



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ
ΙΣΤΟΥΣ (ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ – ΚΑΡΔΙΑ) ΚΑΙ ΑΙΜΑ ΑΠΟ ΝΕΑΡΑ
ΧΟΙΡΙΔΙΑ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ
ΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΣΤΕΜΦΥΛΑ**

**ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN PIGLET
TISSUES (QUADRICEPS – HEART) AND BLOOD AFTER
ADMINISTRATION OF FEED SUPPLEMENTED WITH GRAPE
POMACE EXTRACT**



ΧΑΤΖΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στο χοιροστάσιο του ΤΕΙ Λάρισας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για τη δυνατότητα που μου έδωσε, ώστε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα στο εργαστήριό του, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές, τις γνώσεις και τα ερεθίσματα που μου μετέδωσε καθ'όλη τη διάρκεια του προγράμματος σπουδών.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο για την αμέριστη βοήθεια και το ενδιαφέρον του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς όποτε χρειάστηκε ήταν εκεί με τις συμβουλές του και τη στήριξή του.

Οφείλω να ευχαριστήσω, ακόμη, τον Ιωάννη Καφαντάρη, ο οποίος εκτελεί το μεταδιδακτορικό του πρόγραμμα, και τα δείγματα προήλθαν από το δικό του πρόγραμμα. Βοήθησε σημαντικά καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, τόσο στην συγγραφή της όσο και στην εκτέλεση των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήταν άδικο να μην ευχαριστήσω συνολικά όλη την ομάδα του εργαστηρίου, δηλαδή τους υποψήφιους διδάκτορες Κωσταντίνο Γερασόπουλο, Νίκο Γκουτζουρέλα, Αλέξανδρο Πρίφτη, Υπάτιο Σπανίδη και Σωτηρίνα Μακρή, οι οποίοι με την στήριξή τους και με το φιλικό κλίμα που καλλιέργησαν στο εργαστήριο προσέφεραν τα μέγιστα, επιλύοντας οποιαδήποτε απορία είχα και όντας πρόθυμοι να συνεργαστούν μαζί μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Ιστορική Αναδρομή	9
1.2 Ελεύθερες Ριζες.....	10
1.2.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)	12
1.2.2 Δραστικές Μορφές Αζωτου (RNS)	14
1.2.3 Πώς Δημιουργούνται Οι Ελεύθερες Ριζες Στον Οργανισμό Μας	15
1.3 Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα	17
1.4 Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες.....	21
1.4.1 Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες Στην Υγεία Των Ζώων	22
1.5 Ευεργετικές Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών	23
1.6 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	23
1.6.1 Φυσικές Ιδιότητες.....	24
1.6.2 Χημική Δομή Και Τάξεις Πολυφαινολών	24
1.6.3 Το «Γαλλικό Παράδοξο»	26
1.6.4 Φυτικές Πολυφαινολές – Φυσιολογικός Ρόλος	27
1.6.5 Ευεργετικές Επιδράσεις Πολυφαινολών Στην Υγεία	28
1.7 Βιοδραστικές Φυτοχημικές Ένωσης	29
1.7.1 Τα Σταφύλια Και Οι Βιολογικές Τους Ιδιότητες.....	30
1.7.2 Ανατομία Και Χημική Σύσταση Σταφυλιών	32
1.7.3 Επίδραση Των Στεμφύλων Στο Περιβάλλον.....	33
1.8 Γενικές Πληροφορίες Για Τα Γουρούνια.....	35
1.8.1 Εγκυμοσύνη Των Χοίρων	36

1.8.2 Ασθένειες Που Προσβάλλουν Τους Χοίρους	37
1.8.3 Εκτροφή Χοίρων	37
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	39
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	40
3.1 Γενικά.....	40
3.1.1 Παραγωγικά Χαρακτηριστικά	42
3.2 Περιγραφή Σιτηρεσίου	42
3.2.1 Παρασκευή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών.....	42
3.2.2 Χαρακτηριστικά Ενσιρώματος.....	43
3.2.3 Παρασκευή Ενσιρώματος Στεμφύλων	43
3.2.4 Σύσταση πειραματικών σιτηρεσίων	45
3.2.5 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (invitro) των παρασκευασμένων ζωοτροφών για τα νεαρά χοιρίδια.....	45
3.3 Ιστοληψία - Αιμοληψία.....	46
3.3.1 Επεξεργασία αίματος.....	47
3.3.2 Ομογενοποίηση ιστών	49
3.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες	50
3.4.1 Γενικά	50
3.4.2 Μέτρηση Γλουταθειόνης	50
3.4.3 Δραστικότητα της Καταλάσης	54
3.4.4 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TotalAntioxidantCapacity, TAC).....	57
3.4.5 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	61
3.4.6 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια	63
3.4.7 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford	66
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	67
4.1 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πειραματικών ζωοτροφών για τους χοίρους	67

4.1.1 Συσχέτιση των δύο μεθόδων κατά Spearman	69
4.2 Αποτελέσματα παραγωγικών χαρακτηριστικών χοιριδίων	71
4.3 Αποτελέσματα μετρήσεων δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα και στους ιστούς (καρδιά, τετρακέφαλος) στους χοίρους	74
4.3.1 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα	75
4.3.2 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα	76
4.3.3 Επίπεδα των TBARS στο πλάσμα	77
4.3.4 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα	78
4.3.5 Επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στο πλάσμα	79
4.3.6 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH) στον τετρακέφαλο ιστό	80
4.3.7 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στον τετρακέφαλο ιστό	81
4.3.8 Επίπεδα των TBARS στον τετρακέφαλο ιστό	82
4.3.9 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον τετρακέφαλο ιστό	83
4.3.10 Επίπεδα της TAC στον τετρακέφαλο ιστό	84
4.3.11 Επίπεδα Γλουταθειόνης στον καρδιακό ιστό	85
4.3.12 Επίπεδα Καταλάσης στον καρδιακό ιστό	86
4.3.13 Επίπεδα των TBARS στον καρδιακό ιστό	87
4.3.14 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον καρδιακό ιστό	88
4.3.15 Επίπεδα της TAC στον καρδιακό ιστό	89
4.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα και στους ιστούς (τετρακέφαλος, καρδιά) των χοίρων	90
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	92
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	100

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, πραγματοποιήθηκε εκτροφή οικόσιτων χοίρων που προήλθαν από τη διασταύρωση Landrace με Large White – Duroc – Pietrain και διεξήχθησαν 4 ιστοληψίες-αιμοληψίες σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά τους στάδια, ώστε να γίνει έλεγχος της οξειδοαναγωγικής τους κατάστασης στο μυϊκό ιστό, στον καρδιακό ιστό και στο αίμα. Οι πρώτες 2 ιστοληψίες διεξήχθησαν κατά την πρόωρη ηλικία (2^η και 20^η μέρα), περίοδο κατά την οποία κατανάλωναν 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 κατανάλωναν. 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, τόσο στους προαναφερθέντες ιστούς όσο και στο αίμα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα δραστικότητας CAT (30,17% στις 50 ημέρες) και TAC (11,12% στις 35 ημέρες) στο αίμα, αυξημένα επίπεδα GSH (25,16% στις 35 ημέρες και 40,74% στις 50 ημέρες) και μειωμένα επίπεδα TBARS (41,86% στις 35 ημέρες και 29,52% στις 50 ημέρες) στον τετρακέφαλο, καθώς και αυξημένα επίπεδα GSH (40% στις 35 ημέρες), CAT (64,34% στις 50 ημέρες) και TAC (40,77% στις 50 ημέρες) στον καρδιακό ιστό. Συμπερασματικά, τα πολυφαινολικά πρόσθετα των στεμφύλων είχαν ευεργετική επίδραση στους ιστούς και στο αίμα. Επομένως, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για να διευκρινιστεί η επιρροή των στεμφύλων, καθώς και ο μηχανισμός δράσης των στους επιμέρους ιστούς. Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα ήταν θετικά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι μια χρήση στεμφύλων στην παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων θα επιλύσει και οικολογικά προβλήματα που δημιουργούνται 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 was carried out. Blood and tissue samples were collected at specific developmental stages, in order to examine the redox status in the heart and quadriceps tissues, as well as in blood. 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 sample 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 (polyphenolic group). Consequently, the antioxidant effects of the experimental feed were assessed by measuring the following oxidative stress biomarkers in blood and tissues: reduced glutathione (GSH), catalase activity (CAT), total antioxidant capacity (TAC), thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and protein carbonyls (CARB). According to the results, CAT (30,17% at 50d) and TAC (11,12% at 35d) levels were reduced in blood. In the quadriceps tissue, GSH was increased by 25,16% and 40,74% at 35d and 50d respectively, while TBARS were reduced by 41,86 and 29,52% at 35d and 50d respectively. Finally, in the heart tissue, GSH (40% at 35d), CAT (64,34% at 50d) and TAC (40,77% at 50d) levels were increased. In conclusion, grape pomace polyphenolic additives seem to be beneficial both in the examined tissues and blood. 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's redox status, a concomitant reduction of the environmental pollution from the aggregation of these pollutants will be observed.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Όπως είναι γνωστό, το **οξυγόνο (O_2)** είναι ένα πολύ κρίσιμο και βασικό στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής και χρησιμοποιείται στη μετατροπή της τροφής σε ενέργεια, οξειδώνονται τις τροφές. Ωστόσο, αν και το οξυγόνο είναι απαραίτητο για όλες τις μορφές αερόβιας ζωής, η υπέρμετρη και ανεξέλεγκτη χορήγησή του μπορεί να αποβεί ιδιαίτερα βλαπτική για τους οργανισμούς και να προκαλέσει ανεπιθύμητες επιδράσεις στην υγεία. Σε κάποιες περιπτώσεις, δηλαδή, μπορεί να γίνει τοξικό, κάτι που χαρακτηρίζεται ως «βιοχημικό παράδοξο». Αυτό πρώτη φορά παρατηρήθηκε από τον Priestley το 1775, ο οποίος ανέφερε ότι *«η συνεχής έκθεση στο οξυγόνο μπορεί να σβήσει το κερί της ζωής πολύ γρήγορα»*. Η προφητική αυτή παρατήρηση από τον άνθρωπο που ανακάλυψε το οξυγόνο, έδωσε το έναυσμα για τη λύση ενός εκ των σημαντικότερων προβλημάτων της σύγχρονης επιστήμης: του «παράδοξου του οξυγόνου».

Τα αίτια των δηλητηριωδών ιδιοτήτων του οξυγόνου ήταν άγνωστα πριν τη δημοσίευση της θεωρίας του Gershaman το 1954, σύμφωνα με την οποία η τοξικότητα του οξυγόνου οφειλόταν σε μερικώς αναχθείσες μορφές οξυγόνου. Λίγο αργότερα, το 1956, ο Denham Harman πρότεινε την ιδέα για την ύπαρξη της «ελεύθερης ρίζας» και αργότερα έθεσε ως αξίωμα ότι αυτά τα συστατικά έχουν ρόλο στην γήρανση μέσω των πρόκλησης διασταυρωμένων αντιδράσεων και δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών τροποποιώντας λιπίδια, πρωτεΐνες, κυτταρικό DNA (ιδιαίτερα το μιτοχονδριακό DNA) και προκαλώντας μεταλλαξιγενέσεις, καρκίνο και κυτταρική βλάβη. Η ανακάλυψη του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) το 1969 σήμανε μια νέα εποχή για τη διερεύνηση των δράσεων των ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς. Μια τρίτη εποχή της έρευνας σχετικά με τις δράσεις των ελευθέρων ριζών ξεκίνησε όταν το 1977 εμφανίστηκαν οι πρώτες αναφορές που περιέγραφαν τις ευεργετικές βιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Έκτοτε, είναι πλέον σαφές ότι οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν προσαρμοστεί στη συνύπαρξη με τις ελεύθερες ρίζες και έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς για τη χρησιμοποίηση αυτών σε φυσιολογικές λειτουργίες. Είναι πλέον γνωστό, ότι οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διπλό ρόλο:

άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε βλαπτικές (Valko *et al.* 2007).

Τα τελευταία χρόνια ο ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην παθογένεση πολλών ασθενειών κίνησε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, με αποτέλεσμα μέρα με τη μέρα οι ερευνητές να έρχονται όλο και πιο κοντά στην κατανόηση των επιβλαβών δράσεών τους, αλλά και στην επίλυση αυτών με τη μελέτη των αντιοξειδωτικών συστατικών του οργανισμού και των τροφίμων, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική προστατευτική δράση.

1.2 Ελεύθερες Ρίζες

Σε άρθρο που δημοσιεύτηκε το 1954 στο επιστημονικό περιοδικό Science προτάθηκε για πρώτη φορά ότι ο παράγοντας που συσχετίζε τα αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με αυτά της «δηλητηρίασης» από το O₂, ήταν αυτό που αποκαλούμε ελεύθερες ρίζες (ROS).

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 και μεταβολή του αριθμού οξείδωσης των ατόμων των στοιχείων που συμμετέχουν. Τέτοιες αντιδράσεις ονομάζονται **οξειδοαναγωγικές (redox)**, εκ των οποίων κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή

έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων από ένα άτομο (π.χ. οξειδωτική φωσφορυλίωση, κύκλος του κιτρικού οξέος).

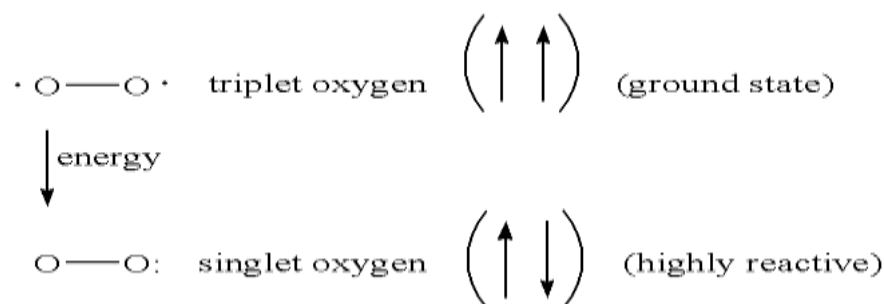
Ελεύθερη ρίζα είναι οποιοδήποτε άτομο, μόριο ή ιόν, που διαθέτει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στοιβάδα, είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Halliwell & Gutteridge 1990). Για παράδειγμα ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός και ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεοσχηματισμένη χημική οντότητα. 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.. Κατά συνέπεια, μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης (Halliwell & Gutteridge 1990). Η 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 (ground state or atomic unexcited state).

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και έχουν διπλό ρόλο αφού ανάλογα με το ρυθμό παραγωγής τους μπορεί να είναι είτε ευεργετικές είτε επιβλαβείς. Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, οι οποίες οδηγούν στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελευθέρων ριζών. Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta *et al.* 2004; Pani *et al.* 2010; AICR 2007), το θείο (Battin & Brumaghim 2009; Pani *et al.* 2010) ή τον άνθρακα.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το οξυγόνο μπορεί να γίνει τοξικό. Πιο συγκεκριμένα, το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του O_2 , που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (*tripletstate*) και συμβολίζεται με $3O_2$, δεν είναι ιδιαίτερα δραστική. Όμως, είναι δυνατή η

ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, με αποτέλεσμα τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (*singletstate*) και συμβολίζεται με $^*\text{O}_2$. Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η ενεργοποίηση του οξυγόνου μπορεί να συμβεί μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών. Δηλαδή, είτε μέσω απορρόφησης της επαρκούς ενέργειας για την αναστροφή του spin σε ένα από τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια είτε μέσω μονοσθενής αναγωγής. Έτσι, θα προκύψει ο σχηματισμός οξυγόνου μονής κατάστασης, του οποίου τα ηλεκτρόνια έχουν αντιπαράλληλα spin, και συνεπώς μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις ταυτόχρονης μεταφοράς δύο ηλεκτρονίων.



Εικόνα 1: Οξυγόνο μονής και τριπλής κατάστασης.

Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα, αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Halliwell 2001). Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ) (Cheeseman & Slater 1993; Gutteridge 1995) ενώ αντίστοιχα όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν άζωτο ονομάζονται δραστικά είδη αζώτου (ΔΕΑ).

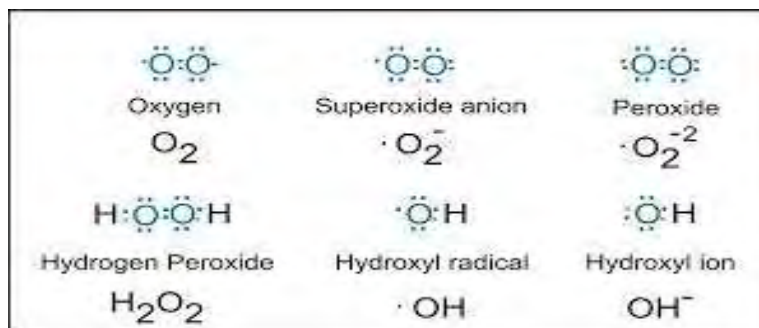
1.2.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)

Χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα και είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής. Όλες οι ROS έχουν κοινή ικανότητα να αποσπούν ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο στόχο και αυτό χημικά ονομάζεται οξείδωση. Επόμενως, οι ROS προκαλούν οξείδωση και γι'αυτό δρουν ως οξειδωτικά, ενώ οι ίδιες υφίστανται αναγωγή. Αποτελούνται από τα ενδιάμεσα προϊόντα ατελούς αναγωγής του οξυγόνου. Αυτά είναι: η ρίζα σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$),

η ρίζα υδροξυλίου (OH^\bullet), η ρίζα υπεροξειδίου (ROO^\bullet), το O_2 απλής κατάστασης, το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl). Το O_2^\bullet και το OH^\bullet είναι πολύ δραστικές ελεύθερες ρίζες, ενώ το H_2O_2 αν και δεν είναι ελεύθερη ρίζα η σημασία του για την οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού είναι κρίσιμη, καθώς από τη μία αποτελεί υπόστρωμα για την παραγωγή άλλων ενδιαμέσων μορίων με οξειδοαναγωγικό δυναμικό και από την άλλη συμμετέχει στις διαβιβαστικές οδούς ορμονών και παραγόντων ανάπτυξης οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων ευαίσθητων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού (redox sensitive genes) (Παπαγαλάνης 2014).

Οι ευεργετικές δράσεις των ΔΜΟ παρατηρούνται σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως στην κυτταρική απόκριση στο στρες, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή, στην απόπτωση, στη φαγοκυττάρωση κυττάρων του ανοσοποιητικού και στη σηματοδότηση για την πήξη του αίματος (Παπαγαλάνης 2014).

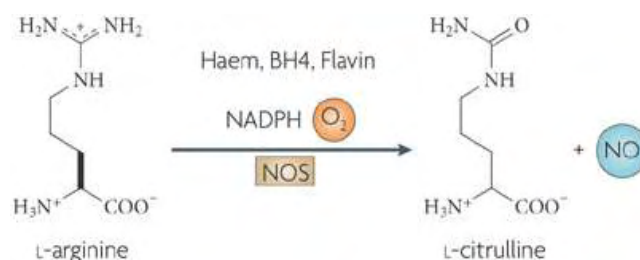
Όπως συνάγεται από τις αντιδράσεις τους, οι ελεύθερες ρίζες και κυρίως οι πολύ δραστικές όπως η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να προσβάλλουν μεγάλη ποικιλία μορίων όπως σάκχαρα, αμινοξέα, φωσφολιπίδια και γενικά λιπίδια, βάσεις DNA και οργανικά οξέα. Οι λιγότερο δραστικές ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή δραστικότερων καταλήγοντας τελικά στο ίδιο αποτέλεσμα. Η παρουσία ασύζευκτου ηλεκτρονίου, προσδίδει στις ΔΜΟ ιδιαίτερη δραστικότητα, αφού μπορούν είτε να δώσουν είτε να λάβουν ένα ηλεκτρόνιο σε/από άλλα μόρια, συμπεριφερόμενες έτσι ως αναγωγικά ή οξειδωτικά μέσα αντίστοιχα (Durackova 2010).



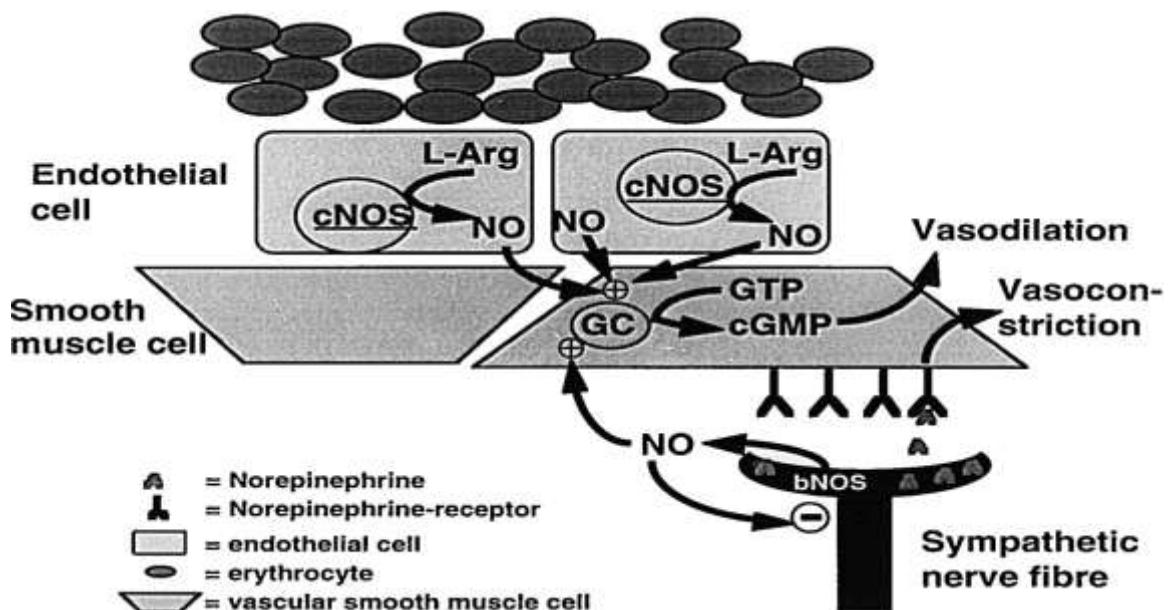
Εικόνα 2: Παραδείγματα δραστικών μορφών οξυγόνου.

1.2.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS)

Τα δραστικά είδη αζώτου (reactive nitrogen species, RNS) αποτελούν μια οικογένεια αντιμικροβιακών παραγόντων που προέρχονται από το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το οποίο παράγεται μέσω της ενζυμικής δραστικότητας της συνθάσης του NO (NOS2) (Iovine *et al.*, 2008). Έτσι, η κύρια πηγή δραστικών ειδών αζώτου είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Όντας και το ίδιο ελεύθερη ρίζα, αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο (O₂), με το υπεροξείδιο (O₂⁻), με την αιμοσφαιρίνη και γενικά με πρωτεΐνες που περιέχουν συναθροίσεις (clusters) ομάδων με δεσμούς δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου με θείο (iron-sulfur centers) καθώς και με άλλες ρίζες πρωτεϊνών και λιπών. Τα παραγόμενα προϊόντα και η τροποποίηση διαφόρων βιομορίων από αυτά, έχουν ουσιαστική συμμετοχή στο μεταβολισμό και στο επίπεδο του οξειδωτικού στρες του οργανισμού (Παπαγαλάνης 2014).



Εικόνα 3: Παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO).

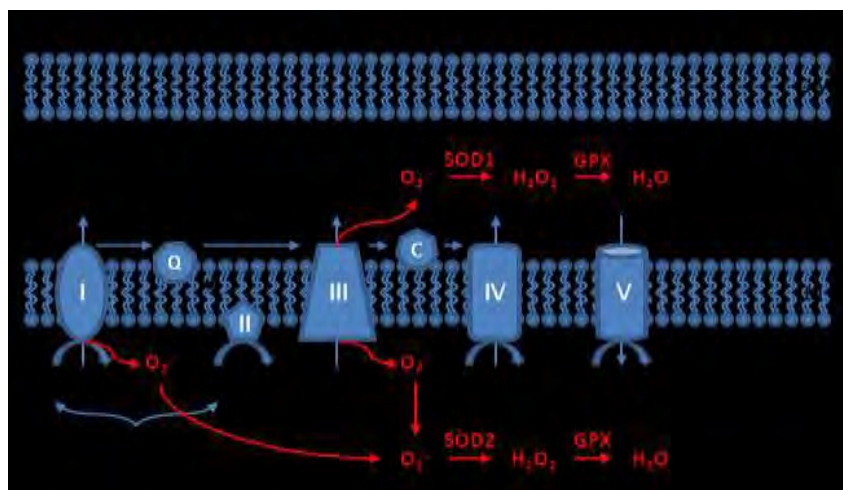


Εικόνα 4: Επίδραση του NO στη χαλασή του αγγείου.

1.2.3 Πώς Δημιουργούνται Οι Ελεύθερες Ρίζες Στον Οργανισμό Μας

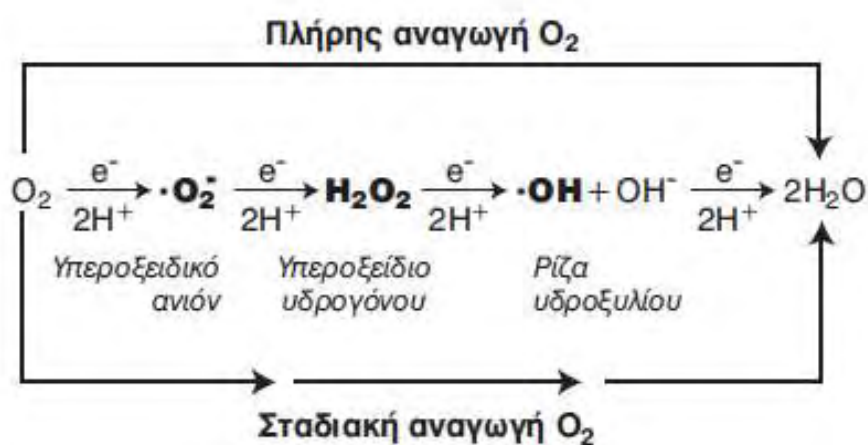
Όπως είναι ευραίως γνωστό, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν στον οργανισμό μας τόσο ενδογενώς όσο και εξωγενώς. Αρχικά, το οξυγόνο που εισέρχεται στον οργανισμό με την αναπνοή, μεταφέρεται μέσω του αίματος στα κύτταρα. Το 95% του εισερχόμενου οξυγόνου χρησιμοποιείται από τα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας, η οποία αποθηκεύεται υπό τη μορφή δεσμών υψηλής ενέργειας στο μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) με τη διεργασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής οξείδωσης των τροφών στα μιτοχόνδρια παράγονται διάφορα προϊόντα, ανάμεσα στα οποία είναι και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που απελευθερώνονται μέσα στο κύτταρο. Το υπόλοιπο 5% του εισερχόμενου οξυγόνου χρησιμοποιείται από διάφορα ενζυμικά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα, οι φυσιολογικές διαδικασίες για παραγωγή ελεύθερων ριζών ενδογενώς είναι οι ακόλουθες (Valko *et al.* 2006):

A) Η πιο σημαντική πηγή ελεύθερων ριζών είναι μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, σύμφωνα με την οποία τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH₂ μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό, ενώ ταυτόχρονα η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται στην ATP μέσω της συνθετάσης του ATP. Αυτό αφορά το 95-99% του οξυγόνου. Το υπόλοιπο οξυγόνο διαφεύγει από τα συμπλέγματα πρωτεϊνών με τη μορφή μονήρους οξυγόνου και σουπεροξειδίου. Το φαινόμενο αυτό, δηλαδή της παραγωγής ελεύθερων ριζών από τα μιτοχόνδρια, εξαρτάται από τη μερική τάση του οξυγόνου και αυξάνεται σημαντικά σε περίπτωση βλάβης στα μιτοχόνδρια (μιτοχονδριακή μεταβολή της διαπερατότητας) με αποτέλεσμα τη μη χρησιμοποίηση της παραγόμενης ενέργειας για τη σύνθεση ATP και τη μεγάλη παραγωγή σουπεροξειδίου που προκαλεί απόπτωση του κυττάρου (Παπαγαλάνης 2014).



Εικόνα 5: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια.

Β) Το υπόλοιπο 5% του εισερχόμενου οξυγόνου που χρησιμοποιείται από ενζυμικά συστήματα στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως η NADH οξειδάση, η οξειδάση του κυτταροχρώματος P450, η κυκλοξυγενάση, η λιποξυγενάση και η ξανθινοξειδάση. Αυτά τα ένζυμα με τη σειρά τους, μεταφέρουν σταδιακά ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο, ώστε να μην το ανάγουν πλήρως και σε κάθε στάδιο (προστίθεται ένα ηλεκτρόνιο) παράγεται ένα ενδιάμεσο προϊόν. Κατά συνέπεια, έχουμε σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου προς νερό, με τα ενδιάμεσα προϊόντα να είναι κατά σειρά παραγωγής τους, το $O_2^{\bullet-}$, το H_2O_2 και το OH^{\bullet} (Παπαγαλάνης 2014).



Εικόνα 6: Αναγωγή του μοριακού οξυγόνου εκτός μιτοχονδρίων.

Γ) Κάποια ιόντα μετάλλων (σίδηρος, χαλκός, χρώμιο, κοβάλτιο, αρσενικό, κάδμιο, νικέλιο), που αποτελούν σημαντικοί ενζυμικοί συμπαραγόντες, όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους μέσα σε βιολογικά συστήματα έχουν την ικανότητα να

προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA, προκαλώντας έτσι καταστροφές.

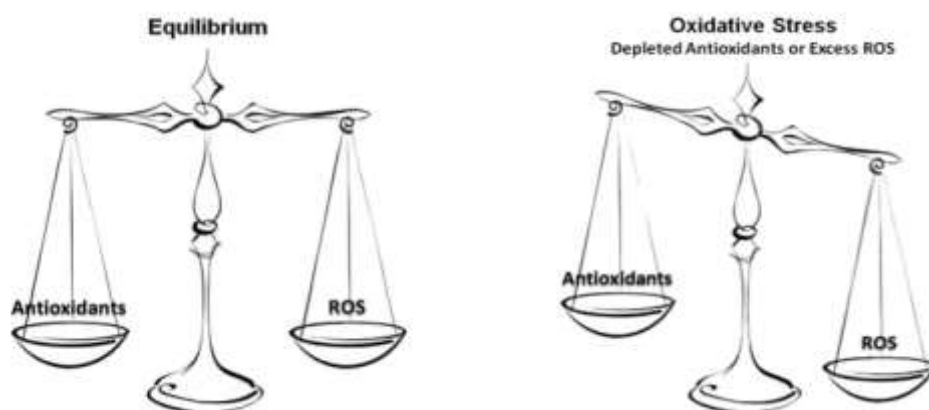
Δ) Τέλος, η παραγωγή ελεύθερων ριζών λαμβάνει χώρα και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς και βιολογικά υλικά (μεταμοσχευθέντα όργανα ή ιστοί). Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα (Pani *et al.* 2010; COOKE *et al.* 2003; Fujisawa *et al.* 2004; Vainio 1999). Τέτοια κύτταρα είναι και τα φαγοκύτταρα. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου που συνοδεύεται από παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ελευθέρων ριζών.

Συμπερασματικά, οι ελεύθερες ρίζες είναι απαραίτητα ενδιάμεσα στοιχεία στον κυτταρικό μεταβολισμό. Η παραγωγή τους είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ανθρώπινη ζωή, ενώ επηρεάζεται και από εξωγενείς παράγοντες. Αυτοί μπορεί να είναι: η έκθεση στην ιονίζουσα και υπεριώδη ακτινοβολία, η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ, η επίδραση των βαρέων μετάλλων (μόλυβδος, κάδμιο, νικέλιο, υδράργυρος, χαλκός), το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης όπως το όζον της τροπόσφαιρας (ισχυρό οξειδωτικό της φωτοχημικής ρύπανσης) το οποίο προκαλεί υπεροξειδωση λιπιδίων και επιδρά στις δράσεις των ενζύμων, καθώς και διάφοροι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και φάρμακα που δρουν με έμμεσο μηχανισμό (ενεργοποίηση κυτοχρώματος P450). Επίσης, ουσίες που περιέχονται στα τσιγάρα, όπως η πίσσα, η νικοτίνη και το μονοξειδίο του άνθρακα προκαλούν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών που επιδρούν στους πνεύμονες. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ο καπνός του τσιγάρου μπορεί να αποβεί ακόμα πιο βλαβερός, κάτι που αυξάνει τους κινδύνους και για τους παθητικούς καπνιστές.

1.3 Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Σε περίπτωση, όμως, που προκύψει μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ των δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρος του τελευταίου, τότε παρατηρείται το φαινόμενο του **οξειδωτικού στρες**

(Pisoschi & Pop 2015). Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταληγεί σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μείωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών αζώτου και οξυγόνου. Στην πρώτη περίπτωση, παρατηρούνται διάφορες μεταλλάξεις και τοξικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, εξάντληση των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων λόγω πιθανής παθολογικής κατάστασης, καθώς και μείωση των αντιοξειδωτικών ουσιών που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Στη δεύτερη περίπτωση, έχουμε έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS και RNS ή ύπαρξη παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή τους.



Εικόνα 7: Δημιουργία οξειδωτικού στρες.

Ως **αντιοξειδωτική ουσία** ορίζουμε κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. (Vaya J. and Aviram M. 2001; Krinsky 2002). Αυτές μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους.

- α) Εμποδίζουν το σχηματισμό ΔΕΟ.
- β) Καθυστερούν ή σταματούν τις οξειδωτικές διαδικασίες αφότου αρχίσουν, δηλαδή τη διάδοση των ελεύθερων ριζών μέσω των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Αυτό γίνεται με τη σάρωση και την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών τελικά.
- γ) Απενεργοποιούν τα μέταλλα μέσω της σύνδεσής τους με αυτά και έτσι δεν τα αφήνουν να δράσουν (μεταλλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες).

δ) Δρουν συνεργιστικά. Δηλαδή, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού.

Η βασική διάκριση των αντιοξειδωτικών γίνεται με βάση την προέλευσή τους (εξωγενή ή ενδογενή), τη διαλυτότητά τους (υδρόφιλα ή λιπόφιλα) και τη χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική).

Ειδικότερα, τα **ενδογενή αντιοξειδωτικά**, αυτά που τα παράγει από μόνος του ο οργανισμός, ταξινομούνται κυρίως σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες θεωρούνται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Όσον αφορά τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, αυτά κατανέμονται ισότιμα μέσα σ'ένα ζωντανό οργανισμό. Στο εξωκυττάριο τμήμα, και συγκεκριμένα στο πλάσμα, όλα τα στοιχεία που είναι ικανά να δώσουν άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια για να ικανοποιήσουν την ανάγκη των ελεύθερων ριζών, αποτελούν κομμάτι του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Σ'αυτό περιλαμβάνονται η λευκωματίνη, η χολερυθρίνη και το ουρικό οξύ. Ενδοκυττάρια, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα κατανέμεται ισότιμα στις μεμβράνες και στο κυτταρόπλασμα. Επειδή η πλειοψηφία των ελεύθερων ριζών παράγεται σε τμήματα όπου υπάρχουν λιπίδια, τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά (βιταμίνη Ε, β-καροτένιο) εντοπίζονται στις μεμβράνες και αποτελούν την πρώτη γραμμή του αμυντικού συστήματος. Στις επόμενες γραμμές του αμυντικού συστήματος ανήκουν η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C, μερικά μέλη του συμπλέγματος βιταμινών Β και η γλουταθειόνη (Gerogianni & Gourgoulialis 2006).

Επιπρόσθετα, τα πιο συνηθισμένα **εξωγενή αντιοξειδωτικά** είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη Ε (τοκοφερόλες), βιταμίνη Α, τα φλαβονοειδή, τα φυτοχημικά και ολιγοστοιχεία (π.χ. σελήνιο, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο) τα οποία μπορούν να χορηγηθούν ως συμπληρώματα διατροφής.

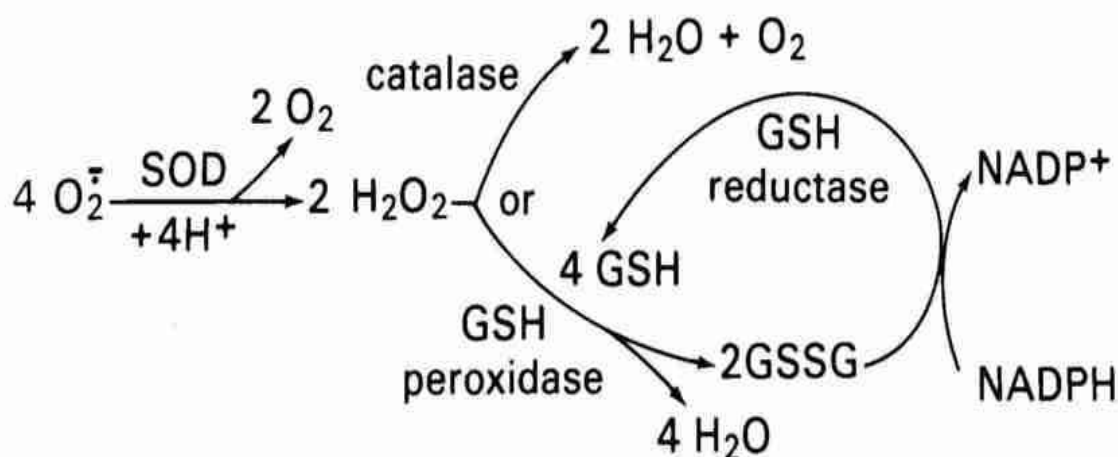
Γενικότερα, άλλες γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι η λακτοφερίνη, η σερουλοπλασμίνη, η απτοσφαιρίνη, η τρανσφερίνη, η αιμογλοβίνη, οι οξειδάσες κυτοχρωμάτων και το συνένζυμο Q10 (Gerogianni & Gourgoulialis 2006). Σημαντική, επίσης, θεωρείται και η δράση της μελατονίνης η οποία παράγεται κυρίως σε συνθήκες απόλυτου σκοταδιού. Η μελατονίνη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό που μπορεί εύκολα να διασχίσει τις κυτταρικές μεμβράνες και τον αιματο-εγκεφαλικό φράγμα και εξουδετερώνει άμεσα τις ελεύθερες ρίζες OH , O^{2-} και NO . Έτσι,

απαιτείται αρκετός ύπνος, ώστε ο οργανισμός μας να παράξει τα απαραίτητα επίπεδα μελατονίνης και να επωφεληθεί από τον προστατευτικό ρόλο που αυτή ασκεί στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA (Poljsak 2011).



Εικόνα 8: Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας.

Σχετικά με τα ένζυμα που αναφέρθηκαν προηγουμένως, έχουν άμεση επίδραση μεταξύ τους. Η υπεροξειδική δισμουτάση μετατρέπει το $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 και οξυγόνο. Η καταλάση με τη σειρά της μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μειώνει την λιπιδική υπεροξειδίωση και ανάγει το H_2O_2 σε νερό. Η ρεδοукτάση της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της γλουταθειόνης, δηλαδή μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή της (GSH). Τέλος, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο μεταβολισμού φάσης II, το οποίο καταλύει τη σύζευξη της GSH με κάποιο ξеноβιοτικό υπόστρωμα με σκοπό την αποτοξίνωσή του. Οι δράσεις τους φαίνονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα (Valko *et al.* 2006).



Εικόνα 9: Δράση των ενδογενών, ενζυμικών αντιοξειδωτικών.

Η βιταμίνη C (ή ασκορβικό οξύ) και η βιταμίνη E είναι δύο ισχυρά αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν συνεργιστική δράση (Khallouki *et al.* 2003). Η βιταμίνη E είναι λιποδιαλυτή, αποτελείται από τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες και

βρίσκεται κυρίως στα φυτικά έλαια και τους ξηρούς καρπούς. Προστατεύει τα κύτταρα του πνεύμονα που είναι εκτεθειμένα στο οξυγόνο, αποτρέπει την οξείδωση της κακής χοληστερίνης LDL, ανάγει μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός και ως επί το πλείστον αποτρέπει την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και των πρωτεϊνών και εμποδίζει την δημιουργία οξειδωτικού στρες. Η βιταμίνη C με τη σειρά της, είναι υδατοδιαλυτή, βρίσκεται κυρίως στα φρούτα και λαχανικά και προστατεύει από την αθηροσκλήρωση, καθώς εμποδίζει την οξείδωση της LDL χοληστερίνης και αυξάνει την ευεργετική χοληστερίνη (HDL). Επίσης, δρα απευθείας με τις ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου και το οξυγόνο απλής κατάστασης, ενώ παράλληλα ανάγει την οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης E, όταν η τελευταία έχει παγιδέψει μια ελεύθερη ρίζα.

1.4 Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες

Σε περίπτωση που δημιουργηθεί οξειδωτικό στρες στον οργανισμό, τότε είναι πιθανόν να παρατηρηθούν και σημαντικές αλλοιώσεις-τροποποιήσεις κυρίως των νουκλεϊκών οξέων (πρόκληση μεταλλάξεων και διαφόρων γενετικών επιπτώσεων), των κυτταρικών μεμβρανών (διακοπή της διακυτταρικής επικοινωνίας), των μιτοχονδρίων (αποσύζευξη ενεργειακής παραγωγής), των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να προκληθεί αποσύνθεση και θάνατος των κυττάρων και κατ'επέκταση ανάπτυξη πολλών σοβαρών ασθενειών (Pisoschi & Pop 2015).

Το οξειδωτικό στρες αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της ηλικίας και έτσι αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες της γήρανσης του οργανισμού (Rinnerthaler *et al.* 2015). Γενικότερα, σημαντικές ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες είναι ο καρκίνος, η καρδιαγγειακή νόσος, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η ισχαιμική βλάβη, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer, Parkinson) και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Valko *et al.* 2007). Κάποιες άλλες σχετιζόμενες ασθένειες είναι τα αναπνευστικά προβλήματα, οι δερματικές παθήσεις, η περιβαλλοντική ευαισθησία, η φλεγμονώδης ασθένεια του εντέρου, το χρόνιο σύνδρομο κόπωσης, καθώς και το AIDS ή άλλες παρεμφερείς ασθένειες (Poljsak 2011).



Εικόνα 10: Διαταραχές που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες.

1.4.1 Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες Στην Υγεία Των Ζώων

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι στα κτηνοτροφικά ζώα το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε μία σειρά από παθολογικές καταστάσεις (σήψη, μαστίτιδα, εντερίτιδα, πνευμονία, παθήσεις των αρθρώσεων, φλεγμονή της αναπνευστικής οδού) στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και καταστάσεις που σχετίζονται άμεσα με τη ζωική παραγωγή και την ευζωία (Lykkesfeldt & Svendsen 2007). Για παράδειγμα, κοινές ασθένειες όπως, πνευμονία, εντερίτιδα (Miller *et al.* 1993), πυρετός (Kataria A.K. 2012b), σήψη στους χοίρους (Basu & Eriksson 2001) και υποτροπιάζουσα απόφραξη και φλεγμονή της αναπνευστικής οδού στα άλογα (Deaton, Marlin, Smith, Pat A Harris, *et al.* 2004), προκαλούνται από διαταραχές της αντιοξειδωτικής ομοιόστασης των ζώων. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι μαστίτιδα (Weiss *et al.* 2004), πανώλη (*Peste des petits ruminants*) (PPR) (Kataria A.K. 2012a), πνευμονία (Wessely-Szponder *et al.* 2004) και μολύνσεις από παράσιτα προκαλούνται στα μηρυκαστικά λόγω οξειδωτικού στρες (Celi 2011), ενώ πολλές έρευνες έδειξαν ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να προστατεύσει τα ζώα από τέτοιες ασθένειες ή να μειώσει τα κλινικά συμπτώματάτους (Hogan *et al.* 1992; Deaton, Marlin, Smith, Patricia A Harris, *et al.* 2004). Έτσι, θεωρείται ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική και χαμηλού κόστους παρέμβαση για την αντιμετώπιση

παθολογικών καταστάσεων των κτηνοτροφικών ζώων στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες (Lykkesfeldt & Svendsen 2007). Επίσης, πρόσφατες μελέτες (Jain & Flora 2012) έδειξαν ότι τα πολύ νεαρά ζώα λόγω παραγόντων στρες (στρες απογαλακτισμού) έχουν μειωμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σε σύγκριση με τα ενήλικα άτομα και έτσι στα νεαρά άτομα είναι ακόμα πιο απαραίτητη η χορήγηση αντιοξειδωτικών για προστασία από ασθένειες. Για παράδειγμα, ο απογαλακτισμός είναι μια αγχωτική περίοδος για τα γουρούνια, με αποτέλεσμα την πρόκληση παθολογικών καταστάσεων (γαστρεντερικές διαταραχές) που σχετίζονται άμεσα με τους μειωμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στο χοιρίδιο κατά την περίοδο εκείνη (Zhu *et al.* 2012; Boudry *et al.* 2004).

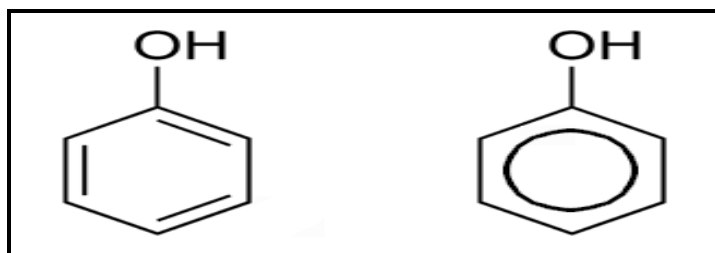
1.5 Ευεργετικές Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών

Πέρα από τις πολυάριθμες αρνητικές τους επιδράσεις, οι ROS και RNS θεωρούνται φυσιολογικά παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και συμμετέχουν και σε διαδικασίες σημαντικές για τη λειτουργία του οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμεύουν στην άμυνα του οργανισμού, απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, ενώ έχουν συμμετοχή στη σηματοδότηση των κυττάρων, την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, την απόπτωση, τη διαφοροποίηση των κυττάρων, την ωρίμανση του ωοκυττάρου, αλλά και τη μυϊκή συστολή. Είναι λοιπόν σημαντικό να σημειωθεί ότι δεν είναι μόνο επιβλαβείς για τον οργανισμό, αλλά αντιθέτως κάποιες φορές είναι αναγκαίες για φυσιολογικές του λειτουργίες. Έτσι, πρέπει να είμαστε προσεκτικοί στην ημερήσια κατανάλωση αντιοξειδωτικών, ώστε αυτή να μην υπερβαίνει συγκεκριμένα όρια που θα οδηγούσαν στην πλήρη εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών (Celi 2010).

1.6 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών (φυτικοί μεταβολίτες) και ένα αναπόσπαστο μέρος της δίαιτας των ανθρώπων και των ζώων (Tsao 2010). Είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται κυρίως από φυσικές, καθώς και συνθετικές ή ημισυνθετικές χημικές ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων πολλαπλάσιων δομικών μονάδων της φαινόλης (Quideau *et al.* 2011). Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα με

ένα άτομο άνθρακα ενός ή περισσότερων αρωματικών δακτυλίων. Ο χημικός τύπος της φαινόλης (Φαινικό οξύ) είναι C_6H_5OH , το απλούστερο των φαινολών.



Εικόνα 11: Δομή μιας φαινόλης.

Γενικά τρόφιμα που περιέχουν σύνθετα μείγματα πολυφαινολών, σύμφωνα με μια ανασκόπηση του 2005, είναι προϊόντα που καταναλώνονται ευρέως σε μεγάλες ποσότητες, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, το πράσινο τσάι, το μαύρο τσάι, το κόκκινο κρασί, ο καφές, η σοκολάτα, οι ελιές, τα εσπεριδοειδή, η σόγια και το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Επίσης, τα βότανα και μπαχαρικά, οι ξηροί καρποί και τα φύκια είναι επίσης δυνητικά σημαντικά για την παροχή ορισμένων πολυφαινολών (D'Archivio *et al.* 2010). Στην ανθρώπινη διατροφή, θεωρούνται η πιο άφθονη πηγή αντιοξειδωτικών.

Πιστεύεται ότι η συνολική περιεκτικότητα πολυφαινολών στα φυτά υποτιμάται, καθώς πολλές από τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά και τα παράγωγά τους δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί, ξεφεύγοντας από τις μεθόδους και τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται, καθώς και η σύσταση σε πολυφαινόλες για τα περισσότερα φρούτα και αρκετών ποικιλιών σιτηρών δεν είναι ακόμα γνωστή.

1.6.1 Φυσικές Ιδιότητες

Είναι χαμηλού μοριακού βάρους. Συνήθως σε υγρή μορφή ή σε στερεή με χαμηλό σημείο τήξεως. Λόγω των δεσμών υδρογόνου, οι φαινόλες μικρού μοριακού βάρους, είναι υδατοδιαλυτές. Τείνουν να έχουν υψηλότερα σημεία βρασμού, από τις αλκοόλες ίδιου μοριακού βάρους, λόγω του ισχυρότερου δεσμού υδρογόνου που έχουν. Επίσης, υπάρχουν και λιποδιαλυτές πολυφαινόλες μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Διατηρούνται καλύτερα μέσα στον ατμό παρά μετά από τηγάνισμα.

1.6.2 Χημική Δομή Και Τάξεις Πολυφαινολών

Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε διάφορα φυτικά είδη. Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλανίνη, ή μια κοντινή προδρόμη ένωση, το σικιμικό οξύ. Οι

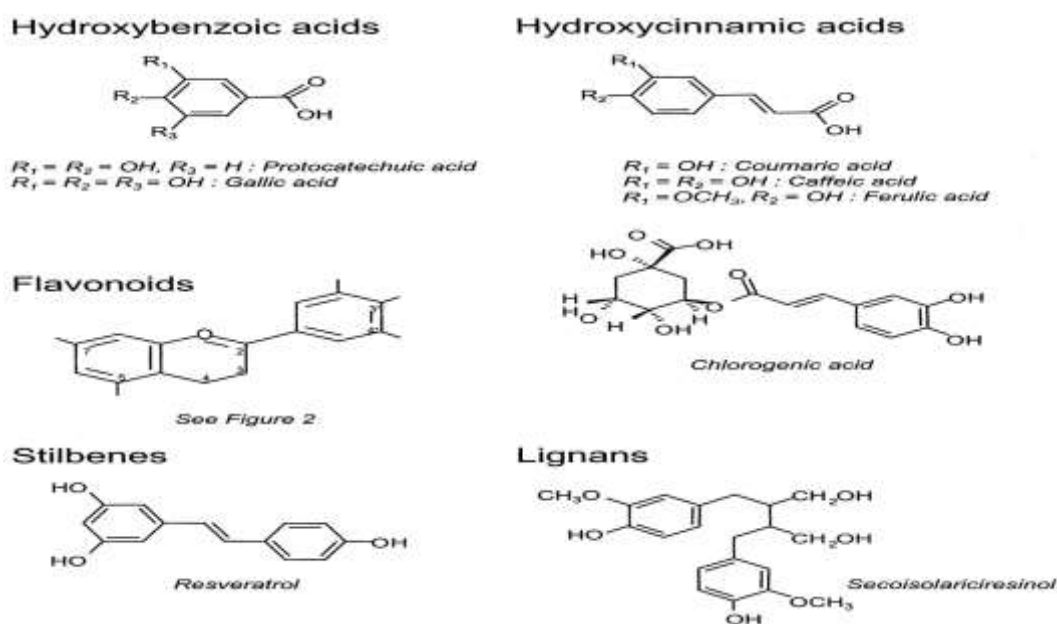
πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι ταννίνες. Ανευρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτης. Η γλυκοζυλίωση αυξάνει τη διαλυτότητα των πολυφαινοών. Η γλυκόζη είναι ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων, αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη, καθώς και γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια. Παράλληλα, κατέχουν υψηλή συγγένεια δέσμευσης με τις πρωτεΐνες, σχηματίζοντας διαλυτά ή αδιάλυτα σύμπλοκα μαζί τους (Papadopoulou and Frazier 2004).

Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε διαφορετικές κατηγορίες (Manach *et al.* 2005), ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων στη δομή τους, καθώς και τα δομικά στοιχεία και τους υποκαταστάτες που προσδένονται στο δακτυλίδι τους. Ως εκ τούτου, προσδιορίζονται δύο κύριες ομάδες: τα φλαβονοειδή και οι μη φλαβονοειδείς ομάδες.

A) Φλαβονοειδή: Έχουν μια κοινή δομή, που αποτελείται από δύο δακτύλιους, οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με 3 άτομα άνθρακα σχηματίζοντας έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Έτσι, μπορούν να διαιρεθούν σε 6 υποκατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του ετερόκυκλου που εμπλέκεται. Αυτές είναι οι: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες (κατεχίνες, προανθοκυανιδίνες) (Manach *et al.* 2004; Han *et al.* 2007). Υπάρχουν σε κόκκινες, μπλε και μωβ αποχρώσεις και αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων που συναντάμε στην ανθρώπινη διατροφή. Τρόφιμα με υψηλή σύσταση σε φλαβονοειδή θεωρούνται το κόκκινο και πράσινο τσάι, η μαύρη σοκολάτα, τα βατόμουρα, τα κρεμμύδια, ο μαϊντανός, τα εσπεριδοειδή, οι μπανάνες και το κόκκινο κρασί (Harnly *et al.* 2006). Έρευνες έδειξαν ότι είναι ιδιαίτερα ευεργετικά ενάντια στον καρκίνο, τις φλεγμονές, το οξειδωτικό στρες και τις καρδιαγγειακές νόσους.

B) Μη φλαβονοειδή: Είναι κυρίως τα φαινολικά οξέα, οι λιγνάνες και τα στυλβένια. Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (7 άτομα άνθρακα) και του κινamikού οξέος (9 άτομα άνθρακα) (Manach *et al.* 2004) και βρίσκονται κυρίως στα μήλα, τις φράουλες, τα κεράσια, τα ακτινίδια, τα κρεμμύδια, τον καφέ, το τσάι, τα βατόμουρα, η βρώμη, το κόκκινο κρασί και άλλα. Χαρακτηρίζονται από

αυξημένες αντικές, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Παραδείγματα φαινολικών οξέων είναι το καφεϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ. Οι λιγνάνες περιέχονται σε διάφορα δημητριακά, τη σόγια, το βερίκοκο, το μπρόκολο, το λιναρόσπορο και το λάχανο. Μελέτες δείχνουν ότι παίζουν προστατευτικό ρόλο σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, η οστεοπόρωση και η καρδιαγγειακή νόσος, αλλά ακόμα δεν έχουμε σαφή αποτελέσματα (Adlercreutz 2007). Τα στυλβένια, τέλος, έχουν βρεθεί σε μικρές ποσότητες στην διατροφή του ανθρώπου. Το πιο γνωστό στυλβένιο είναι η ρεσβερατρόλη, μια φυτοαλεξίνη, η οποία οξειδώνεται εύκολα και είναι δύσκολο να παραμείνει καθαρή επί μακρό χρονικό διάστημα. Βρίσκεται κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις στον φλοιό των σταφυλιών και ιδιαίτερα των κόκκινων σταφυλιών, στα φύλλα ευκαλύπτου και ελάτου, στους ξηρούς καρπούς, στα μούρα (Soleas *et al.* 1997). Θεωρούνται ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά του Alzheimer, του καρκίνου, του σακχαρώδους διαβήτη και των καρδιαγγειακών νόσων. Βρίσκεται και σε μικρές ποσότητες στο κόκκινο κρασί (Manach *et al.* 2004) γι' αυτό και σχετίζεται άμεσα με το «Γαλλικό παράδοξο».



Εικόνα 12: Είδη πολυφαινολών.

1.6.3 Το «Γαλλικό Παράδοξο»

Το 1992 οι γιατροί Renaud και De Lorgeril καθιέρωσαν με μία εργασία τους στο Lancet (από τα πλέον έγκυρα ιατρικά περιοδικά) τον όρο «Γαλλικό παράδοξο» ("French Paradox"). Ως «Γαλλικό παράδοξο» εννοούμε τη φαινομενική συμβατότητα

δίαιτας υψηλής σε λιπαρά με χαμηλή συχνότητα στεφανιαίας αρτηριοσκλήρυνσης. Από στατιστικές έρευνες είχε διαπιστωθεί ότι οι Γάλλοι διέτρεχαν μικρότερο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα (ισχαιμικά επεισόδια) σε σχέση με άλλους Βορειοευρωπαίους, αν και κατανάλωναν περισσότερο κρέας και λιπαρές ύλες κατά κεφαλήν. Η διαπίστωση αναφερόταν για πολλά χρόνια σε εφημερίδες και περιοδικά. Ως αποτέλεσμα, οι πωλήσεις κόκκινου κρασιού αυξήθηκαν δραματικά σε σχέση με το λευκό κρασί, ενώ συγχρόνως δημιουργήθηκε η μάλλον αφελής εντύπωση ότι "όσο πιο πολύ κόκκινο κρασί τόσο το καλύτερο", που μπορεί να οδηγήσει στον αλκοολισμό με αρκετά οδυνηρές συνέπειες. Τελικά, λεπτομερέστερες έρευνες και κλινικές έρευνες έδειξαν ότι δεν είναι μόνο το κρασί αλλά και μία σειρά διατροφικών συνηθειών και άσκησης σε καθημερινή βάση που δημιουργεί τις προϋποθέσεις για μικρότερο κίνδυνο καρδιαγγειακών νόσων.

1.6.4 Φυτικές Πολυφαινόλες – Φυσιολογικός Ρόλος

Στα φυτά έχουν βρεθεί περισσότερες από 4000 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις. Θεωρούνται προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Οι φυτικές πολυφαινόλες ευθύνονται για την απελευθέρωση και καταστολή των αυξητικών ορμονών (π.χ. αυξίνη), την προστασία ενάντια στην ιονίζουσα ακτινοβολία UV, την παροχή οργανοληπτικών ιδιοτήτων που αποτρέπουν τα φυτοφάγα ζώα στο να τα καταναλώσουν, την πρόληψη από μικροβιακές λοιμώξεις (φυτοαλεξίνες) και αποτελούν μόρια σηματοδότησης της ωρίμανσης καθώς και άλλων αναπτυξιακών διαδικασιών μέσω της ρύθμισης στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (Lattanzio *et al.* 2006). Στα φρούτα και λαχανικά παρέχουν το φωτεινό χρώμα (φυτικές χρωστικές), το οποίο διευκολύνει τη γονιμοποίηση των φυτών, προσελκύοντας τα έντομα επικονιαστές. Επιπρόσθετα, προσδίδουν στα τρόφιμα και στα ποτά την χαρακτηριστική πικρή γεύση και τη στυφότητα, ενώ η αιτία που αναπτύσσουν τις επιθυμητές οργανοληπτικές ιδιότητές τους είναι η εμπλοκή τους σε οξειδωτικές μεταβολές. Επιπλέον, λειτουργούν ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα που είναι τοξικά για τα φυτά και εμπλέκονται στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του καθορισμού του φύλου και της φωτοσύνθεσης (Manach *et al.* 2004; Di Carlo *et al.* 1999; Harborne 1986). Τέλος, σε ορισμένα είδη φυτών έχουν την ικανότητα να παρέχουν προστασία έναντι της σήψης.

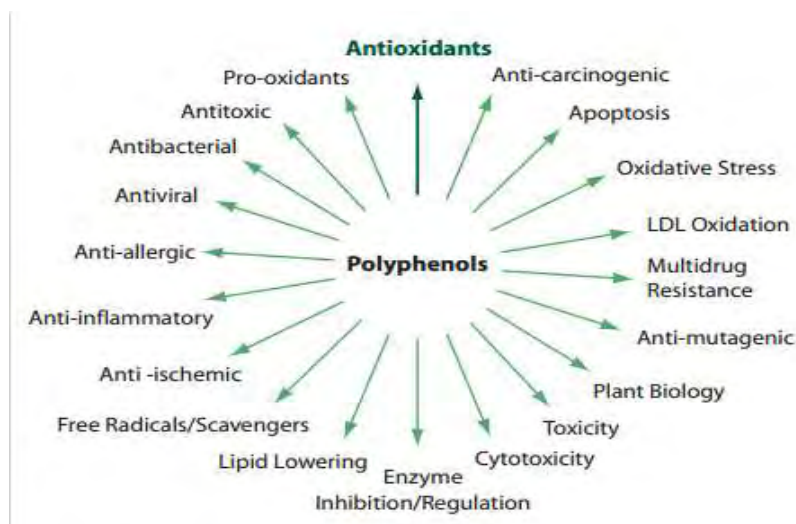
1.6.5 Ευεργετικές Επιδράσεις Πολυφαινολών Στην Υγεία

Οι πολυφαινόλες θεωρούνται μη θρεπτικά συστατικά, τα οποία όμως παρεμβαίνουν στην απορρόφηση απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, όπως ο σίδηρος και άλλα μεταλλικά ιόντα, και στη δέσμευση πεπτικών ενζύμων και πρωτεϊνών. Οι επιπτώσεις τους στην υγεία εξαρτώνται από το ποσό της πρόσληψής τους και από τη βιοδιαθεσιμότητά τους, η οποία ποικίλλει. Γενικώς, έχουν γίνει πολλές έρευνες σχετικά με τις ενδεχομένες ευεργετικές επιδράσεις τους (Mennen *et al.* 2005).

Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες, δίνοντας σε αυτές ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου. Μ' αυτόν τον τρόπο, καταστέλλουν την διάδοση των ελεύθερων ριζών (συμβαίνει μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης), μέσω της αναστολής ή απενεργοποίησης των ROS. Πιο συχνά, δρουν ως άμεσοι δευσμεντές ριζών των αλυσιδωτών αντιδράσεων υπεροξειδωσής των λιπιδίων, με αποτέλεσμα να τις σταματούν, ενώ οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε σταθερές ρίζες (λιγότερο δραστικές). Επιπλέον, οι πολυφαινόλες δρουν και ως χηλικές ενώσεις, καθώς δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος Fe^{2+} , μειώνοντας το ποσοστό της αντίδρασης Fenton και εμποδίζοντας την οξειδωση που συμβαίνει από τις πολύ δραστικές OH^{\bullet} . Επιπρόσθετα, μπορούν να δράσουν ως συν-αντιοξειδωτικά, αναγεννώντας βασικές βιταμίνες, αναστέλλοντας την οξειδάση της ξανθίνης, αλλά και αυξάνοντας διάφορα ενδογενή αντιοξειδωτικά, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση. Από την άλλη πλευρά, όμως, δεδομένου ότι οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες, σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορεί να αποκτήσουν και προ-οξειδωτική ικανότητα, κάτι που φανερώνει ότι η δράση τους είναι δοσο-εξαρτώμενη. Κατά συνέπεια, πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες, ώστε να δειχθεί η απαιτούμενη δοσολογία πολυφαινολών που χρειάζεται ο οργανισμός και η οποία θα προκαλεί περισσότερο αντιοξειδωτική παρά προ-οξειδωτική δραστηριότητα και θα καθίσταται ευεργετική για τον οργανισμό (Bouayed & Bohn 2010; Tsao 2010; Scalbert *et al.* 2005).

Πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινα καλλιεργούμενα κύτταρα έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες παίζουν προστατευτικό ρόλο ενάντια στον καρκίνο, τις καρδιαγγειακές νόσους, το διαβήτη, τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και την οστεοπόρωση. Άλλες ευεργετικές επιδράσεις τους όσον αφορά την υγεία του

ανθρώπου, είναι η μείωση της πιθανότητας πρόκλησης ασθενειών της καρδιάς, ηπατικών ασθενειών, παχυσαρκίας, αθηροσκλήρωσης, διαφόρων αλλεργιών και ασθενειών του γαστρεντερικού σωλήνα (Rodrigo *et al.* 2014; Bouayed *et al.* 2011). Παρακάτω φαίνονται οι ασθένειες με τις οποίες εμπλέκονται οι πολυφαινόλες.



Εικόνα 13: Ασθένειες στις οποίες οι πολυφαινόλες έχουν ευεργετική επίδραση.

1.7Βιοδραστικές Φυτοχημικές Ένωσης

Τα τελευταία χρόνια, ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχει προσανατολιστεί στην ανάπτυξη χημειοπροστατευτικών παραγόντων που προέρχονται από τρόφιμα της καθημερινής διατροφής. Σε αυτούς τους παράγοντες ανήκουν και οι βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις. Η **χημειοπροστασία** ως όρος χρησιμοποιήθηκε πριν 35 χρόνια από τον Lee Wattenberg και είναι η χρήση φυσικών ή συνθετικών ουσιών για την πρόληψη ασθενειών και μολύνσεων (Kushi *et al.* 2012; Schwartz 2014; Baliga *et al.* 2011; Wang *et al.* 2012).

Ο όρος **βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις** αναφέρεται σε ουσίες φυτικής προέλευσης που βρίσκονται στα τρόφιμα και έχουν ιδιότητες που τους προσδίδουν την ικανότητα να δρουν προστατευτικά σε χρόνιες παθήσεις (Bidlack *et al.* 2000; Meskin *et al.* 2002). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες έχουν αποδοθεί στις περιεχόμενες φυτοχημικές ενώσεις (Kris-Etherton *et al.* 2002). Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν τις κυριότερες βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων και είναι εκείνες οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενέστερα για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Bidlack *et al.* 2000).

1.7.1 Τα Σταφύλια Και Οι Βιολογικές Τους Ιδιότητες

Τα σταφύλια έχουν μακρά ιστορία στην ανθρωπότητα, καθώς τόσο οι αρχαίοι Έλληνες όσο και οι Ρωμαίοι τα χρησιμοποιούσαν στην παραγωγή οίνου. Στις μέρες μας, υπάρχουν τρία κύρια είδη σταφυλιών: τα ευρωπαϊκά σταφύλια (*Vitis vinifera*), τα σταφύλια της Βόρεια Αμερικής (*Vitis labrusca* και *Vitis rotundifolia*) και γαλλικά υβρίδια. Τα σταφύλια ταξινομούνται σε επιτραπέζια σταφύλια, σε σταφύλια που χρησιμοποιούνται στην αμπελουργία, σε σταφύδες, καθώς και σ'αυτά που περιέχουν βρώσιμους σπόρους και σ'αυτά που είναι άσπορα. Επίσης, χωρίζονται με βάση το χρώμα τους σε πράσινο, κόκκινο και μωβ, ενώ στην Ελλάδα η πιο γνωστή ποικιλία σταφυλιού είναι η σουλτανίνα Κορινθίας. Τα θρεπτικά συστατικά που περιέχονται στα σταφύλια είναι άφθονα και περιλαμβάνουν διάφορες βιταμίνες (Α, Β, C), ανόργανα άλατα, υδατάνθρακες, βρώσιμες ίνες και φυτοχημικά (Xia *et al.* 2010).

Οι πολυφαινόλες είναι τα πιο σημαντικά συστατικά που εμπεριέχονται στο σταφύλι, διότι διαθέτουν πολλές βιολογικές ιδιότητες και προάγουν πολλά οφέλη στην υγεία. Οι πολυφαινολικές ενώσεις που περιλαμβάνονται είναι κυρίως οι ανθοκυανίνες, οι φλαβονόλες, τα στιλβένια (ρεσβερατρόλη) και φαινολικά οξέα. Οι ανθοκυανίνες (κατεχίνη, επικατεχίνη, προκυανιδίνη) είναι χρωστικές ουσίες που βρίσκονται στη φλούδα, ενώ τα φλαβονοειδή περιέχονται στους σπόρους και στα στελέχη. Οι παραπάνω πολυφαινόλες φαίνεται να βρίσκονται κυρίως στη φλούδα, στο βλαστό και στα γίγαρτα των σταφυλιών παρά στο χυμώδες τμήμα τους (Xia *et al.* 2010).

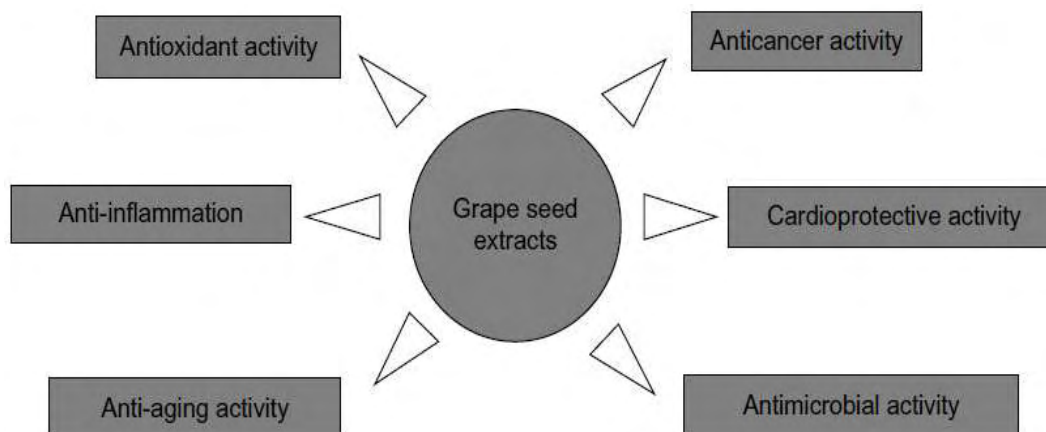
Table 1. The phenolic compounds in different parts of grape and its products.	
Resource	Phenolic compounds
seed	gallic acid, (+)-catechin, epicatechin, dimeric procyanidin, proanthocyanidins
skin	Proanthocyanidins, ellagic acid, myricetin, quercetin, kaempferol, trans-resveratrol
leaf	myricetin, ellagic acid, kaempferol, quercetin, gallic acid
stem	rutin, quercetin 3-O-glucuronide, trans-resveratrol, astilbin
raisin	hydroxycinnamic acid, hydroxymethylfurfural
red wine	malvidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside, catechin, quercetin, resveratrol, hydroxycinnamic acid

Εικόνα 14: Διάφορα πολυφαινολικά συστατικά των σταφυλιών και των παραγώγων τους.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι πολυφαινόλες των σταφυλιών έχουν άμεση συσχέτιση με το «Γαλλικό παράδοξο». Πιο συγκεκριμένα, τα σταφύλια έχουν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, αναστέλλουν της λιπιδική υπεροξειδωση και μειώνουν το σχηματισμό

υδροϋπεροξειδίων (Shanmuganayagam *et al.* 2007). Επιπρόσθετα, διαθέτουν καρδιοπροστατευτική δράση η οποία οφείλεται στην αντιθηρωματική τους δράση (εμποδίζουν το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας) μέσω της βελτίωσης της λειτουργίας του ενδοθηλίου, της αύξησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού και κατ'επέκταση της μείωσης της οξείδωσης της LDL και της ελάττωσης της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων (Vislocky & Fernandez 2010; Keevil *et al.* 2000; Xia *et al.* 2010). Περαιτέρω έρευνες απέδειξαν, ακόμη, τις ευεργετικές τους επιδράσεις στις χρόνιες εκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer), στο διαβήτη, στη γήρανση, στην αντική δραστηριότητα και στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Vislocky & Fernandez 2010). Άλλες βιολογικές ιδιότητες των σταφυλίων και του κρασιού αναφέρονται σε μελέτες που έδειξαν σημαντική αντιφλεγμονώδη επίδραση των πολυφαινόλικών συστατικών τους σε ποντίκια και ανθρώπους, φανερώνοντας έτσι την θετική τους επίδραση στην παχυσαρκία και στον σακχαρώδη διαβήτη (Chacon *et al.* 2009; Terra *et al.* 2009), καθώς και αντιμυκητιακή δραστηριότητα (Jung *et al.* 2005), αντιβακτηριακή δραστηριότητα (Baydar *et al.* 2006), δράση κατά του έλκους και δράση κατά της υπέρτασης (Soares De Moura *et al.* 2002).

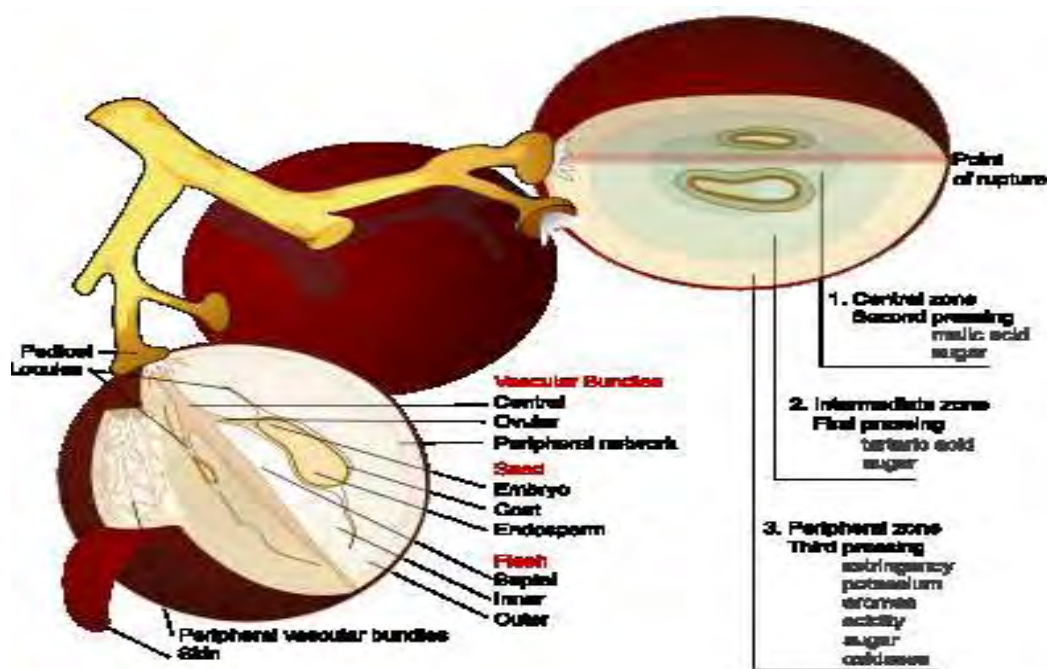
Τέλος, η πιο σημαντική πολυφαινόλη των σταφυλίων είναι η ρεσβερατρόλη, διότι φαίνεται να παρουσιάζει χημειοπροστατευτική καρκινική δραστηριότητα (Kaur *et al.* 2009), κάτι το οποίο προσδιορίστηκε σε δοκιμασίες πάνω στα τρία στάδια της καρκινογένεσης. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων αποδεικνύεται η αντικαρκινική της δράση είναι: η αναστολή των κυκλοοξυγενασών (COX-1, COX-2), η αναστολή της υδροϋπεροξειδικής λειτουργίας, η αντιμεταλλαξιγόνο δράση της και η επαγωγή των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των φαρμάκων. Επίσης, βρέθηκε να επάγει τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων προμυελωτικών λευχαιμικών κυττάρων, να αναστέλλει την ανάπτυξη προνεοπλαστικών βλαβών σε ποντίκια με καρκίνο του μαστού και να αναστέλλει την ογκογένεση σε ποντίκια με καρκίνο του δέρματος (Jang *et al.* 1997). Γενικώς, φαίνεται ότι τα σταφύλια μπορούν να ασκήσουν αντικαρκινική δράση μέσω διακοπής της κυτταρικής αύξησης, τροποποιώντας βιοχημικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Ακόμα, όμως, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες, ώστε να διευκρινιστούν οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ασκούν τη χημειοπροστατευτική τους δράση (DeFlora & Ramel 1990).



Εικόνα 15: Βιολογικές ιδιότητες των σταφυλιών.

1.7.2 Ανατομία Και Χημική Σύσταση Σταφυλιών

Το σταφύλι είναι ο καρπός του αμπελιού. Το αμπέλι αλλιώς ονομάζεται και κλήμα (*Vitis Vinifera*) και είναι αναρριχητικό φυτό. Το σταφύλι απαρτίζεται από το ξυλώδες μέρος, που ονομάζεται βόστρυχας ή τσαμπί και τις ράγες, που αποτελούν το εδώδιμο και οινοποιήσιμο τμήμα του σταφυλιού. Οι βόστρυχοι έχουν διπλό φυσιολογικό ρόλο, καθώς κρατάνε τις ράγες και μεταφέρουν τις θρεπτικές ουσίες στους καρπούς. Το βάρος τους συνήθως αποτελεί το 4% του συνολικού βάρους του σταφυλιού. Οι ράγες αποτελούνται από τα γίγαρτα (κουκούτσια), το φλοιό και τη σάρκα και καταλαμβάνουν περίπου το 96% του συνολικού βάρους του σταφυλιού. Τα στέμφυλα είναι το υπόλειμμα που μένει μετά την έκθλιψη των σταφυλιών και αποτελείται από τους βοστρύχους (κοτσάνια), τα γίγαρτα (κουκούτσια) και τους φλοιούς των σταφυλιών, ενώ περικλείει και κάποιο ποσοστό γλεύκους (αζύμωτου ή εν ζυμώσει) ή κρασιού ανάλογα με το βαθμό έκθλιψης / πίεσης τους. Η επί της εκατό αναλογία των δυο αυτών μερών του σταφυλιού δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται από την ποικιλία αυτού, τις κλιματολογικές συνθήκες, το έδαφος, την ηλικία των πρεμνών, το χρόνο του τρυγητού, την προσβολή από διάφορες ασθένειες και γενικά από κάθε παράγοντα που θα επηρέαζε το μέγεθος του βότρυ. Γενικά όσο μεγαλύτερος είναι ο βότρυς, τόσο μικρότερος είναι ο βόστρυχας σε σχέση με το σύνολο των ραγών.



Εικόνα 16: Ανατομία και σύσταση ράγας σταφυλιού.

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

1.7.3 Επίδραση Των Στεμφύλων Στο Περιβάλλον

Τα οινοποιητικά απόβλητα, λόγω όγκου και οργανικού φορτίου αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα επιβάρυνσης του περιβάλλοντος, αφού κατά τη διάρκεια της οινοποίησης παράγεται ένας πολύ μεγάλος όγκος στερεών αποβλήτων, τα στέμφυλα, που συνιστούν το 17% του βάρους των χρησιμοποιούμενων σταφυλιών. Τα στέμφυλα, λοιπόν, παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις οργανικού φορτίου, το οποίο δεν βιοαποικοδομείται εύκολα, ενώ η σημαντικότερη ρυπαντική

παράμετρος που ευθύνεται κυρίως για τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις από την τελική διάθεση των στέμφυλων σε φυσικούς αποδέκτες, είναι οι φαινόλες οι οποίες βρίσκονται σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις στα συγκεκριμένα απόβλητα, με αποτέλεσμα να δρουν βιοτοξικά. Η βιοτοξικότητά τους προκαλεί την επιβάρυνση του φυσικού περιβάλλοντος και γενικότερα προβλήματα στο οικοσύστημα.

Πιο συγκεκριμένα, το οργανικό φορτίο των στεμφύλων διαθέτει ισχυρές βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιμικροβιακή και φυτοτοξική δραστηριότητα, οι οποίες περιορίζουν τη δράση των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη βιοαποικοδόμηση. Κατά συνέπεια, η ανεξέλεγκτη εναπόθεση αυτών των υποπροϊόντων στο περιβάλλον οδηγεί στην εμφάνιση φαινομένων φυτοτοξικότητας με επακόλουθες επιπτώσεις:

A) αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών

B) ρύπανση του υδροφόρου ορίζοντα, μέσω της υποβάθμισης της ποιότητας του πόσιμου νερού

Γ) θάνατος των ευαίσθητων οργανισμών των ποταμών και των θαλασσών

Όμως τα τελευταία χρόνια ποικίλες εξειδικευμένες επιστημονικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι διάφορες βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών (αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή κ.ά.) είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν σε πλήθος εφαρμογών στη φαρμακευτική βιομηχανία, βιομηχανία καλλυντικών και τροφίμων. Έτσι, έχουμε τη δυνατότητα να επεξεργαστούμε τα στέμφυλα προς όφελός μας και παράλληλα να εξαλείψουμε τα οικολογικά προβλήματα που αυτά προκαλούν όταν εναποτίθενται ελεύθερα στο περιβάλλον. Στη συγκεκριμένη μελέτη αξιοποιήσαμε τα στέμφυλα, μέσω της χρησιμοποίησής τους για παραγωγή βιολειτουργικών ζωοτροφών υψηλής προστιθέμενης αξίας.



Εικόνα 17: Εναπόθεση των υποπροϊόντων της οινοποίησης (στέμφυλα) στο περιβάλλον.

1.8 Γενικές Πληροφορίες Για Τα Γουρούνια

Ο χοίρος (κοινώς 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 18: Γουρούνια.

Πίνακας 1: 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>

1.8.1 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 (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.

1.8.2 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 οφείλετε 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 *Escherichiacoli*
- 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.

1.8.3 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 την κατάλληλη ελευθερία κινήσεων και την 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.

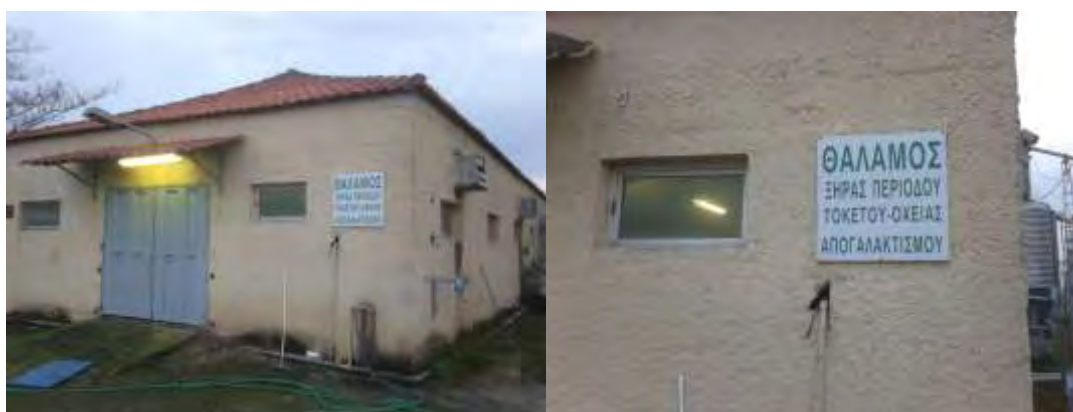
2. ΣΚΟΠΟΣ

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 βιοδραστικά 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 (τετρακέφαλος, καρδιά) και στο αίμα των νεαρών χοιριδίων.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Γενικά

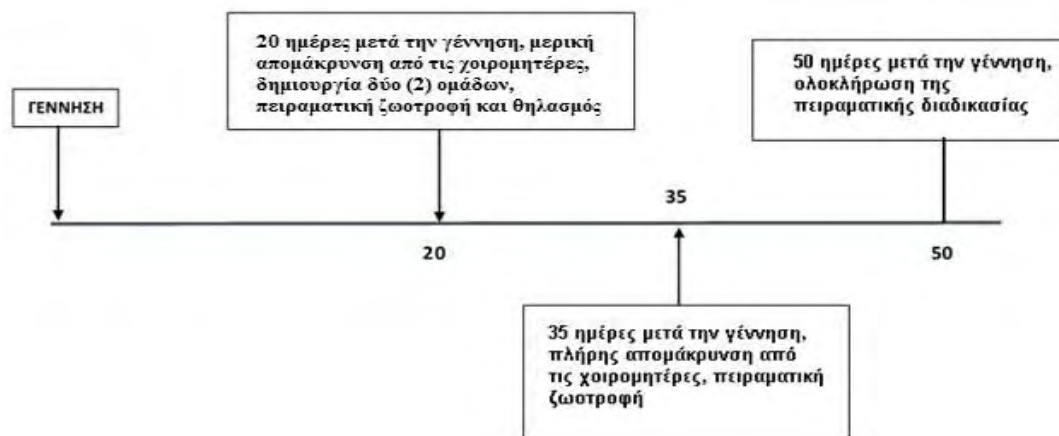
Η εκτροφή των χοιριδίων πραγματοποιήθηκε στις πειραματικές εγκαταστάσεις εκτροφής χοίρων, του ΤΕΙ Θεσσαλίας στη Λάρισα και συγκεκριμένα στους θαλάμους του κτιρίου ξηράς περιόδου-τοκετού οξείας απογαλακτισμού. Τόσο οι συνθήκες διαβίωσης τους όσο και ο τρόπος θανάτωσής τους για τη λήψη αίματος και ιστών 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 19: 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 LargeWhite – 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 20: 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 σύνθετος πειραματικό μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΜΣΖ) ανάπτυξης χοιριδίων. Στην ομάδα Β χορηγήθηκε ΜΣΖ ανάπτυξης, στο οποίο ενσωματώθηκε ενσίρωμα αραβόσιτου-στέμφυλων 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 γέννησή 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.



The linked image cannot be displayed. The file may have been moved, renamed, or deleted. Verify that the link points to the correct file and location.



Εικόνα 21: 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

Γενικά, ως ζωοτροφή, ορίζεται κάθε ύλη η οποία μετά την πρόσληψή της 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, συμπίεζοντας 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 Ενσίρωματος

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 μαραθεί γρήγορα. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3% κατά την κοπή και το φυτό θα πρέπει να μαραθεί 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 Ενσίρωματος Στεμφύλων

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

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

Μετά την ανάμειξη των συστατικών το ενσίρωμα τοποθετήθηκε σε σακούλες κενού αέρος και παρακολούθηθηκε η διαδικασία της ζύμωσης. Μετά το πέρας 2-4 ημερών (ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος), ήταν αναγκαίο οι σακούλες να ανοίγονται και να κλείνουν ξανά αεροστεγώς. Αυτή η διαδικασία που εκτελέστηκε τέσσερις (4) φορές, είναι απαραίτητη λόγω του ότι παράγεται διοξείδιο του άνθρακα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης που πραγματοποιούν τα βακτήρια, με αποτέλεσμα αν δεν αφαιρεθεί ο αέρας οι σακούλες να ανοίξουν και να έρθουν σε επαφή με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Λόγω του ότι η αντίδραση που πραγματοποιείται για την ενσίρωση του καλαμποκιού απαιτεί αναερόβιες συνθήκες, η επαφή του ενσιρώματος με τον ατμοσφαιρικό αέρα θα έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της αντίδρασης.

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

Η μέτρηση του pH έγινε με 2 μεθόδους. Στην πρώτη μέθοδο γίνεται αραιώση 1/10 του ενσιρώματος. Δηλαδή σε 1 γραμμάριο ενσιρώματος προστίθενται 9 ml απεσταγμένου νερού. Το μίγμα αναδεύεται έντονα σε vortex για τουλάχιστον 20 λεπτά. Τέλος μετρήθηκε το pH το οποίο ήταν 3,82. Με την δεύτερη μέθοδο γίνεται αραιώση 1/2 του ενσιρώματος. Δηλαδή σε 5 γραμμάρια ενσιρώματος προστίθενται 5 ml απεσταγμένου νερού. Έπειτα ακολουθεί έντονη ανάδευση σε vortex για τουλάχιστον 20 λεπτά και τέλος μετρήθηκε το pH. Το pH του ενσιρώματος με την δεύτερη μέθοδο ήταν 3,80. Όπως φαίνεται και οι δύο μέθοδοι έδωσαν παρόμοιες

τιμές pH και συνεπώς η διαδικασία της γαλακτικής ζύμωσης στο ενσίρωμα είχε ολοκληρωθεί και ήταν πλέον έτοιμο για να προστεθεί στο σιτηρέσιο.



Εικόνα 22: 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 ισορροπα ως προς τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων χοιριδίων. Η σύστασή τους περιγράφεται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 2: 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 (invitro) 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 IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών η οποία εξουδετερώνει την ρίζα (DPPH, ABTS) κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση της ουσίας. Έτσι υπολογίζοντας το IC₅₀ των ζωοτροφών μπορούμε να εκτιμήσουμε την δραστηριότητα και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

3.3 Ιστοληψία - Αιμοληψία

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**).

Υλικά:

- Μιας χρήσεως σύριγγες με βελόνα (PentaFerte®), χωρητικότητας 5 ml, που μετά τη χρήση τους απομακρύνονταν σε δοχεία περισυλλογής αιχμηρών αντικειμένων.

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

Το αίμα από τα χοιρίδια και τα πρόβατα λαμβάνονταν από τη σφαγίτιδα φλέβα, αφού είχε προηγηθεί αναισθησία και θανάτωση σύμφωνα με τους κανονισμούς περί θανάτωσης εργαστηριακών ζώων. Το αίμα μεταφέρονταν σε σωληνάρια συλλογής, που περιείχαν αντιπηκτικό και ανακατεύονταν απαλά αναστρέφοντας τον σωλήνα αρκετές φορές. Αυτό διασφάλιζε τη σωστή ανάμιξη του αντιπηκτικού με το αίμα. Τα δείγματα τοποθετούνταν σε φορητό ψυγείο που έφεραν παγοκύστες και μεταφέρονταν στο εργαστήριο άμεσα, μετά το πέρας της αιμοληψίας.

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 23: Διατήρηση και αποθήκευση των ιστών σε κασέτες.

3.3.1 Επεξεργασία αίματος

Στο εργαστήριο αμέσως μετά από κάθε αιμοληψία, εκτελούνταν επεξεργασία των δειγμάτων, σύμφωνα με την παρακάτω μέθοδο, για τη συλλογή αιμολύματος και πλάσματος και φυλάσσονταν στους -80°C μέχρι τη βιοχημική ανάλυσή τους (Εικόνα

24). Στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της καταλάσης και στο πλάσμα για τον προσδιορισμό των TBARS, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Περιγραφή Μεθόδου.

1. Τοποθετούμε τα σωληνάρια συλλογής αίματος στην φυγόκεντρο και φυγοκεντρούμε στα 1370g, για 10 λεπτά, στους 4°C.
 2. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (πλάσμα) και το χωρίζουμε σε φιαλίδια erpendorf, ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν.
 3. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετά τη φυγοκέντρωση βρίσκονται στο κάτω μέρος του falcon.
 4. Ανακινούμε βίαια και φυγοκεντρούμε στα 4020g, για 15 λεπτά, στους 4°C.
 5. Συλλέγουμε το υπερκείμενο, που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20μL).
 6. Χωρίζουμε σε erpendorf το αιμόλυμα ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν.
- Διατήρηση στους -20°C.



Εικόνα 24: Διατήρηση πλάσματος και αιμόλυματος σε φιαλίδια Eppendorf.

Στη συνέχεια καθαρίζεται το αιμόλυμα **για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης.**

1. Προσθέτουμε 500μL αιμόλυματος σε 500μL 5% TCA σε erpendorf και ανακινούμε στο vortex.
2. Φυγοκεντρούμε στα 20.000g για 5 min στους 5°C.
3. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε erpendorf και προσθέτουμε 5% TCA με την εξής αναλογία: 300μL αιμόλυματος / 90μL 5% TCA και ανακινούμε στο vortex.
4. Φυγοκεντρούμε στα 20.000g για 5 min στους 5°C.

5. Μεταφέρουμε το καθαρό υπερκείμενο σε erpendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στον καταψύκτη και θα χρησιμοποιηθούν για την μέτρηση της γλουταθειόνης.

3.3.2 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 το ψυγείο 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 25: 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 -80°C μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.



Εικόνα 26: Ο ομογενοποιητής.

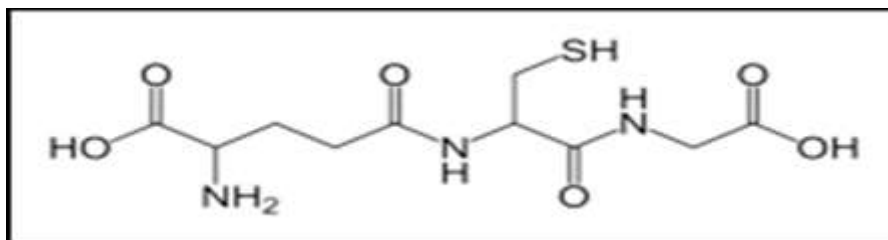
3.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες

3.4.1 Γενικά

Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστηριότητα 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 1-15mM. 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 *et al.* 2003).

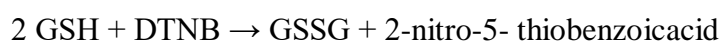


Εικόνα 27: Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης.

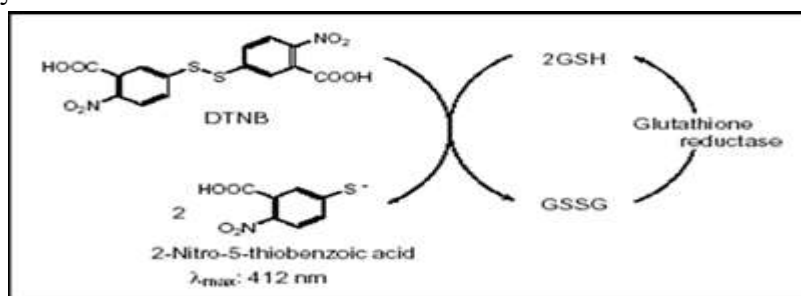
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battinet *al.* 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων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

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειόδυο νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετριέται σε αιμόλυμα. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm (Reddy 2004).



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



Εικόνα 28: Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης.

Αντιδραστήρια

- **Phosphatebuffer** 67mM (pH 7,95). MB (KH_2PO_4): 136 MB (Na_2HPO_4): 178.

Για να δημιουργήσουμε 500mL από το phosphatebuffer φτιάχνουμε 25mL KH_2PO_4 (67mM) και 500mL Na_2HPO_4 (67mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε

0,227g και τα διαλύουμε σε 25mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 5,94g και τα διαλύουμε σε 475mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7,95.

- **DTNB** (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό. (39,6mg DTNB σε 100ml του 1% διαλύματος του κιτρικού νατρίου, για να δώσει μία συγκέντρωση του 1mM). 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.

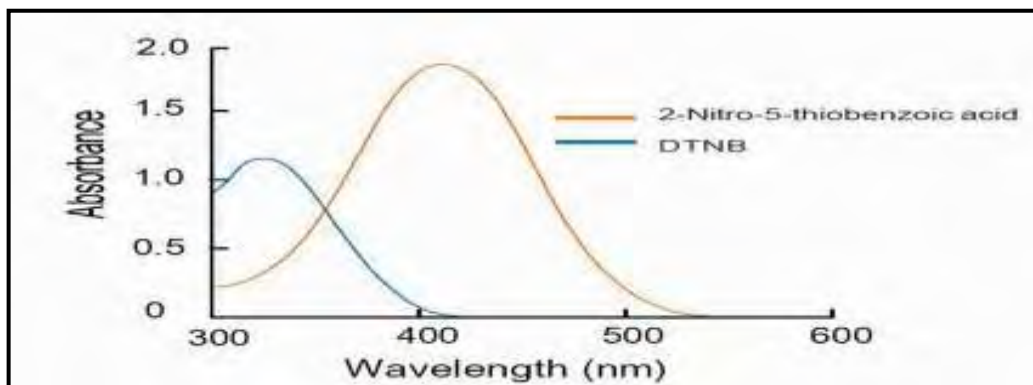
Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς και ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

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

Πίνακας 3: 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 ή Αίμα	-	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 (Rolandetal. 1952).



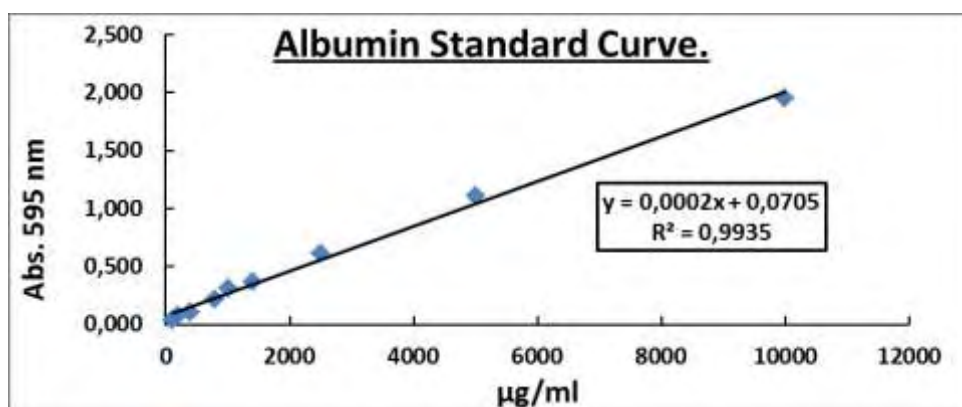
Εικόνα 29: Φάσμα απορρόφησης του 2-νιτρο-5-θεοβενζοϊκού οξέος (DojindoMolecularTechnologies).

Α)Υπολογισμοίγια ιστούς

Δραστικότητα GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg total prot.}$) = $(\text{Abs δείγματος} - \Delta\text{abstυφλού}/13.6) \times 2 \times 3$ (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 Bradfordtest, λαμβάνονταν η τιμή της απορρόφησης και υπολογίζονταν αντίστοιχα η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης

B) Υπολογισμοί για αιρυθροκυτταρικό αιμόλυμα

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

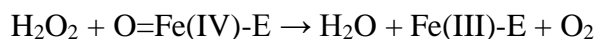
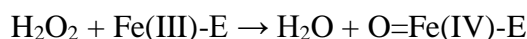
Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10×2 , τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων. Έτσι λαμβάνουμε την συγκέντρωση της GSH ανά γραμμάριο αιμοσφαιρίνης. GSH (mmol/ g Hb).

3.4.3 Δραστικότητα της Καταλάσης

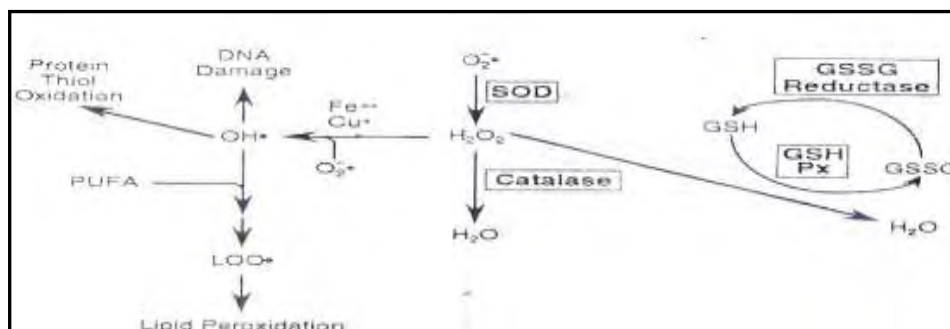
Αρχή της μεθόδου

Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Για να διαχειριστεί αυτό το πρόβλημα, η ενζυμική καταλάση καταλύει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου, σε αβλαβή οξυγόνο και νερό (Chelikani *et al.* 2004). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τεραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων (Boon *et al.* 2007). Στο τετρεμερές 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 προσδεσμένη στο ένζυμο).



Εικόνα 30: Μονοπάτι αναγωγής του H^2O^2 σε H^2O .

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

CAT



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

Διαλύματα

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

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

Πίνακας 4: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης σε ιστό.

	Δείγμα
Phosphatebuffer 67 mM, pH 7.4	2955 μL
Ομογενοποιημένος Ιστός	40 μL

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

	Δείγμα
Phosphatebuffer 67 mM, pH 7.4	2991 μL
αιμόλυμα αραιωμένο 1/10	4 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 μ L 30% H₂O₂ 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/mgHb) = (Δ Abs_{sample} per min / 40) x (75 x 1000 x 3 x 2) / Conc. Protein (mg/mL).

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

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

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

B) Υπολογισμοί για ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

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

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

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

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

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

3.4.4 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.

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

Αρχή της μεθόδου

Η TAC 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 Janaszewska και Bartosz (Janaszewska & Bartosz 2002). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

Διαλύματα

- **Phosphatebuffer 10mM (pH 7.4).** MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178. Για να φτιάξουμε 500mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100mL KH_2PO_4 (10mM) και 400mL Na_2HPO_4 (10mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.136g και τα διαλύουμε σε 100mL νερό. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 0.712g και τα διαλύουμε σε 400mL 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 0.1mM.** MB: 394.32

Διαλύουμε 0.02g DPPH σε 5mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200μL του 10mM διαλύματος του DPPH σε 19.8mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα, συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο). Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5mL 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 10mM.** Είναι έτοιμο προς χρήση.

Φυσιολογικά, η τιμή της απορρόφησης για το δείγμα που περιέχει το ασκορβικό οξύ (PositiveControl) 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 και πλάσμα

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

Πίνακας 6: 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

Πίνακας 7: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC σε πλάσμα.

	Blank	Θετικός control	Δείγμα
Phosphatebuffer 10 mM, pH 7.4	500 μ L	495 μ L	480 μ L
DPPH 0.1 mM	500 μ L	500 μ L	500 μ L
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	-	5 μ L	-
Πλάσμα	-	-	20 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 20000g στους 25°C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρουμε 900mL 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 αραιώση του ιστού στην κυψελίδα είναι 25 πλάσια ($1000\mu\text{L}$ στην κυψελίδα / $40\mu\text{L}$ ιστού του δείγματος στην κυψελίδα = 25).

δ) Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και 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: $\text{mmol DPPH} / \text{mg total prot}$.

B) Υπολογισμοί για πλάσμα

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

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

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

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

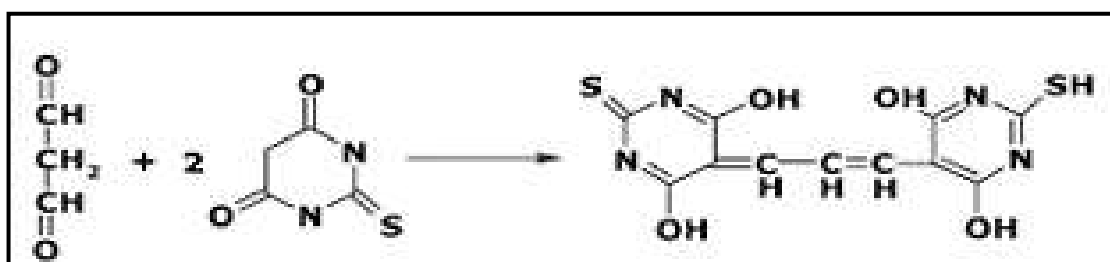
δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

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

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



Εικόνα 31: Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA.

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

Διαλύματα

- **Tris-HCl 200mM (pH 7.4).** MB (Tris): 121.14. MB (HCl): 36.46 (stock 37%) [10.1 N]. Για να παρασκευάσουμε ≈100mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25mL Tris (200mM) και 42mL HCl (0.1N). Για το Tris ζυγίζουμε 0.61g και τα διαλύουμε

σε 25mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0.42mL του stock 37% HCl (10.1N) σε 42mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100mL. 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 2.84g Na₂SO₄ και 0.08g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10mL 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 35g TCA και τα διαλύουμε σε απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

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

Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς και πλάσμα

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15ml) προσθέτουμε 100μL ομογενοποιημένου ιστού ή πλάσματος για τα δείγματα και απεσταγμένο νερό για το τυφλό. Προσθέτουμε 500μL TCA 35% και 500μL Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1mL 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 1mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1mL σε eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200g (10000 rpm) στους 25°C για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900μL 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 (3100μL) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (100μL) (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 αραίωση 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.

B) Υπολογισμοί για πλάσμα

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

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

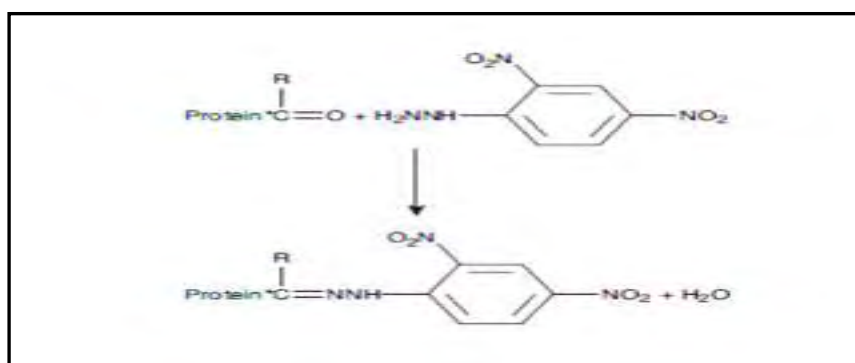
3.4.6 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια

Αρχή της μεθόδου

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

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

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



Εικόνα 32: Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δινιτρυφαινυλαδραζίνη) και σχηματισμός του δινιτροφαινυλδραζονίου.

Διαλύματα

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

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

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

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

- **Ουρία 5M (pH 2.3).** (MB: 60.06)

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

Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς και πλάσμα

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

Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Κατόπιν, προσθέτουμε στο ίζημα (πελέτα) 0.5mL του 14mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5N HCL) για τα δείγματα ή 0.5mL 2.5N 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 15.000g για 5 λεπτά στους 4°C.

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

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 0.5mL αιθανόλης και 0.5mL οξικού ειθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15.000g 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 1mL 5M 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 15000g για 3 λεπτά στους 4°C. Τέλος, μεταφέρουμε με την πιπέτα 900mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.

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

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

B) Υπολογισμοί για πλάσμα

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = Αδείγματος – Ατυφλού / 0.022 x 1000/50 x 2. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22mM x cm⁻¹. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραιώσης (1000μL στην κυψελίδα /50μL δείγματος). X 2 διότι προσθέτουμε (αραιώση 1/1 TCA / TCA 20% αρχικά).

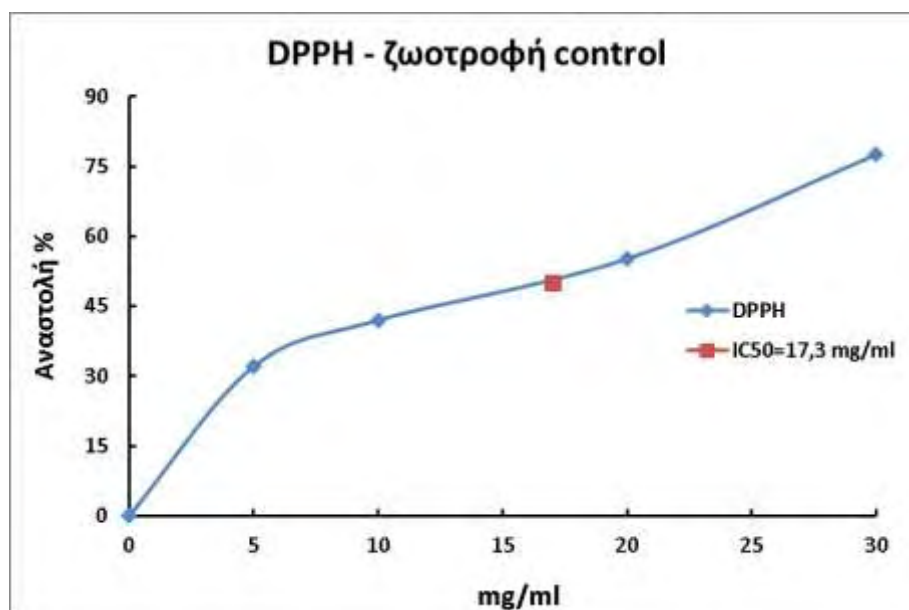
3.4.7 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

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 Arapid sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein- Dye Binding. Anal Biochem 72:248-254).

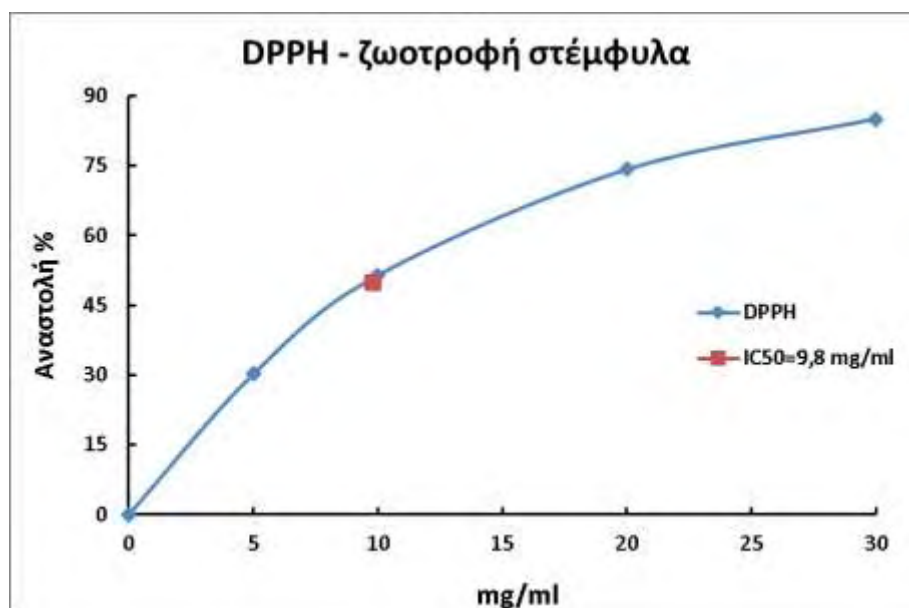
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

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.

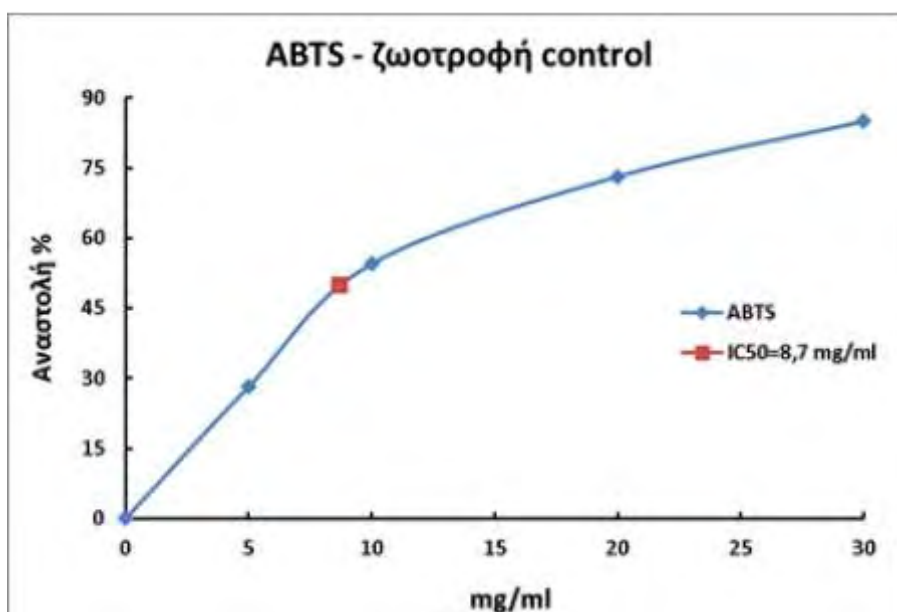


Διάγραμμα 2: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.

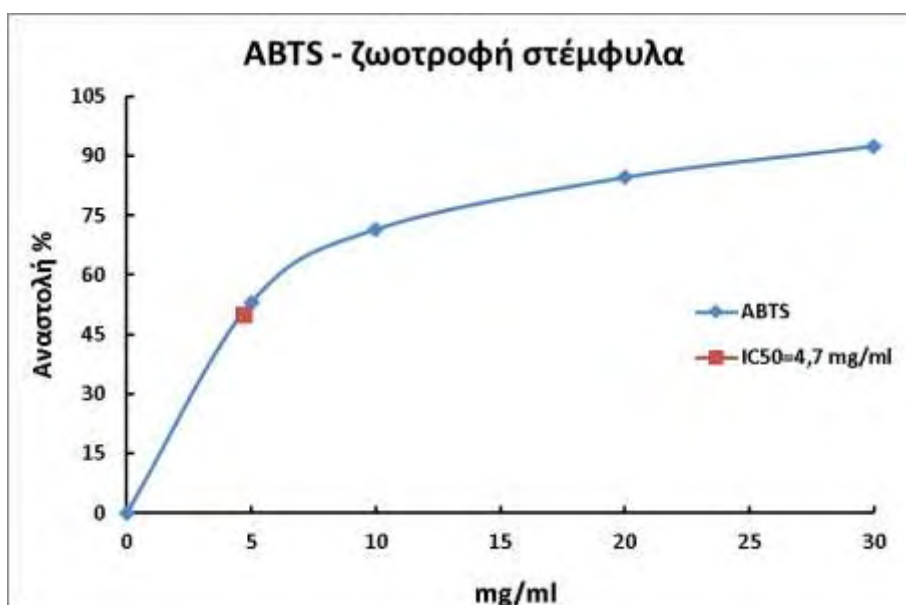


Διάγραμμα 3: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με στέμφυλα.

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 $IC_{50} = 9,8\text{mg/ml}$, ενώ η ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου παρουσιάζει τιμή $IC_{50} = 17,3\text{mg/ml}$. 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.



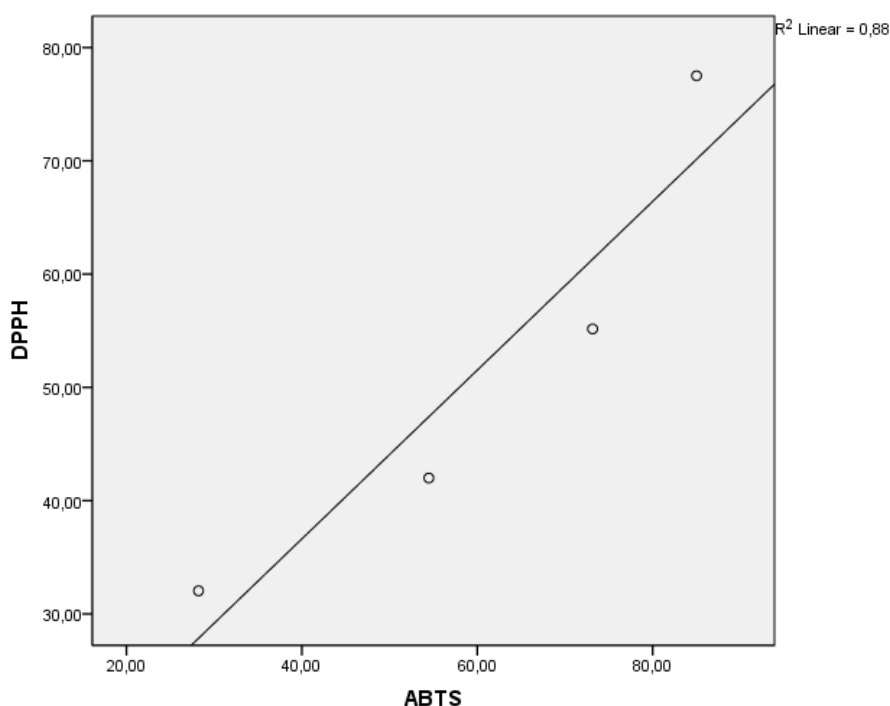
Διάγραμμα 5: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένης με στέμφυλα.

Με την μέθοδο της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS (Διάγραμμα 4, 5) οι τιμές IC_{50} είναι πιο χαμηλές ($IC_{50} = 8,7\text{mg/ml}$ (ομάδα ελέγχου) και $IC_{50} = 4,7\text{mg/ml}$) 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 δραστηριότητα 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

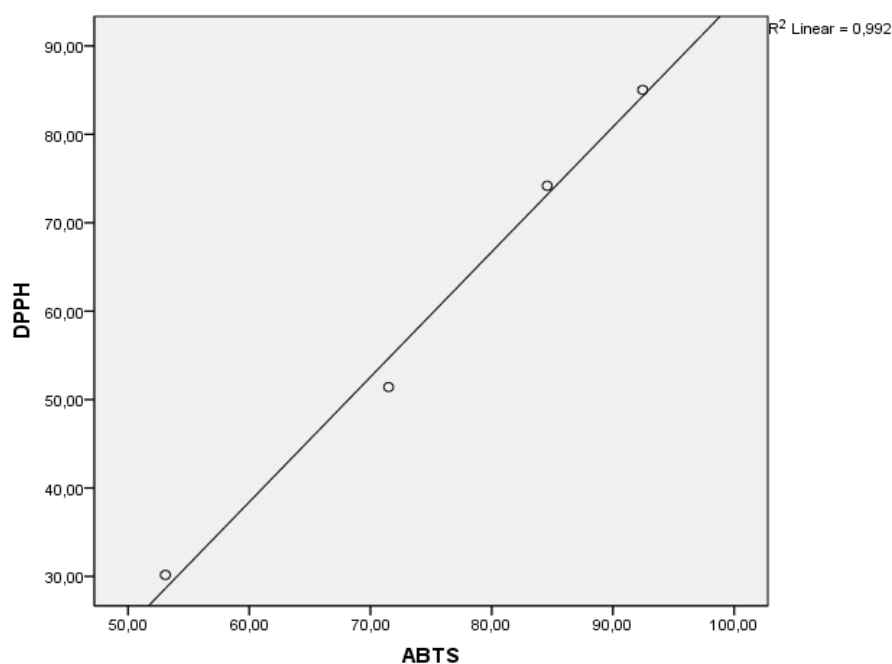
Για την συσχέτιση των δύο ζωοτροφών και τον προσδιορισμό της ικανότητάς τους να εξουδετερώνουν και τις δύο ρίζες DPPH και ABTS, πραγματοποιήθηκε υπολογισμός του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα στατιστικής SPSS18. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της στατιστικής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

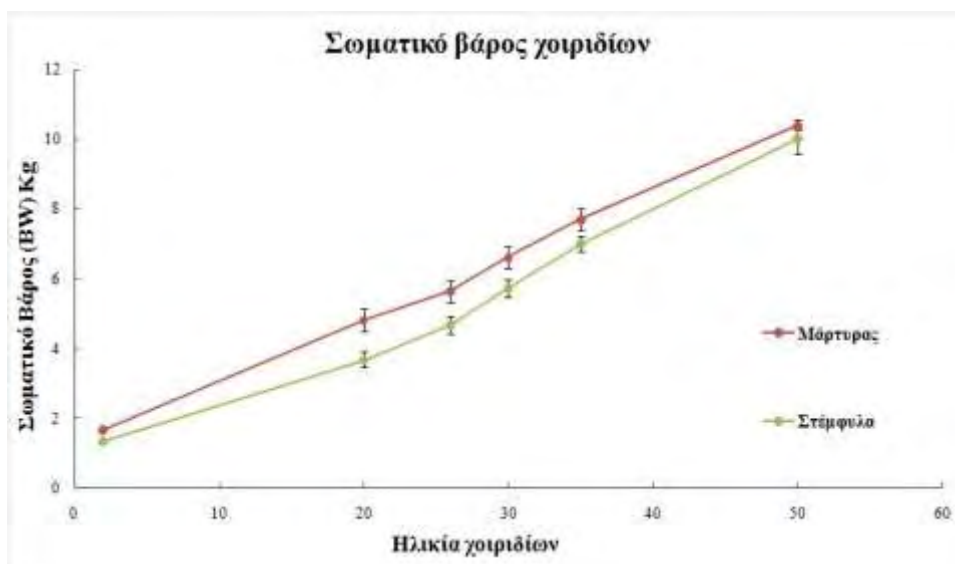
Δεδομένου ότι η διατροφή των χοιριδίων ήταν ομαδική, δεν είναι δυνατή η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της κατανάλωσης της τροφής. Ωστόσο, από το διάγραμμα 8 παρατηρείται ότι η κατανάλωση είναι περίπου ίδια μεταξύ των δύο ομάδων σε όλη τη διάρκεια του πειραματισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά 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 8: Σωματικά βάρη των χοιριδίων κατά την περίοδο απογαλακτισμού (mean \pm sem)

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

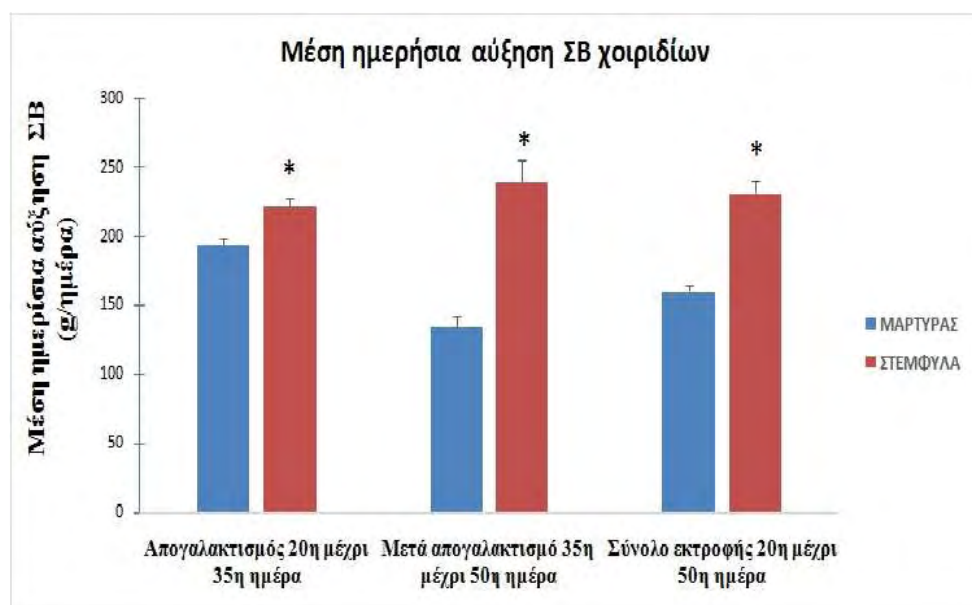
3) Ημερήσια αύξηση σωματικού βάρους (ADG)

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	<0,001
ADG Μετά Απογαλακτισμό	134,65 ^a ±7,437	238,88 ^b ±16,632	<0,001
ADG Σύνολο Εκτροφής	160,45 ^a ±4,091	231,66 ^b ±8,286	<0,001

Διαφορετικοί εκθέτες (a,b,c) δηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$ και $p < 0,001$.



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 οиноποιίας (ομάδα

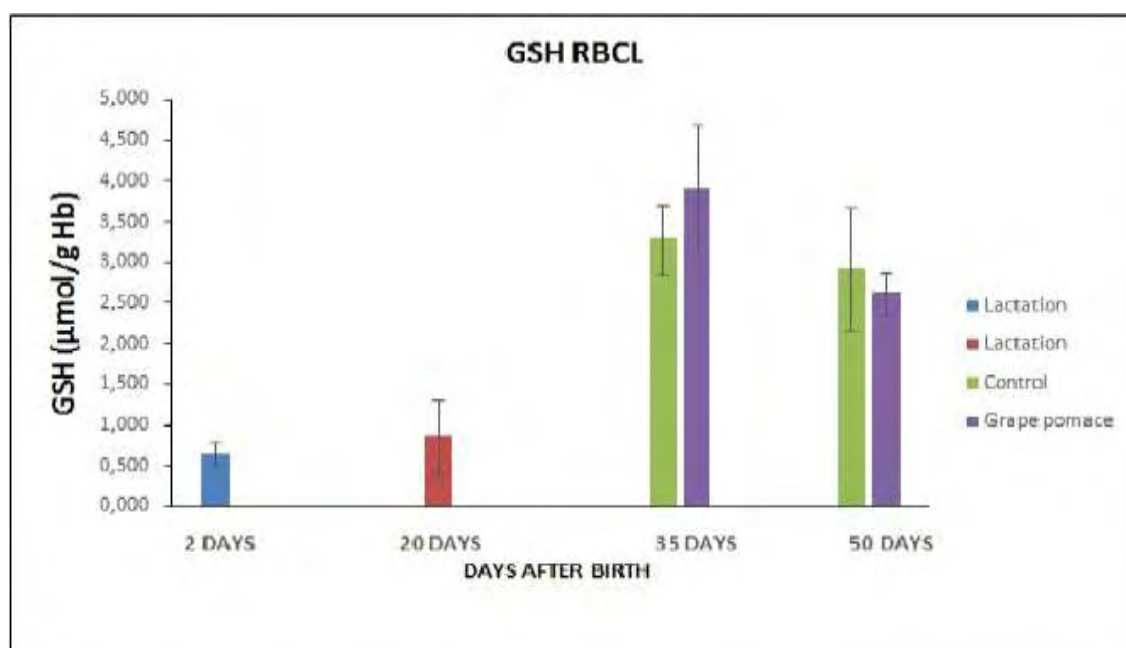
Ενσιρώματος Στέμφυλων). Επίσης, στο σύνολο της πειραματικής διαδικασίας παρατηρείται ότι ο ημερήσιος ρυθμός ανάπτυξης της ομάδας στεμφύλων διαφέρει και είναι στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερος ($p < 0,05$) από την ομάδα του μάρτυρα.

4.3 Αποτελέσματα μετρήσεων δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα και στους ιστούς (καρδιά, τετρακέφαλος) 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, εκτελέστηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (One-Way ANOVA), με την επιλογή των παραμέτρων post-hocLSD, Tukey, Dunnett'sT3, προσδιορίζοντας το επίπεδο σημαντικότητας σε $*p < 0.05$.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των πέντε (5) δεικτών οξειδωτικού στρες για τους ιστούς και το αίμα των χοίρων και των προβάτων, φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα. Η σύγκριση πραγματοποιείται στις ομάδες control και στις πολυφαινολικές ομάδες (στέμφυλα οινοποιίας, grapepomace) 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) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα



Διάγραμμα 11: Τα επίπεδα δραστικότητας της γλουταθειόνης (GSH) στο αιμόλυμα διαφορετικών ομάδων ηλικίας χοίρων κρεατοπαραγωγής.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή των επιπέδων GSH ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 10).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (graperomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή των επιπέδων GSH ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 10).

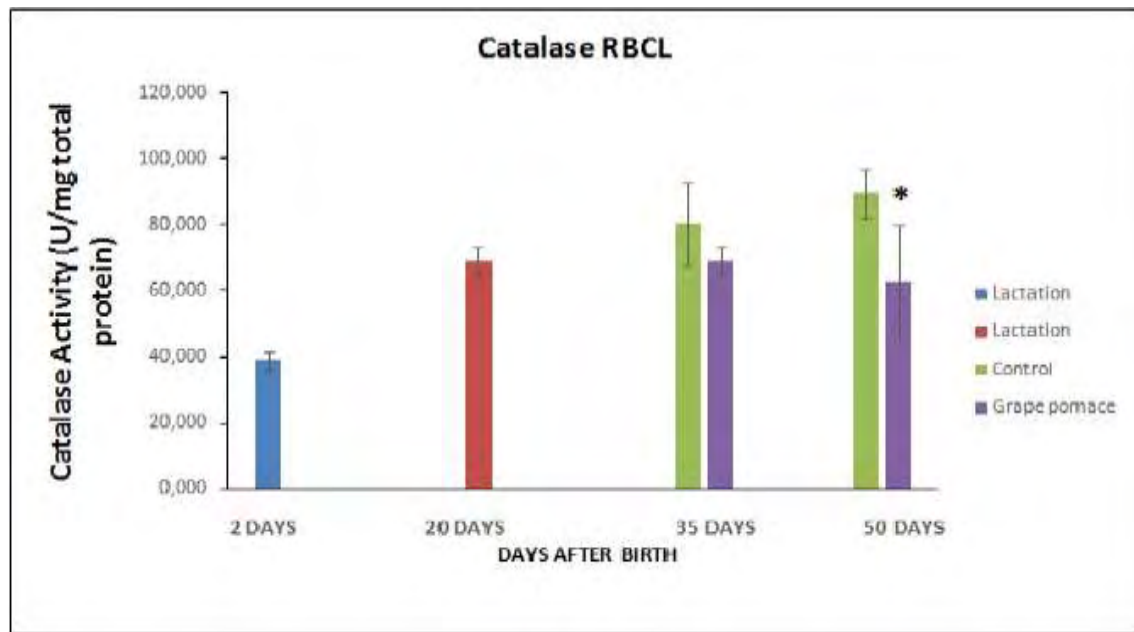
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 11, δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα GSH τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες (πίνακας 10).

Πίνακας 10: Επίπεδα γλουταθειόνης στο αιμόλυμα στις ομάδες control και στις πολυφαινολικές ομάδες.

GSH (μmol/mgprotein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	3,287 ± 1,440	2,919 ± 0,757
Grape pomace	3,906 ± 0,779	2,615 ± 0,266

4.3.2 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα



Διάγραμμα 12: Τα επίπεδα της δραστηριότητας της καταλάσης (CAT) στο αιμόλυμα διαφορετικών ομάδων ηλικίας χοίρων κρεατοπαραγωγής.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή των επιπέδων CAT ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 11).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grapepomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή των επιπέδων CAT ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 11).

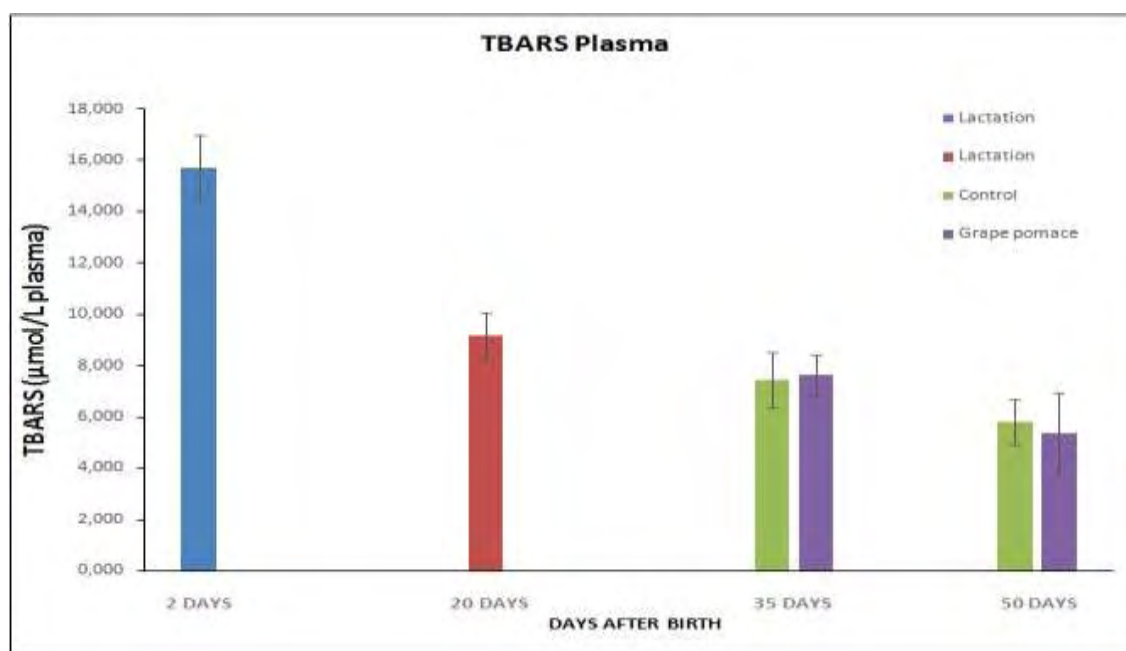
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 12, δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της CAT στις 35 ημέρες, ενώ στις 50 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική μείωση (30,17%) ($p < 0,05$)** στα επίπεδα της CAT από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα.

Πίνακας 11: Επίπεδα καταλάσης στο αιμόλυμα στις ομάδες control και στις πολυφαινολικές ομάδες.

CAT (U/mg Protein) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	80,418 \pm 12,572	89,670 \pm 7,407
Grape pomace	69,311 \pm 4,061	62,610 \pm 17,624

4.3.3 Επίπεδα των TBARS στο πλάσμα



Διάγραμμα 13: Επίπεδα των TBARS στο πλάσμα.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 12).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grapepomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 12).

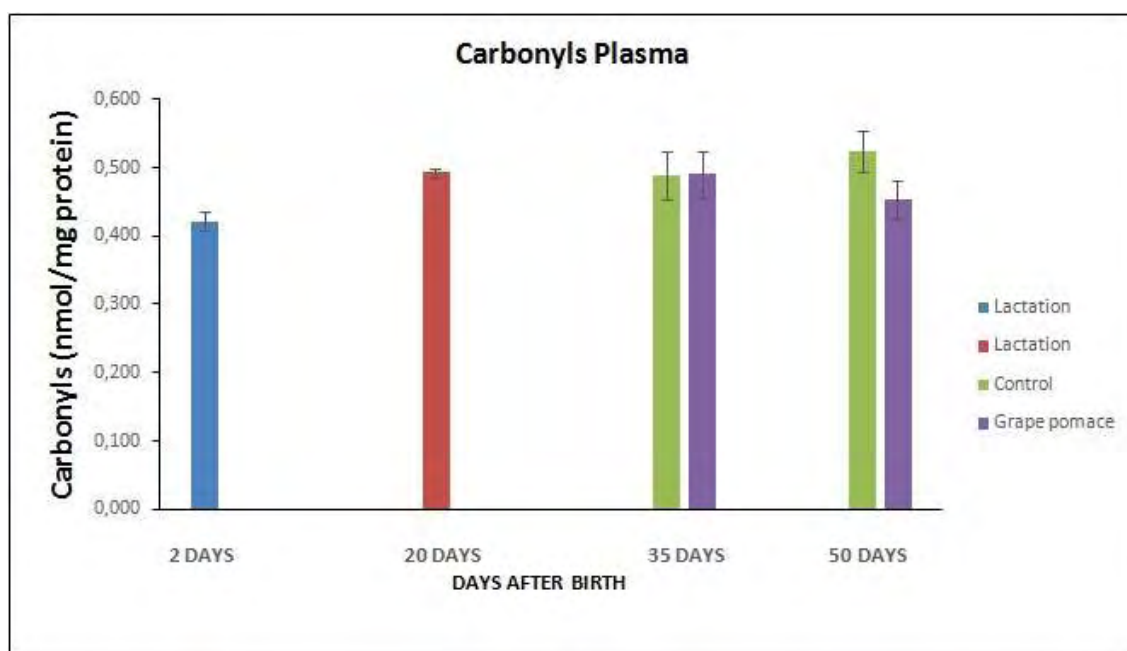
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 13, τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα TBARS από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα (πίνακας 12).

Πίνακας 12: Επίπεδα TBARS στο πλάσμα στις ομάδες control και στις πολυφαινολικές ομάδες.

TBARS (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	7,432 ± 1,092	5,783 ± 0,888
Grape pomace	7,631 ± 0,771	5,341 ± 1,579

4.3.4 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα



Διάγραμμα 14: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 13).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grapepomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 13).

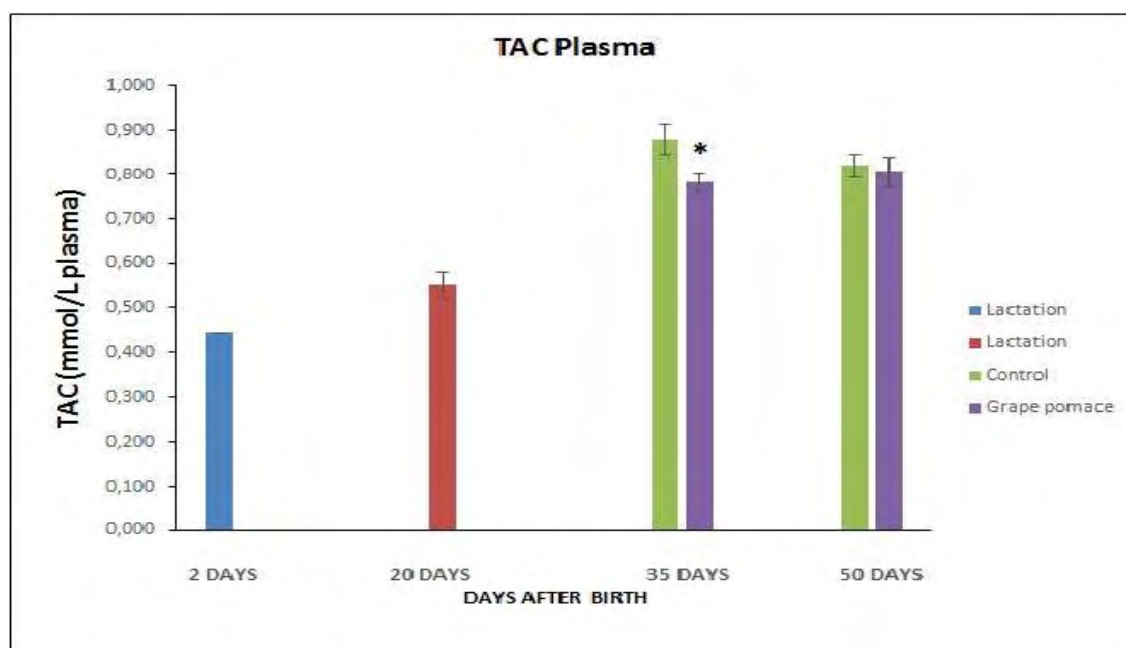
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 14, δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες (πίνακας 13).

Πίνακας13: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα στις ομάδες control και στις πολυφαινολικές ομάδες.

CARB (nmol/mg protein)M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,490 ± 0,035	0,525 ± 0,030
Grape pomace	0,491 ± 0,035	0,455 ± 0,028

4.3.5 Επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στο πλάσμα



Διάγραμμα 15: Επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στο πλάσμα.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 14).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grapepomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 14).

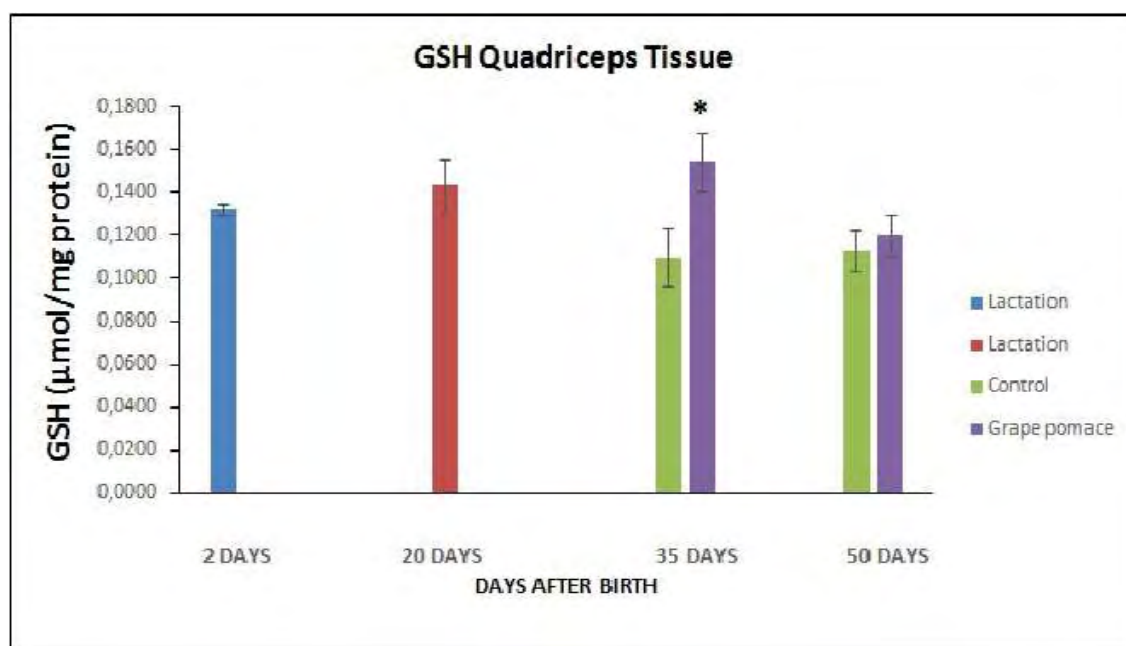
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 15, στις 35 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική μείωση (11,12%) ($p < 0,05$)** στα επίπεδα της TAC από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα, ενώ στις 50 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της TAC (πίνακας 14).

Πίνακας 14: Επίπεδα της TAC στο πλάσμα στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

TAC (mmol DPPH/mg protein) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,881 \pm 0,034	0,821 \pm 0,026
Grape pomace	0,783 \pm 0,020	0,807 \pm 0,035

4.3.6 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH) στον τετρακέφαλο ιστό



Διάγραμμα 16: Επίπεδα της γλουταθειόνης στον τετρακέφαλο 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 (grapepomace)

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

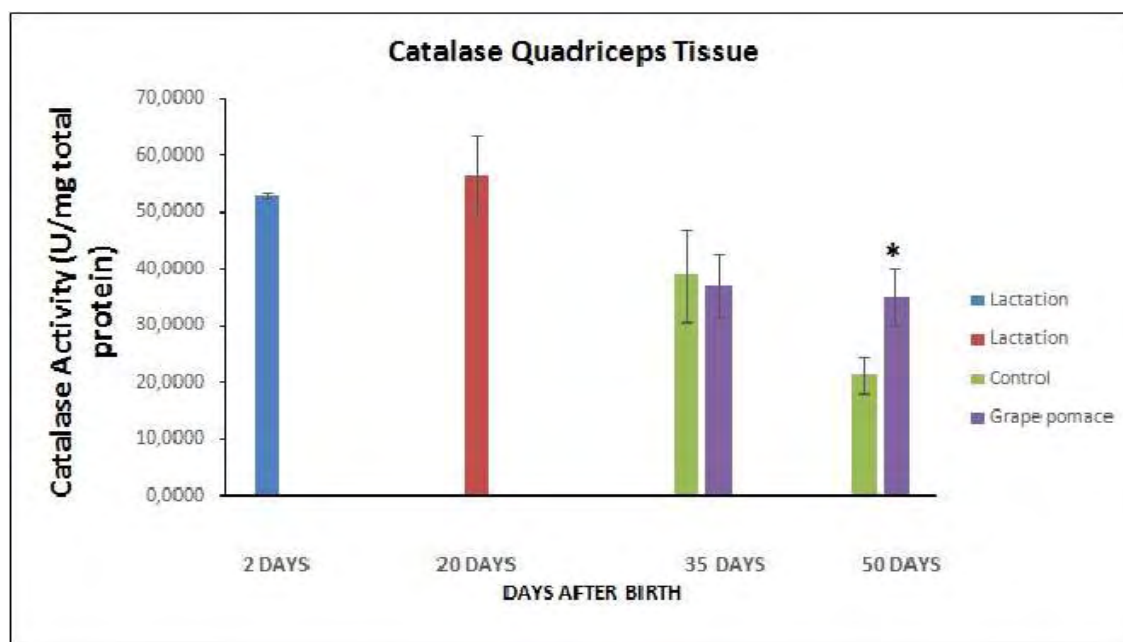
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 16, στις 35 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική αύξηση (40%) ($p < 0,01$)** των επιπέδων της GSH από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα, ενώ στις 50 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της GSH (πίνακας 15).

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

GSH (μmol/mgprotein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,110 ± 0,010	0,113± 0,016
Grape pomace	0,154± 0,014	0,120± 0,010

4.3.7 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στον τετρακέφαλο ιστό



Διάγραμμα 17: Επίπεδα της καταλάσης στον τετρακέφαλο ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

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

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grapepomace)

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

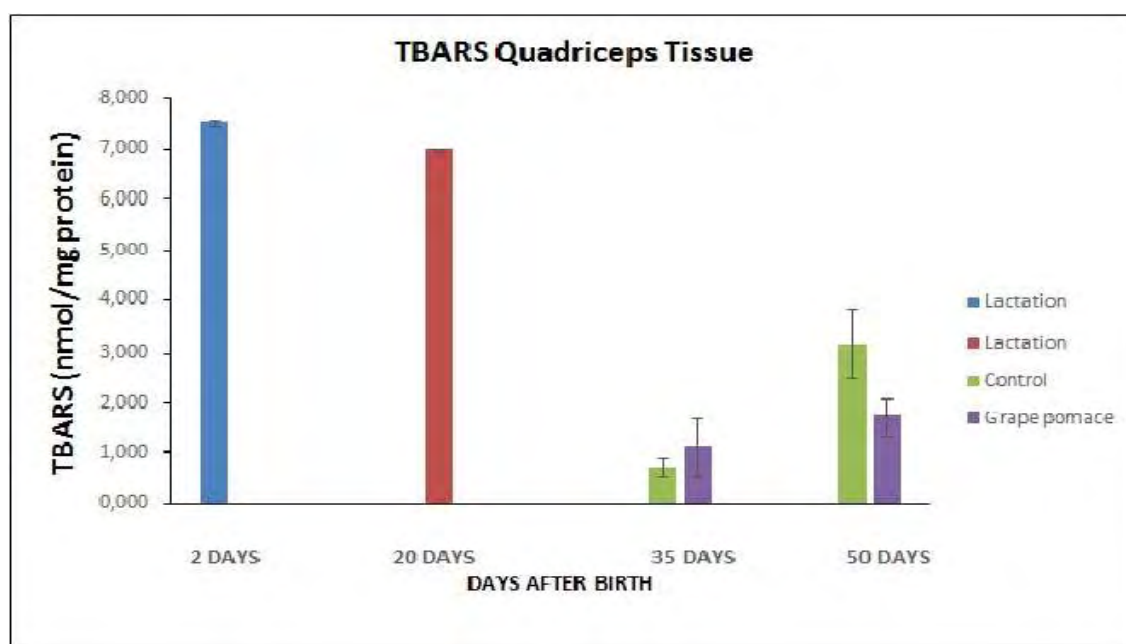
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 17, στις 50 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική αύξηση (64,34%) ($p < 0,05$)** των επιπέδων της CAT από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα, ενώ στις 35 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της CAT (πίνακας 16).

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

CAT (U/mg Protein) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	38,849 \pm 8,217	21,354 \pm 3,362
Grape pomace	37,196 \pm 5,542	35,094 \pm 4,994

4.3.8 Επίπεδα των TBARS στον τετρακέφαλο ιστό



Διάγραμμα 18: Επίπεδα της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (TBARS) στον τετρακέφαλο 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 (grapepomace)

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

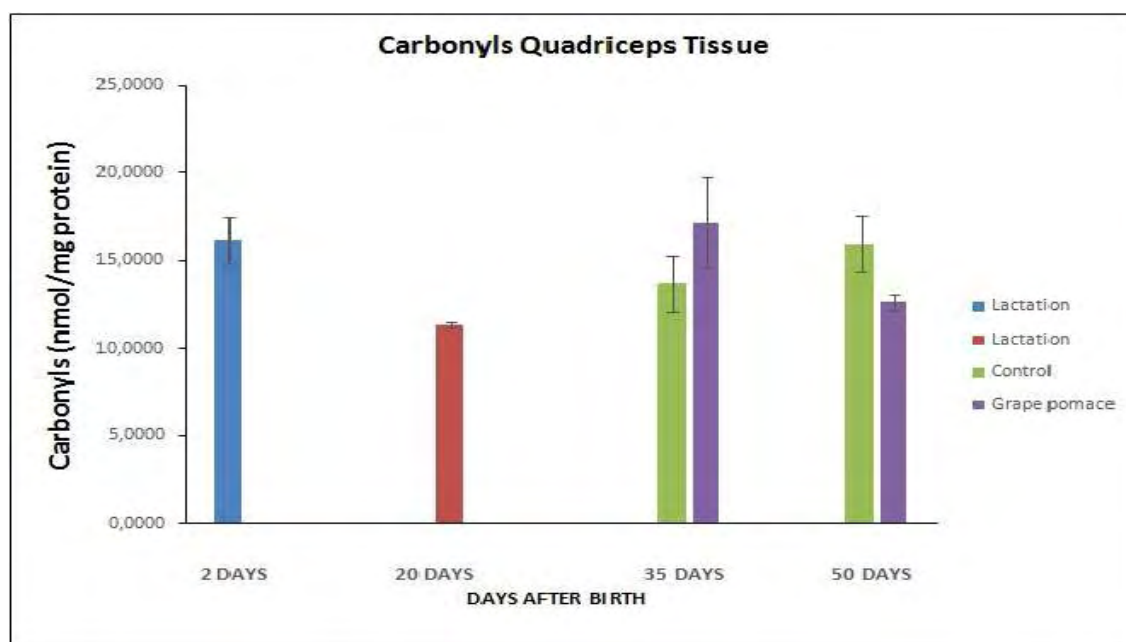
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 18, δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα των TBARS τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες (πίνακας 17).

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

TBARS (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,707 ± 0,167	3,168 ± 0,425
Grape pomace	1,111 ± 0,566	1,710 ± 0,401

4.3.9 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον τετρακέφαλο ιστό



Διάγραμμα 19: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον τετρακέφαλο ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

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

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grapepomace)

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

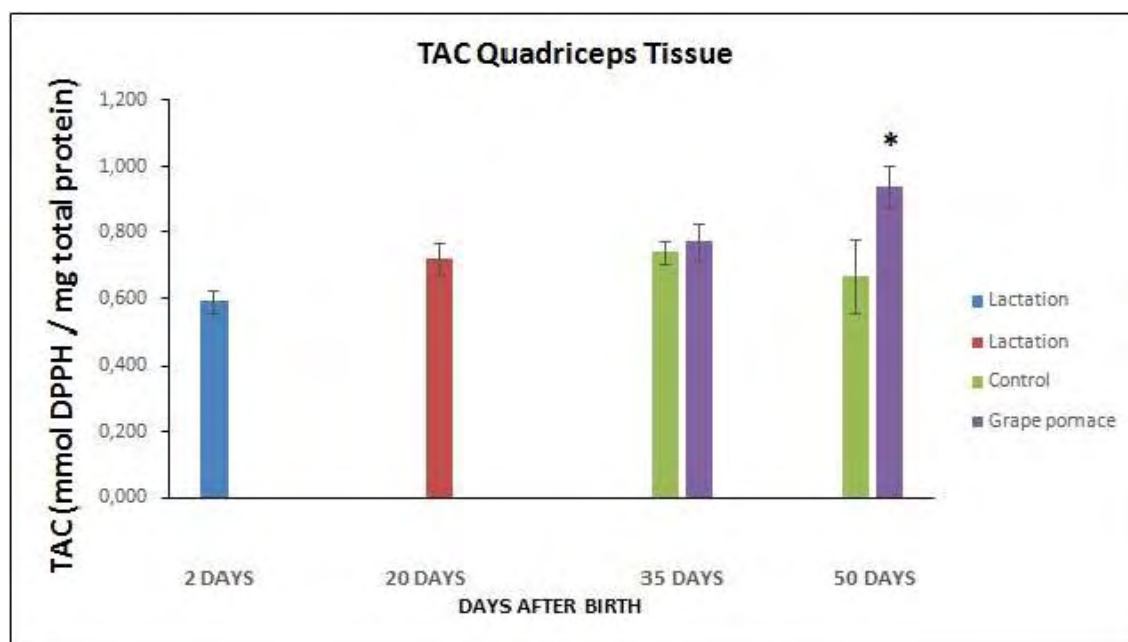
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 19, δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες (πίνακας 18).

Πίνακας 18: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον τετρακέφαλο ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

CARB (nmol/mg protein)M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	13,667 ± 1,632	15,956 ± 1,617
Grape pomace	17,153 ± 2,545	12,591 ± 0,417

4.3.10 Επίπεδα της TAC στον τετρακέφαλο ιστό



Διάγραμμα 20: Επίπεδα της TAC στον τετρακέφαλο 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 (grapepomace)

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

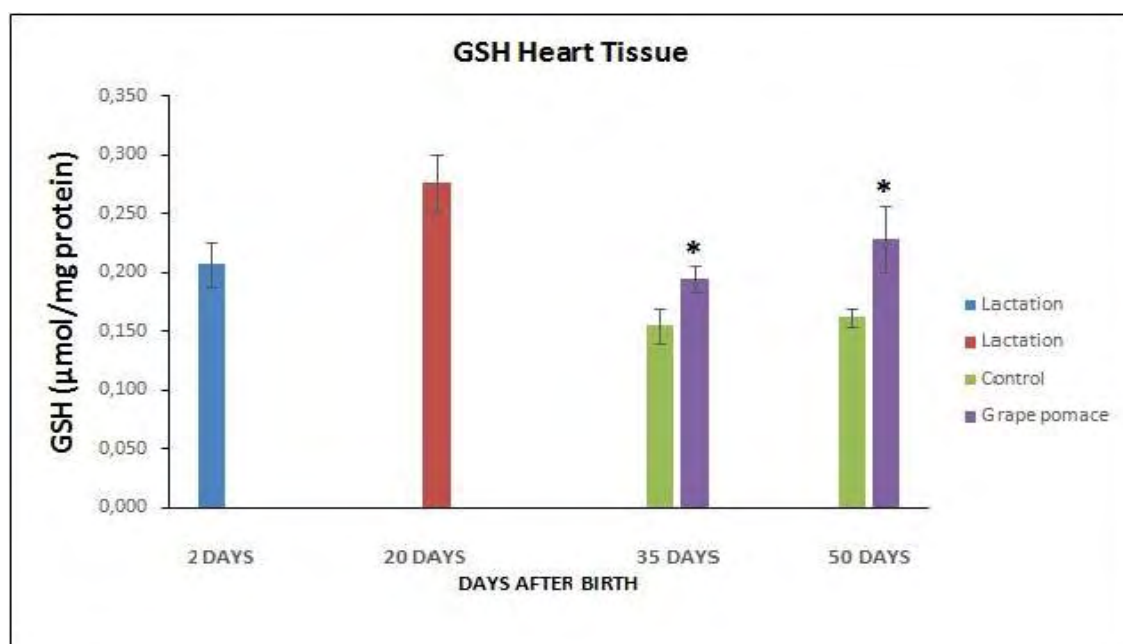
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 20, στις 35 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της TAC, ενώ στις 50 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική αύξηση (40,77%) ($p < 0,05$)** των επιπέδων της TAC από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα (πίνακας 19).

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

TAC (mmol DPPH/mg protein) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,740 \pm 0,035	0,667 \pm 0,110
Grape pomace	0,771 \pm 0,057	0,939 \pm 0,063

4.3.11 Επίπεδα Γλουταθειόνης στον καρδιακό ιστό



Διάγραμμα 21: Επίπεδα της GSH στον καρδιακό 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 (grapepomace)

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

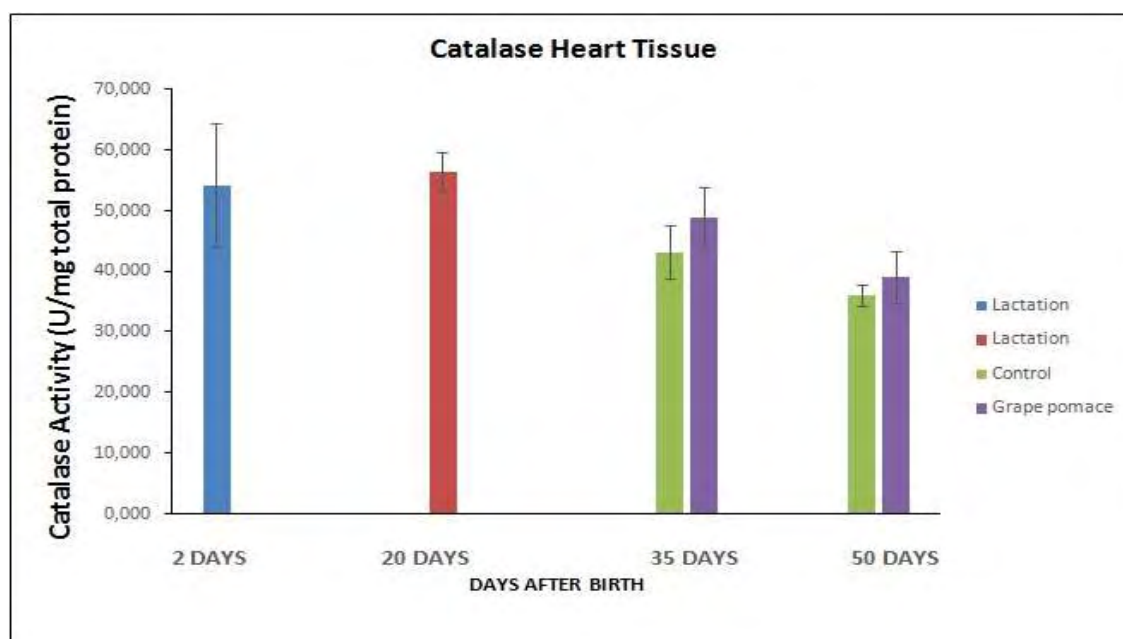
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 22, στις 35 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική αύξηση (25,16%) ($p < 0,05$)** των επιπέδων της GSH από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα. Στις 50 μέρες, παρατηρείται πάλι στατιστικώς **σημαντική αύξηση (40,74%) ($p < 0,05$)** των επιπέδων της GSH της πολυφαινολικής ομάδας (πίνακας 20).

Πίνακας 20: Επίπεδα της TAC στον καρδιακό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

GSH (μmol/mgprotein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,155 ± 0,015	0,162 ± 0,008
Grape pomace	0,194 ± 0,011	0,228 ± 0,028

4.3.12 Επίπεδα Καταλάσης στον καρδιακό ιστό



Διάγραμμα 22: Επίπεδα της CAT στον καρδιακό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

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

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (grapepomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της CAT ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 21).

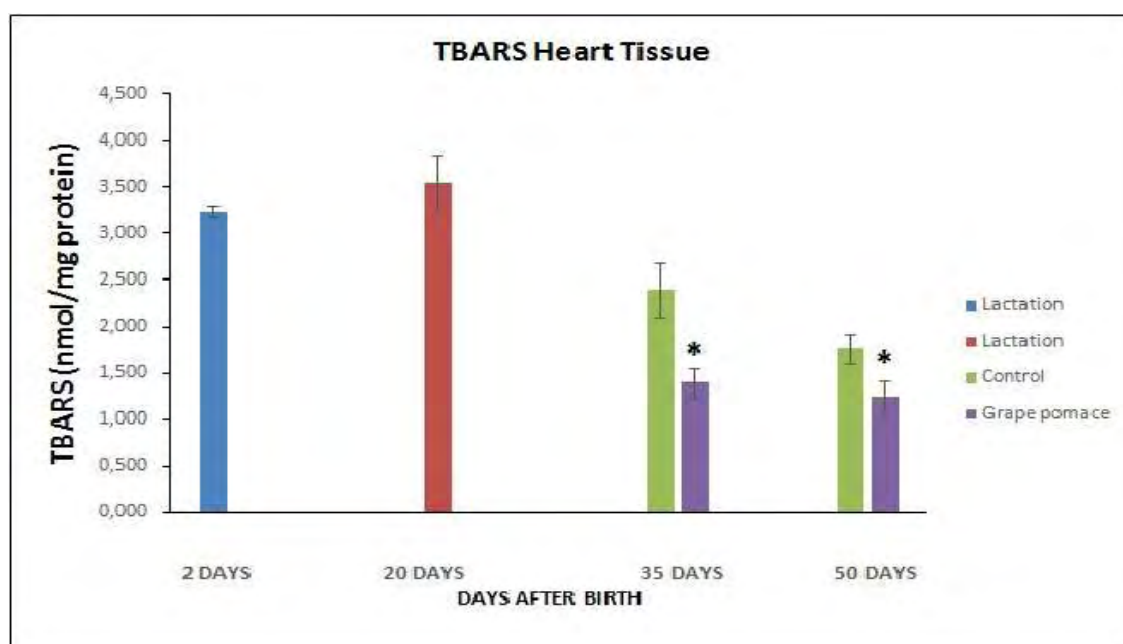
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 22, δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της CAT τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες (πίνακας 21).

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

CAT (U/mg Protein)M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	43,137 ± 4,391	36,163 ± 1,798
Grape pomace	48,809 ± 5,046	39,085 ± 4,181

4.3.13 Επίπεδα των TBARS στον καρδιακό ιστό



Διάγραμμα 23: Επίπεδα των TBARS στον καρδιακό ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 22).

- Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων (graperomace)

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών (πίνακας 22).

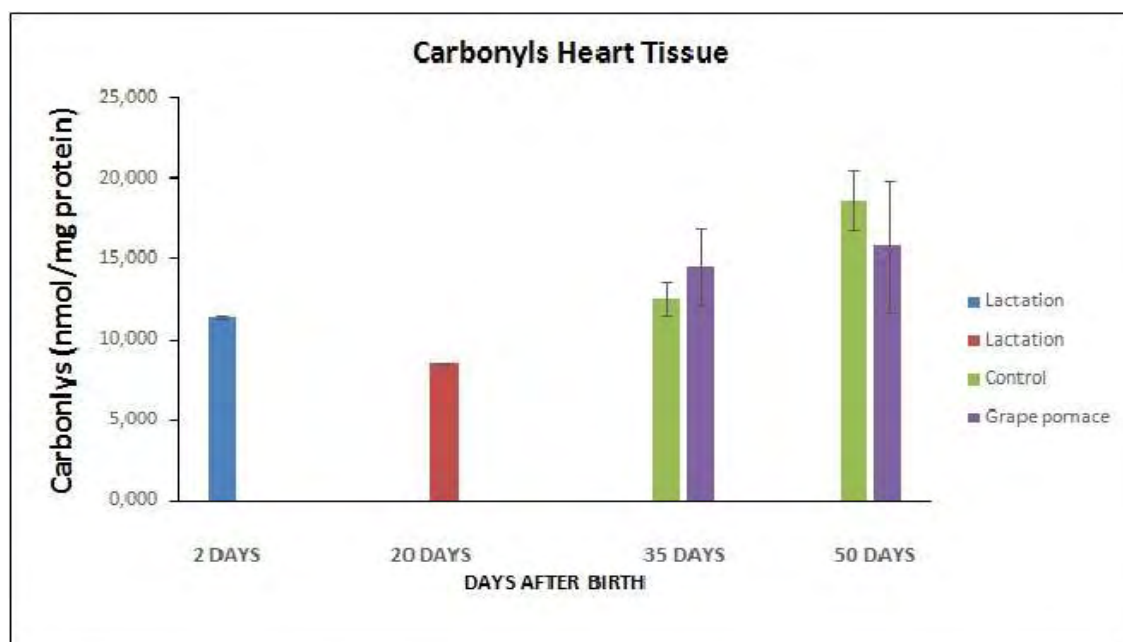
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 23, στις 35 ημέρες παρατηρείται **στατιστικώς σημαντική μείωση (41,86%)** ($p < 0,05$) στα επίπεδα των TBARS από τα ζώα της ομάδας control στα ζώα της ομάδας στέμφυλα. Στις 50 μέρες, παρατηρείται πάλι **στατιστικώς σημαντική μείωση (29,52%)** ($p < 0,05$) στα επίπεδα των TBARS της πολυφαινολικής ομάδας (πίνακας 22).

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

TBARS (nmol/mg protein) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	2,403 \pm 0,290	1,758 \pm 0,154
Grape pomace	1,397 \pm 0,166	1,239 \pm 0,172

4.3.14 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον καρδιακό ιστό



Διάγραμμα 24: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον καρδιακό 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 (grapepomace)

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

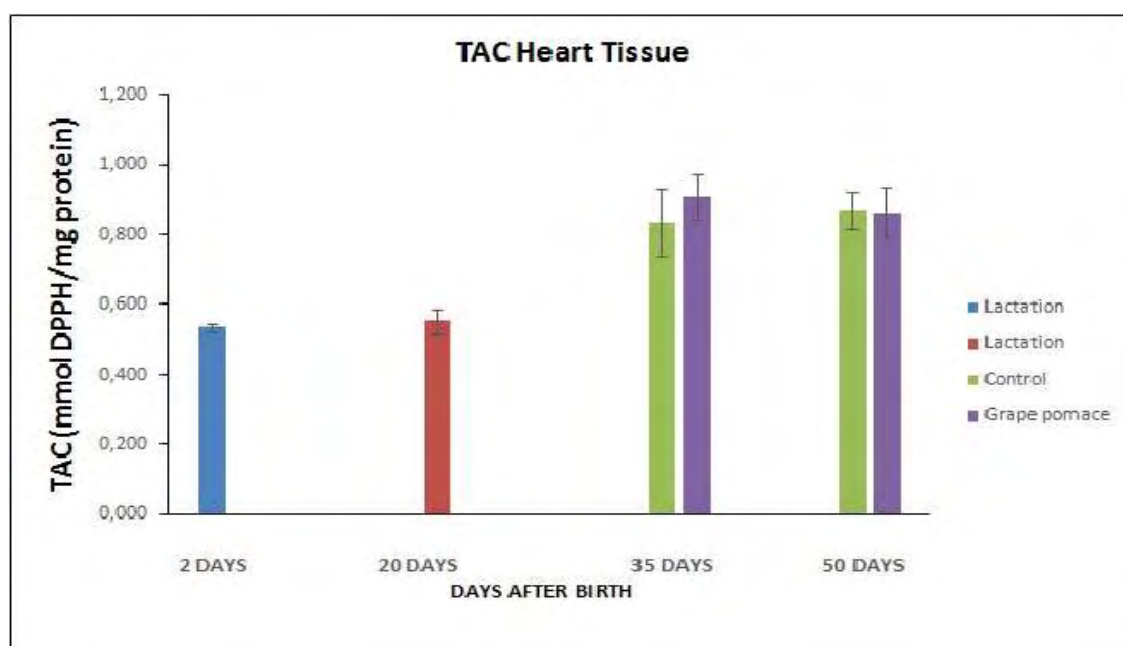
- Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Σύμφωνα με το διάγραμμα 24, δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες (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	12,594 ± 1,046	18,635 ± 1,861
Grape pomace	14,567 ± 2,376	15,850 ± 4,084

4.3.15 Επίπεδα της TAC στον καρδιακό ιστό



Διαγραμμα 25: Επίπεδα της TAC στον καρδιακό 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 (graperomace)

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 25, 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 καρδιακό ιστό στις ομάδες ελέγχου και στις πολυφαινολικές ομάδες.

TAC (mmol DPPH/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,836± 0,095	0,868± 0,053
Grape pomace	0,911± 0,064	0,863± 0,073

4.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα καιστους ιστούς (τετρακέφαλος, καρδιά) των χοίρων

Πίνακας 25: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα.

	ΑΙΜΑ				
	GSH	CATALASE	TBARS	CARBONYLS	TAC
Control					
Grape pomace	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS	35 DAYS: -11,12%
	50 DAYS: NS	50 DAYS: -30,17%	50 DAYS: NS	50 DAYS: NS	50 DAYS: NS

Πίνακας 26: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στην καρδιά.

	ΚΑΡΔΙΑΚΟΣ ΙΣΤΟΣ				
	GSH	CATALASE	TBARS	CARBONYLS	TAC
Control					
Grape pomace	35 DAYS: +25,16%	35 DAYS: NS	35 DAYS: -41,86%	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS
	50 DAYS: +40,74%	50 DAYS: NS	50 DAYS: -29,52%	50 DAYS: NS	50 DAYS: NS

Πίνακας 27: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών στον τετρακέφαλο.

	ΜΥΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ-ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ				
	GSH	CATALASE	TBARS	CARBONYLS	TAC
Control					
Grape pomace	35 DAYS: +40%	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS
	50 DAYS: NS	50 DAYS: +64,34%	50 DAYS: NS	50 DAYS: NS	50 DAYS: +40,77%

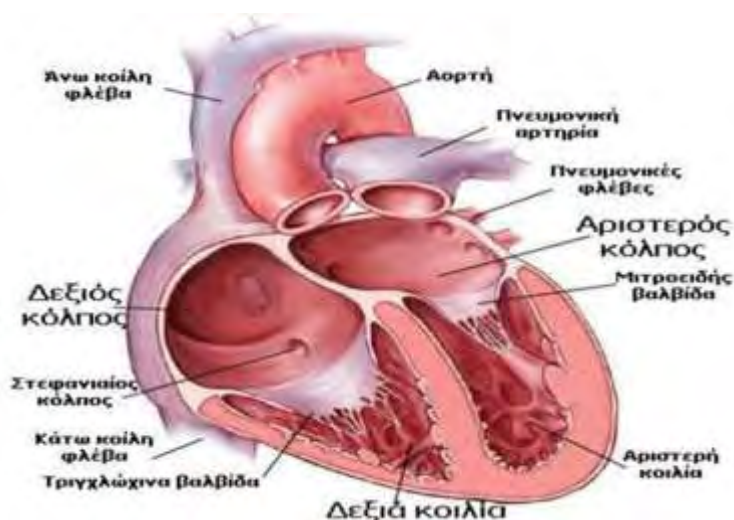
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να αξιολογηθεί η οξειδωαναγωγική 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 στο αίμα, στον τετρακέφαλο καθώς και στον καρδιακό ιστό 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, το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 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.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο προσδιορισμός των δεικτών του οξειδωτικού στρες διεξήχθη στην καρδιά και στον τετρακέφαλο, όργανα τα οποία είναι ζωτικής σημασίας.

Συγκεκριμένα, η καρδιά των γουρουνιών είναι μικρότερη από την αντίστοιχη του ανθρώπου, αλλά παρουσιάζει παρόμοια χαρακτηριστικά. Είναι ένα κοίλο, μυώδες όργανο, που αποτελείται από τους δύο κόλπους και τις δύο κοιλίες, που επικοινωνούν μεταξύ τους με τα κολποκοιλιακά στόμια. Ο φυσιολογικός της ρόλος είναι η κυκλοφορία του αίματος. Πιο συγκεκριμένα, οξυγονωμένο αίμα (εμπλουτισμένο σε οξυγόνο) στέλνεται από την αριστερή κοιλία της καρδιάς με την αορτή και τις διακλαδώσεις της στα διάφορα όργανα του σώματος. Με τις μεγάλες φλέβες (πρόσθια/οπίσθια κοίλη φλέβα) το αίμα επιστρέφει στο δεξιό κόλπο. Στην συνέχεια, μέσω της δεξιάς κοιλίας, το αίμα στέλνεται με την πνευμονική αρτηρία στους πνεύμονες για οξυγόνωση. Τέλος, το αίμα με τις πνευμονικές φλέβες φτάνει στον αριστερό κόλπο και από εκεί στην αριστερή κοιλία.



Εικόνα 33: Τα κύρια μέρη της καρδιάς.

Όσον αφορά τον τετρακέφαλο ιστό, διαθέτει αρκετά ενδογενή αντιοξειδωτικά στα οποία συμπεριλαμβάνονται: η τοκοφερόλη, διπεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη (καρνοσίνη, ανσερίνη), αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδική δισμουτάση και η καταλάση. Παρά την παρουσία αντιοξειδωτικών συστημάτων, η οξείδωση των λιπιδίων στους μυς εμπλέκεται στη μοριακή βάση ασθενειών όπως η μυϊκή δυστροφία. Τα λιπίδια στους μυς κυμαίνονται σε μεγάλα όρια (1-20%) και εντοπίζονται κυρίως στο επίπεδο κυτταρικών μεμβρανών, όπως στα μιτοχόνδρια, το σαρκοπλασματικό δίκτυο και τα μικροσώματα.

Επειδή η συγκέντρωση και η δραστηριότητα πολλών ενδογενών αντιοξειδωτικών των μυών μπορεί να επηρεαστεί από τη διατροφή του ζώου, κρίνεται αναγκαία η κατανόηση της σχέσης διατροφής και συνολικού αντιοξειδωτικού τόνου του μυός, τόσο για την μείωση συχνότητας εμφάνισης σοβαρών ασθενειών όσο και για την ενίσχυση της οξειδωτικής σταθερότητας, ώστε να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη διάρκεια ζωής του ζώου.

Οι δείκτες που αναφέρθηκαν και παραπάνω 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 1964), και ρυθμίζει τον κύκλο του μονοξειδίου του αζώτου που είναι κρίσιμος για τη ζωή. Επίσης, επιδρά σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις όπως η σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, η πρωτεϊνσύνθεση, η σύνθεση προσταγλανδίνης, η μεταφορά αμινοξέων και η ενεργοποίηση ενζύμων. Ζωτική είναι επίσης η δράση της στον μεταβολισμό του σιδήρου. Στα ζώα η γλουταθειόνη δρα ως υπόστρωμα σε συζευκτικές και αναγωγικές αντιδράσεις, που καταλύονται από το ένζυμο S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) στο κυτταροπλασματικό υγρό, 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 τετρακέφαλο ιστό κατά 40% στους χοίρους της πολυφαινολικής ομάδας σε σχέση με τους χοίρους της ομάδας ελέγχου. Επιπλέον, στον καρδιακό ιστό της πολυφαινολικής ομάδας παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων GSH κατά 26,16% και 40,74% στις 35 και 50 ημέρες αντίστοιχα σε σχέση πάντα με την ομάδα ελέγχου. Από την άλλη, στις υπόλοιπες μετρήσεις που έγιναν στο αίμα, οι μεταβολές των επιπέδων της GSH δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές. Επομένως, στην καρδιά 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 οиноποιίας, κάτι που υποδηλώνει ότι

ίσως τα πολυφαινολικά συστατικά των στεμφύλων επιδρούν στη διαφοροποίηση 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). Το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και στον τετρακέφαλο, με τη διαφορά ότι εδώ στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε μια τάση για μείωση της GSH σε σχέση με τις 35 ημέρες, αν και η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική. 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, η χορήγηση πολυφαινολών, 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**, στο αίμα των χοίρων της πολυφαινολικής ομάδας παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση κατά 30,17% στις 50 ημέρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, στον τετρακέφαλο ιστό βρέθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση κατά 64,34% στις 50 ημέρες. Αντιθέτως, στις υπόλοιπες μετρήσεις που έγιναν στην καρδιά δεν βρέθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της καταλάσης. Όπως γνωρίζουμε, η μεγαλύτερη δραστηριότητα της CAT εντοπίζεται στο ήπαρ, αφού πρόκειται για ζωτικό όργανο του συστήματος της πέψης, που διασπά τα τοξικά υπεροξειδία του υδρογόνου, παράγοντας νερό και οξυγόνο. Από τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψε ότι το συγκεκριμένο ένζυμο παίζει σημαντικό ρόλο στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του χοίρου στον τετρακέφαλο και ότι με την χορήγηση ενσιρώματος εμπλουτισμένου με στέμφυλα η δράση του ενισχύεται. Σε ανάλογη

μελέτη στον τετρακέφαλο ιστό (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 δραστικότητα του ενζύμου CAT σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ στα μυϊκά κύτταρα δεν είχε κανένα αποτέλεσμα. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που βρέθηκαν στο αίμα, όπου παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα (όχι όμως στατιστικώς σημαντικά) της CAT, η πιο λογική εξήγηση είναι ότι άλλα ενδογενή αντιοξειδωτικά είναι σε αυξημένα επίπεδα στο αίμα των χοίρων με αποτέλεσμα να μην υπάρχει τόσο μεγάλη ανάγκη σε καταλάση.

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-ισοπροστανίνα) προϊόντων της υπεροξείδωσης. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα σχετικά με τα επίπεδα των **TBARS** στους χοίρους της πολυφαινολικής ομάδας, βλέπουμε ότι αυτά ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένα στον καρδιακό ιστό κατά 41,86% και 29,52% στις 35 και 50 ημέρες αντιστοίχως σε σχέση με τα χοιρίδια της ομάδας ελέγχου, ενώ τόσο στο αίμα όσο και στον τετρακέφαλο ιστό δεν προκύπτει κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα TBARS. Κάτι τέτοιο μπορεί να εξηγηθεί και από το γεγονός ότι τα επίπεδα GSH στην καρδιά είναι αρκετά αυξημένα τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες, κάτι που οδηγεί στη μείωση της λιπιδικής υπεροξείδωσης και επομένως στην απόλυτα φυσιολογική μείωση των TBARS. Σε παρόμοια μελέτη, στην οποία έγινε χορήγηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) σε χοίρους, μειώθηκε η υπεροξείδωση των λιπιδίων σε όλους τους ιστούς και το αίμα (Gerasopoulos *et al.* 2015), γεγονός που επιβεβαιώνει τις ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινολών είτε βρίσκονται στα ΥΑΕ είτε στα στέμφυλα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η υπεροξείδωση 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 οξείδωση 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 υπεροξείδωσης 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 στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Όπως είναι γνωστό, κάθε συστατικό έχει διαφορετική αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, φαίνεται ότι στα επίπεδα της TAC στον τετρακέφαλο των χοίρων της πολυφαινολικής ομάδας υπάρχει στατιστικώς σημαντική αύξηση κατά 40,77% στις 50 ημέρες σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ζώα της ομάδας ελέγχου. Αυτό υποδηλώνει ότι οι πολυφαινόλες που εμπεριέχονται στα στέμφυλα οινοποιίας, ενεργοποιούν τους μηχανισμούς της αντιοξειδωτικής άμυνας με την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων. Από την άλλη πλευρά, στο αίμα, από την σύγκριση της ομάδας ελέγχου με την πολυφαινολική ομάδα, φαίνεται να υπάρχει μια στατιστικώς σημαντική μείωση κατά 11,12% στις 35 ημέρες. Οι μετρήσεις της TAC στην καρδιά δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές. Επομένως, από τα αποτελέσματα της TAC στους χοίρους παρατηρείται ότι οι μεταβολές της παρουσιάζουν ιστο-εξειδίκευση, διότι κάθε ιστός που προέρχεται από ζωτικό όργανο διαφέρει σε περιεκτικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων. Κάτι ανάλογο παρατηρείται και σε μελέτες του εργαστηρίου μας πάνω σε ιστούς των ζωτικών οργάνων των προβάτων, όπου προκύπτει ότι κάποιοι ιστοί παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα της TAC και κάποιοι άλλοι μειωμένα (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα) .

Τέλος, η μέτρηση των **πρωτεϊνικών καρβονυλίων** μας υποδηλώνει το ποσοστό οξείδωσης που έχουν υποστεί οι πρωτεΐνες των ιστών εξαιτίας της δράσης των ελεύθερων ριζών. Ουσιαστικά η οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών προκύπτει από την τροποποίηση διαφόρων αμινοξέων, όπως η προλίνη, η αργινίνη, η θρεονίνη και η λυσίνη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, δεν φαίνεται να μεταβάλλονται στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, αν και στο αίμα και στον τετρακέφαλο παρατηρείται μια τάση για μείωση των επιπέδων τους στους χοίρους της πολυφαινολικής ομάδας σε σχέση πάντα με αυτά της ομάδας ελέγχου. 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 αυξήθηκαν τα επίπεδα των χοίρων σε GSH, CAT και TAC, ενώ με ελάχιστες εξαιρέσεις μειώθηκαν τα επίπεδά τους σε TBARS. 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. Επίσης, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το μητρικό γάλα είναι εξίσου εμπλουτισμένο με διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες.

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 χοίρων κατά την περίοδο του απογαλακτισμού τους, βοηθάει σημαντικά στη βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του αίματος και των ιστών που ελέγχθηκαν (τετρακέφαλος, καρδιά). 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, συριγικό οξύ, π-μεθόξικουμαρικό 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 υπεροξειδωσής των λιπιδίων) και ότι αυξάνουν τους

αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (τη δραστηριότητα 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. 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 διεξαχθεί ποσοτική και ποιοτική ανάλυση του αίματος και των ιστών που ελήφθησαν από τα νεαρά χοιρίδια (π.χ. μέθοδος HPLC-MS), ώστε να αναγνωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν οι επιμέρους ενώσεις και μέσα σε αυτές και οι πολυφαινόλες που βρίσκονται στο αίμα και στους ιστούς αυτών. 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 εξάγουμε συμπεράσματα της επίδρασής τους στην ποιότητα του κρέατος.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adlercreutz, H., 2007. Lignans and human health. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 44(5-6), pp.483–525.
2. Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, pp.121–126.
3. AICR (2007) Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective; *World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research*, Washington, DC, USA
4. 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.
5. Aquilano, K., Baldelli, S. & Ciriolo, M.R., 2014. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in pharmacology*, 5, p.196.
6. 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.
7. Baliga, M.S. *et al.*, 2011. Update on the chemopreventive effects of ginger and its phytochemicals. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(6), pp.499–523.
8. Basu, S. & Eriksson, M., 2001. Retinol palmitate counteracts oxidative injury during experimental septic shock. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 30(3), pp.265–269.
9. 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.
10. Battin, T.J., Luyssaert, S., Kaplan, L.A., Aufdenkampe, A.K., Richter, A., Tranvik, L.J., 2009. The boundless carbon cycle. *Nature Geoscience*.
11. Baydar, N.G., Sagdic, O., Ozkan, G., Cetin, S., 2006. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Int. J. Food Sci.* 41, pp.799–804.
12. Bidlack, W.R., Omay, S.T., Meskin, M.S., Topham, D.K.W., 2000. Phytochemicals as bioactive agents. *CRC Press*.
13. Boon, E.M., Downs, A., Marcey, D., 2007. Proposed Mechanism of Catalase in Catalase: H₂O₂: H₂O₂ Oxidoreductase. *Catalase Structural Tutorial Text*.
14. Bouayed, J. & Bohn, T., 2010. Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(4), pp.228–237.
15. Bouayed, J., Hoffmann, L. & Bohn, T., 2011. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food chemistry*, 128(1), pp.14–21.
16. Boudry, G. *et al.*, 2004. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *The Journal of nutrition*, 134(9), pp.2256–2262.
17. Di Carlo, G. *et al.*, 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65(4), pp.337–353.
18. Celi, P., 2011. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 33(2), pp.233–240.

19. Celi, P., 2010. The role of oxidative stress in small ruminants health and production. *R. Bras. Zootec.* v.39, pp.348-363
20. Chacon, M.R. *et al.*, 2009. Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes in vitro. *Cytokine*, 47(2), pp.137–142.
21. Cheeseman, K.H. & Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*, 49(3), pp.481–493.
22. 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.
23. COOKE, M.S. *et al.*, 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* , 17 (10), pp.1195–1214. Available at: <http://www.fasebj.org/content/17/10/1195.abstract>.
24. D'Archivio, M. *et al.*, 2010. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, 11(4), pp.1321–1342.
25. Deaton, C.M., Marlin, D.J., Smith, N.C., Harris, P.A., *et al.*, 2004. Antioxidant supplementation in horses affected by recurrent airway obstruction. *The Journal of nutrition*, 134(8 Suppl), p.2065S–2067S.
26. Deaton, C.M., Marlin, D.J., Smith, N.C., Harris, P.A., *et al.*, 2004. Pulmonary epithelial lining fluid and plasma ascorbic acid concentrations in horses affected by recurrent airway obstruction. *American journal of veterinary research*, 65(1), pp.80–87.
27. Durackova, Z., 2010. Some current insights into oxidative stress. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 59(4), pp.459–469.
28. De Flora, S. & Ramel, C., 1990. Classification of mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Basic life sciences*, 52, pp.461–462.
29. Fujisawa, S. *et al.*, 2004. Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds. *Anticancer research*, 24(2B), pp.563–569.
30. Gerasopoulos, K., Stagos, D., Kokkas, S., *et al.*, 2015. Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 82, pp.42–49.
31. 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.
32. Gerogianni, I., Gourgoulialis, K.i., 2006. Oxidative stress and lung diseases. *Archives of Hellenic Medicine*. 23(5), pp.444–454.
33. Goutzourelas, N. *et al.*, 2015. Grape pomace extract exerts antioxidant effects through an increase in GCS levels and GST activity in muscle and endothelial cells. , (6), pp.1–9.
34. Gutteridge, J.M., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*, 41(12 Pt 2), pp.1819–1828.
35. Halliwell, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & aging*, 18(9), pp.685–716.
36. Halliwell, B. & Gutteridge, J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, pp.1–85.
37. Han, X., Shen, T. & Lou, H., 2007. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. , 2, pp.950–988.
38. Harborne, J.B., 1986. Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Progress in clinical and biological research*, 213, pp.15–24.
39. Harnly, J.M. *et al.*, 2006. Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *Journal of*

- agricultural and food chemistry*, 54(26), pp.9966–9977.
40. Hogan, J.S. *et al.*, 1992. Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. *Journal of dairy science*, 75(2), pp.399–405.
 41. HUGHES, R.E., 1964. REDUCTION OF DEHYDROASORBIC ACID BY ANIMAL TISSUES. *Nature*, 203, pp.1068–1069.
 42. Iovine, N.M. *et al.*, 2008. Reactive nitrogen species contribute to innate host defense against *Campylobacter jejuni*. *Infection and immunity*, 76(3), pp.986–993.
 43. Jackson, R.S., 1993. Chemical constituents of grapes and wine. In *Wine Science: Principles and applications*. Taylor SL ed. Academic Press.
 44. Jain, A. & Flora, S.J.S., 2012. Dose related effects of nicotine on oxidative injury in young, adult and old rats. *Journal of environmental biology / Academy of Environmental Biology, India*, 33(2), pp.233–238.
 45. 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.
 46. Jang, M. *et al.*, 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5297), pp.218–220.
 47. Jung, H.J. *et al.*, 2005. Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Archives of pharmacal research*, 28(5), pp.557–560.
 48. Kataria, A.K., Kataria, N., 2012a. Evaluation of oxidative stress in sheep affected with peste des petits ruminants. *J Stress Physiol Biochem.* 8(4), pp.72–77.
 49. Kataria, A.K., Kataria, N., 2012b. Evaluation of oxidative stress in pigs affected with classical swine fever. *Porc Res.* 2(2), pp.35–38.
 50. Kaur, M., Agarwal, C. & Agarwal, R., 2009. Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products. *The Journal of nutrition*, 139(9), p.1806S–12S.
 51. Keevil, J.G. *et al.*, 2000. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *The Journal of nutrition*, 130(1), pp.53–56.
 52. 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.
 53. Khallouki, F. *et al.*, 2003. Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 12(1), pp.67–75.
 54. Krinsky, N.I., 2002. Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of nutrition*, 132(3), p.540S–542S.
 55. Kris-Etherton, P.M. *et al.*, 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American journal of medicine*, 113 Suppl 9B, p.71S–88S.
 56. 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.
 57. Kushi, L.H. *et al.*, 2012. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(1), pp.30–67.
 58. Lattanzio, V. *et al.*, 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects,
 59. Lund, M.N. *et al.*, 2011. Protein oxidation in muscle foods: a review. *Molecular nutrition &*

- food research*, 55(1), pp.83–95.
60. Lykkesfeldt, J. & Svendsen, O., 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 173(3), pp.502–511.
 61. Manach, C. *et al.*, 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), p.230S–242S.
 62. Manach, C. *et al.*, 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), pp.727–747.
 63. Mennen, L.I. *et al.*, 2005. Risks and safety of polyphenol consumption. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), p.326S–329S.
 64. Meskin, M.S., Bidlack, W.R., Davies, A.J., Omaye, S.T., 2002. Phytochemicals in nutrition and health. *CRC Press*.
 65. Miller, J.K., Brzezinska-Slebodzinska, E. & Madsen, F.C., 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of dairy science*, 76(9), pp.2812–2823.
 66. 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.
 67. Pani, G., Galeotti, T. & Chiarugi, P., 2010. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer metastasis reviews*, 29(2), pp.351–378.
 68. Papadopoulou, A., Frazier, R.A., 2004. Characterization of protein–polyphenol interactions. *Trends in Food Science & Technology*. 15(3), pp.186–190.
 69. 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.
 70. Patsoukis, N. *et al.*, 2004. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience letters*, 357(2), pp.83–86.
 71. Pisoschi, A.M. & Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, pp.55–74.
 72. Poljsak, B., 2011. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2011, p.194586.
 73. Quideau, S. *et al.*, 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(3), pp.586–621.
 74. Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R., Prabhakar, M.C., 2004. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients.
 75. 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.
 76. Rinnerthaler, M. *et al.*, 2015. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, 5(2), pp.545–589.
 77. Rodrigo, R. *et al.*, 2014. Polyphenols in disease: from diet to supplements. *Current pharmaceutical biotechnology*, 15(4), pp.304–317.
 78. Roland, F.B., Jr. and I.W. Sizer. 1952. A Spectrophotometric Method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by Catalase.
 79. Scalbert, A. *et al.*, 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), pp.287–306.
 80. Schwartz, G.G., 2014. Vitamin D in blood and risk of prostate cancer: lessons from the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial and the Prostate Cancer Prevention

- Trial. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 23(8), pp.1447–1449.
81. 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.
 82. Shanmuganayagam, D. *et al.*, 2007. Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, 190(1), pp.135–142.
 83. Scholz, R.W., Graham, K.S., Gumprich, E., Reddy, C.C., 1989. Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation. *Ann NY Acad Sci*. 570, pp.514–7.
 84. Soares De Moura, R. *et al.*, 2002. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 54(11), pp.1515–1520.
 85. Soleas, G.J., Diamandis, E.P. & Goldberg, D.M., 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical biochemistry*, 30(2), pp.91–113.
 86. Terra, X. *et al.*, 2009. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *The Journal of nutritional biochemistry*, 20(3), pp.210–218.
 87. Tsao, R., 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), pp.1231–1246.
 88. Vainio, H., 1999. Chemoprevention of cancer: a controversial and instructive story. *British medical bulletin*, 55(3), pp.593–599.
 89. Valko, M. *et al.*, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), pp.44–84.
 90. Valko, M. *et al.*, 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), pp.1–40.
 92. 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.
 93. Vislocky, L.M. & Fernandez, M.L., 2010. Biomedical effects of grape products. *Nutrition reviews*, 68(11), pp.656–670.
 94. Wang, Z.-H., Gao, Q.-Y. & Fang, J.-Y., 2012. Green tea and incidence of colorectal cancer: evidence from prospective cohort studies. *Nutrition and cancer*, 64(8), pp.1143–1152.
 95. Weiss, W.P., Hogan, J.S. & Smith, K.L., 2004. Changes in vitamin C concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of *Escherichia coli*. *Journal of dairy science*, 87(1), pp.32–37.
 96. Wessely-Szponder, J. *et al.*, 2004. Assessment of neutrophil components as markers of lung injury in the course of bovine respiratory tract infections. *Polish journal of veterinary sciences*, 7(3), pp.157–161.
 97. Xia, E.-Q. *et al.*, 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *International journal of molecular sciences*, 11(2), pp.622–646.
 98. Zhu, L.H. *et al.*, 2012. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. *Journal of animal science*, 90(8), pp.2581–2589.
 99. Παπαγαλάνης, Ν., 2014. Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I .

Δραστικές ρίζες οξυγόνου. , 26(3), pp.151–194.

100.Σαράντης, Κ.Ν., 2010. Αποτελεσματικότητα εκμεταλλεύσεων ελεύθερης εκτροφής χοίρων. pp.19.