



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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ
ΙΣΤΟΥΣ (ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ-ΣΤΟΜΑΧΟΣ-ΝΕΦΡΟ) ΑΠΟ ΝΕΑΡΑ
ΧΟΙΡΙΔΙΑ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ
ΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΣΤΕΜΦΥΛΑ**

**ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN PIGLET
TISSUES (LUNG-STOMACH-KIDNEY) AFTER
ADMINISTRATION OF FEED SUPPLEMENTED WITH GRAPE
POMACE**



ΓΚΑΛΙΑΚΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον Καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτριο, ο οποίος είναι και Δ/ντής του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, για την συνεχή και ουσιαστική παρουσία και υποστήριξη του.

Ευχαριστώ ακόμη όλη την ομάδα του εργαστηρίου, για τη συνεργασία και το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τους Ιωάννη Καφαντάρη και Κωνσταντίνο Γερασόπουλο, που συνέβαλαν στα μέγιστα τόσο στη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας όσο και στην ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικές Μόρια Οξυγόνου (ΔΜΟ)	9
1.2 Μηχανισμοί Παραγωγής Ελευθέρων Ριζών	14
1.2.1 Μιτοχονδριακοί μηχανισμοί παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου	14
2.2 Κυτταροπλασματικοί μηχανισμοί παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου	16
1.2.3 Ενζυμικά Συστήματα Οξειδασών	17
1.2.4 Οξειδοαναγωγή της Ξανθίνης	19
1.2.5 Κυτόχρωμα P450	20
1.3 Οι συνέπειες της παραγωγής των ελευθέρων ριζών στους οργανισμούς - Οξειδωτικό στρες	22
1.4 Κλινική Σημασία Οξειδωτικού Στρες	26
1.5 Αντιοξειδωτική Άμυνα των Οργανισμών	31
1.5.1 Αντιοξειδωτικά Ένζυμα	31
1.5.9 Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά	35
1.6 Πολυφαινόλες	42
1.7. Κατηγορίες Φυτικών Πολυφαινολών	43
1.7.1 Φλαβονοειδή	43
1.7.2 Πολυφαινολικά Οξέα	45
1.7.3 Στυλβένια	47
1.7.4 Λιγνάνες	48
1.8. Αντιοξειδωτική Δράση Πολυφαινολών	50
1.9. Κυτταρικές δράσεις των πολυφαινολών	55

1.10. Βιοδιαθεσιμότητα Πολυφαινολών.....	60
1.11. Τοξικότητα Φυτικών Πολυφαινολών.....	65
1.12. Μορφολογικά χαρακτηριστικά και σύσταση σταφυλιών.....	68
1.13. Φαινολικά Συστατικά Σταφύλης και Στέμφυλων.....	73
1.14. Εναλλακτικές χρήσεις Στέμφυλων.....	76
1.15. Παραγωγή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών.....	79
1.16. Γενικές Πληροφορίες Για Τα Γουρούνια.....	81
1.16.1 Εγκυμοσύνη Των Χοίρων.....	82
1.16.2 Ασθένειες Που Προσβάλλουν Τους Χοίρους.....	82
1.16.3 Εκτροφή Χοίρων.....	83
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	85
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	86
3.1 Γενικά.....	86
3.1.1 Παραγωγικά Χαρακτηριστικά.....	88
3.2 Περιγραφή Σιτηρεσίου.....	89
3.2.1 Παρασκευή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών.....	89
3.2.2 Χαρακτηριστικά Ενσιρώματος.....	89
3.2.3 Παρασκευή Ενσιρώματος Στεμφύλων.....	90
3.2.4 Σύσταση πειραματικών σιτηρεσίων.....	91
3.2.5 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (in vitro) των παρασκευασμένων ζωοτροφών για τα νεαρά χοιρίδια.....	92
3.3 Ιστοληψία.....	93
3.3.1 Ομογενοποίηση ιστών.....	94
3.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.....	95
3.4.1 Γενικά.....	95
3.4.2 Μέτρηση Γλουταθειόνης.....	95
3.4.3 Δραστηριότητα της Καταλάσης.....	99
3.4.4 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC).....	101
3.4.5 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).....	104

3.4.6 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια.....	106
3.4.7 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.....	109
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	109
4.1 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πειραματικών ζωοτροφών για τους χοίρους.....	109
4.1.1 Συσχέτιση των δύο μεθόδων κατά Spearman	112
4.2 Αποτελέσματα παραγωγικών χαρακτηριστικών χοιριδίων	113
4.3 Αποτελέσματα μετρήσεων δεικτών οξειδωτικού στρες στους ιστούς (νεφρό, πνεύμονας, στόμαχος) στους χοίρους.....	117
4.3.1 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH) στον νεφρικό ιστό.....	118
4.3.2 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στον νεφρικό ιστό	119
4.3.3 Επίπεδα των TBARS στον νεφρικό ιστό	120
4.3.4 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον νεφρικό ιστό.....	121
4.3.5 Επίπεδα της TAC στον νεφρικό ιστό.....	123
4.3.6 Επίπεδα Γλουταθειόνης στον πνευμονικό ιστό	124
4.3.7 Επίπεδα Καταλάσης στον πνευμονικό ιστό.....	125
4.3.8 Επίπεδα των TBARS στον πνευμονικό ιστό.	127
4.3.9 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον πνευμονικό ιστό.....	128
4.3.10 Επίπεδα της TAC στον πνευμονικό ιστό.....	129
4.3.11 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH) στον στομαχικό ιστό	130
4.3.12 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στον στομαχικό ιστό	131
4.3.13 Επίπεδα των TBARS στον στομαχικό ιστό	132
4.3.14 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον στομαχικό ιστό	133
4.3.15 Επίπεδα της TAC στον στομαχικό ιστό.....	134
4.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στους ιστούς (νεφρός, πνεύμονας, στόμαχος) των χοίρων	136
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	138
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	145

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, πραγματοποιήθηκε εκτροφή οικόσιτων χοίρων που προήλθαν από τη διασταύρωση Landrace με Large White – Duroc – Pietrain και διεξήχθησαν 4 ιστοληψίες σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά τους στάδια, ώστε να γίνει έλεγχος της οξειδοαναγωγικής τους κατάστασης στο νεφρικό, πνευμονικό και στομαχικό ιστό. Οι πρώτες 2 ιστοληψίες διεξήχθησαν κατά την πρόωρη ηλικία (2^η και 20^η μέρα), περίοδο κατά την οποία καταναλώναν μόνο το μητρικό γάλα. Οι άλλες 2 ιστοληψίες αφορούσαν τις περιόδους μερικού (35^η μέρα) και πλήρους απογαλακτισμού (50^η μέρα), κατά τις οποίες τα εναπομείναντα χοιρίδια ήταν χωρισμένα σε δύο ομάδες ανάλογα με το πειραματικό σιτηρέσιο που καταναλώναν. Η πρώτη ομάδα αποτελούσε την ομάδα ελέγχου, ενώ η δεύτερη την πολυφαινολική ομάδα, το σιτηρέσιο της οποίας ήταν εμπλουτισμένο με στέμφυλα οиноποιίας, τα οποία περιέχουν πολυφαινόλες. Στη συνέχεια, ελέγχθηκαν οι δείκτες του οξειδωτικού στρες, όπως η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστικότητα της καταλάσης (CAT), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, στους προαναφερθέντες ιστούς. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν (44% και 203,2% στις 35 ημέρες,) στον πνευμονικό και στομαχικό ιστό αντίστοιχα, στις 50 ημέρες αυξήθηκαν (80,51% και 59,09%) στον νεφρικό και πνευμονικό ιστό αντίστοιχα ενώ στον στομαχικό ιστό μειώθηκαν GSH (41,83%). Στις 35 ημέρες η δραστικότητα της CAT αυξήθηκε κατά 28,29% στον νεφρικό ιστό, στον πνευμονικό και στομαχικό ιστό μειώθηκε κατά 42,24% και 19,70% αντίστοιχα, ενώ στις 50 ημέρες αυξήθηκε στον νεφρικό ιστό (29,94%) ενώ στον πνευμονικό ιστό μειώθηκε (43,03%). Τα TBARS μειώθηκαν στις 35 ημέρες κατά 33,42% στον νεφρικό ιστό, αυξήθηκαν κατά 23,36% και 27,71% στον πνευμονικό και στομαχικό ιστό αντίστοιχα, ενώ στις 50 ημέρες, αυξήθηκαν στον πνευμονικό ιστό (23,56%). Η TAC αυξήθηκε (54,45% στις 50 ημέρες) στον νεφρικό ιστό (54,45% στις 50 ημέρες) και τέλος, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξήθηκαν (25,58% στις 50 ημέρες) στον πνευμονικό ιστό ενώ στον στομαχικό ιστό μειώθηκαν (35,36% στις 50 ημέρες). Συμπερασματικά, τα πολυφαινολικά πρόσθετα των στεμφύλων είχαν ευεργετική επίδραση στους ιστούς. Επομένως, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για να διευκρινιστεί η επιρροή των στεμφύλων, καθώς και ο μηχανισμός δράσης στους επιμέρους ιστούς. Ωστόσο, αυτά τα πρώτα αποτελέσματα είναι θετικά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η χρήση στεμφύλων στην παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων θα επιλύσει και τα οικολογικά προβλήματα που πηγάζουν όταν αυτά εναποτίθενται αλόγιστα στο περιβάλλον.

ABSTRACT

In the present study, breeding of domestic pigs, derived from the cross between Landrace and Large White – Duroc – Pietrain and four tissue collections was carried out at specific developmental stages, in order to examine the redox status in the kidney, lung and stomach tissue, after the administration of feed supplemented with grape pomace. The first two sample collections took place at the early age of piglets (2 and 20 days post birth), during which they were consuming only breast milk. The other two tissue collections took place during the period of partial and full weaning, at days 35 and 50 post birth, respectively. During that period, the piglets were divided into two groups depending on their experimental diet. The first group was treated with basal feed (control group), while the second group was treated with experimental feed, enriched with polyphenolic additives derived from grape pomace (grape pomace group). Consequently, the antioxidant effects of the experimental feed were assessed by measuring the following oxidative stress biomarkers in the aforementioned tissues: reduced glutathione (GSH), catalase activity (CAT), total antioxidant capacity (TAC), thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and protein carbonyls (CARB). According to the results, GSH levels were increased (by 44% and 203,2% at 35 d) in lung and stomach respectively, at 50 d were increased (by 80,51% and 59,09%) in kidney and lung respectively, whereas in stomach there was a decrease in GSH levels (by 41,83%). At 35 days, CAT activity increased by 28,29% in kidney, in lung and stomach, CAT activity decreased by 42,24% and 19,70% respectively, whereas at 50 days, increased in kidney (29,94%) whereas in lung decreased (43,03%). TBARS levels, at 35 days, reduced in kidney (by 33,42%), in lung (by 23,36%) and stomach (by 27,71%) decreased, whereas at 50 days, TBARS levels increased in lung tissue (by 23,56%). TAC levels increased (by 54,45% at 50 d) in kidney and finally, protein carbonyls levels increased (by 25,58% at 50 d) in lung, whereas in stomach decreased (by 35,36% at 50 d). In conclusion, grape pomace polyphenolic additives seemed to be beneficial in the examined tissues. Therefore, further investigations are required in order to elucidate the effects of grape pomace polyphenols, as well as their molecular mechanisms of action in the aforementioned tissues. The results from this study are encouraging, as apart from harnessing the pomace's polyphenols to improve the animals' redox status, a concomitant reduction of the environmental pollution from the aggregation of these pollutants will be observed

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικά Μόρια Οξυγόνου (ΔΜΟ)

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

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

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

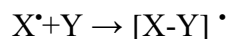
αντιπαράλληλη στροφορμή (spin) από άλλο μόριο κ.ο.κ.. Η αλυσιδωτή αυτή αντίδραση μπορεί να συνεχιστεί επί μακρόν. Το υπόβαθρο για τη διεργασία αυτή αποτελεί η εγγενής τάση ατόμων, ιόντων, μορίων και γενικά ενεργειακών συστημάτων, φυσικά και των ριζών, να διατηρούνται στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας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

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

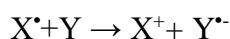
1. Απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $X \rightarrow e^- + X^\bullet$
2. Λήψη ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $Y + e^- \rightarrow Y^{\bullet-}$
3. Ομολυτική σχάση ομοιοπολικού δεσμού: $A:B \rightarrow A^\bullet + B^\bullet$

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

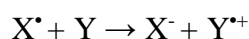
1. Προσθετικώς, όταν η ελεύθερη ρίζα συνδέεται με ένα μόριο ή άτομο (π.χ. προσθήκη της ρίζας OH^\bullet στη βάση γουανίνη του DNA):



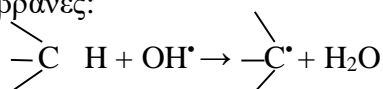
2. Αναγωγικώς, όταν η ελεύθερη ρίζα δρα ως αναγωγικός παράγοντας, παραχωρώντας το ασύζευκτο της ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο ή άτομο:



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



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



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

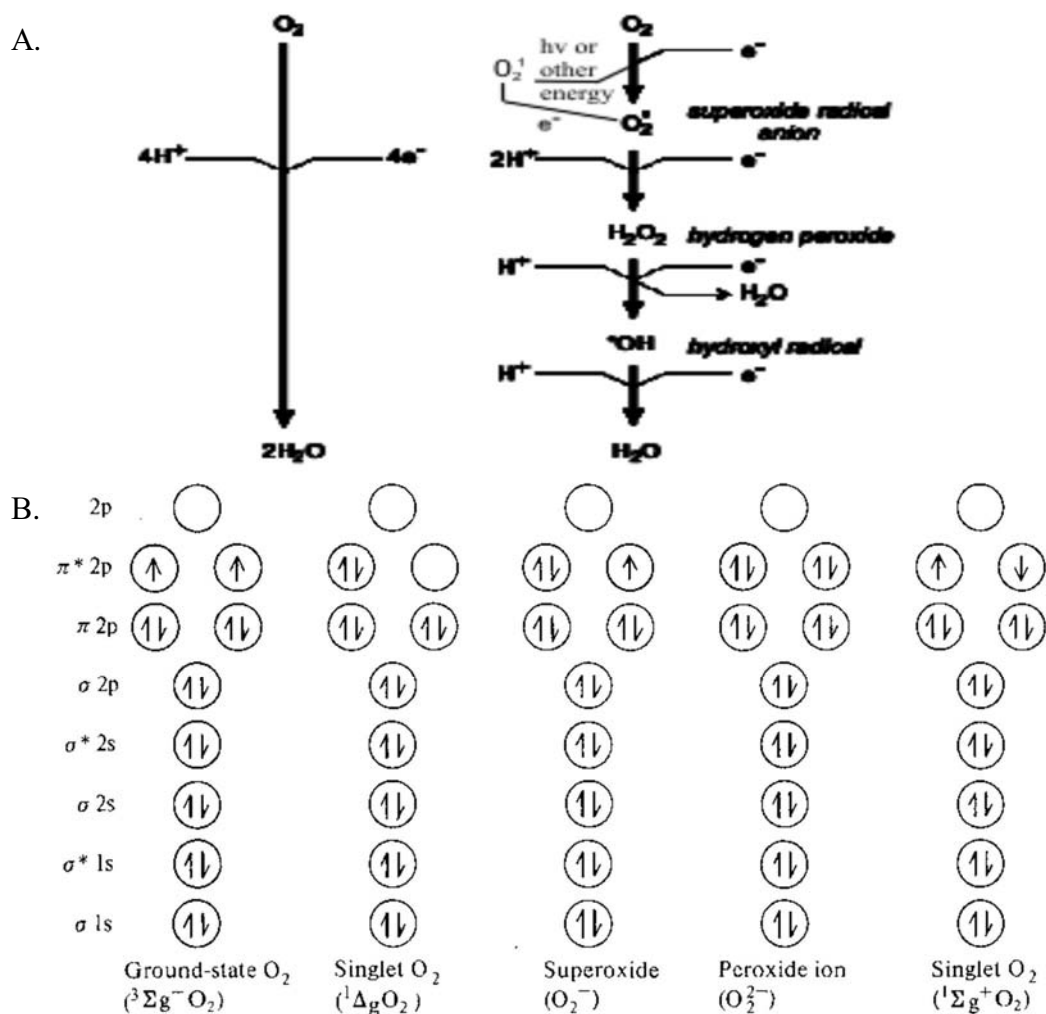
οξυγόνο, οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) που προέρχονται από το χλώριο, με τις τρεις αυτές τελευταίες κατηγορίες ριζών να μπορούν να προέλθουν από αντίδραση με τις δραστικές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

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

α) Με πρόσληψη ενέργειας από το O_2 βασικής κατάστασης, το οποίο έτσι μεταπίπτει στη διεγερμένη κατάσταση του μονήρους οξυγόνου (singlet oxygen). Η απορροφούμενη ενέργεια σε πρώτη φάση αντιστρέφει τη στροφορμή του ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου (ενδιάμεση μορφή μονήρους οξυγόνου, $^1\Sigma^+O_2$). Αμέσως μετά, τα δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, έχοντας πλέον αντίθετες στροφορμές και κατάλληλη ενέργεια, καταλήγουν σε κοινό τροχιακό, δίνοντας την τελική μορφή μονήρους οξυγόνου ($^1\Delta gO_2$) που είναι ένας ιδιαίτερα δραστικός οξειδωτικός παράγοντας. Η μετάπτωση του μοριακού οξυγόνου από τη βασική στη μονήρη κατάσταση είναι κατά κανόνα συζευγμένη με την αποδιέγερση κάποιου κατάλληλου μορίου, το οποίο είχε προηγουμένως διεγερθεί με την απορρόφηση φωτεινής ή άλλης ακτινοβολίας υψηλής ενέργειας. Το συνολικό φαινόμενο καλείται αντίδραση φωτοευαισθητοποίησης (photosensitization reaction) και μπορεί να λάβει χώρα in vivo με τη μεσολάβηση διαφόρων μορίων όπως φλαβινομάδες (FMN, FAD, ριβοφλαβίνη), πορφυρίνες, χολερυθρίνη κ.α.

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

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



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

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

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

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

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

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

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

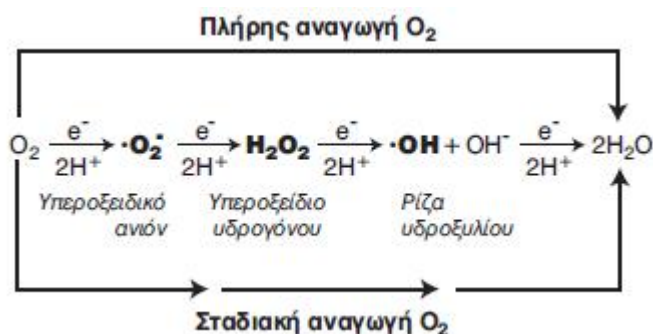
^β Μπορεί να χαρακτηριστεί και ως δραστική μορφή αζώτου (reactive nitrogen species, RNS)

1.2 Μηχανισμοί Παραγωγής Ελευθέρων Ριζών

1.2.1 Μιτοχονδριακοί μηχανισμοί παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου

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

κυτταρόπλασμα και κινητοποιεί συγκεκριμένες σηματοδοτικές οδούς. Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στα μιτοχόνδρια, στον υπόλοιπο οργανισμό η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου γίνεται σταδιακά, δηλαδή σε κάθε βήμα προστίθεται και ένα ηλεκτρόνιο, με συνέπεια το σχηματισμό ενδιάμεσων προϊόντων, τα σπουδαιότερα από τα οποία είναι το υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\cdot-}$) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (Σχήμα 1).



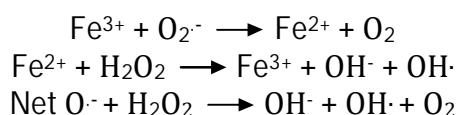
Σχήμα 1: Αναγωγή του μοριακού οξυγόνου εκτός μιτοχονδρίων.

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

2.2 Κυτταροπλασματικοί μηχανισμοί παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου

Όσον αφορά την παραγωγή ελεύθερων ριζών εκτός των μιτοχονδρίων, φαίνεται πως αυτή επιτελείται από ενζυμικά συστήματα, για την παραγωγή υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και H_2O_2 στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Στα συστήματα αυτά περιλαμβάνονται, η NADH-οξειδάση, η οξειδάση του κυτταροχρώματος P450, η κυκλοξυγενάση, η ξανθινοξειδάση και η λιποξυγενάση. Τα παραπάνω ένζυμα, συμβάλουν στην παραγωγή σε ένα πρώτο στάδιο ενός ενδιάμεσου προϊόντος, δηλαδή $O_2^{\cdot-}$ και σε ένα δεύτερο στάδιο H_2O_2 (σχήμα 1). Επειδή όμως τα πρώτα αυτά ενδιάμεσα προϊόντα είναι τοξικά για τους ιστούς, η συμβίωση του οργανισμού μαζί τους έχει διασφαλισθεί με την ανάπτυξη μηχανισμών εξουδετέρωσής τους, από τα ένζυμα της οικογένειας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (superoxide dismutase, SOD) (Mn-SOD στα μιτοχόνδρια, Cu,Zn-SOD στο κυτταρόπλασμα και EC-SOD στην κυτταρική μεμβράνη) μετατρέπουν το $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 στο οποίο στη συνέχεια δρουν αφενός η καταλάση και αφετέρου η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase) και το μετατρέπουν σε νερό. Παρ' όλα αυτά, τα δύο πρωτοσχηματιζόμενα προϊόντα της ατελούς αναγωγής του μοριακού οξυγόνου (και ιδίως το H_2O_2) αποτελούν σηματοδοτικά μόρια και δευτερογενή διαβιβαστικά μόρια (second messenger) στην σηματοδοτική διαδικασία αυξητικών παραγόντων (growth factors) και ορμονών, υπό συγκεκριμένες παθολογικές συνθήκες αποτελούν και υπόστρωμα για το σχηματισμό νέων ενδιάμεσων προϊόντων έναντι των οποίων ο οργανισμός διαθέτει περιορισμένη αμυντική ικανότητα. Μεταξύ των ριζών αυτών κυριότερες είναι: η υδροξυλική ρίζα (OH^{\cdot}) η οποία παράγεται από το H_2O_2 , με την καταλυτική δράση του δισθενούς σιδήρου (ferrous state), που δίνει ένα ηλεκτρόνιο και μετατρέπεται σε τρισθενή (ferric state) κατά την αντίδραση:

Αντίδραση Haber-Weiss:



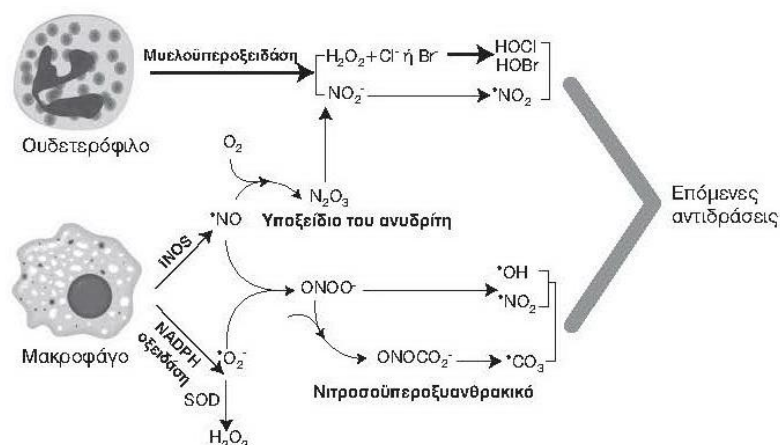
το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$) που παράγεται με τη δράση της μυελοϋπεροξειδάσης και υπεροξυνιτρικό ($ONOO^-$) που παράγεται από το $O_2^{\cdot-}$ παρουσία του μονοξειδίου του αζώτου (Παπαγαλάνης, 2014). Ειδικότερα, το υπεροξυνιτρικό ανιόν ($ONOO^-$), σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ($ONOOH$) (Korpenol, 1998) και από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες OH^{\cdot} και NO_2^{\cdot} . Τέλος, η αντίδραση του

μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη (UQH₂) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης (UQH), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου (O₂^{·-}) (Boveris & Cadenas, 1997).

1.2.3 Ενζυμικά Συστήματα Οξειδασών

Βέβαια, οι ελεύθερες ρίζες δεν αποτελούν απλώς παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού, αλλά η παραγωγή τους γίνεται με λεπτομερώς προγραμματισμένο μηχανισμό από εξειδικευμένα ένζυμα, τις οξειδάσες NOX (NADPH-oxidase) και DUOX (dual-oxidase), εξυπηρετώντας την φυσική ανοσία, συγκεκριμένες σηματοδοτικές λειτουργίες και τη βιοσύνθεση ορμονών. Χαρακτηριστικά, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος με φαγοκυτταρική λειτουργία (ουδετερόφιλα και μακροφάγα), όταν έρθουν σε επαφή με μικρόβια, αυξάνουν απότομα και σε πολύ μεγάλο βαθμό ("εκρηκτικά") την κατανάλωση οξυγόνου, η οποία δεν φαίνεται να αναστέλλεται από την παρουσία κυανίου, που αναστέλλει την μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, με αποτέλεσμα την ανεύρεση του ενζύμου της φαγοκυτταρικής NADPH-οξειδάσης, η οποία καταναλώνει το οξυγόνο και ευθύνεται για την μεγάλη παραγωγή O₂^{·-}, H₂O₂ και HOCl στο φαγόσωμα για την καταστροφή των μικροβίων. Τα συγκεκριμένα ενζυμικά συμπλέγματα, βρέθηκε να εντοπίζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Mohazzab και συν.), στα λεία μυϊκά κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος (Griendling και συν.), στα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου (colon epithelial cells) και έκτοτε σε όλα σχεδόν τα κύτταρα του οργανισμού, συμμετέχοντας στην παθογένεια διάφορων νοσημάτων είτε λόγω ανεπάρκειάς τους (κοκκιωματώδεις νόσοι) είτε λόγω υπερδραστηριότητάς τους και υπερπαραγωγής ROS. Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι μεταξύ του ενζυμικού συμπλέγματος που εκφράζεται στα φαγοκύτταρα και αυτού που εκφράζεται σε άλλους ιστούς υπάρχει μια ουσιαστική λειτουργική διαφορά: στα φαγοκύτταρα η ενεργοποίησή του γίνεται ανάλογα με τις αμυντικές ανάγκες του οργανισμού, ενώ στα υπόλοιπα κύτταρα η δραστηριότητά του είναι ιδιοσυστασιακή (constitutive) δηλαδή συνεχής και παράγει ένα "βασικό" επίπεδο ελεύθερων ριζών. Σήμερα είναι γνωστές επτά ισομορφές των ενζυμικών αυτών συστημάτων. Οι πέντε από αυτές έχουν ως κεντρική καταλυτική μονάδα την NADPH οξειδάση (NOX), και αναφέρονται ως NOX-1, NOX-2, NOX-3, NOX-4 και NOX-5, και οι δύο υπόλοιπες την διπλή (dual) οξειδάση και αναφέρονται ως DUOX-1 και DUOX-2. Το υπεροξείδιο είναι το προϊόν των NOX1, NOX2 και NOX5 ενώ οι οξειδάσες NOX4, DUOX1 και DUOX2 παράγουν H₂O₂. Λόγω

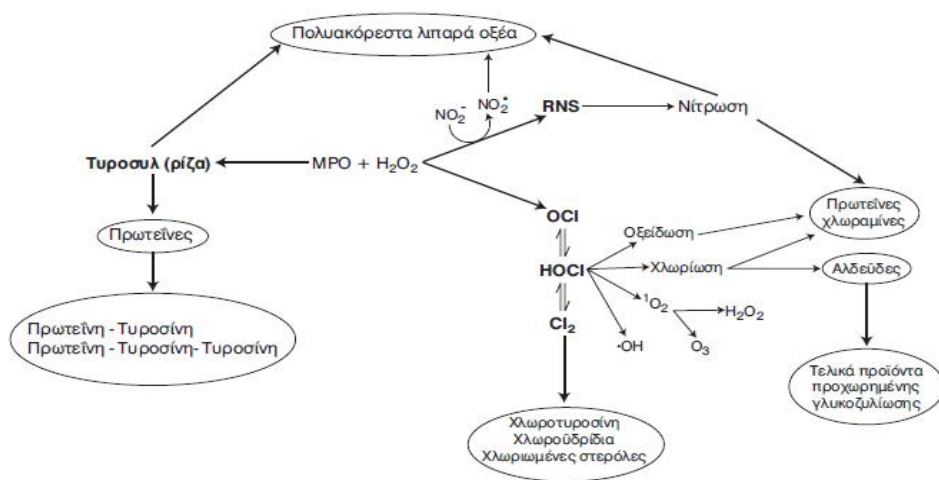
στερεοχημικής δομής των NOX4, DUOX1 και DUOX2 το παραγόμενο υπεροξειδίο καθυστερεί να απελευθερωθεί από το μόριο της οξειδάσης ώστε να συντίθεται και ένα δεύτερο μόριο υπεροξειδίου πριν αποσπασθεί το πρώτο, και να δημιουργείται H₂O₂ με τη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης.



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

Η μυελοϋπεροξειδάση, είναι μια λυσοσωμική πρωτεΐνη (ένζυμο) που υπάρχει στα κοκκία των πολυμορφοπυρήνων και ανήκει στην οικογένεια "υπεροξειδάσης-κυκλοξυγενάσης" των οξειδοαναγωγικών ενζύμων, μαζί με την ηωσινοφιλική υπεροξειδάση (eosinophil peroxidase, EPO) και τη γαλακτική υπεροξειδάση (lacto peroxidase, LPO), που δρουν ως παράγοντες φυσικής ανοσίας. Η EPO είναι υπεύθυνη για την παραγωγή υποβρομιώδους οξέος (hypobromous acid, HOBr) από τα ενεργοποιημένα ηωσινόφιλα και η μυελοϋπεροξειδάση για την παραγωγή υποχλωριώδους οξέος (hypochlorous acid, HOCl) από τα πολυμορφοπύρηνα και τα μονοκύτταρα και χρησιμοποιούν H₂O₂ και το αντίστοιχο αλογόνο (βρώμιο ή χλώριο). Τα παραγόμενα οξέα κατά την "αναπνευστική έκρηξη" διοχετεύονται στο φαγόσωμα συμβάλλοντας στην καταστροφή των μικροβίων. Εκτός από το υποχλωριώδες οξύ, η MPO είναι υπεύθυνη, για την παραγωγή υδροξυλικής ρίζας ($\cdot\text{OH}$), μοριακού χλωρίου, μονήρους οξυγόνου (singlet oxygen, $^1\text{O}_2$) και όζοντος (O₃). Τα μόρια αυτά δεν περιορίζονται μόνο στο φαγόσωμα, αλλά διοχετεύονται στον εξωκυττάριο χώρο και προκαλούν οξειδωτική βλάβη πρωτεϊνών και λιπών (Σχ. 2). Μάλιστα η χλωροτυροσίνη (που είναι αποτέλεσμα της δράσης της MPO στην τυροσίνη των πρωτεϊνών) αποτελεί και δείκτη της τοξικής δράσης του ενζύμου, ενώ οι ισχυρές

οξειδωτικής ικανότητας ρίζες (HOCl , $\cdot\text{HO}$), που απελευθερώνονται στην τελευταία περίπτωση αντιδρούν άμεσα με μόρια του παρακείμενου περιβάλλοντος και κυρίως με τις λευκοματίνες και επακόλουθα η οξειδωτική τους δράση εξαντλείται στα άμεσα περιβάλλον του λυθέντος πολυμορφοπύρηνου. Δεν ισχύει όμως το ίδιο για το H_2O_2 και τις χλωραμίνες οι οποίες λόγω μικρότερης οξειδωτικής ισχύος μεταφέρονται εύκολα σε μεγαλύτερη απόσταση. Η MPO και η EPO είναι ισχυρές βάσεις και συνδέονται με τις αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές μεμβράνες όπου φθάνει και το H_2O_2 και με αυτό τον τρόπο το σύστημα MPO- H_2O_2 ενεργοποιείται στην επιφάνεια κυττάρων που ευρίσκονται μακριά από το λυθέν πολυμορφοπύρηνου προκαλώντας ιστική βλάβη (Ν. Παπαγαλάνης, 2014).



Σχήμα 2: Επίδραση της μυελοϋπεροξειδάσης στις πρωτεΐνες και στα λίπη

1.2.4 Οξειδοαναγωγή της Ξανθίνης

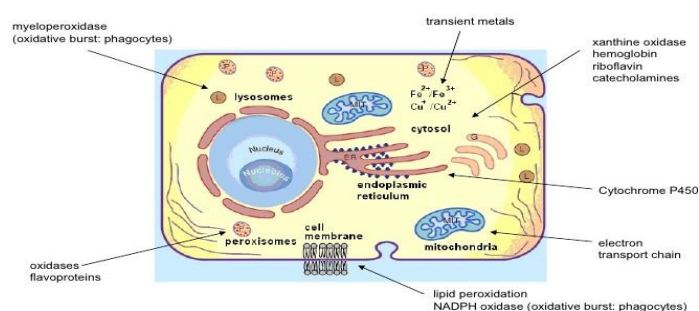
Η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης ανακαλύφθηκε το 1902 από τον Schardinger και αποτελεί μέλος της ομάδας των ενζύμων που περιέχουν μολυβδαίνιο. Είναι το ένζυμο που κατά τη διαδικασία καταβολισμού των πουρινών υδροξυλιώνει την υποξανθίνη σε ξανθίνη και την τελευταία σε ουρικό οξύ, με ταυτόχρονη αναγωγή ή του NAD^+ ή του οξυγόνου. Διακρίνονται δύο τύποι του ενζύμου, ανάλογα με την επιλογή του υποστρώματος που θα αναχθεί: Η αφυδρογονάση της ξανθίνης (xanthine dehydrogenase, XDH), η οποία έχει ως υπόστρωμα το NAD^+ και η οξειδάση της ξανθίνης (xanthine oxidase), η οποία έχει ως υπόστρωμα το οξυγόνο. Το σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (ischemia-reperfusion, I-R), πρόκειται για τη διεργασία κατά την οποία η νέκρωση των κυττάρων μιας ισχαιμούσας περιοχής επισυμβαίνει, όχι κατά την περίοδο της ισχαιμίας, αλλά κατά την περίοδο της επαναιμάτωσης. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Jennings και συν. το 1960 και διαπιστώθηκε

ότι στην ανάπτυξή του ενέχεται η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης (xanthine oxidoreductase, XOR). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το ATP αποφωσφορυλιώνεται σε ADP και AMP εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται λόγω της σύσπασης του μυοκαρδίου. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ, με τη δράση της οξειδοαναγωγής της ξανθίνης να αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα στην παραπάνω διεργασία (rate-limiting enzyme). Οι μελέτες έδειξαν ότι στη φάση της επαναιμάτωσης, παρατηρούνται "εκρήξεις" παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), υπεροξειδίου του οξυγόνου (O_2^-), υδροξυλικής ρίζας (OH^\cdot) και υπεροξυνιτρώδους ρίζας (peroxynitrite, ONOOH^\cdot), ενώ η αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα της XOR στους ιστούς όσο και τα υψηλά επίπεδά της στην κυκλοφορία συνδυάστηκαν με αυξημένη παραγωγή ουρικού οξέος. Επιπλέον, με βάση τα αποτελέσματα περαιτέρω ερευνών, διαπιστώθηκε πως κατά την ιστική βλάβη ενεργοποιείται και η NADH-οξειδάση και υποστηρίχτηκε έτσι ότι στο σύνδρομο I-R η παραγωγή υπεροξειδίου σε ποσότητες ικανές να προκαλέσουν ιστική βλάβη οφείλεται κατά μεγάλο ποσοστό στην NADH οξειδάση η οποία διεγείρεται από την XOR, λόγω του ότι η αφυδρογονάση της ξανθίνης έχει μεγαλύτερη συγγένεια με την NADH-οξειδάση από ότι με την ξανθίνη όταν το pH είναι $\leq 6,7$ (όπως συμβαίνει σε ισχαιμία). Συνεπώς φαίνεται ότι οι ποσότητες του υπεροξειδίου που απαιτούνται για την πρόκληση ιστικής βλάβης εξασφαλίζονται απόλυτα μέσω της οδού XOR-NADH οξειδάσης χωρίς να απαιτείται η μετατροπή της αφυδρογονάσης σε οξειδάση. Ας σημειωθεί επίσης, ότι η διέγερση της NADH οξειδάσης από την XOR είναι ανεξάρτητη από την παρουσία μολυβδαινίου και σιδήρου στο μόριο της τελευταίας, τα οποία όμως είναι απαραίτητα για την παραγωγή των ROS (Ν. Παπαγαλάνης, 2014).

1.2.5 Κυτόχρωμα P450

Οικογένειες των ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (cytochrome P450, CYP-450) ευρίσκονται σε κάθε μορφή ζωής και είναι πολυπληθής: στα ζώα έχουν βρεθεί 69 οικογένειες και στα θηλαστικά ειδικά 18 οικογένειες και 43 υποοικογένειες. Πρόκειται για εγγενείς μεμβρανικές πρωτεΐνες που εκφράζονται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο και αποτελούν ισχυρά οξειδωτικά (οξυγενάσες) και καταλύουν την υδροξυλίωση κεκορεσμένων δεσμών άνθρακα-υδρογόνου και την εποξείδωση, (δηλαδή προσθήκη ενός ατόμου οξυγόνου σε ένα διπλό δεσμό δύο ατόμων άνθρακα). Σήμερα είναι γνωστό ότι διάφορα μέλη της οικογένειας αυτής

έχουν καθοριστική συμμετοχή στον οξειδωτικό μεταβολισμό πλήθους ξеноβιοτικών ουσιών (χημικών καρκινογόνων, φαρμάκων κ. ά.), αλλά και ενδοβιοτικών ουσιών όπως είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και οι βιταμίνες Α και D3 τις οποίες μετατρέπουν σε δραστικές ορμόνες. Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας απαιτούν την παρουσία ενός δότη ηλεκτρονίων για την αναγωγή του σιδήρου της ομάδας αίμης που διαθέτουν και τελικά του μοριακού οξυγόνου και επομένως τα ένζυμα αυτά αποτελούν τμήμα μιας αλυσίδας πρωτεϊνών η οποία μεταφέρει ηλεκτρόνια (Ν. Παπαγαλάνης, 2014). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων παράγουν ROS μέσω του κυτοχρώματος P₄₅₀ (Yu, 1994). Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας O₂^{•-} το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε H₂O₂ (Chance et al., 1979). Ο ρυθμός παραγωγής του H₂O₂ είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα (Halliwell & Gutteridge, 1989). Παρουσία ADP και Fe³⁺ η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O₂ παράγοντας O₂^{•-}.



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

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

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

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

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ), όπως η ρίζα υπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο πυρηνικό και στο μιτοχονδριακό DNA,. Οι βλάβες μπορεί να είναι εγκοπές στη μία έλικα του DNA (DNA nicks) ή σπασίματα και στις δύο αλυσίδες του (DNA fragments), καθώς επίσης και πληθώρα χημικών τροποποιήσεων στις βάσεις πουρίνης [για παράδειγμα η 8 υδρόξυ-γουανίνη (8-OH-guanine)] και πυριμιδίνης [για παράδειγμα η 5-υδρόξυ-6-υδροθυμίνη (5-hydroxy-6-hydrothymine)]. Εναλλακτικά, η προσβολή των πρωτεϊνών του DNA από ελεύθερες ρίζες μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό ομοιοπολικών ενώσεων DNA-πρωτεϊνών (DNA-protein cross-links), όπως για παράδειγμα μεταξύ θυμίνης και

τυροσίνης, ενώ η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) μπορεί να προκαλέσει ομοιοπολική δέσμευση και διμερισμό μεταξύ γειτονικών πυριμιδινών (pyrimidine dimers). Άμεσο επακόλουθο της βλάβης του DNA είναι η μεταλλαξιγένεση που με τη σειρά της οδηγεί σε δυσλειτουργία του κυττάρου και καρκινογένεση.

Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στο DNA, ο σχηματισμός υπεροξειδίων είτε στον πεπτιδικό κορμό είτε στις πλευρικές αλυσίδες ορισμένων αμινοξέων αποτελεί έναν μόνο από τους πολλούς τύπους οξειδωτικών βλαβών που έχουν παρατηρηθεί στις πρωτεΐνες. Παρ' όλα αυτά, ο όρος υπεροξείδωση πρωτεϊνών έχει προσλάβει μια ευρύτερη έννοια και δηλώνει όλα τα είδη ομοιοπολικών τροποποιήσεων που προκαλούνται στις πρωτεΐνες από τα διάφορα είδη ΔΜΟ ($\text{OH}\cdot$, ONOO^- , HClO , $^1\text{O}_2$) ή άλλα παραπροϊόντα του οξειδωτικού στρες (π.χ. από προϊόντα της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, όπως οι αλδεϋδες MDA και HNE). Οι χημικές μεταβολές που επέρχονται στις πρωτεΐνες ως συνέπεια του οξειδωτικού στρες ποικίλουν ανάλογα με το προσβαλλόμενο σε κάθε περίπτωση αμινοξύ αλλά και το είδος του δραστικού μορίου που επιφέρει τη βλάβη (Stadtman, 2006). Χαρακτηριστικά, πρωτεΐνες που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν πιο εύκολα με ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα τη μεταβολή της δομής τους και της λειτουργίας τους (Lyrras et al, 1977).

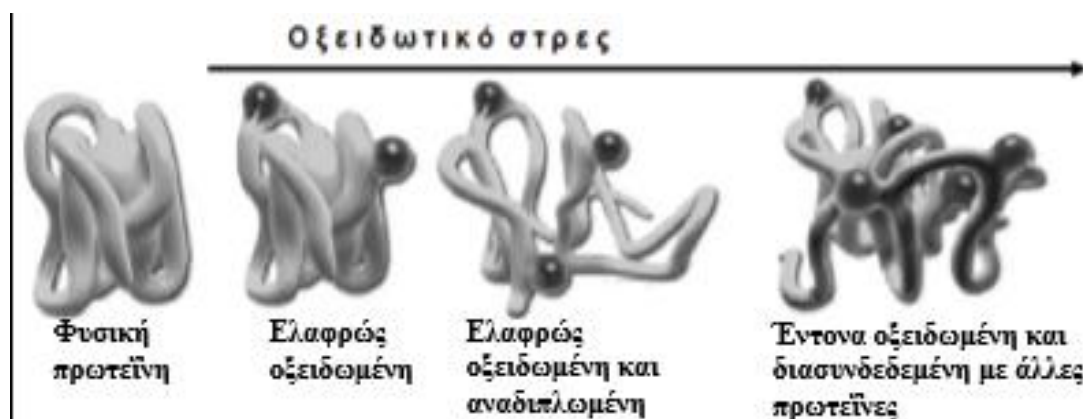
Πίνακας 3: Γενικοί τύποι οξειδωτικής τροποποίησης πρωτεϊνών.

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

Πίνακας 4: Βιοχημικές συνέπειες οξειδωτικής τροποποίησης πρωτεϊνών.

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

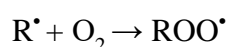
Οι περισσότερες οξειδωτικές επιδράσεις οδηγούν στη δυσλειτουργία πολλών πρωτεϊνών, η οποία μπορεί να οφείλεται σε αυτή την άμεση μεταβολή/αλλαγή αμινοξέων που βρίσκονται σε μια λειτουργική περιοχή για την πρωτεΐνη ή σε μερική αποδιάταξη της (Εικόνα 3). Αν οι πρωτεΐνες δεν αποδομηθούν εγκαίρως σ' αυτό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



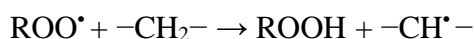
Εικόνα 4: Το οξειδωτικό στρες και οι επιπτώσεις του στην πρωτεϊνική δομή.

Όσον αφορά τα λιπίδια, έχει βρεθεί πως ένας από τους κύριους στόχους των ελευθέρων ριζών και λοιπών δραστικών μορφών οξυγόνου (ΔΜΟ) που σχηματίζονται στο κύτταρο είναι η φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταροπλασματικής και των ενδοκυττάρων μεμβρανών. Ως γνωστόν, το υδρόφοβο τμήμα των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων αποτελείται από λιπαρά οξέα με μακριές (14-24 άτομα C), αλειφατικές υδρογονανθρακικές αλυσίδες, ένα μεγάλο ποσοστό

των οποίων έχει έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς σε cis διάταξη (μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αντιστοίχως). Όσο αυξάνεται ο αριθμός των διπλών δεσμών της αλειφατικής αλυσίδας τόσο μειώνεται το σημείο τήξης του αντίστοιχου λιπαρού οξέος. Έτσι, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) συνεισφέρουν σημαντικά στη ρευστότητα των μεμβρανών, η οποία είναι άρρηκτα συνυφασμένη με όλες σχεδόν τις βιολογικές τους λειτουργίες. Την ίδια στιγμή όμως, τα PUFAs είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στην οξειδωτική προσβολή από διάφορα είδη ΔΜΟ, με την οποία ξεκινά μια αλληλουχία αντιδράσεων ελευθέρων ριζών με καταστροφικά αποτελέσματα για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των μεμβρανών γνωστή ως υπεροξειδωση λιπιδίων. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων αποτελεί, αν όχι την πιο σημαντική, τουλάχιστον την πιο μελετημένη εκδήλωση του οξειδωτικού στρες και των αλληλεπιδράσεων ελευθέρων ριζών στα κύτταρα. Περιλαμβάνει το στάδιο έναρξης (initiation) και το στάδιο διάδοσης (propagation stage). Η συνήθης τύχη της ρίζας άνθρακα που σχηματίζεται (R^{\bullet}) είναι να συνδυαστεί με ένα μόριο O_2 με επακόλουθη παραγωγή υπεροξυλικής ρίζας, με βάση την αντίδραση:



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



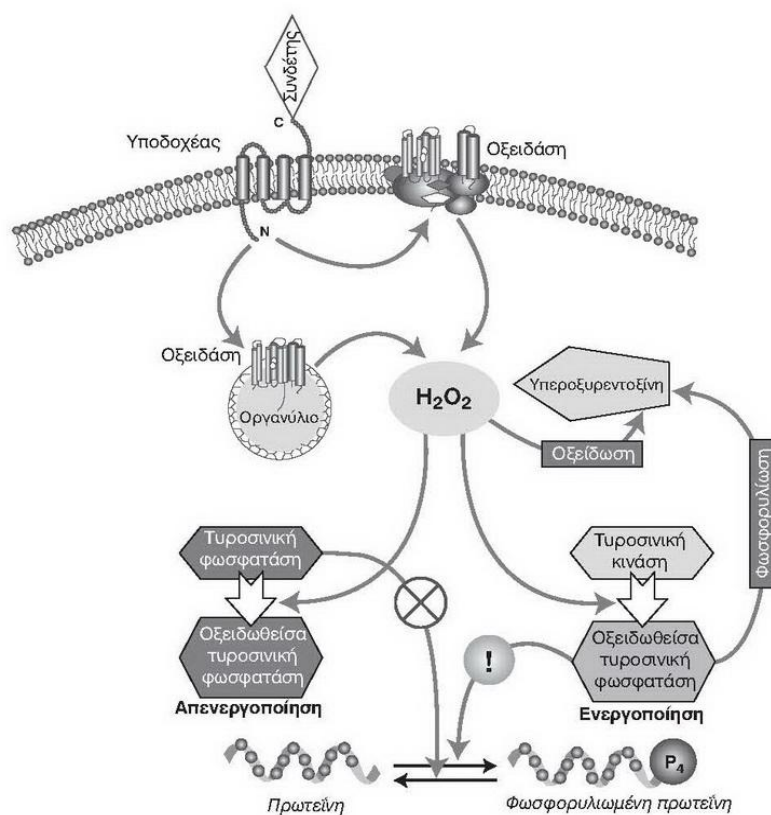
Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας νέας ελεύθερης ρίζας άνθρακα, η οποία μπορεί να αντιδράσει με O_2 και να δώσει εκ νέου υπεροξυλική ρίζα, που με τη σειρά της μπορεί να αποσπάσει ένα υδρογόνο από άλλο μόριο PUFA, συνεχίζοντας έτσι την αλυσίδα αντιδράσεων που ξεκίνησε από την προσβολή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

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

μεταβολικά παράγωγά τους είναι εξαιρετικά τοξικά και ευθύνονται για μεγάλο μέρος των βιοφυσικών και βιοχημικών διαταραχών που έπονται της υπεροξειδωσής των λιπιδίων.

1.4 Κλινική Σημασία Οξειδωτικού Στρες

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



Εικόνα 5: Σηματοδοτική οδός του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) για την τροποποίηση της δράσης τυροσινικών κινάσων και φωσφατάσων.

Επίσης, οι ROS έχουν καίριο ρόλο σε ορισμένους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής (Finaud et al., 2006), ενώ σε περίπτωση τραύματος, τα αιμοπετάλια που βρίσκονται σε περιοχή που έχει υποστεί πληγή απελευθερώνουν ROS τα οποία αποτελούν σήμα για τη στρατολόγηση κι άλλων αιμοπεταλίων στην περιοχή καθώς και λευκοκυττάρων. Επιπλέον ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό, την αγγειογένεση και την απόπτωση. Υπάρχουν πολλά δεδομένα που συνηγορούν υπέρ της συμμετοχής των ROS στην απόπτωση. Πρώτον, η προσθήκη ROS ή η στέρηση των αντιοξειδωτικών προκαλεί απόπτωση. Δεύτερον, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αναστέλλεται από τα ενδογενή ή τα εξωγενή αντιοξειδωτικά. Τρίτον, σε μερικές περιπτώσεις η απόπτωση συνδυάζεται με αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων των ROS. Πράγματι, πολλά από τα χημικά και φυσικά ερεθίσματα που προκαλούν απόπτωση φαίνεται ότι οφείλονται στο οξειδωτικό stress, που αυξάνει την συγκέντρωση των ROS στο κύτταρο, ενώ ορισμένοι προαποπτωτικοί παράγοντες, αν και δεν είναι ελεύθερες ρίζες, προκαλούν την παραγωγή ROS ή/και ελαττώνουν την ικανότητα του κυττάρου για αναγωγή. Χαρακτηριστικά, η μείωση των ενδοκυττάρων αντιοξειδωτικών, όπως της γλουταθειόνης (GSH), καθιστά το κύτταρο ευάλωτο στο οξειδωτικό stress και στην επαγόμενη από αυτό απόπτωση. Τα μιτοχόνδρια με τη σειρά τους, παίζουν καθοριστικό στη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, με βάση ένα μοντέλο που περιλαμβάνει τρία στάδια. Το πρώτο αφορά στην ενεργοποίηση των οδών μεταγωγής του σήματος και ρυθμίζεται από τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών BCL-2. Το δεύτερο αφορά στη διαταραχή της ομοιόστασης των μιτοχονδρίων και τη διαφυγή στο κυτταρόπλασμα πρωτεϊνών, οι οποίες θα ενεργοποιήσουν τις κασπάσες, ενώ συγχρόνως μεταβάλλεται η μιτοχονδριακή μεταφορά των ηλεκτρονίων, η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η παραγωγή ATP. Το τρίτο στάδιο αφορά στην ενεργοποίηση των κασπασών και των νουκλεασών, που προκαλούν τον κερματισμό του DNA. Ο ρόλος όμως του οξειδωτικού stress έχει καταστεί πλέον αποδεκτός ακόμα και στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρυνσης της στεφανιαίας νόσου, της καρδιακής ανεπάρκειας, του σακχαρώδους διαβήτη, της αρτηριακής υπέρτασης, της νόσου Alzheimer, της νόσου του Parkinson, της παγκρεατίτιδας, του συνδρόμου

ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος, της προεκλαμψίας, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και του συνδρόμου επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS) (Halliwell, 2001). Οι καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου, όπως το κάπνισμα, η υπερχοληστερολαιμία και η υπεργλυκαιμία, σχετίζονται με το οξειδωτικό stress (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007). Η φλεγμονή, η διεργασία της γήρανσης και ορισμένες μορφές καρκίνου, όπως ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού και τη μεταστατική του ικανότητα έχουν αποδοθεί εν μέρει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Ειδικότερα, το καρκίνωμα των ηπατοκυττάρων σχετίζεται με τη χρόνια λοίμωξη από τους ιούς HBV και HCV ή την επίδραση της αφλατοξίνης. Στοιχεία λοιπόν, υποδεικνύουν την εμπλοκή του οξειδωτικού στρες στην παθογένεια του καρκινώματος του ήπατος (Gulam and Haseeb, 2006).



Εικόνα 6: Ασθένειες προκαλούμενες από το οξειδωτικό στρες

Ανάλογα, σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες ορισμένων φαρμάκων αποδίδονται στο οξειδωτικό stress (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007). Χαρακτηριστικά, κατά την έκθεση των κυττάρων σε αντικαρκινικά φάρμακα, δηλαδή σε συνθήκες στρες, το H_2O_2 προάγει την απόπτωση (Jabs, 1999) ενεργοποιώντας τις JNK και p38 (Benhar et al., 2001; Davis et al., 2001; Tobiume et al., 2001). Η μεταγωγή σήματος μέσω των JNK παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση που εξαρτάται από τα μιτοχόνδρια ή/και υποδοχείς (Tournier et al., 2000). Το H_2O_2 παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση που επάγεται από την πρωτεΐνη p53 (Polyak et al., 1997), πιθανώς μέσω φωσφορυλίωσής της από τις JNK και p38 (Fuchs et al., 1998; Sanchez-Prieto et al., 2000). Τέλος, μπορεί να δρα απευθείας στον αποπτωτικό μηχανισμό, προκαλώντας την εκπόλωση και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων (Jabs et al., 1999). Ωστόσο, υπάρχουν και δεδομένα που απουσία στρες, αποδίδουν στις JNK θετικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Shaulian et al., 2001). Πρόσφατα προτάθηκε ένα μοντέλο για την εξήγηση των διαφορετικών δράσεων των ROS ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους σε καρκινικά και φυσιολογικά κύτταρα, το οποίο εμπλέκει τις JNK και τον AP-1. Σύμφωνα με αυτό, τα επίπεδα των ενδογενών ROS στα φυσιολογικά κύτταρα είναι σχετικά χαμηλά. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων σε καρκινικά οδηγεί σε αύξηση των βασικών επιπέδων των ROS και ενίσχυση της δραστηριότητας των JNK. Αυτή η ενδιάμεση κατάσταση ευνοεί μιτογόνα σήματα μέσω του AP-1 ή/και άλλων μονοπατιών. Μικρή αύξηση στις ROS δύναται να προάγει περαιτέρω την αύξηση των κυττάρων, με τα φυσιολογικά κύτταρα να εμφανίζουν μεγαλύτερη δεκτικότητα λόγω χαμηλότερου κατωφλίου. Υψηλότερα όμως επίπεδα των ROS (όπως στην περίπτωση αντικαρκινικών φαρμάκων), οδηγούν σε περαιτέρω ενεργοποίηση των JNK και αποπτωτική απόκριση των κυττάρων (Benhar M et al., 2002).

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

Συμπερασματικά διακρίνεται πως, δεν είναι σαφές εάν αυτές οι κλινικές παρατηρήσεις υποδηλώνουν ειδικές ενδογενείς προσπάθειες κυτταρικής και ιστικής προστασίας ή μη ειδική απόκριση στο stress. Εντούτοις, δείχνουν ότι η κυτταρική

απόκριση στο stress εκδηλώνεται κατά τη διάρκεια της νόσου και επομένως μπορεί να επηρεάσει ή να τροποποιήσει την πορεία της. Η συσχέτιση μιας νοσολογικής οντότητας με το οξειδωτικό stress προέρχεται από την παρατήρηση της ύπαρξης αυξημένης ποσότητας προϊόντων αντίδρασης ελευθέρων ριζών, ιδίως δεικτών υπεροξείδωσης λιπιδίων, στα βιολογικά υγρά. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η υπεροξείδωση αποτελεί δευτερογενές φαινόμενο και συνεπώς δεν υποδηλώνει άμεσο ρόλο του οξειδωτικού stress στη νόσο. Προκειμένου να αιτιολογηθεί ο πρωτογενής ρόλος του οξειδωτικού stress σε μια νόσο, πρέπει να υπάρχει ένας εύλογος μηχανισμός, σύμφωνα με τον οποίο να δικαιολογείται αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών ή μείωση των αντιοξειδωτικών εφεδρειών. Επιπλέον, το οξειδωτικό stress πρέπει να ανιχνεύεται πριν από την έναρξη της ιστικής βλάβης και η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε πρώιμο στάδιο πρέπει να μπορεί να εμποδίσει ή να μειώσει την ιστική βλάβη. Σύμφωνα με τα ανωτέρω, ο πρωτογενής ρόλος του οξειδωτικού stress είναι σαφής στη διεργασία της καρκινογένεσης, αλλά αποτελεί αντικείμενο έρευνας για τις άλλες νοσολογικές οντότητες (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007).

1.5 Αντιοξειδωτική Άμυνα των Οργανισμών

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

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

1.5.1 Αντιοξειδωτικά Ένζυμα

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

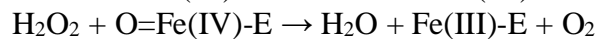
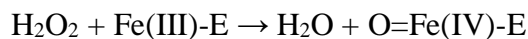
1.5.2 Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD).

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

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

1.5.3. Καταλάση.

Η καταλάση απαντάται στα αερόβια βακτήρια, στους μύκητες, στα κύτταρα των φυτών και των ζώων. Εντοπίζεται στα υπεροξεισώματα αλλά και στα μιτοχόνδρια της καρδιάς, δεν ανευρίσκεται όμως στα μιτοχόνδρια των κυττάρων άλλων ιστών. Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες, άνω των 500 αμινοξέων, καθεμία από τις οποίες περιέχει και μία ομάδα αίμης στην ενεργό περιοχή τους. Επίσης, κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH, το οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου. Τα υπεροξειδισώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας H_2O_2 (Antunes et al., 2002), σε δύο στάδια. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει ένα εκατομμύριο μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου κάθε min.

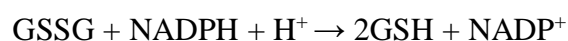


(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεδεμένη στο ένζυμο).

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

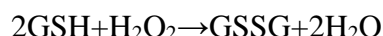
1.5.4. Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR).

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

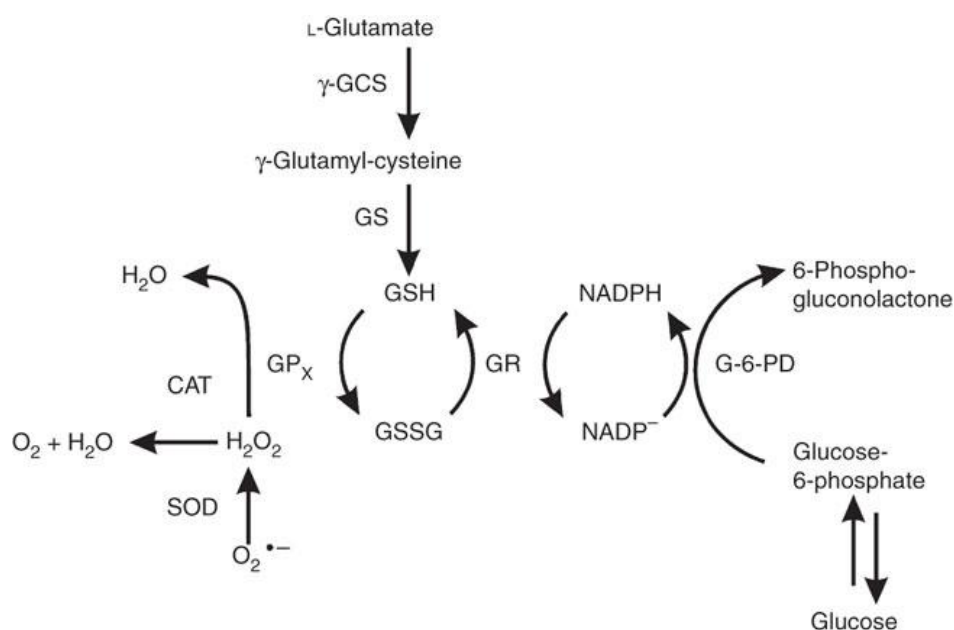


1.5.5. Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPxs).

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



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



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

1,5.6. Υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης και αναγωγή της θειορεδοξίνης.

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

1,5.7. Συνένζυμο Q.

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

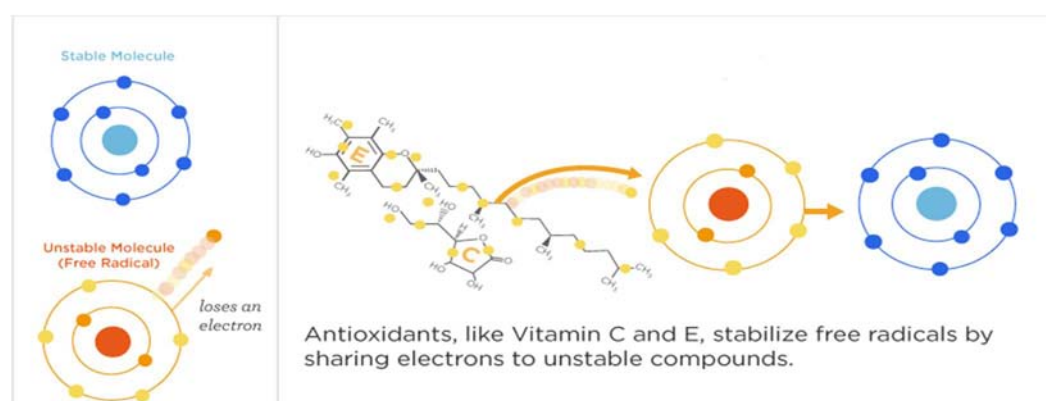
1.5.8. Ένζυμο της οδού της φωσφορικής πεντόζης.

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

1.5.9 Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

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

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



Εικόνα 8: Απεικόνιση της δράσης των Αντιοξειδωτικών .

5.2.1. Γλουταθειόνη.

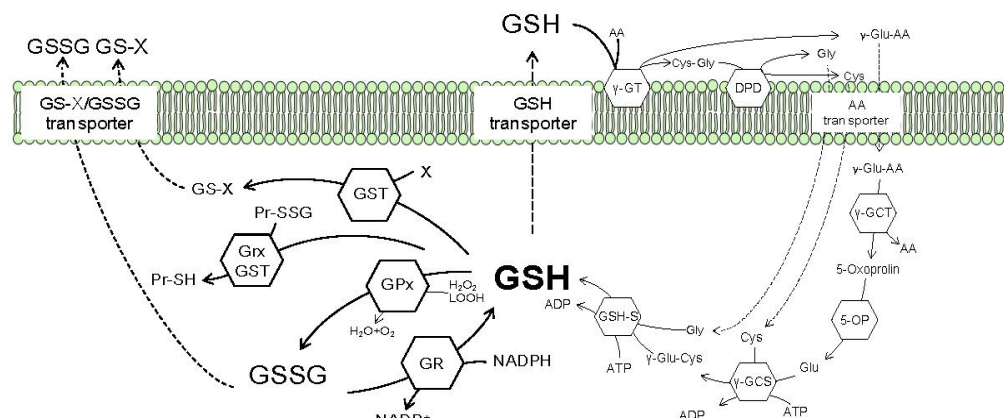
Η ιστορία της γλουταθειόνης αρχίζει το 1888, όταν ο de Ray Pailhand ανακάλυψε την ουσία “hydrogenant de soufflé”, η οποία είχε την ιδιότητα να ανάγει το στοιχειακό θείο, και την οποία ονόμασε “philothion”. Αργότερα, η ουσία αυτή απομονώθηκε από το χημικό Hopkins και ονομάστηκε γλουταθειόνη. Τέλος, η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

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

15 mM) και στα μιτοχόνδρια (5–11 mM), όπου αποτελεί και την κύρια διαλυτή αντιοξειδωτική ουσία. Στον πυρήνα, η γλουταθειόνη διατηρεί την οξειδοαναγωγική κατάσταση των πρωτεϊνών που φέρουν σουλφυδρυλικές ομάδες και είναι απαραίτητες για την επιδιόρθωση και την έκφραση του DNA.

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

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



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

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

5.2.2. Θειοαναγωγάσες TRX.

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

5.2.3. Βιταμίνη C.

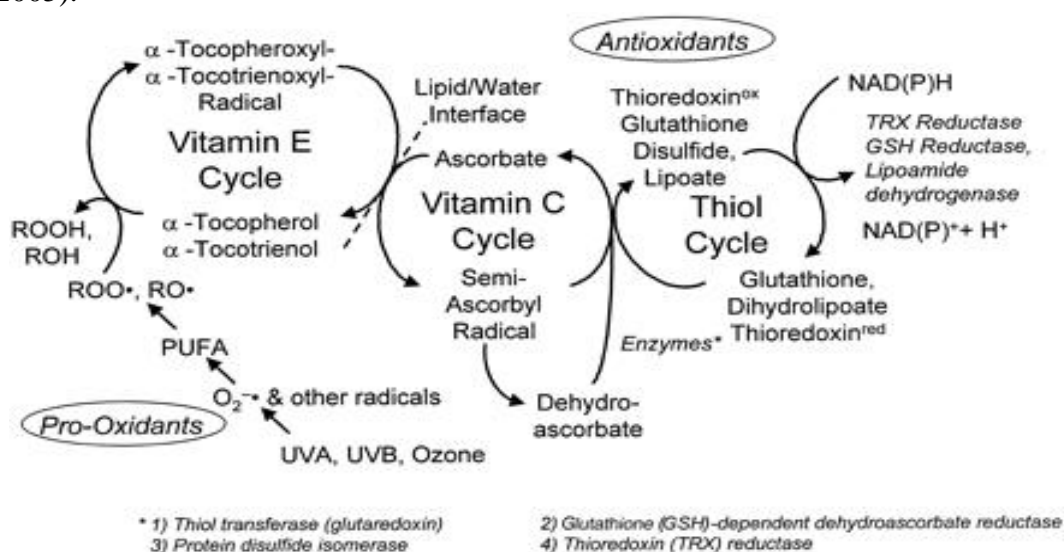
Η βιταμίνη C ή αλλιώς, ασκορβικό οξύ, είναι υδατοδιαλυτή και ο κύριος ρόλος της είναι η συμμετοχή στη σύνθεση του κολλαγόνου, καθώς αποτελεί ένα συμπαραγοντα ή συνένζυμο οχτώ ενζυμικών αντιδράσεων που συμβαίνουν στον οργανισμό. Πέρα,

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

5.2.4. Βιταμίνη E.

Η βιταμίνη E είναι λιποδιαλυτή και απαντά σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Η α-τοκοφερόλη είναι η πλέον δραστική μορφή της βιταμίνης E στους ανθρώπους και αποτελεί ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Η κύρια αντιοξειδωτική της δράση αφορά στην προστασία κατά της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Φαίνεται ότι το ασκορβικό οξύ και η βιταμίνη E λειτουργούν μαζί ως αντιοξειδωτικές ουσίες σε μια κυκλικού τύπου αντίδραση. Πιο συγκεκριμένα η βιταμίνη E, δεν δρα απομονωμένη από τα άλλα αντιοξειδωτικά αλλά αποτελεί μέρος ενός συνόλου οξειδοαναγωγικών κύκλων, αντιοξειδωτικών που ονομάζεται “αντιοξειδωτικό δίκτυο”. Η βιταμίνη C μπορεί να συμβάλλει στην αναγέννηση της βιταμίνης E άμεσα, ενώ τα αντιοξειδωτικά θειόλης όπως η γλουταθειονίνη και το λιποϊκό οξύ μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην αναγέννησή της έμμεσα μέσω της βιταμίνης C, ώστε από την οξειδωμένη της μορφή

να μετατραπεί στην ανηγμένη. Τα συστήματα αυτά δρουν συνεργικά για τη σταθερή διατήρηση της συγκέντρωσης σε χαμηλά επίπεδα των ριζών της βιταμίνης E, αλλά και για να περιοριστεί η κατανάλωση ή η απώλεια της. Η βιταμίνη E, συνεπώς που βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες τις προστατεύει από τη λιπιδική υπεροξείδωση, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες. Στις μεμβράνες η φαινολική υδροξυλική ομάδα της βιταμίνης E βρίσκεται μεταξύ της μεμβράνης και της υδατικής φάσης, όπως συμβαίνει και με τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων. Με ανάλογο τρόπο η βιταμίνη E προστατεύει και τις LDL από τη λιπιδική υπεροξείδωση και έτσι συμβάλλει στην πρόληψη του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών (Παπαγεωργίου 2005).



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

5.2.5. Μεταλλοθειονίνες.

Φαίνεται ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στα ιόντα μετάλλων και στην αντίσταση στο οξειδωτικό stress. Αυτή η συσχέτιση ερμηνεύεται βιολογικά με βάση το ρόλο των ιόντων μετάλλων, ιδίως του Cu²⁺ και του Zn²⁺, στην παραγωγή οξειδωτικών ουσιών. Οι μεταλλοθειονίνες είναι μια ομάδα μικρών πρωτεϊνών, πλούσιων σε κυστεΐνη, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να συνδέουν διαφορετικά ιόντα μετάλλων. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ιδιαίτερη σημασία στην αντιμετώπιση της τοξικότητας των μετάλλων, όπως ο Cu.

5.2.6. Καροτενοειδή.

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

1.6 Πολυφαινόλες

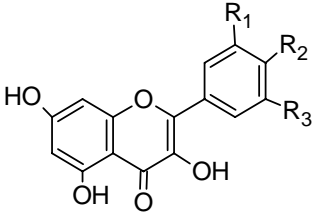
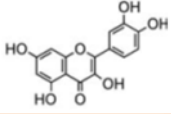
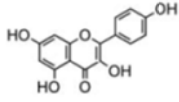
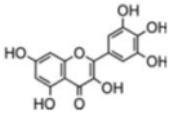
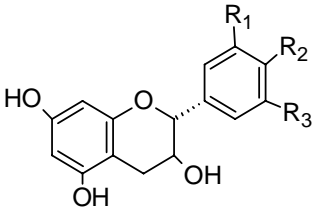
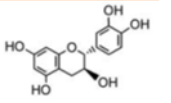
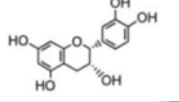
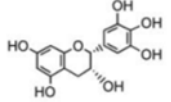
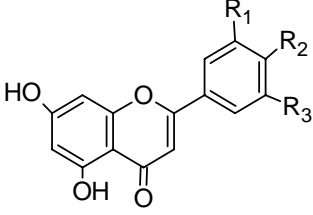
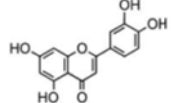
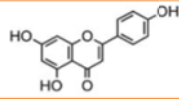
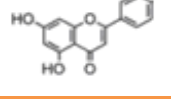
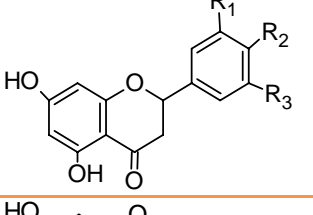
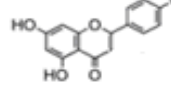
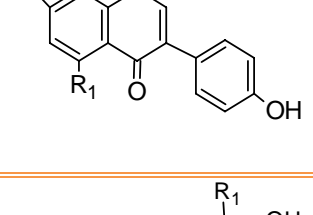
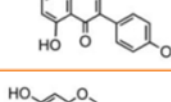
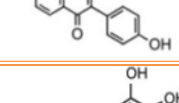
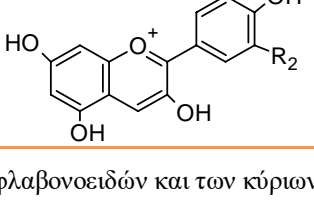
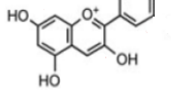
Οι φαινολικές ενώσεις, είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών που εντοπίζονται κυρίως σε βότανα και φρούτα όπως τα μούρα, τα μήλα, τα εσπεριδοειδή, το κακάο, τα σταφύλια, τα λαχανικά όπως τα κρεμμύδια, ελιές, ντομάτες, μπρόκολο, μαρούλι, σόγια, δημητριακά και σιτηρά, το πράσινο και μαύρο τσάι και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

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

1.7. Κατηγορίες Φυτικών Πολυφαινολών

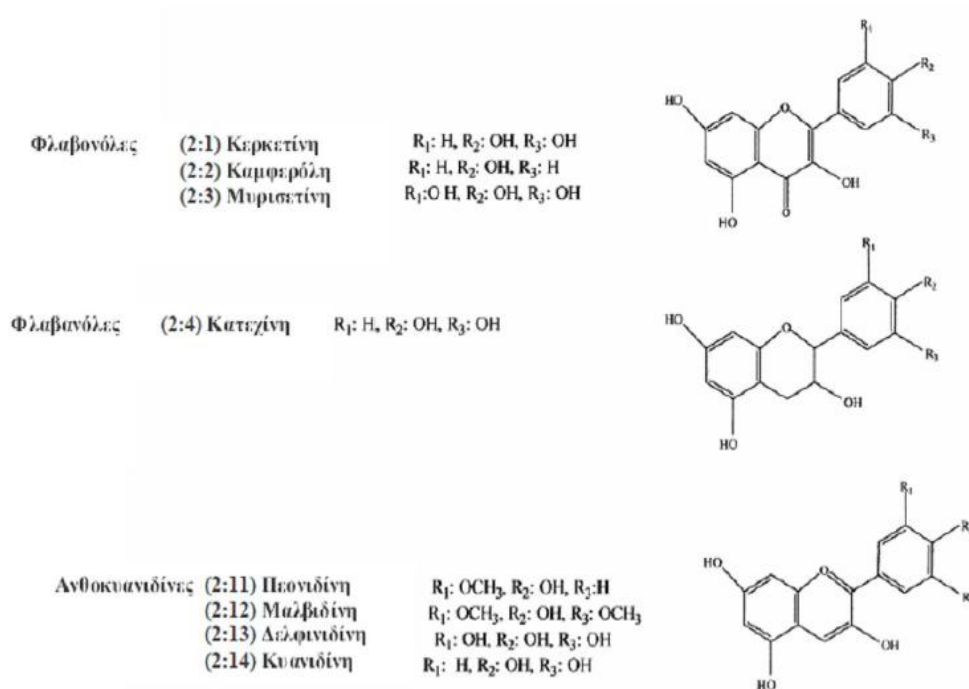
1.7.1 Φλαβονοειδή.

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

Τάξη των φλαβονοειδών	Γενική χημική δομή R _{1,2,3} : -OH ή -H	Χαρακτηριστικά φλαβονοειδή
Φλαβονόλες		Κερκετίνη 
		Καιμπφερόλη 
		Μυρικετίνη 
Φλαβανόλες		(+)-Κατεχίνη 
		(-)-Επικατεχίνη 
		Επιγαλλοκατεχίνη 
Φλαβόνες		Λουτεολίνη 
		Απιγενίνη 
		Χρυσίνη 
Φλαβανόνες		Ναριγενίνη 
Ισοφλαβόνες		Γενιστεΐνη 
		Ντετζεΐνη 
Ανθοκυανιδίνες		Κυανιδίνη 

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

Τα φλαβονοειδή που συναντώνται στα σταφύλια είναι κυρίως οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες (κατεχίνες), οι ανθοκυανίνες και οι φλαβαν-3,4-διόλες (λευκοανθοκυανίνες) που είναι παράγωγα των ανθοκυανινών. Οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στη φλούδα ενώ οι κατεχίνες και οι λευκοανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στα σπέρματα και στο μίσχο των σταφυλιών. Στις ανθοκυανίνες οφείλεται ο χρωματισμός των ανθέων και των καρπών. Οι προκυανιδίνες υπάρχουν κυρίως ως διμερή στα σταφύλια ενώ στο κρασί πολυμερίζονται επιπλέον και σχηματίζουν τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι πολυμερείς αυτές ενώσεις σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες της σιέλου, στα οποία οφείλεται η στυπτικότητα στη γεύση των σταφυλιών και του κρασιού.

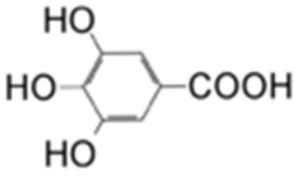
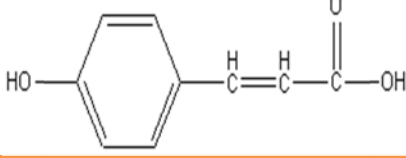
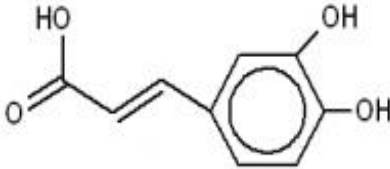
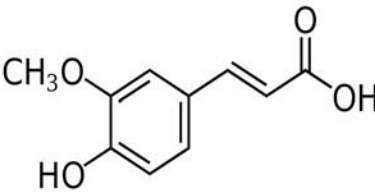


Εικόνα 11: Κυριότερες ομάδες φλαβονοειδών που εντοπίζονται στα σταφύλια και τους οίνους (Monagas M., 2005).

1.7.2 Πολυφαινολικά Οξέα.

Είναι η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή και περιλαμβάνει τα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκινναμικού οξέος. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (όπως το γαλλικό οξύ και το πρωτοκατεχοϊκό οξύ) βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που μπορούν να

καταναλωθούν από των άνθρωπο με την εξαίρεση ορισμένων φυτών (π.χ. τσάι), ενώ αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες ταννίνες (Clifford και Scalbert 2000). Τα υδροξυκιναμικά οξέα βρίσκονται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά, και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φεουλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Συνήθως τα υδροξυκιναμικά οξέα γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουινικό οξύ, το σικιμικό οξύ και το ταρταρικό οξύ. Τα πολυφαινολικά οξέα εντοπίζονται στα σταφύλια είτε σαν ετεροζίτες είτε σαν εστέρες. Στην διάρκεια της οινοποίησης και την συντήρησης των οίνων λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της μια βραδείας υδρόλυσης γιατί στους οίνους, αν και συνεχίζουν να εντοπίζονται με τις παραπάνω μορφές τα συναντάμε και ελεύθερα. Συγκεκριμένα, τα κινναμωνικά οξέα, βρίσκονται στους οίνους συνδεδεμένα με τις ανθοκυάνες και το τρυγικό οξύ με τα οποία παράγονται οξέα ρ-κουμαρυλοτρυγικό καφεϋλοτρυγικό και φεουλυτρυγικό. Τα πολυφαινολικά οξέα είναι αντισηπτικά, συντηρητικά ενώ διακρίνονται και για την αντιμικροβιακή τους δράση. Βέβαια στις ποσότητες που υπάρχουν στα σταφύλια, δεν γίνεται να γίνει παραδεχτό πως επεμβαίνουν στην οινοποιητική τεχνική, ωστόσο συγκαταλέγονται στους παρεμποδιστές της ανάπτυξης των βακτηρίων και ερμηνεύουν μερικώς τις δυσκολίες εκδήλωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης γιατί τα βακτήρια, που έχουν ενζυμικό εξοπλισμό λιγότερο πλήρη σε σύγκριση με τις ζύμες, είναι ευαίσθητα σε μικρότερες δόσεις αντισηπτικών και αντιβιοτικών (Βράκας, 2012).

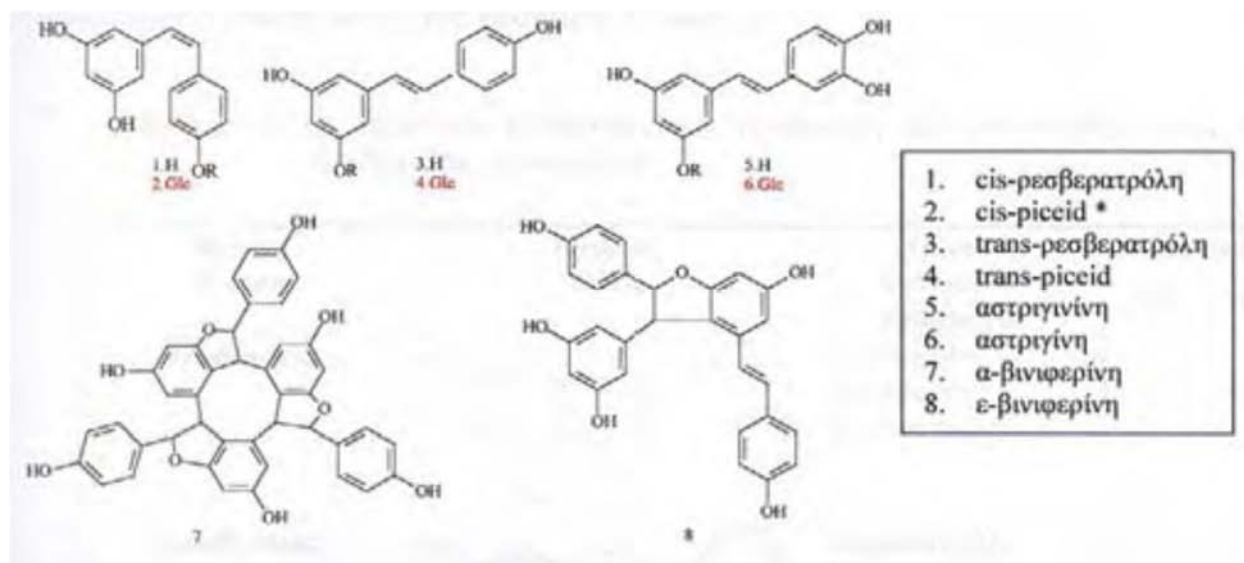
Πολυφαινολικά Οξέα	Συστηματική Ονομασία	Χημική Δομή	Μοριακός Τύπος
Γαλλικό Οξύ	3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ		$C_7H_6O_5$
Κουμαρικό Οξύ	3 - (4 -υδροξυφαινυλο) -2 ακρυλικό		$C_9H_8O_3$
Καφεϊκό οξύ	3 - (3,4-διυδροξυ-φαινυλ)-2-προπενοϊκό οξύ		$C_9H_8O_4$
Φερουλικό οξύ	4 - υδροξυ-3 - μεθοξυ-κινναμικό οξύ	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

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

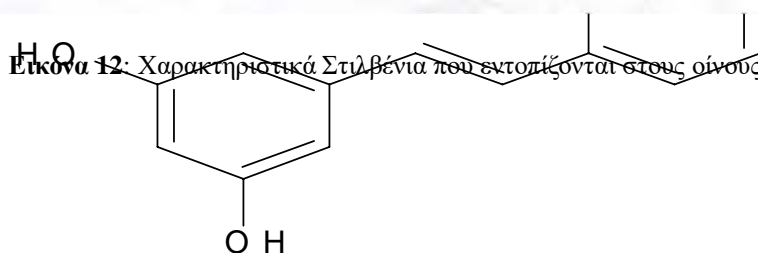
1.7.3 Στιλβένια.

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

(Soleas et al., 1997). Με αυτή ακριβώς τη μορφή πολυμερικών μορίων εντοπίζεται στους ερυθρούς οίνους ως trans-ρεσβερατρόλη σε τιμές της τάξης των 0,1-15 mg/l.



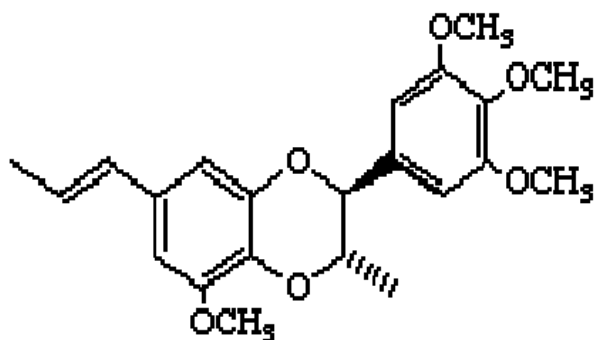
Εικόνα 12: Χαρακτηριστικά Στυλβένια που εντοπίζονται στους οίνους (Fremont 2000).



Εικόνα 13: Χαρακτηριστική δομή trans- ρεσβερατρόλης.

1.7.4 Λιγνάνες.

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

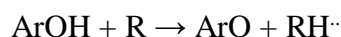


Εικόνα 14: Η χημική δομή λιγνανών (αριστερά) και ο λιναρόσπορος (δεξιά), η κύρια πηγή προέλευσής τους.

1.8. Αντιοξειδωτική Δράση Πολυφαινολών

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

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



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

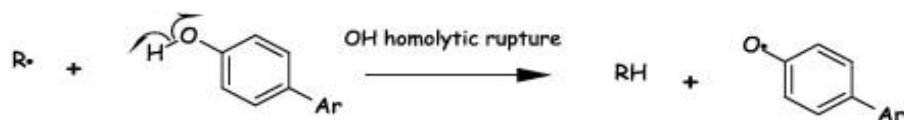
Κατά το δεύτερο μηχανισμό προβλέπεται η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στην ρίζα, R:



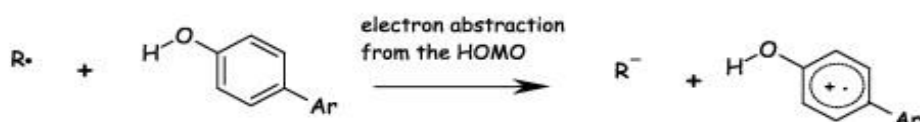
Το ανιόν R^{·-} είναι ένα σταθερό είδος, ενώ η κατιονική ρίζα ArOH⁺, ανήκει επίσης στα λιγότερο αντιδραστικά είδη ριζών.

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

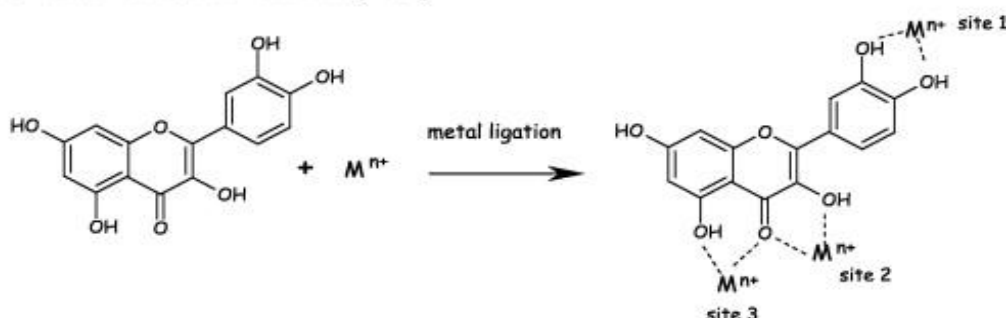
1. Hydrogen Atom Transfer (HAT)



2. Single Electron Transfer (SET)



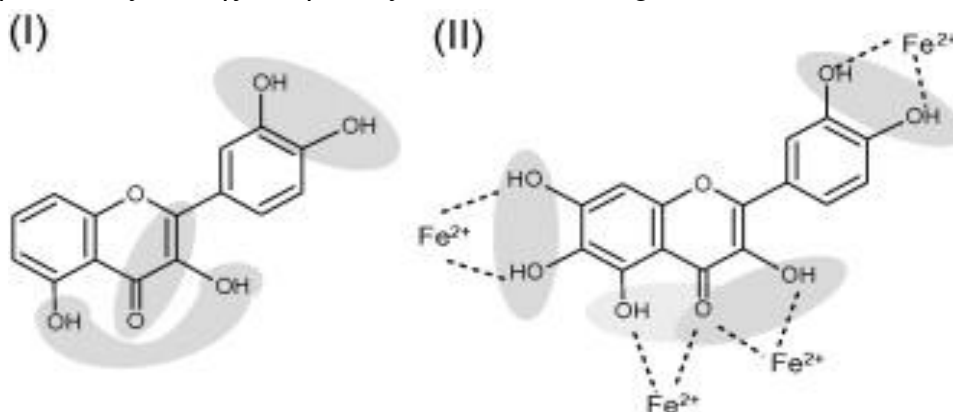
3. Transition Metals Chelation (TMC)



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

Το πρότυπο δυναμικό αναγωγής E° , αντιπροσωπεύει την τάση της οξειδωμένης μορφής ενός μορίου ή ατόμου (ελεύθερης ρίζας, σ' αυτήν την περίπτωση) να περιοριστεί με τη λήψη ενός ηλεκτρονίου. Το E° υπολογίζεται σε βιολογικές συνθήκες (E°) για κάθε μία από τις ενώσεις που εμπλέκονται σε αντιδράσεις εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη, επίτευξης μιας τέτοιας αντιοξειδωτικής αντίδρασης. Συγκρίνοντας το E° δύο ενώσεων, αυτή με την υψηλότερο E° θα λάβει το ηλεκτρόνιο από την άλλη με το

χαμηλότερο E° . Το E° για τις πολυφαινόλες κυμαίνεται στα 330-840 mV, με αυτές τις σχετικά χαμηλές τιμές να αποτελούν τις κινητήριες δυνάμεις για την μετακίνηση ηλεκτρονίων. Τελικά η σταθερότητα του τελικού μορίου που προκύπτει, καθορίζει τη δραστικότητα της αρχικής πολυφαινόλης, στη διακοπή αλυσιδωτών αντιδράσεων που οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως οι αντιδράσεις οξείδωσης λιπιδίων. Δηλαδή, μια μη δραστική ρίζα θα αναστείλει ή θα μειώσει το ποσό της οξείδωσης, ενώ μια δραστική μπορεί να συμβάλλει στη πορεία αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης. Με βάση αυτό το σκεπτικό έχουν προσδιοριστεί για τα μόρια των φλαβονοειδών, ορισμένα δομικά χαρακτηριστικά, ώστε τελικά να συμβάλλουν στη δημιουργία σταθερών μη δραστικών ριζών που αποτρέπουν τη συνέχιση αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης λιπαρών οξέων (Cesar G. Fraga, 2010).



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

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



Η ρίζα υδροξυλίου (OH^\bullet) είναι γενικά αποδεκτό πως είναι μία από τις πιο δραστικές ρίζες, με βραχύ χρόνο ημιζωής, που όμως δεν μπορεί να εξουδετερωθεί ενζυμικά και

συνεπώς μπορεί να αντιδράσει με οποιοδήποτε υπόστρωμα (Palmer & Paulson, 1997). Μέταλλα μετάπτωσης όπως ο χαλκός, το μαγγάνιο, το κοβάλτιο είναι ικανά να καταλύουν την αντίδραση αυτή, υπό ορισμένες συνθήκες, όταν αυτά τα ιόντα μετάλλων δεν δεσμεύονται με πρωτεΐνες ή χηλικοποιητές. Η Fenton αντίδραση μπορεί να λάβει χώρα και να προκαλέσει ειδική συσσώρευση των ελεύθερων ριζών και ταυτόχρονα να προκαλέσει βλάβη στα βιομόρια. Οι χηλικές ενώσεις μετάλλων απομακρύνουν τα μέταλλα και μπορούν να αλλάξουν οξειδοαναγωγικό δυναμικό, καθιστώντας τα ανενεργά. Επιπλέον η χρήση φυσικών χηλικοποιητών, όπως τα φλαβονοειδή, πρέπει να ευνοείται έναντι άλλων συνθετικών χηλικοποιητών που μπορεί να παρουσιάζουν κάποια προβλήματα τοξικότητας, ενώ βρέθηκε πως οι ομάδες υδροξυλίου και καρβονυλίου στις πολυφαινόλες παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τα ιόντα μετάλλων (Cesar G. Fraga, 2010). Χαρακτηριστικά, τα φλαβονοειδή με πολλαπλές ομάδες υδροξυλίου και την ομάδα καρβονυλίου στη θέση 4 επί του δακτυλίου C μπορεί να προσφέρουν διάφορες διαθέσιμες θέσεις για συμπλοκοποίηση μετάλλων (Monica Leopoldini, 2011). Παρ' όλα αυτά έχουν βρεθεί πολλές διαφορές όσον αφορά την ικανότητα συμπλοκοποίησης των πολυφαινολών, ενώ είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη πως η χηλίωση των μετάλλων μετάπτωσης δεν έχει πάντα σαν αποτέλεσμα αντιοξειδωτική δράση (Cesar G. Fraga, 2010). Οι οξειδοαναγωγικές ιδιότητες ενός μετάλλου αλλάζουν με τη χηλίωση και τελικά το E° του συμπλόκου πολυφαινόλης-μετάλλου είναι αυτό που καθορίζει την συμπεριφορά του.

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

στα διάφορα όργανα εκτός από εκείνα το εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτών όπως η γαστρεντερική οδός και το αίμα (Cesar G. Fraga, 2010).

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

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

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

^c Estimated plasma concentration of antioxidant compounds.

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

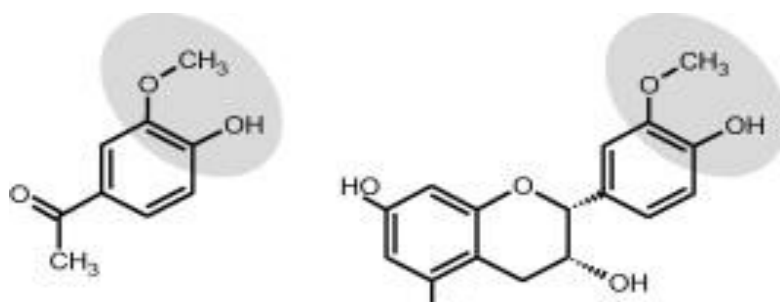
Πίνακας 7: Θερμοδυναμικές και κινητικές πτυχές χαρακτηριστικών πολυφαινόλων (Cesar G. Fraga, 2010).

1.9. Κυτταρικές δράσεις των πολυφαινολών.

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

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

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

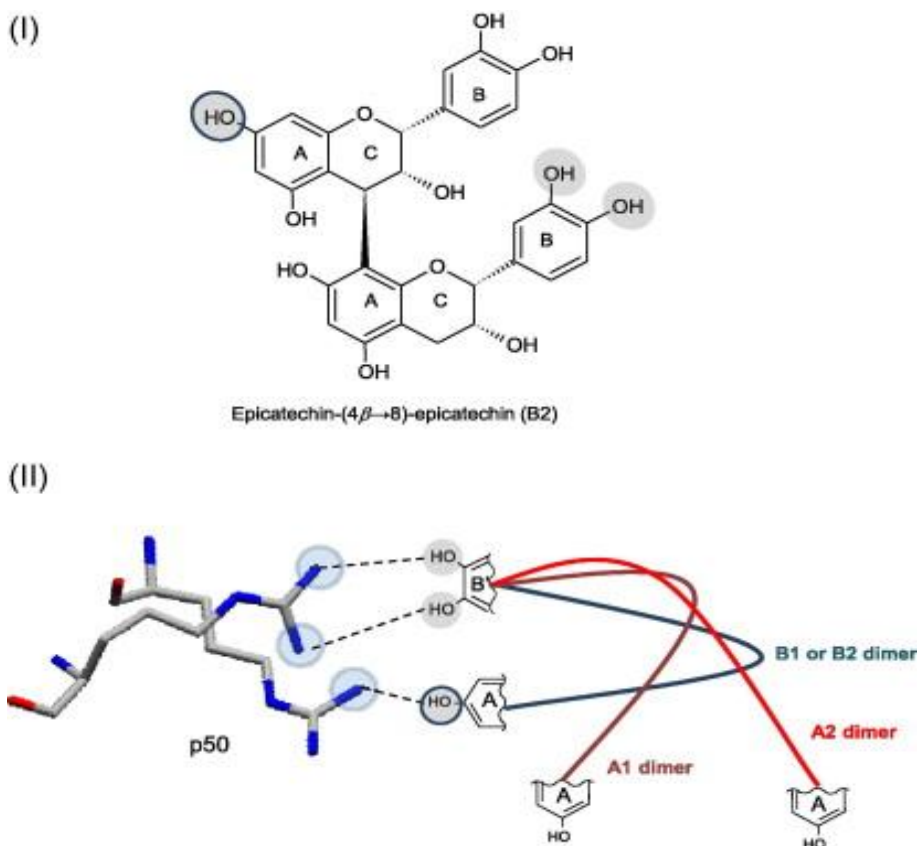


Εικόνα 17: Δομικά χαρακτηριστικά αποκυνίνης και 3'-Ο-μεθυλ -επικατεχίνης ως αναστολείς της οξειδάσης του NADPH (NOX). Οι τονισμένες περιοχές δείχνουν τις δομικές ομοιότητες μεταξύ της 3'-Ο-μεθυλ-επικατεχίνης και αποκυνίνης που σχετίζονται με την αναστολή της δραστηριότητας NOX (Cesar G. Fraga, 2010).

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

Τα διμερή προκυανιδίνης B1 και B2, βρέθηκαν να αναστέλλουν με επιλεκτική δράση την ενεργοποίηση του NF-kB σε πολλαπλά επίπεδα, με ένα υποθετικό μοριακό μοντέλο να προτείνει την αποτροπή σύνδεσης του σε περιοχές κB του DNA. Η ελάχιστης ενέργειας διαμόρφωση, των B1 και B2, τους επιτρέπει να εμφανίζουν μια αναδιπλωμένη δομή δύο δακτυλίων με τις ομάδες υδροξυλίου να προσανατολίζονται

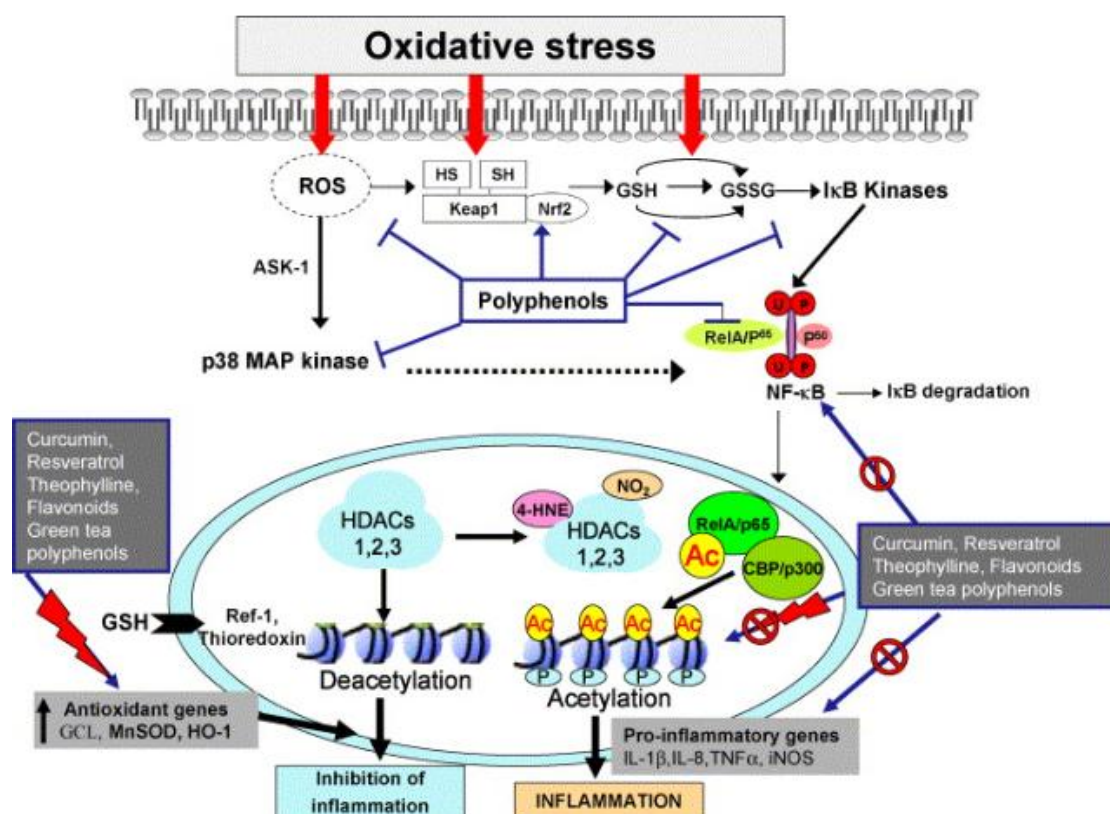
προς την ίδια κατεύθυνση. Τόσο ο τρόπος σύνδεσης των δύο δακτυλίων, όσο και η θέση των υδροξυλομάδων, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση των διμερών πολύ στενά στους δακτυλίους γουανίνης των ομόλογων περιοχών του NF-κΒ. Οι διαφορές λοιπόν στη στερεοχημεία των μορίων, είναι καθοριστικές για την ανασταλτική τους δράση και αποτελούν ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα που αποδεικνύει ότι οι αλληλεπιδράσεις, εξαρτώνται όχι μόνο από τη χημική σύνθεση αλλά και από τα δομικά χαρακτηριστικά των πολυφαινολών (Cesar G. Fraga, 2010).



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

Οι πολυφαινόλες αντιμετωπίζουν, λοιπόν την προφλεγμονώδη γονιδιακή έκφραση, όχι μόνο με αναστολή των NF-κΒ, αλλά και με ενεργοποίηση των αποακετυλασών ιστόνης (HDACs) για την καταστολή της γονιδιακής μεταγραφής. Και αυτό γιατί η

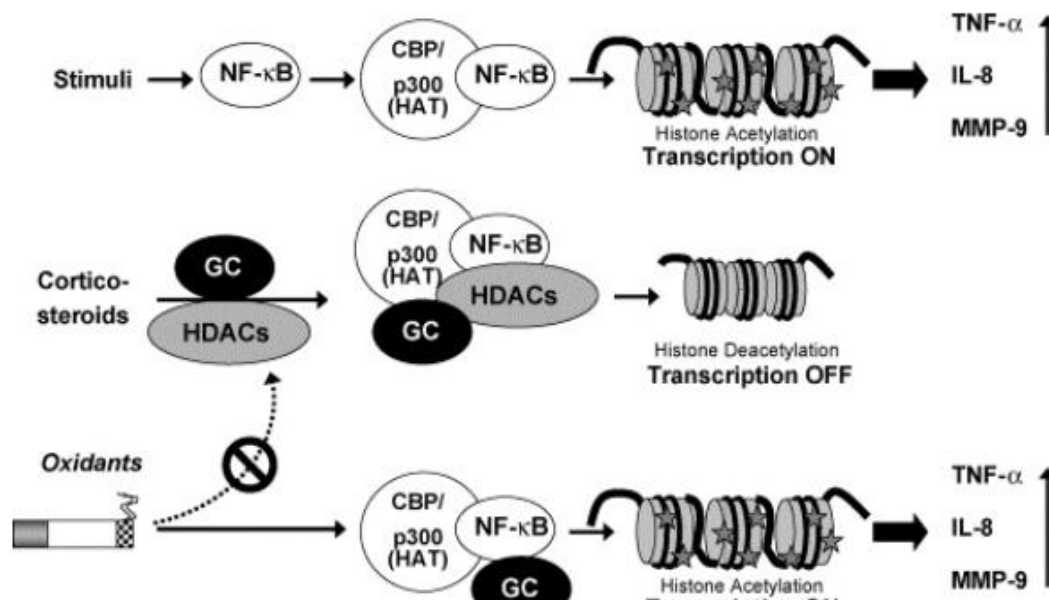
φλεγμονή που προκαλείται λόγω ROS, σχετίζεται και με την ενεργοποίηση MAP κινασών, που επηρεάζουν ποικίλες διεργασίες κυτταρικής σηματοδότησης, με παραγωγή μεσολαβητών (**IL-1β, IL-8, TNFα και iNOS**) και αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (Εικόνα 19). Ειδικότερα, προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες ενεργοποιούν παράγοντες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



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

την εμφάνιση φλεγμονωδών αντιδράσεων, επιβεβαιώνεται και από ανεξάρτητες εκθέσεις. Χαρακτηριστικά, η κουρκουμίνη σε υψηλές συγκεντρώσεις (100μM), μπορεί να αναστείλει τη δράση των HAT, αποτρέποντας την NF-κΒ μεσολαβούμενη

ακετυλίωση της χρωματίνης. Ωστόσο, άλλοι πιθανοί μηχανισμοί με τη μεσολάβηση των πολυφαινολών για την αναστολή της φλεγμονώδους απόκρισης δεν πρέπει να παραβλέπονται, όπως η καταστολή ή αναστροφή μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Irfan Rahman, 2006).



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

1.10. Βιοδιαθεσιμότητα Πολυφαινολών.

Το σημερινό ενδιαφέρον για τις πολυφαινόλες έχει προκύψει κυρίως από τις επιδημιολογικές μελέτες, όπου αποδεικνύουν με σημαντικά στοιχεία για την αποτελεσματικότητα των πολυφαινολών της διατροφής στην πρόληψη κυρίως εκφυλιστικών ασθενειών όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ο καρκίνος. Γι' αυτόν ακριβώς τον λόγο κρίνεται αναγκαίος ο καθορισμός της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών, έτσι ώστε να είναι δυνατή η αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης. Η βιοδιαθεσιμότητα διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διάφορων φαινολικών ενώσεων και μάλιστα οι περισσότερες από αυτές που προσλαμβάνονται διατροφικά δεν φαίνεται να έχουν το καλύτερο προφίλ απορρόφησης και βιοδιαθεσιμότητας. Κατά συνέπεια, δεν είναι μόνο σημαντική η γνώση κατά πόσο μία θρεπτική ουσία είναι παρούσα στα τρόφιμα και τα διατροφικά συμπληρώματα αλλά είναι σημαντικότερη η γνώση κατά πόσο αυτή είναι βιοδιαθέσιμη. Ο όρος βιοδιαθεσιμότητα χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην φαρμακολογία για να οριστεί η έννοια του ποσοστού και της έκτασης στην οποία μία δραστική ουσία φτάνει στο σημείο δράσης της. Αν και έχουν παραταθεί διάφοροι ορισμοί ο καταλληλότερος περιλαμβάνει την έννοια της πρόσληψης του θρεπτικού συστατικού και στη συνέχεια τη μεταφορά του από τη συστηματική κυκλοφορία στις ειδικές περιοχές στόχους όπου μπορεί να ασκήσει τη βιολογική του δράση (Massimo D'Archivio, 2010).

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

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

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

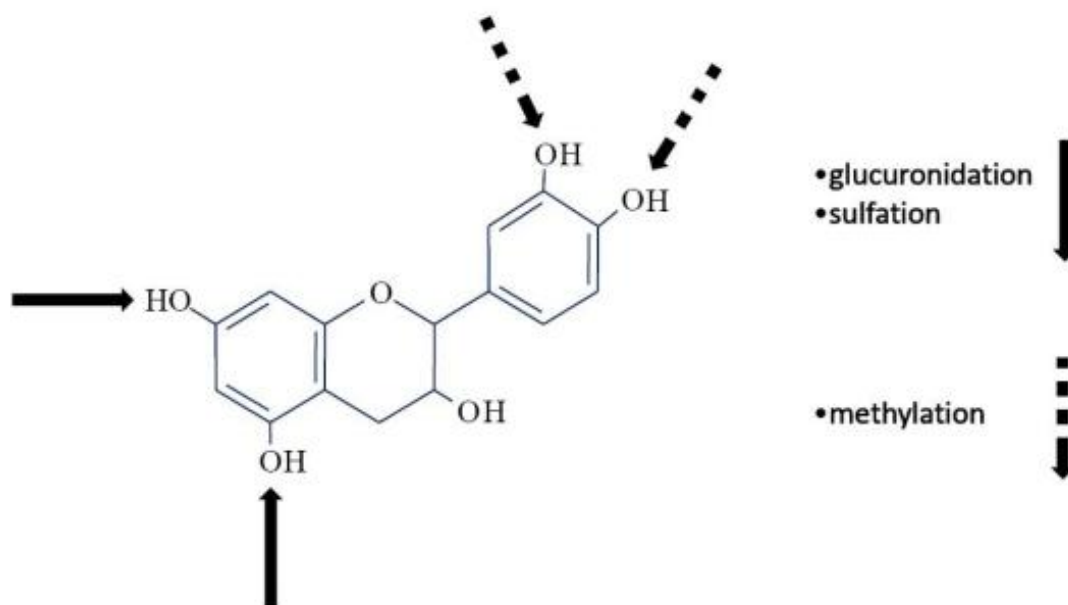
Συνεπώς, μετά την πρόσληψη η απορρόφηση των περισσότερων διατροφικών πολυφαινολών, όχι όμως όλων συμβαίνει στο λεπτό έντερο. Η υδρόλυση των γλυκοζιτών μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο μηχανισμούς. Ο πρώτος περιλαμβάνει τη δράση της υδρολάσης της λακτάσης (LPH), που εντοπίζεται στα κύτταρα που καλύπτουν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

Οι πολυφαινόλες που δεν απορροφώνται στο λεπτό έντερο, φθάνουν στο κόλον όπου υφίστανται σημαντικές δομικές τροποποιήσεις από την κολονική μικροχλωρίδα που υδρολύει γλυκοζίτες σε αγλυκόνες και τελικά την αποικοδόμηση αυτών σε απλά

φαινορικά οξέα. Αυτή η δραστηριότητα έχει μεγάλη σημασία για τη βιολογική δράση των πολυφαινόλων, δεδομένου ότι οι ενεργοί μεταβολίτες που παράγονται όπως η δαϊδζεΐνη μετασχηματίζεται στο δραστικό μεταβολίτη εκουόλη. Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί πως υπάρχει μεγάλη διακύμανση μεταξύ των ατόμων όσον αφορά στην παραγωγή αυτών των δραστικών μεταβολιτών, η οποία φαίνεται να σχετίζεται με γενετικά χαρακτηριστικά. Μάλιστα για τα άτομα που παράγουν μηδενικές ποσότητες εκουόλης, μια σύντομη έρευνα οδήγησε στην παραγωγή φυσικού συμπληρώματος εκουόλης, ως φαρμακευτικό προϊόν διατροφής, μετά την ανακάλυψη στελεχών βακτηρίων που είναι ικανά να παράγουν εκουόλη *in vitro*, όταν επωάζονται με ισοφλαβόνες σόγιας.

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

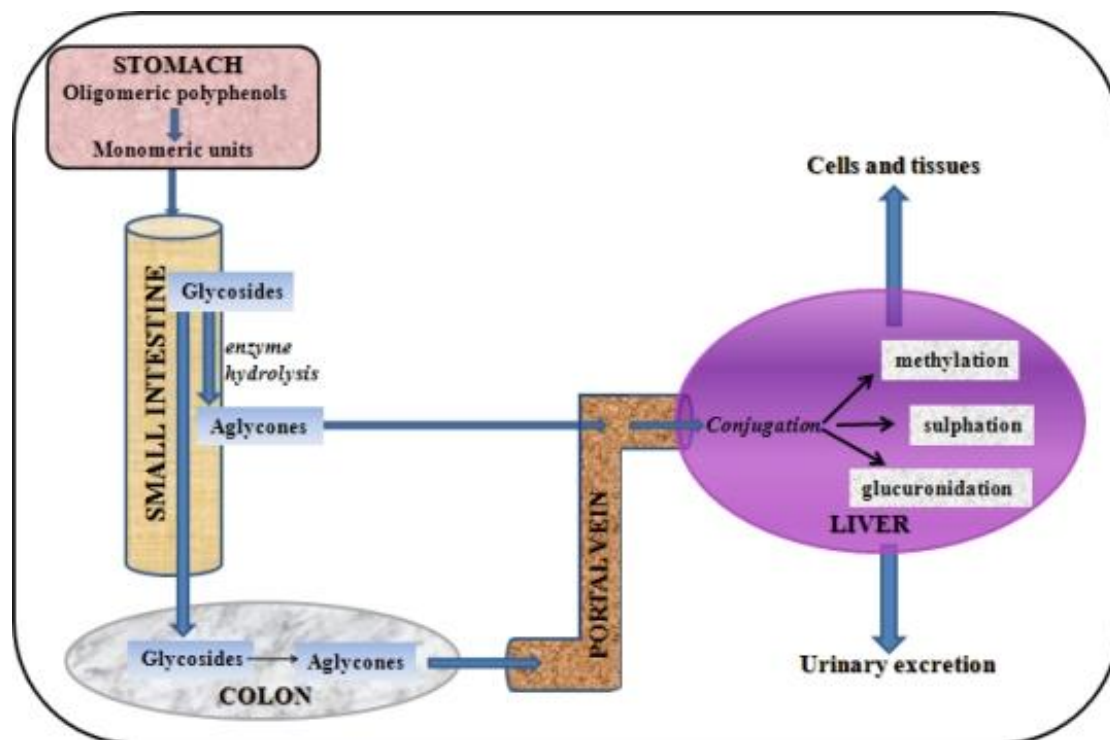
Η κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράση (COMT) καταλύει τη μεταφορά μιας ομάδας μεθυλίου από μία αδένοσυλ-μεθειωνίνη, σε πολυφαινόλες όπως η κερκετίνη, η κατεχίνη, το καφεϊκό οξύ και η κυανιδίνη. Αυτό το ένζυμο είναι παρόν σε ένα ευρύ φάσμα ιστών αλλά η δραστηριότητά του είναι μεγαλύτερη στο ήπαρ και τα νεφρά.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



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

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

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



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

1.11. Τοξικότητα Φυτικών Πολυφαινολών.

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

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

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

Η πιθανή τοξικότητα μερικών πολυφαινολών από σταφύλια, όπως η επικατεχίνη έχει διερευνηθεί σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών και κερατινοκυττάρων, μετά από επώασή τους μ' αυτήν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα 24, 48 και 72 ωρών. Αρνητικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τελικά όταν η συγκέντρωση της

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

Επίσης τα φυτοοιστρογόνα των πολυφαινολικών ενώσεων είναι ένα από τα πιο κοινά διατροφικά συστατικά του ανθρώπου και των ζώων. Στην πλειονότητά τους αυτές οι χημικές ουσίες εμφανίζουν λιγότερη ισχυρή δράση από τα ενδογενή οιστρογόνα αλλά ασκούν τις βιολογικές τους επιδράσεις μέσω παρόμοιων μηχανισμών. Τα φυτοοιστρογόνα και ειδικότερα η σόγια, πλούσια σε γενιστεΐνη και δαϊδζεΐνη, χρησιμοποιείται ως κύρια πηγή πρωτεΐνης σε ζωοτροφές. Το σχετικά αυξημένο ενδιαφέρον για τα φυτοοιστρογόνα, έχει προκύψει λόγω συσσώρευσης πληροφοριών για τις δυσμενείς επιδράσεις τους στο αναπαραγωγικό σύστημα. Τα πρώτα στοιχεία

αναφέρθηκαν το 1946 από τον Bennetts (Bennetts et al. , 1946), τα οποία έδειξαν πως η κατάποση τριφυλλίου πλούσιων σε φυτοοιστρογόνα σε βοσκότοπους προκαλεί στειρότητα στα πρόβατα. Είκοσι χρόνια μετά παρόμοιες παρατηρήσεις σημειώθηκαν και για τις αγελάδες, συμπεριλαμβανομένων και των προβλημάτων που εντοπίστηκαν ακόμα και κατά την κυοφορία τους. Οι επιδράσεις των φυτοοιστρογόνων επηρεάζονται από διαφορετικούς παράγοντες και κυρίως τη δόση και την οδό έκθεσης, καθορίζοντας τις τελικές συγκεντρώσεις των βιοδραστικών ενώσεών τους στον ορό. Ο χρόνος έκθεσης από την άλλη είναι κρίσιμος για τον καθορισμό των επιδράσεων στους ιστούς που φαίνεται να έχουν διαφορετική ευαισθησία σε μορφολογικές και λειτουργικές διαταραχές (Izabela Wocławek-Potocka, 2013).

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

1.12. Μορφολογικά χαρακτηριστικά και σύσταση σταφυλιών.

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

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

I. Ο Φλοιός.

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

Ο φλοιός αποτελείται κυρίως από νερό κατά 75-80%, αδιάλυτες πηκτίνες, κυτταρίνη, πρωτεΐνες και οξέα όπως είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό οξύ. Σε γενικές

γραμμές αν και η πολυφαινολική σύσταση είναι διαφορετική σε κάθε ποικιλία, επηρεαζόμενη σε κάθε περίπτωση και από τις συνθήκες καλλιέργειας, ο φλοιός φαίνεται να περιέχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα τανινών στο σταφύλι. Οι τανίνες στα σταφύλια διακρίνονται από το μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού τους και από το μικρότερο ποσοστό εστέρων γαλλικού οξέος. Η κατεχίνη, η επικατεχίνη και η γαλλική επικατεχίνη είναι τα συστατικά της τανίνης. Η κερκετίνη, οι γλυκοζίτες, τα γλυκουρονίδια, το γαλλικό οξύ και η ρεσβερατρόλη ολοκληρώνουν τη φαινολική σύσταση του φλοιού (Arnous, Meyer, 2009).

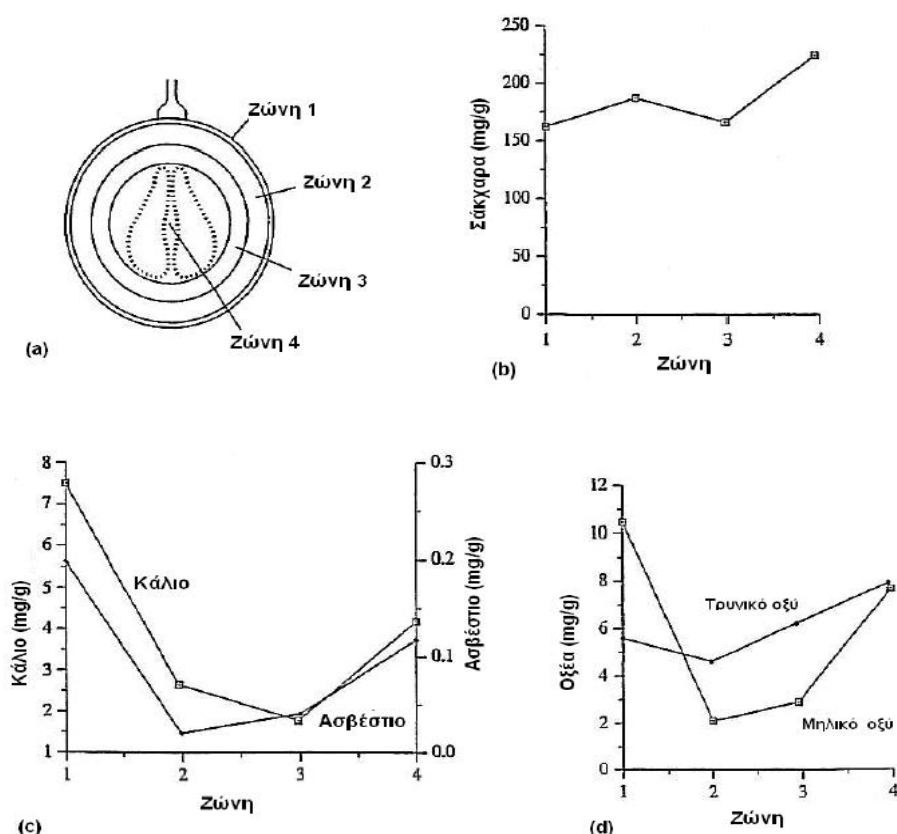


Εικόνα 23: Τομή ρόγας σταφυλιού, όπου διακρίνεται ο φλοιός, η σάσκα και τα γίγαρτα (Γιαννόπουλος, 2012).

II. Η Σάρκα.

Περιέχει νερό κατά 65-80%, σάκχαρα σε ποσοστό 10-30%, οργανικά οξέα, ανόργανα συστατικά αζωτούχες ουσίες, πτητικές ύλες, αρωματικές ουσίες και τανίνες (Δημοπούλου, 2008). Πιο συγκεκριμένα, τα σημαντικότερα σάκχαρα της σάρκας είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, σε συγκέντρωση 150-250 g/l. Τα άλλα σάκχαρα της σάρκας υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες. Η σακχαρόζη υπάρχει σε περιεκτικότητα 1-3 g/l. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία. Όσο αναφορά τα οξέα, το τρυγικό και το μηλικό οξύ έχουν την ίδια κατανομή. Το κιτρικό οξύ βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα κυτταρικά τοιχώματα και παραλαμβάνεται πιο δύσκολα. Τα οξέα και οι βάσεις έχουν αντίθετη κατανομή στα διάφορα μέρη της ρόγας. Από τα ανόργανα ιόντα, το κάλιο, εκφρασμένο σε οξείδιο, αποτελεί το 50% του συνόλου των ανόργανων ιόντων και βρίσκεται προς την περιφέρεια της ρόγας. Τα αζωτούχα συστατικά της σάρκας είναι το $\frac{1}{4}$ με $\frac{1}{5}$ των αζωτούχων συστατικών της ρόγας. Βρίσκονται σε μορφή ανόργανη

(NH₄) ή σε οργανική ως αμινοξέα, πολυπεπίδια και πρωτεΐνες. Οι μέσες τιμές των κυριότερων αμινοξέων είναι: αργινίνη 327 mg/l (χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο), προλίνη 266 mg/l, θρεονίνη 258 mg/l, γλουταμινικό οξύ 173 mg/l (Καλλή, 2008). Τα παρεγχυματικά κύτταρα που δομούν τη σάρκα, αποτελούνται από κυτταρικές κύστες που περιέχουν τον κυτταρικό χυμό (γλεύκος). Ο κυτταρικός χυμός αντιπροσωπεύει το 64-90% του βάρους των ραγών. Η σάρκα απαρτίζεται από κύτταρα του μεσοκαρπίου και από κύτταρα της εξωτερικής και εσωτερικής στιβάδας του ενδοκαρπίου. Αυτά σχηματίζουν είκοσι με τριάντα περίπου στιβάδες πενταγωνικών ή εξαγωνικών κυττάρων, στα πρώτα επίπεδα των οποίων, τα τοιχώματα τους είναι λεπτά και εύθραυστα, με αποτέλεσμα να δημιουργείται κάτω από το φλοιό μια πλήρη ζώνη υγρού (Δημοπούλου, 2008). Επιπλέον οι μεμβράνες των συνεχόμενων κυττάρων δεν είναι ενωμένες μεταξύ τους σε όλη την περιφέρεια, αλλά αφήνουν στις γωνίες μικρούς, επικοινωνούντες χώρους μέσα από τους οποίους γίνονται οι εναλλαγές αερίων με το εξωτερικό περιβάλλον.

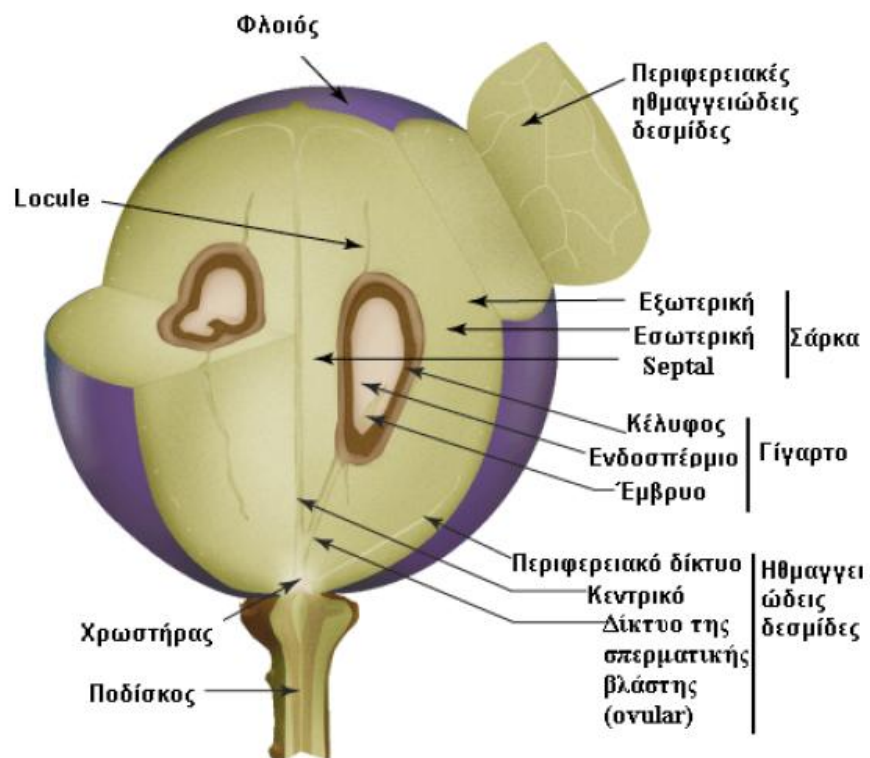


Εικόνα 24: Ανάλυση των κυριότερων συστατικών της ράγας: (b) σακχάρων, (c) κατιόντων και (d) οξέων, εκφρασμένων σε mg/g νωπού βάρους στα διαφορετικά της τμήματα (a, ζώνες). Η ζώνη (1) αντιστοιχεί στο φλοιό, η ζώνη (2) και (3) στο μεσοκάρπιο και η ζώνη (4) στο ενδοκάρπιο (Possner και Kliewer, 1985).

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

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

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



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

1.13. Φαινολικά Συστατικά Σταφύλης και Στέμφυλων.

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

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

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

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

σταφυλιών, αντιπροσωπεύοντας το 12% του βάρους των λευκών και το 14% του βάρους των ερυθρών οινοποιηθέντων σταφυλιών.



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

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

Σύνθεση Στέμφυλων

Περιεκτικότητα εκφρασμένη σε ποσοστό%

Φλοιοί	50
Γίγαρτα	20
Αλκοόλη	5
Υγρασία	25
Σύνολο	100

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

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

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

1.14. Εναλλακτικές χρήσεις Στέμφυλων

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



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

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

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

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

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

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

1.15. Παραγωγή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών

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

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

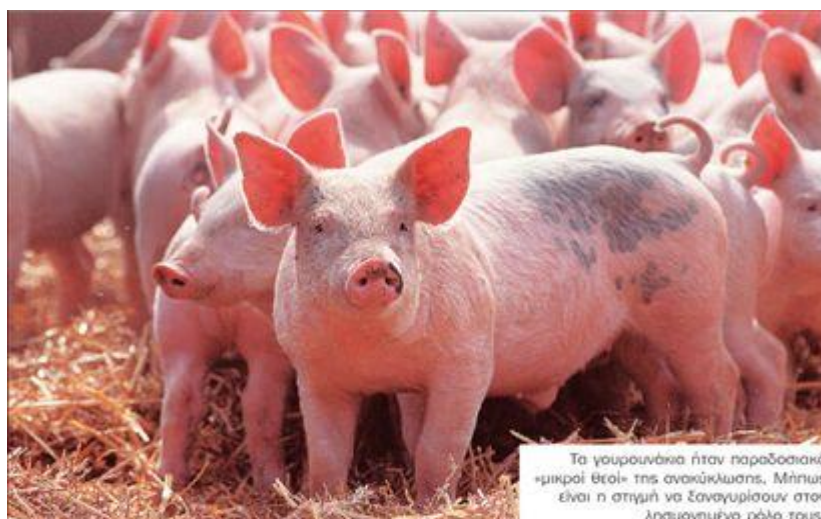


Εικόνα 28: Υποπροϊόντα οινοποίησης, στέμφυλα.

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

1.16. Γενικές Πληροφορίες Για Τους Χοίρους

Ο χοίρος (κοινός γουρούνι) είναι οικόσιτο θηλαστικό ζώο και ανήκει στο υποείδος *sus scrofa domesticus*. Πιστεύεται ότι προέρχεται από τον αγριόχοιρο, μέσω εξημέρωσης από την παλαιολιθική εποχή. Είναι ζώο παμφάγο και πολύ γόνιμο. Απαντάται σε όλα τα μέρη της γης και εκτρέφεται κυρίως για το κρέας του. Ο χοίρος προσαρμόζεται σε όλες τις συνθήκες, ωστόσο αναπτύσσεται καλύτερα σε ψυχρά κλίματα. Είναι αδηφάγο ζώο και τρώει από όλες τις τροφές. Το πεπτικό του σύστημα μπορεί να επεξεργαστεί κάθε είδους τροφή. Αυτό συνιστά μεγάλο πλεονέκτημα για τους εκτροφείς χοίρων, όπως και η μέγιστη απόδοσή του σε κρέας και λίπος. Η απόδοση αυτή φτάνει άνετα το 70% του βάρους του σώματός του στις κοινές φυλές και ξεπερνά το 85% στις βελτιωμένες. Μερικές από τις σημαντικότερες ράτσες του χοίρου είναι η British Yorkshire, η British Berkshire, η νορμανδική και η ιβηρική ή μεσογειακή (εδώ ανοίκει ο ελληνικός οικόσιτος χοίρος).



Εικόνα 29: Χοίροι.

Πίνακας 9: Συστηματική ταξινόμηση γουρουνιών.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	
Kingdom	Metazoa
Phylum	Chordata
Subphylum	Craniata
Class	Mammalia
Order	Artiodactyla
Infraorder	Suina
Family	Suidae
Subfamily	Suinae
Tribe	Suini
Genus	<i>Sus</i>
Species	<i>Sus scrofa</i>
Subspecies	<i>Sus scrofa domesticus</i>

1.16.1 Εγκυμοσύνη Των Χοίρων

Ο αναπαραγωγικός κύκλος ενός θηλυκού χοίρου διαρκεί 21 ημέρες, ενώ η εγκυμοσύνη περίπου 3 μήνες, 3 εβδομάδες και 3 ημέρες (δηλαδή 114 ημέρες). Οι χοιρομητέρες γεννούν δύο φορές το χρόνο, έχοντας κατά μέσο όρο 11 γουρουνάκια ανά γέννα (Κωνσταντίνος Ν. Σαράντης, 2010). Τα νεογνά αμέσως μετά τη γέννα ζυγίζουν κατά μέσο όρο 0,5-1kg, ενώ στους 2 μήνες που διαρκεί και η πειραματική διαδικασία φτάνουν τα 15 κιλά περίπου.

1.16.2 Ασθένειες Που Προσβάλλουν Τους Χοίρους

Τα νεαρά χοιρίδια πριν από τον απογαλακτισμό τους μαστίζονται από αρκετές ασθένειες, οι οποίες θέτουν σε σοβαρό κίνδυνο την υγεία τους και οι κυριότερες παρατίθενται στη συνέχεια.

- Coccidiosis: πρόκειται για μια παρασιτική ασθένεια του εντερικού σωλήνα που οφείλεται σε coccidian protozoa (π.χ. *Toxoplasma Gondii*)
- Colibacillosis: πρόκειται για μια ασθένεια που οφείλεται σε μόλυνση του εντερικού σωλήνα ή του ουροποιητικού συστήματος από το βακτήριο *Escherichia coli*
- Υποσιτισμός: λόγω λήψης ανεπαρκούς ποσότητας τροφής

- Διάφορες μολύνσεις από μια ποικιλία μικροοργανισμών.
- Εξιδρωματική επιδερμίτιδα: προκαλείται από το βακτήριο *Staphylococcus hyicus*, το οποίο προσβάλλει το δέρμα προκαλώντας μόλυνση

Άλλες ασθένειες παρατηρούνται μετά τον απογαλακτισμό τους και είναι οι εξής: ασθένειες του αναπνευστικού, δυσεντερία, ψώρα, εντερική συστροφή, έλκος, ερυσίπελας (δερματική νόσος) και παρασιτώσεις.

1.16.3 Εκτροφή Χοίρων

Η παραγωγικότητα των εκτρεφόμενων παραγωγικών ζώων (όπως και των χοίρων) καθορίζεται από το γενότυπό τους και επηρεάζεται από την κατάσταση της υγείας τους και το περιβάλλον εκτροφής τους. Με τον όρο περιβάλλον εκτροφής υπονοούμε τις συνθήκες ενσταβλισμού, τη μεταχείριση των ζώων, καθώς και τη διατροφή τους. Η διατροφή αποτελεί βασικό στοιχείο της εκτροφής όλων των παραγωγικών ζώων αφού επηρεάζει άμεσα τις αποδόσεις και την υγεία τους. Επιπλέον, το απαιτούμενο κόστος για τη διατροφή των εκτρεφόμενων ζώων αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την οικονομικότητα της εκτροφής.

Στόχος της διατροφής είναι να εφοδιάσει το ζώο με όλα εκείνα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που εξασφαλίζουν την υγεία και τη παραγωγικότητα του ζώου καθώς επίσης και να βελτιώσει τη ποιότητα των προϊόντων που παράγει το ζώο, δηλαδή το κρέας. Η παραγωγή καλής ποιότητας και χαμηλού κόστους κρέατος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ορθολογική και ισόρροπη διατροφή. Η χορήγηση ενός επαρκούς ποσοτικά και ισορροπημένου ποιοτικά σιτηρεσίου έχει ιδιαίτερη σημασία, αφού η διατροφή συμμετέχει σε ποσοστό 65% στη διαμόρφωση του τελικού κόστους παραγωγής. Μη ισόρροπη διατροφή έχει ποικίλες δυσμενείς επιδράσεις με συνέπεια στη μείωση της οικονομικής απόδοσης της εκμετάλλευσης. Έτσι μπορεί να παρατηρηθεί μικρός ρυθμός αύξησης βάρους, μειωμένη εκμετάλλευση της τροφής. Η διατροφή των παραγωγικών ζώων διαφέρει ανάλογα με την ηλικία του ζώου, το στάδιο στο οποίο βρίσκεται και το σκοπό της εκτροφής.

Εκτός από τη διατροφή, σημαντικό ρόλο στην ευζωία και στην ανάπτυξη των παραγωγικών ζώων παίζει και το περιβάλλον εκτροφής, δηλαδή οι συνθήκες ενσταβλισμού καθώς και η μεταχείριση των ζώων. Οι συνθήκες ενσταβλισμού πρέπει να διέπονται από κανόνες που εξασφαλίζουν την καλή διαβίωση των ζώων έτσι ώστε τα ζώα να μην υφίσταται κανένα περιττό πόνο, ταλαιπωρία ή τραυματισμό και επίσης να εξασφαλίζουν συνθήκες εκτροφής που να ικανοποιούν τις φυσιολογικές και

ηθολογικές ανάγκες των ζώων (π.χ ανάγκες συμπεριφοράς όσον αφορά κατάλληλη ελευθερία κινήσεων και άνεση).

Συγκεκριμένα, στις σταυλικές εγκαταστάσεις που εκτρέφονται παραγωγικά ζώα η κυκλοφορία του αέρα, η θερμοκρασία και οι συγκεντρώσεις αερίων πρέπει να τηρούνται μέσα σε όρια που δεν είναι επιβλαβή για τα ζώα. Επίσης οι χώροι να καθαρίζονται σχολαστικά, απομακρύνοντας τα κόπρανα, τα ούρα και τα υπολείμματα τροφής, όσον το δυνατόν ταχύτερα. Κατά διαστήματα πρέπει να παρέχεται σε όλα τα ζώα, σιτηρέσιο κατάλληλο και προσαρμοσμένο στην ηλικία, το βάρος, τη συμπεριφορά και τις φυσιολογικές τους ανάγκες και να έχουν συνεχή πρόσβαση σε πόσιμο νερό. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να τηρείται αυστηρώς το ωράριο εκτροφής τους, δηλαδή η παροχή και απομάκρυνση τροφής να πραγματοποιείται σε προκαθορισμένα χρονικά πλαίσια σε καθημερινή βάση. Επίσης οι εκτροφείς πρέπει να προσφέρουν στα ζώα την καλύτερη δυνατή φροντίδα κατά τη διάρκεια της εκτροφής, αλλά και κατά τη μεταφορά τους στα σφαγεία.

Η εκτροφή των χοιριδίων και των προβάτων που συμμετείχαν στο πειραματικό μέρος αυτού του έργου πραγματοποιήθηκε σε εγκαταστάσεις οι οποίες πληρούσαν όλους τους απαραίτητους κανόνες, οι οποίοι εξασφάλιζαν την άριστη διαβίωση των συγκεκριμένων ζώων. Κατά τη διάρκεια των πειραματισμών με τους χοίρους παρακολουθήθηκε η ανάπτυξή τους και συγκεκριμένα καταγράφηκε η ημερήσια αύξηση βάρους καθώς και η ημερήσια κατανάλωση τροφής.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, ασχοληθήκαμε με την αξιοποίηση των στεμφύλων, τα οποία είναι υποπροϊόντα της οινοποίησης. Όταν τα στέμφυλα εναποτίθενται στο περιβάλλον θεωρούνται οργανικός ρύπος και προκαλούν διάφορα οικολογικά προβλήματα. Υπάρχει, όμως, και η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων, πλούσιων σε διάφορα θρεπτικά συστατικά, γεγονός το οποίο μειώνει και την περιβαλλοντική επιβάρυνση. Επίσης, τα στέμφυλα είναι πλούσια σε πολυφαινόλες που εμφανίζουν εκτός των άλλων βιολογικών τους ιδιοτήτων και ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Έτσι, με βάση το παραπάνω σκεπτικό, δημιουργήσαμε συγκεκριμένες ζωοτροφές, εμπλουτισμένες με στέμφυλα, και τις χορηγήσαμε ως διατροφή στα νεαρά χοιρίδια. Σκοπός του πειράματος ήταν η εκτίμηση της επίδρασης αυτών των ζωοτροφών στην οξειδοαναγωγική κατάσταση σε συγκεκριμένους ιστούς (νεφρό, πνεύμονας, στόμαχος) των νεαρών χοιριδίων.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Γενικά

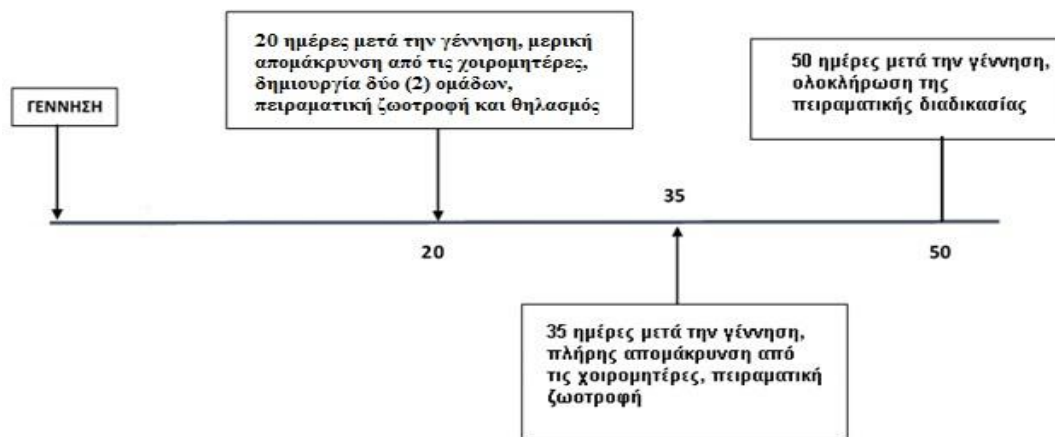
Η εκτροφή των χοιριδίων πραγματοποιήθηκε στις πειραματικές εγκαταστάσεις εκτροφής χοίρων, του ΤΕΙ Θεσσαλίας στη Λάρισα και συγκεκριμένα στους θαλάμους του κτιρίου ξηράς περιόδου-τοκετού οξείας απογαλακτισμού. Τόσο οι συνθήκες διαβίωσης τους όσο και ο τρόπος θανάτωσής τους για τη λήψη αίματος και ιστών έγιναν σύμφωνα με τις Οδηγίες 2010/63/ΕΕ του Ε. Κ. και του Συμβουλίου της 22/10/2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς.



Εικόνα 29: Οι χώροι εγκατάστασης στις οποίες εκτράφηκαν τα χοιρίδια.

Κατά τον μήνα Φεβρουάριο γεννήθηκαν είκοσι-οκτώ (28) χοιρίδια από δύο (2) χοιρομητέρες. Το γενετικό υπόβαθρο των νεαρών χοιριδίων προήλθε από τη διασταύρωση Landrace (μητέρα) X Large White – Duroc – Pietrain (πατέρας). Λόγω της μεγάλης ζήτησης του άπαχου κρέατος, εκτρέφονται κυρίως οι παραπάνω φυλές οι οποίες και παρουσιάζουν περισσότερο κρέας και λιγότερο λίπος.

Η εκτροφή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παρακάτω πειραματική διαδικασία.



Εικόνα 30: Πειραματική διαδικασία εκτροφής - απογαλακτισμού των χοιριδίων.

Στην ηλικία των 20 ημερών τα χοιρίδια χωρίστηκαν σε δύο πειραματικές ομάδες (10 από τη μία χοιρομητέρα και 10 από την άλλη). Στην ομάδα Α (ομάδα ελέγχου) χορηγήθηκε συνήθες πειραματικό μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΜΣΖ) ανάπτυξης χοιριδίων. Στην ομάδα Β χορηγήθηκε ΜΣΖ ανάπτυξης, στο οποίο ενσωματώθηκε ενσίρωμα αραβόσιτου-στεμφύλων οиноποιίας.

Κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας του πειραματισμού, τα χοιρίδια απομακρύνονταν καθημερινά, από τις χοιρομητέρες τους σε διαφορετικά κελιά για χρονικό διάστημα οκτώ (8) ωρών, ενώ κατά τη δεύτερη εβδομάδα του πειραματισμού η καθημερινή απομάκρυνση από τις χοιρομητέρες αυξήθηκε σε δέκα (10) ώρες. Η απομάκρυνση των χοιρομητέρων, δηλαδή ο απογαλακτισμός των νεαρών χοιριδίων, έγινε 35 μέρες μετά την γέννηση τους, οπότε και τα νεαρά χοιρίδια μεταφέρθηκαν σε ξεχωριστό κελί (ανά ομάδα) και καταναλώναν όλη τη μέρα μόνο το πειραματικό σιτηρέσιο που τους χορηγήθηκε. Συγχρόνως, όλες αυτές τις μέρες γινόταν συνεχής παρακολούθηση της ημερήσιας κατανάλωσης στα σιτηρέσια απογαλακτισμού.



Εικόνα31: Η εκτροφή των χοιριδίων στα κελιά τους.

3.1.1 Παραγωγικά Χαρακτηριστικά

1) Ημερήσια κατανάλωση τροφής

Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας εκτός από την καθημερινή χορήγηση των πειραματικών σιτηρεσίων, γινόταν συνεχής παρακολούθηση της ημερήσιας κατανάλωσης στα σιτηρέσια.

2) Εξέλιξη του σωματικού βάρους των χοιριδίων

Εκτός από την ημερήσια μέτρηση της κατανάλωσης σιτηρεσίου, γινόταν και μετρήσεις στα βάρη των χοίρων.

3) Ημερήσια αύξηση σωματικού βάρους χοιριδίων (ADG)

3.2 Περιγραφή Σιτηρεσίου

3.2.1 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, συμπιέζοντας 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 χοιριδίων, 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 χοιριδίων 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.

3.2.2 Χαρακτηριστικά Ενσιρώματος

Ένα καλό ενσίρωμα διαθέτει ένα ανοικτό καφέ στο χρώμα, έχει μια έντονη γεύση και μυρίζει ελάχιστα όταν το γαλακτικό οξύ που περιέχει βρίσκεται στην σωστή ποσότητα. Είναι πολύ σταθερό και μπορεί να διατηρηθεί για χρόνια, εάν απαιτείται υπό την προϋπόθεση ότι το οξυγόνο περιορίζεται από το υλικό. Για την καλύτερη

ζύμωση, η ξηρά τροφή που χρησιμοποιείται πρέπει να έχει υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Η κοπή θα πρέπει να πραγματοποιηθεί όταν το περιεχόμενό τους σε υδατάνθρακες (διαλυτά σάκχαρα) είναι υψηλό και όταν το φυτό μπορεί να μααραθεί γρήγορα. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3% κατά την κοπή και το φυτό θα πρέπει να μααραθεί έως ότου η περιεκτικότητά του σε υγρασία από 80% κατέβει στο 70-75%. Σε αυτό το ποσοστό εξασφαλίζεται η υψηλότερη περιεκτικότητα σε θρεπτικά στοιχεία και η ασφαλέστερη ενσίρωση. Συνήθως το κατάλληλο pH για ένα καλό ενσίρωμα πρέπει να είναι μικρότερο από 4,1.

3.2.3 Παρασκευή Ενσιρώματος Στεμφύλων

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

Το ενσιρωμένο καλαμπόκι περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας, οργανικά οξέα, όπως γαλακτικό οξύ και χορηγείται στα ζώα σαν χονδροειδής ζωοτροφή. Η ενσίρωση είναι η διαδικασία ζύμωσης φυτικών προϊόντων με υψηλό ποσοστό υγρασίας και υπό αναερόβιες συνθήκες, με σκοπό τη διατήρηση του προϊόντος αλλά και τη βελτίωση της θρεπτικής του αξίας, για χρήση ως ζωοτροφή. Κατά την ενσίρωση δημιουργούνται όξινες συνθήκες που εξασφαλίζουν την διατήρηση της υγρασίας και της γεύσης τους.

Μετά την ανάμιξη 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 αραίωση 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 αραίωση 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 32: Διαδικασία συσκευασίας του ενσιρώματος στεμφύλων.

3.2.4 Σύσταση πειραματικών σιτηρεσίων

Για τις ανάγκες του πειράματος παράχθηκαν τα ακόλουθα σιτηρέσια, τα οποία ήταν ισοενεργειακά και ισοπρωτεϊνικά και ισόρροπα ως προς τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων χοιριδίων. Η σύστασή τους περιγράφεται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 10: Τα πειραματικά σιτηρέσια της ομάδας control και της ομάδας στέμφυλα.

ΟΜΑΔΑ ΜΑΡΤΥΡΑΣ		ΟΜΑΔΑ ΣΤΕΜΦΥΛΑ	
ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%	ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	48,5	ΕΝΣΙΡΩΜΑ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ (60% ΣΤΕΡΕΑ)	48,5
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	21	ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	21
ΟΡΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	20	ΟΡΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	20
ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟ	8	ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟ	8
ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5	ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5
ΣΥΝΟΛΟ	100	ΣΥΝΟΛΟ	100

3.2.5 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (in vitro) των παρασκευασμένων ζωοτροφών για τα νεαρά χοιρίδια

Η αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των πειραματικών ζωοτροφών πραγματοποιήθηκε, τόσο για την ζωοτροφή control όσο και για την εμπλουτισμένη ζωοτροφή, 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 IC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών η οποία εξουδετερώνει την ρίζα (DPPH, ABTS) κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC_{50} τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση της ουσίας. Έτσι υπολογίζοντας το IC_{50} των ζωοτροφών μπορούμε να εκτιμήσουμε την δραστικότητα και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα

3.3 Ιστοληψία

Οι σφαγές, πραγματοποιήθηκαν από εξειδικευμένο προσωπικό στο σφαγείο της Λάρισας στην περιοχή Γυρτώνη, ακολουθώντας τους απαραίτητους κανονισμούς περί χειρισμού, μεταφοράς και θανάτωσης εργαστηριακών ζώων, που πραγματοποιήθηκαν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε τα ζώα να υποστούν την λιγότερη καταπόνηση καθώς και λιγότερο άγχος. Πραγματοποιήθηκαν σε συγκεκριμένες ηλικίες των ζώων, μετά τη γέννησή τους, με σκοπό την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής άμυνας (**πρόωρη ηλικία, 2 και 20 ημερών**) (**4 ζώα σε κάθε σφαγή**), την εκτίμηση της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στην ευζωία (**απογαλακτισμός, 35 ημερών**) (**10 ζώα**) και τέλος, με σκοπό την εκτίμηση της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στο τελικό βάρος (**βάρος σφάγιου, 50 μέρες**) (**10 ζώα**). Το χρονικό σχεδιάγραμμα των σφαγών παρουσιάζεται παρακάτω.

Υλικά:

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

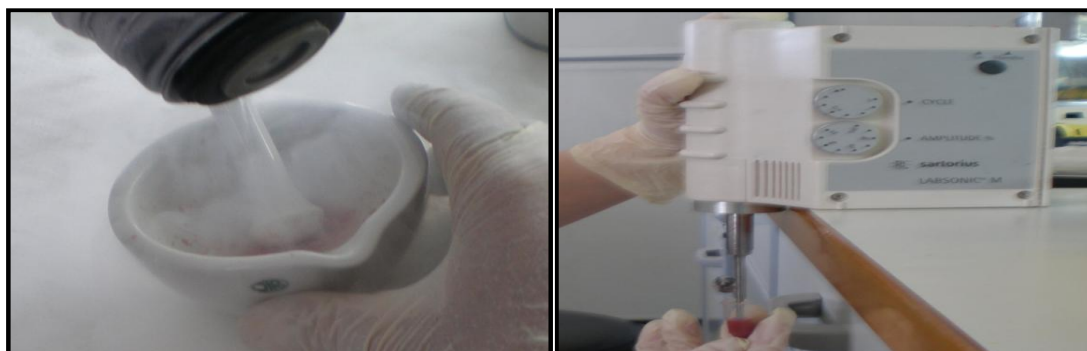


Εικόνα 33: Διατήρηση και αποθήκευση των ιστών σε κασέτες.

3.3.1 Ομογενοποίηση ιστών

Η ομογενοποίηση τόσο του τετρακέφαλου όσο και του καρδιακού ιστού εκτελέστηκε με δύο μεθόδους.

A) Με γουδί και γουδοχέρι: Αρχικά, πήραμε ένα μικρό μέρος του παγωμένου ιστού από τον καταψύκτη των -80°C και τον κονιορτοποιήσαμε στο γουδί με το γουδοχέρι. Συγχρόνως, προσθέταμε στο γουδί ανά τακτά χρονικά διαστήματα υγρό άζωτο. Όταν θρυμματίστηκε τελείως, τον ζυγίσαμε και τον προσθέσαμε σε Eppendorf μαζί με ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7,4 σε αναλογία 1:2. Το PBS περιείχε 138mM NaCl, 2,7mM KCL και 1mM EDTA, καθώς και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH). Οι πρωτεάσες αυτές ήταν η απροτινίνη (10mg/mL), η οποία αναστέλει την θρυψίνη και άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα, η λιουπεπτίνη (1mg/mL), η οποία αναστέλει πεπτιδάσες όπως την κυστεΐνη, την σερίνη και την θρεονίνη, η PMSF (9mg/mL) και άλλες. Ακολούθως, το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης (με σπάσιμο μεμβρανών) και φυγοκεντρήθηκε (15.000g, 5min, 4°C). Η φύλαξή όλων των ομογενοποιημένων ιστών πραγματοποιήθηκε σε φιαλίδια Eppendorf των 1,5mL, ψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.



Εικόνα 34: Τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στην ομογενοποίηση.

B) Με ομογενοποιητή: Μέσα σε falcon προσθέσαμε περίπου 0,5-0,6g ιστού και PBS σε αναλογία 1:2 και πραγματοποιήσαμε ομογενοποίηση με τον ειδικό ομογενοποιητή. Ακολούθως, προσθέσαμε το μείγμα σ' ένα Eppendorf και το ομογενοποιήσαμε περαιτέρω με υπερήχους. Έπειτα, έγινε φυγοκέντρωση (15.000g, 5min, 4°C), πήραμε το υπερκείμενο και το προσθέσαμε σε νέα Eppendorf. Τέλος, αφότου

ομογενοποιήθηκαν όλοι οι ιστοί, διατηρήθηκαν στους -80oC μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.



Εικόνα 35: Ο ομογενοποιητής.

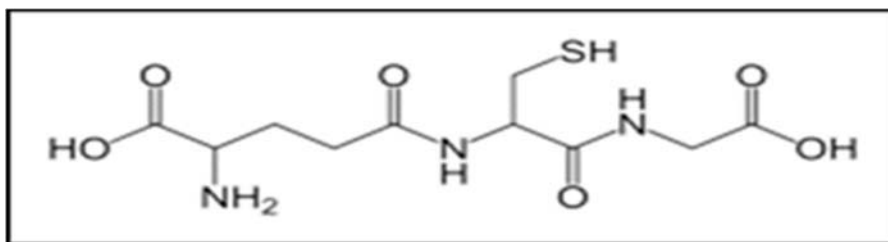
3.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες

3.4.1 Γενικά

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

3.4.2 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 τριπεπίδιο 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).

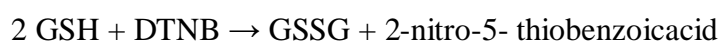


Εικ36: Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης.

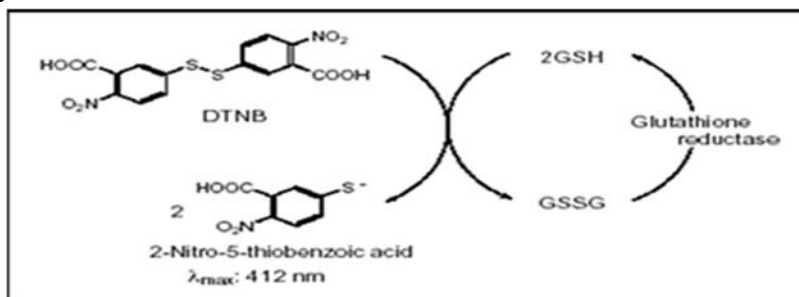
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battinetal, 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και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

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειόδου 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 37: 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.

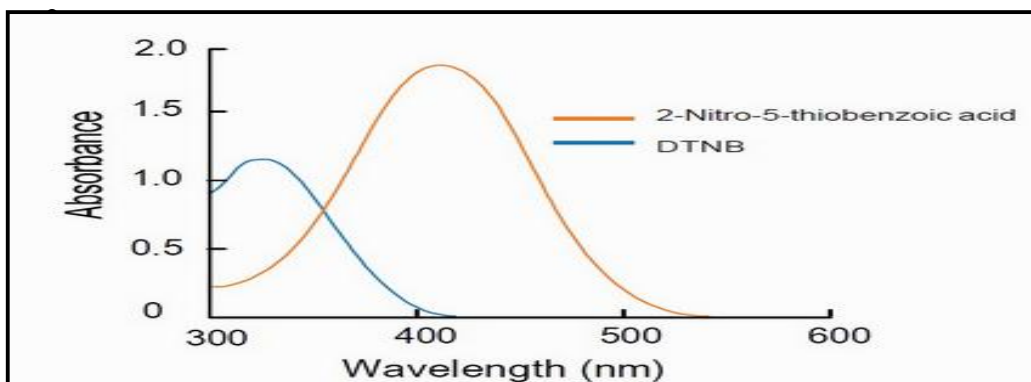
Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς.

- 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 eppendorf. 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 eppendorf:
- **Πίνακας 11:** 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).



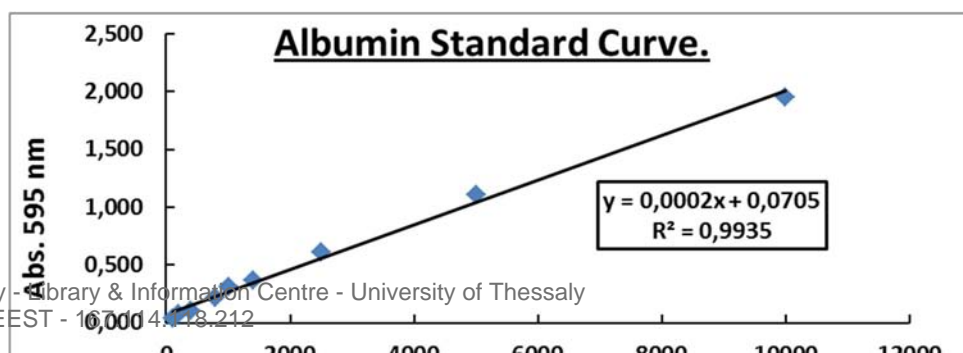
• **Εικόνα 38:** Φάσμα απορρόφησης του 2-νιτρο-5-θεοβενζοϊκού οξέος (Dojindo Molecular Technologies).

A) Υπολογισμοί για ιστούς

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

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

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



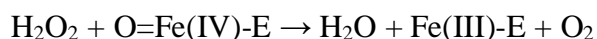
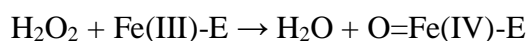
Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης

3.4.3 Δραστηριότητα της Καταλάσης

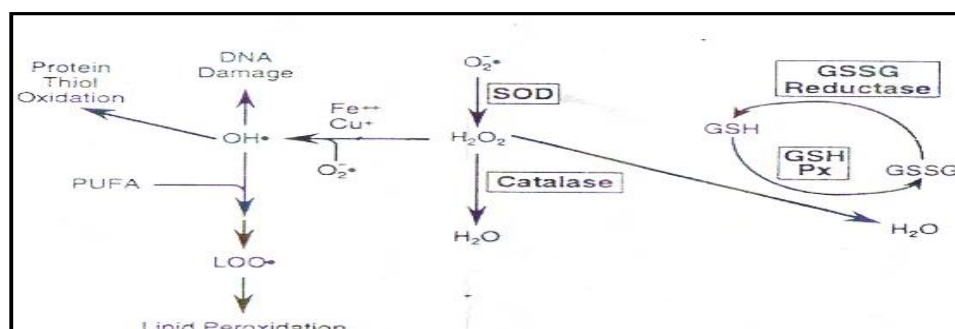
Αρχή της μεθόδου

Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Για να διαχειριστεί αυτό το πρόβλημα, η ενζυμική καταλάση καταλύει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου, σε αβλαβή οξυγόνο και νερό. Chelikani P, et. al., (2004). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Boon EM, et. al. (2007). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



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



Εικόνα 39: Μονοπάτι αναγωγής του H^2O^2 σε H^2O .

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

CAT



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

Διαλύματα

Phosphate buffer 67mM (pH 7.4) MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178. Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7,4.

30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

Το διάλυμα H_2O_2 είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

Πίνακας 12: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης σε ιστό.

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

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.

A) Υπολογισμοί για ιστούς

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

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2 πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε $\mu\text{mol/mL}$. Το 75 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου ($3000\mu\text{L}$) με τον όγκο του δείγματος ($40\mu\text{L}$) ($3000/40=75$). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και εγκεφαλικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης.

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης. ΔAbs = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

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

3.4.4 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)

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

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

Αρχή της μεθόδου

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

Διαλύματα

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

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

Διαλύουμε 0.02 g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200 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 για ιστούς

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

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

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

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.

A) Υπολογισμοί για ιστούς

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

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

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

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

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

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

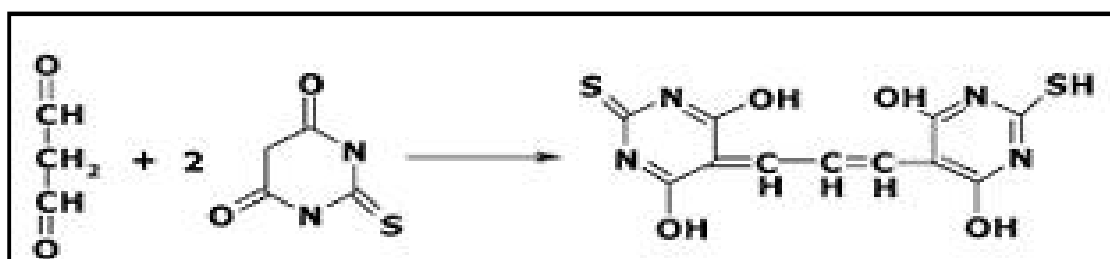
ε) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L σε mL.

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

3.4.5 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Αρχή της μεθόδου.

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



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

Διαλύματα

- **Tris-HCl 200 mM (pH 7.4).** MB (Tris): 121,14. MB (HCl): 36,46 (stock 37%) [10,1 N]. Για να παρασκευάσουμε ~100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0,1 N). Για το Tris ζυγίζουμε 0,61 g και τα διαλύουμε

σε 25 mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0.42 mL του stock 37% HCl (10.1 N) σε 42 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25 mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42 mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100 mL. Ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7,4.

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

- **Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM).** MB (TBA): 144,1 και MB (Na₂SO₄): 142,04. Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος, ζυγίζουμε 2,84 g Na₂SO₄ και 0,08 g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

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

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

Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μ L ομογενοποιημένου ιστού για τα δείγματα και απεσταγμένο νερό για το τυφλό. Προσθέτουμε 500 μ L TCA 35% και 500 μ L 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 μ L από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

A) Υπολογισμοί για ιστούς

Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg total protein) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 x 31 x 3 x 3, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μ L) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (100 μ L) (3100 / 100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το

συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156 (mol/L) διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε $\mu\text{mol/L}$. Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και εγκεφαλικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 3 ξανά επειδή το δείγμα αραιώνεται 3 φορές κατά τη μέτρηση.

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

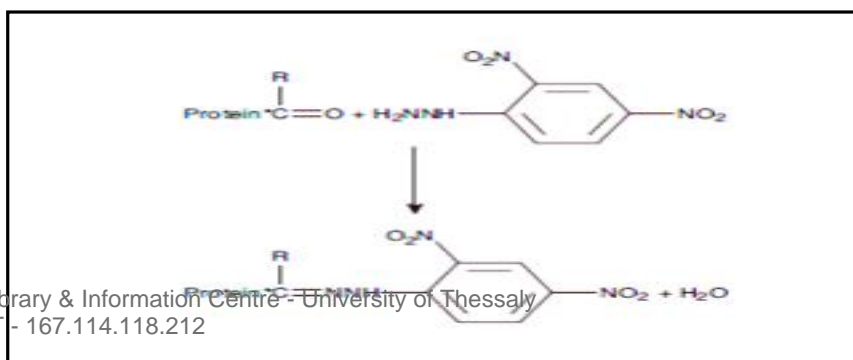
3.4.6 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια

Αρχή της μεθόδου

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

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

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



Εικόνα 40: Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δινιτριφαινυλαδραζίνη) και σχηματισμός του δινιτροφαινυλδραζονίου.

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 για ιστούς

Σε 50 μ L ομογενοποιημένου ιστού προσθέτουμε 50 μ L 20% TCA σε eppendorfs και αναδεύουμε στο vortex. Κάθε δείγμα έχει το τυφλό του (το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0.5 mL DNPH, τα οποία αντικαθίστανται 0.5 mL HCL 2.5 N). Το 20% TCA προστίθεται με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Το TCA (τριχλωροοξικό οξύ) χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμνιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.

Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Κατόπιν, προσθέτουμε στο ίζημα

(πελέτα) 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2,5 N HCL) για τα δείγματα ή 0,5 mL 2,5 N HCL για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Μετά την πάροδο της μίας ώρας, φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

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

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 0,5 mL αιθανόλης και 0,5 mL οξικού ειθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει. Αυτήν την διαδικασία την επαναλαμβάνουμε άλλες δύο (2) φορές και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

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

A) Υπολογισμοί για ιστούς

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

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

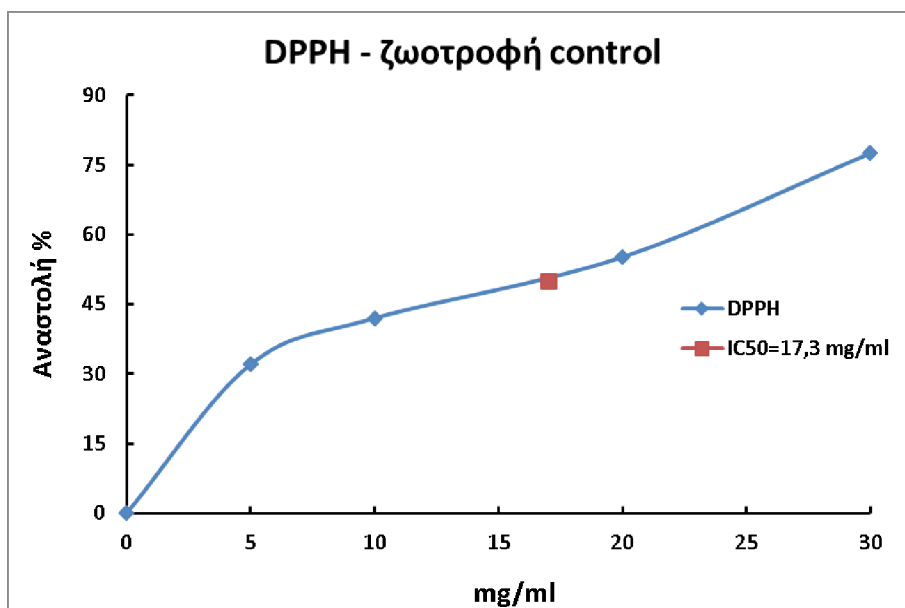
3.4.7 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

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).

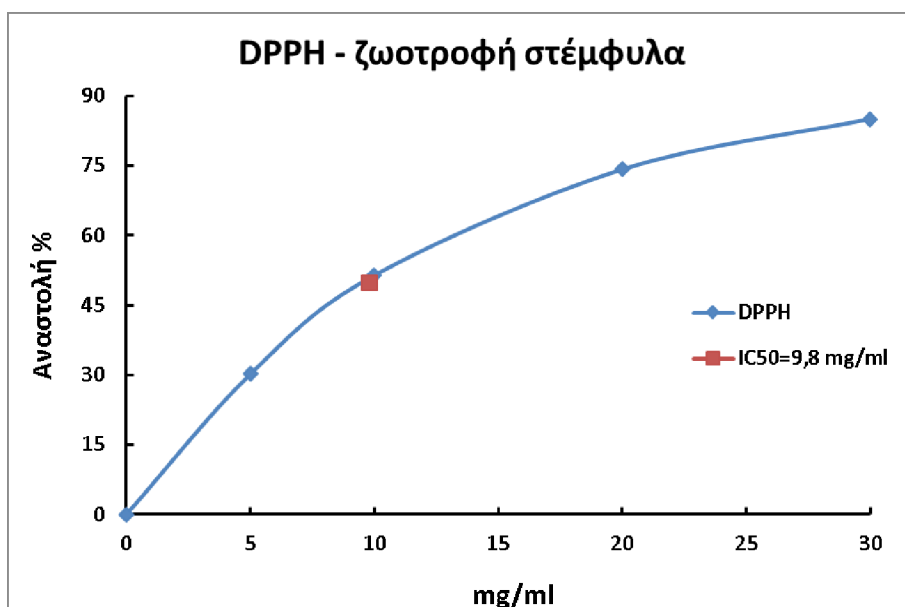
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πειραματικών ζωοτροφών για τους χοίρους

Παρακάτω παρατίθενται οι γραφικές παραστάσεις οι οποίες απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH, ABTS σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των ζωοτροφών.

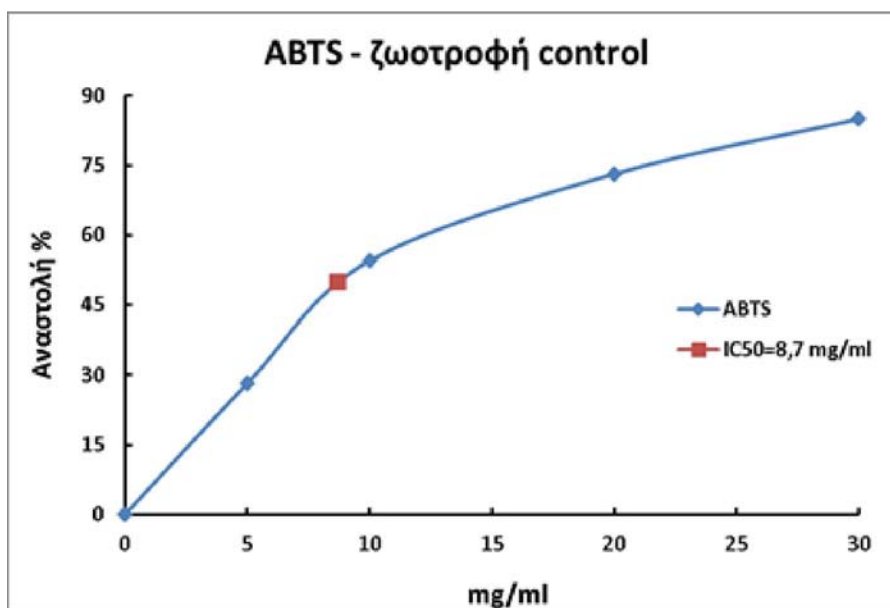


Διάγραμμα 2: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.

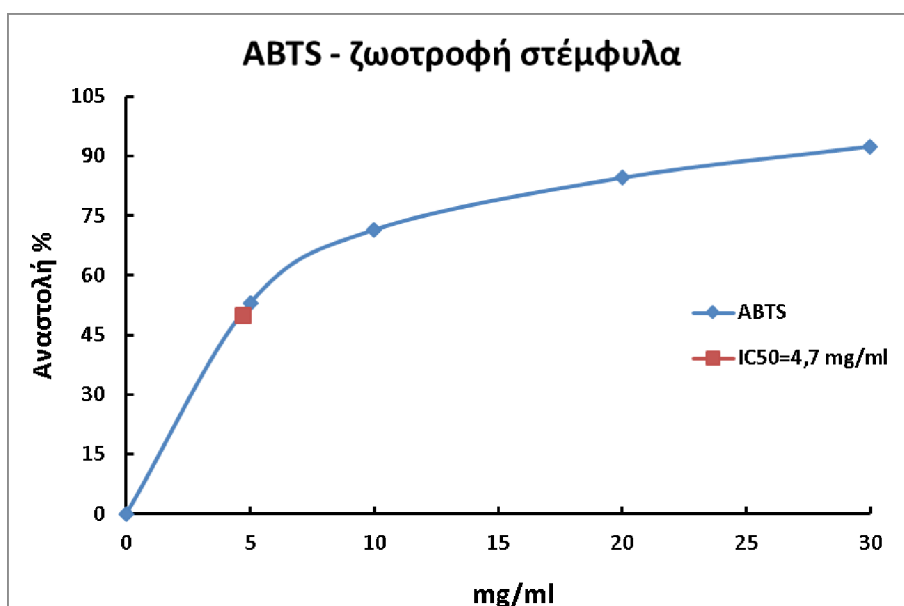


Διάγραμμα 3: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με στέμφυλα.

Από τις γραφικές παραστάσεις (Διάγραμμα 2, 3) παρατηρείται ότι με την μέθοδο της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH, η ζωοτροφή εμπλουτισμένη με τα υποπροϊόντα οινοποιίας (στέμφυλα) παρουσιάζει τιμή IC₅₀= 9,8 mg/ml, ενώ η ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου παρουσιάζει τιμή IC₅₀= 17,3 mg/ml. Κατά συνέπεια, η ζωοτροφή με τα στέμφυλα παρουσιάζει αντιοξειδωτική ικανότητα (διπλάσια) σε σχέση με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου.



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.

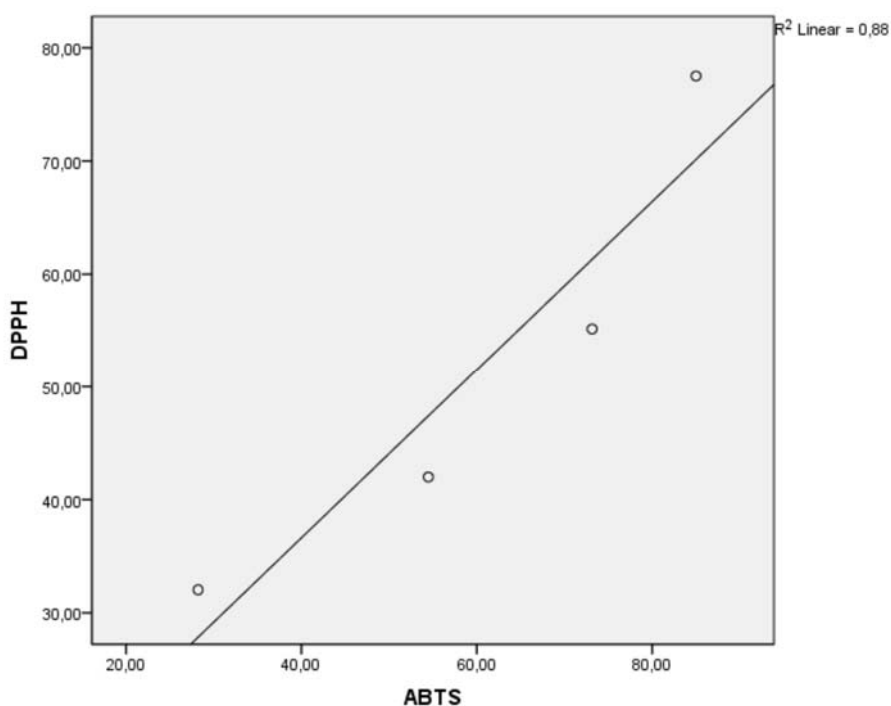
Με την μέθοδο της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS (Διάγραμμα 4, 5) οι τιμές IC₅₀ είναι πιο χαμηλές (IC₅₀=8,7 mg/ml (ομάδα ελέγχου) και IC₅₀=4,7 mg/ml) σε σύγκριση με αυτές της ρίζας του DPPH, το οποίο οφείλεται στο ότι τα βιοδραστικά συστατικά των ζωοτροφών εξουδετερώνουν με διαφορετικό τρόπο την ρίζα του ABTS σε σχέση με εκείνη του DPPH. Και σε αυτή, όμως, την περίπτωση η

δραστικότητα της ζωοτροφής που είναι εμπλουτισμένη με τα στέμφυλα είναι διπλάσια σε σχέση με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου.

4.1.1 Συσχέτιση των δύο μεθόδων κατά Spearman

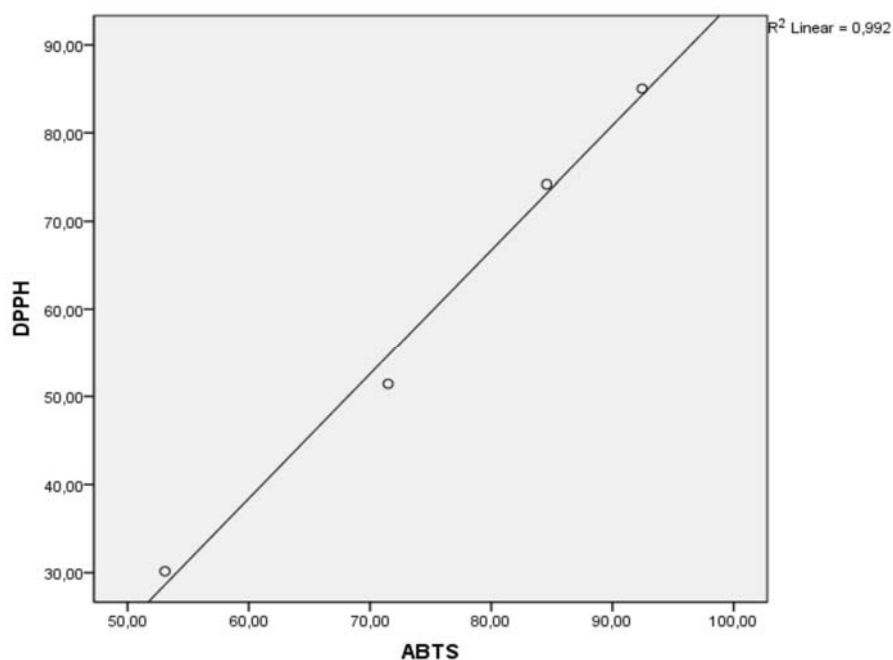
Για την συσχέτιση των δύο ζωοτροφών και τον προσδιορισμό της ικανότητάς τους να εξουδετερώνουν και τις δύο ρίζες DPPH και ABTS, πραγματοποιήθηκε υπολογισμός του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα στατιστικής SPSS18. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της στατιστικής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

Ζωοτροφή ομάδας ελέγχου (control)



Διάγραμμα 6: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση των τιμών IC_{50} της μεθόδου DPPH με τη μέθοδο του ABTS ($r = 0,88$, $p < 0,05$).

Ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ενσίρωμα στεμφύλων

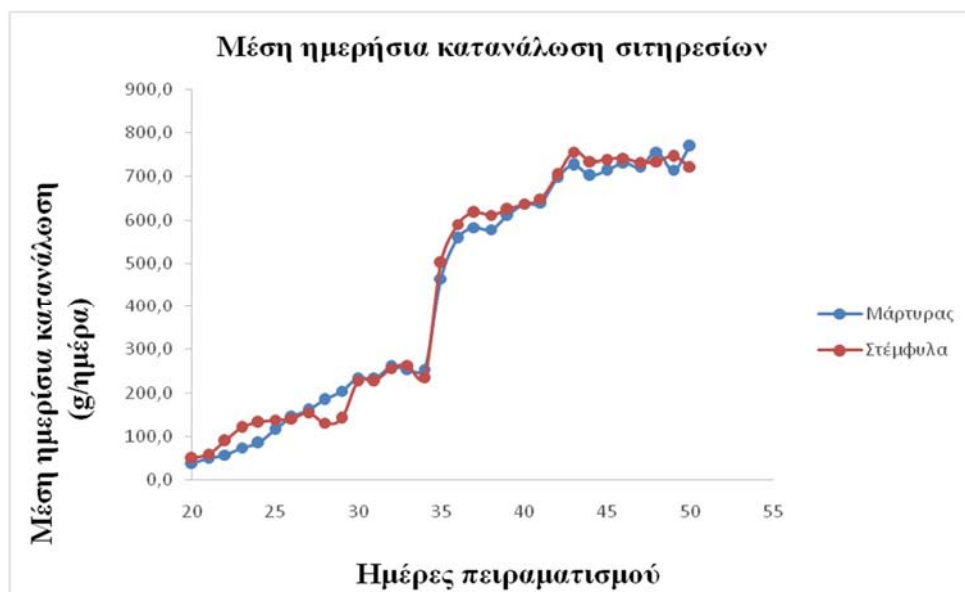


Διάγραμμα 7: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση των τιμών IC_{50} της μεθόδου DPPH με τη μέθοδο του ABTS ($r = 0,992$, $p < 0,05$).

Υπολογίζοντας τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, ανάμεσα στις τιμές IC_{50} που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους (DPPH, ABTS), τόσο στην ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου ($r=0,88$) όσο και στην ζωοτροφή εμπλουτισμένη με το ενσίρωμα στεμφύλων ($r=0,992$), παρατηρείται μια μεγάλη συσχέτιση που σημαίνει ότι τα ίδια πιθανώς βιοδραστικά συστατικά των ζωοτροφών εξουδετερώνουν και τις δύο ρίζες (Διάγραμμα 6, 7).

4.2 Αποτελέσματα παραγωγικών χαρακτηριστικών χοιριδίων

1) Μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής



Διάγραμμα 8: Μέση ημερήσια κατανάλωση σιτηρεσίων για τα χοιρίδια.

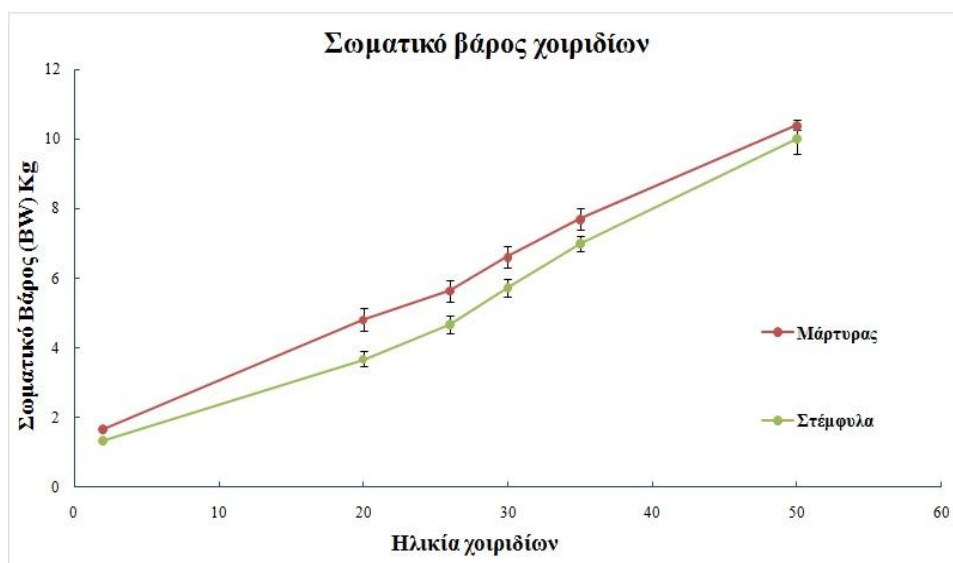
Δεδομένου ότι η διατροφή των χοιριδίων ήταν ομαδική, δεν είναι δυνατή η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της κατανάλωσης της τροφής. Ωστόσο, από το διάγραμμα 8 παρατηρείται ότι η κατανάλωση είναι περίπου ίδια μεταξύ των δύο ομάδων σε όλη τη διάρκεια του πειραματισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τον απογαλακτισμό η κατανάλωση και των δύο ομάδων σχεδόν υπερτριπλασιάστηκε απότομα, κάτι που είναι λογικό αφού τα χοιρίδια σταμάτησαν πλέον να θηλάζουν και κατανάλωναν τα σιτηρέσια κατά τη διάρκεια όλης της μέρας.

2) Εξέλιξη του σωματικού βάρους χοιριδίων

Ακολουθεί ο πίνακας 8 με τους μέσους όρους των σωματικών βαρών των χοιριδίων και το διάγραμμα 9, στο οποίο παρατηρείται η εξέλιξη του σωματικού βάρους των χοιριδίων από την γέννηση, τον απογαλακτισμό τους και μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας.

Πίνακας 14: Σωματικά βάρη των χοιριδίων κατά την περίοδο απογαλακτισμού(*mean ± sem*)

Ημέρες μετά την γέννηση	Ομάδα μάρτυρα	Ομάδα στέμφυλα
2	1,65	1,34
20	4,808±0,328	3,679±0,219
26	5,645±0,318	4,669±0,261
30	6,614±0,303	5,718±0,249
35	7,713±0,295	7,009±0,224
50	10,404±0,145	10,011±0,415



Διάγραμμα 9: Εξέλιξη του σωματικού βάρους των χοιριδίων στις ομάδες (μάρτυρας, στέμφυλα).

Από το διάγραμμα 9 παρατηρείται ότι από τον απογαλακτισμό και μετά ο ρυθμός ανάπτυξης του σωματικού βάρους της ομάδας στέμφυλα αυξήθηκε παραπάνω σε σχέση με το αντίστοιχο βάρος της ομάδας μάρτυρα.

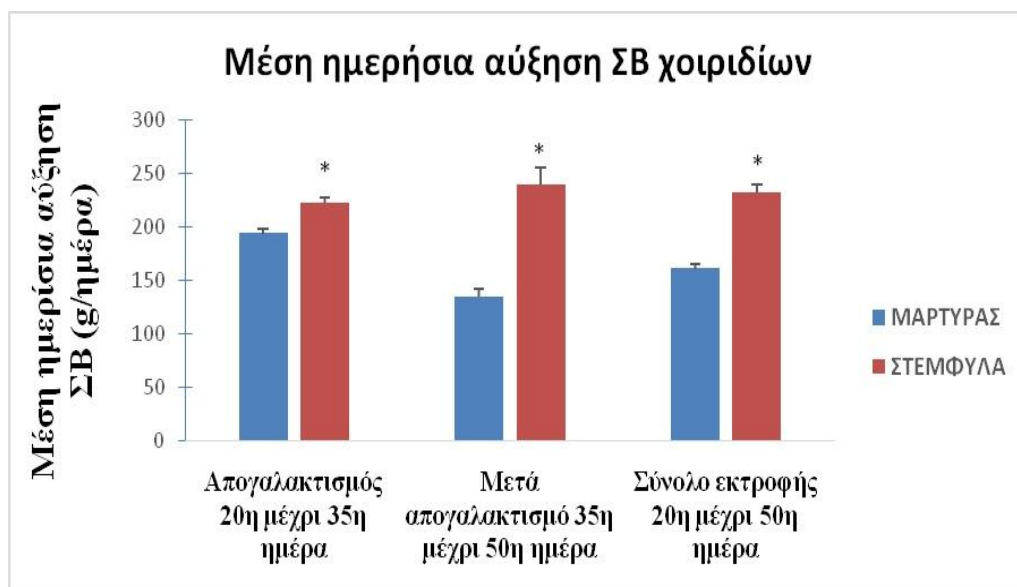
3) Ημερήσια αύξηση σωματικού βάρους (ADG)

Από την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της ημερήσιας αύξησης σωματικού βάρους, προκύπτουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Μέση ημερήσια αύξηση ΣΒ (g/ημέρα) στις ομάδες των χοιριδίων στην περίοδο του απογαλακτισμού, μετά τον απογαλακτισμό και στο σύνολο της πειραματικής διαδικασίας.

Ομάδα	Μάρτυρας	Στέμφυλα	P-value
ADG Απογαλακτισμός	193,70 ^a ±4,002	221,99 ^b ±4,922	<0,05
ADG Μετά Απογαλακτισμό	134,65 ^a ±7,437	238,88 ^b ±16,632	<0,05
ADG Σύνολο Εκτροφής	160,45 ^a ±4,091	231,66 ^b ±8,286	<0,05

Διαφορετικοί εκθέτες (a,b,c) δηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$.



Διάγραμμα 10: Ημερήσια αύξηση σωματικού βάρους (ADG) χοιριδίων.

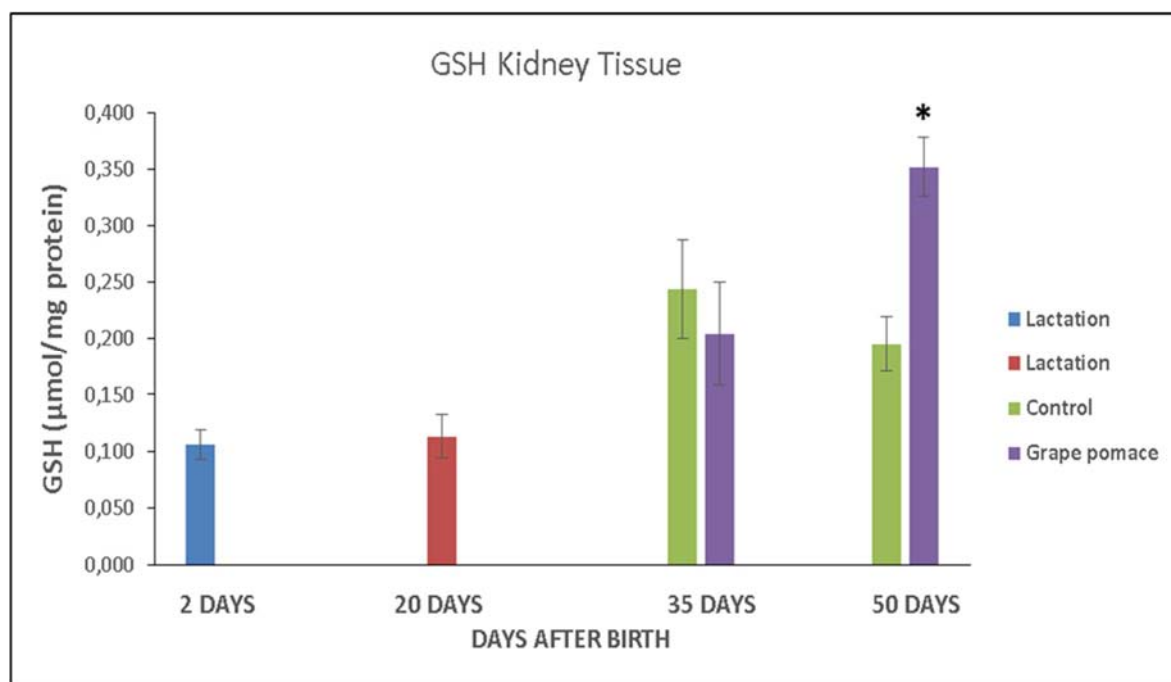
Συγκεκριμένα στο διάγραμμα 10 παρατηρείται ότι ο ημερήσιος ρυθμός ανάπτυξης από την έναρξη της χορήγησης των πειραματικών σιτηρεσίων 20^η ημέρα μέχρι τον απογαλακτισμό 35^η ημέρα, καθώς και στην περίοδο μετά τον απογαλακτισμό μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας 50^η ημέρα ήταν σημαντικά μεγαλύτερος ($p < 0,05$) στα χοιρίδια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο, στο οποίο ενσωματώθηκε ενσίρωμα αραβοσίτου-στέμφυλων οινοποιίας (ομάδα Ενσιρώματος Στέμφυλων). Επίσης, στο σύνολο της πειραματικής διαδικασίας παρατηρείται ότι ο ημερήσιος ρυθμός ανάπτυξης της ομάδας στεμφύλων διαφέρει και είναι στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερος ($p < 0,05$) από την ομάδα του μάρτυρα.

4.3 Αποτελέσματα μετρήσεων δεικτών οξειδωτικού στρες στους ιστούς (νεφρό, πνεύμονας, στόμαχος) στους χοίρους

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν, ως μέση τιμή \pm SEM ενώ η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου IBM SPSS 22. Συγκεκριμένα, εκτελέσθηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (One-Way ANOVA), με την επιλογή των παραμέτρων post-hoc LSD, Tukey, Dunnett's T3, προσδιορίζοντας το επίπεδο σημαντικότητας σε $p < 0.05$.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των πέντε (5) δεικτών οξειδωτικού στρες για τους ιστούς των χοίρων, φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα. Η σύγκριση πραγματοποιείται στις ομάδες control και στις πολυφαινολικές ομάδες (στέμφυλα οινοποιίας, grape pomace) ξεχωριστά, για την παρατήρηση των μεταβολών στα αναπτυξιακά τους στάδια, όσο και μεταξύ τους για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιολειτουργικών ζωοτροφών.

4.3.1 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH) στον νεφρικό ιστό



Διάγραμμα 11: Επίπεδα της γλουταθειόνης στον νεφρικό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της GSH ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 15).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grape pomace)

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση στα επίπεδα της GSH ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 15).

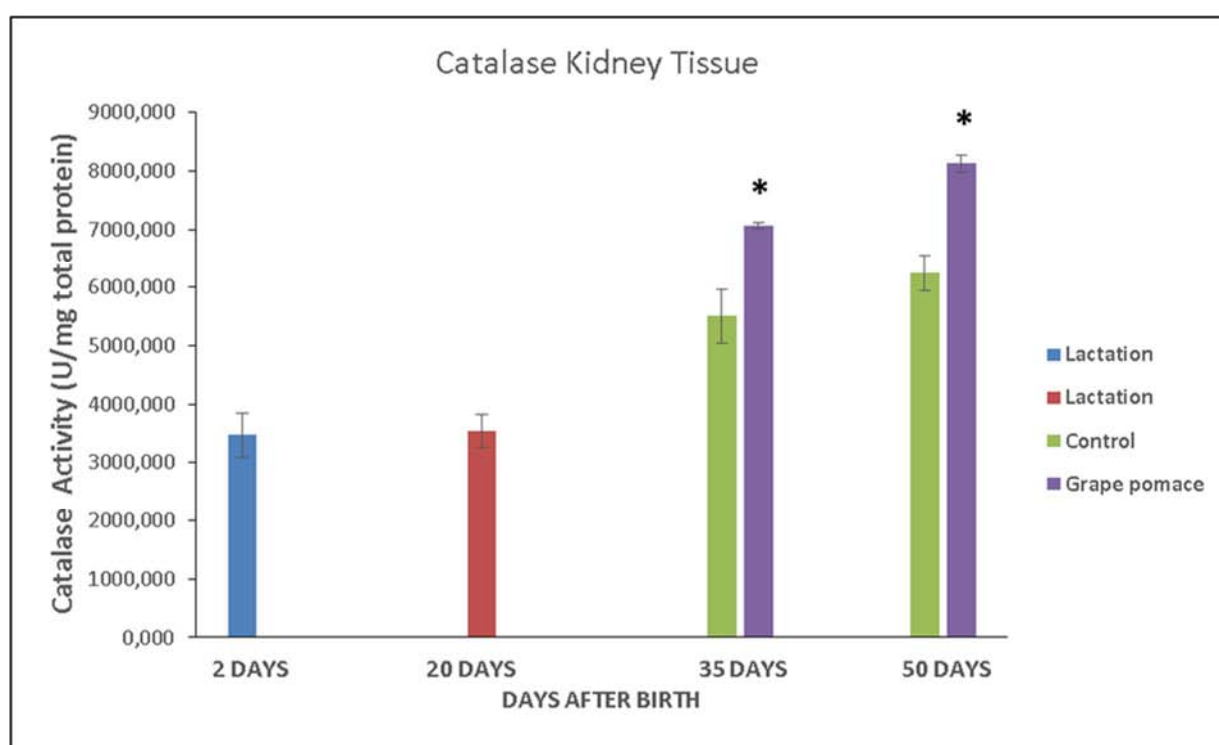
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 11, στις 35 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά των επιπέδων της GSH από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα, ενώ στις 50 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική αύξηση (80,51%)** ($p < 0,05$) στα επίπεδα της GSH (πίνακας 15).

Πίνακας 15: Επίπεδα της GSH στον νεφρικό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

GSH (μmol/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,244 ± 0,043	0,195 ± 0,024
Grape pomace	0,204 ± 0,045	0,352 ± 0,025

4.3.2 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στον νεφρικό ιστό



Διάγραμμα 12: Επίπεδα της καταλάσης στον νεφρικό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της CAT ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 16).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grape pomace)

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση στα επίπεδα της CAT ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 16).

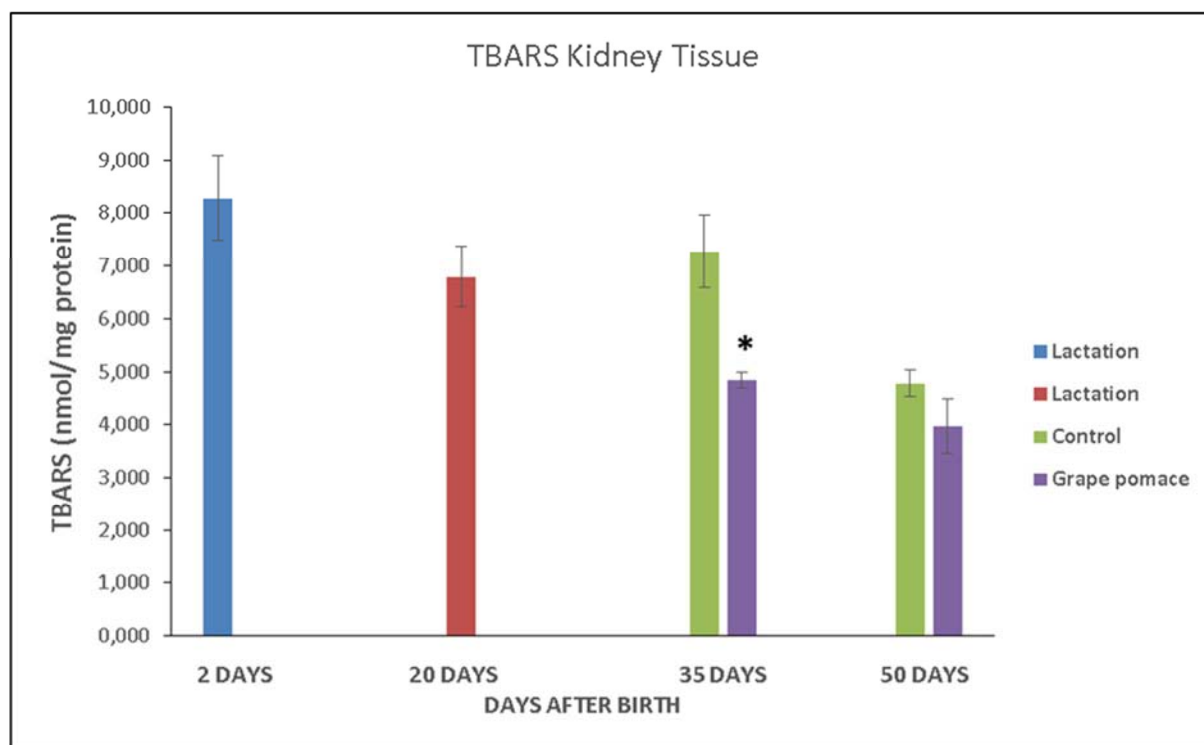
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 12, στις 35 και στις 50 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική αύξηση (28,29%) και (29,94%)** στα επίπεδα της CAT από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα (πίνακας 16).

Πίνακας 16: Επίπεδα της CAT στον νεφρικό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

CAT (U/mg Protein)M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	5505,65 \pm 462,72	6252,44 \pm 306,57
Grape pomace	7063,646 \pm 59,8159	8124,900 \pm 149,8073

4.3.3 Επίπεδα των TBARS στον νεφρικό ιστό



Διάγραμμα 13: Επίπεδα της TBARS στον νεφρικό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική μείωση** στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 17).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grape pomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 17).

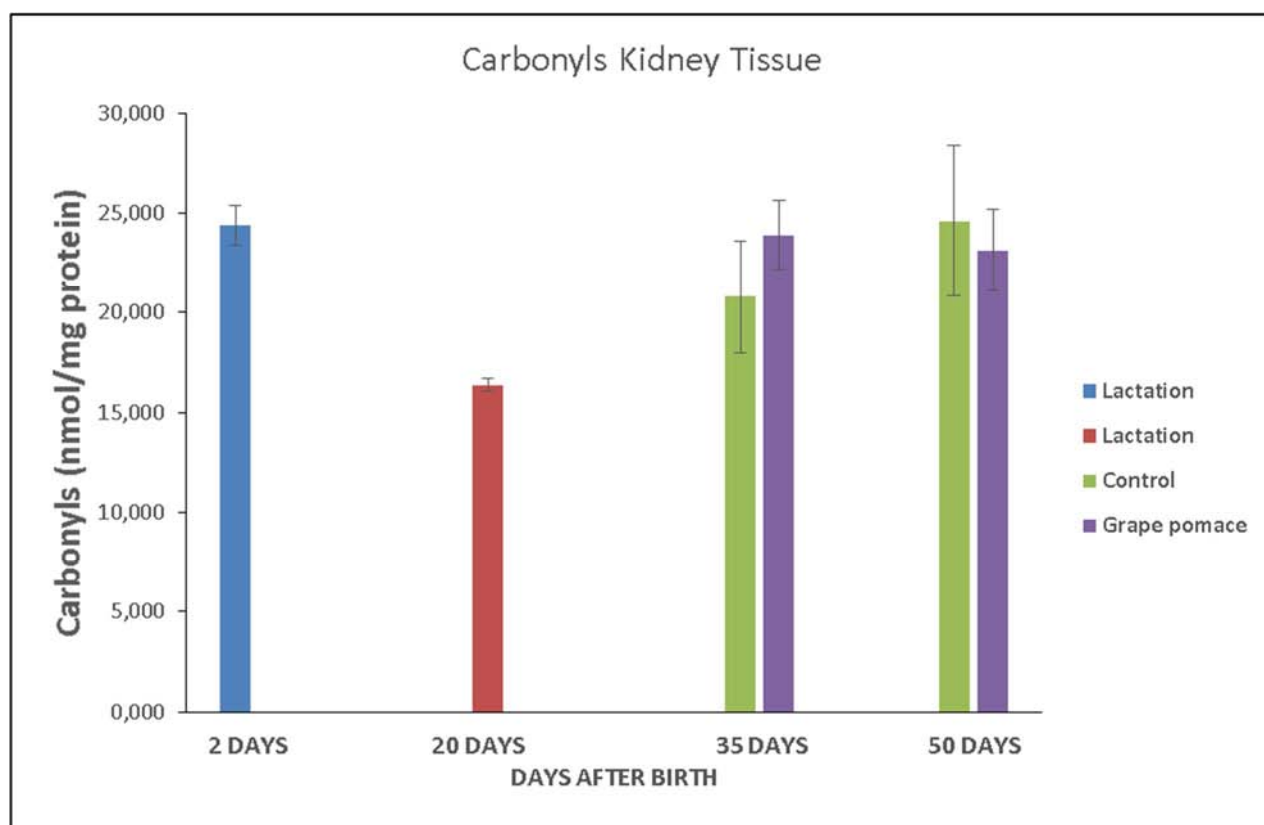
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 13, παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική μείωση (33,42%) ($p < 0,05$)** στα επίπεδα των TBARS στα ζώα 35 ημερών σε σχέση με το control ενώ στις 50 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά (πίνακας 17).

Πίνακας 17: Επίπεδα των TBARS στον νεφρικό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

TBARS (nmol/mg protein) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	7,268 \pm 0,6874	4,776 \pm 0,2534
Grape pomace	4,839 \pm 0,1510	3,970 \pm 0,5169

4.3.4 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον νεφρικό ιστό



Διάγραμμα 14: Επίπεδα της πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον νεφρικό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των CARB ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 16).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grape pomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των CARB ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 16).

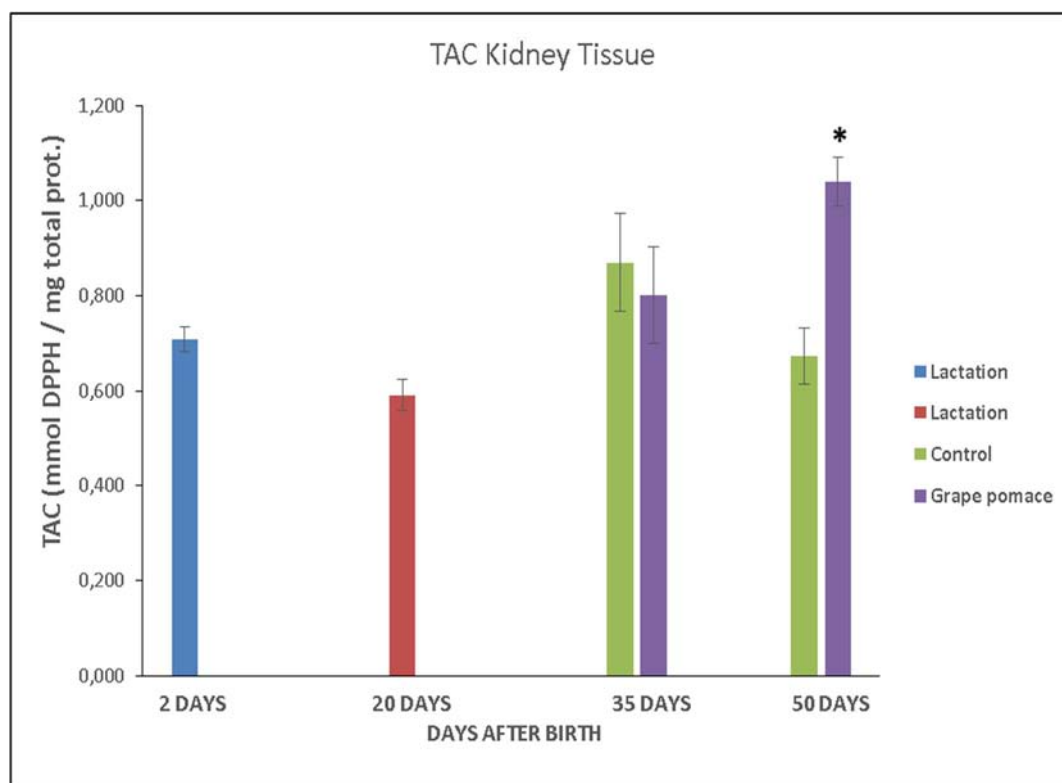
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 14, τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα.

Πίνακας 18: Επίπεδα της πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο νεφρικό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

CARB (U/mg Protein)M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	20.807±2.805	24.593±3.766
Grape pomace	23.888±1.724	23.138±2.022

4.3.5 Επίπεδα της TAC στον νεφρικό ιστό



Διάγραμμα 15: Επίπεδα της TAC στον νεφρικό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 19).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grape pomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 19).

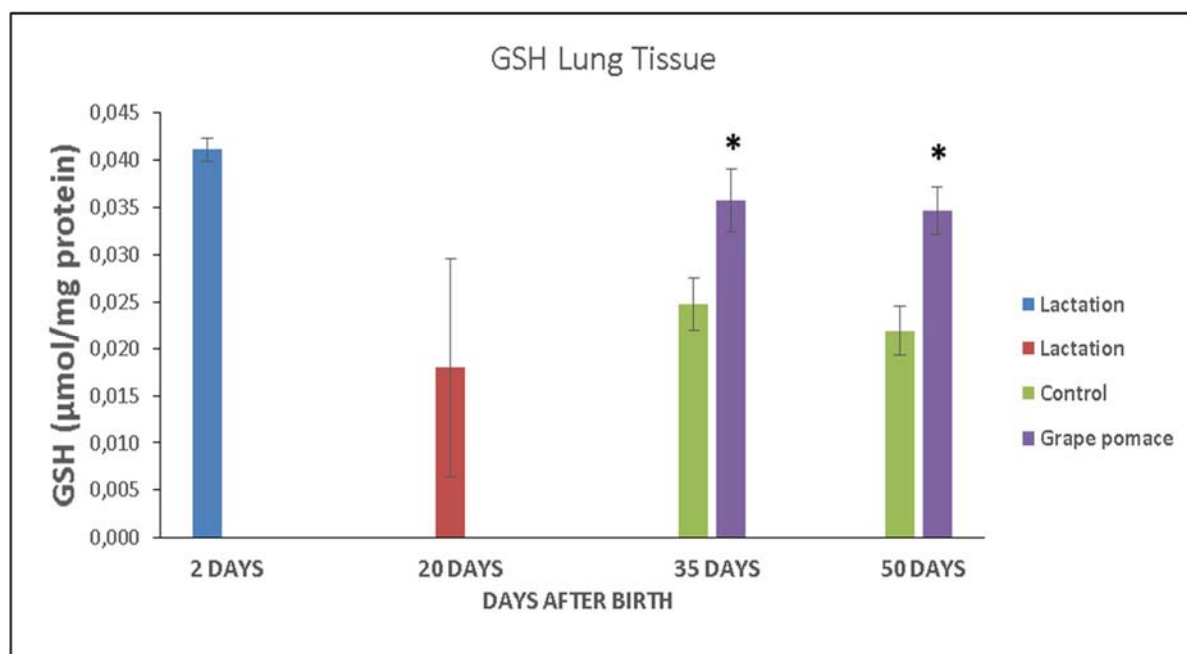
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 15, στις 35 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της TAC, ενώ στις 50 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική αύξηση (54,45%) ($p < 0,05$)** των επιπέδων της TAC από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα (πίνακας 19).

Πίνακας 19: Επίπεδα της TAC στον νεφρικό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

TAC (mmol DPPH/mg protein) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,871 \pm 0,1034	0,674 \pm 0,0592
Grape pomace	0,803 \pm 0,1016	1,041 \pm 0,511

4.3.6 Επίπεδα Γλουταθειόνης στον πνευμονικό ιστό



Διάγραμμα 16: Επίπεδα της γλουταθειόνης στον πνευμονικό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της GSH ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 20).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grape pomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της GSH ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 20).

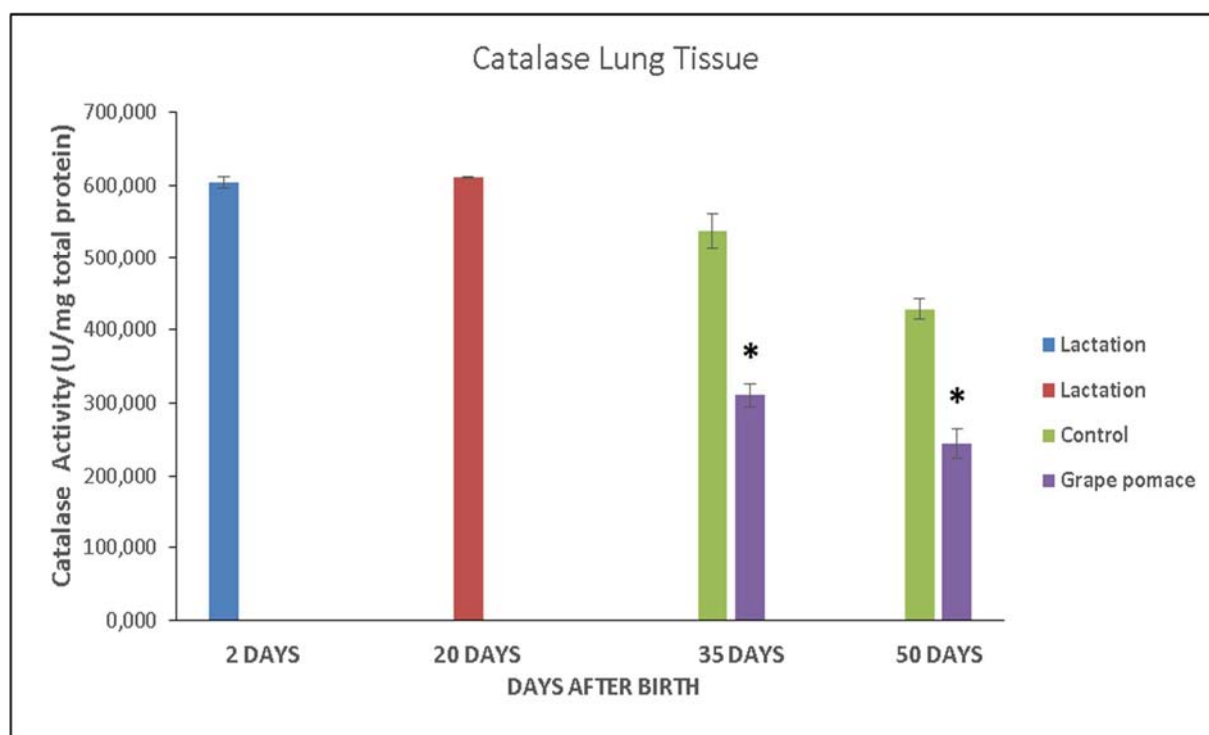
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 16, στις 35 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική αύξηση (44%)** ($p<0,05$) των επιπέδων της GSH από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα. Στις 50 μέρες, παρατηρείται στατιστικώς **σημαντική αύξηση (59,09%)** ($p<0,05$) των επιπέδων της GSH της πολυφαινολικής ομάδας (πίνακας 20).

Πίνακας 20: Επίπεδα της GSH στον πνευμονικό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

GSH ($\mu\text{mol/mg protein}$) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,025 \pm 0,003	0,022 \pm 0,003
Grape pomace	0,036 \pm 0,003	0,035 \pm 0,002

4.3.7 Επίπεδα Καταλάσης στον πνευμονικό ιστό



Διάγραμμα 17: Επίπεδα της καταλάσης στον πνευμονικό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση στα επίπεδα της CAT ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grape pomace)

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση στα επίπεδα της CAT ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 21).

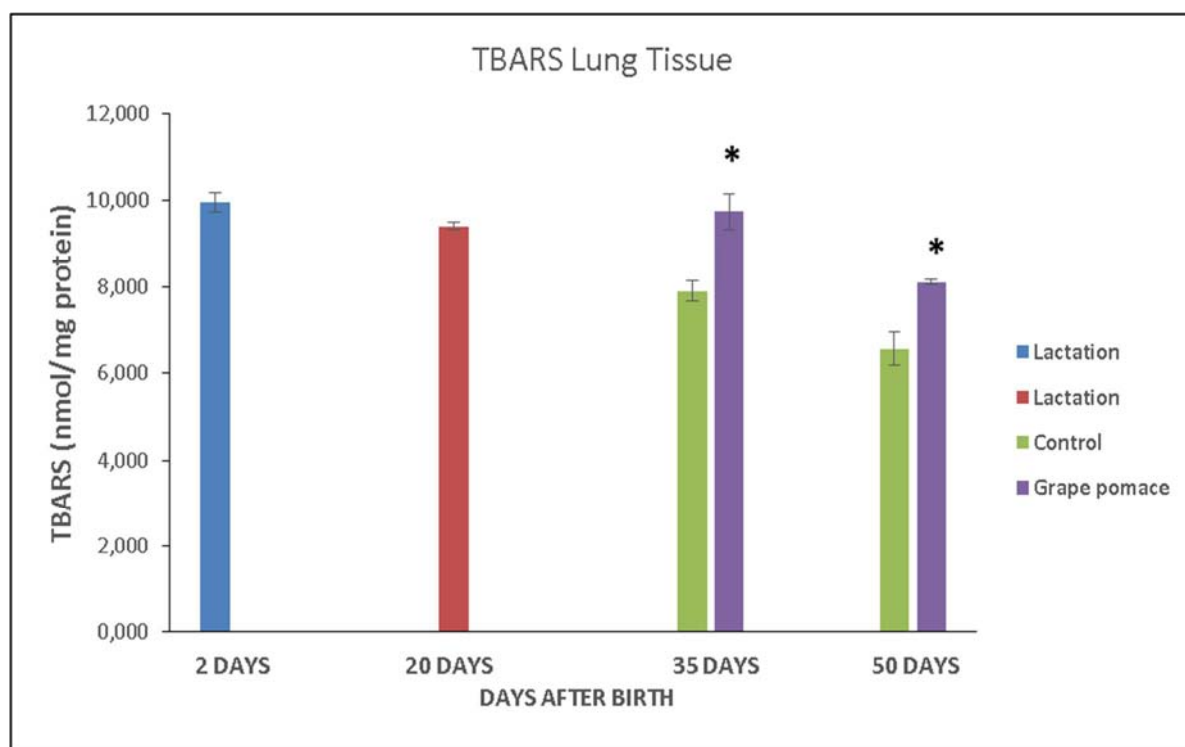
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 17, στις 35 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική μείωση (42,24%) ($p < 0,05$)** των επιπέδων της GSH από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα. Στις 50 μέρες, παρατηρείται στατιστικώς **σημαντική μείωση (43,03) ($p < 0,05$)** των επιπέδων της GSH της πολυφαινολικής ομάδας (πίνακας 20).

Πίνακας 21: Επίπεδα της CAT στον πνευμονικό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

CAT (U/mg Protein) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	537,9 \pm 23,5	428,9 \pm 13,73
Grape pomace	310,57 \pm 15,53	243,97 \pm 19,74

4.3.8 Επίπεδα των TBARS στον πνευμονικό ιστό.



Διάγραμμα 18: Επίπεδα της TBARS στον πνευμονικό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 22).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grape pomace)

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 22).

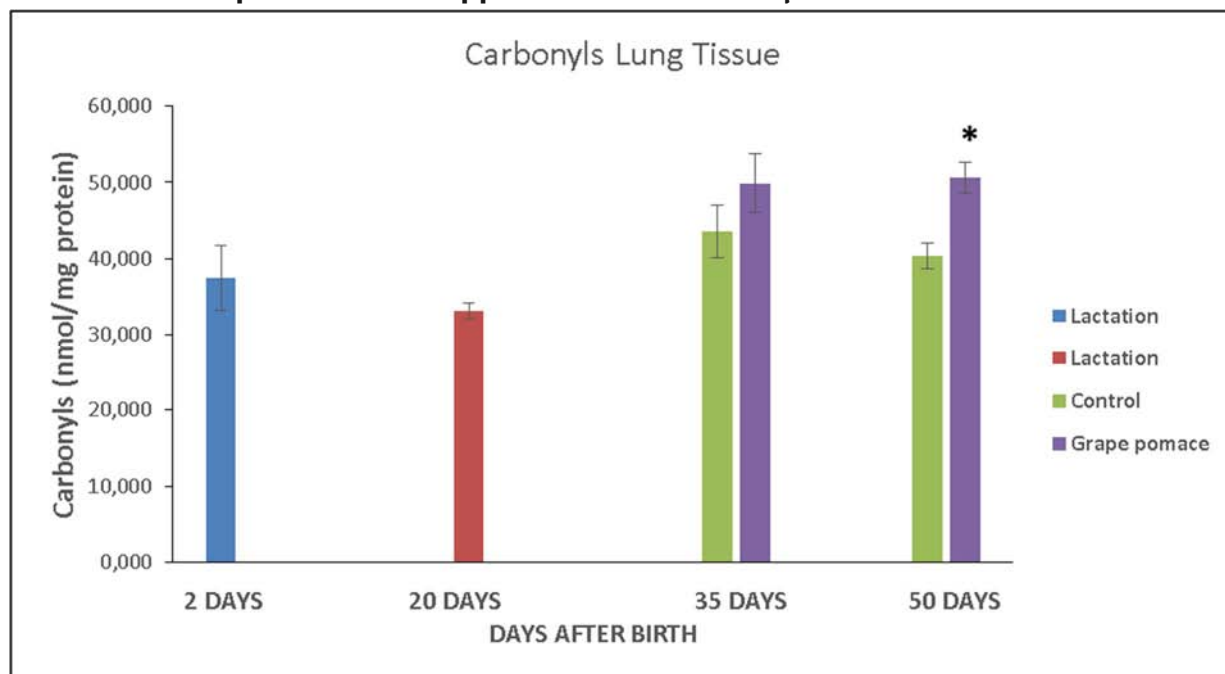
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 18, στις 35 ημέρες και στις 50 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική αύξηση (23,36%) ($p<0,05$) και (23,56%) ($p<0,05$)** στα επίπεδα των TBARS από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα.(πίνακας 22).

Πίνακας 22: Επίπεδα των TBARS στον πνευμονικό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

TBARS (nmol/mg protein) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	7,902 \pm 0,24	6,561 \pm 0,382
Grape pomace	9,748 \pm 0,416	8,107 \pm 0,06

4.3.9 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον πνευμονικό ιστό



Διάγραμμα 19: Επίπεδα της πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον πνευμονικό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 23).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grape pomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 23).

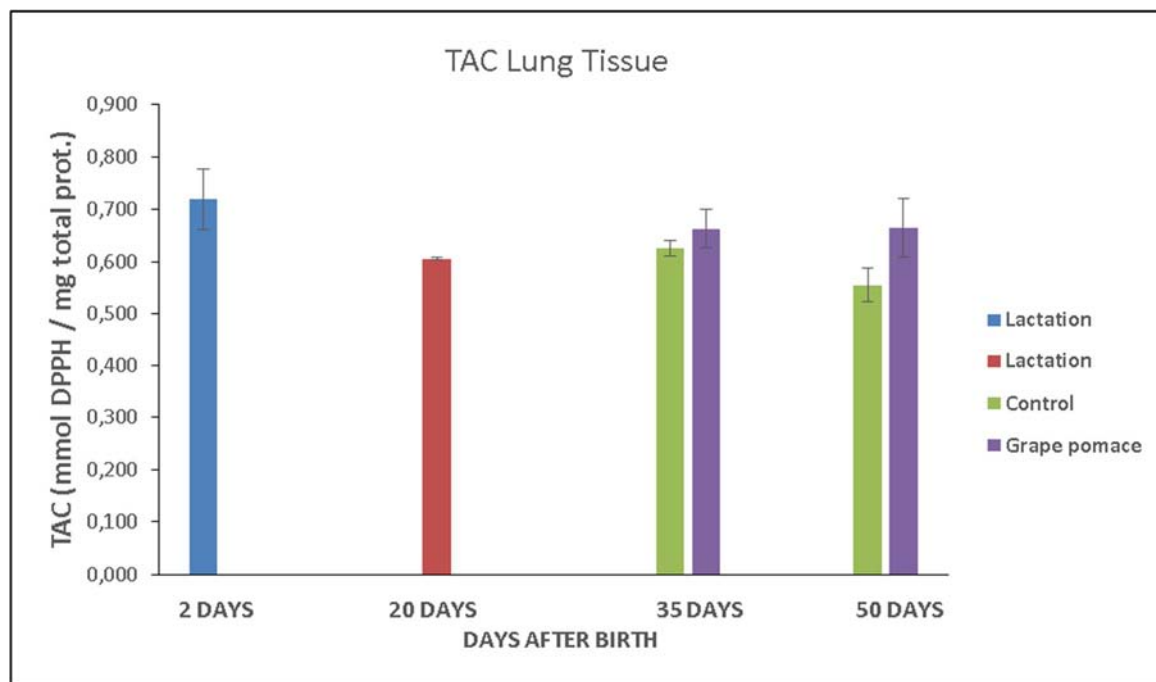
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 19, δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στις 35 ημέρες ενώ στις 50 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική αύξηση (25,58%) ($p < 0,05$)** στα επίπεδα των TBARS της πολυφαινολικής ομάδας (πίνακας 22). (πίνακας 23).

Πίνακας 23: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον καρδιακό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

CARB (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	43,568±3,41	40,356±1,65
Grape pomace	49,859±3,867	50,68±1,97

4.3.10 Επίπεδα της TAC στον πνευμονικό ιστό



Διάγραμμα 20: Επίπεδα της TAC στον πνευμονικό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 24).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grape pomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 24).

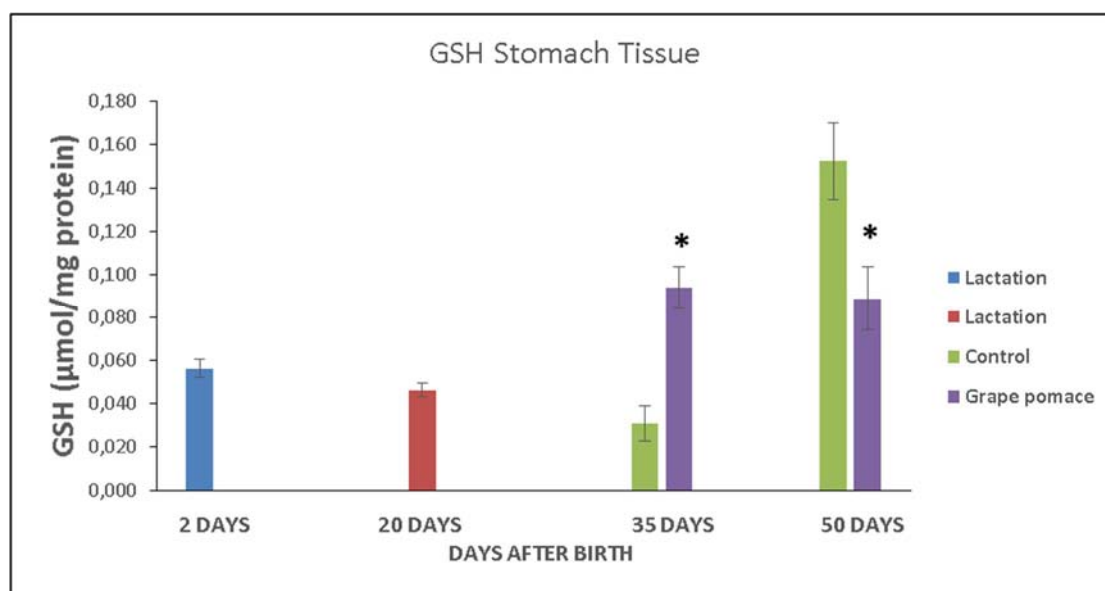
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 20, δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της TAC τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες (πίνακας 24).

Πίνακας 24: Επίπεδα της TAC στον πνευμονικό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

TAC (mmol DPPH/mg protein) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,625 \pm 0,015	0,555 \pm 0,03
Grape pomace	0,663 \pm 0,03	0,665 \pm 0,05

4.3.11 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH) στον στομαχικό ιστό



Διάγραμμα 21: Επίπεδα της γλουταθειόνης στον στομαχικό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση στα επίπεδα της GSH ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 15).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grape pomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της GSH ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 15).

- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

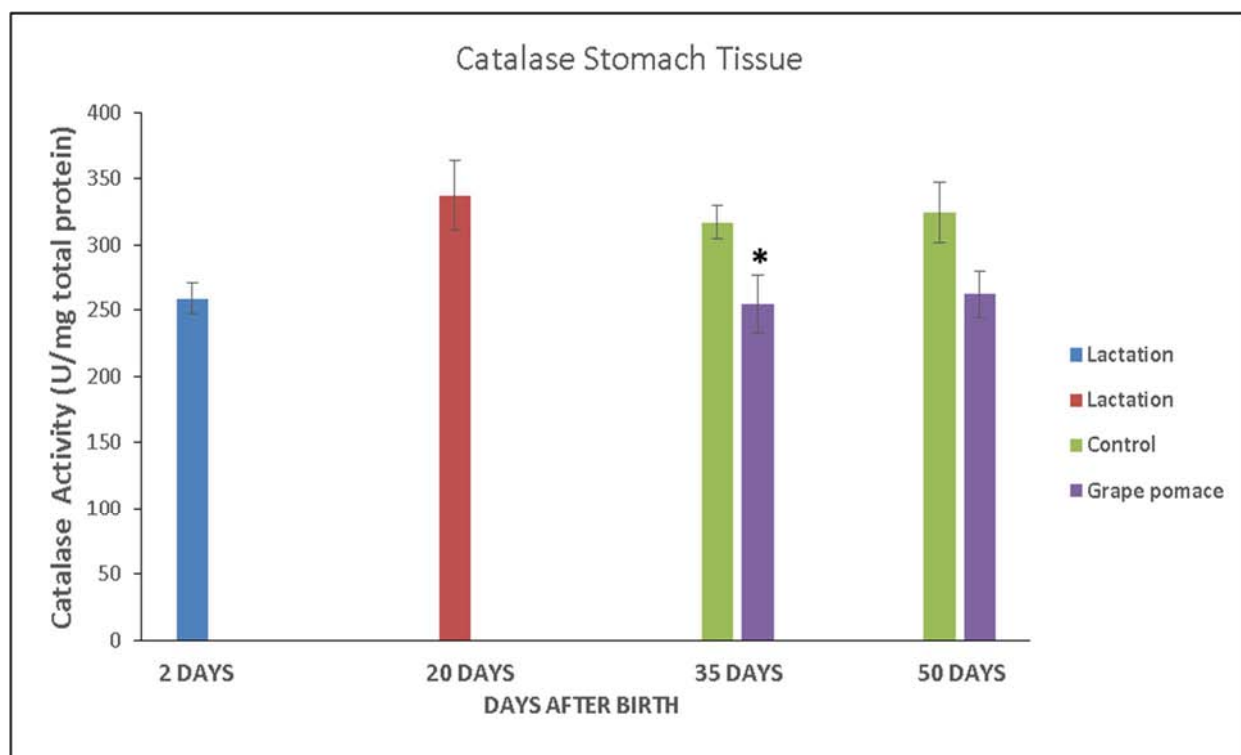
Σύμφωνα με το διάγραμμα 21, στις 35 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική αύξηση (203,3%) ($p < 0,01$)** των επιπέδων της GSH από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα, ενώ στις 50 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς**

σημαντική μείωση (41,83%) ($p<0,01$) των επιπέδων της GSH από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα, (πίνακας 15).

Πίνακας 25: Επίπεδα της GSH στον στομαχικό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

GSH ($\mu\text{mol/mg protein}$) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,031 \pm 0,008	0,153 \pm 0,018
Grape pomace	0,09 \pm 0,009	0,089 \pm 0,015

4.3.12 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στον στομαχικό ιστό



Διάγραμμα 22: Επίπεδα της καταλάσης στον στομαχικό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της CAT ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 16).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grape pomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της CAT ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 16).

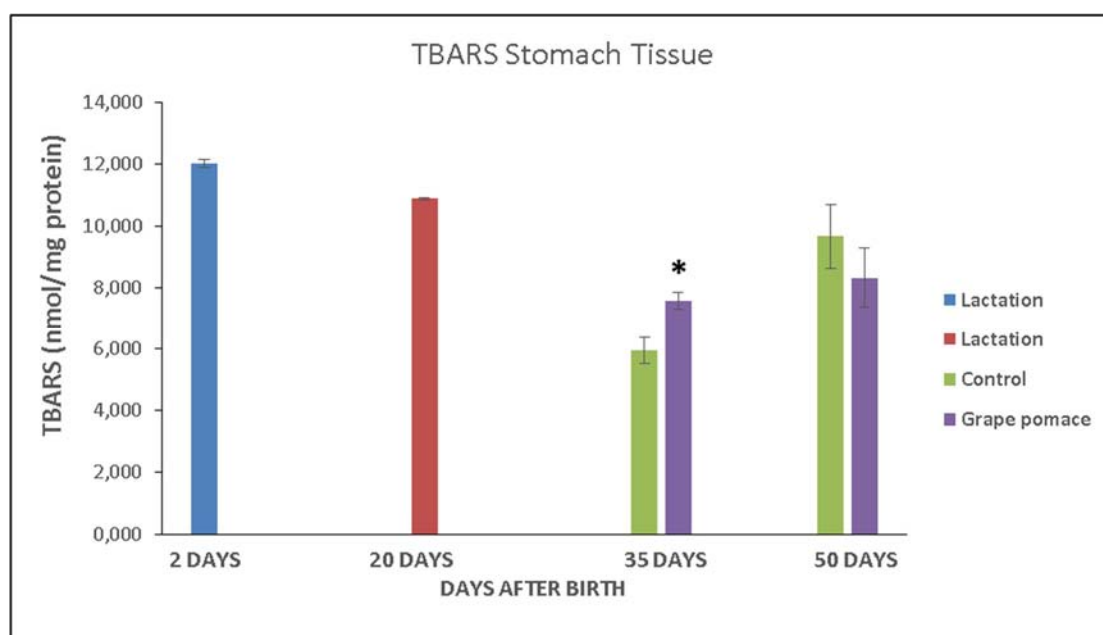
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 2, στις 35 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική μείωση (19,70%) ($p < 0.05$)** στα επίπεδα της CAT από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα ενώ στις 50 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά των επιπέδων της CAT από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα (πίνακας 16).

Πίνακας 26: Επίπεδα της CAT στον στομαχικό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

CAT (U/mg Protein) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	317,011 \pm 12.533	324,21 \pm 23.088
Grape pomace	254,551 \pm 21.574	261,822 \pm 17.619

4.3.13 Επίπεδα των TBARS στον στομαχικό ιστό



Διάγραμμα 23: Επίπεδα της TBARS στον στομαχικό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική αύξηση** στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 17).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grape pomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 17).

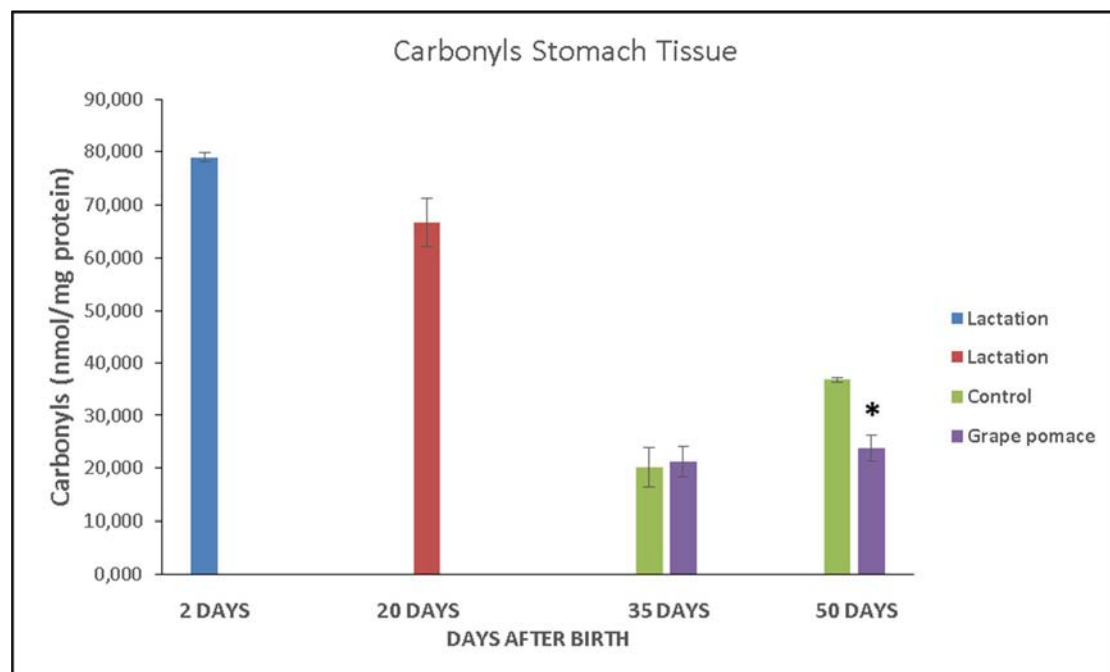
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 23, στις 35 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική αύξηση (27,71%) ($p < 0,05$)** των επιπέδων της CAT από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα ενώ στις 50 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα των TBARS (πίνακας 17).

Πίνακας 27: Επίπεδα των TBARS στον στομαχικό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

TBARS (nmol/mg protein) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	5,947 \pm 0,434	9,679 \pm 1,04
Grape pomace	7,595 \pm 0,279	8,338 \pm 0,955

4.3.14 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον στομαχικό ιστό



Διάγραμμα 24: Επίπεδα της πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον στομαχικό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση στα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 18).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grape pomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 18).

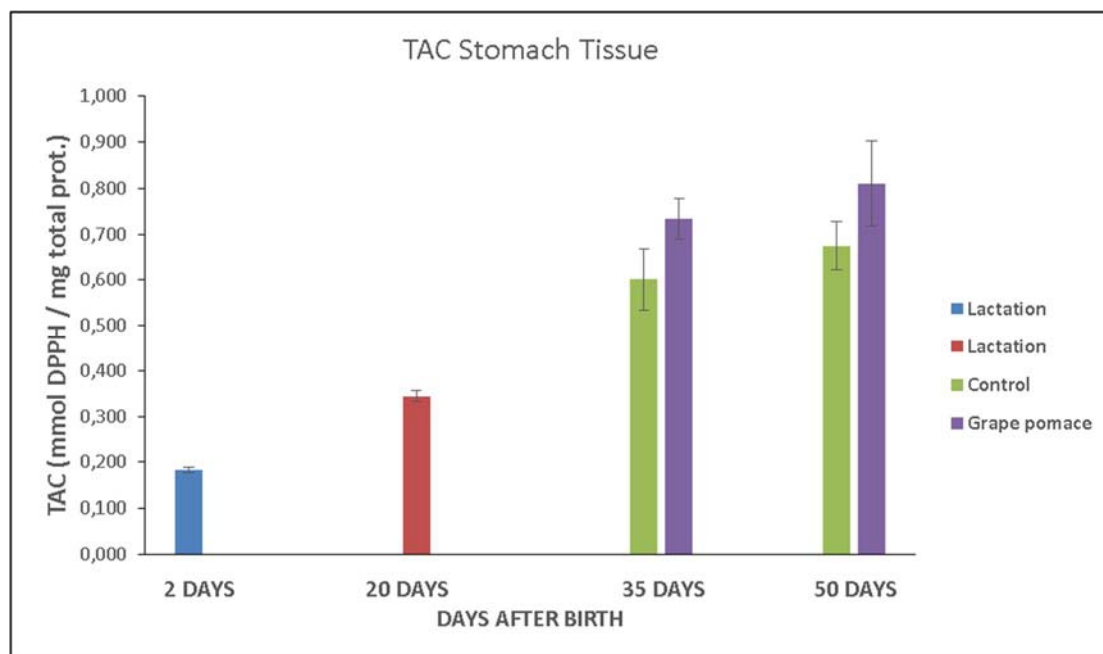
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 24, στις 35 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ενώ στις 50 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική μείωση (35,36%) ($p < 0,05$)** των επιπέδων της CAT από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα (πίνακας 18).

Πίνακας 28: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον στομαχικό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

CARB (nmol/mg protein) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	20,113 \pm 3,745	36,731 \pm 0,447
Grape pomace	21,248 \pm 2,831	23,742 \pm 2,426

4.3.15 Επίπεδα της TAC στον στομαχικό ιστό



Διάγραμμα 25: Επίπεδα της TAC στον στομαχικό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 19).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grape pomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 19).

- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 25, τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της TAC, από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα (πίνακας 19)

TAC (mmol DPPH/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,601±0,0672	0,674±0,053
Grape pomace	0,734±0,043	0,810±0,09

Πίνακας 29: Επίπεδα της TAC στον στομαχικό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

4.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στους ιστούς (νεφρός, πνεύμονας, στόμαχος) των χοίρων

Πίνακας 30: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στο νεφρό.

	ΝΕΦΡΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ				
	GSH	CATALASE	TBARS	CARBONYLS	TAC
Control					
Grape pomace	35 DAYS: NS 50 DAYS: +80,51%	35 DAYS: +28,29% 50 DAYS: +29,94%	35 DAYS: -33,42% 50 DAYS: NS	35 DAYS: NS 50 DAYS: NS	35 DAYS: NS 50 DAYS: +54,45%

Πίνακας 26: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στον πνεύμονα

	ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ				
	GSH	CATALASE	TBARS	CARBONYLS	TAC
Control					
Grape pomace	35 DAYS: +44% 50 DAYS: +59,09%	35 DAYS: -42,24% 50 DAYS: -43,03%	35 DAYS: +23,36% 50 DAYS: +23,55%	35 DAYS: NS 50 DAYS: +25,58%	35 DAYS: NS 50 DAYS: NS

Πίνακας 31: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στον στόμαχο

	ΣΤΟΜΑΧΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ				
	GSH	CATALASE	TBARS	CARBONYLS	TAC
Control					
Grape pomace	35 DAYS: +203,2% 50 DAYS: -41,83%	35 DAYS: -19,70% 50 DAYS: NS	35 DAYS: +27,71% 50 DAYS: NS	35 DAYS: NS 50 DAYS: -35,36%	35 DAYS: NS 50 DAYS: NS

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση νεαρών χοιριδίων κρεατοπαραγωγής, τα οποία ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκαν εκτρέφονταν με διαφορετικό σιτηρέσιο. Από τη μία πλευρά, είχαμε την ομάδα ελέγχου, δηλαδή χοιρίδια τα οποία τρέφονταν με το βασικό σιτηρέσιο και από την άλλη πλευρά την ομάδα στέμφυλα, δηλαδή χοιρίδια τα οποία τρέφονταν με σιτηρέσιο που περιελάμβανε πολυφαινολικά πρόσθετα από στέμφυλα. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν είκοσι οκτώ (28) χοιρίδια, στα οποία έγιναν τέσσερις (4) ιστοληψίες σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της ανάπτυξής τους, δηλαδή, στις δύο (2), είκοσι (20), τριάντα πέντε (35) και πενήντα (50) ημέρες μετά τη γέννησή τους. Πιο συγκεκριμένα, μέχρι και τις είκοσι (20) ημέρες από τη γέννησή τους, τα χοιρίδια τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα. Από εκείνη την ημέρα και μέχρι την τριακοστή πέμπτη (35) ημέρα, τρέφονταν τόσο με το μητρικό γάλα όσο και με το πειραματικό σιτηρέσιο απογαλακτισμού. Τέλος, ο πλήρης απογαλακτισμός πραγματοποιήθηκε από την τριακοστή πέμπτη (35) μέρα μέχρι και την πεντηκοστή (50) μέρα.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των δεικτών οξειδωτικού στρες στους ιστούς (νεφρικός, πνευμονικός, στομαχικός) των νεαρών χοιριδίων. Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστικότητα της καταλάσης (CAT), 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. Παράλληλα, διεξήχθη εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιολειτουργικών ζωοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή τόσο του βασικού σιτηρέσιου της ομάδας control όσο και του σιτηρέσιου της ομάδας στέμφυλα. Γι' αυτό το λόγο, προσδιορίστηκε η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ρίζες ABTS και DPPH, ενώ έγινε και συσχετισμός (κατά Spearman) μεταξύ των δύο ζωοτροφών. Κατά συνέπεια, δόθηκε η ευκαιρία για εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική κατάσταση των χοιριδίων σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια, μέσω της σύγκρισης των τιμών των προαναφερθέντων δεικτών είτε μεταξύ των ζώων της ομάδας ελέγχου και της πολυφαινολικής ομάδας είτε ξεχωριστά για κάθε ομάδα.

Οι συγκεκριμένοι δείκτες μελετήθηκαν, διότι 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 προσλαμβάνόμενα μέσω της διατροφής αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E στις ανηγμένες (ενεργές) μορφές τους (Scholz *et al.*, 1964) (Hughes *et al.*, 1989), και ρυθμίζει τον κύκλο του μονοξειδίου του αζώτου που είναι κρίσιμος για τη ζωή (Clementi *et al.*, 1999). Επίσης, επιδρά σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις όπως η σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, η πρωτεϊνοσύνθεση, η σύνθεση προσταγλανδίνης, η μεταφορά αμινοξέων και η ενεργοποίηση ενζύμων. Σημαντική 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 (GST) στο κυτταρόπλασμα, στα μικροσώματα και στα μιτοχόνδρια. Είναι επίσης ικανή να συμμετέχει σε μη ενζυματικές συζευκτικές αντιδράσεις με κάποιες ουσίες. Αξιολογώντας, λοιπόν, τα αποτελέσματα του ελέγχου της ανηγμένης γλουταθειόνης, τα επίπεδά της στις 35 ημέρες, βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα στον πνευμονικό και στομαχικό ιστό στην ομάδα στέμφυλα σε σχέση με την ομάδα control, ενώ στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της GSH στον νεφρικό και πνευμονικό ιστό αντίστοιχα. Αντιθέτως, στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της GSH στον στομαχικό ιστό των χοιριδίων της ομάδας στέμφυλα σε σχέση με την ομάδα control. Επομένως, στον νεφρό και στον πνεύμονα φαίνεται ότι η συγκέντρωση της GSH αυξάνεται σε συνάρτηση με το χρόνο από τη στιγμή που χορηγήθηκε στα ζώα το σιτηρέσιο που ήταν εμπλουτισμένο με ενσίρωμα στεμφύλων οινοποιίας, κάτι που υποδηλώνει ότι ίσως οι φαινολικές ενώσεις των στεμφύλων επιδρούν στη αύξηση των κύριων ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της GSH. Αυτά τα ένζυμα είναι η λιγάση της γ-γλουταμινοκυστεΐνης (GCL) και η 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). Στον στομαχικό ιστό, φαίνεται να μην συμβαίνει το ίδιο αποτέλεσμα καθώς στις 35 ημέρες τα επίπεδα της GSH αυξάνονται στατιστικά σημαντικά αλλά στην συνέχεια στις 50 ημέρες παρατηρείται στατιστικώς σημαντική

μείωση. Αυτό οφείλεται ίσως στο γεγονός ότι στον στομαχικό ιστό καταναλώθηκε σημαντική ποσότητα GSH καθώς παρατηρείται ότι στις 50 ημέρες τα επίπεδα των TBARS και πρωτεϊνικών καρβονυλίων μειώνονται με αποτέλεσμα η ποσότητα της GSH που έχει καταναλωθεί να παρέχει προστασία από την οξείδωση των λιπιδίων και πρωτεϊνών. Επίσης, αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι στις 35 ημέρες τα επίπεδα της GSH στο στομάχι στα ζώα μάρτυρες είναι χαμηλά, οπότε σε αυτή την ηλικία είναι απαραίτητη η αύξηση της GSH από την πειραματική ζωοτροφή. Ωστόσο, τα ζώα των 50 ημερών από μόνα τους παράγουν πλέον υψηλά επίπεδα GSH στο στομάχι και έτσι στην περίπτωση αυτή δεν είναι αναγκαίο να ενεργοποιηθούν οι μηχανισμοί αύξησης της GSH από την πειραματική ζωοτροφή. Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες όπου στη ζωοτροφή είχαν ενσωματωθεί πολυφαινόλες από απόβλητα ελαιοτριβείου και έγινε χορήγηση σε κοτόπουλα αλλά και σε χοίρους (Gerasopoulos *et al.*, 2015). Επίσης, και άλλες έρευνες συνηγορούν στη σημασία της GSH πάνω στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων στεμφύλων (GPE), τα οποία βρέθηκε ότι επάγουν την αύξηση της δραστηριότητας της GST. Η GST επάγεται υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες και εμπλέκεται στην αποτοξίνωση των οργανικών εποξειδίων, των υδροϋπεροξειδίων και των ακόρεστων αλδεϋδων που σχηματίζονται μετά από την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Ο ρόλος της είναι να αποτοξινώνει τα προϊόντα αυτά μέσω της σύζευξής τους με την GSH (Goutzourelas *et al.* 2015). Σε παρόμοιες εργασίες που έχουν διεξαχθεί στα χοιρίδια κρεατοπαραγωγής, η χορήγηση πολυφαινολών από υποπροϊόντα ελαιουργείων, είχε ως αποτέλεσμα, η GSH να παρουσιάσει 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 *et al.* 2015).

Όσον αφορά την αξιολόγηση από τις μετρήσεις για τη δραστηριότητα της **καταλάσης**, στις 35 ημέρες παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξησή της, στα χοιρίδια της ομάδας στέμφυλα σε σχέση με την ομάδα control, στον νεφρικό ιστό, ενώ στον πνευμονικό και στομαχικό ιστό παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση. Ο νεφρός σαν όργανο είναι πλούσιο στο ένζυμο της καταλάσης (Zhou *et al.*, 2000) και τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα στέμφυλα που είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις ενεργοποιούν τον μηχανισμό της καταλάσης επιδρώντας στην δραστηριότητα του ενζύμου. Μελέτες σε αρουραίους και στον άνθρωπο, έχουν δείξει ότι η ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη ενισχύουν τους μηχανισμούς της καταλάσης

στους νεφρούς αυξάνοντας της δραστηριότητά της (Oliboni et al., 2011) (Lo Presti et al., 2007). Η μείωση της καταλάσης στον πνευμονικό και στομαχικό ιστό στις 35 ημέρες ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι στους προαναφερθέντες ιστούς, οι φαινολικές ενώσεις των στεμφύλων ενεργοποιούν κυρίως τον μηχανισμό της GSH και όχι το μηχανισμό της καταλάσης. Επιπλέον, στις 50 ημέρες παρατηρείται ακριβώς το ίδιο πρότυπο δηλαδή αύξηση της δραστηριότητας της CAT στον νεφρικό ιστό, ενώ στον πνευμονικό ιστό παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση στα χοιρίδια της ομάδας στέμφυλα σε σχέση με την ομάδα control. Η πιο λογική εξήγηση είναι ότι άλλα ενδογενή αντιοξειδωτικά όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα μας (GSH), είναι σε αυξημένα επίπεδα με αποτέλεσμα να μην υπάρχει τόσο μεγάλη ανάγκη σε καταλάση στον πνευμονικό ιστό. Σε ανάλογη μελέτη σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Goutzourelas *et al.* 2015), φάνηκε ότι η χορήγηση εκχυλισμάτων σπόρων σταφυλιού (GPE), δεν ασκεί αντιοξειδωτική δράση μέσω της ρύθμισης των αντιοξειδωτικών ενζύμων CAT, SOD και HO-1. Ειδικότερα, σε αυτή τη μελέτη η χορήγηση GPE μείωσε την έκφραση και τη δραστηριότητα του ενζύμου της καταλάσης.

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-ισοπροσάνια) προϊόντων της υπεροξείδωσης. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα σχετικά με τα επίπεδα των **TBARS** στα χοιρίδια της πολυφαινολικής ομάδας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, βλέπουμε ότι στις 35 ημέρες ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένα, στον νεφρικό ιστό, ενώ στον πνευμονικό και στομαχικό ιστό ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα. Στον νεφρικό ιστό φαίνεται ότι η αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης στις 35 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των TBARS. Ωστόσο, στον στομαχικό ιστό αν και παρατηρήσαμε αύξηση της GSH στις 35 ημέρες, υπήρξε αύξηση στην οξείδωση των λιπιδίων στα ζώα που έλαβαν την πειραματική ζωοτροφή σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες. Στις 50 ημέρες διατηρούνται τα αυξημένα επίπεδα των TBARS στον πνευμονικό ιστό στα ζώα που έλαβαν την πειραματική ζωοτροφή σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες. Παρατηρούμε δηλαδή ότι υπάρχει μία ιστοεξειδίκευση όσον αφορά την επίδραση της πειραματικής ζωοτροφής στην υπεροξείδωση των λιπιδίων, γεγονός που απαιτεί περαιτέρω έρευνα για να διερευνηθεί σε ποιους διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς μεταξύ των ιστών οφείλονται αυτές οι διαφορές. Σε παρόμοια μελέτη, στην οποία έγινε χορήγηση επεξεργασμένων υγρών

αποβλήτων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) σε χοιρίδια, μειώθηκε η υπεροξειδωση των λιπιδίων σε όλους τους ιστούς και το αίμα (Gerasopoulos *et al.* 2015), γεγονός που επιβεβαιώνει τις ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινόλων είτε βρίσκονται στα ΥΑΕ είτε στα στέμφυλα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η υπεροξειδωση των λιπιδίων αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες της υποβάθμισης της ποιότητας του κρέατος, καθώς και στην παραγωγή διάφορων τοξικών ενώσεων (Rey *et al.* 2001). Ειδικότερα, η οξειδωση των λιπιδίων οδηγεί στην αλλοίωση της γεύσης και τη μείωση της διατροφικής αξίας του κρέατος και των προϊόντων του (Nam & Ahn 2003). Έτσι, 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 (Arshad *et al.* 2013).

Όσον αφορά την ολική **αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)**, αυτή αναφέρεται στα αναγωγικά στοιχεία και στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, φαίνεται ότι στις 50 ημέρες τα επίπεδα της TAC παρουσιάζονται στατιστικώς σημαντικά αυξημένα στον νεφρικό ιστό της ομάδας στέμφυλα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Στους υπόλοιπους ιστούς τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες τα επίπεδα της TAC παρουσιάζονται αυξημένα χωρίς οι διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικά. Αυτό υποδηλώνει ότι οι πολυφαινόλες που εμπεριέχονται στα στέμφυλα οινοποιίας, ενεργοποιούν τους μηχανισμούς της αντιοξειδωτικής άμυνας με την παραγωγή αντιοξειδωτικών μορίων.

Τέλος, όσον αφορά τη μέτρηση των **πρωτεϊνικών καρβονυλίων**, που υποδηλώνει το ποσοστό οξειδωσης που έχουν υποστεί οι πρωτεΐνες των ιστών εξαιτίας της δράσης των ελεύθερων ριζών, στις 50 ημέρες παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση στον πνευμονικό ιστό των χοιριδίων της ομάδας στέμφυλα σε σχέση με την ομάδα control, ενώ στον στομαχικό ιστό παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση. Δηλαδή, στον στομαχικό ιστό παρατηρούμε ότι η επίδραση των στέμφυλων είναι ευεργετική καθώς μειώνεται η οξειδωση των πρωτεϊνών. Ωστόσο, και σε αυτόν το δείκτη, όπως αναφέρθηκε και για τα TBARS, παρατηρούμε μία ιστοεξειδίκευση όσον αφορά την επίδραση της πειραματικής ζωοτροφής, γεγονός όμως που απαιτεί περαιτέρω έρευνα για να διερευνηθεί σε ποιους διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς μεταξύ των ιστών οφείλονται αυτές οι διαφορές. Σε παρόμοια μελέτη, στην οποία έγινε χορήγηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) σε χοιρίδια, μειώθηκε η υπεροξειδωση των πρωτεϊνών σε όλους

τους ιστούς (Gerasopoulos *et al.* 2015), γεγονός που επιβεβαιώνει τις ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινολών είτε βρίσκονται στα ΥΑΕ είτε στα στέμφυλα. Είναι γνωστό ότι οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν μια μη αναστρέψιμη μορφή τροποποίησης πρωτεϊνών που έχει αποδεχθεί πως είναι πολύ σταθερές, σε αντίθεση με τα προϊόντα της υπεροξειδωσής των λιπιδίων που εξουδετερώνονται μέσα σε λίγα λεπτά. Ο σχηματισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων λαμβάνει χώρα πολύ γρήγορα, χωρίς να είναι το αποτέλεσμα συγκεκριμένης δράσης οξειδωτικού και έτσι μπορεί να χαρακτηριστεί ως δείκτης συνολικής οξειδωσής των πρωτεϊνών. Γενικώς, μελέτες έχουν δείξει ότι η οξείδωση των πρωτεϊνών από τις ROS συντελεί στην απώλεια των απαραίτητων αμινοξέων (π.χ. τρυπτοφάνη) και επηρεάζει την ικανότητα συγκράτησης του νερού από τις πρωτεΐνες του κρέατος, το χρώμα και την υφή των επεξεργασμένων προϊόντων του κρέατος, γεγονός που οδηγεί στην μείωση της θρεπτικής τους αξίας (Villaverde *et al.* 2014; Lund *et al.* 2011).

Αξιο αναφοράς αποτελεί το γεγονός ότι στο διάστημα από τις 2 ημέρες έως τις 20 ημέρες παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα TBARS και πρωτεϊνικών καρβονυλίων ενώ τα επίπεδα GSH, CAT και TAC είναι μειωμένα. Υπενθυμίζεται ότι κατά το συγκεκριμένο διάστημα τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα. Συνεπώς, όσο μικρότερη είναι η ηλικία των χοίρων τόσο μεγαλύτερη είναι και η επιβάρυνση που υφίστανται από το οξειδωτικό στρες, για αυτό και βλέπουμε τις μεταβολές στους παραπάνω δείκτες, οι οποίοι επάγονται λόγω απόκρισης στο οξειδωτικό στρες. Αυτό τονίζει τη σημασία της χορήγησης ζωτροφής εμπλουτισμένης με αντιοξειδωτικές ουσίες ιδιαίτερα στους χοίρους νεαρής ηλικίας. Επίσης, ήταν ιδιαίτερα σημαντικό ότι και ο ρυθμός αύξησης του βάρους των ζώων ήταν μεγαλύτερος στα ζώα που έλαβαν την πειραματική ζωτροφή σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες. Αυτό δείχνει ότι η ζωτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με στέμφυλα βελτιώνει όχι μόνο την αντιοξειδωτική ικανότητα των χοίρων αλλά και την παραγωγικότητά τους.

Συνοψίζοντας, από την παρούσα πτυχιακή εργασία καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η εισαγωγή των παραγόμενων βιολειτουργικών ζωοτροφών, δηλαδή του σιτηρέσιου που είναι εμπλουτισμένο με στέμφυλα, στην καθημερινή διατροφή των χοιριδίων κατά την περίοδο του απογαλακτισμού τους, βοηθάει σημαντικά στη βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών που ελέγχθηκαν (νεφρικός, πνευμονικός, στομαχικός). Αυτή η ευεργετική επίδραση των εκχυλισμάτων από στέμφυλα βασίζεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, ουριδίνη, γενιστεΐνη, γενιστίνη, τυροσόλη, γαλλικό οξύ,

πρωτοκατεχοϊκό οξύ, συριγκικό οξύ, π-μεθοξικουμαρικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, τρυγικό οξύ). Ως λογικό επακόλουθο ενισχύεται η δράση όσον αφορά την αντιμετώπιση ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες στα παραγωγικά ζώα και γενικότερα στην βελτιστοποίηση της ευζωίας τους. Αυτό συμβαίνει, διότι οι συγκεκριμένες ζωοτροφές αποδείχτηκε ότι μειώνουν την οξειδωτική βλάβη των βιολογικών μορίων (δηλαδή την οξείδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών) και ότι αυξάνουν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (τη δραστικότητα της καταλάσης, τα επίπεδα της γλουταθειόνης και της TAC). Ωστόσο, οι συγκεκριμένες παρατηρήσεις θα πρέπει να συνεκτιμηθούν με το γεγονός ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα των δεικτών του οξειδωτικού στρες, όπως συνθήκες εκτροφής. Εν κατακλείδι, το συγκεκριμένο πολυφαινολικό σιτηρέσιο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα και σε άλλα οικότροφα ζώα ή ακόμα και στην ανθρώπινη διατροφή. Ο ρόλος του θα ήταν διπλός, καθώς έτσι θα αποφεύγονται και τα οικολογικά προβλήματα που προκαλούνται από την εναπόθεση των στεμφύλων στο περιβάλλον. Βέβαια, είναι αναγκαίο στο εγγύς μέλλον να πραγματοποιηθούν και άλλες τέτοιου είδους μελέτες και σε άλλα ζώα που θα εδραιώσουν τις προαναφερθείσες ευργετικές ιδιότητες των στεμφύλων, ενώ παράλληλα κρίνεται απαραίτητο να διεξαχθούν πειράματα και να μελετηθεί η έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για αντιοξειδωτικά ένζυμα καθώς επίσης να μελετηθούν ένζυμα που συμμετέχουν σε διάφορα μονοπάτια (αναγωγή και υπεροξειδάση της GSH). Τέλος, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί δειγματοληψία κοπράνων ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση των πολυφαινολών στην υγεία του εντέρου, καθώς και προσδιορισμός του προφίλ των λιπαρών οξέων του κρέατος (μέθοδος HPLC-MS) για να εξαγάγουμε συμπεράσματα της επίδρασής τους στην ποιότητα του κρέατος.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A. King, G. Young, Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals, Journal of American Dietetic Association, 1999.
- A. Scalbert, Antimicrobial properties of tannins, Phytochemistry, 1991
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, pp.121–126.
- Anna-Karin Welin, Mats Sandberg, Anna Lindblom, Pernilla Arvidsson, Ulf A Nilsson, Ingemar Kjellmer and Carina Mallard, White Matter Injury Following Prolonged Free Radical Formation in the 0.65 Gestation Fetal Sheep Brain, 2005
- Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, Trizoglou I, Wallace Hayes A, Tsatsakis A.M, Kouretas D. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of Vitis vinifera stem extracts Food and Chemical Toxicology. 61: 60–68, 2013.
- Apostolou, A. *et al.*, 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: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 61, pp.60–68
- Aquilano, K., Baldelli, S. & Ciriolo, M.R., 2014. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in pharmacology*, 5, p.196.
- Arnous, A & Meyer, AS, Grape skins (Vitis vinifera L.) catalyze the in vitro enzymatic hydroxylation of p-coumaric acid to caffeic acid' Biotechnology Letters, 2009.
- Arshad, M.S. *et al.*, 2013. Wheat germ oil enrichment in broiler feed with alpha-lipoic acid to enhance the antioxidant potential and lipid stability of meat. *Lipids in health and disease*, 12, p.164.
- 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 biochemistry and biophysics*, 55(1), pp.1–23.
- Benhar M., Dalyot I., Engelberg D. and Levitzki A., Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. Mol. Cell Biol., 2001.
- Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL., A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western Australia, 1946.
- Bhat KP¹, Pezzuto JM., Cancer chemopreventive activity of resveratrol, Ann N Y Acad Sci. 2002.
- Boon, E.M., Downs, A., Marcey, D., 2007. Proposed Mechanism of Catalase in Catalase: H₂O₂: H₂O₂ Oxidoreductase. *Catalase Structural Tutorial Text*.

- BOVERIS A, CADENAS E (1997) Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCH LB, MASSARO DJ (eds) Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function. NY: Marcel Dekker
- BOVERIS A, COSTA L, CADENAS E (1999a) The mitochondrial production of oxygen radicals and cellular aging. In: CADENAS E, PACKER L (eds) Understanding the process of aging. NY: Marcel Dekker
- Cathy Tournier, Requirement of JNK for Stress- Induced Activation of the Cytochrome c-Mediated Death Pathway, Science, 5 May 2000.
- Cesar G. Fraga et al, Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols, Molecular Aspects of Medicine, 2010.
- Chance B, Sies H, Boveris A, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, Physiol Rev.197
- Chelikani, P., Fita, I. & Loewen, P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 61(2), pp.192–208.
- Cohen G, Somerson NL, Mycoplasma pneumoniae: hydrogen peroxide secretion and its possible role in virulence. Ann N Y Acad Sci. , 1967 Jul 28.
- D. Stagos, C. Spanou, M. Margariti et al., “Cytogenetic effects of grape extracts (Vitis vinifera) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes,” Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007.
- Davis R.J, Signal transduction by the JNK group of MAP kinases, Cell, 2000.
- E. Γιαννακοπούλου, Οξειδωτικό stress – αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί Κλινική σημασία, Archives of Hellenic Medicine 2009, 26(1):23–35.
- Earl R. Stadtman, Protein Oxidation in Aging and Age-Related Diseases, 25 JAN 2006.
- En-Qin Xia, Gui-Fang Deng, Ya-Jun Guo, and Hua-Bin Li, Biological Activities of Polyphenols from Grapes, Int J Mol Sci. 2010.
- Fan P, Lou H., Effects of polyphenols from grape seeds on oxidative damage to cellular DNA, Mol Cell Biochem, 2004.
- Fuchs S.Y., Dolan L., Davis R.J., Ronai Z., Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. Oncogene, 1996.
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Petrotos, K., et al., 2015. Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 86, pp.319–327.

- Giles GI, Jacob C, Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress, *Biol Chem.* 2002 Mar-Apr
- Goutzourelas N, Stagos D, Demertzis N, Mavridou P, Karterolioti H, Georgadakis S, Kerasioti E, Aligiannis N, Skaltsounis L, Tsatsakis A.M, Hayes A.W, Kouretas D. ,Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Human and Experimental Toxicology.* 33(11):1099-112, 2014.
- Griendling, K. K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*
- Gulam Waris **and** Haseeb Ahsan, Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions, *Journal of Carcinogenesis* 20
- H.J. Palmer, K.E. Paulson, Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression, *Nutrition Reviews*,1997.
- Halliwell and Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 1999.
- Halliwell B, Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept, *Nutr Rev.* 1999 Apr.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 2. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell B, Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* in press,2001.
- Helmut Sies' Glutathione and its role in cellular functions, *Free Radical Biology and Medicine*, 1999.
- HUGHES, R.E., 1964. REDUCTION OF DEHYDROASORBIC ACID BY ANIMAL TISSUES. *Nature*, 203, pp.1068–1069
- Irfan Rahman et al, Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols, *Biochemical Pharmacology*,2006.
- Izabela Wocławek-Potocka, Chiara Mannelli, Dorota Boruszewska,Ilona Kowalczyk-Zieba, Tomasz Waśniewski, and Dariusz J. Skarżyński, Diverse Effects of Phytoestrogens on the Reproductive Performance: Cow as a Model, *International Journal of Endocrinology*,2013.
- J.S. Wright, E.R. Johnson, G.A. DiLabio, Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *Journal of the American Chemical Society*,2001.
- Jabs T Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol*, 1999.
- James M. May, Zhi-chao Qu,Dustin R. Neel, Xia Li, Recycling of vitamin C from its oxidized

forms by human endothelial cells, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2003.

- Janaszewska, A. & Bartosz, G., 2002. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 62(3), pp.231–236.
- Julien Finaud, Gérard Lac, Edith Filaire, *Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training*, Sports Medicine, 2006.
- K. Hermann, *Flavonoid antioxidants in food of plant origin*, Gordian, 1993.
- Keles, M.S. *et al.*, 2001. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, 28(2), pp.141–143.
- Kim K.K, Whitin J.C, Sukhova N.M, Cohen H.J 1999. Increase in extracellular glutathione peroxidase in plasma and lungs of mice exposed to hyperoxia. *Pediatr Res* 46(6):715–21
- Kornelia Polyak, Yong Xia, Jay L. Zweier, Kenneth W. Kinzler and Bert Vogelstein, A model for p53-induced apoptosis, *Nature*, 1997.
- Kumar, H. *et al.*, 2014. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Natural product reports*, 31(1), pp.109–139.
- Leopoldini, T. Marino, N. Russo, M. Toscano, Density functional computations of the energetic and spectroscopic parameters of quercetin and its radicals in the gas phase and in solvent, *Theoretical Chemistry Accounts*, 2004.
- Lester Packer, Stefan U. Weber, and Gerald Rimbach, *Molecular Aspects of α -Tocotrienol Antioxidant Action and Cell Signalling*, The American Society for Nutritional Sciences, 2001.
- Linnane, A.W. *et al.*, Aging and global function of coenzyme, *N.Y. Acad. Sci.*, 2002
- Lo Presti R, Carollo C, Caimi G 2007. Wine consumption and renal diseases: new perspectives. *Nutrition* 23: 598-602.
- Louise I Mennen, Ron Walker, Catherine Bennetau-Pelissero, and Augustin Scalbert, *Risks and safety of polyphenol consumption*, American Society for Clinical Nutrition, 2005.
- Lund, M.N. *et al.*, 2011. Protein oxidation in muscle foods: a review. *Molecular nutrition & food research*, 55(1), pp.83–95.
- Lykkesfeldt J, Svendsen O, Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 173(3):502-11, 2007.
- M. Kaplan, T. Hayek, A. Raz, R. Coleman, L. Dornfeld, M. Vaya, *et al.*, Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular

cholesterol accumulation and development of atherosclerosis, *Journal of Nutrition*, 2001.

- M. Leopoldini, I. Prieto Pitarch, N. Russo, M. Toscano, Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study, 2004.
- M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo, M. Toscano, Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism, *The Journal of the Physical Chemistry A*, 2004.
- M.A. Bustamante, R. Moral, C. Paredes, A. Pérez-Espinosa, J. Moreno-Caselles, M.D. Pérez-Murcia, Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry, *Waste Management*, 2008.
- Massimo D'Archivio, Carmelina Filesi, Rosaria Varì, Beatrice Scazzocchio, and Roberta Masella, Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies, *Int J Mol Sci.*, 2010.
- Monica Leopoldini, [Nino Russo](#), Marirosa Toscano, The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants, *Food Chemistry*, 2011.
- Moran Benhar, David Engelberg, Alexander Levitzki, ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer, *EMBO reports*, 2002.
- NADIS, Nervous Disease in Sheep, 2015
- Nam, K.C. & Ahn, D.U., 2003. Use of antioxidants to reduce lipid oxidation and off-odor volatiles of irradiated pork homogenates and patties. *Meat science*, 63(1), pp.1–8.
- Oliboni LS, Dani C, Funchal C, Henriques JA, Salvador M 2011. Hepatoprotective, cardioprotective and renal-protective effects of organic and conventional grapevine leaf extracts (*Vitis labrusca* var. Bordo) on Wistar rat tissues, *An Acad Bras Cienc* 83: 1403-1411
- Pastore A., Fedetici G., Bertini E., Piemonte F. Analysis of Glutathione: Implication in Redox and Detoxification, 2003.
- Pastore, A. *et al.*, 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 333(1), pp.19–39.
- Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylene-tetrazol-induced epileptic seizure, 2004.
- Pinelo M, Arnous A, Meyer AS. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci Tech.* 2006.
- Possner D, Kliwer WM, The localisation of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis*, 1985 24: 229–240.
- Potter D.W, Tran T.B 1993. Apparent rates of glutathione turnover in rat tissues. *Toxicol Appl*

- R. Devesa-Rey, X. Vecino, J.L. Varela-Alende, M.T. Barral, J.M. Cruz, A.B. Moldes, Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling, *Waste Management*, 2011.
- Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R., Prabhakar, M.C. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients, 2004.
- Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R., Prabhakar, M.C., 2004. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients
- Reid MB, Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction, *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2001.
- Rey, A.I. *et al.*, 2001. Effect of dietary oils and alpha-tocopheryl acetate supplementation on lipid (TBARS) and cholesterol oxidation in cooked pork. *Journal of animal science*, 79(5), pp.1201–1208.
- Ricardo Sanchez-Prieto, Jose M. Rojas, Yoichi Taya, and J. Silvio Gutkind, A Role for the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in the Transcriptional Activation of p53 on Genotoxic Stress by Chemotherapeutic Agents, American Association for Cancer Research, 2000.
- Rimbach, M. , and F. Liebert. 1999. N-metabolism parameter of current broiler chicken genotypes in different age period. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 8:49.
- Roland F. Beers, Jr. and Irwin W. Sizer. A Spectrophotometric Method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by Catalase, 1952
- Roland, F.B., Jr. and I.W. Sizer. 1952. A Spectrophotometric Method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by Catalase.
- S.V. Jovanovic, S. Steenken, M.G. Simic, Y. Hara, Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoids radicals, *Flavonoids in health and disease*, Marcel Dekker, New York, 1998.
- Scholz, R.W., Graham, K.S., Gumpricht, 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, pp.514–7.
- Sen CK, Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction, *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2001.
- Sengupta A., Ghosh S., Bhattacharjee S. Allium Vegetables in Cancer Prevention: An Overview, 2004.
- Sengupta, A., Ghosh, S. & Bhattacharjee, S., 2004. Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 5(3), pp.237–245.

- Shaulian E, Karin M, AP-1 in cell proliferation and survival, *Oncogene* 2001.
- Sies, H. (1991). Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *Amer. J. Med.*91, 31-38.
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM, Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?, *Clin Biochem.* 1997.
- Suvara Kimmite Wattanapitayakul, John Anthony Bauer, Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications, *Pharmacology & Therapeutics*, 2001.
- Tania Brenes-Arguedas, Phyllis D. Coley and Thomas A. Kursar, Divergence and diversity in the defensive ecology of Inga at two Neotropical sites, *Journal of Ecology*, 2007.
- Taylor DE, Ghio AJ, Piantadosi CA., Reactive Oxygen species produced by liver, mitochondria of rats in sepsis, 1995 *Arch Biochem Biophys*
- Tom J. Battin, Sebastiaan Luyssaert, Louis A. Kaplan, Anthony K. Aufdenkampe, Andreas Richter & Lars J. Tranvik, The boundless carbon cycle, *Nature Geoscience*, 2009.
- Tomoaki Ikeda, Ben H Choi, Simon Yee, Yuji Murata, Edward J Quilligan, Oxidative stress, brain white matter damage and intrauterine asphyxia in fetal lambs, *International Journal of Developmental Neuroscience*, 1999.
- Ugartondo, V.; Mitjans, M.; Lozano, C.; Torres, J.L.; Vinardell, M.P., Comparative study of the cytotoxicity induced by antioxidant, epicatechin conjugates obtained from grape. *J. Agric. Food Chem.*, 2006.
- Villaverde, A., Morcuende, D. & Estevez, M., 2014. Effect of curing agents on the oxidative and nitrosative damage to meat proteins during processing of fermented sausages. *Journal of food science*, 79(7), pp.C1331–42.
- Yi Sun, Larry W. Oberley, The inhibition of catalase by glutathione, *Free Radical, Biology and Medicine*, 1989.
- Yu, Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, 1994
- Zhou Z, Kang Y.J 2000. Cellular and Subcellular Localization of Catalase in the heart of transgenic Mice. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 48(5): 585–594
- Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H., Nury, F.S., 1999. Wine analysis and production. Aopen Publishers, Inc., Garthersburg, ML, USA. ,1999.
- Βράκας Αναστάσιος, Διδακτορική Διατριβή, με θέμα: Μελέτη της τροποποίησης ποιοτικών και βιολογικά δραστικών συστατικών του οίνου από την έκθεσή του σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία. Δυνατότητα εισαγωγής νέων όρων διασφάλισης ποιότητας των οίνων, Αγρίνιο 2012

- Γιαννόπουλος Νικόλαος, Εκχύλιση Στέμφυλων για ανάκτηση φαινολικών ενώσεων, ποσοτικός προσδιορισμός τους και μέτρηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης., Θεσσαλονίκη 2012.
- Δημοπούλου Ειρήνη, Μελέτη Ταννινών των Γίγαρτων της ποικιλίας Cabernet Sauvignon, Εφαρμογή και Ανάπτυξη μεθόδων Ανάλυσης, Αθήνα 2008.
- Ν. Παπαγαλάνης, Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα, I. Δραστικές ρίζες οξυγόνου, Ελληνική Νεφρολογία 2014; 26 (3): 151 – 194.
- Ν. Παπαγαλάνης, Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα III. Η τοξικότητα των ελεύθερων ριζών, Ελληνική Νεφρολογία 2015; 27 (1): 17 – 50.
- Σαράντης, Κ.Ν., 2010. Αποτελεσματικότητα εκμεταλλεύσεων ελεύθερης εκτροφής χοίρων. pp.19.