

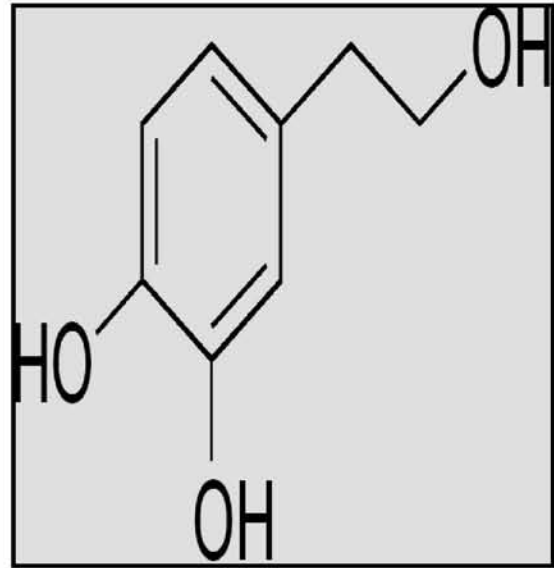


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
“Βιοτεχνολογία - Ποιότητα διατροφής και περιβάλλοντος”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΑΙΜΑ
ΑΠΟ ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΟΥ ΥΠΕΣΤΗΣΑΝ
ΑΓΩΓΗ ΜΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ



ΟΙΚΟΝΟΜΙΔΗΣ Ε. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΓΕΩΠΟΝΟΣ - ΖΩΟΤΕΧΝΗΣ

Λάρισα 2013.

**ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN BROILER BLOOD
TREATED WITH POLYPHENOLIC ADDITIVES**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΑΙΜΑ ΑΠΟ
ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΟΥ ΥΠΕΣΤΗΣΑΝ ΑΓΩΓΗ ΜΕ
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

Ευχαριστίες.

Στην οικογένεια μου,
ιδιαίτερα στον παππού μου
που πάντα με προέτρεπε στη γνώση
και στην αγαπημένη μου Μαρινέλα.

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

Ευχαριστώ τον Λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο, για την συνεχή και ουσιαστική παρουσία και υποστήριξη του, τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στην συγγραφή αυτής της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης, τον Επίκουρο Καθηγητή του ΤΕΙ/Λάρισας κ. Κωνσταντίνο Πετρωτό.

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

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους και πολύ καλούς φίλους Στέφανο Τσιρίγκα, Γιώργο Θελούρα και Παναγιώτη Κολοβό για τη στήριξη και βοήθεια αλλά και για τη συνεργασία τους, κατά τη διάρκεια της φοίτησης στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

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

Τρεις (3) συλλογές αίματος από όλα τα κοτόπουλα έγιναν (ανά δέκα ημέρες), αρχίζοντας από την ηλικία των τριάντα (30) ημερών και με μέσο βάρος τα 660 γραμμάρια. Στην δεύτερη συλλογή του αίματος, το βάρος των κοτόπουλων ήταν 1.200 γραμμάρια και στην τρίτη 2.100 γραμμάρια. Μετά από κάθε συλλογή αίματος, άμεσα στο εργαστήριο γινόταν η συλλογή του πλάσματος και του αιμόλυματος. (V. Ramnath, et. al.,2007). Το αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της δραστηριότητας της καταλάσης. Το πλάσμα για τα TBARS, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και την συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας ήταν θετικά και ενθαρρυντικά. Τα πολυφαινολικά πρόσθετα επηρεάζουν τη συμπεριφορά των δεικτών οξειδωτικού στρες, μεταξύ των ομάδων σε σχέση με τον χρόνο, δείχνοντας ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, στην πρώτη αιμοληψία η ομάδα C, που ελάμβανε το πλήρως εμπλουτισμένο σε πολυφαινόλες εκχύλισμα από ΥΑΕ, είχε αυξημένες τιμές γλουταθειόνης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου περίπου στο τετραπλάσιο (από 1,1 σε 4 $\mu\text{mol}/\text{g}$ αιμοσφαιρίνης), που σημαίνει πως τα νεαρά κοτόπουλα με την χορήγηση πολυφαινολικών προσθέτων, αυξάνουν τα επίπεδα της γλουταθειόνης. Στην ομάδα C αυξάνεται η τιμή TAC, η

οποία είναι στατιστικά σημαντική. Κατά συνέπεια, η παρουσίαση πολυφαινολών στη διατροφή της ομάδας αυτής βοηθά στην αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα.

ABSTRACT.

For several years, there has been in the strict sense, a sudden increase in generation of plant origin food products. The main reason is their polyphenolic content, which is attributed by studies, large-scale bioactivity.

The aim of the present work was to raise broilers chicks with feed containing polyphenolic additives, from processed OMWW (olive mill waste waters) and distilling rose residues, in order to examine the effect on their antioxidant status in blood using oxidative stress biomarkers.

For this reason, the broilers were divided into four (4) groups of twelve (12) subjects. The group A was the control group, with the basic diet throughout the experiment. The other three (3) were received special feed with polyphenolic additives, different of course for each one. Three (3) blood collections from all broilers were performed, with time interval of ten days, beginning at the age of thirty (30) days, once the average broilers weight was 660 gr. In the second blood collection the broilers weight was 1.200 gr and in the third one, it was 2.100 gr. After each blood collection, biochemical analysis of the samples was performed to collect hemolysate and plasma [the hemolysate for assaying reduced glutathione (GSH) and catalase activity and the plasma for TBARS, protein carbonyls and total antioxidant capacity (TAC)].

Summarizing, the results of this work were positive and encouraging. The polyphenolic additives increased antioxidant status of the broilers feeded with the polyphenolic extracts. For example, until the first thirty days, there was an increase of GSH in the C (Permeate from processed OMWW after microfiltration using ceramic filters) and D (Distilling Rose Residues) groups, compared with that of the control group. Moreover, in the group C, there was an increase in the TAC compared to control group.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΕΛΙΔΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.	5
ABSTRACT.	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.	12
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.	13
1.1. Πολυφαινόλες.	14
1.1.1 Ορισμός.	14
1.1.2 Φυσικές Ιδιότητες.	14
1.2. Φυτικές Πολυφαινόλες - Κατηγορίες.	15
1.3. Οξειδωτικό Στρες.	18
1.3.1 Ιστορική Αναδρομή.	18
1.3.2 Ελευθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη O ₂ .	18
1.3.3 Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες στον Οργανισμό μας.	20
1.3.4 Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ), στον Οργανισμό μας.	21
1.3.5. Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.	23
1.4. Σκοπός.	25
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.	26
2.1. Γενικά.	26
2.2. Περιγραφή Σιτηρεσίου.	26
2.3. Αιμοληψία.	27
2.3.1. Επεξεργασία Αίματος.	28
2.3.2. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες.	29
2.3.2.1 Γενικά.	29
2.3.2.2 Μέθοδοι.	30
1. GSH στο Ερυθροκυτταρικό Αιμόλυμα.	30
2. Κατάληση στο Ερυθροκυτταρικό Αιμόλυμα.	33
3. TAC στο Πλάσμα.	35

4. TBARS στο Πλάσμα.	38
5. Καρβονύλια στο Πλάσμα.	40
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.	43
3.1. GSH στο Ερυθροκυτταρικό Αιμόλυμα.	43
3.2. Καταλάση στο Ερυθροκυτταρικό Αιμόλυμα.	44
3.3. TAC στο Πλάσμα.	45
3.4. TBARS στο Πλάσμα.	46
3.5. Καρβονύλια στο Πλάσμα.	47
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.	48
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.	51

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.

Πίνακας 1.	Κυριότερες Πολυφαινόλες στα ΥΑΕ και στα Τριαντάφυλλα	15
Πίνακας 2.	Ενώσεις που Περιέχονται, από την Απόσταξη Ροδοπετάλων.	17
Πίνακας 3.	Σιτηρέσιο κοτόπουλων πάχυνσης.	26
Πίνακας 4.	Διαδοχική σειρά προσθήκης και Ποσότητες των Αντιδραστηρίων, για την Μέτρηση της GSH.	32
Πίνακας 5.	Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και Ποσότητες των Αντιδραστηρίων, για την Μέτρηση της Καταλάσης.	35
Πίνακας 6.	Διαδοχική σειρά Προσθήκης και Ποσότητες των Αντιδραστηρίων, για την Μέτρηση της TAC.	37

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.

Εικόνα 1.	Φαινολικό (Φαινικό οξύ): Η απλούστερη φαινόλη.	14
Εικόνα 2.	Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων.	16
Εικόνα 3.	Ταννίνες και άλλες Πολυφαινόλες από Αγριοτριανταφυλλιά.	16
Εικόνα 4.	Το DNA, οι Πρωτεΐνες και τα Λιπίδια, Αποτελούν τους Στόχους των Ελευθέρων Ριζών.	21
Εικόνα 5.	Τρόποι Σχηματισμού των Ελευθέρων Ριζών.	21
Εικόνα 6.	Οξειδωτικό Στρες.	22
Εικόνα 7.	Δράση Χημειοπροστατευτικών Παραγόντων.	24
Εικόνα 8.	Κλωβοί Ανάπτυξης.	26
Εικόνα 9.	Αιμοληψία από Βραχίονα Φλέβα.	28
Εικόνα 10.	Τοποθέτηση Αίματος σε Σωληνάρια Περισυλλογής.	28
Εικόνα 11.	Διατήρηση Πλάσματος και Αιμούματος σε Φιαλίδια Erpendorf.	29
Εικόνα 12.	Συντακτικός Τύπος της Γλουταθειόνης.	30
Εικόνα 13.	Ανακύκλωση και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.	31
Εικόνα 14.	Μονοπάτι Αναγωγής του H_2O_2 σε H_2O .	33
Εικόνα 15.	Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην Παραγωγή του Μορίου TBA-MDA.	38
Εικόνα 16.	Σύνδεση Πρωτεΐνης με την DNPH (δίνιτριφαινυλυδραζίνη) και Σχηματισμός του Δίνιτροφαινυλυδραζονίου.	41

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.

Γράφημα 1.	GSH στο Αιμόλυμα των Κοτόπουλων.	45
Γράφημα 2.	Καταλάση στο Αιμόλυμα των Κοτόπουλων.	46
Γράφημα 3.	TAC στο Πλάσμα των Κοτόπουλων.	47
Γράφημα 4.	TBARS στο Πλάσμα των Κοτόπουλων.	48
Γράφημα 5.	Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στο Πλάσμα των Κοτόπουλων.	49

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

Στην βιβλιογραφία, από το 1992 μέχρι και σήμερα υπάρχουν δεκαοκτώ (18) μελέτες, που αναφέρονται σε πολυφαινολικά πρόσθετα σε κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, με πρόσφατες των Worapol A. & Maitree S. 2013, H.-B. Xiao et. al., 2013, Yi-Bin Zhou et. al., 2012, Viveros A. et. al. 2011. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη όπου πολυφαινολικά πρόσθετα από επεξεργασμένα Υ.Α.Ε. και υπολείμματα απόσταξης τριαντάφυλλου, προστίθενται στην διατροφή των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, με σκοπό την αιματολογική ανάλυση των δεικτών του οξειδωτικού στρες.

Τα Υ.Α.Ε. χαρακτηρίζονται από βαρύ φορτίο ρύπων. Οι πολυφαινόλες είναι η βασική παράμετρος της ρύπανσης. (Mebirouk M., et. Al., 2007., Ryan, D., Robards, 1998., Tsimidou K, et. Al. 1992). Η απομόνωση των πολυφαινολών από το φορτίο των Υ.Α.Ε., δημιουργεί ένα προϊόν κατάλληλο για πολλές γεωργικές εφαρμογές, π.χ. υδρολίπανση, ενσίρωση. (Gkoutssidis, P.E., et al., 2011), ενώ το πολυφαινολικό προϊόν, μπορεί να διαχειρισθεί ανάλογα, με γνώμονα πάντα την αντιοξειδωτική του δράση.

Από την άλλη πλευρά, τα εκχυλίσματα από φύλλα και πέταλα τριαντάφυλλου, είναι μια πλούσια πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη των επιβλαβών επιδράσεων που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. (Nowak R, Gawlik-Dziki U., 2007., Schieber A. et.al. 2005).

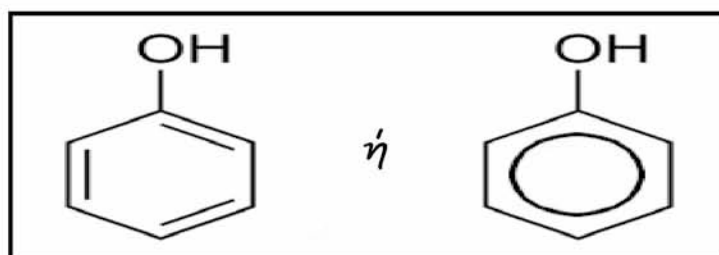
Έτσι λοιπόν, πραγματοποιήθηκε διατροφή τεσσάρων (4) ομάδων κοτόπουλων πάχυνσης, με ζωοτροφές που περιείχαν πολυφαινολικά πρόσθετα, από επεξεργασμένα Υ.Α.Ε. και από υπολείμματα απόσταξης τριαντάφυλλου, προκειμένου με αιματολογική μελέτη (στο πλάσμα και στο αιμόλυμα), να ελεγχθούν οι δείκτες του οξειδωτικού στρες, έτσι ώστε, με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, να καταδειχθεί η συμπεριφορά των δεικτών σε σχέση με το χρόνο και να επισημανθούν οι διαφορές μεταξύ των ομάδων.

1.1. Πολυφαινόλες.

1.1.1 Ορισμός.

Πολυφαινόλες – (Polyphenols). Είναι μία τάξη φυσικών, συνθετικών και ημισυνθετικών οργανικών χημικών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών φαινολικών δομών. Ο όρος πολυφαινόλη, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1894.

Είναι δηλαδή, μόρια όπου έχουν μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες, σε δεσμό με το άτομο του άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου. Ο χημικός τύπος της φαινόλης (Φαινικό οξύ) είναι C_6H_5OH , το απλούστερο των φαινολών.



Εικόνα 1. Φαινολικό (Φαινικό οξύ): Η απλούστερη φαινόλη.

1.1.2 Φυσικές Ιδιότητες.

Είναι χαμηλού μοριακού βάρους. Συνήθως σε υγρή μορφή ή σε στερεή με χαμηλό σημείο τήξεως. Λόγω των δεσμών υδρογόνου, οι φαινόλες μικρού μοριακού βάρους, είναι υδατοδιαλυτές. Τείνουν να έχουν υψηλότερα σημεία βρασμού, από τις αλκοόλες ίδιου μοριακού βάρους, λόγω του ισχυροτέρου δεσμού υδρογόνου που έχουν.

1.2. Φυτικές Πολυφαινόλες - Κατηγορίες.

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

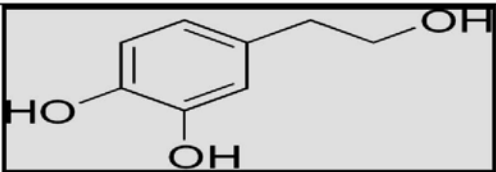
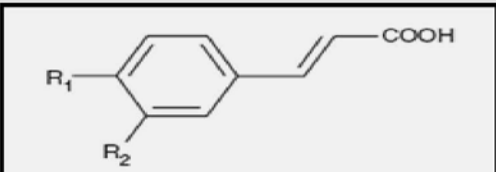
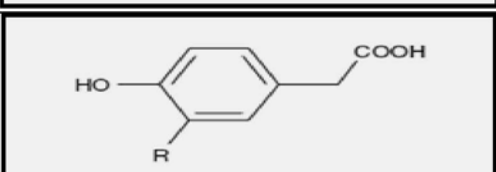
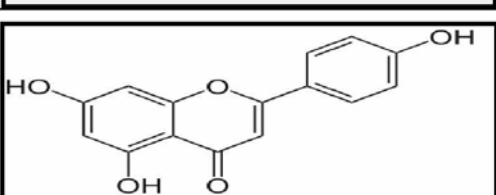
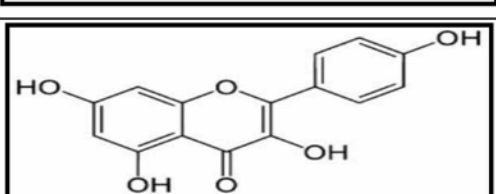
Η χημειοπροστατευτική δράση των φυτικών τροφών, οφείλεται στα φυτοχημικά τους συστατικά:

- Τα φυτοχημικά συστατικά είναι μη θρεπτικά συστατικά που έχουν σημαντική βιολογική δράση.

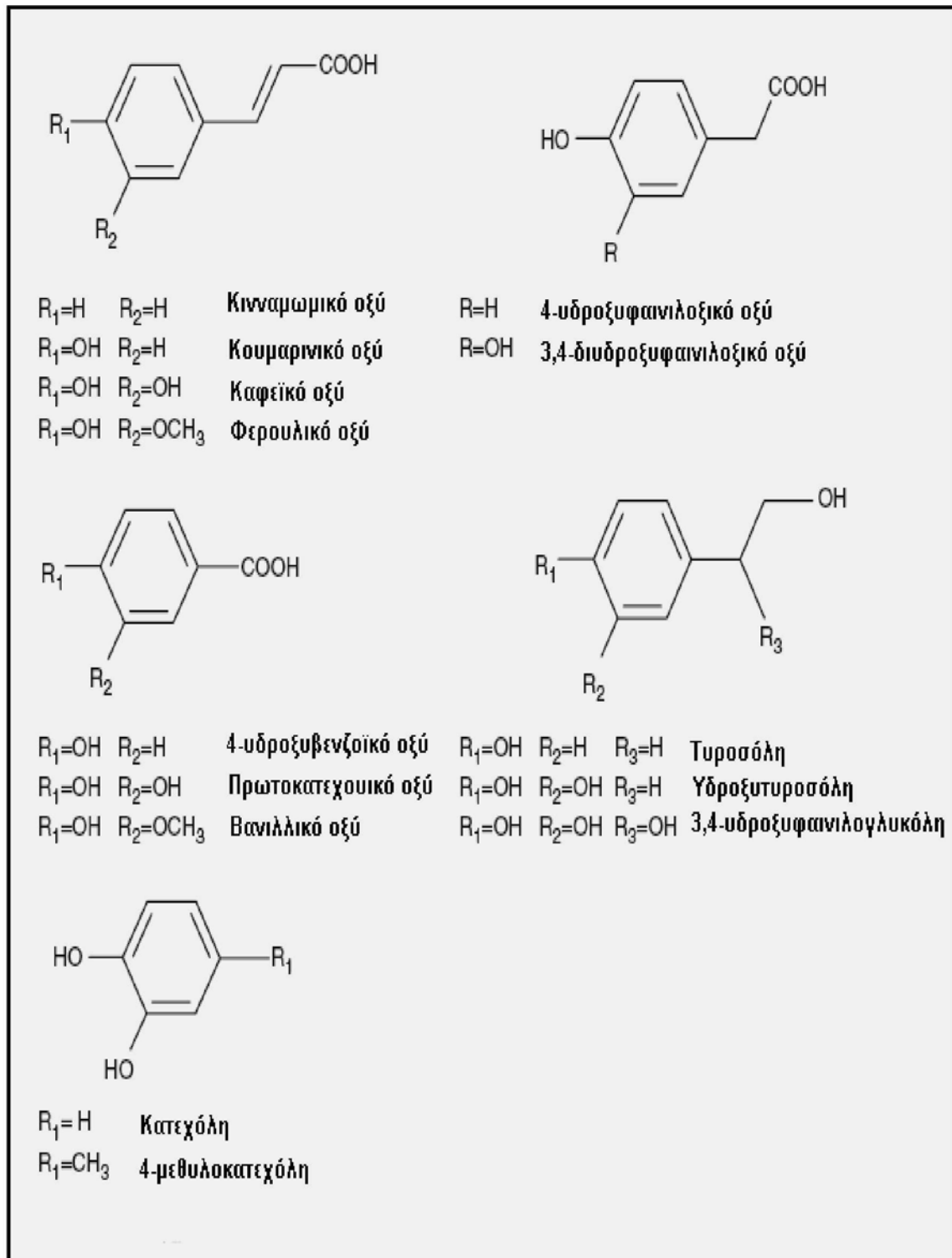
- Δρουν ως αντιοξειδωτικά και έχουν δράση παρόμοια με αυτή των ορμονών. Συνήθως, δρουν συνεργικά, δηλαδή εμφανίζουν ισχυρότερη δράση όταν συνδυάζονται διαφορετικές κατηγορίες φυτοχημικών.

- Παίζουν ρόλο στον καθορισμό της γεύσης, του αρώματος, των χρωμάτων και άλλων χαρακτηριστικών των φυτικών τροφών.

Φρούτα, λαχανικά καθώς και ροφήματα όπως το κόκκινο κρασί, και το τσάι, αποτελούν καλές πηγές πολυφαινόλων. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, που οφείλεται κυρίως στην αναγνώριση των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων καθώς και της πιθανής χημειοπροστατευτικής τους επίδρασης στην ανθρώπινη υγεία (Dew et al., 2005). Οι φυτικές πολυφαινόλες, ποικίλουν για κάθε είδος φυτού και στα διάφορα μέρη του. Τα ΥΑΕ και τα τριαντάφυλλα, περιέχουν πολυφαινόλες, των οποίων οι κυριότερες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

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

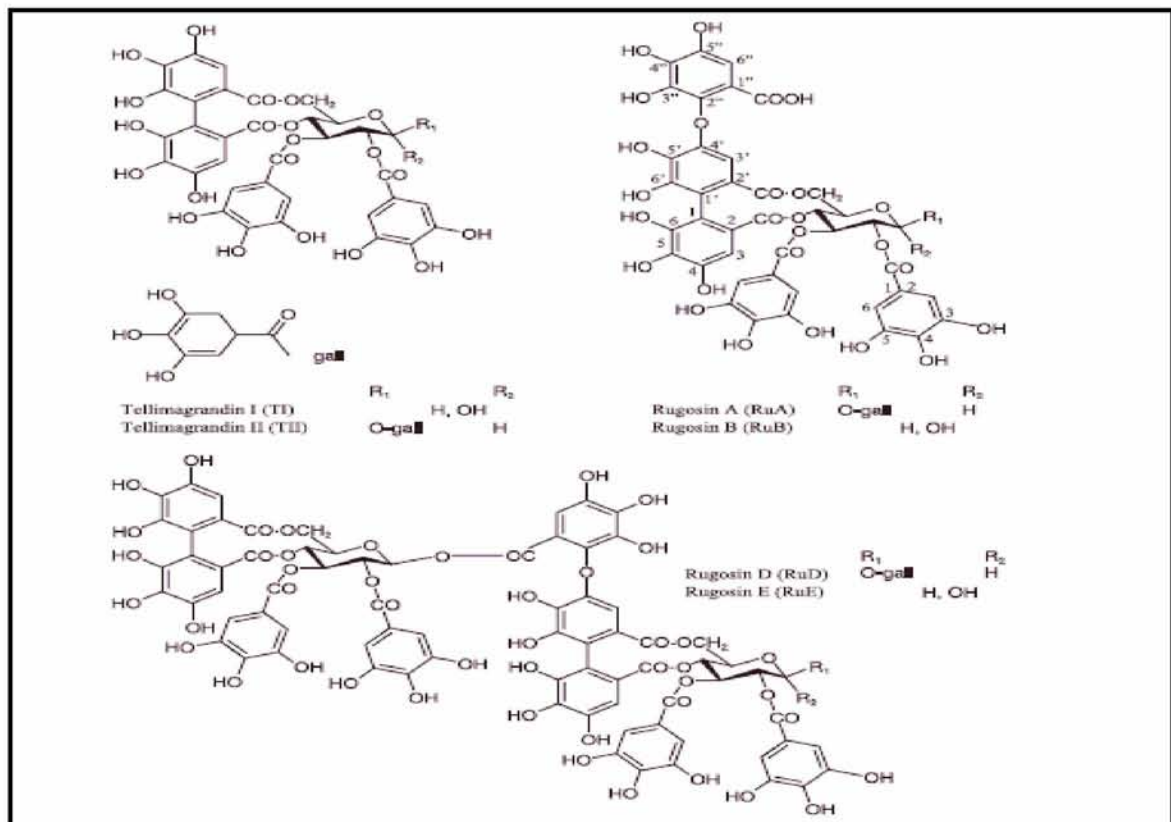
Πίνακας 1. Κυριότερες Πολυφαινόλες στα ΥΑΕ και στα Τριαντάφυλλα.



Εικόνα 2. Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων. (Niaounnakis & Halvadakis, 2006).

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

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



Εικόνα 3. Ταννίνες και άλλες πολυφαινόλες από Αγριοτριανταφυλλιά. (Fecka I., 2009).

1.3 Οξειδωτικό Στρες.

1.3.1 Ιστορική Αναδρομή.

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

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

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

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

1.3.2 Ελευθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη O_2 .

Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια, τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα. Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό, ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό σε - *μικρότερη ενεργειακή κατάσταση*- και ως εκ τούτου λιγότερο δραστικό.

Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα

εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο γίνεται ασταθές -σε μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση- και συνεπώς πιο δραστικό από άλλα μόρια.

Άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται παραμαγνητικά, ενώ όταν δεν διαθέτουν τέτοια ηλεκτρόνια, διαμαγνητικά. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων.

Οι αντιδράσεις αυτές λέγονται οξειδοαναγωγικές (*redox*). Κατά την οξειδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων, από ένα άτομο.

Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία, λέγεται **ελεύθερη ρίζα** και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια. Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης. (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο ή τον άνθρακα. Το ίδιο το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του O_2 , που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (*triplet state*) και συμβολίζεται με 3O_2 , δεν είναι ιδιαίτερα δραστική.

Το μοριακό όμως αυτό οξυγόνο μπορεί να ενεργοποιηθεί, έτσι ώστε τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (*singlet state*) και συμβολίζεται με *O_2 .

Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με

αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ).

Τα κυριότερα ΔΕΟ είναι:

- η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$),
- η ρίζα υδροξυλίου ($-OH^{\cdot}$),
- η ρίζα υπεροξειδίου ($-ROO^{\cdot}$),
- 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^{\cdot}), το οποίο είναι ελεύθερη ρίζα (με τελεία συμβολίζεται η ελεύθερη ρίζα, ενώ με (-) συμβολίζεται το αρνητικό φορτίο της ρίζας και με R, ένα άτομο ή μία ομάδα ατόμων, κυρίως αλυσίδα ατόμων άνθρακα).

1.3.3 Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες στον Οργανισμό μας.

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

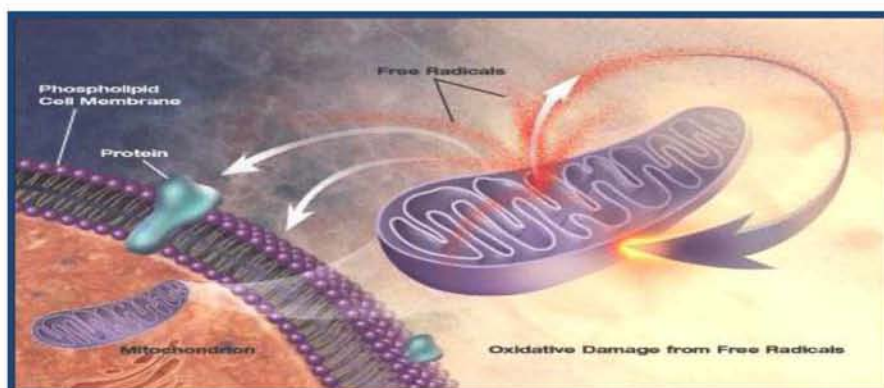
(α) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου, ως παραπροϊόν ή «χημικό ατύχημα» κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή ορισμένα ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από τα μόρια που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα και περνούν στο οξυγόνο,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

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

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

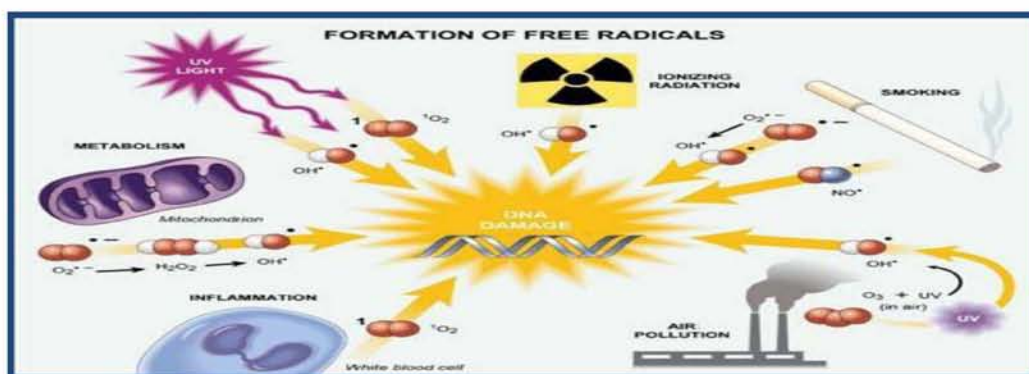
(δ) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως μέρος της λειτουργίας του

ανοσοποιητικού συστήματος. Ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς. Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα.



Εικόνα 4. Το DNA, οι Πρωτεΐνες και τα Λιπίδια, Αποτελούν τους Στόχους των Ελευθέρων Ριζών.

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

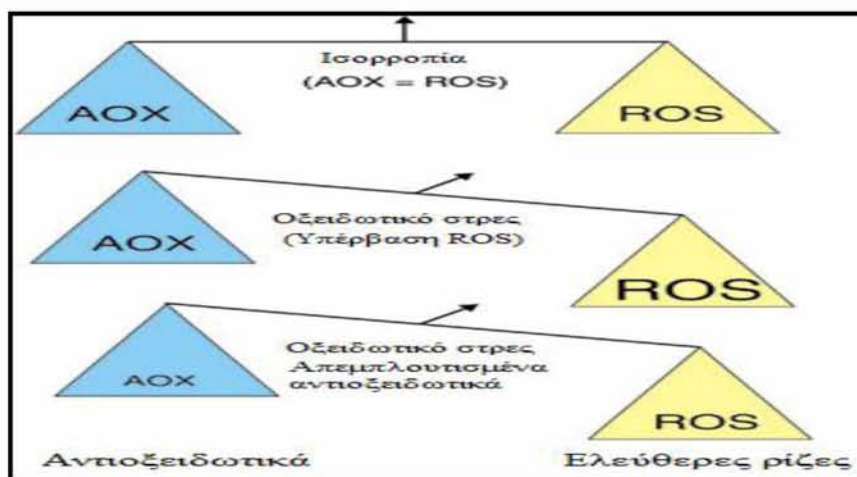


Εικόνα 5. Τρόποι Σχηματισμού των Ελευθέρων Ριζών.

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

Σε κάθε βιολογικό σύστημα, πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης των ΔΕΟ. Η αύξηση των οξειδώσεων από τα ΔΕΟ οδηγεί τα κύτταρα σε μία κατάσταση που λέγεται **οξειδωτικό στρες** και

είναι παράγοντας πρόκλησης ασθενειών. Λόγω της συνεχούς έκθεσης σε ΔΕΟ και για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες, ο οργανισμός μας, όπως όλα τα φυτά και τα ζώα, έχει αναπτύξει για προστασία διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στους οποίους παίρνουν μέρος αντιοξειδωτικές ουσίες.



Εικόνα 6. Οξειδωτικό Στρες.

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

Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους:

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

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

Στην περίπτωση αυτή, έχουμε συνεργατική δράση των δύο αντιοξειδωτικών και λέμε ότι η βιταμίνη C έχει συν-αντιοξειδωτική δράση.

Ο όρος **οξειδωτικό στρες** περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας, ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου *Reactive Oxygen Species* - (ROS) και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών ενός οργανισμού (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, et.al., 2004).

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως από:

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

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

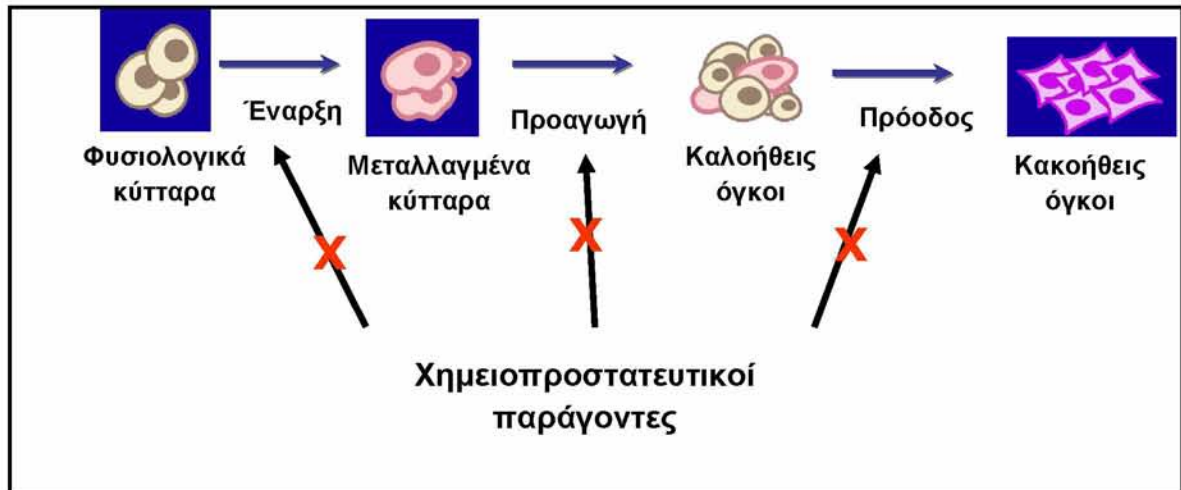
1.3.5. Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.

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

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

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

Ένα άλλο παράδειγμα, σύμφωνα με τη θεωρία του πολυσταδιακού μοντέλου, οι μεταλλάξεις αποτελούν βασικό παράγοντα και στα τρία στάδια της καρκινογένεσης: στην έναρξη (initiation), στην προαγωγή (promotion) και στην πρόοδο (progression). (Greenwald, 1995).



Εικόνα 7. Δράση Χημειοπροστατευτικών Παραγόντων.

Η έναρξη, το πρώτο στάδιο, προκαλείται από τη δημιουργία μη αντιστρεπτών βλαβών στο DNA (πιθανότητα σε γονίδια που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση) σε ένα ‘αρχικό κύτταρο’ (initiated cell) που βρίσκεται κάτω από την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα. Έτσι δημιουργείται ένα κύτταρο που μπορεί να εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων από ότι κανονικά θα έκανε (Trosko και Chang 1989).

Στο δεύτερο στάδιο, στην προαγωγή, τα αρχικά μεταλλαγμένα κύτταρα πολλαπλασιάζονται κάτω από την επίδραση μιτογόνων παραγόντων (προαγωγέων) με τελική κατάληξη το σχηματισμό ενός κλώνου από μεταλλαγμένα κύτταρα. Σε ένα από αυτά τα κύτταρα, μία ‘κρίσιμη’ μετάλλαξη το μετατρέπει στο πρώτο προ-καρκινογόνο κύτταρο. Η προαγωγή συνήθως διαρκεί αρκετά χρόνια και είναι ένα αντιστρεπτό στάδιο αφού αφαίρεση του προαγωγέα συχνά έχει ως αποτέλεσμα ο ιστός να επανέρθει στην φυσιολογική του κατάσταση αν και θα περιέχει ‘αρχικά κύτταρα’ (Trosko et.al., 1983).

Στο τελικό μη αντιστρεπτό στάδιο, στην πρόοδο, το προ-καρκινικό κύτταρο μετατρέπεται σε καρκινικό εξαιτίας νέων μεταλλάξεων που έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση του καρκινικού φαινότυπου, δηλαδή ενός κυτταρικού κλώνου με αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, διείσδυσης και μετάστασης (Kerbel et. al., 1984).

Στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, στο οποίο εκπονήθηκε η παρούσα εργασία, έχουν μελετηθεί τα τελευταία χρόνια, πλήθος φυτικών εκχυλισμάτων, σχετικά με την πιθανή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους, που οφείλονταν κυρίως στις φυτικές πολυφαινόλες που περιείχαν. (Stagos

D.et.al.,2012). Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν η αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση της αμπέλου, σε εκχυλίσματα από τον καρπό του φυτού, τόσο από τα γίγαρτα και τους βόστρυχους όσο και από τα στέμφυλα. Επιπλέον, εξετάστηκε η βιολογική δράση εκχυλισμάτων (μεθανολικών και υδατικών) και πολυφαινολικών κλασμάτων από Ελληνικές ποικιλίες αμπέλου, Μανδηλαριά Σαντορίνης (κόκκινα σταφύλια) και Ασσύρτικο Σαντορίνης (άσπρα σταφύλια), καθώς και μονομερών φυτικών πολυφαινολών που ανιχνεύτηκαν σε αυτά. Τα περισσότερα εκχυλίσματα επέδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς και εξαιρετική προστατευτική δράση έναντι της επαγόμενης από τις ελεύθερες ρίζες, βλάβη του DNA. (Stagos D et al., 2007; Spanou C et al. 2007)

Ακόμη και στα πλαίσια της αναζήτησης από το εργαστήριο νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων, μελετήθηκαν υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα, που προέκυψαν από έναν μεγάλο αριθμό φυτών Ελληνικών ψυχανθών. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι, τα εκχυλίσματα μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, παρουσίασαν σημαντική ικανότητα να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες και να παρεμποδίζουν την επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Επιπλέον, επηρέαζαν τη δραστικότητα ενζύμων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. (Spanou CI et al., 2012; Spanou CI et al., 2008).

1.4 Σκοπός.

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

2. Υλικά και Μέθοδοι.

2.1 Γενικά.

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

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

- Εκτροφή κοτόπουλων (Εφαρμογή σιτηρεσίου και συνθηκών ομαλής διαβίωσης – ανάπτυξης).
- Παρακολούθηση ανάπτυξης κοτόπουλων (Ημερήσια αύξηση ζωϊκού βάρους, ημερήσια κατανάλωση τροφής).
- Εκτέλεση τριών (3) αιμοληψιών (Στις 10, 20 και 30 Δεκ.2012).

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

- Ταχεία και ασφαλή μεταφορά των δειγμάτων των αιμοληψιών (120 δείγματα) και την τοποθέτησή τους σε ψυγείο στους -80°C .
- Επεξεργασία του αίματος. (Λήψη πλάσματος – αιμολύματος).
- Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.

2.2 Περιγραφή σιτηρεσίου.

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

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



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

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

1. Καλαμπόκι Α ομάδας: (Νερό + Καλαμπόκι). Σύνολο 60% Στερεά.

2. Καλαμπόκι Β ομάδας: (**Διήθημα** επεξεργασμένων υγρών απόβλητων ελαιοτριβείου, μερικώς αποφαινολοποιημένο, που προήλθε από μικροδιήθηση με κεραμικά φίλτρα, με 4% στερεά + Καλαμπόκι με 56% στερεά). Σύνολο 60% Στερεά.

3. Καλαμπόκι Γ ομάδας: (**Κατακράτημα** επεξεργασμένων υγρών απόβλητων ελαιοτριβείου, που προήλθε από μικροδιήθηση με κεραμικά φίλτρα, πολυφαινολοποιημένο με 4% στερεά + Καλαμπόκι με 56% στερεά). Σύνολο 60% Στερεά.

4. Καλαμπόκι Δ ομάδας: (**Υπολείμματα απόσταξης** τριαντάφυλλου με 20% στερεά + Καλαμπόκι με 40% στερεά). Σύνολο 60% Στερεά.

Σημείωση: Προστέθηκαν γαλακτικά βακτήρια ενσίρωσης.

2.3 Αιμοληψία.

Εκτελέστηκαν τρεις (3) αιμοληψίες ακολουθώντας την διαδικασία που περιγράφεται από τους Ison A.J.et.al.(2005), όταν τα κοτόπουλα ήταν ηλικίας 30, 40 και 50 ημερών, τα οποία ελάμβαναν το ειδικό σιτηρέσιο για 17, 27 και 37 ημέρες αντιστοίχα. Σύμφωνα με μελέτη συλλογής αίματος των πουλερικών Spriegle S, et. al.,(2005), η μέγιστη ποσότητα του αίματος που μπορεί να συλλεχθεί από ένα υγιές κοτόπουλο, είναι το 1% του σωματικού του βάρους. Έτσι, για τις πειραματικές ανάγκες αποφασίστηκε να λαμβάνονται 4 ml αίματος. Χρησιμοποιήθηκαν:

- Μίας χρήσεως σύριγγες με βελόνα (Penta Ferte®), χωρητικότητας 5 ml., που μετά την χρήση τους απομακρύνονταν σε δοχεία περισυλλογής αιχμηρών αντικειμένων.

- Μίας χρήσεως αποστειρωμένα σωληνάρια συλλογής αίματος, (BD Vacutainer® EDTA Tubes, με Ref. nr. 3668860), που περιείχαν 7,2 mg K3E. Το αντιπηκτικό EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) δεσμεύει τα άλατα του ασβεστίου στο αίμα με χηλίωση (αποσιδήρωση), έτσι ώστε να διατηρηθούν τα κύτταρα.

Το αίμα από τα κοτόπουλα λαμβάνονταν από την μεγάλη φλέβα κάτω από το φτερό (βραχίονα φλέβα - brachial vein). Με ιδιαίτερη προσοχή στο κοτόπουλο, ανοίγονταν οι πτέρυγες, καθαρίζονταν τα πούπουλα και απολυμαίνονταν οι περιοχές της αιμοληψίας, με 70% αλκοόλη. Η βελόνα εισχωρούσε προδευτικά στην φλέβα και γινόταν η εξαγωγή του αίματος.



Εικόνες 9 και 10. Αιμοληψία από βραχίονα φλέβα και τοποθέτηση αίματος σε σωληνάρια περισυλλογής.

Εφαρμόζονταν πίεση στην φλέβα, για αποφυγή αιμοραγίας και το αίμα μεταφέρονταν στα σωληνάρια συλλογής. Το ληφθέν αίμα ανακατεύονταν απαλά αναστρέφοντας τον σωλήνα αρκετές φορές. Αυτό διασφαλίζε τη σωστή ανάμιξη του αντιπηκτικού με το αίμα. Τα δείγματα τοποθετούντο σε φορητό ψυγείο που έφεραν παγοκύστες και μεταφέρονταν στο εργαστήριο σε μισή ώρα, μετά το πέρας της αιμοληψίας.

2.3.1 Επεξεργασία Αίματος.

Στο εργαστήριο αμέσως μετά από κάθε αιμοληψία, εκτελείτο επεξεργασία των δειγμάτων για την συλλογή αιμολύματος και πλάσματος. (V. Ramnath, et. al., 2007). Στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της καταλάσης και στο πλάσμα για τον προσδιορισμό των TBARS, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Περιγραφή Μεθόδου.

1. Τοποθετούμε τα σωληνάρια συλλογής αίματος στην φυγόκεντρο και φυγοκεντρούμε στα 1370 g, για 10 λεπτά, στους 4 °C.
2. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (πλάσμα) και το χωρίζουμε σε φιαλίδια erpendorf, ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν.

3. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετά τη φυγοκέντρηση βρίσκονται στο κάτω μέρος του falcon.
4. Ανακινούμε βίαια και φυγοκεντρούμε στα 4020 g, για 15 λεπτά, στους 4 °C.
5. Συλλέγουμε το υπερκείμενο, που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μ L).
6. Χωρίζουμε σε erpendorf το αιμόλυμα ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν. Διατήρηση στους -20 °C.



Εικόνα 11. Διατήρηση πλάσματος και αιμολύματος σε φιαλίδια erpendorf.

Στην συνέχεια καθαρίζεται το αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης.

1. Προσθέτουμε 500 μ l αιμολύματος σε 500 μ l 5% TCA σε erpendorf και ανακινούμε στο vortex.
2. Φυγοκεντρούμε στα 20.000 g για 5 min στους 5 °C.
3. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε erpendorf και προσθέτουμε 5% TCA με την εξής αναλογία: 300 μ L αιμολύματος / 90 μ L 5% TCA και ανακινούμε στο vortex.
4. Φυγοκεντρούμε στα 20.000 g για 5 min στους 5 °C.
5. Μεταφέρουμε το καθαρό υπερκείμενο σε erpendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στον καταψύκτη και θα χρησιμοποιηθούν για την μέτρηση της γλουταθειόνης.

2.3.2 Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες.

2.3.2.1 Γενικά.

Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστηριότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας

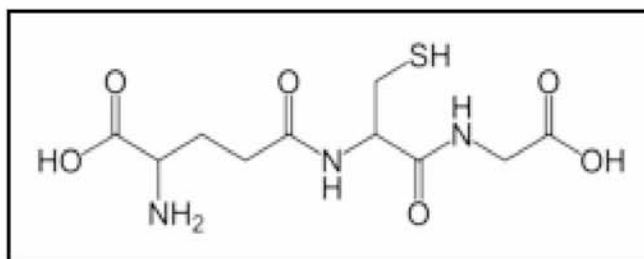
συχνά προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος του αίματος. Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες, ένας από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσής των λιπιδίων είναι οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, ενώ για την καταστροφή των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

2.3.2.2 Μέθοδοι.

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

1. GSH στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.

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

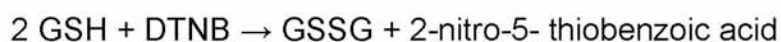


Εικόνα 12. Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης.

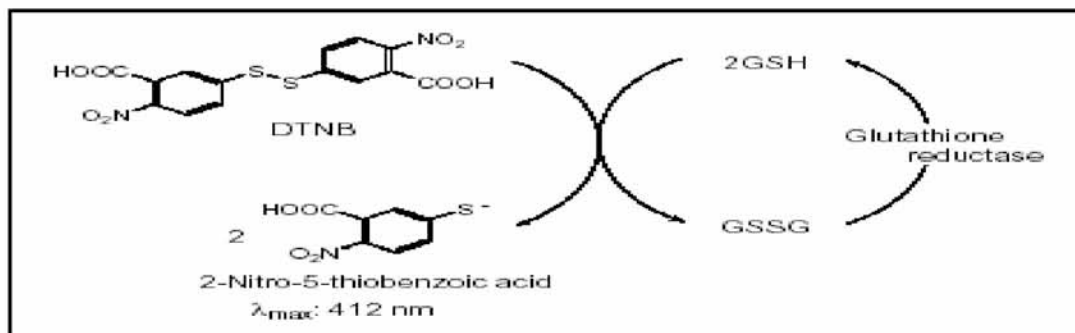
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών.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

Αρχή της μεθόδου.

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



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



Εικόνα 13. Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης.

Αντιδραστήρια.

- **Phosphate buffer** 67 mM (pH 7.95). MB (KH₂PO₄): 136 MB (Na₂HPO₄): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH₂PO₄ (67 mM) και 500 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0.227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 5.94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.95.

- **DTNB** (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό. (39.6 mg DTNB σε 100 ml του 1% διαλύματος του κιτρικού νατρίου, για να δώσει μία συγκέντρωση του 1 mM). DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396.35

- **Κιτρικό Νάτριο.** (C₆H₅Na₃O₇*2H₂O, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB: 294.10. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια erpendorf:

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

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

Αναδεύουμε τα erpendorfs και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm. (Roland F. Beers, Jr. and Irwin W. Sizer. 1952)

Υπολογισμοί.

Δραστικότητα της GSH (mmol/L) = (Absδείγματος – ΔAbstυφλού / 13.6) x 262.6, όπου το 262.6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μ L) με τον όγκο του αιμόλυματος (20 μ L) (1010 / 20 = 50.5), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2 x 1.3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500 μ L αιμολ. / 500 μ L 5% TCA) και τη δεύτερη αραίωση (390 μ L / 300 μ L) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10 x 2, τη μετατρέπουμε σε g/L και

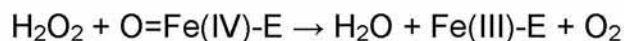
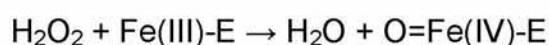
ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων. Έτσι λαμβάνουμε την συγκέντρωση της GSH ανά γραμμάριο αιμοσφαιρίνης. GSH (mmol/ g Hb).

2. Δραστηριότητα της Καταλάσης.

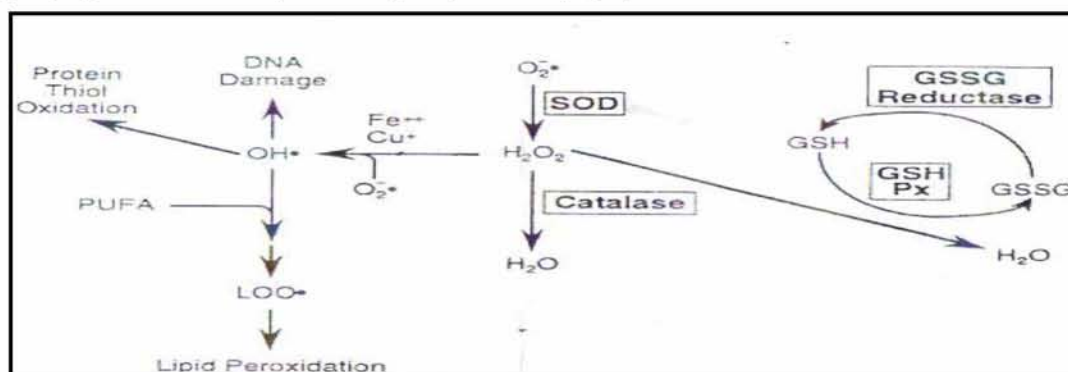
Αρχή της μεθόδου.

Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο 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 χρησιμοποιείται συχνά για να καταλύσει 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 τεραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Boon EM, et. al. (2007). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



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



Εικόνα 14. Μονοπάτι αναγωγής του H_2O_2 σε H_2O

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



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

Αντιδραστήρια.

Phosphate buffer 67mM (pH 7.4) MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178. Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

Το διάλυμα H_2O_2 είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

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

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

Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση. Κατόπιν, μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για

μέτρηση στο υπεριώδες (UV). Τέλος, προσθέτουμε 5 μL 30% H_2O_2 στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = $(\Delta\text{Abs}_{\text{sample}} \text{ per min} / 40) \times (750 \times 1000 \times 10 \times 2) / \text{Conc. Hb (mg/mL)}$.

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2 πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε $\mu\text{mol/mL}$. Το 750 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μL) ($3000 / 4 = 750$), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραίωση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L. Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10×2 , την μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

$\Delta \text{ Abs (min)}$ = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

$U = \mu\text{mol/min}$. $\Delta\text{Abs}_{\text{blank}}$ είναι πάντοτε μηδέν και έτσι δεν απαιτείται μέτρηση του τυφλού.

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

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό του πλάσματος 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 του πλάσματος. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού του πλάσματος ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο επίπονος τρόπος επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που

συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο.

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

Αρχή της μεθόδου

Η TAC του ορού 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.

Αντιδραστήρια

- **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	480 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL	500 μL
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	-	5 μL	-
Πλάσμα	-	-	20 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 ορού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη. Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρουμε 900 mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

Υπολογισμοί.

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

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

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

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

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

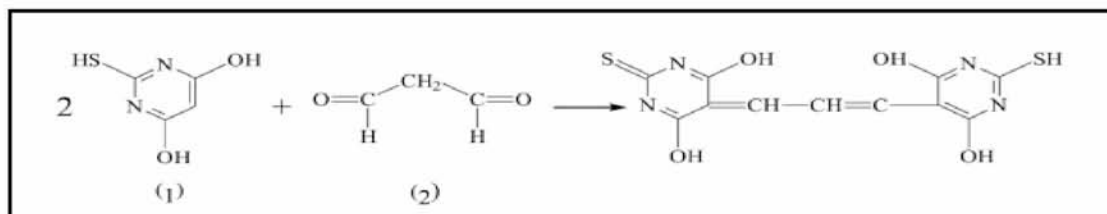
δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

Παράδειγμα. Αν η % μείωση της απορρόφησης είναι 20, τα μmol του DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος είναι: $20 / 100 \times 50 \times 50 / 1000 = 0.5 \mu\text{mol}$ DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος ή 0.5 mmol DPPH που απομακρύνθηκαν / L πλάσματος ή 0.5 mmol DPPH/L.

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

Αρχή της μεθόδου.

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



Εικόνα 15. 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.

Αντιδραστήρια.

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

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

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

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

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

Πειραματικό Πρωτόκολλο.

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL πλάσματος (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 ($\mu\text{mol/L}$) = $(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0.156 \times 31$, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) ($3100 / 100 = 31$). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L to $\mu\text{mol/L}$.

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

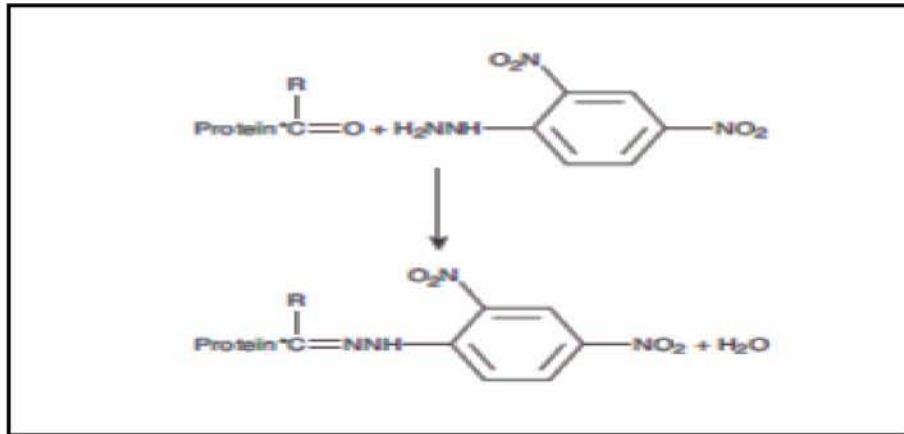
5. Πρωτεϊνικά καρβονύλια.

Αρχή της μεθόδου.

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας δείκτης της οξειδωσών 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 οξειδωσών των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

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

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



Εικόνα 16. Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPΗ (δίνιτροφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου.

Αντιδραστήρια

- **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.

- **DNPΗ 14 mM.** (MB: 198.1)

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

- **Ουρία 5 M (pH 2.3).** (MB: 60.06)

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

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Σε 50 μL πλάματος 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 αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει. Αυτήν την διαδικασία την επαναλαμβάνουμε άλλες δύο (2) φορές και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

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

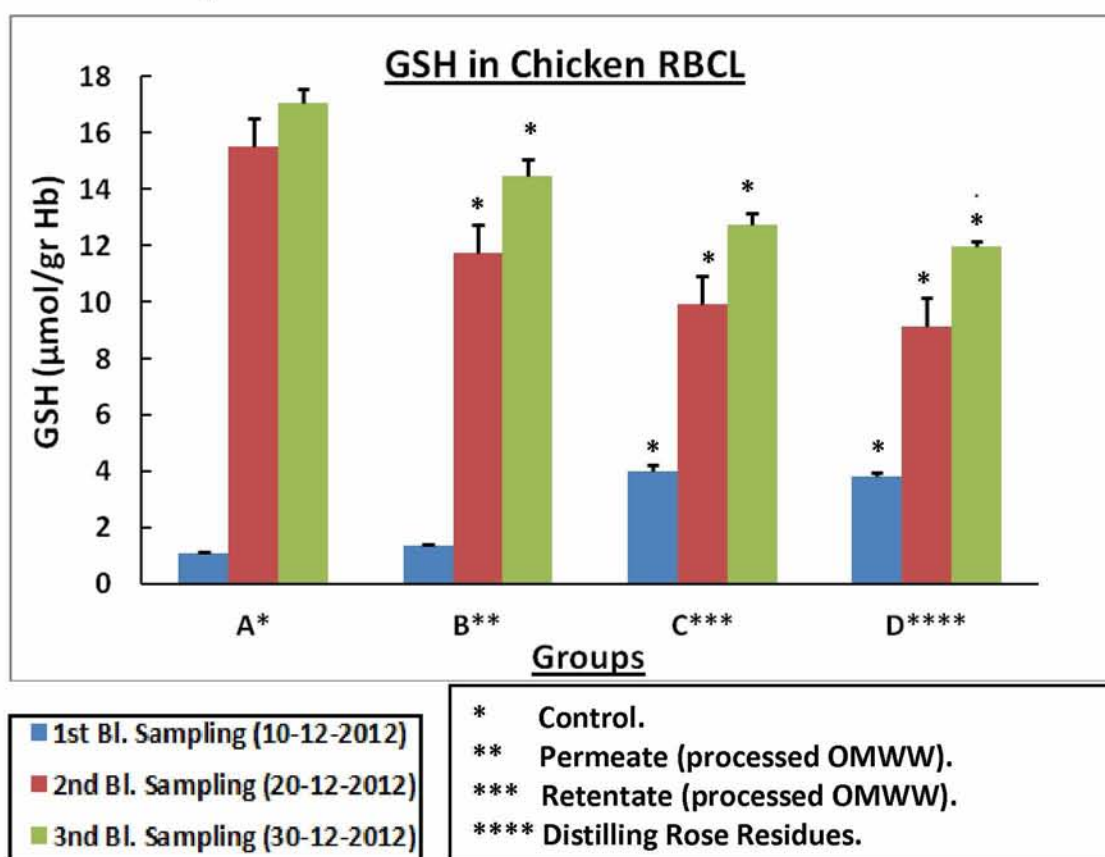
*(Κάθε δείγμα έχει το τυφλό του. Το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0.5 mL DNPH, τα οποία αντικαθίστανται 0.5 mL HCL 2.5 N).

Υπολογισμοί.

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1000/50$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$.

Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραιώσης (1000 μL στην κυψελίδα /50 μL δείγματος).

3. Αποτελέσματα.

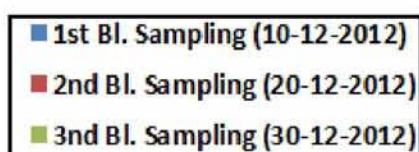
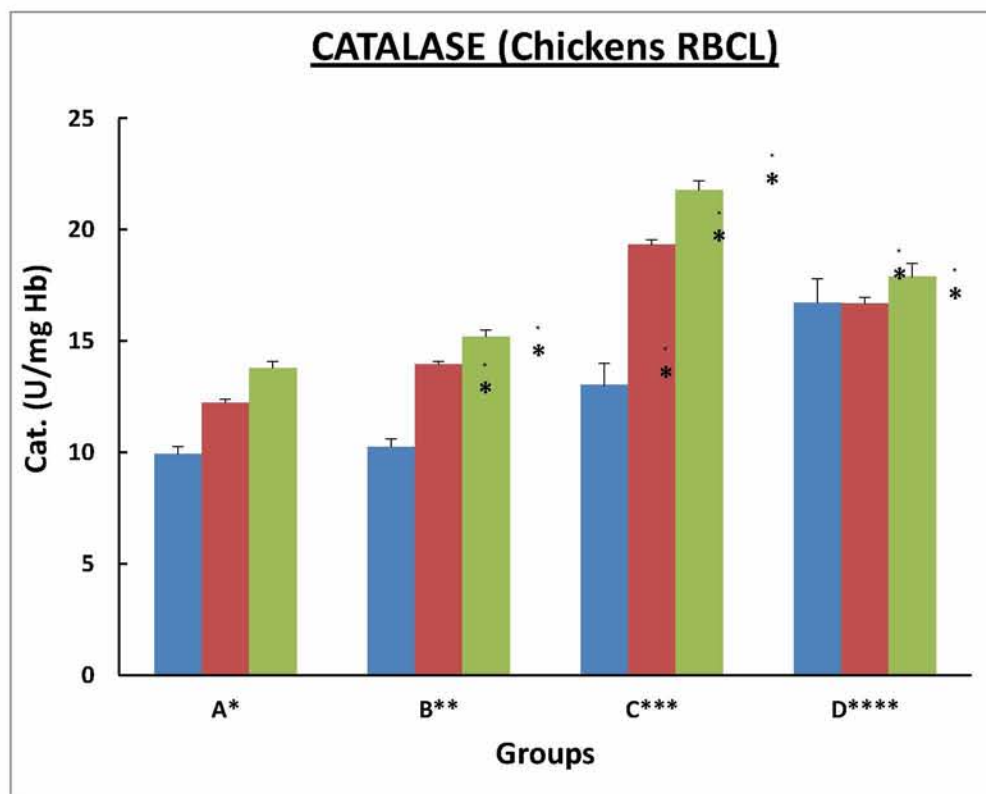


Γράφημα 1. GSH στο Αιμόλυμα των Κοτόπουλων. ($p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά Αιμοληψία).

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm SEM. Εκτελέστηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (one way ANOVA), με το πρόγραμμα PASW Statistics 18 (πρώην SPSS Statistics), κατά Tukey και Dunnett. Το επίπεδο σημαντικότητας προσδιορίστηκε σε $P < 0,05$.

Η Α ομάδα (Control) στην 1η αιμοληψία (κοτόπουλα 30 ημερών και μέσου βάρους 650 γραμμαρίων), παρουσιάζει μειωμένες στατιστικά σημαντικές τιμές GSH σε σχέση με τις C και D ομάδες.

Επίσης, στην πρώτη αιμοληψία και σε όλες τις ομάδες παρατηρούνται τιμές GSH στατιστικά σημαντικά μικρότερες, από τις άλλες δύο αιμοληψίες με τις υψηλότερες να παρατηρούνται στην ομάδα του μάρτυρα.

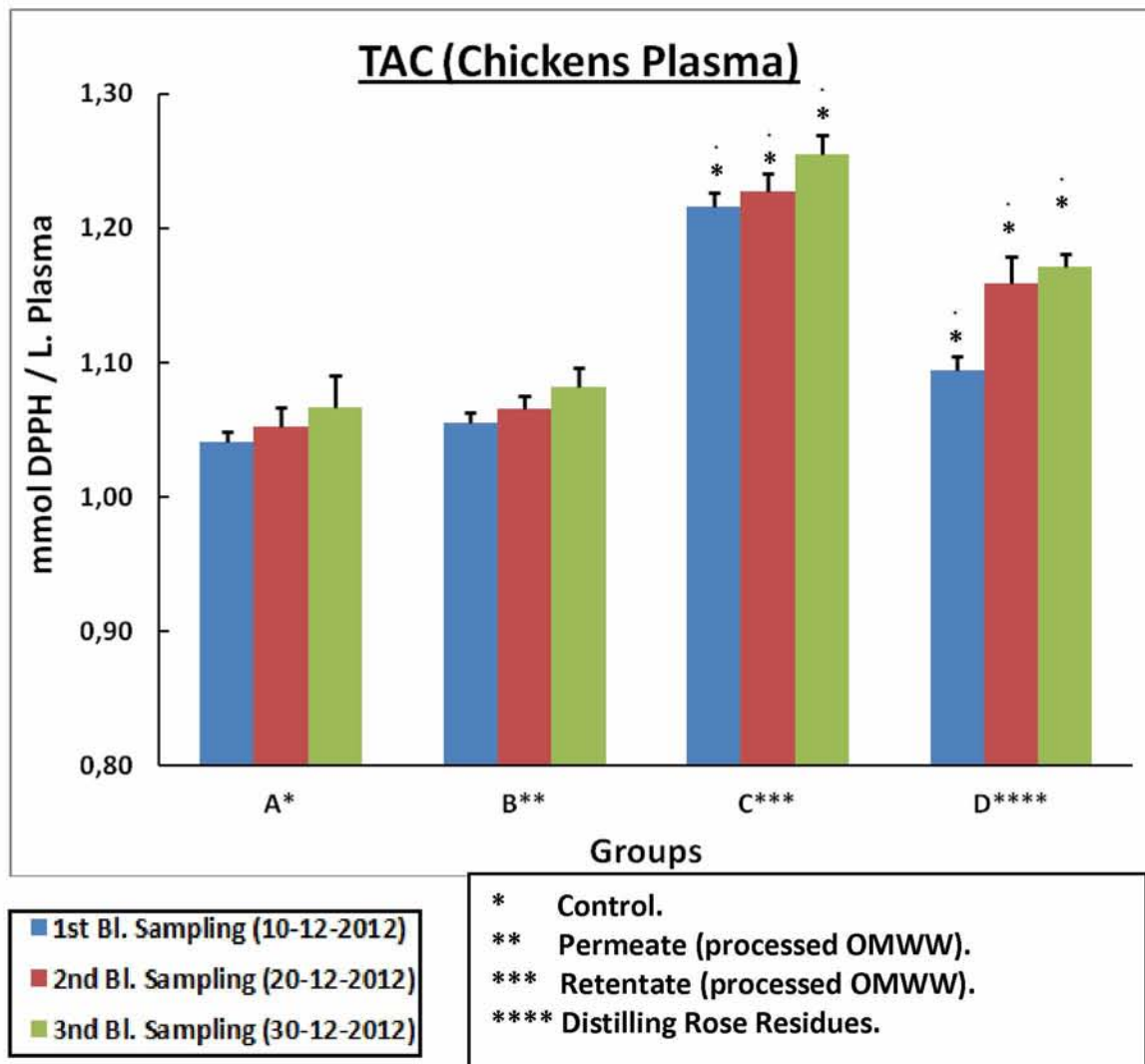


*	Control.
**	Permeate (processed OMWW).
***	Retentate (processed OMWW).
****	Distilling Rose Residues.

Γράφημα 2. Καταλάση στο Αιμόλυμα των Κοτόπουλων. ($p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά Αιμοληψία).

Η Α ομάδα (Control) και η Β στην 1η αιμοληψία (κοτόπουλα 30 ημερών), παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μειωμένες τιμές καταλάσης, σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες.

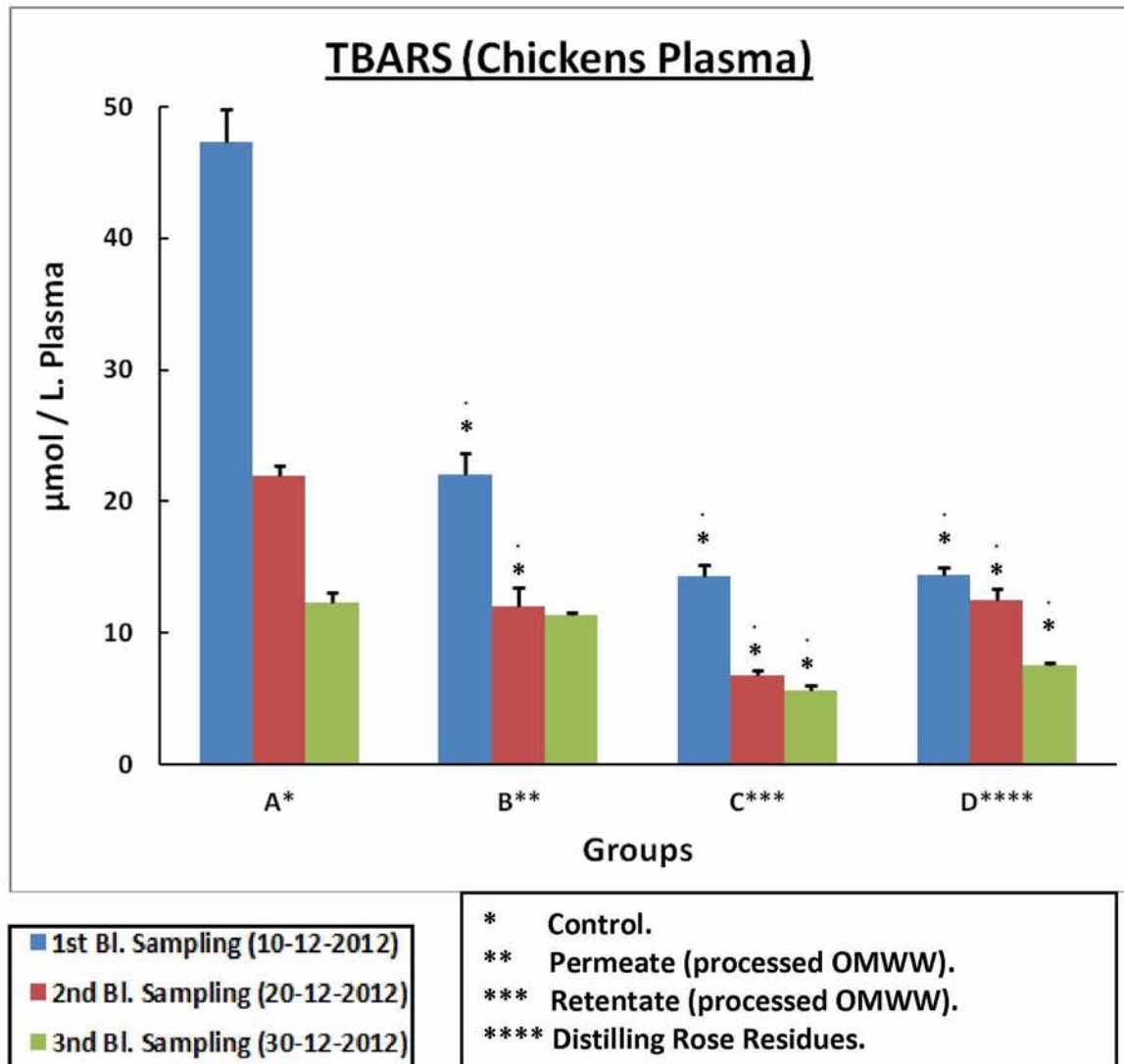
Η C ομάδα παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές καταλάσης στις δύο (2) τελευταίες αιμοληψίες. Κατά την 3η αιμοληψία παρουσιάζονται οι μεγαλύτερες τιμές σε σύγκριση (στατιστικά σημαντικές) με τις υπόλοιπες ομάδες.



Γράφημα 3. TAC στο Πλάσμα των Κοτόπουλων. (* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά Αιμοληψία).

Η Α ομάδα (Control) και η Β στην 1η αιμοληψία (κοτόπουλα 30 ημερών), παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μειωμένη TAC (total antioxidant capacity), σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες.

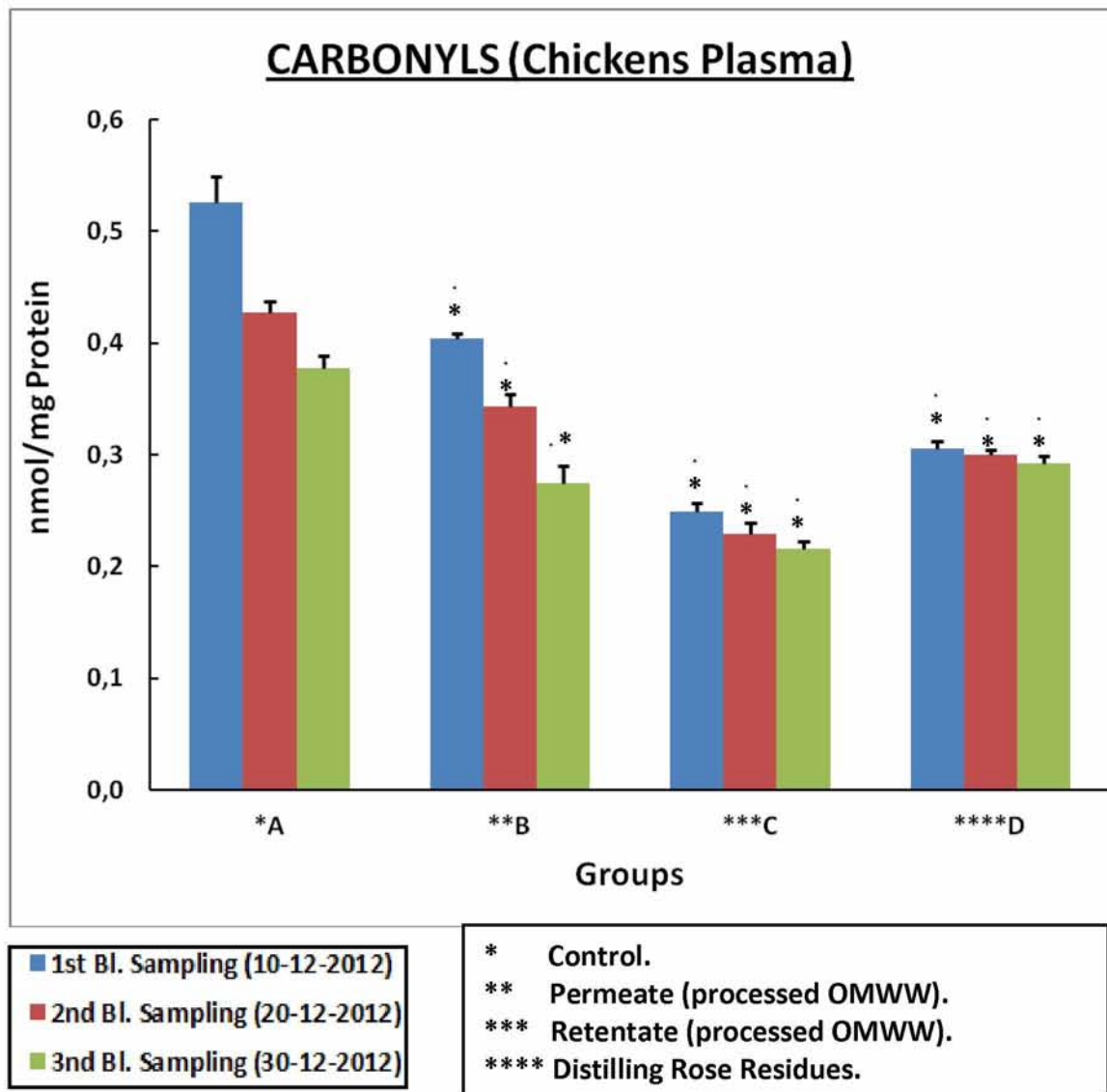
Η C ομάδα παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές TAC σε όλες τις αιμοληψίες. Κατά την 3η αιμοληψία παρουσιάζονται οι μεγαλύτερες τιμές, στατιστικά σημαντικές με τις υπόλοιπες ομάδες.



Γράφημα 4. TBARS στο Πλάσμα των Κοτόπουλων. ($p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά Αιμοληψία).

Η Α ομάδα (Control) στην 1η αιμοληψία (κοτόπουλα 30 ημερών), παρουσιάζει στατιστικά σημαντικά αυξημένα TBARS σε σχέση με τις υπόλοιπες αιμοληψίες όχι μόνο στην ίδια ομάδα, αλλά και σχέση με τις υπόλοιπες.

Η C ομάδα παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές TBARS σε όλες τις αιμοληψίες. Κατά την 3η αιμοληψία παρουσιάζονται οι μικρότερες τιμές TBARS, στατιστικά σημαντικές με τις υπόλοιπες ομάδες.



Γράφημα 5. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στο Πλάσμα των Κοτόπουλων. (* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά Αιμοληψία).

Η Α ομάδα (Control) στην 1η αιμοληψία (κοτόπουλα 30 ημερών), παρουσιάζει στατιστικά σημαντικά αυξημένα πρωτεϊνικά καρβονύλια, σε σχέση με τις υπόλοιπες αιμοληψίες όχι μόνο στην ίδια ομάδα, αλλά και σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Η C ομάδα παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές καρβονυλίων σε όλες τις αιμοληψίες. Κατά την 3η αιμοληψία παρουσιάζονται οι μικρότερες τιμές, στατιστικά σημαντικές με τις υπόλοιπες ομάδες.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εκτραφούν τέσσερις (4) ομάδες κοτόπουλων πάχυνσης με πολυφαινολικά πρόσθετα, έτσι ώστε να ελεγχθούν οι δείκτες του οξειδωτικού στρες, στο πλάσμα και το αιμόλυμά τους. Με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, δεν εντοπίστηκε μόνον η συμπεριφορά των δεικτών, σε σχέση με τον χρόνο, αλλά και μεταξύ των ομάδων. Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που ελέγχθηκαν ήταν: Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστηριότητα της καταλάσης (Catalase activity), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC–Total antioxidant capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS – Thiobarbituric acid reactive substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Το σπουδαιότερο σε αυτήν την εργασία είναι πως οι δείκτες δεν διαφοροποιούνται μόνον από αιμοληψία σε αιμοληψία, αλλά τα πολυφαινολικά πρόσθετα διαφοροποιούν τους δείκτες και μεταξύ των ομάδων ακόμα και στην ίδια αιμοληψία.

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα, καταλήγουμε στις παρακάτω παρατηρήσεις και συμπεράσματα: Συγκεκριμένα, στην πρώτη αιμοληψία η ομάδα C, που ελάμβανε το πλήρως εμπλουτισμένο σε πολυφαινόλες εκχύλισμα από ΥΑΕ, είχε αυξημένες τιμές γλουταθειόνης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου περίπου στο τετραπλάσιο (από 1,1 σε 4 $\mu\text{mol}/\text{gr}$ αιμοσφαιρίνης), που σημαίνει πως τα νεαρά κοτόπουλα με την χορήγηση πολυφαινολικών προσθέτων, αυξάνουν τα επίπεδα της γλουταθειόνης. Με την πάροδο του χρόνου και μετά την 1η αιμοληψία, παρουσιάζεται μεγάλη αύξηση της GSH στο αιμόλυμα, όσον αφορά στην ομάδα του μάρτυρα (αύξηση επιπέδων πάνω από 14 φορές). Παράλληλα, οι άλλες τρεις (3) ομάδες παρουσιάζουν μικρότερες τιμές, στατιστικά σημαντικές. Το ίδιο συμπέρασμα ισχύει και στην τρίτη (3) αιμοληψία, με την υψηλότερη τιμή να παρατηρείται στην ομάδα ελέγχου και οι χαμηλότερες τιμές στις ομάδες C and D αντίστοιχα. Αυτό ερμηνεύεται ως απόκριση του οργανισμού στα εξωγενή αντιοξειδωτικά τα οποία παρέχονται. Έτσι, με αυτόν τον τρόπο, ο οργανισμός καθορίζει την αντιοξειδωτική του άμυνα. Όσον αφορά στην δραστηριότητα της καταλάσης, με την πάροδο του χρόνου υπάρχει μία αύξηση, στην ομάδα του μάρτυρα, η οποία είναι και στατιστικά σημαντική. Μία άλλη παρατήρηση είναι πως η ομάδα ελέγχου, παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές, σε σχέση με τις άλλες ομάδες. Σε κάθε συλλογή αίματος η ομάδα C, αυξάνει την δραστηριότητα της

καταλάσης, με μεγαλύτερη τιμή αυτήν της τρίτης αιμοληψίας, η οποία και είναι στατιστικά σημαντική. Αυτό σημαίνει πως τα πολυφαινολικά πρόσθετα της ομάδας C, υποβοηθούν στην δραστηριότητα του ενζύμου, με αποτέλεσμα την αύξηση της διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο.

Οι τιμές των δεικτών του οξειδωτικού στρες στο πλάσμα, παρουσιάζουν ιδίετο ενδιαφέρον και ερμηνεύονται ως ακολούθως: Με την πάροδο του χρόνου, η ομάδα ελέγχου παρουσιάζει αύξηση στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική (2.4%). Σε αντίθεση, η ομάδα C, αυξάνει στατιστικά σημαντικά τις τιμές της TAC, σε σχέση με τις άλλες ομάδες. Αυτό σημαίνει πως οι πολυφαινόλες που λαμβάνονται από αυτήν την ομάδα, υποβοηθούν στην αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η ομάδα D, παρουσιάζει την δεύτερη υψηλότερη τιμή TAC. Η ομάδα ελέγχου κατά την διάρκεια της πρώτης αιμοληψίας, παρουσιάζει στατιστικά αυξημένες τιμές TBARS, σε σύγκριση με τις άλλες αιμοληψίες, όχι μόνον στην ίδια ομάδα, αλλά και σε σχέση με τις υπόλοιπες. Η ομάδα C παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές TBARS, στατιστικά σημαντικές σε σχέση με τις άλλες ομάδες και μειώνει συνεχώς τις τιμές, που ερμηνεύεται πως η παρουσία των πολυφαινολών, δρα αντιοξειδωτικά και έτσι συνεισφέρει στην μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Η ομάδα D παρουσιάζει την δεύτερη χαμηλότερη τιμή TBARS. Τελικά, μελετήθηκε και η οξειδωση των πρωτεϊνών. Η ομάδα ελέγχου παρουσιάζει αυξημένες τιμές, στατιστικά σημαντικές σε σχέση με τις άλλες ομάδες. Η ομάδα C μειώνει συνεχώς την συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, το οποίο σημαίνει πως οι πολυφαινόλες που υπάρχουν σ' αυτήν την ομάδα υποβοηθούν στην μείωση της οξειδωσης των πρωτεϊνών. Η ομάδα D παρουσιάζει την δεύτερη χαμηλότερη τιμή συγκέντρωσης των καρβονυλίων.

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα πως τα πολυφαινολικά πρόσθετα, στο σιτηρέσιο των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, δρουν ως αντιοξειδωτικά διότι, για παράδειγμα, η ομάδα C σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, κατά την τρίτη αιμοληψία αυξάνει την τιμή της TAC κατά 15% και παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές μειωμένες συγκεντρώσεις στην οξειδωση των πρωτεϊνών κατά 43%, των λιπιδίων κατά 54%, αλλά και αυξημένη δραστηριότητα της καταλάσης κατά 58%. Τέλος, η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ως ενδογενές αντιοξειδωτικό, εμφανίζει μία αλλαγή, μετά την πρώτη αιμοληψία. Ενώ, μέχρι εκείνη την χρονική στιγμή η ομάδα ελέγχου παρουσίαζε μικρότερες

τιμές, σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες, κατόπιν παρατηρήθηκε ότι η ομάδα ελέγχου, στην δεύτερη και τρίτη αιμοληψία, παρουσίαζε τις μεγαλύτερες τιμές GSH, σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Αυτό ερμηνεύεται ως απόκριση του οργανισμού στα εξωγενή αντιοξειδωτικά, που χορηγούνται με το σιτηρέσιο. Έτσι, με αυτόν τον τρόπο, ο οργανισμός καθορίζει την αντιοξειδωτική του άμυνα.

Η χρήση των πολυφαινολικών προσθέτων από τα επεξεργασμένα ΥΑΕ και τα υπολείμματα της απόσταξης τριαντάφυλλου, απέδειξαν την αντιοξειδωτική τους δράση, πάνω στα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής. Ένα άλλο σπουδαίο όμως κεφάλαιο που πρέπει να επισημανθεί, είναι πως οι πολυφαινόλες αποτελούν την κύρια ρυπαντική παράμετρο, η οποία ευθύνεται για τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις των ΥΑΕ. Άρα, εάν προκύψουν μέθοδοι απομόνωσής των πολυφαινολών, τότε τα απόβλητα ελαιοτριβείου, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για παράδειγμα στην ενσίρωση για τα οικότροφα ζώα και στην υδρολίπανση. Αντίστοιχα, εφόσον απομονωθούν οι πολυφαινόλες και εκτιμηθούν οι αντιοξειδωτικές ικανότητές τους, θα μπορούσε να προκύψει ένα προϊόν με αυξημένη προστιθέμενη αξία. Το ίδιο ακριβώς ισχύει και για τα υπολείμματα απόσταξης του τριαντάφυλλου, που με μελέτες έχει αποδειχθεί η ύπαρξη ισχυρών πολυφαινολών όπως η απιγενίνη και η καμφερόλη.

Μετά τα παραπάνω, προτείνεται περαιτέρω έρευνα, σε επίπεδο ιστών, έτσι ώστε να ερευνηθεί και εκεί η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών προσθέτων. Επιπλέον, η έρευνα θα πρέπει να εφαρμοσθεί και σε άλλα ζώα. Οι χοίροι είναι ένα παράδειγμα, λόγω των γενετικών ομοιοτήτων με τους ανθρώπους. (Kararli TT 1995, Vaclavikova R., et.al., 2004).

References.

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Boon E M, Downs A and Marcey D. 2007. Proposed Mechanism of Catalase
In *Catalase: H₂O₂: H₂O₂ Oxidoreductase. Catalase Structural Tutorial Text.*
- Castañer, O., Fitó, M., López-Sabater, M.C., Poulsen, H.E., Nyssönen, K., Schröder, H., Salonen, J.T., Covas, M.I. 2011. The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition* 30 (4), pp. 490-493.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (2) , pp. 192-208.
- Dew T., Day A., Morgan M. 2005. Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components. Department of Food Science, University of Leeds.
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk. 2004. Lipid peroxidation cannot be used as universal criterion of oxidative stress. *Progr. Lipid Res*, 43: 200 -227.
- Fecka I. 2009. Qualitative and Quantitative Determination of Hydrolysable Tannins and Other Polyphenols in Herbal Products from Meadowsweet and Dog Rose. *Phytochem. Anal.*; 20: 177–190.
- Gerschman R., Gilbert D.L., Nye S.W., Dwyer P. and Fenn W.O. 1954. Oxygen poisoning and x-irradiation: A mechanism in common. *Science Magazine.*
- Giacosa, A., Barale, R., Bavaresco, L., Gatenby, P., Gerbi, V., Janssens, J., Johnston, B., Rondanelli, M. 2012. Cancer prevention in Europe: The Mediterranean diet as a protective choice. *European Journal of Cancer Prevention.* Article in Press.
- Gkoutsidis, P.E., Petrotos, K.B., Kokkora, M.I., Tziortziou, A.D., Christodouloulis, K., Goulas, P. 2011. Olive mill waste water (OMWW) treatment by diafiltration desalination and water treatment. Volume 30, Issue 1-3, Pages 237-246.

Greenwald P, Kelloff G, Burch Whitman C, Kramer BS. 1995. Chemoprevention. *CA Cancer J Clin*, 45: 31-49.

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

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

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

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

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

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

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

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

Nowak R., Gawlik-Dziki U., 2007. Polyphenols of *Rosa L.* leaves extracts and

their radical scavenging activity. *Pub. Med. Z. Naturforsch* 62(1-2):32-8.

Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. 2004. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett.*; 357: 83-86.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Zhou Yi-Bin, Wan X.-C., Shang Y.-Y., Hu J.-W., Shao L., Chen W., Li D..X. Polyphenol Content of Plasma and Litter after the Oral Administration of Green Tea and Tea Polyphenols in Chickens. 2012. *J. Agric.Food Chem.* 60, 1619–1627.