



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ (ΚΑΡΔΙΑ-
ΗΠΑΡ) ΑΠΟ ΝΕΑΡΑ ΠΡΟΒΑΤΑ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ**

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



ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ Ν. ΚΟΥΚΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα τον οποίον θα ήθελα να ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό του.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω τον Λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο, για την βοήθεια κατά τη διάρκεια του πειράματος και τον Γιάννη Καφαντάρη με τον οποίο συνεργάστηκα στα πλαίσια μεταδιδακτορικού προγράμματος.

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 καρδιακό και ηπατικό ιστό. Τα είκοσι οχτώ (28) πρόβατα που εκτράφηκαν χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες. Σε αυτές τις δύο ομάδες χορηγήθηκε διαφορετικό σιτηρέσιο. Η πρώτη ομάδα αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου ενώ η δεύτερη ομάδα αποτελούνταν από τα νεαρά πρόβατα στο σιτηρέσιο των οποίων, περιέχονταν επιπλέον στέμφυλα, τα οποία περιέχουν πολυφαινόλες. Τα πρόβατα εκτράφηκαν με το πειραματικό σιτηρέσιο για πενήντα (50) ημέρες, διότι τις πρώτες 15 ημέρες, τρέφονταν μόνο με το μητρικό γάλα. Πραγματοποιήθηκαν 3 ιστοληψίες – 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 καρδιακός και ο ηπατικός ιστός, 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 υπεροξειδωσης των λιπιδίων και τέλος τα πρωτεϊνικά καρβονύλια για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσης των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν είναι τα εξής: Τα επίπεδα των CARBS μειώθηκαν στον ηπατικό ιστό των 42 ημερών, από τις control στις πολυφαινολικές ομάδες, κατά 35,44%. Τα TBARS παρουσιάζουν για τον ηπατικό ιστό των 65 ημερών μείωση, από τις control στις πολυφαινολικές ομάδες, κατά 33,39% και για τον καρδιακό ιστό των 65 ημερών, μείωση κατά 44,44%. Τα επίπεδα TAC στον ηπατικό ιστό των 65 ημερών, βρέθηκαν ελάχιστα μειωμένα κατά 4,90% από την control στην πολυφαινολική ομάδα. Τα επίπεδα της γλουταθειόνης βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα, από τις control στις πολυφαινολικές ομάδες, κατά 70,59%, στον ηπατικό ιστό των 65 ημερών. Στις υπόλοιπες μετρήσεις, οι μεταβολές της GSH δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Για την δραστικότητα της καταλάσης δεν υπήρξαν 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 tissues (cardiac and liver), 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: CARB levels in liver tissue of 42 days polyphenolic group decreased by 35.44% compared with the control. In TBARS assay, a reduction was found in both liver and heart tissue of 65 days polyphenolic group by 33.39% and 44.44%, respectively compared with the control. TAC levels in the 65 days polyphenolic group were slightly lower by 4.90% than those of the control group. Glutathione levels were significantly reduced compared with the control by 70.59% in the liver tissue of 65 days polyphenolic group. In the groups, changes in GSH were not statistically significant compared to control. As for the activity of catalase no statistically significant changes were displayed.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	2
ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	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	12
1.1.3 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών	14
1.1.4 Αντιοξειδωτική άμυνα	15
1.1.5 Οξειδωτικό στρες και διαταραχές της υγείας	17
1.1.6 Οξειδωτικό στρες και διαταραχή της υγείας των ζώων	18
1.2. Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις	18
1.2.1 Βιολογικές ιδιότητες των σταφυλιών	18
1.2.2. Ανατομία και χημική σύσταση σταφυλλιών	19
1.2.3 Στέμφυλα και περιβάλλον	20
1.3 Πολυφαινόλες.....	21
1.3.1 Χημική δομή και ομάδες.....	22
1.3.2 Φυσιολογικές δράσεις	23
1.3.3 Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία	24
1.4 Γενικές πληροφορίες για τα πρόβατα	24
1.4.1 Χαρακτηριστικά	25
1.4.2 Εγκυμοσύνη.....	25
1.4.3 Χιώτικο πρόβατο	25
1.5 Σκοπός	26
2.Υλικά και Μέθοδοι	27
2.1 Γενικά.....	27

2.2	Περιγραφή του σιτηρεσίου	28
2.2.1	Παρασκευή βιολειτουργικών ζωοτροφών.....	28
2.2.2	Παρασκευή βιολειτουργικών ζωοτροφών για τα πρόβατα (Ελληνικής φυλής, «Χιώτικα»).	29
2.2.3	Παρασκευή ενσιρώματος στεμφύλων.....	29
2.2.4	Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης (in vitro) των ζωοτροφών.	31
2.3	Ομογενοποίηση ιστών.....	32
2.4	Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.....	32
2.4.1	Γενικά.....	32
2.4.2	Μέθοδοι.....	33
1.	Μέτρηση γλουταθειόνης.....	33
2.	Δραστικότητα της Καταλάσης.....	36
3.	Ολική Αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC).....	38
4.	Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).	40
5.	Πρωτεϊνικά καρβονύλια.....	42
6.	Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.....	44
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
3.1	Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των παρασκευασμένων ζωοτροφών για τα πρόβατα	45
3.1.1.	Συσχέτιση των δύο μεθόδων κατά Spearman	47
3.1.2.	Συνολικά αποτελέσματα της αποτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ζωοτροφών	48
3.2	Επίπεδα Γλουταθειόνης.....	49
3.3	Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων	52
3.3	Επίπεδα TBARS	54
3.5	Επίπεδα TAC.....	57
3.6	Επίπεδα καταλάσης.....	60
4	. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	63
5	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Συστηματική ταξινόμηση προβάτων.....	25
Πίνακας 3 Σύσταση παρασκευασμένων σιτηρεσίων, ομάδα στεμφύλων.....	29
Πίνακας 2 Σύσταση παρασκευασμένων σιτηρεσίων, ομάδα control.....	29
Πίνακας 5 Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της GSH.....	34
Πίνακας 6 Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης.....	37
Πίνακας 7 Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC.....	39
Πίνακας 4 Τιμές IC50 των ζωοτροφών με τη μέθοδο DPPH και ABTS.....	48
Πίνακας 8 Επίπεδα GSH, ηπατικού ιστού στις ομάδες control.....	49
Πίνακας 9 Επίπεδα GSH, ηπατικού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες.....	50
Πίνακας 10 Επίπεδα GSH, ηπατικού ιστού στα πολυφαινολικά και στα control ζώα.....	50
Πίνακας 11 Επίπεδα GSH,καρδιακού ιστού στα control ζώα.....	50
Πίνακας 12 Επίπεδα GSH, καρδιακού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες.....	51
Πίνακας 13 Επίπεδα GSH, καρδιακού ιστού στα πολυφαινολικά και στα control ζώα.....	51
Πίνακας 14 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ηπατικού ιστού στις ομάδες control.....	52
Πίνακας 15 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ηπατικού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες.....	52
Πίνακας 16 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ηπατικού ιστού στα control και πολυφαινολικά ζώα.....	53
Πίνακας 17 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, καρδιακού ιστού στις ομάδες control.....	53
Πίνακας 18 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, καρδιακού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες.....	53
Πίνακας 19 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, καρδιακού ιστού στα control και πολυφαινολικά ζώα.....	54
Πίνακας 20 Επίπεδα TBARS, ηπατικού ιστού στις ομάδες control.....	55
Πίνακας 21 Επίπεδα TBARS, ηπατικού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες.....	55
Πίνακας 22 Επίπεδα TBARS, ηπατικού ιστού στα control και στα πολυφαινολικά ζώα.....	55
Πίνακας 23 Επίπεδα TBARS, καρδιακού ιστού στις ομάδες control.....	56
Πίνακας 24 Επίπεδα TBARS, καρδιακού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες.....	56
Πίνακας 25 Επίπεδα TBARS, καρδιακού ιστού στα control και πολυφαινολικά ζώα.....	56
Πίνακας 26 Επίπεδα TAC, ηπατικού ιστού στις ομάδες control.....	57
Πίνακας 27 Επίπεδα TAC, ηπατικού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες.....	58
Πίνακας 28 Επίπεδα TAC, ηπατικού ιστού στα control και στα πολυφαινολικά ζώα.....	58
Πίνακας 29 Επίπεδα TAC, καρδιακού ιστού στις ομάδες control.....	58
Πίνακας 30 Επίπεδα TAC, καρδιακού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες.....	59
Πίνακας 31 Επίπεδα TAC, ηπατικού ιστού στα control και πολυφαινολικά ζώα.....	59
Πίνακας 32 Επίπεδα καταλάσης, ηπατικού ιστού στις ομάδες control.....	60
Πίνακας 33 Επίπεδα καταλάσης, ηπατικού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες.....	60
Πίνακας 34 Επίπεδα καταλάσης, ηπατικού ιστού στα control και στα πολυφαινολικά ζώα.....	61
Πίνακας 35 Επίπεδα καταλάσης, καρδιακού ιστού στις ομάδες control.....	61
Πίνακας 36 Επίπεδα καταλάσης, καρδιακού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες.....	61
Πίνακας 37 Επίπεδα καταλάσης, καρδιακού ιστού στα control και πολυφαινολικά ζώα.....	62

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Δραστικές μορφές οξυγόνου.....	13
Εικόνα 2 Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ΔΜΟ.	15
Εικόνα 3 Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών.....	15
Εικόνα 4 Οξειδωτικό στρες.....	16
Εικόνα 5 Ασθένειες προκαλούμενες από οξειδωτικό στρες.....	17
Εικόνα 6 Ανατομία και σύσταση ράγας σταφυλιού.....	20
Εικόνα 7 Εναπόθεση των υποπροϊόντων της οινοποίησης (στέμφυλα) στο περιβάλλον.....	21
Εικόνα 8 Χημικές δομές πολυφαινολών.....	23
Εικόνα 9 Πρόβατα.....	24
Εικόνα 10 Χιώτικο πρόβατο.....	25
Εικόνα 11 Πειραματικό πλάνο εκτροφής – απογαλακτισμού των αναπτυσσόμενων αρνιών.....	27
Εικόνα 12 Συσκευασία πακεταρίσματος σιτηρεσίων.....	31
Εικόνα 13 Ομογενοποίηση α) με γουδί β) χρήση υπερήχων.....	32
Εικόνα 14 Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης.....	33
Εικόνα 15 Ανακύκλωση και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.....	34
Εικόνα 16 Φάσμα απορρόφησης του 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκού οξέος (Dojindo Molecular Technologies).....	35
Εικόνα 17 Μονοπάτι αναγωγής του H_2O_2 σε H_2O	37
Εικόνα 18 Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA.....	40
Εικόνα 19 Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (2,4-δινιτριφαινυλυδραζίνη) και σχηματισμός του 2,4-δινιτροφαινυλυδραζονίου.....	42
Εικόνα 20 Ήπαρ αρνιού.....	64
Εικόνα 21 Τα κύρια μέρη της καρδιάς.....	64

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 7 Πρότυπη καμπύλη Αλβουμίνης.....	36
Διάγραμμα 1 Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση τη ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.....	45
Διάγραμμα 2 Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με στέμφυλα.....	45
Διάγραμμα 3 Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.....	46
Διάγραμμα 4 Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με στέμφυλα.....	46
Διάγραμμα 5 Στο διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση των τιμών IC50 της μεθόδου DPPH με τη μέθοδο του ABTS ($r=0,991$, $p<0,05$).....	47
Διάγραμμα 6 Στο διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση των τιμών IC50 της μεθόδου DPPH με τη μέθοδο του ABTS ($r=0,972$, $p<0,05$).....	48

Διάγραμμα 8 Επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH). * Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων control 65 ημερών και polyphenol 65 ημερών στον ηπατικό ιστό.	49
Διάγραμμα 9 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων control 42 ημερών και polyphenol 42 ημερών στον ηπατικό ιστό.	52
Διάγραμμα 10 Επίπεδα TBARS. Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων control 65 ημερών και polyphenol 65 ημερών στον ηπατικό και καρδιακό ιστό.	54
Διάγραμμα 11 Επίπεδα TAC. Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων control 65 ημερών και polyphenol 65 ημερών στον ηπατικό ιστό.	57
Διάγραμμα 12 Επίπεδα καταλάσης.	60

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 σθήσει το κερι 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 Gersham 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 μεταλλαξινέωση, 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 O₂

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.

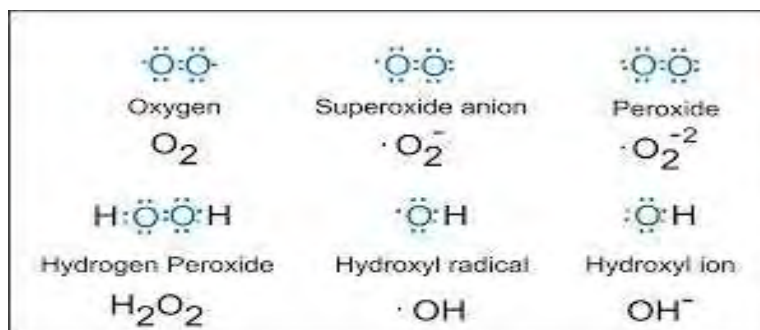
Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta et al., 2004; Pani and Galeotti, 2010; AICR, 2007), το θείο (Battin et al., 2009; Pani and Galeotti, 2010) ή τον άνθρακα. Το ίδιο το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του O₂, που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (*triplet state*) και συμβολίζεται με **3O₂**, 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 ***O₂**. Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ

τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (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:

- η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$),
- η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}),
- η ρίζα υπεροξειδίου (ROO^{\bullet}),
- το O_2 απλής κατάστασης,
- το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)
- και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$).

Στα δραστικά αυτά μοριακά είδη συμπεριλαμβάνεται επίσης και η δραστική μορφή αζώτου, το μονοξειδίο 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.

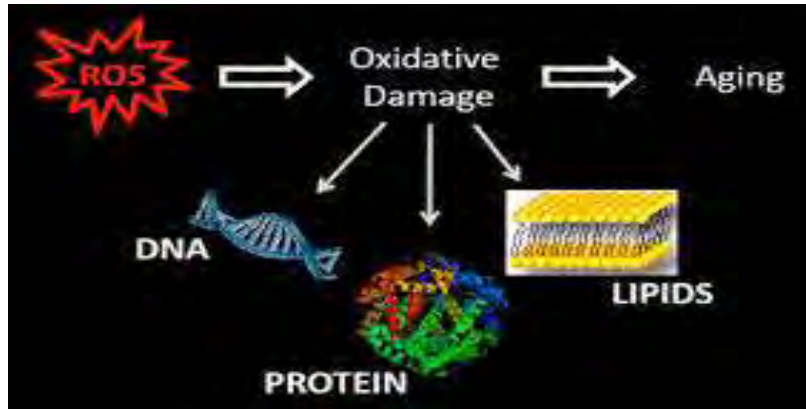
Όπως συνάγεται από τις αντιδράσεις τους, οι ελεύθερες ρίζες και κυρίως οι πολύ δραστικές όπως η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να προσβάλλουν μεγάλη ποικιλία μορίων όπως σάκχαρα, αμινοξέα, φωσφολιπίδια και γενικά λιπίδια, βάσεις DNA και οργανικά οξέα. Οι λιγότερο δραστικές ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή δραστικότερων καταλήγοντας τελικά στο ίδιο αποτέλεσμα. 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

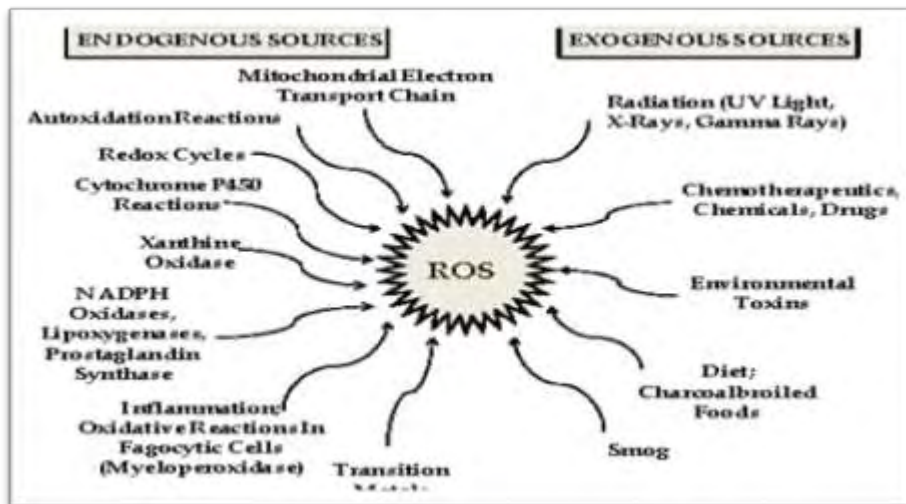
Οι ελεύθερες ρίζες στον ανθρώπινο οργανισμό μπορούν να σχηματιστούν τόσο ενδογενώς όσο και εξωγενώς. Ενδογενώς, σχηματίζονται μέσω των φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών, από όλα τα αερόβια κύτταρα μέσω της δράσης πολλών ενζύμων και πολλές φορές ως αποτέλεσμα παθολογικών καταστάσεων που περιλαμβάνουν το τραύμα, τις μολύνσεις και άλλα. Οι βασικότερες πηγές ελευθέρων ριζών είναι οι εξής:

- Ενζυμικά συστήματα όπως είναι το κυτόχρωμα P450, η οξειδάση του NAD(P)H, η λιπooξυγονάση, η κυκλοοξυγονάση και η οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν τις κυριότερες ενζυμικές πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.
- Ιόντα μετάλλων τα οποία αποτελούν σημαντικούς ενζυμικούς συμπαράγοντες. Στην ελεύθερη μορφή τους, τα ιόντα αυτά μπορούν, μέσα σε βιολογικά συστήματα, να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA προκαλώντας έτσι καταστροφές.
- Μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς. Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα (Pani and Galeotti, 2010; Cooke et al., 2013; Fujisawa et al., 2004; Vainio et al., 1999).
- Φαγοκύτταρα. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου που συνοδεύεται από παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ελευθέρων ριζών.
- Μιτοχονδριακό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων της αναπνευστικής αλυσίδας έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η κυριότερη πηγή ΔΜΟ 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 (Valko, M., et al., 2007).



Εικόνα 2 Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ΔΜΟ.

Επίσης, υπάρχουν αρκετοί εξωγενείς παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στη δημιουργία ελευθέρων ριζών, όπως τα συστατικά του καπνίσματος, η περιβαλλοντική ρύπανση, ο μεταβολισμός συγκεκριμένων διαλυτών, φαρμάκων, παρασιτοκτόνων καθώς και η έκθεση στην ραδιενέργεια-ακτινοβολία.

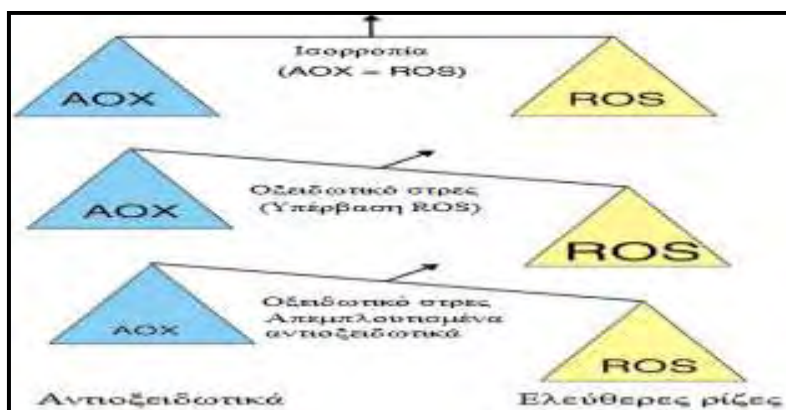


Εικόνα 3 Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών

1.1.4 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 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 4 Οξειδωτικό στρες

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

Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους:

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

Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι:

1. Αντιοξειδωτικά ένζυμα
2. Αντιοξειδωτικά μέταλλα
3. Αντιοξειδωτικά από τρόφιμα

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. 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.

Στα εξωγενή αντιοξειδωτικά συγκαταλέγονται οι δεσμευτές ελευθέρων ριζών όπως είναι η βιταμίνη-E, το σύμπλεγμα της οποίας είναι ένα από τα πιο ευρέως διαδεδομένα αντιοξειδωτικά στη φύση. Η βιταμίνη E αντιδρά εύκολα με τις ελεύθερες ρίζες των λιπαρών οξέων και ενώ οξειδώνεται η ίδια, αποτρέπει την οξείδωση των λιπιδίων και την περαιτέρω καταστροφή των ιστών. Η οξειδωμένη

μορφή της E ανάγεται με τη βοήθεια της βιταμίνης C και της γλουταθειόνης (Janero, D., et al., 1991).

Επίσης, περιλαμβάνεται τόσο η βιταμίνη-C, όσο και το β-καροτένιο. Επιπλέον, άλλα εξωγενή αντιοξειδωτικά αποτελούν διάφορα ιχνοστοιχεία όπως ψευδάργυρος (Zn), χαλκός (Cu) και μαγνήσιο (Mg). Τέλος, κάποια φάρμακα και κάποιες ουσίες που επιδρούν στο μεταβολισμό των ελευθέρων ριζών έχουν τη δυνατότητα να λειτουργήσουν ως εξωγενή αντιοξειδωτικά.

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως από:

1. Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.
2. Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS). Αυτό συμβαίνει είτε λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS, λόγω της ύπαρξης παραγόντων που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.

1.1.5 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, χρόνια σύνδρομο κόπωσης καθώς και AIDS ή παρεμφερείς ασθένειες (Poljsak, B., et al., 2011).



Εικόνα 5 Ασθένειες προκαλούμενες από οξειδωτικό στρες.

1.1.6 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 2012α), 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

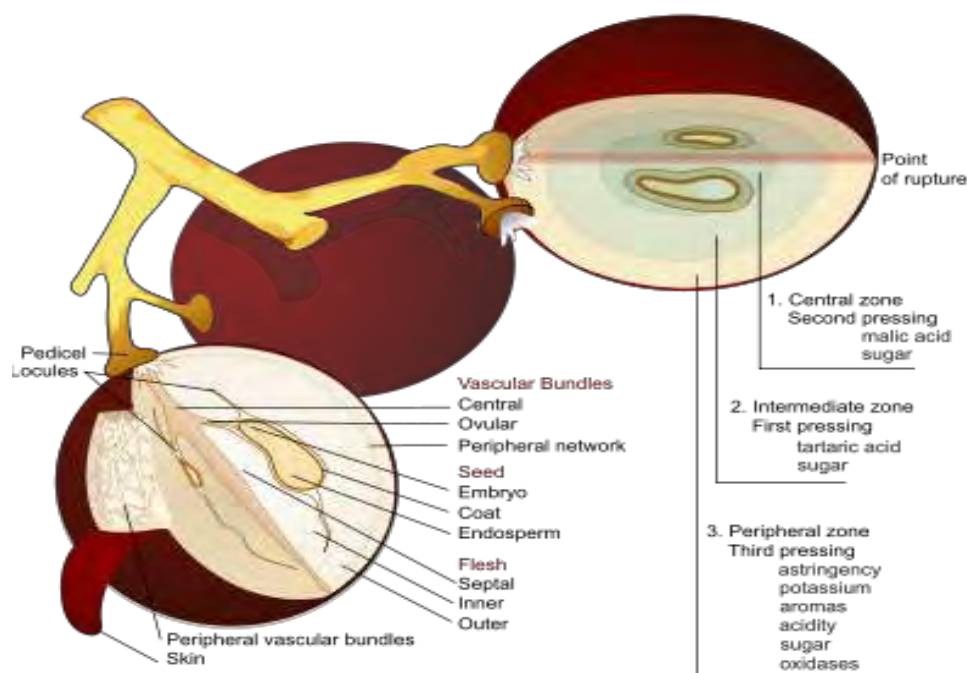
Η άμπελος είναι ένα από τα φυτά του οποίου ο καρπός (τα σταφύλια) και το κύριο προϊόν του (το κρασί) παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Η άμπελος ανήκει στην οικογένεια *Vitaceae*, με σημαντικότερο είδος το *Vitis vinifera* από το οποίο προέρχεται και το 90% της παγκόσμιας παραγωγής σταφυλιών (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 οξείδωση τη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Day et.al., 1997), και ελαττώνοντας τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων (Keenil 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). Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για την αντικαρκινική δράση των σταφυλιών και του κρασιού όπως 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). Ωστόσο, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ασκείται η χημειοπροστατευτική δράση των εκχυλισμάτων των σταφυλιών δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί και η μελέτη τους θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική (De Flora et.al., 2001). Άλλες βιολογικές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί σε εκχυλίσματα σταφυλιών είναι αντιοξειδωτικές (Bagchi et.al., 2000), αντιμικροβιακές (Weisse et.al., 1995), δράση κατά του έλκους (Saito et.al., 1998) και αντιυπερτασικές (Soares De Moura et.al., 2002). Επίσης, εκχυλίσματα από σπέρματα σταφυλιών ανέστειλαν σε *in vivo* πειράματα την ανάπτυξη μοσχεύματος από ανθρώπινο καρκίνο του προστάτη (Singh et.al., 2004), ενώ *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι εκχυλίσματα από σταφύλια παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα έναντι ανθρώπινων κυτταροκαλλιιεργειών από καρκινικά κύτταρα του μαστού, του προστάτη, του εντέρου και του πνεύμονα ενώ ενίσχυσαν την ανάπτυξη φυσιολογικών κυττάρων (Agarwal et.al., 2000α; Agarwal et.al., 2000β; Ye et.al., 1999; Bagchi 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 έκθλιψης / 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 βότρου. Γενικά όσο μεγαλύτερος είναι ο βότρυς, τόσο μικρότερος είναι ο βόστρυχας, σε σχέση με το σύνολο των ραγών.



Εικόνα 6 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.



Εικόνα 7 Εναπόθεση των υποπροϊόντων της οινοποίησης (στέμφυλα) στο περιβάλλον.

1.3 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται κυρίως από φυσικές αλλά επίσης και συνθετικές ή ημισυνθετικές, οργανικές χημικές ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων πολλαπλάσιων δομικών μονάδων της φαινόλης (Quideau, S., et al., 2011).

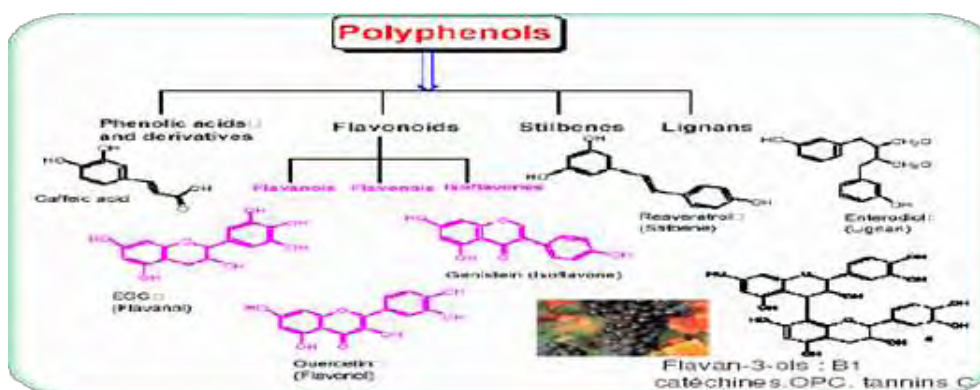
Βρίσκονται στα φυτά και στα τρόφιμα, τα προστατεύουν από εξωτερικούς παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία και οι μικροβιακές εισβολές, ενισχύοντας τη φυσική τους άμυνα. Στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες μπορούν να συμβάλλουν στην πικρή γεύση, στυφότητα, στο χρώμα, στη γεύση, στην οσμή και στην οξειδωτική σταθερότητα. Η κύρια πηγή για τα πολυφαινόλικά αντιοξειδωτικά είναι η διατροφή, μιας και οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε ποικιλίες τροφίμων που περιέχουν φυτοθεραπευτικά συστατικά. Τα περισσότερα όσπρια, φρούτα (όπως μήλα, μούρα, πεπόνι, κεράσια, βακκίνια, σταφύλια, αχλάδια, δαμάσκηνα, βατόμουρα, και φράουλες), και λαχανικά (όπως μπρόκολο, λάχανο, σέλινο, κρεμμύδι και μαϊντανός) είναι πλούσια σε πολυφαινόλικά αντιοξειδωτικά. Το κόκκινο κρασί, η σοκολάτα, το πράσινο τσάι, το ελαιόλαδο, η γύρη της μέλισσας είναι εναλλακτικές πηγές. Χιλιάδες είναι τα αντιοξειδωτικά και καθένα από αυτά έχει διαφορετικές ιδιότητες. Διαχωρίζονται σύμφωνα με τη χημική τους δομή σε μεγάλες ομάδες.

1.3.1 Χημική δομή και ομάδες

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Επίσης, οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια όπως τα φαινόλικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις όπως οι ταννίνες. Συναντώνται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμα και ολιγοσακχαρίτης. Ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων είναι η γλυκόζη αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη. Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια (Bravo, L., et al., 1998). Οι πολυφαινόλες χωρίζονται στις εξής κατηγορίες ανάλογα με την χημική τους δομή:

- Φλαβονοειδή. Αποτελούν τη μεγαλύτερη υποομάδα των πολυφαινολών και είναι ιδιαίτερα ευεργετικά για την υγεία λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων, της δράσης τους στην καταπολέμηση των φλεγμονών αλλά και της αντικαρκινικής τους δράσης. Παραδείγματα τροφών που περιέχουν φλαβονοειδή είναι το τσάι, ο καφές, το κόκκινο λάχανο, το ελαιόλαδο και άλλα.
- Φαινόλικά οξέα. Παρέχουν αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικρκινικές ιδιότητες. Μία διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά ολικής άλεσης μας παρέχει επαρκείς ποσότητες από φαινόλικά οξέα. Παραδείγματα τροφών που περιέχουν φαινόλικά οξέα είναι τα μήλα, τα κεράσια, τα ακτινίδια, οι φράουλες, τα κρεμμύδια, το τσάι και άλλα.
- Ανθοκυανίνες. Είναι αντιοξειδωτικές ουσίες που μας παρέχουν προστασία από τις φλεγμονές, τον καρκίνο και τις καρδιαγγειακές νόσους. Στην ουσία πρόκειται για τις χρωστικές που δίνουν το λαμπρό κόκκινο, μπλε και μωβ χρώμα στα ρόδια, στα σταφύλια, στα κόκκινα κρεμμύδια, στα μπλε μούρα και άλλα.
- Στιλβένια. Με την πιο διάσημη από αυτά την ρεσβερατρόλη, είναι ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά του Alzheimer, των καρδιαγγειακών νόσων και ιδιαίτερα της αθηρομάτωσης, του καρκίνου και του σακχαρώδους διαβήτη. Βρίσκονται στα μούρα, στη φλούδα των σταφυλιών ιδιαίτερα των κόκκινων, στο κρασί και σε άλλες φυτικές τροφές.

- Λιγνάνες. Οι λιγνάνες είναι χημικές ενώσεις που βρίσκονται στα φυτά , ιδιαίτερα στο λιναρόσπορο. Το λινάρι είναι ένα φυτό με εντυπωσιακά μωβ λουλούδια που είναι ενδημικά στη Μεσόγειο και την Ινδία. Οι λιγνάνες έχουν χρησιμοποιηθεί στα φυτικά φάρμακα για πολλούς αιώνες (Naghma, K., et al., 2007).



Εικόνα 8 Χημικές δομές πολυφαινολών

Το μέγεθος όλων αυτών των πολυφαινολών ποικίλει από μικρά μόρια (όπως η φαινόλη), έως πολυμερή (όπως οι ταννίνες) μεγάλου μοριακού βάρους.

1.3.2 Φυσιολογικές δράσεις

Οι πολυφαινόλες είναι ως ένα βαθμό υπεύθυνες για τις οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες των φυτικών τροφίμων. Προσδίδουν στα τρόφιμα και στα ποτά την χαρακτηριστική πικρή γεύση και τη στυφότητα. Εμπλέκονται και σε οξειδωτικές μεταβολές οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων.

Εκτός από τις ιδιότητες που προσδίδουν στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες είναι ιδιαίτερα ωφέλιμες για τον ανθρώπινο οργανισμό, αφού παρέχουν προστασία έναντι των καρδιοπαθειών και ορισμένων μορφών καρκίνου (Hertog., M., et al., 1995).

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 χημικές 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).

1.3.3 Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία

Στην περίπτωση των καρδιαγγειακών διαταραχών, το οξειδωτικό στρες και οι ΔΜΟ εμπλέκονται σε ενδοθηλιακές βλάβες, σε δημιουργία αρτηριοσκληρυνσης 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 δειχθεί 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 μουφλον 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.



Εικόνα 9 Πρόβατα.

Συστηματική ταξινόμηση	
Βασίλειο	Ζώα (Animalia)
Συνομοταξία	Χορδωτά (Chordata)
Ομοταξία	Θηλαστικά (Mammalia)
Τάξη	Αρτιοδάκτυλα (Artiodactyla)

Οικογένεια	Βοοειδή (Bovidae)
Υποοικογένεια	Αιγώδη (Caprinae)
Γένος	Πρόβατον (Ovis)
Είδος	O. aries

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 γκριζο. 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 λεπτούρου ελληνικού πρόβατου με παχύουρο αναμικτόμαλλου μικρασιατικού 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.



Εικόνα 10 Χιώτικο πρόβατο.

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.

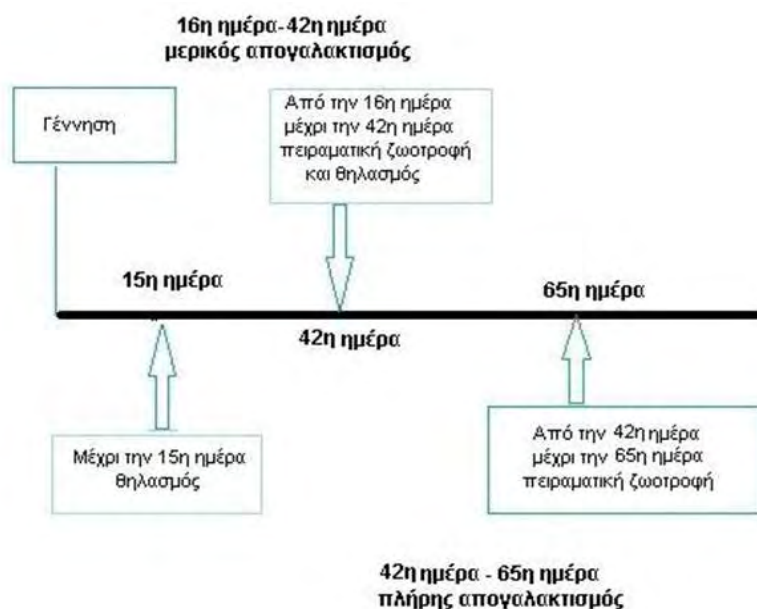
1.5 Σκοπός

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να προσδιοριστεί η επίδραση εκχυλισμάτων στέμφυλων, στους δείκτες οξειδωτικού στρες (GSH, CAT, TBARS, TAC, BARBONYLS) σε ιστούς (καρδιά και ήπαρ) 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, 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 11 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 ταϊστρες 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, συμπεριέχοντας παράλληλα 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 σιτηρεσιών. Κανονικό σιτηρέσιο (χορήγηση σε ομάδα Α, ελέγχου-control) και σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με ενσίρωμα στεμφύλων (χορήγηση σε ομάδα Β).

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

Πίνακας 3 Σύσταση παρασκευασμένων σιτηρεσιών, ομάδα control.

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

Πίνακας 2 Σύσταση παρασκευασμένων σιτηρεσιών, ομάδα στεμφύλων

Ομάδα (Β): καλαμπόκι (ενσιρωμένο με εκχύλισμα στεμφύλων), γάλα φυράματος, σογιάλευρο, πίτυρα, ισορροπιστής αρνιών, μονοφωσφορικό ασβέστιο, μαρμαρόσκονη, άλας.

2.2.3 Παρασκευή ενσίρωματος 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 παρακολουθήθηκε 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 12 Συσκευασία πακεταρίσματος σιτηρεσιών

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).

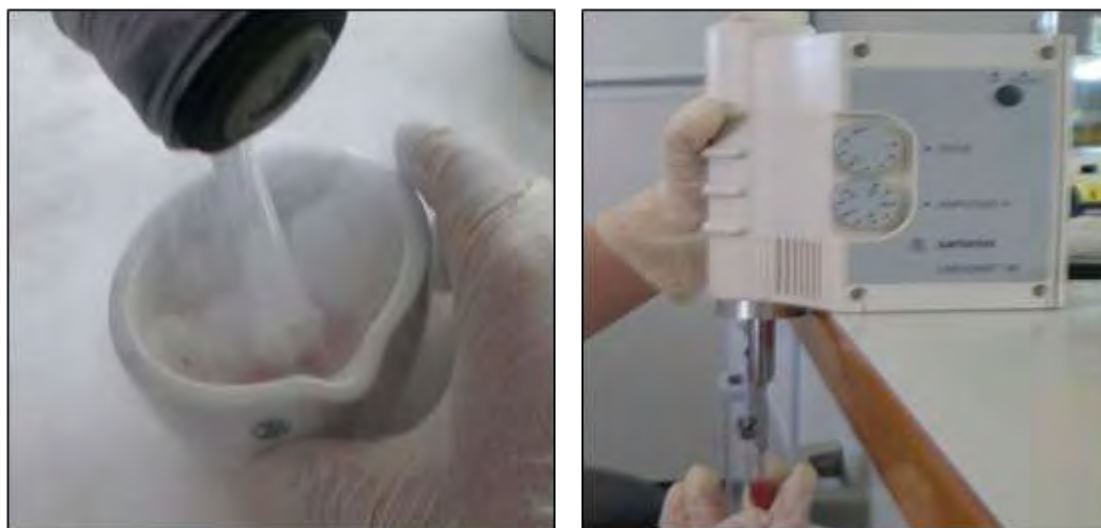
Μέσω των παραπάνω μεθόδων προσδιορίζεται η τιμή IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών η οποία εξουδετερώνει την ρίζα (DPPH, ABTS) κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση

της ουσίας. Έτσι υπολογίζοντας το IC_{50} των ζωοτροφών μπορούμε να εκτιμήσουμε την δραστικότητα και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

2.3 Ομογενοποίηση ιστών

Τα δείγματα του ηπατικού καρδιακού ιστού τοποθετήθηκαν σε erpendorf tubes 1,5mL, ψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους $-80^{\circ}C$ μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση. Ο ιστοί ομογενοποιήθηκαν 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 - $4^{\circ}C$).



Εικόνα 13 Ομογενοποίηση α) με γουδί β) χρήση υπερήχων

2.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες

2.4.1 Γενικά

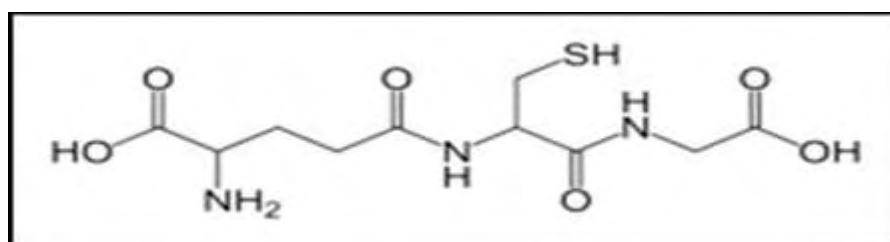
Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστικότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των ιστών. Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες, ένας από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, είναι οι ουσίες που

αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, ενώ για την καταστροφή των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

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).

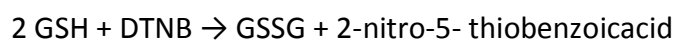


Εικόνα 14 Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης

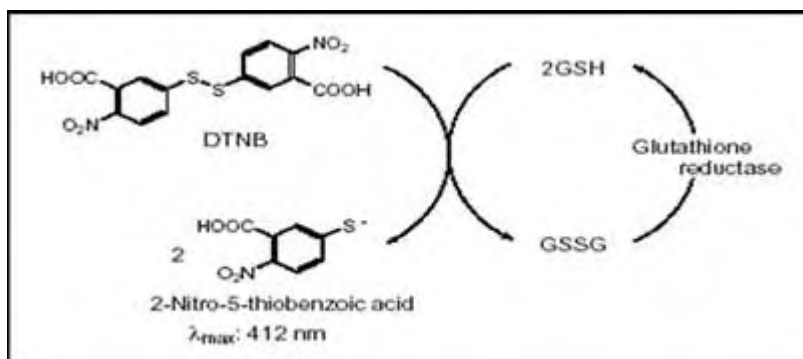
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battineta, 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι επίσης ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών (Sengurta, A., et al., 2004).

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειόδυο νιτρο-βενζοϊκό 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 (Reddy., Y.N., 2004).



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



Εικόνα 15 Ανακύκλωση και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης

Αντιδραστήρια

- **Phosphate buffer** 67 mM (pH 7,95). MB (KH_2PO_4): 136 MB (Na_2HPO_4): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 500 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0,227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 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.** ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB: 294,10. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Πειραματικό πρωτόκολλο

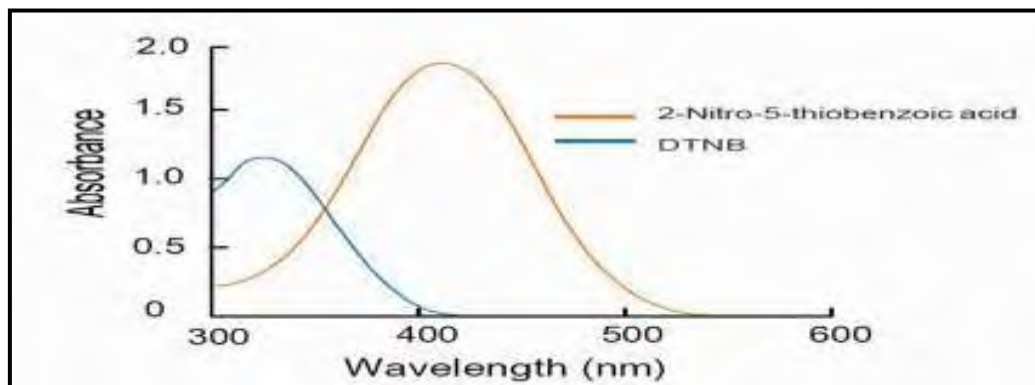
Αρχικά, 100μL ιστού προστέθηκαν σε 100μL TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 5 min στους 5°C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο erpendorf. 20 μL ιστού, αραιωμένου 1/2 αναμίχθηκαν με 660 μL ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 8.0) και 330μL DTNB. Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες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

Πίνακας 4 Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της GSH

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μL	660 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL

Απεσταγμένο νερό	20 μL	-
Ομογενοποιημένος Ιστός	-	20 μL

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).



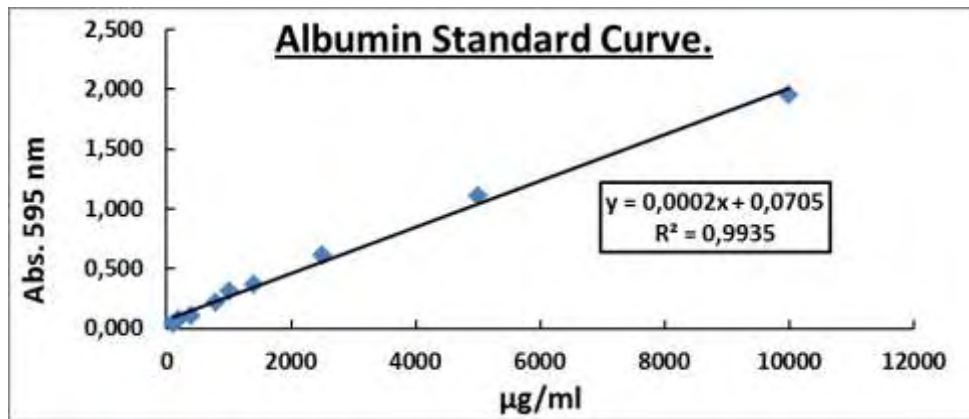
Εικόνα 16 Φάσμα απορρόφησης του 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκού οξέος (Dojindo Molecular Technologies).

Υπολογισμοί

Δραστικότητα GSH (μmol/mg total prot.) = (Absδείγματος - Δαβστυφλού/13.6) × 2 × 3 ή 4 (λόγω αραιώσεων) × 50.5 / Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL).

Όπου το 50.5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010μL) με τον όγκο του ιστού (20μL) (1010/20=50.5), πολλαπλασιάζουμε με 2 και την πρώτη αραιώση που έγινε από το TCA 5% (1:1), πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και με 4 για καρδιακό – ηπατικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

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

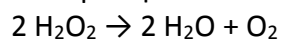


Διάγραμμα 1 Πρότυπη καμπύλη Αλβουμίνης

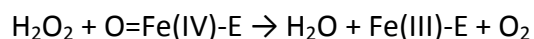
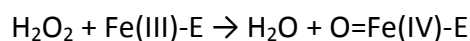
2 Δραστικότητα της Καταλάσης.

Αρχή της μεθόδου.

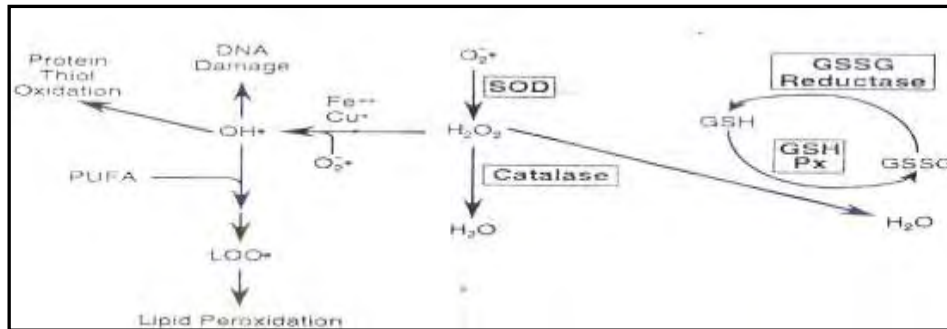
Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική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



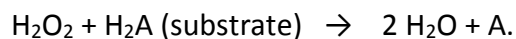
(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεμένη στο ένζυμο).



Εικόνα 17 Μονοπάτι αναγωγής του H₂O₂ σε H₂O

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

CAT



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

Διαλύματα

Phosphate buffer 67mM (pH 7.4) MB (KH₂PO₄): 136 και MB (Na₂HPO₄): 178. Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL KH₂PO₄ (67 mM) και 400 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂).

Το διάλυμα H₂O₂ είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

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

Πίνακας 5 Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης

Αναδεύουμε στο vortex και επώαζουμε στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επώαζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση. Κατόπιν, μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV). Τέλος, προσθέτουμε 5 μL 30% H₂O₂ στην κυψελίδα, την ανακινούμε

τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = $(\Delta Abs_{\text{sample}} \text{ per min} / 40) \times (75 \times 1000 \times 3 \text{ ή } 4 \times 2) / \text{Conc. Protein (mg/mL)}$.

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μmol/mL. Το 75 είναι ο παράγοντας αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000μL) με τον όγκο του δείγματος (40μL) (3000/40=75). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και με 4 για καρδιακό – ηπατικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης.

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

U = μmol/min. ΔAbs_{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).

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 (KH₂PO₄): 136 και MB (Na₂HPO₄): 178. Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH₂PO₄ (10 mM) και 400 mL Na₂HPO₄ (10 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0.136 g και τα διαλύουμε σε

100 mL νερό. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 0.712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.4.

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

Διαλύουμε 0.02 g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200 μL του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19.8 mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα, συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο). Εξαιτίας της 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 6 Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC

Ανακινούμε τα Eppendorfs μερικές φορές και τα επωάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης η αντιοξειδωτικές ουσίες του ιστού, εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη. Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρουμε 900 mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

Υπολογισμοί.

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

% Abs μείωση = (Abs τυφλού – Abs δείγματος) / Abs τυφλού x 100

ii) μmol DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος = [(% Abs μείωση / 100) x 50 x 25 x 3 ή 4 x 5] / 1000.

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

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μmol/L της κυψελίδας.

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

δ) Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και με 4 για καρδιακό – ηπατικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 5 επειδή το δείγμα αραιώνεται 1/5 κατά τη μέτρηση.

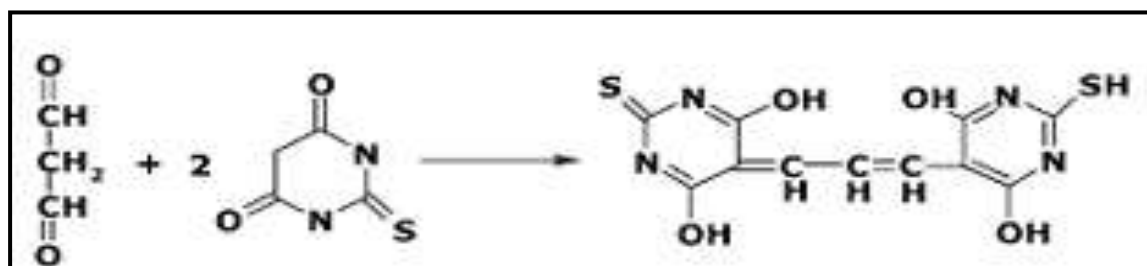
ε) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L σε mL.

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

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

Αρχή της μεθόδου.

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρων 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 υπεροξειδωσης των λιπιδίων.



Εικόνα 18 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 τριυδροξυμεθυλαμινομεθάνιου (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 $\mu\text{mol/L}$. Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και με 4 για καρδιακό – ηπατικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 3 επειδή το δείγμα αραιώνεται 3 φορές κατά τη μέτρηση.

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

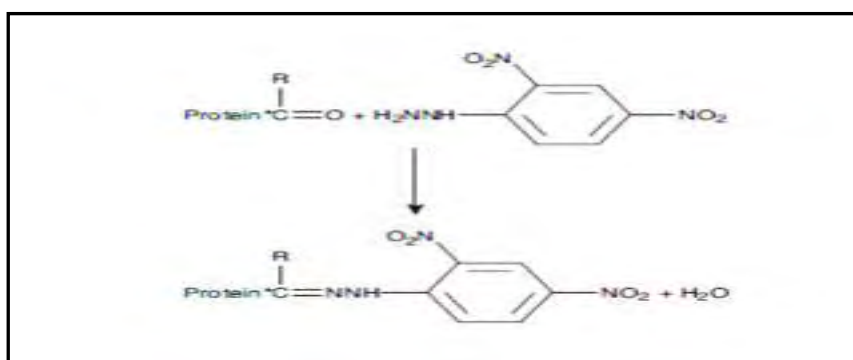
5 Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας δείκτης της οξείδωσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) που αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα σε διπλό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου $\text{C}=\text{O}$, ως συνήθως αποτελούν μέρος σε άλλες μεγαλύτερες λειτουργικές ομάδες. Παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr). Είναι ένας αξιόπιστος δείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες καθώς εκτρέπονται από τη φυσιολογική τους λειτουργία. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε μέτριο βαθμό, διασπώνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν υποστούν πολύ δριμύεις 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 επιδιορθωθεί ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη πιστότητα. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4-δίνιτριφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου. Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο Patsoukis et. al., (2004).



Εικόνα 19 Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (2,4-δίνιτριφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου

Διαλύματα

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

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

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

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0.2833 g DNPH σε 100 mL 2.5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Όταν το ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτούνται 0.5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάχνουμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.

- **Ουρία 5 M (pH 2.3).** (MB: 60.06)

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

Πειραματικό πρωτόκολλο.

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

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

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

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

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

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

Υπολογισμοί.

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

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

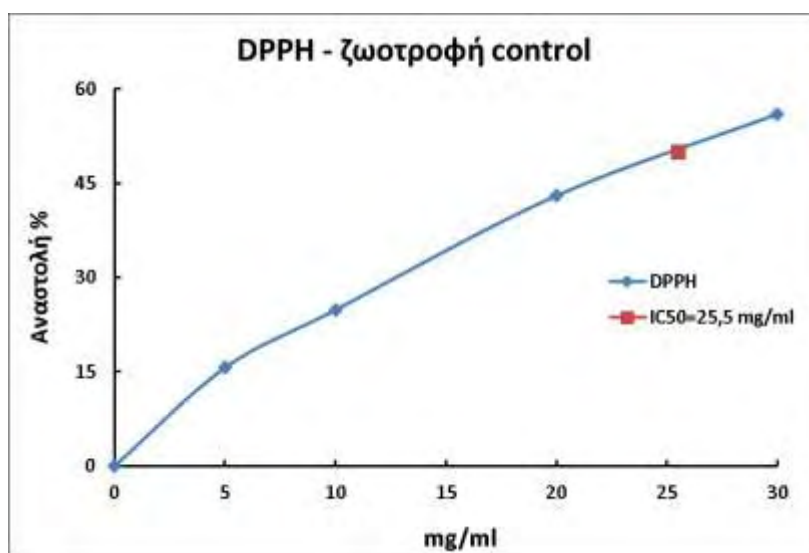
6 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

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

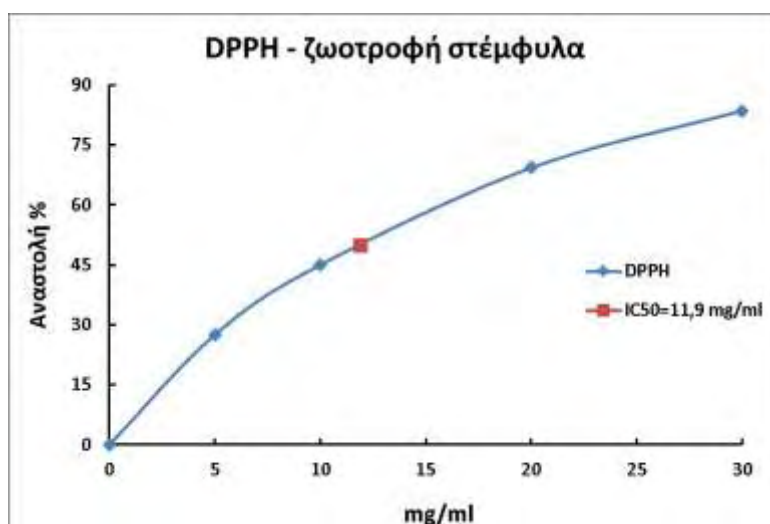
Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα 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).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

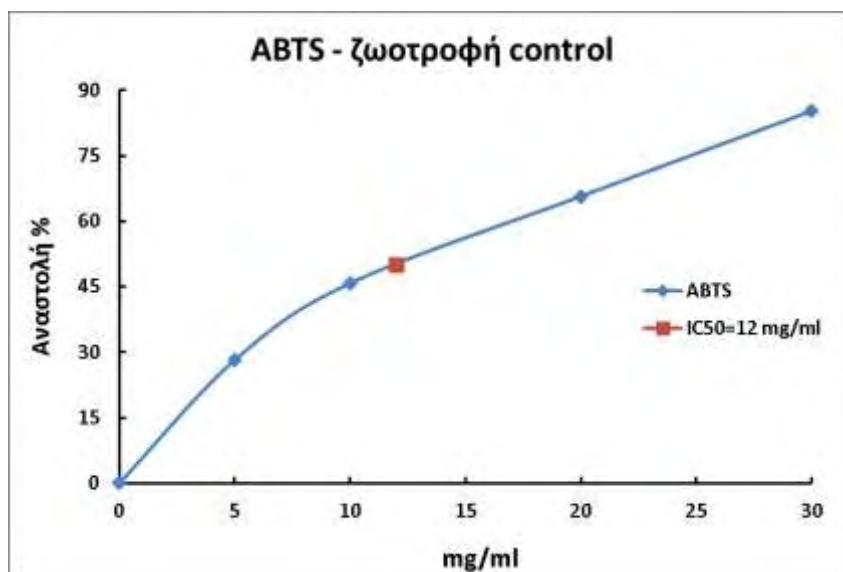
3.1 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των παρασκευασμένων ζωοτροφών για τα πρόβατα



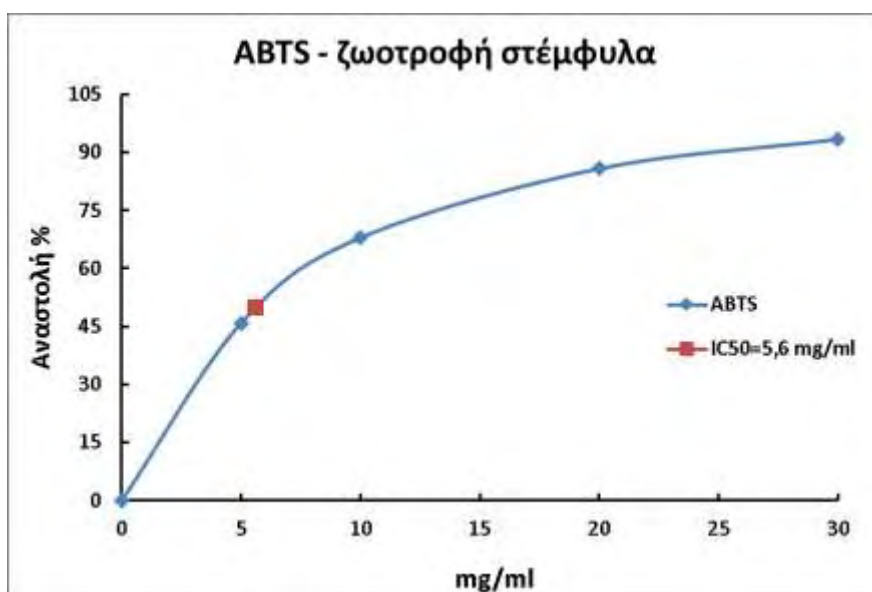
Διάγραμμα 2 Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση τη ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.



Διάγραμμα 3 Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με στέμφυλα.



Διάγραμμα 4 Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.



Διάγραμμα 5 Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με στέμφυλα.

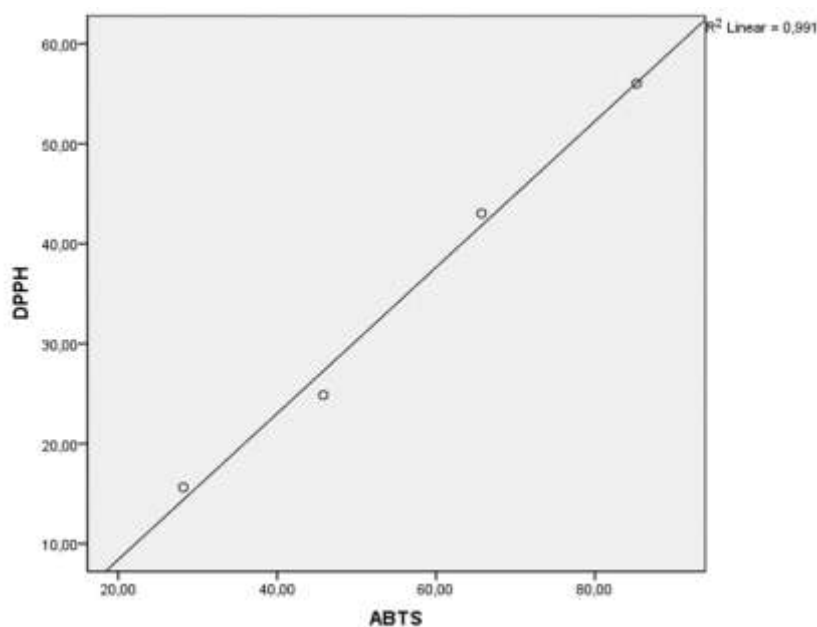
Από τις γραφικές παραστάσεις παρατηρείται ότι με την μέθοδο της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH, η ζωοτροφή εμπλουτισμένη με τα υποπροϊόντα οινοποιίας (στέμφυλα) ($IC_{50} = 11,9 \text{ mg/ml}$) παρουσιάζει διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου ($IC_{50} = 25,5 \text{ mg/ml}$). Με την μέθοδο της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS, οι τιμές IC_{50} είναι πιο χαμηλές ($IC_{50} = 12 \text{ mg/ml}$ και $IC_{50} = 5,6 \text{ mg/ml}$), 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 δραστικότητα της ζωοτροφής που είναι εμπλουτισμένη με τα στέμφυλα είναι περίπου διπλάσια σε σχέση με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου.

3.1.1. Συσχέτιση των δύο μεθόδων κατά Spearman

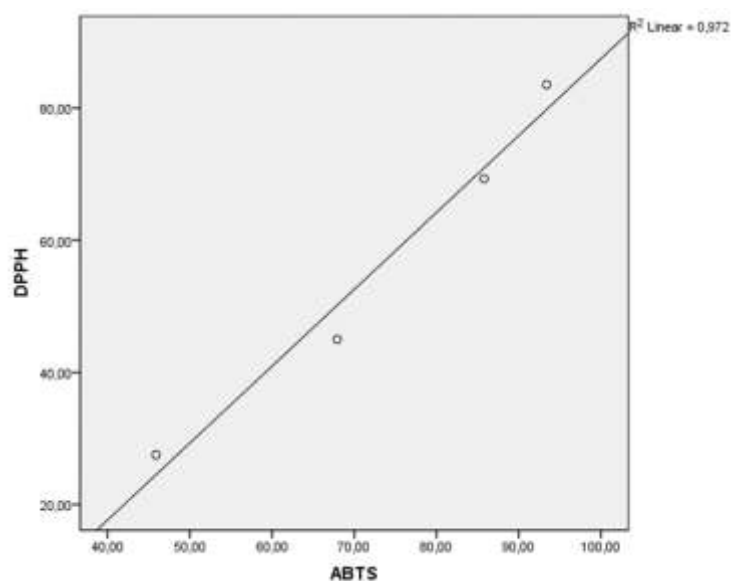
Για τον υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα στατιστικής SPSS18. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης.

Ζωοτροφή ομάδας ελέγχου (control)



Διάγραμμα 6 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 7 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.

3.1.2. Συνολικά αποτελέσματα της αποτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ζωοτροφών

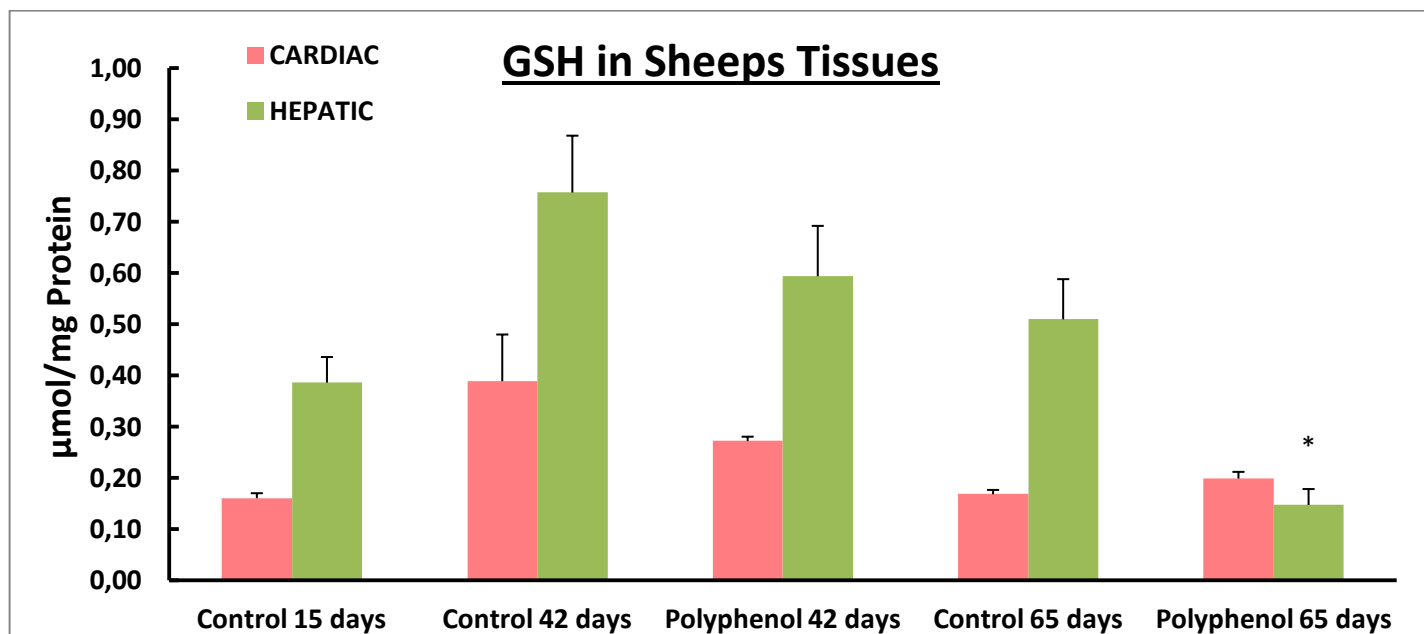
Ζωοτροφές	DPPH(IC₅₀) mg/ml	ABTS(IC₅₀) mg/ml
Ελέγχου (πρόβατα)	25,5	12
Στέμφυλα (πρόβατα)	11,9	5,6

Πίνακας 7 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 Dunett. Το επίπεδο σημαντικότητας προσδιορίστηκε σε * $p < 0,05$.

3.2 Επίπεδα Γλουταθειόνης



Διάγραμμα 8 Επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH). * Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων control 65 ημερών και polyphenol 65 ημερών στον ηπατικό ιστό.

Ηπατικός ιστός

- Σύγκριση των ομάδων control

Στις ομάδες control, τα επίπεδα της γλουταθειόνης, δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές από τις 15 ημέρες στις 42 ημέρες, ούτε από της 42 στις 65 ημέρες.

GSH (μmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	0,39 ± 558,002	0,76 ± 770,340	0,51 ± 563,995

Πίνακας 8 Επίπεδα GSH, ηπατικού ιστού στις ομάδες control.

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Συγκρίνοντας τις δύο πολυφαινολικές ομάδες των 42 και 65 ημερών (διάγραμμα 8), παρατηρούμε ότι τα επίπεδα της GSH μειώνονται στατιστικά σημαντικά από τις 42 ημέρες στις 65 ημέρες.

GSH (μmol/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	0,60 ± 0,098	0,15 ± 0,031

Πίνακας 9 Επίπεδα GSH, ηπατικού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες.

- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα (διάγραμμα 8), παρατηρούμε ότι:

- Στις 42 ημέρες δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές της GSH από τα control ζώα στα πολυφαινολικά.
- Στις 65 ημέρες παρατηρείται **στατιστικά σημαντική** μείωση της GSH από τα control στα πολυφαινολικά ζώα.

GSH (μmol/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM		
Control	0,70 ± 0,111	0,51 ± 0,078
Πολυφαινολικά	0,60 ± 0,098	0,15 ± 0,031

Πίνακας 10 Επίπεδα GSH, ηπατικού ιστού στα πολυφαινολικά και στα control ζώα.

Καρδιακός ιστός

- Σύγκριση των ομάδων control

Από το διάγραμμα 8, βλέπουμε ότι τα επίπεδα της GSH αυξάνονται από τις στατιστικά σημαντικά 15 στις 42 ημέρες, ωστόσο μειώνονται επίσης σημαντικά, από τις 42 στις 65 ημέρες.

GSH (μmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	0,16 ± 0,010	0,39 ± 0,091	0,17 ± 0,008

Πίνακας 11 Επίπεδα GSH,καρδιακού ιστού στα control ζώα.

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Στις πολυφαινολικές ομάδες τα επίπεδα της GSH δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές από τις 42 στις 65 ημέρες.

GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}$)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. \pm SEM	0,27 \pm 0,009	0,20 \pm 0,013

Πίνακας 12 Επίπεδα GSH, καρδιακού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες

- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

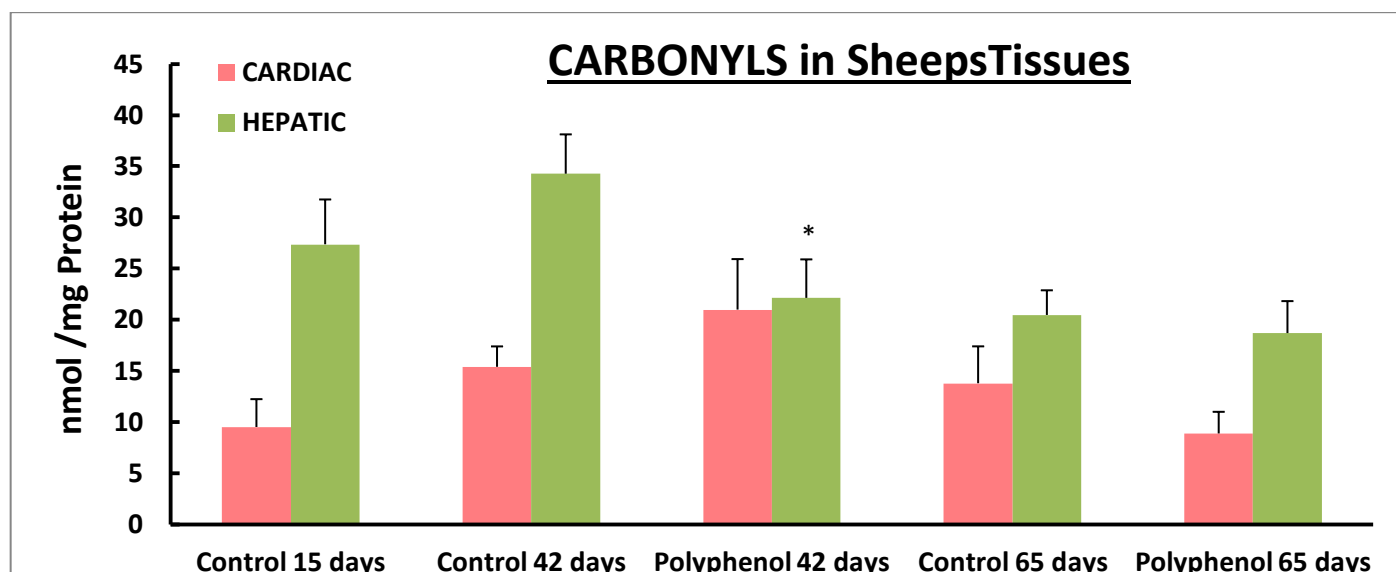
Από το παραπάνω διάγραμμα (διάγραμμα 8), παρατηρούμε ότι:

- Στις 42 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή της GSH από τα control ζώα στα πολυφαινολικά.
- Στις 65 ημέρες τα επίπεδα της GSH από τα control στα πολυφαινολικά ζώα είναι σχεδόν ίδια. (οριακά στατιστικά σημαντικό με $p=0,083$).

GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}$)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. \pm SEM		
Control	0,39 \pm 0,091	0,17 \pm 0,008
Πολυφαινολικά	0,27 \pm 0,009	0,20 \pm 0,013

Πίνακας 13 Επίπεδα GSH, καρδιακού ιστού στα πολυφαινολικά και στα control ζώα.

3.3 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων



Διάγραμμα 9 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων control 42 ημερών και polyphenol 42 ημερών στον ηπατικό ιστό.

Ηπατικός ιστός

- Σύγκριση των ομάδων control

Τα επίπεδα των καρβονυλίων δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές από τις 15 στις 42 ημέρες, και από τις 42 στις 65 ημέρες.

CARB (nmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	27,36 ± 4,383	34,26 ± 3,843	20,45 ± 2,412

Πίνακας 14 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ηπατικού ιστού στις ομάδες control.

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Στις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε οι τιμές των καρβονυλίων στις 42 ημέρες σε σχέση με τις 65 ημέρες δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

CARB (nmol/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	22,12 ± 3,764	18,68 ± 3,128

Πίνακας 15 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ηπατικού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες..

- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα (διάγραμμα 9), παρατηρούμε ότι:

- Α. Στις 42 ημέρες υπάρχει **στατιστικά σημαντική** μείωση των καρβονυλίων από τα control ζώα στα πολυφαινολικά.
- Β. Στις 65 ημέρες δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές ενδείξεις για τη μεταβολή των καρβονυλίων από τα control στα πολυφαινολικά ζώα.

CARB (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	42 ημέρες	65 ημέρες
Control	34,26 ± 3,843	20,45 ± 2,412
Πολυφαινολικά	22,12 ± 3,764	18,68 ± 3,128

Πίνακας 16 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ηπατικού ιστού στα control και πολυφαινολικά ζώα.

Καρδιακός ιστός

- Σύγκριση των ομάδων control

Για τις ομάδες control, οι μεταβολές δεν φάνηκαν να είναι στατιστικά σημαντικές.

CARB (nmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	9,50 ± 2,725	15,38 ± 1,997	13,78 ± 3,604

Πίνακας 17 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, καρδιακού ιστού στις ομάδες control.

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Στις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε μεγάλη μείωση των επιπέδων των καρβονυλίων από τις 42 στις 65 ημέρες.

CARB (nmol/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	20,98 ± 4,938	8,87 ± 2,113

Πίνακας 18 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, καρδιακού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες..

- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

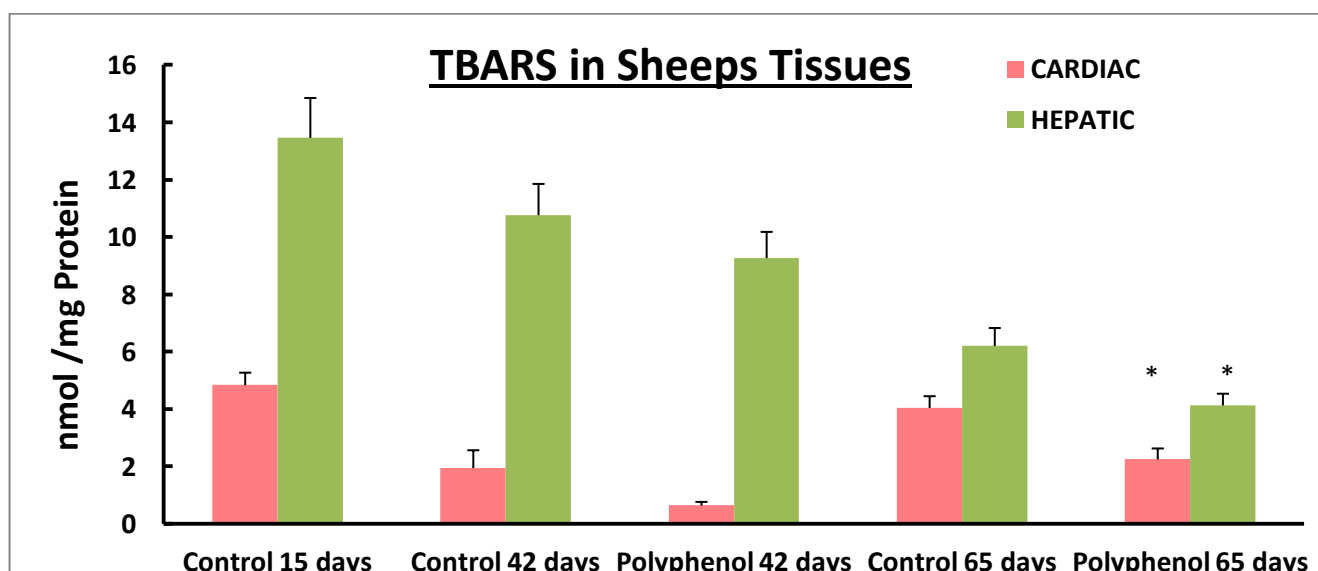
Από το παραπάνω διάγραμμα (διάγραμμα 9), παρατηρούμε ότι:

- 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.

CARB (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	42 ημέρες	65 ημέρες
Control	15,38 ± 1,997	13,78 ± 3,604
Πολυφαινολικά	20,98 ± 4,938	8,87 ± 2,113

Πίνακας 19 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, καρδιακού ιστού στα control και πολυφαινολικά ζώα.

3.3 Επίπεδα TBARS



Διάγραμμα 10 Επίπεδα TBARS. Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων control 65 ημερών και polyphenol 65 ημερών στον ηπατικό και καρδιακό ιστό.

Ηπατικός ιστός

- Σύγκριση των ομάδων control

Από το διάγραμμα 10, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των TBARS μειώνονται στατιστικά σημαντικά από τις 42 στις 65 ημέρες. Επιπλέον, τα TBARS είναι περισσότερο αυξημένα στις 15 από ότι στις 65 ημέρες (σημαντικό).

TBARS (nmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	13,47 ± 1,389	10,78 ± 1,090	6,20 ± 0,632

Πίνακας 20 Επίπεδα TBARS, ηπατικού ιστού στις ομάδες control.

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Στις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε σημαντική μείωση των επιπέδων των TBARS από τις 42 στις 65 ημέρες.

TBARS (nmol/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	9,27 ± 0,915	4,13 ± 0,410

Πίνακας 21 Επίπεδα TBARS, ηπατικού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες..

- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα (διάγραμμα 10), παρατηρούμε ότι:

- Α. Στις 42 ημέρες δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των TBARS από τα control ζώα στα πολυφαινολικά.
- Β. Στις 65 ημέρες τα TBARS μειώνονται **στατιστικά σημαντικά** από τα control στα πολυφαινολικά ζώα.

TBARS (nmol/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM		
Control	10,78 ± 1,090	6,20 ± 0,632
Πολυφαινολικά	9,27 ± 0,915	4,13 ± 0,410

Πίνακας 22 Επίπεδα TBARS, ηπατικού ιστού στα control και στα πολυφαινολικά ζώα.

Καρδιακός ιστός

- Σύγκριση των ομάδων control

Από το διάγραμμα 10, παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων TBARS από τις 15 στις 42 ημέρες, ενώ υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 42 στις 65 ημέρες.

TBARS (nmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	4,84 ± 0,437	1,94 ± 0,626	4,05 ± 0,410

Πίνακας 23 Επίπεδα TBARS, καρδιακού ιστού στις ομάδες control.

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Στις πολυφαινολικές ομάδες δεν παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων των TBARS από τις 42 στις 65 ημέρες.

TBARS (nmol/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	0,64 ± 0,132	2,25 ± 0,381

Πίνακας 24 Επίπεδα TBARS, καρδιακού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες..

- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

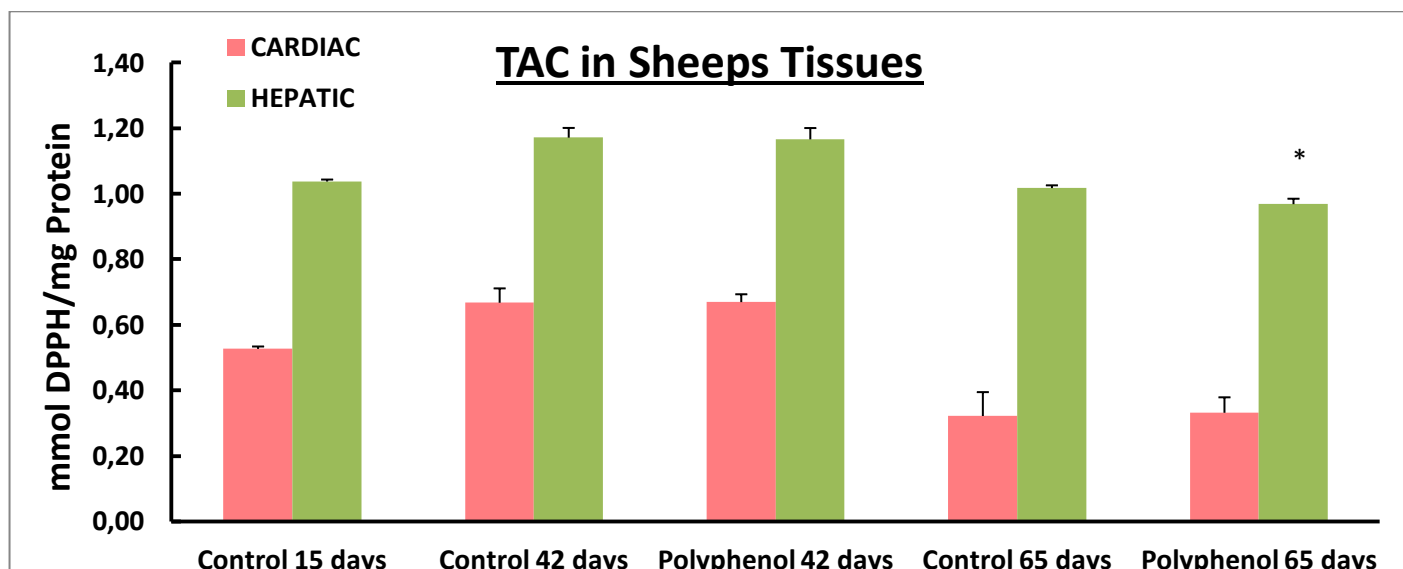
Από το παραπάνω διάγραμμα (διάγραμμα 10), παρατηρούμε ότι:

- Α. Στις 42 ημέρες υπάρχει μείωση των TBARS από τα control ζώα στα πολυφαινολικά. (οριακά στατιστικά σημαντικό με $p=0,0722$.)
- Β. Στις 65 ημέρες τα TBARS μειώνονται **στατιστικά σημαντικά**, από τα control στα πολυφαινολικά ζώα.

TBARS (nmol/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM		
Control	1,94 ± 0,626	4,05 ± 0,410
Πολυφαινολικά	0,64 ± 0,132	2,25 ± 0,381

Πίνακας 25 Επίπεδα TBARS, καρδιακού ιστού στα control και πολυφαινολικά ζώα.

3.5 Επίπεδα TAC.



Διάγραμμα 11 Επίπεδα TAC. Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων control 65 ημερών και polyphenol 65 ημερών στον ηπατικό ιστό.

Ηπατικός ιστός

- Σύγκριση των ομάδων control

Από το διάγραμμα 11, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα της TAC αυξάνονται στατιστικά σημαντικά από 15 στις 42 ημέρες, ωστόσο από τις 42 στις 65 ημέρες μειώνονται στατιστικά σημαντικά.

TAC (mmol DPPH/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	1,04 ± 0,006	1,17 ± 0,030	1,02 ± 0,008

Πίνακας 26 Επίπεδα TAC, ηπατικού ιστού στις ομάδες control.

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Στις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της TAC από τις 42 στις 65 ημέρες.

TAC (mmol DPPH/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	1,17 ± 0,035	0,97 ± 0,017

Πίνακας 27 Επίπεδα TAC, ηπατικού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες.

- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα (διάγραμμα 11), παρατηρούμε ότι:

- Στις 42 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC από τα control στα πολυφαινολικά ζώα.
- Στις 65 ημέρες παρατηρείται μείωση της TAC, **στατιστικά σημαντική** από τα control στα πολυφαινολικά ζώα.

TAC (mmol DPPH/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM		
Control	1,17 ± 0,030	1,02 ± 0,008
Πολυφαινολικά	1,17 ± 0,035	0,97 ± 0,017

Πίνακας 28 Επίπεδα TAC, ηπατικού ιστού στα control και στα πολυφαινολικά ζώα.

Καρδιακός ιστός

- Σύγκριση των ομάδων control

Από το διάγραμμα 11, παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων TAC από τις 42 στις 65 ημέρες.

TAC (mmol DPPH/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	0,53 ± 0,007	0,67 ± 0,044	0,32 ± 0,073

Πίνακας 29 Επίπεδα TAC, καρδιακού ιστού στις ομάδες control.

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Στις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της TAC από τις 42 στις 65 ημέρες.

TAC (mmol DPPH/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	0,67 ± 0,024	0,33 ± 0,047

Πίνακας 30 Επίπεδα TAC, καρδιακού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες..

- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

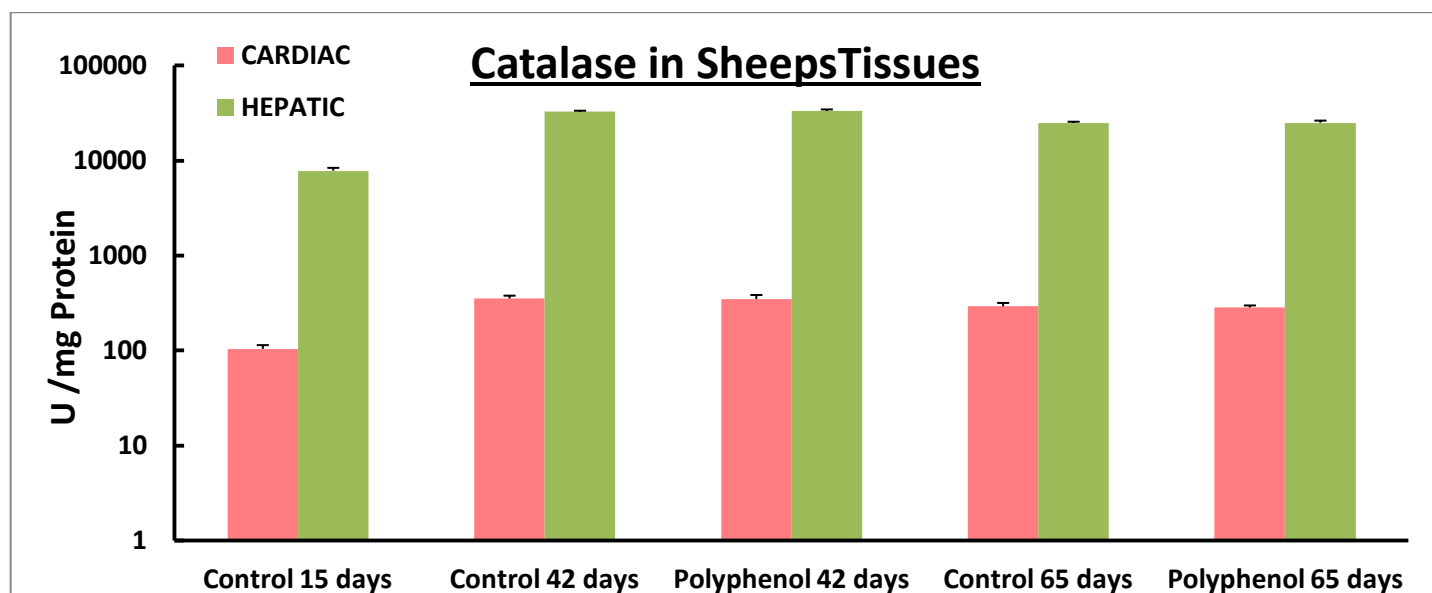
Από το παραπάνω διάγραμμα (διάγραμμα 11), παρατηρούμε ότι:

- Στις 42 ημέρες δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.
- Στις 65 ημέρες δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

TAC (mmol DPPH/mg protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM		
Control	0,67 ± 0,044	0,32 ± 0,073
Πολυφαινολικά	0,67 ± 0,024	0,33 ± 0,047

Πίνακας 31 Επίπεδα TAC, ηπατικού ιστού στα control και πολυφαινολικά ζώα.

3.6 Επίπεδα καταλάσης



Διάγραμμα 12 Επίπεδα καταλάσης.

Ηπατικός ιστός

- Σύγκριση των ομάδων control

Από το διάγραμμα 12, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα της καταλάσης αυξάνονται από 15 στις 42 ημέρες, ωστόσο από τις 42 στις 65 ημέρες μειώνονται. (και οι δύο μετρήσεις βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές.)

CAT (U/mg Protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	7.810,38 ± 558,00165	32.626,87 ± 770,340	25.023,90 ± 563,995

Πίνακας 32 Επίπεδα καταλάσης, ηπατικού ιστού στις ομάδες control.

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Στις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της καταλάσης από τις 42 στις 65 ημέρες.

CAT (U/mg Protein)	42 ημέρες	65 ημέρες
M.O. ± SEM	33.160,50 ± 1306,043	24.968,56 ± 1311,624

Πίνακας 33 Επίπεδα καταλάσης, ηπατικού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες.

- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα (διάγραμμα 12), παρατηρούμε ότι:

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

CAT (U/mg Protein) M.O. ± SEM	42 ημέρες	65 ημέρες
Control	32.626,87 ± 770,340	25.023,90 ± 563,995
Πολυφαινολικά	33.160,50 ± 1306,043	24.968,56 ± 1311,624

Πίνακας 34 Επίπεδα καταλάσης, ηπατικού ιστού στα control και στα πολυφαινολικά ζώα.

Καρδιακός ιστός

- Σύγκριση των ομάδων control

Από το διάγραμμα 12, παρατηρούμε ελάχιστη μείωση από τις 42 στις 65 ημέρες. (στατιστικά σημαντικό)

CAT (U/mg Protein) M.O. ± SEM	15 ημέρες	42 ημέρες	65 ημέρες
	104,06 ± 9,838	352,60 ± 24,871	291,40 ± 24,880

Πίνακας 35 Επίπεδα καταλάσης, καρδιακού ιστού στις ομάδες control.

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Στις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της καταλάσης από τις 42 στις 65 ημέρες.

CAT (U/mg Protein) M.O. ± SEM	42 ημέρες	65 ημέρες
	348,10 ± 35,479	283,41 ± 14,306

Πίνακας 36 Επίπεδα καταλάσης, καρδιακού ιστού στις πολυφαινολικές ομάδες.

- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Από το παραπάνω διάγραμμα (διάγραμμα 12), παρατηρούμε ότι:

- Α. Στις 42 ημέρες δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της καταλάσης.
- Β. Στις 65 ημέρες δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της καταλάσης από τα control στα πολυφαινολικά ζώα.

CAT (U/mg Protein) M.O. ± SEM	42 ημέρες	65 ημέρες
Control	352,60 ± 24,871	291,40 ± 24,880
Πολυφαινολικά	348,10 ± 35,479	283,41 ± 14,306

Πίνακας 37 Επίπεδα καταλάσης, καρδιακού ιστού στα control και πολυφαινολικά ζώα.

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 εκχύλισμάτων από στέμφυλα λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης η οποία βασίζεται κυρίως στην σημαντικά υψηλή περιεκτικότητά 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 απόβλητο 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 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.

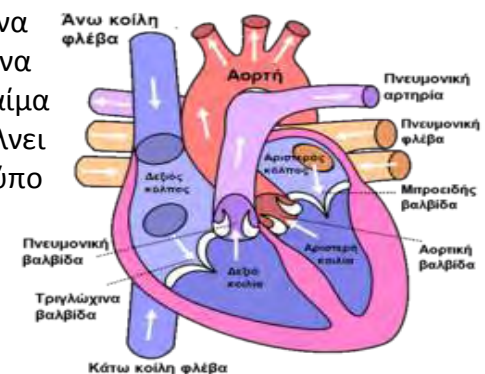
Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων στεμφύλων στον ηπατικό και καρδιακό ιστό νεαρών προβάτων. Οι ιστοί αυτοί είναι ζωτικής σημασίας για όλους τους οργανισμούς.

Συγκεκριμένα, Το ήπαρ είναι ένα ζωτικό όργανο που διαθέτουν τα σπονδυλωτά, καθώς και κάποια άλλα ζώα. Έχει ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών στο οποίο περιλαμβάνεται η αποτοξίνωση, η σύνθεση πρωτεϊνών και η παραγωγή βιοχημικών ουσιών απαραίτητων για την πέψη των τροφών. Το ήπαρ είναι απαραίτητο για τη ζωή. Επί του παρόντος δεν έχει ανευρεθεί τρόπος αντιστάθμισης των λειτουργιών του, σε περίπτωση πλήρους απουσίας του σε βάθος χρόνου, παρόλο που η αιμοκάθαρση ήπατος μπορεί να συνεισφέρει για ένα μικρό διάστημα. Το όργανο αυτό παίζει κυρίαρχο ρόλο στο μεταβολισμό και επιτελεί πολλές λειτουργίες του οργανισμού, μεταξύ άλλων την αποθήκευση γλυκογόνου, καταστροφή ερυθροκυττάρων, σύνθεση των πρωτεϊνών του πλάσματος, παραγωγή ορμονών και απομάκρυνση των τοξικών ουσιών από το σώμα, είτε είναι εξωγενείς είτε είναι παράγωγα του μεταβολισμού. Βρίσκεται κάτω από το διάφραγμα, στο δεξιό και άνω μέρος της κοιλίας, που ονομάζεται δεξιό υποχόνδριο, και επεκτείνεται και στο κεντρικό και άνω μέρος της κοιλίας, που ονομάζεται επιγάστριο. Παράγει τη χολή, ένα αλκαλικό μίγμα, που αποδομεί μικρά και περίπλοκα μόρια, πολλά από τα οποία είναι αναγκαία για της φυσιολογικές ζωτικές λειτουργίες. (Maton, et. Al. 1993).



Εικόνα 20 Ήπαρ αρνιού.

Η καρδιά είναι κοίλος μυς που δίνοντας στο αίμα πίεση, το κάνει να κυκλοφορεί στο εσωτερικό των αρτηριών, με τέτοιο τρόπο, ώστε να φτάνει σε όλα τα όργανα. Είναι κάτι σαν «αντλία» που παίρνει το αίμα από τις φλέβες, στις οποίες βρίσκεται σε χαμηλή πίεση και το στέλνει στις αρτηρίες με υψηλή. Η καρδιά αποτελείται από ένα ειδικό τύπο σκελετικού μυ που βρίσκεται μόνο σε αυτή και αποκαλείται καρδιακός μυς και αποτελεί το μυοκάρδιο. (Κειθ Μουρ, 2013).



Εικόνα 21 Τα κύρια μέρη της καρδιάς.

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες οι οποίοι ελέγχθηκαν ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστηριότητα της καταλάσης (CAT), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC- Total antioxidant capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric acid reactive substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

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 επισκευή 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 σημαντικά μειωμένα, από τις control στις πολυφαινολικές ομάδες, κατά 70,59%, στον ηπατικό ιστό των 65 ημερών. Στις υπόλοιπες μετρήσεις, οι μεταβολές της GSH δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Σε παρόμοιες εργασίες που έχουν διεξαχθεί, η χορήγηση πολυφαινολών, 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) . Μια εξήγηση για τη μείωση της GSH, που παρατηρήθηκε μπορεί να είναι ότι σε ηλικία 65 ημερών στον οργανισμό των προβάτων παρήχθησαν ενδογενή υψηλά επίπεδα γλουταθειόνης, από τον ίδιο τον οργανισμό των ζώων χωρίς την χορήγηση πολυφαινολών . Έτσι, οι βιοχημικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη σύνθεση GSH όχι μόνο δεν αυξήθηκαν περαιτέρω μετά την χορήγηση στεμφύλων, αλλά μειώθηκαν (Gerasopoulos K, et.al.). Επιπλέον, Chen et al. (2013) έχουν επίσης δείξει ότι η συμπληρωματική μεθειονίνη, κύριος πρόδρομος της σύνθεσης GSH, αυξάνει τα επίπεδα γλουταθειόνης σε κοτόπουλα πάχυνσης, με χαμηλή συγκέντρωση GSH αλλά μειωμένα τα επίπεδα γλουταθειόνης σε κοτόπουλα πάχυνσης, με υψηλή 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. Αντιθέτως, τα στέφυλα μπορεί να μειώσουν την έκφραση ή να αναστείλουν την δραστηριότητα του GCL ή GSH συνθετάσης σε πρόβατα με υψηλή GSH. Οι, DeLeve και Karlowitz (1990) έχουν αναφέρει ότι τα υψηλά επίπεδα GSH μπορεί να αναστέλλουν τη σύνθεση της, μέσω της αναστολής της GCL. Φυσικά, χρειάζονται περαιτέρω πειράματα για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση. Ωστόσο, αν αυτή η υπόθεση είναι σωστή, τότε θα τονίζει την ανάγκη για την προσθήκη αντιοξειδωτικών ενώσεων στις ζωοτροφές, ιδίως σε πολύ μικρή ηλικία, όταν ο οργανισμός δεν είναι αρκετά ώριμος για να παράγει αντιοξειδωτικά μόρια από μόνος του, όπως τη GSH.

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-ισοπροστάνια) προϊόντων της υπεροξείδωσης. Στην παρούσα εργασία, οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) δείχνουν πως ο συγκεκριμένος δείκτης παρουσιάζει για τον ηπατικό ιστό των 65 ημερών μείωση, από τις control στις πολυφαινολικές ομάδες, κατά 33,39% και για τον καρδιακό ιστό των 65 ημερών, μείωση κατά 44,44%. Για τις

υπόλοιπες μετρήσεις οι μεταβολές των TBARS δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Σε παρόμοιες μελέτες τα TBARS, ήταν σημαντικά μειωμένα στις πολυφαινολικές ομάδες σε σχέση τις control. Συνεπώς, οι πολυφαινόλες συμβάλουν στην μείωση της οξειδωσης των λιπιδίων (Gerasopoulos K. et.al. 2014). Η μείωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων εκτός από τις θετικές επιδράσεις για την υγεία του ζώου, θα μπορούσε επίσης να βελτιώσει την ποιότητα του κρέατος, καθώς η οξειδωση των λιπιδίων στο κρέας είναι μία από τις κύριες αιτίες για τον περιορισμό της ποιότητας του (Arshad et al., 2013). Ειδικότερα, η οξειδωση 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 φλαβινοπρωτεΐνες επίσης συνεισφέρουν ένα ποσοστό των συνολικών ROS. Υπεροξειδίο 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. Προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιόσταση, είναι αναγκαίο να υπάρξει μια ισορροπία μεταξύ δημιουργίας και αδρανοποίησης των ROS. (Salway et. al.) Η καταλάση είναι το ένζυμο το οποίο μετατρέπει το H_2O_2 σε H_2O και O_2 . Στην παρούσα εργασία ωστόσο, οι μεταβολές της καταλάσης δεν βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικές σε κανέναν από τους δύο υπό μελέτη ιστούς. Σε μια παρεμφερή μελέτη (Goutzourelas et.al., 2015), φάνηκε ότι η χορήγηση εκχυλισμάτων σπόρων σταφυλιού(GPE), δεν φάνηκε να ασκεί αντιοξειδωτική δράση μέσω της ρύθμισης των αντιοξειδωτικών ενζύμων CAT, SOD και HO-1 ένζυμα. Σε αυτή τη μελέτη, η θεραπεία με GPE μείωσε τόσο την έκφραση και τη δραστηριότητα του ενζύμου CAT σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ στα μυϊκά κύτταρα, δεν είχε κανένα αποτέλεσμα. Επίσης, φάνηκε ότι δεν επηρεάστηκε η έκφραση ή η δραστηριότητα της SOD στα κύτταρα EA.hy926 και C2C12. Το γεγονός ότι το εκχύλισμα δεν είχε καμία επίδραση (ή ακόμη και μείωση), στην έκφραση και τη δραστηριότητα της CAT και των SOD ενζύμων μπορεί να εξηγηθεί από την ικανότητά αυτών των πολυφαινολών να ενισχύουν άλλους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, όπως GSH, GCS και GST. Παρόμοια αποτελέσματά, φάνηκαν και σε άλλες μελέτες, οι οποίες έχουν αναφέρει ότι τα εκχυλίσματα σταφυλιού δεν επηρέασαν την δραστηριότητα της CAT και των ενζύμων SOD.(Yang T. et.al., 2014. και Fernández-Iglesias A. et. al. 2014).

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. Τα αποτελέσματα για την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – Total Antioxidant Capacity) δείχνουν πως ο συγκεκριμένος δείκτης στον ηπατικό ιστό των 65 ημερών, βρέθηκε ελάχιστα μειωμένος κατά 4,90% από την control στην πολυφαινολική ομάδα. Συνεπώς, δεν μπορούμε να πούμε ότι τα επίπεδα της TAC, επηρεάστηκαν. Για τις υπόλοιπες μετρήσεις, οι τιμές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Σε άλλες μελέτες όμως βρέθηκε ότι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), ήταν μεγαλύτερη για τις πολυφαινολικές ομάδες (Gerasopoulos K. et.al. 2014).

Τέλος, η μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μας υποδηλώνει το ποσοστό οξείδωσης που έχουν υποστεί οι πρωτεΐνες των ιστών, από τη δράση των ελευθέρων ριζών. Για τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων παρατηρούμε ότι υπήρξε μείωση στον ηπατικό ιστό των 42 ημερών στις πολυφαινολικές ομάδες σε σύγκριση με τα control κατά 35,44%. Οι υπόλοιπες μετρήσεις δεν εμφάνισαν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή. Σε άλλες εργασίες, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είχαν αυξημένες τιμές στις ομάδες control σε σχέση με τις πολυφαινολικές, ενώ με το πέρασμα των ημερών παρουσιάστηκε συνεχής μείωση στις πολυφαινολικές ομάδες, υποδεικνύοντας ότι οι πολυφαινόλες αποτρέπουν την οξείδωση των πρωτεϊνών (Gerasopoulos K. et.al. 2014). Έχει προταθεί ότι η διάσπαση του H_2O_2 από σίδηρο ή χαλκό είναι μια σημαντική πηγή $OH\bullet$ 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 εξαγάγουμε το συμπέρασμα ότι ο εμπλουτισμός των ζωοτροφών με στέμφυλα, έχει ως αποτέλεσμα να μειώνονται οι δείκτες οξείδωσης των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, 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 οινοποίησης στο έδαφος.

5 BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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 Lorgeril 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.*
- Naghma 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 sideroxyton, 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. Gumprich 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, Kerasioti 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.
- Κέιθ 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., KARAOULIOU 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.