚ Σύγκριση των ομάδων control

Στις ομάδες control, τα επίπεδα της γλουταθειόνης αυξάνονται στατιστικά σημαντικά από τις 15 στις 65 ημέρες κατά 99,93%±0,007. Επίσης, παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 42 στις 65 ημέρες κατά 99,93%±0,007.

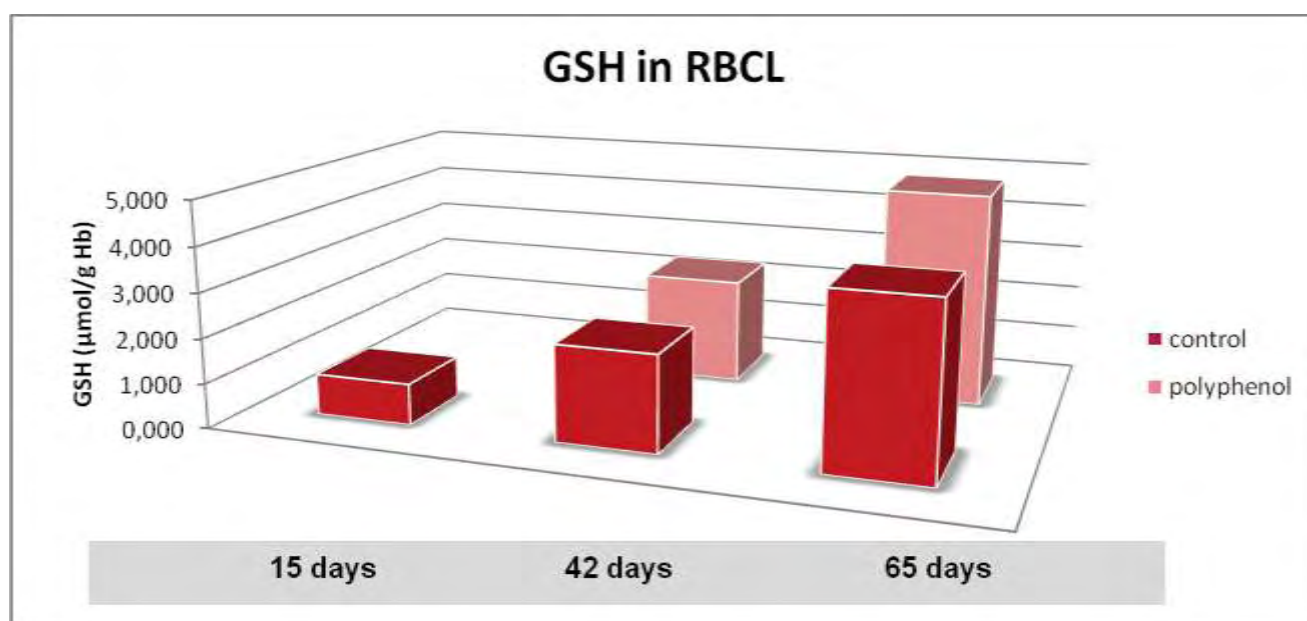
✚ Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Συγκρίνοντας τις δύο πολυφαινολικές ομάδες των 42 και 65 ημερών, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα της GSH αυξάνονται στατιστικά σημαντικά από τις 42 ημέρες στις 65 ημέρες κατά 99,87%±0,011.

✦ Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι:

- A. Στις 42 ημέρες παρατηρείται αύξηση της GSH από τα control ζώα στα πολυφαινολικά κατά 27,02%, ωστόσο η αύξηση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.
- B. Στις 65 ημέρες παρατηρείται **στατιστικά σημαντική** αύξηση της GSH από τα control στα πολυφαινολικά ζώα κατά 101,47% $\pm 0,011$.



Διάγραμμα 9: Επίπεδα γλουταθειόνης.

✦ Σύγκριση των ομάδων control

Στις ομάδες control του αίματος, τα επίπεδα της γλουταθειόνης αυξάνονται στατιστικά σημαντικά από τις 15 στις 42 ημέρες κατά 114,50% $\pm 0,118$ καθώς επίσης και από τις 15 στις 65 ημέρες κατά 96,186% $\pm 0,422$. Στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρείται και από τις 42 στις 65 ημέρες κατά 281,4% $\pm 0,422$.

✦ Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

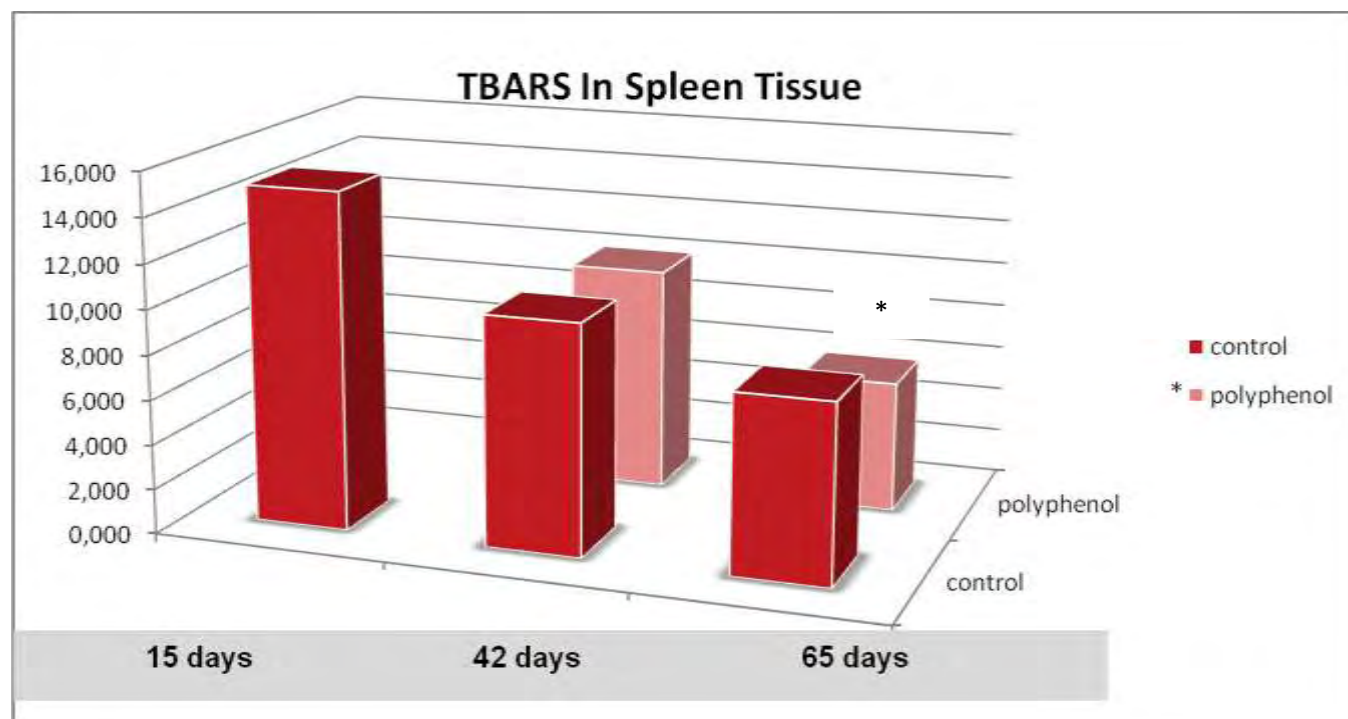
Στις πολυφαινολικές ομάδες του αίματος, τα επίπεδα της γλουταθειόνης, αυξάνονται στατιστικά σημαντικά από τις 42 στις 65 ημέρες κατά 95,23% $\pm 0,428$.

✦ Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι:

- A. Στις 42 ημέρες δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές της GSH από τα control ζώα στα πολυφαινολικά καθώς τα επίπεδα της γλουταθειόνης παραμένουν περίπου ίδια.
- B. Στις 65 ημέρες παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα της γλουταθειόνης από τα control στα πολυφαινολικά ζώα κατά 25,09%, ωστόσο η αύξηση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.

3.2 Επίπεδα TBARS



Διάγραμμα 10: Επίπεδα TBARS. Στατιστικά σημαντική μείωση κατά 26,34% μεταξύ των ομάδων control 65 ημερών και polyphenol 65 ημερών.

✚ Σύγκριση των ομάδων control

Από το διάγραμμα, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των TBARS μειώνονται στατιστικά σημαντικά από τις 15 στις 42 ημέρες κατά $89,74\% \pm 0,415$. Επιπλέον, παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση από τις 15 στις 65 ημέρες κατά $92,01\% \pm 0,485$.

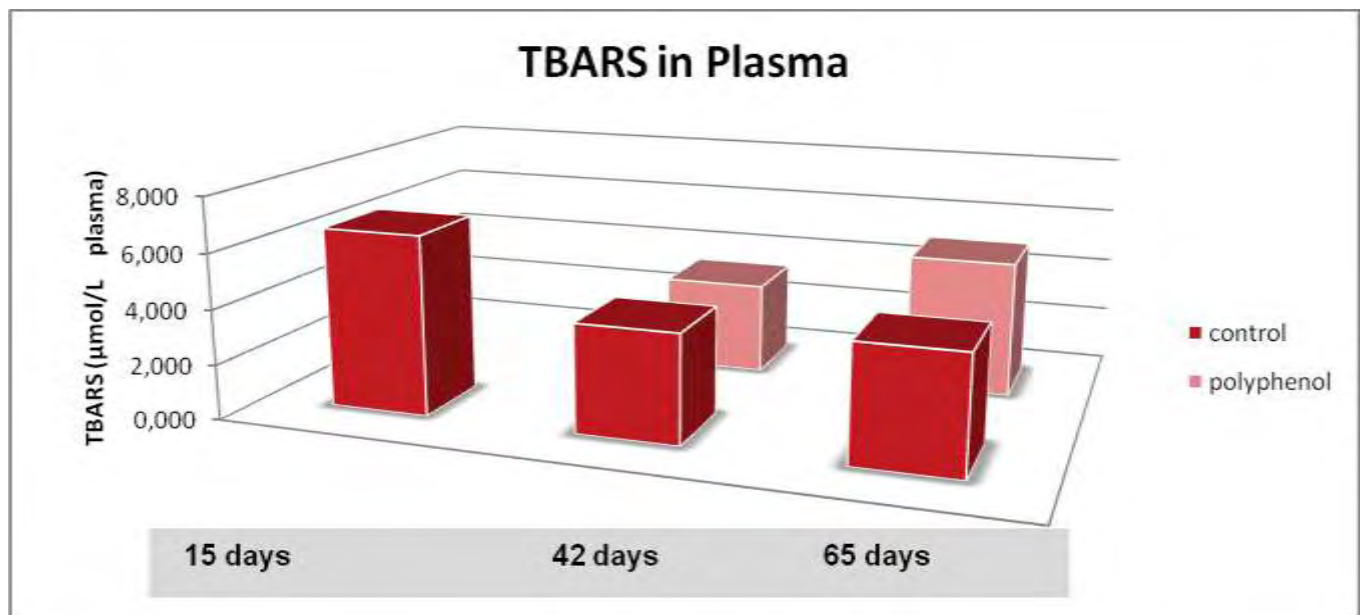
✚ Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Στις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων των TBARS από τις 42 στις 65 ημέρες κατά $99,15\% \pm 0,789$.

✚ Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι:

- Στις 42 ημέρες δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των TBARS από τα control ζώα στα πολυφαινολικά.
- Στις 65 ημέρες τα TBARS μειώνονται **στατιστικά σημαντικά** κατά $26,34\% \pm 0,789$ από τα control στα πολυφαινολικά ζώα.



Διάγραμμα 11: Επίπεδα TBARS.

+ Σύγκριση των ομάδων control

Από το διάγραμμα, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των TBARS μειώνονται στατιστικά σημαντικά από τις 15 στις 42 ημέρες κατά $96,05\% \pm 0,415$.

+ Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

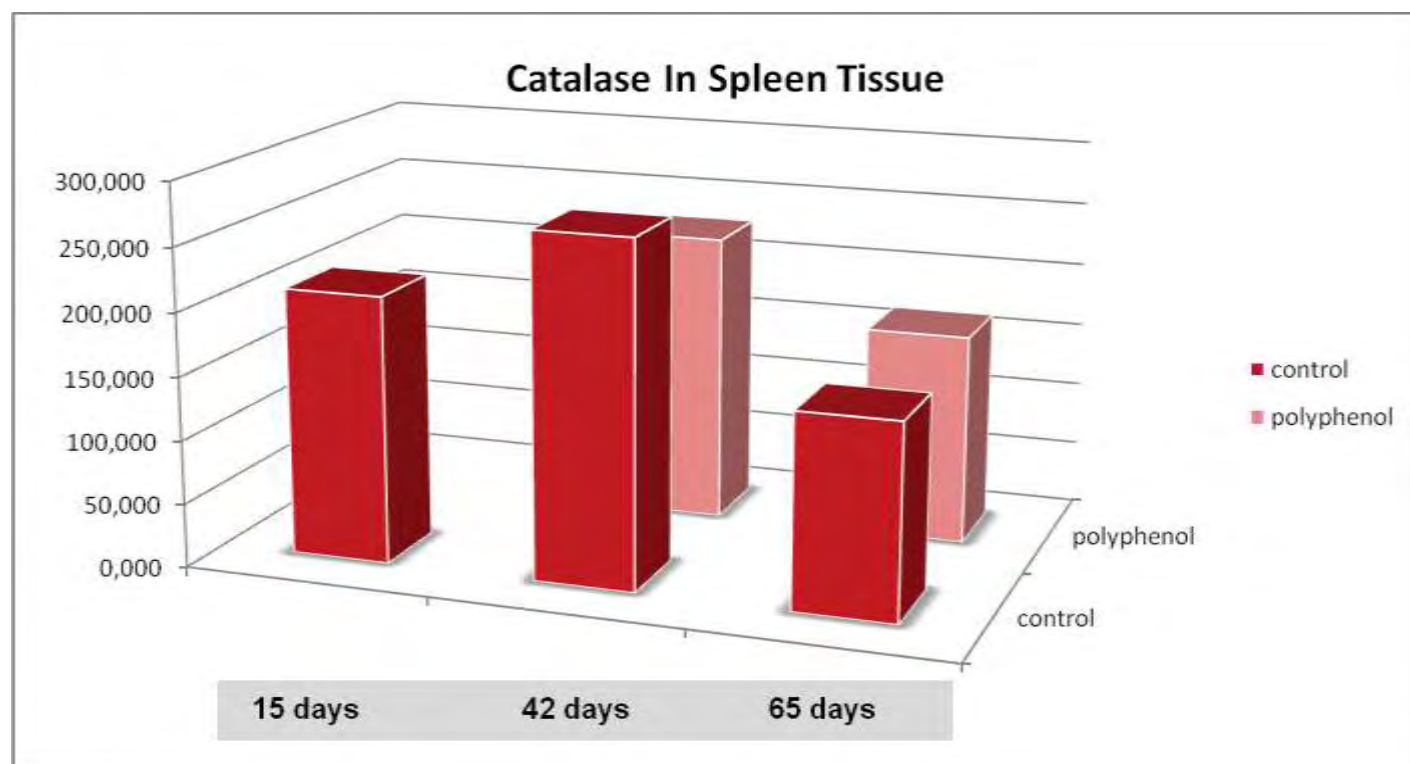
Στις πολυφαινολικές ομάδες δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

+ Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

- A. Στις 42 ημέρες υπάρχει μείωση κατά 14,80% των TBARS από τα control ζώα στα πολυφαινολικά, ωστόσο η μείωση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.
- B. Στις 65 ημέρες τα TBARS αυξάνονται κατά 17,45% από τα control στα πολυφαινολικά ζώα χωρίς όμως η αύξηση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική.

3.3 Επίπεδα Καταλάσης



Διάγραμμα 12: Επίπεδα Καταλάσης

✚ Σύγκριση των ομάδων control

Από το διάγραμμα, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα της καταλάσης μειώνονται στατιστικά σημαντικά από τις 42 στις 65 ημέρες κατά $52,41\% \pm 11,388$.

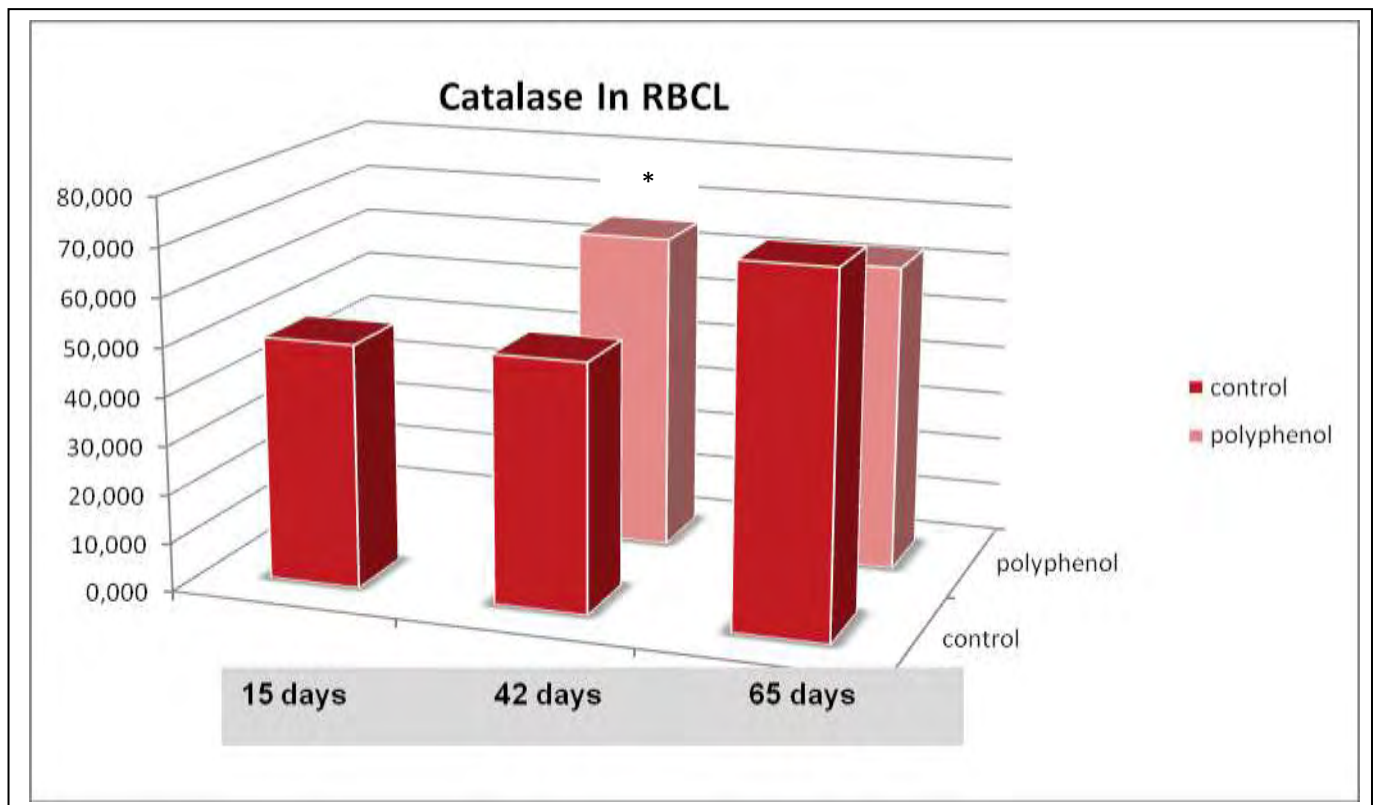
✚ Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Στις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε μείωση των επιπέδων της καταλάσης από τις 42 στις 65 ημέρες κατά $65,92\% \pm 22,889$.

✚ Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

- Στις 42 ημέρες δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της καταλάσης από τα πολυφαινολικά ζώα στα control.
- Στις 65 ημέρες δεν υπάρχουν στατικά σημαντικές μεταβολές.



Διάγραμμα 13: Επίπεδα Καταλάσης. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης στις 42 ημέρες στην πολυφαινολική ομάδα κατά 28,47%.

✚ Σύγκριση των ομάδων control

Από το διάγραμμα, παρατηρούμε στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 42 στις 65 ημέρες κατά 37,23%±7,015.

✚ Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

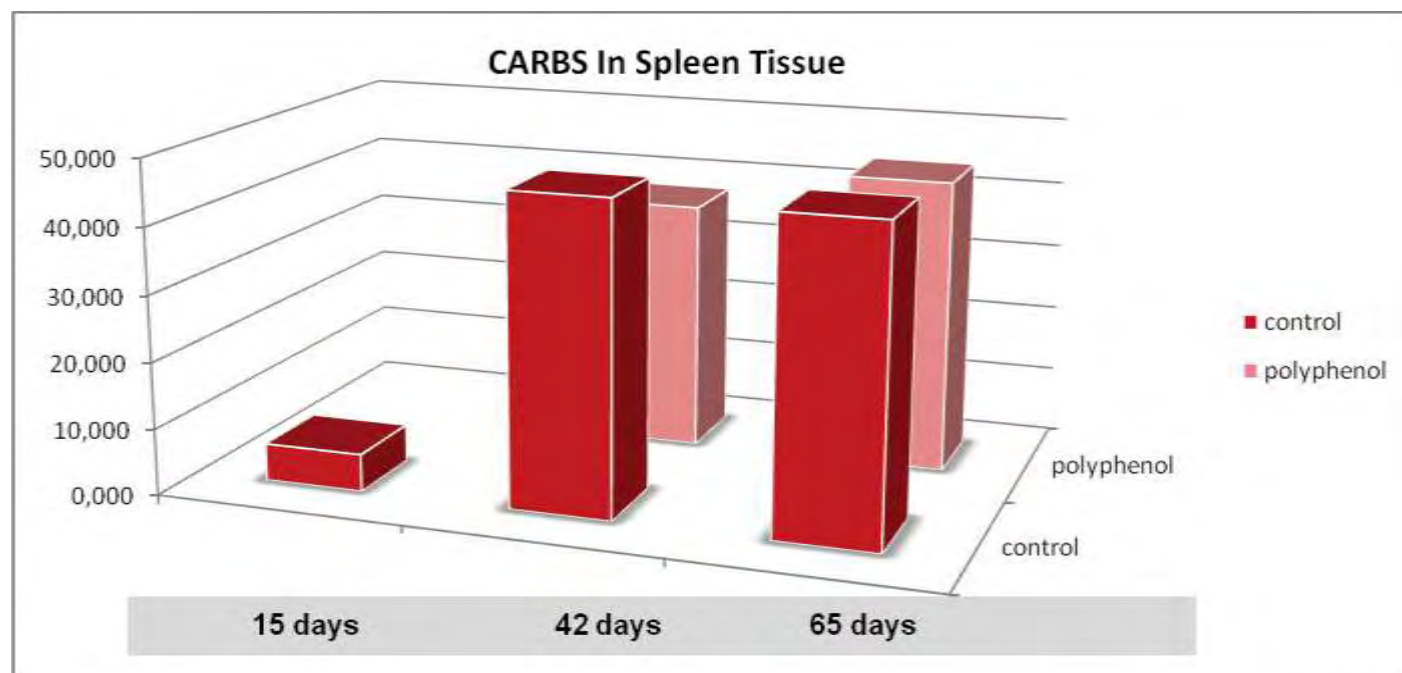
Στις πολυφαινολικές ομάδες δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

✚ Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι:

- A. Στις 42 ημέρες παρατηρείται **στατιστικά σημαντική αύξηση στις πολυφαινολικές ομάδες σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου** κατά 28,47% ±5,866.
- B. Στις 65 ημέρες δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της καταλάσης από τα control στα πολυφαινολικά ζώα.

3.4 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων



Διάγραμμα 14: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον ιστό της σπλήνας.

+ Σύγκριση των ομάδων control

Τα επίπεδα των καρβονυλίων αυξάνονται στατιστικά σημαντικά από τις 15 στις 42 ημέρες κατά $53,36\% \pm 6,849$ και από τις 15 στις 65 ημέρες κατά $53,60\% \pm 2,520$.

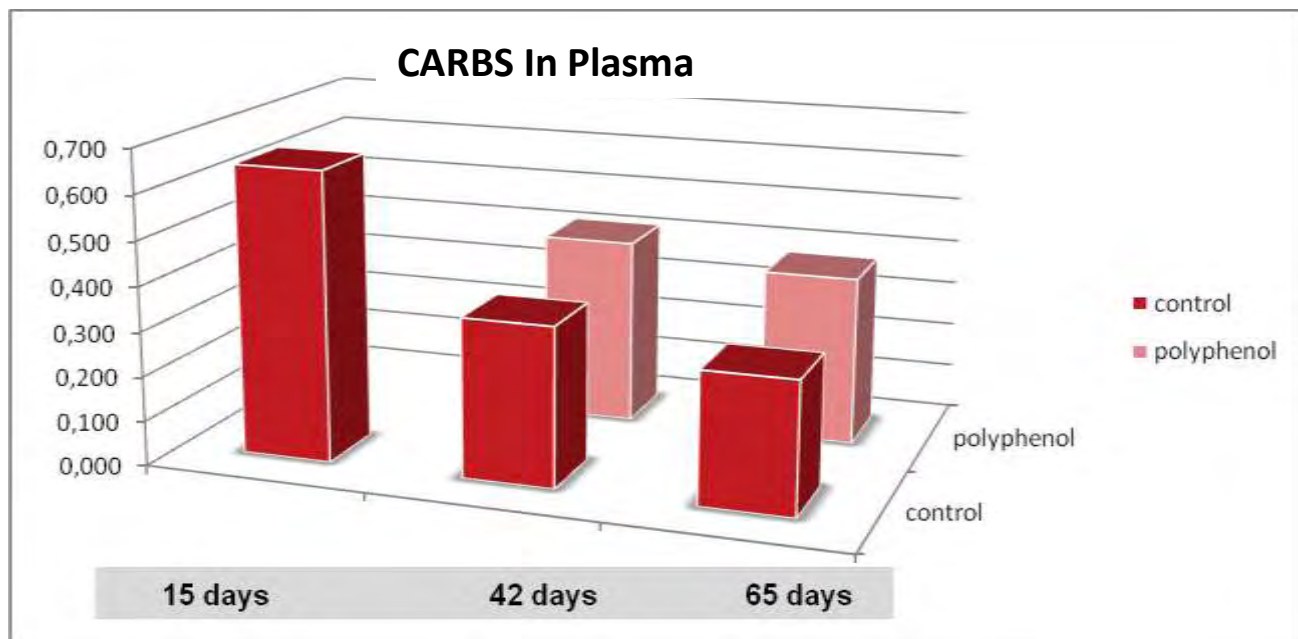
+ Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Στις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε ότι οι τιμές των καρβονυλίων στις 42 ημέρες και στις 65 ημέρες δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

+ Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

- Στις 42 ημέρες υπάρχει μείωση των καρβονυλίων κατά 18,75% από τα control ζώα στα πολυφαινολικά η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική.
- Στις 65 ημέρες υπάρχει μείωση των καρβονυλίων από τα control στα πολυφαινολικά ζώα κατά 4,93% η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Διάγραμμα 15: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο αίμα.

✚ Σύγκριση των ομάδων control

Για τις ομάδες control, τα επίπεδα των καρβονυλίων μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά κατά $99,65\% \pm 0,021$ από τις 15 στις 42 ημέρες και κατά $99,71\% \pm 0,036$ από τις 15 στις 65 ημέρες.

✚ Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

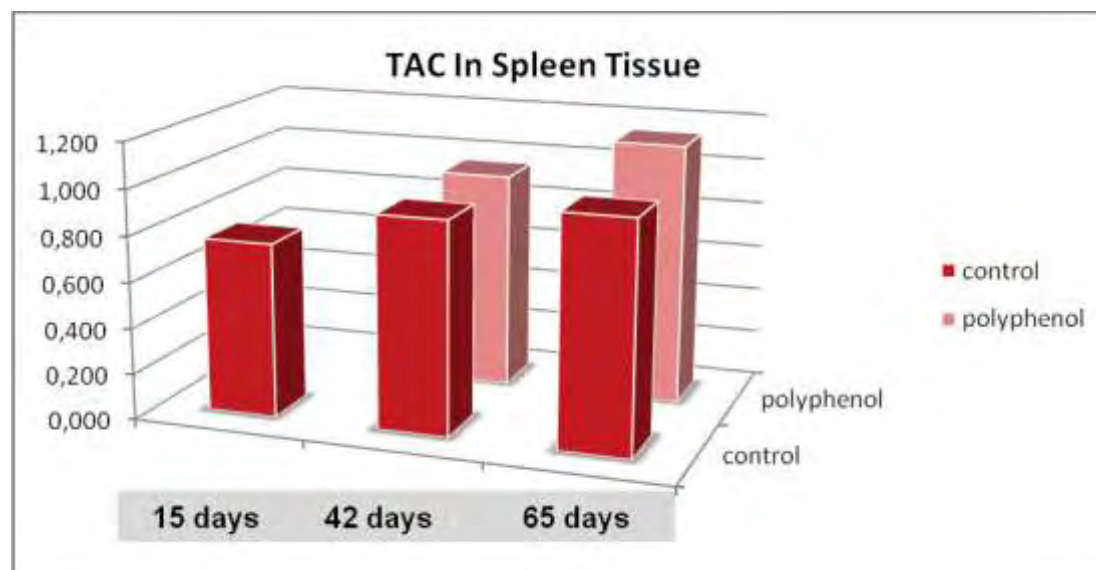
Στις πολυφαινολικές ομάδες δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές ούτε στις 42 ούτε στις 65 ημέρες.

✚ Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι:

- Στις 42 ημέρες δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των καρβονυλίων από τα control ζώα στα πολυφαινολικά.
- Στις 65 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή των καρβονυλίων από τα control στα πολυφαινολικά ζώα.

3.5 Επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)



Διάγραμμα 16: Επίπεδα TAC.

+ Σύγκριση των ομάδων control

Από το διάγραμμα, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα της TAC αυξάνονται στατιστικά σημαντικά κατά $99,07\% \pm 0,028$ από τις 15 στις 42 ημέρες και κατά $99,05\% \pm 0,027$ από τις 42 στις 65 ημέρες.

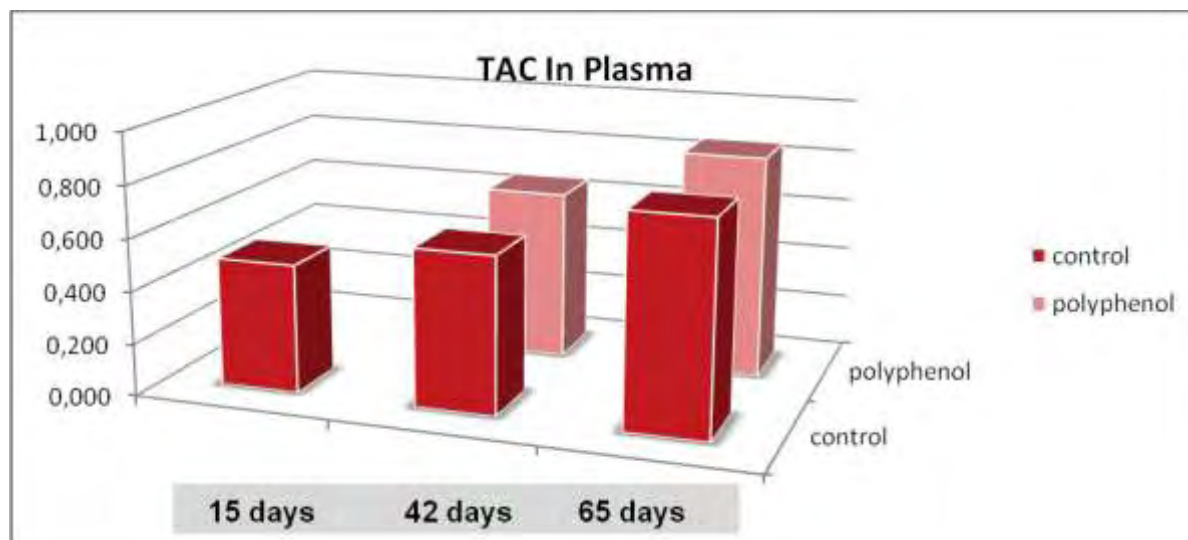
+ Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Στις πολυφαινολικές ομάδες δεν παρατηρούμε στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

+ Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

- Στις 42 ημέρες παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα της TAC κατά $2,70\%$ από τα control στα πολυφαινολικά ζώα η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική .
- Στις 65 ημέρες παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα της TAC κατά $14,27\%$ από τα control στα πολυφαινολικά ζώα η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική .



Διάγραμμα 17: Επίπεδα της TAC στο πλάσμα του αίματος.

✚ Σύγκριση των ομάδων control

Από το διάγραμμα, παρατηρούμε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TAC από τις 15 στις 42 ημέρες κατά $99,4\% \pm 0,026$, από τις 42 στις 65 ημέρες κατά $99,2\% \pm 0,020$ και από τις 15 στις 65 ημέρες κατά $99,2\% \pm 0,026$.

✚ Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Στις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TAC από τις 42 στις 65 ημέρες κατά $99,15\% \pm 0,024$.

✚ Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

- A. Στις 42 ημέρες δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές καθώς παρατηρείται αύξηση κατά 9,16% η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική.
- B. Στις 65 ημέρες δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές καθώς παρατηρείται αύξηση κατά 6,35% η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση νεαρών προβάτων κρεατοπαραγωγής, Ελληνικής φυλής «Χιώτικα», τα οποία, ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκαν, εκτρέφονταν με διαφορετικό σιτηρέσιο. Η πρώτη ομάδα που αποτελούσε την ομάδα ελέγχου, τρέφονταν με το βασικό σιτηρέσιο ενώ η δεύτερη τρέφονταν 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.

Τα τελευταία χρόνια έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς τις ευεργετικές ιδιότητες 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). Έρευνες για την ανάκτηση πολυφαινολών από τα υποπροϊόντα της οινοποίησης έχουν κυρίως επικεντρωθεί στα στέμφυλα των κόκκινων σταφυλιών, τα οποία χαρακτηρίζονται από σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις (Nile et al., 2013; Ju and Howard 2005; Kammerer et al., 2005; Spingo et al., 2007). Τα στέμφυλα τα οποία αποτελούνται από τα στερεά μέρη του σταφυλιού, δηλαδή τους βόστρυχους, τους φλοιούς, και τα κουκούτσια (γίγαρτα), είναι η φυτική βιομάζα που προκύπτει κατά τη διαδικασία οινοποίησης, μετά από την πίεση των σταφυλιών για την παραλαβή του μούστου και είναι το κύριο από άποψη όγκου και απομένουσας αξίας υποπροϊόν της οινοποίησης. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες έδειξαν ότι εκχύλισμα στεμφύλων, 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). Οι πολυφαινόλες που εμπεριέχονται στο εκχύλισμα στεμφύλων, διαθέτουν όπως αναφέρθηκε αντιοξειδωτική δράση παρεμποδίζοντας την υπερβολική συσσώρευση των ελεύθερων ριζών. Έτσι, θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική η πιθανή συμβολή των αντιοξειδωτικών ουσιών στην ευζωία των ζωικών οργανισμών σε όλα τα στάδια του κύκλου της ζωής τους και είναι ιδιαίτερης σημασίας η δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών και η εισαγωγή τους στην καθημερινή διατροφή ειδικότερα στα πρωταρχικά στάδια μετά την γέννηση όπου η φυσική άμυνα του οργανισμού δεν επαρκεί για να διατηρήσει την ισορροπία μεταξύ του οξειδωτικού στρες και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων στεμφύλων στον ιστό της σπλήνας και στο αίμα νεαρών προβάτων.

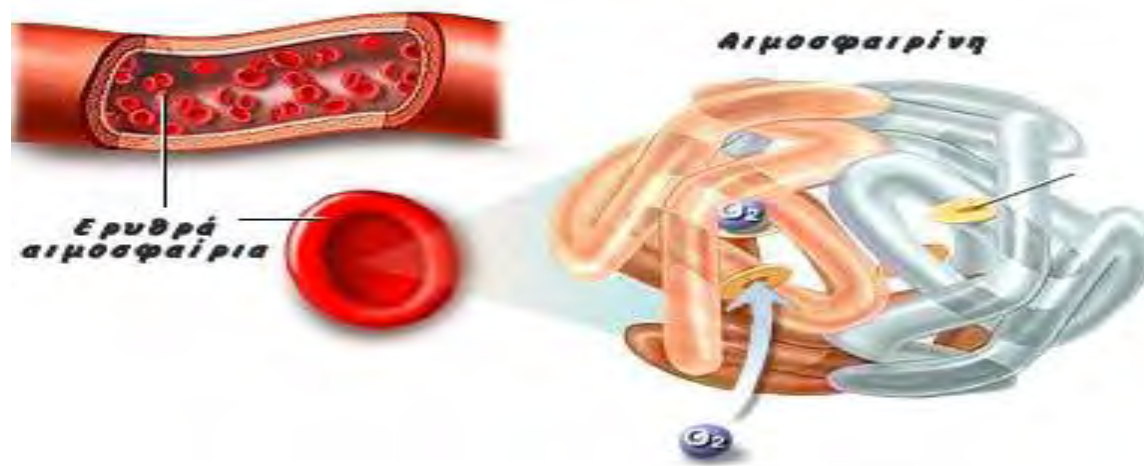
Ο σπλήνας είναι ένα λεμφοειδές όργανο των ζώων. Αποτελεί αιμοποιητικό όργανο κατά την εμβρυική ζωή καθώς συμμετέχει στην παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων ενώ λειτουργεί και ως ηθμός που καθαρίζει το αίμα από γηρασμένα ή παθολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια, από έγκλειστα που υπάρχουν εντός των ερυθροκυττάρων και από αντιγόνα και μικροοργανισμούς. Επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στη μη ειδική και ειδική ανοσία του οργανισμού, συμμετέχει στο μεταβολισμό του σιδήρου και λειτουργεί ως αποθήκη λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων. Σε ορισμένα είδη ζώων, όπως στον ίππο, στο πρόβατο και στο σκύλο, η ικανότητα του σπλήνα για αποθήκευση ερυθροκυττάρων είναι σημαντικά μεγάλη. Έτσι σε περίπτωση έντονης μυικής προσπάθειας, ο σπλήνας συσπάται ελευθερώνοντας στην κυκλοφορία του αίματος μια συμπακνωμένη μάζα ερυθροκυττάρων. Επιπλέον, ο σπλήνας είναι τόπος καταστροφής των ερυθροκυττάρων και συμμετέχει στο σχηματισμό χολοχρωστικών. Ο σπλήνας, όμως, δεν είναι ένα

τελείως απαραίτητο για τη ζωή όργανο. Στους ενήλικους οργανισμούς (όχι όμως και στους νεαρούς) μπορεί να αφαιρεθεί χωρίς σημαντικές επιπτώσεις στον οργανισμό καθώς οι λειτουργίες του αναλαμβάνονται από άλλους ιστούς. Στα μηρυκαστικά υπάρχουν ορισμένα γάγγλια (αιμογάγγλια) με ιστολογική δομή και ίσως και λειτουργία όμοια με εκείνη του σπλήνα. Στα γάγγλια αυτά παράγονται ερυθροκύτταρα κατά την εμβρυική ζωή και ουδετερόφιλα, εωσινόφιλα και βασεόφιλα κατά τη μετεμβρυική ζωή (Αθ.Σμοκοβίτη: Φυσιολογία, έκδοση 2007).



Εικόνα 19: Απεικόνιση του σπλήνα και οι βασικές λειτουργίες του.

Το αίμα αποτελείται από το πλάσμα (άμορφο συστατικό), μέσα στο οποίο εναιωρούνται τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Το αίμα περιέχει αέρια όπως το οξυγόνο, το διοξείδιο του άνθρακα και το άζωτο και μεταφέρει επίσης σε μικρές ποσότητες μια μεγάλη ποικιλία διαλυμένων χημικών ουσιών, στις οποίες περιλαμβάνονται υδατάνθρακες (γλυκόζη), πρωτεΐνες (λευκώματα), ορμόνες, λίπη και αζωτούχες ενώσεις. Το αίμα αποτελείται κατά 22 % από στερεά και κατά 78 % από νερό. Το πιο σημαντικό από τα λευκώματα που μεταφέρει το αίμα είναι η αιμοσφαιρίνη, η οποία είναι μια μεταλλοπρωτεΐνη με σίδηρο, που περιέχεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η λειτουργία που επιτελεί στα περισσότερα θηλαστικά είναι αυτή της μεταφοράς οξυγόνου από τους πνεύμονες στο υπόλοιπο σώμα και διοξειδίου του άνθρακα από το σώμα στους πνεύμονες. (Αθ.Σμοκοβίτη: Φυσιολογία, έκδοση 2007).



Εικόνα 20 : Απεικόνιση αιμοσφαιρίνης και ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες οι οποίοι ελέγχθηκαν ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστικότητα 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.

Οι δείκτες αυτοί μελετήθηκαν καθώς αποτελούν βασικούς μηχανισμούς ένδειξης του οξειδωτικού στρες στους έμβιους οργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα η **γλουταθειόνη** είναι το κυριότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό που παράγεται από τα κύτταρα, συμμετέχοντας απευθείας στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και των ενεργών μορφών του οξυγόνου, ενώ συντηρεί και εισαγόμενα αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E στις αναγμένες (ενεργές) μορφές τους (Scholz et.al.)(Hughes et.al.), ρυθμίζει τον κύκλο του μονοξειδίου του αζώτου που είναι κρίσιμος για τη ζωή (Clementi). Επίσης, επιδρά σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις όπως η σύνθεση και η επιδιόρθωση του DNA, η πρωτεϊνοσύνθεση, η σύνθεση προσταγλανδίνης, η μεταφορά αμινοξέων και η ενεργοποίηση ενζύμων. Ζωτική είναι επίσης η δράση της στον μεταβολισμό του σιδήρου. Στα ζώα η γλουταθειόνη δρα ως υπόστρωμα σε συζευκτικές και αναγωγικές αντιδράσεις, που καταλύονται από το ένζυμο S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης στο κυτταροπλασματικό υγρό, στα μικροσώματα και στα μιτοχόνδρια. Είναι επίσης ικανή να συμμετέχει σε μη ενζυματικές συζευκτικές αντιδράσεις με κάποιες ουσίες. Αξιολογώντας τα αποτελέσματα του ελέγχου της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), στην παρούσα πειραματική διαδικασία, τα επίπεδα της γλουταθειόνης βρέθηκαν στατιστικά αυξημένα, από τις control στις πολυφαινολικές ομάδες, κατά 101,47%, στον ιστό της σπλήνας των 65 ημερών. Επίσης, στατιστικά σημαντική αύξηση στον ιστό της σπλήνας παρατηρήθηκε τόσο μεταξύ των ομάδων ελέγχου από τις 15 στις 65 ημέρες κατά 99,93% όσο και μεταξύ των ομάδων ελέγχου από τις 42 στις 65 ημέρες κατά 99,93%. Επιπροσθέτως, στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε σε όλες τις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες του αίματος. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση από τις 15 στις 42 ημέρες κατά 114,5%, από τις 42 στις 65 ημέρες κατά 281,4% και από τις 15 στις 65 ημέρες κατά 96,19% στις ομάδες ελέγχου. Στις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρήθηκε αύξηση κατά 95,23%. Σε παρόμοιες εργασίες που έχουν διεξαχθεί, η χορήγηση πολυφαινολών σε κοτόπουλα είχε ως αποτέλεσμα, η GSH να παρουσιάζει αύξηση σε σχέση με το χρόνο και στις control και στις πολυφαινολικές ομάδες, ωστόσο οι τιμές είχαν μεγαλύτερη αύξηση στις πολυφαινολικές από ότι στις control ομάδες, το οποίο συνηγορεί το θετικό αποτέλεσμα των πολυφαινολών (Gerasopoulos K. et.al. 2014). Επίσης, μελέτες που έγιναν σε ανθρώπους έδειξαν ότι η κατανάλωση πολυφαινολικών πρόσθετων, οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της GSH στο πλάσμα του αίματος. Αυτό οφείλεται στο ότι (Chen et al. 2013) η συμπληρωματική μεθειονίνη, κύριος πρόδρομος της σύνθεσης GSH, αυξάνει τα επίπεδα γλουταθειόνης σε κοτόπουλα πάχυνσης, με χαμηλή συγκέντρωση GSH. Οι επιδράσεις των στεμφύλων στη GSH, μπορεί πιθανόν να εξηγηθούν μέσω της διαφοροποίησης των κύριων ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση GSH όπως τη λιγάση της γ-γλουταμινοκυστεΐνης (GCL) και τη GSH συνθετάση (Aquilano et al., 2014). Η ρύθμιση της έκφρασης των ενζύμων αυτών διαμεσολαβείται μέσω του στοιχείου απόκρισης σε αντιοξειδωτικά (ARE), μια cis αλληλουχία ενισχυτή που ρυθμίζει την μεταγραφή διαφόρων αντιοξειδωτικών γονιδίων (Kumar et al., 2014). Έτσι, οι ενώσεις στεμφύλων μπορεί να αυξήσουν τα επίπεδα GSH επάγοντας την έκφραση ή την ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων σε πρόβατα με χαμηλή GSH (Goutzourelas et al. 2015).

Η υπεροξείδωση λιπιδίων αποτελεί ένα κύριο χαρακτηριστικό του οξειδωτικού στρες και μπορεί να μετρηθεί με διάφορες μεθόδους, οι οποίες περιλαμβάνουν την ποσοτικοποίηση είτε των πρωτογενών (υδροϋπεροξειδίων), είτε των δευτερογενών (**TBARS**, ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ και F2-ισοπροστανία) προϊόντων της υπεροξείδωσης. Στην παρούσα εργασία, οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) δείχνουν πως ο συγκεκριμένος δείκτης παρουσιάζει στον ιστό της σπλήνας των 65 ημερών μείωση, από τις control στις πολυφαινολικές ομάδες, κατά 26,34%. Επίσης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση τόσο στις ομάδες ελέγχου όσο και στις πολυφαινολικές ομάδες. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση από τις 15 στις 42 ημέρες κατά 89,74%, από τις 15 στις 65 ημέρες κατά 92,06% στις ομάδες ελέγχου και κατά 94,15% στις πολυφαινολικές ομάδες. Η μείωση των επιπέδων TBARS εξηγείται και από την αύξηση της GSH η οποία συνέβαλε στην καταπολέμηση των

ελευθέρων ριζών με αποτέλεσμα τη μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσής. Συνεπώς, οι πολυφαινόλες συμβάλουν στην μείωση της οξειδωσής των λιπιδίων (Gerasopoulos K. et.al. 2014). Η μείωση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων εκτός από τις θετικές επιδράσεις για την υγεία του ζώου, θα μπορούσε επίσης να βελτιώσει την ποιότητα του κρέατος, καθώς η οξειδωσής των λιπιδίων στο κρέας είναι μία από τις κύριες αιτίες για τον περιορισμό της ποιότητας του (Arshad et al., 2013). Ειδικότερα, η οξειδωσής των λιπιδίων οδηγεί στην αλλοίωση της γεύσης και τη μείωση της διατροφικής αξίας του κρέατος και των προϊόντων του (Namand Ahn, 2003).

Η κυριότερη πηγή ROS στον άνθρωπο είναι η διαρροή ενεργοποιημένου οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια, το οποίο φυσιολογικά εμφανίζεται ως ενδιάμεσο κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και η τελική του τύχη είναι ο σχηματισμός μορίων νερού. Επιπρόσθετα, οι αντιδράσεις ουβικινόνης της αναπνευστικής αλυσίδας μπορούν να προκαλέσουν διαρροή ηλεκτρονίων απευθείας στο οξυγόνο. Συνολικά, μέχρι και 2% του οξυγόνου που εισέρχεται στην αναπνευστική αλυσίδα σχηματίζει ανιόντα σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$). Υποστηρίζεται ότι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν φλαβονοπροτεΐνες επίσης συνεισφέρουν ένα ποσοστό των συνολικών ROS. Υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) μπορούν να παράγουν ποικίλα ένζυμα, μεταξύ των οποίων αρκετές οξειδάσες. Τα κυριότερα από αυτά είναι η οξειδάση της ξανθίνης, η οξειδάση του NADPH και το σύμπλεγμα του κυτοχρώματος P450. Η καταλάση είναι το ένζυμο το οποίο μετατρέπει το H_2O_2 σε H_2O και O_2 . Στην παρούσα εργασία, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της καταλάσης στο αίμα κατά 28,47% από τις ομάδες ελέγχου στις πολυφαινολικές ομάδες. Επίσης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της καταλάσης στις ομάδες ελέγχου από τις 42 στις 65 ημέρες κατά 37,25%. Σε μία παρεμφερή μελέτη (Gerasopoulos et al. 2015), ύστερα από χορήγηση πολυφαινολικών προσθετών σε κοτόπουλα παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της καταλάσης στο αίμα, ενός εκ των πιο σημαντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων, τόσο στα ερυθροκύτταρα όσο και στους υπόλοιπους υπό μελέτη ιστούς. Παρόμοιες μελέτες έδειξαν ότι, η χορήγηση πολυφαινολικών προσθετών αύξησε τα επίπεδα της καταλάσης σε ιστό ήπατος, πνευμόνων και στο πλάσμα ποντικών (Hamden et al. 2009). Ωστόσο, στον ιστό της σπλήνας παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της καταλάσης τόσο στις ομάδες ελέγχου όσο και στις πολυφαινολικές. Το γεγονός ότι το εκχύλισμα προκάλεσε μείωση στην έκφραση και τη δραστηριότητα της CAT μπορεί να εξηγηθεί από την ικανότητά αυτών των πολυφαινολών να ενισχύουν άλλους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, όπως GSH, GCS και GST.

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. 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. Αύξηση της TAC παρατηρήθηκε μεταξύ ομάδων ελέγχου και πολυφαινολικών ομάδων, ωστόσο η αύξηση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική ούτε στον ιστό της σπλήνας ούτε στο αίμα. Σε άλλες μελέτες σε κοτόπουλα, βρέθηκε ότι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), ήταν αυξημένη και μάλιστα μεγαλύτερη για τις πολυφαινολικές ομάδες (Gerasopoulos K. et.al. 2014). Όπως γνωρίζουμε η TAC αναφέρεται στην αντιοξειδωτική ικανότητα αρκετών αντιοξειδωτικών μορίων. Η GSH αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά ωστόσο η TAC δεν αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η αύξηση της GSH μπορεί να λειτουργεί σαν αντιστάθμισμα της μείωσης άλλων αντιοξειδωτικών μορίων.

Τέλος, η μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μας υποδηλώνει το ποσοστό οξειδωσής που έχουν υποστεί οι πρωτεΐνες των ιστών, από τη δράση των ελευθέρων ριζών. Για τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων παρατηρούμε πως υπήρξε μία τάση για μείωση στον σπλήνα στις 42 ημέρες. Σε άλλα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε κοτόπουλα ύστερα από χορήγηση πολυφαινολών από υγρά

απόβλητα ελαιοτριβείου, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είχαν αυξημένες τιμές στις ομάδες control σε σχέση με τις πολυφαινολικές, ενώ με το πέρας των ημερών παρουσιάστηκε συνεχής μείωση στις πολυφαινολικές ομάδες, υποδεικνύοντας ότι οι πολυφαινόλες αποτρέπουν την οξείδωση των πρωτεϊνών (Gerasopoulos et.al. 2014). Έχει προταθεί ότι η διάσπαση του H_2O_2 από σίδηρο ή χαλκό είναι μια σημαντική πηγή $OH\cdot$ που μπορούν να οξειδώσουν τα υπολείμματα αμινοξέων στις πρωτεΐνες και οδηγούν στο σχηματισμό πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Stadtman και Levine, 2003). Έτσι, πολυφαινόλες που βρίσκονται στα στέμφυλα μπορούν να αναστέλλουν αυτές τις αντιδράσεις. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η οξείδωση πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει τον πολυμερισμό πρωτεϊνών και συσσωμάτωση, επηρεάζοντας έτσι την πεπτικότητα τους, η οποία μειώνει τη θρεπτική αξία των τροφών. (Zhang et al., 2013).

Συνοπτικά, από την παρούσα εργασία εξάγουμε το συμπέρασμα ότι ο εμπλουτισμός των ζωοτροφών με στέμφυλα, έχει ως αποτέλεσμα στον σπλήνα να μειώνεται ο δείκτης οξείδωσης των λιπιδίων και να αυξάνεται η GSH, ενώ στο αίμα αυξήθηκε η δράση της καταλάσης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως υπάρχει βελτίωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ζώων το οποίο εκτός από τις θετικές επιδράσεις για την υγεία του ζώου, θα μπορούσε επίσης να βελτιώσει την ποιότητα και την θρεπτική αξία του κρέατος ενώ παράλληλα θα μειωθεί η περιβαλλοντική ρύπανση που προκαλείται από την εναπόθεση των υπολειμμάτων οينوποιΐας στο έδαφος.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J of Biochem & Cell Biol*, 2007.
- Sies, H. *Oxidative Stress*. London: Academic; 1985.
- 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.
- Halliwell B. (1994). *Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet* 344:721–724
- Battin E. E., Brumaghim J. L. (2009) Antioxidant Activity of Sulfur and Selenium: A Review of Reactive Oxygen Species Scavenging, Glutathione Peroxidase, and Metal-Binding Antioxidant Mechanisms *Cell Biochem Biophys* 55:1–23
- Sengupta A., Ghosh S., Bhattacharjee S. (2004) Allium Vegetables in Cancer Prevention: An Overview *Asian Pacific J Cancer Prev*, 5: 237-245
- Pani G., Galeotti T. and Chiarugi P. (2010) Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress *Cancer Metastasis Rev* 29:351–378.
- B. Poljsak. *Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress*, 2011.
- Vera Dias. *The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease*, 2013.
- Janero DR., *Therapeutic potential of vitamin-E in the pathogenesis of spontaneous atherosclerosis. Free Radic Biol Med*, 1991.
- Kaplan M, Hayek T, Raz A, Coleman R, Dornfeld L, Vaya J, Aviram M., *Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis*, 2001.
- Durackova Z., *Some Current Insights info Oxidative Stress. Physiol Res*, 2010.
- Farrukh Aqil, Radha Munagala, Manicka V. Vadhanam, Hina Kausar, Jeyaprakash Jeyabalan, David J. Schultz, and Ramesh C., *Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk*, 2012.
- Bidlack WR, Omay ST., Meskin MS, Topham DKW, 2000 *Phytochemicals as bioactive agents*, CRC Press.
- Kris Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD, 2002 *Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. Am J Med* 113:S71-88.
- Shenoy NR, Choughuley ASU: *Inhibitory effect of diet related sulfhydryl compounds on the formation of carcinogenic nitrosamines* (1992) *Cancer Lett*, 65: 227-232.
- De Flora S, Ramel C: *Classification of mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis*(1990) *Basic Life Sci*, 52:461-462.
- Renaud S. and Lorgeiril M., (1992), *Wine alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease, Lancet* 339:1523–1526
- Singh RP, Tyagi AK, Dhanalakshmi S, Agarwal R, Agarwal C. *Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3. Int J Cancer*. 2004 108:733-740.
- Yamamoto T, Hsu S, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Lockwood P, Ueta E, Osaki T, Schuster G. *Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. J Pharmacol Exp Ther*. 2003 307:230-236.

- Agarwal C., Sharma Y. and Agarwal R., (2000), Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signalling and cell-cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis, *Mol. Carcinogen.* 28: 129–138.
- Singh RP, Tyagi AK, Dhanalakshmi S, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3. *Int J Cancer.* 2004 108:733-740.
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology.* 2000 148:187-197.
- Bagchi D, Ray SD, Bagchi M, Preuss HG, Stohs SJ. Mechanistic pathways of antioxidant cytoprotection by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Indian J Exp Biol.* 2002 40:717-726.
- Ye X, Krohn R.L., Liu W., Joshi S.S., Kuszynski C.A., McGinn T.R., Bagchi M, Preuss H.G., Stohs S.J. and Bagchi D., (1999), The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells, *Mol. Cell. Biochem.* 196: 99–108.
- Weisse ME, Eberly B, Person DA. Wine as a digestive aid: comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine. *BMJ.* 1995 311:1657-1660.
- Soares De Moura R, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP, Rubenich LM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmao Correia ML. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J Pharm Pharmacol.* 2002 11:1515-1520.
- Jackson RS. Chemical constituents of grapes and wine. In *Wine Science: Principles and applications.* Taylor SL ed. Academic Press: San Diego, 1993.
- *Quideau, S. P.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C. L.; Pouységu, L., Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis, 2011.*
- *Bravo L, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, Nutrition Rev, 1998.*
- Nagma Khan and Hasan Mukhtar, Tea polyphenols for health promotion, 2007.
- *Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, et al, Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study, 1995.*
- *Huber B, Eberl L, Feucht W, Polster J., Naturforsch, 2003.*
- Manach Claudine, Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., (2004), Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Society for Clinical Nutrition*, 79:727-47
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A., Capasso F, (1999), Flavonoids : Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, 4:337-353
- Harborne JB. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: *Plant flavonoids in biology and medicine.* Cody B, Middleton E, Harborne JB, eds. Alan Liss: New York, 1986.
- John H Hart. Hillis W.E., Inhibition of wood-rotting fungi by stilbenes and other polyphenols in eucalyptus sideroxylon, 1974.
- 40. Sandhya Khurana, Krishnan Venkataraman, Amanda Hollingsworth, Matthew Piche, and T. C. Tai, Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging, 2013.
- Ferguson Lynnette R, (2001), Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, 475:89-111
- Lauritzen B, Lykkesfeldt J, Friis, C (2003). Evaluation of a single dose versus divided dose regimen of danofloxacin in treatment of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Research in Veterinary Science* 74, 271–277.

- Lykkesfeldt J, Svendsen O (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 173(3):502-11.
- Lauritzen B, Lykkesfeldt J, Friis, C (2003). Evaluation of a single dose versus divided dose regimen of danofloxacin in treatment of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Research in Veterinary Science* 74, 271–277.
- Kataria A. K, Kataria N (2012a) Evaluation of oxidative stress in sheep affected with peste des petits ruminants. *J Stress Physiol Biochem* 8(4):72-77.
- Kataria A. K, Kataria N (2012b) Evaluation of oxidative stress in pigs affected with classical swine fever. *Porc Res* 2(2):35-38.
- Basu S, Eriksson M, (2001) Retinol palmitate counteracts oxidative injury during experimental septic shock. *Annals of the Academy of Medicine Singapore* 30: 265–269
- Deaton C.M, Marlin D.J, Smith N.C, Harris P.A, Roberts C.A, Schroter R.C, Kelly F.J (2004a). Pulmonary epithelial lining fluid and plasma ascorbic concentrations in horses affected by recurrent airway obstruction. *American Journal of Veterinary Research* 65, 80–87.
- Deaton C.M, Marlin D.J, Smith N.C, Harris P.A, Schroter R.C, Kelly F.J (2004b). Antioxidant supplementation in horses affected by recurrent airway obstruction. *Journal of Nutrition* 134, S2065– S2067.
- Deaton C.M, Marlin D.J, Smith N.C, Roberts C.A, Harris P.A, Schroter R.C, Kelly F.J (2005). Antioxidant and inflammatory responses of healthy horses and horses affected by recurrent airway obstruction to inhaled ozone. *Equine Veterinary Journal* 37, 243–249.
- Hogan J.S, Weiss W.P, Todhunter D.A, Smith K.L, Schoenberger P.S (1992). Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. *Journal of Dairy Science* 75: 399–405.
- Smith K.L, Hogan J.S, Weiss W.P, (1997) Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J. Anim. Sci.* 75:1659–1665
- Weiss W.P, Hogan J.S, Smith K.L (2004) Changes in vitamin C concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science* 87: 32–37
- Wessely-Szponder J, Bobowiec R, Martelli F, Wojcik M, Kosior-Korzecka U (2004) Assessment of neutrophil components as markers of lung injury in the course of bovine respiratory tract infections. *Polish Journal of Veterinary Science* 7: 157–161
- Celi P (2010). The role of oxidative stress in small ruminants health and production, *R. Bras. Zootec.*, v.39: 348-363
- Jain A, Flora SJ ((2012) Dose related effects of nicotine on oxidative injury in young, adult and old rats. *J Environ Biol.* 33(2):233-8
- Scholz, R.W. Graham K.S. Gumprecht E. Reddy C.C. (1989). «Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation». *Ann NY Acad Sci* 570: 514–7.
- Hughes, RE (1964). «Reduction of dehydroascorbic acid by animal tissues». *Nature* 203 (4949): 1068–9.
- Clementi, Emilio; Smith, Guy Charles; Howden, Martin; Dietrich, Salvador; Bugg, S; O'Connell, MJ; Goldsbrough, PB; Cobbett, CS (1999). «Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*». *The Plant cell* 11 (6): 1153–64.
- J. G. Salway, *Ιατρική Βιοχημεία με μια Ματιά*, 2η Έκδοση. Blackwell Publishing, 2006.
- Vivas M, Nonier M.F, Vivas de Gaulejac N, Absalon C, Bertrand A, Mirabel M (2004). Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 513: 247-256.

- Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, Trizoglou I, Wallace Hayes A, Tsatsakis A.M, Kouretas D (2013). 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
- Nile SH, Kim SH, Ko EY, Park S.W (2013) Polyphenolic contents and antioxidant properties of different grape (V. vinifera, V. labrusca, and V. hybrid) cultivars BioMed Res. Int Volume 2013, Article ID 718065, 5 pages.
- Kammerer D, Claus A, Schieber A, Carle R (2005). A novel process of polyphenols from grape (Vitisvinifera L) pomace. Journal of Food Science. 70: 157-163.
- Goutzourelas N, Stagos D, Demertzis N, Mavridou P, Karterolioti H, Georgadakis S, Kerasiote E, Aligiannis N, Skaltsounis L, Tsatsakis A.M, Hayes A.W, Kouretas D. (2014). Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. Human and Experimental Toxicology. 33(11):1099-112.
- Maton, Anthea; Jean Hopkins, Charles William McLaughlin, Susan Johnson, Maryanna Quon Warner, David LaHart, Jill D. Wright (1993). Human Biology and Health. Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall.
- Κείθ Μουρ (2013). Κλινική Ανατομία. Broken Hill. σελ. 176-7.
- Μήτσιος Δημήτριος, ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ (ΝΕΦΡΙΚΟΣ – ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΣ - ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ) ΑΠΟ ΝΕΑΡΑ ΧΟΙΡΙΔΙΑ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα 2014.
- Καραβέλη Χριστίνα, ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΚΑΡΔΙΑΚΟ, ΝΕΦΡΙΚΟ, ΜΥΪΚΟ ΚΑΙ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟ ΙΣΤΟ ΑΠΟ ΝΕΑΡΑ ΧΟΙΡΙΔΙΑ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα 2014.
- Οικονομίδης Δημήτριος, ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΑΙΜΑ ΑΠΟ ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΟΥ ΥΠΕΣΤΗΣΑΝ ΑΓΩΓΗ ΜΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα 2013.
- Aquilano, K., Baldelli, S., Ciriolo, M.R., 2014. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. Front Pharmacol. 26 (5), 196.
- Kumar, H., Kim, I.S., More, S.V., Kim, B.W., Choi, D.K., 2014. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. Nat. Prod. Rep. 31 (1), 109–139.
- DeLeve, L.D., Kaplowitz, N., 1990. Importance and regulation of hepatic glutathione. Semin. Liver Dis. 10 (4), 251–266.
- Chen, Y.P., Chen, X., Zhang, H., Zhou, Y.M., 2013. Effects of dietary concentrations of methionine on growth performance and oxidative status of broiler chickens with different hatching weight. Br. Poult. Sci. 54 (4), 531–537
- Konstantinos Gerasopoulos a,b, Dimitrios Stagos a, Stylianos Kokkas b, Konstantinos Petrotos , Dimitrios Kantas b, Panagiotis Goulas b, Dimitrios Koureta . Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. a Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Greece b Department of Biosystem Engineering, Technical Education Institute of Thessaly.
- Arshad, M.S., Anjum, F.M., Khan, M.I., Shahid, M., Akhtar, S., Sohaib, M., 2013. Wheat germ oil enrichment in broiler feed with α -lipoic acid to enhance the antioxidant potential and lipid stability of meat. Lipids Health Dis. 4 (12), 164.

- GOUTZOURELAS N., STAGOS D., HOUSMEKERIDOU A., KARAPOULIOU Ch., KERASIOTI E., ALIGIANNIS N., SKALTSOUNIS A., SPANDIDOS D., TSATSAKIS A. and KOURETAS D., Grape pomace extract exerts antioxidant effects through an increase in GCS levels and GST activity in muscle and endothelial cells, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, June 15, 2015.
- Yang T, Li X, Zhu W, Chen C, Sun Z, Tan Z and Kang J: Alteration of antioxidant enzymes and associated genes induced by grape seed extracts in the primary muscle cells of goats in vitro. PLoS One 9: e107670, 2014.
- Fernández-Iglesias A, Quesada H, Díaz S, Pajuelo D, Bladé C, Arola L, Salvadó MJ and Mulero M: Combination of grape seed proanthocyanidin extract and docosahexaenoic acid-rich oil increases the hepatic detoxification by GST mediated GSH conjugation in a lipidic postprandial state. Food Chem 165: 14-20, 2014.