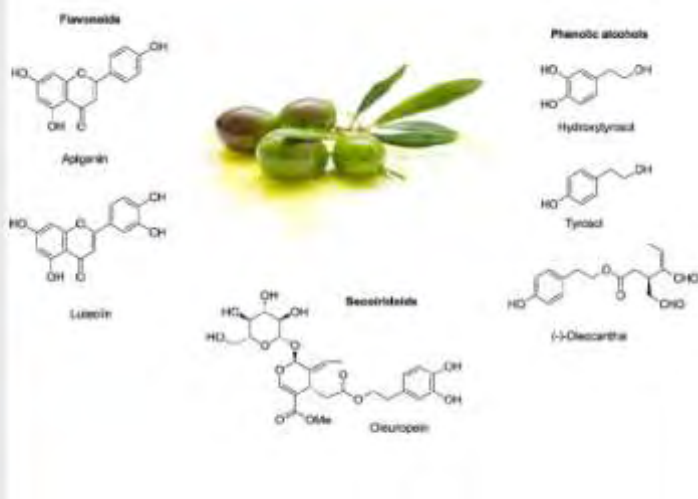




ΤΟΕΙΚΟΛΟΓΙΑ

*“Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα κοτόπουλων
κρεατοπαραγωγής μετά από χορήγηση πόσιμου νερού με πολυφαινόλικό
εκχύλισμα από απόβλητα ελαιολαιολιγνίτη”*

**ΛΑΡΙΣΑ 2016**

Assessment of oxidative stress markers in the blood of broiler chickens after the administration of drinking water enriched with polyphenolic extracts from olive mill waste waters

*Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα κοτόπουλων
κρεατοπαραγωγής μετά από χορήγηση πόσιμου νερού με πολυφαινολικό εκχύλισμα
από απόβλητα ελαιοτριβείου*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Δημήτριος Κουρέτας : Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών και Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

*Στη μητέρα μου Ράνια και στον αγαπημένο
μου Τάκη για την αγάπη και την ηθική
στήριξη όλα αυτά τα χρόνια...*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιπλέοντα καθηγητή μου κ. Πετρωτό Κωνσταντίνο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, εμπλουτίζοντας τις γνώσεις μου, καθώς και για την άριστη συνεργασία και υποστήριξη που μου παρείχε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Τοξικολογίας - Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και υπεύθυνο του μεταπτυχιακού προγράμματος “Τοξικολογία”, κ. Κουρέτα Δημήτριο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Στάγκο Δημήτριο , για την βοήθεια και την συνεχή παρουσία του καθ’ όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τον Διδάκτορα κ. Γερασόπουλο Κωνσταντίνο, ο οποίος τόσο με τις συμβουλές του όσο και με την συνεχή παρουσία του στη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, βοήθησε τα μέγιστα και συνέβαλε στην έγκαιρη ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος, ευχαριστώ τους υπολοίπους συναδέλφους του εργαστηρίου για το άριστο κλίμα συνεργασίας και ιδιαίτερα το μεταδιδάκτορα Καφαντάρη Ιωάννη και την υποψήφια διδάκτορα Μακρή Σωτηρία, τους προπτυχιακούς φοιτητές του τμήματος Ζωικής Παραγωγής του ΤΕΙ Λάρισας, Μακρή Χαράλαμπο και Μαϊμάρη Αντώνιο καθώς και τον Προϊστάμενο του Κτηνοτροφικού Τμήματος του Αγροκτήματος του ΤΕΙ Λάρισας κ. Κόκκα Στυλιανό, για τη βοήθεια τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, σε μια προσπάθεια να αυξηθεί η αντιοξειδωτική άμυνα και η προστασία του οργανισμού από τις επιβλαβείς επιδράσεις του οξειδωτικού στρες, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για αναζήτηση φυσικών πηγών αντιοξειδωτικών. Πλήθος ερευνών - μελετών, υποστηρίζουν την άποψη πως οι πολυφαινόλες που βρίσκονται στο ελαιόλαδο, είναι ικανές να δρουν ως φυτοχημικά αντιοξειδωτικά. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη όπου πολυφαινολικά πρόσθετα, από την επεξεργασία του υδατικού κλάσματος που προκύπτει από την διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου από την ελιά, προστίθενται στο πόσιμο νερό κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες στο αίμα των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, έτσι ώστε με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, να διερευνηθεί αν θα υπήρχε ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών τους. Στη διατροφή τους υπήρχε το προβλεπόμενο σιτηρέσιο, αλλά στο πόσιμο νερό τους προστέθηκε πολυφαινολικό εκχύλισμα σε μορφή σκόνης. Τα κοτόπουλα χωρίστηκαν σε τρεις (3) ομάδες των είκοσι πέντε (25) ατόμων. Η ομάδα Α ήταν η ομάδα ελέγχου. Στις άλλες δύο (2) ομάδες, όπως αναφέρθηκε, στο νερό τους το οποίο ανανεώνονταν καθημερινά, μετά την ηλικία των δεκαπέντε (15) ημερών, προστέθηκε πολυφαινολική σκόνη που παράγεται από το υγρό (υδατικό κλάσμα) που προκύπτει από την διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου από την ελιά. Πραγματοποιήθηκαν δύο (2) συλλογές αίματος από όλα τα κοτόπουλα. Η πρώτη αιμοληψία έγινε όταν τα κοτόπουλα ήταν σαράντα (40) ημερών και λάμβαναν τα πολυφαινολικά πρόσθετα για είκοσι πέντε (25) ημέρες, ενώ η δεύτερη, όταν τα κοτόπουλα ήταν εξήντα (60) ημερών και λάμβαναν τα πολυφαινολικά πρόσθετα για σαράντα πέντε (45) ημέρες. Μετά από κάθε συλλογή αίματος, άμεσα στο εργαστήριο γινόταν η συλλογή του πλάσματος και του αιμολύματος. Το αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της δραστηριότητας της καταλάσης. Το πλάσμα για τα TBARS, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και την συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας ήταν θετικά και ενθαρρυντικά. Τα πολυφαινολικά πρόσθετα επηρεάζουν τη συμπεριφορά των δεικτών οξειδωτικού στρες, μεταξύ των ομάδων σε σχέση με τον χρόνο, δείχνοντας ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, στην πρώτη αιμοληψία η ομάδα Β, που

λάμβανε την μικρότερη συγκέντρωση της πολυφαινολικής σκόνης (200 ppm), είχε αυξημένες τιμές γλουταθειόνης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου περίπου στο 51% (από 13,1 σε 19,8 $\mu\text{mol/gr}$ αιμοσφαιρίνης), που σημαίνει πως τα νεαρά κοτόπουλα με την χορήγηση πολυφαινολικών προσθέτων, αυξάνουν τα επίπεδα της γλουταθειόνης. Στην ομάδα Γ αυξάνεται η τιμή TAC, η οποία είναι στατιστικά σημαντική, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Κατά συνέπεια, η παρουσίαση πολυφαινολών στο πόσιμο νερό της ομάδας αυτής, βοηθά στην αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα.

ABSTRACT

For the past few years, a great effort has been made to increase the antioxidant defence and protection of the organism against oxidative stress harmful effects. Many studies suggest that polyphenols originating from olive oil, are capable of acting as plant-chemical antioxidants. This is the first study where polyphenolic powder was added to the broiler chickens' water.

The aim of the present study, was to measure oxidative stress biomarkers in broiler chickens' blood, administrated with polyphenolic powder from processed olive mill waste waters, dissolved in drinking water, in order to examine the effect on their antioxidant status.

The chickens were fed according to plan, but they were administrated with water, containing polyphenolic powder. The chickens were divided into three (3) groups of twenty five (25) subjects. Group A was the control group, which was administrated with drinking water without polyphenols, throughout the experiment. The other two (2) were administrated with polyphenolic water, each one of a different concentration. The water was freshened up, daily. Two (2) blood collections were performed, one at the age of forty (40) days and one at the age of sixty (60) days. After each blood collection, biochemical analysis of the samples was performed to collect hemolysate and plasma [the hemolysate for assaying reduced glutathione (GSH) and catalase activity and the plasma for the total antioxidant capacity (TAC), TBARS and protein carbonyls].

To sum up, the results of this study were positive and encouraging. Polyphenolic additives affect the oxidative stress biomarkers' behaviour in between groups over time, presenting interesting results. For example, samples of the first blood collection of Group B, administrated with the smallest concentration of polyphenolic powder (200ppm), had increased GSH levels compared to the control Group (Group A) by 51%, which means that young chickens increase their glutathione levels after being administrated with polyphenolic additives. Increase of TAC in Group C was statistically important. Therefore, the presence of polyphenols in their water, helps increase the total antioxidant capacity in their plasma.

ΠΕΡΙΞΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....	11

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες.....	12
1.1.1. Γενικά.....	12
1.1.2. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών.....	13
1.1.3. Οξειδωτικό στρες.....	14
1.1.4. Αντιοξειδωτικοί παράγοντες.....	15
1.2. Πολυφαινόλες.....	15
1.2.1. Γενικά - Κατηγορίες πολυφαινολών.....	15
1.2.2. Ιδιότητες πολυφαινολών.....	18
1.2.3. Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία.....	18
1.2.4. Επιδράσεις πολυφαινολών από συστατικά ελαιολάδου και Υ.Α.Ε.....	20
1.3. Σκοπός.....	20

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....21

2.1. Γενικά.....	21
2.2. Περιγραφή Σκόνης Πολυφαινολικού Εκχυλίσματος.....	21
2.3. Περιγραφή Σιτηρεσίου - Βάρη.....	24
2.4. Αιμοληψία.....	25
2.4.1. Επεξεργασία Αίματος.....	26
2.5. Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.....	26
2.5.1. Γενικά.....	26
2.5.2. Μέθοδοι.....	27
2.5.2.1. Μέτρηση Γλουταθειόνης (GSH).....	27
2.5.2.2. Μέτρηση Καταλάσης.....	30
2.5.2.3. Μέτρηση Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC).....	33
2.5.2.4. Μέτρηση TBARS.....	36
2.5.2.5. Μέτρηση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων.....	38
2.6. Εκτίμηση Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Ρίζας DPPH•.....	41
2.7. Στατιστική Ανάλυση.....	44

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....45

3.1. GSH.....	45
3.2. Καταλάση.....	46
3.3. TAC.....	47
3.4. TBARS.....	48
3.5. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια.....	49
3.6. Αναστολή Ρίζας DPPH.....	50

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....51

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....54

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.	Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα που δημιουργεί ελεύθερη ρίζα	12
Εικόνα 2.	Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών	13
Εικόνα 3.	Κατηγορίες πολυφαινολών	17
Εικόνα 4.	Ασθένειες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες	19
Εικόνα 5.	Προϊόντα πολυφαινολικού εκχυλίσματος	21
Εικόνα 6.	Χρωματογραφία (HPLC) του Πολυφαινολικού Προφίλ του Προϊόντος	23
Εικόνα 7.	Συντακτικός τύπος της Γλουταθειόνης	27
Εικόνα 8.	Ανακύκλωση Και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης	28
Εικόνα 9.	Φάσμα απορρόφησης 2-Nitro-5-thiobenzoic acid	30
Εικόνα 10.	Μονοπάτι αναγωγής του H_2O_2 σε H_2O	31
Εικόνα 11.	Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA	36
Εικόνα 12.	Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δίνιτριφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου	39
Εικόνα 13.	Η Αναγωγή του DPPH [•] σε DPPH:H	42

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.	Συγκεντρώσεις πολυφαινολικής σκόνης στις ομάδες των κοτόπουλων	23
Πίνακας 2.	Σύσταση σιτηρεσίου	24
Πίνακας 3.	Μετρήσεις βάρους κοτόπουλων	24
Πίνακας 4.	Απόδοση σε κρέας μετά τη σφαγή	25
Πίνακας 5.	Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της GSH	29
Πίνακας 6.	Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης	32
Πίνακας 7.	Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC	35
Πίνακας 8.	Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων	43
Πίνακας 9.	Αποτελέσματα μετρήσεων της GSH ($\mu\text{mol/gHb}$) στο Αιμόλυμα	45
Πίνακας 10.	Αύξηση GSH % σε σχέση με Control	45
Πίνακας 11.	Αύξηση GSH % μεταξύ των ομάδων σε σχέση με τον Χρόνο	45
Πίνακας 12.	Αποτελέσματα μετρήσεων της Δραστικότητας της Καταλάσης (U/mg Hb) στο Αιμόλυμα	46
Πίνακας 13.	Αύξηση Καταλάσης % σε σχέση με Control	46
Πίνακας 14.	Αύξηση Καταλάσης % μεταξύ των ομάδων σε σχέση με τον Χρόνο	46
Πίνακας 15.	Αποτελέσματα μετρήσεων της TAC (mmol DPPH/ L. Pl.) στο Πλάσμα	47
Πίνακας 16.	Αύξηση TAC % σε σχέση με Control	47
Πίνακας 17.	Αύξηση TAC % μεταξύ των ομάδων σε σχέση με τον Χρόνο	47
Πίνακας 18.	Αποτελέσματα μετρήσεων των TBARS ($\mu\text{mol DPPH/ L. Pl.}$) στο Πλάσμα	48
Πίνακας 19.	Μείωση TBARS % σε σχέση με Control	48
Πίνακας 20.	Μείωση TBARS % μεταξύ των ομάδων σε σχέση με τον Χρόνο	48
Πίνακας 21.	Αποτελέσματα μετρήσεων των Καρβονυλίων (nmol /mg Protein.) στο Πλάσμα	49
Πίνακας 22.	Μείωση Καρβονυλίων % σε σχέση με Control	49
Πίνακας 23.	Μείωση Καρβονυλίων % μεταξύ των ομάδων σε σχέση με τον Χρόνο	49
Πίνακας 24.	Συγκεντρώσεις πολυφαινολικής σκόνης και αντίστοιχη αναστολή της Ρίζας DPPH	50

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1.	GSH στο Αιμόλυμα των Κοτόπουλων.	45
Γράφημα 2.	Δραστικότητα Καταλάσης στο Αιμόλυμα των Κοτόπουλων.	46
Γράφημα 3.	Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα στο Πλάσμα των Κοτόπουλων.	47
Γράφημα 4.	TBARS στο Πλάσμα των Κοτόπουλων.	48
Γράφημα 5.	Καρβονύλια στο Πλάσμα των Κοτόπουλων.	49
Γράφημα 6.	Αναστολή Ρίζας DPPH	50

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

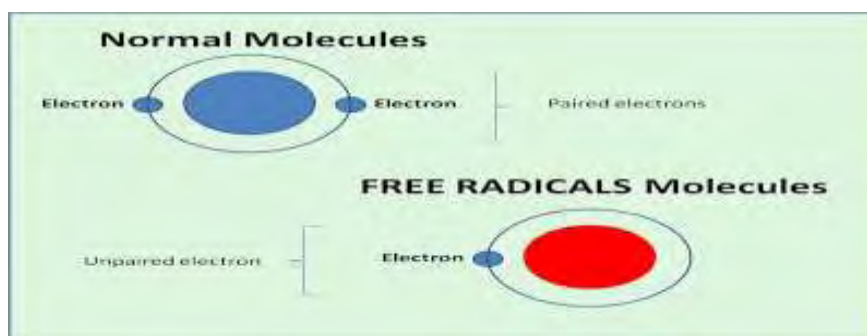
1.1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

1.1.1. Γενικά

Τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στιβάδας των ατόμων και των μορίων βρίσκονται συνήθως σε ζεύγη, τα οποία κινούνται σε μια καθορισμένη περιοχή που ονομάζεται αντίστοιχα ατομικό ή μοριακό τροχιακό. Τα άτομα ή μόρια, που φέρουν στην εξωτερική τους στιβάδα ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται ελεύθερες ρίζες (Gilbert, 2000, Halliwell & Gutteridge, 1989).

Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που έχει στον πυρήνα του ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο. Το μη συζευγμένο ηλεκτρόνιο αυξάνει τη δραστηριότητα του μορίου ή του ατόμου, γιατί προσπαθεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα γειτονικά άτομα, προκειμένου να σχηματίσει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων που θα κάνει τη δομή του σταθερότερη.

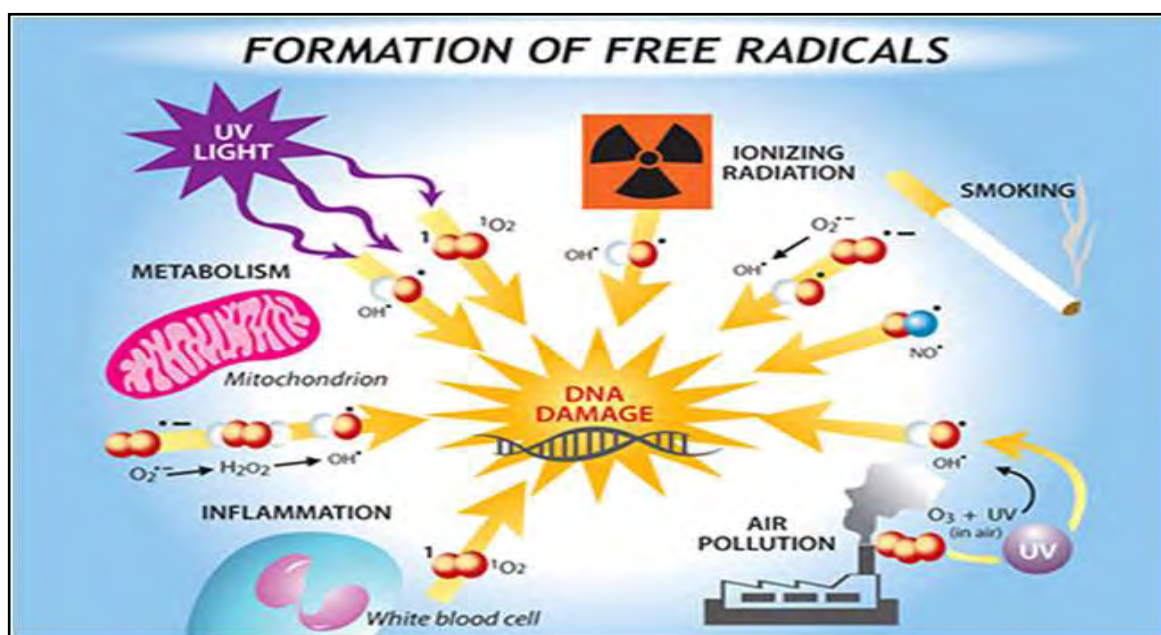
Γενικά οι ελεύθερες ρίζες οφείλουν την αστάθειά τους και τη μεγάλη του χημική δραστηριότητα στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιό τους (Valavanidis, 2006). Σε αυτή τους τη μεγάλη χημική δραστηριότητα αποδίδεται και το γεγονός πως οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με σημαντικά βιομόρια (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα) και να προκαλέσουν την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων που μπορούν να οδηγήσουν στην ολοκληρωτική καταστροφή του εκάστοτε βιολογικού υποστρώματος. Σε περίπτωση που το βιολογικό υπόστρωμα είναι το DNA τότε είναι δυνατόν να προκληθούν μεταλλάξεις που μπορούν να οδηγήσουν στον καρκίνο.



Εικόνα 1. Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα που δημιουργεί ελεύθερη ρίζα

1.1.2. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε ένα ευρύ φάσμα χημικών και βιολογικών συστημάτων, όπως κατά τη διάρκεια σχηματισμού των πλαστικών, της παλαίωσης των χρωμάτων, της καύσης των καυσίμων καθώς και μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό (Halliwell, 2001). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν ως παραπροϊόν της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια ή και κατά τη λιπιδική οξείδωση. Άλλες πηγές ελευθέρων ριζών αποτελούν οι ακτινοβολίες (ακτίνες X, υπεριώδης ακτινοβολία), η φλεγμονή, το κάπνισμα και η ρυπασμένη ατμόσφαιρα. Η παρουσία ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα είναι αποτέλεσμα της φυσιολογικής μεταβολικής λειτουργίας των κυττάρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται, προκειμένου να εξυπηρετήσουν βασικές βιολογικές λειτουργίες, ενώ σε άλλες περιπτώσεις παράγονται ως παραπροϊόντα μεταβολικών διαδικασιών, όπως προαναφέρθηκε.



Εικόνα 2. Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι ελεύθερες ρίζες:

- ◆ Είναι ρυθμιστές της ομοιόστασης και της ανάπτυξης των πολυκύτταρων οργανισμών, συμμετέχοντας στη μεταβίβαση οξειδοαναγωγικών σημάτων και ενεργοποιώντας τη διαδικασία της απόπτωσης.
- ◆ Ενεργοποιούν ένζυμα και προστατευτικούς κυτταρικούς μηχανισμούς.
- ◆ Αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας των κυττάρων έναντι παθογόνων μικροοργανισμών

- ◆ Η ρίζα NO[•] είναι σημαντικός ρυθμιστής της πίεσης του αίματος, προκαλώντας αγγειοδιαστολή και χάλαση των λείων μυϊκών ιστών.

Για τις ελεύθερες ρίζες συχνά χρησιμοποιείται ο όρος Reactive Oxygen Species (ROS). Ο όρος περιγράφει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο, όπως το O₂^{•-} και το OH[•]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου (O₂^{•-}), του υδροξυλίου (OH[•]), του αλκοξυλίου (RO[•]), και του περοξυλίου (ROO[•]).

Ωστόσο, στις ROS εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου, όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), οι ρίζες τριχλωρομεθύλιου (CCl₃[•]), οι θειούχες ρίζες (RS[•]) και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl).

1.1.3. Οξειδωτικό στρες

Σε κάθε βιολογικό σύστημα, πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης των ROS. Η αύξηση των οξειδώσεων από τα ROS οδηγεί τα κύτταρα σε μία κατάσταση που λέγεται **οξειδωτικό στρες** και είναι παράγοντας πρόκλησης ασθενειών (Cicerale *et al.*, 2008; AICR, 2007).

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

Το **οξειδωτικό στρες** προκαλείται συνήθως από:

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

1.1.4. Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Λόγω της συνεχούς έκθεσης σε ROS και για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες, ο οργανισμός μας, όπως όλα τα φυτά και τα ζώα, έχει αναπτύξει για προστασία διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στους οποίους παίρνουν μέρος αντιοξειδωτικές ουσίες. Γενικά χαρακτηρίζουμε ως **αντιοξειδωτική ουσία** κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. (Vaya J. and Aviram M., 2001). Επιπλέον, για να είναι μια ουσία αντιοξειδωτικό πρέπει να προσφέρει ανοχή έναντι του οξειδωτικού στρες, μειώνοντας τις ελεύθερες ρίζες, αναστέλλοντας την υπεροξείδωση των λιπιδίων κι άλλων μηχανισμών, προλαμβάνοντας την εμφάνιση ασθενειών (Kushi et al., 2011; Ibiebele et al., 2013; Klein et al., 2011; Baliga et al., 2011; Chen and Ross, 2012; Giaginis and Theocharis, 2011; Lin and Cai, 2012; Bozkurt et al., 2012; Ouyang et al., 2012; AICR, 2007).

Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους:

- Παρεμποδίζουν τη δημιουργία ROS,
- Σταματούν τη διάδοση των ελεύθερων ριζών που προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις. Επίσης είναι δυνατόν, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού (για παράδειγμα της βιταμίνης C), να συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού, όπως της τοκοφερόλης. Στην περίπτωση αυτή, έχουμε συνεργατική δράση των δύο αντιοξειδωτικών και λέμε ότι η βιταμίνη C έχει συν-αντιοξειδωτική δράση.

1.2. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

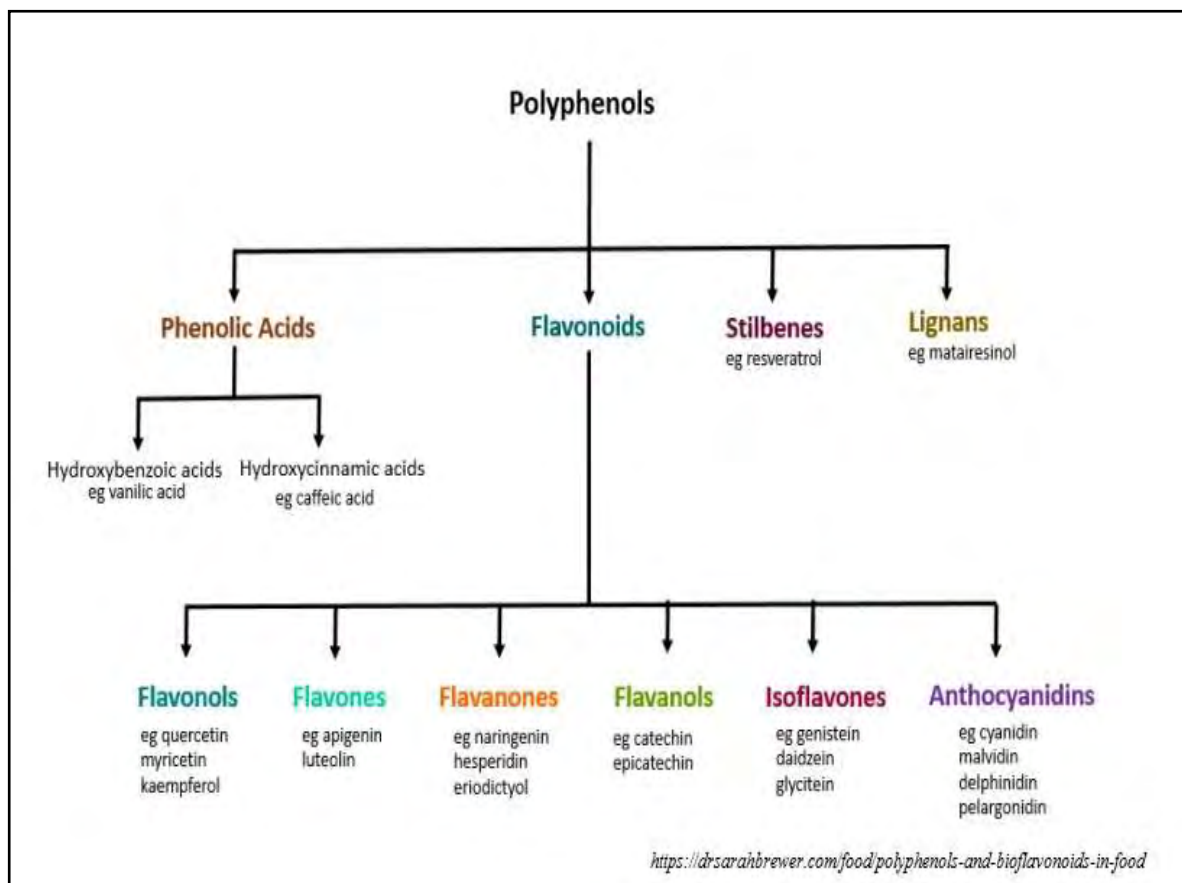
1.2.1. Γενικά - Κατηγορίες πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες είναι οι κυριότερες βιοδραστικές, φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων, οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο για τις βιολογικές τους ιδιότητες. Παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες και συνιστούν μια από τις πολυπληθέστερες και περισσότερο διαδεδομένες ομάδες φυτικών μεταβολιτών, ενώ αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου. Υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά, τα βότανα, τα ψυχανθή, τα δημητριακά, το τσάι, το κόκκινο κρασί και αλλού, λειτουργώντας ως άμυνα του εκάστοτε φυτού έναντι παθογόνων καθώς και του στρες που μπορεί να προκληθεί από την υπερϊώδη ακτινοβολία και άλλους παράγοντες (Manach et al., 2004, Crozier et al., 2006).

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

- **Φλαβονοειδή.** Αποτελούν τη μεγαλύτερη υποομάδα των πολυφαινολών και είναι ιδιαίτερα ευεργετικά για την υγεία λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων, της δράσης τους στην καταπολέμηση των φλεγμονών αλλά και της αντικαρκινικής τους δράσης. Παραδείγματα τροφών που περιέχουν φλαβονοειδή είναι το τσάι, ο καφές, το κόκκινο λάχανο, το ελαιόλαδο και άλλα. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες:

- Φλαβονόλες
- Φλαβανόλες
- Φλαβόνες
- Φλαβανόνες
- Ισοφλαβόνες
- Ανθοκυανιδίνες



Εικόνα 3. Κατηγορίες πολυφαινολών

- **Μη Φλαβονοειδή**

Τα μη φλαβονοειδή μπορούμε να τα χωρίσουμε σε 3 υποκατηγορίες:

- **Φαινολικά οξέα.** Παρέχουν αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιϊκές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Μία διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά ολικής άλεσης μας παρέχει επαρκείς ποσότητες από φαινολικά οξέα. Παραδείγματα τροφών που περιέχουν φαινολικά οξέα είναι τα μήλα, τα κεράσια, τα ακτινίδια, οι φράουλες, τα κρεμμύδια, το τσάι και άλλα.
- **Λιγνάνια.** Οι λιγνάνες είναι χημικές ενώσεις που βρίσκονται στα φυτά, και ιδιαίτερα στο λιναρόσπορο. Το λινάρι είναι ένα φυτό με εντυπωσιακά μωβ λουλούδια που είναι ενδημικά στη Μεσόγειο και την Ινδία. Οι λιγνάνες έχουν χρησιμοποιηθεί στα φυτικά φάρμακα για πολλούς αιώνες (Naghma, K., et al., 2007).
- **Στιλβένια.** Με την πιο διάσημη από αυτά την Ρεσβερατρόλη, είναι ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά του Alzheimer, των καρδιαγγειακών νόσων και ιδιαίτερα της αθηρομάτωσης, του καρκίνου και

του σακχαρώδους διαβήτη. Βρίσκονται στα μούρα, στη φλούδα των σταφυλιών ιδιαίτερα των κόκκινων, στο κρασί και σε άλλες φυτικές τροφές.

1.2.2. Ιδιότητες πολυφαινόλων

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, λόγω των αντιοξειδωτικών και των χημειοπροστατευτικών τους ιδιοτήτων στην ανθρώπινη υγεία (Dew et al., 2005). Γενικά οι πολυφαινόλες:

- Θεωρούνται υπεύθυνες για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών, συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών, προσελκύοντας τους επικονιαστές, καθώς και στη διασπορά των σπερμάτων
- Ως αντιοξειδωτικά, οι πολυφαινόλες μπορούν να προστατεύσουν τα συστατικά των κυττάρων από την οξειδωτική βλάβη. Ως εκ τούτου, μπορούν να περιορίσουν τον κίνδυνο των διαφόρων εκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως οι καρδιαγγειακές νόσοι, ο διαβήτης τύπου II και ο καρκίνος (Scalbert A. et al., 2005)
- Η χαμηλή τοξικότητα και οι ελάχιστες παρενέργειες που συνδέονται με την κατανάλωση πολυφαινόλων, αποτελούν πρόσθετα πλεονεκτήματά τους έναντι των παραδοσιακών χημειοπροστατευτικών παραγόντων (Bode A.M., Dong Z., 2006).

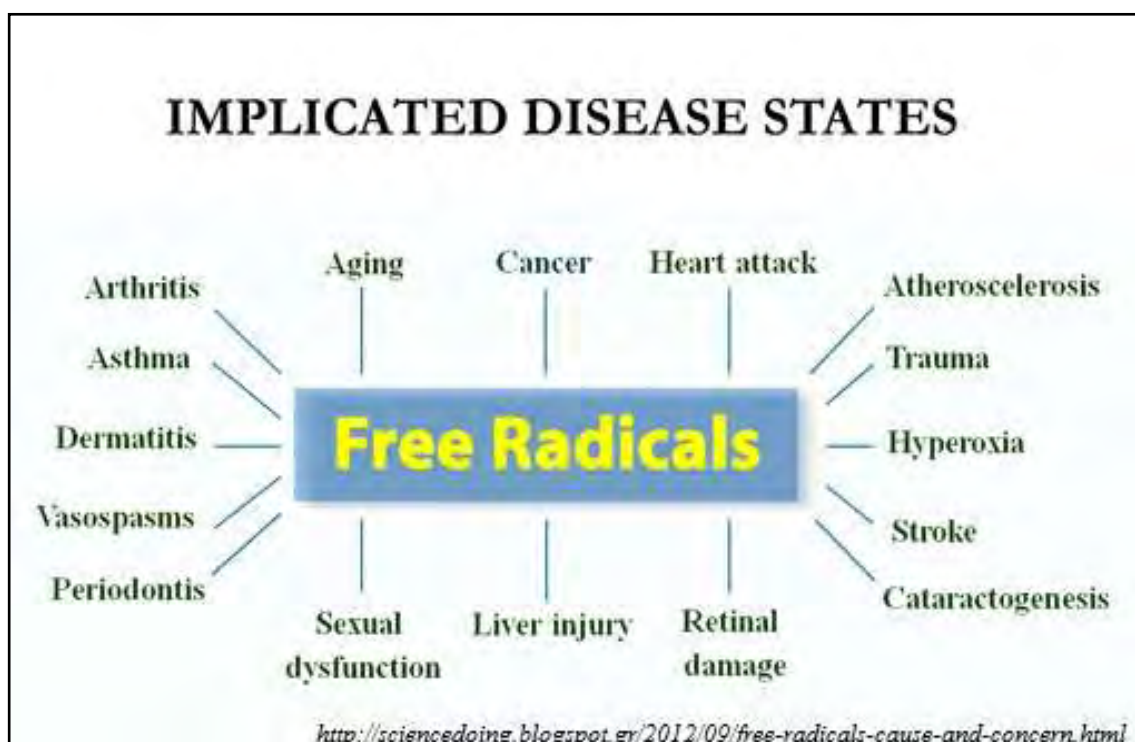
1.2.3. Επιδράσεις πολυφαινόλων στην υγεία

Κάποιοι από τους μηχανισμούς δράσης των πολυφαινόλων, που εξηγούν τον χημειοπροστατευτικό τους ρόλο έναντι καρκινικών κυττάρων σχετίζονται με την καταστολή της υπερέκφρασης των προ-οξειδωτικών ενζύμων, τη ρύθμιση της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων, την αναστολή των μεταλλοπρωτεϊνών καθώς και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα. Παράλληλα οι πολυφαινόλες διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης και την έκφραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινες κυτταρικές σειρές υποστηρίζουν το ρόλο των πολυφαινόλων στην πρόληψη της οστεοπόρωσης (Scalbert et al., 2005).

Πιθανολογείται πως παίζει σημαντικό ρόλο σε νευροεκφυλιστικές νόσους συμπεριλαμβανομένων αυτών του Alzheimer, του Parkinson και του Huntington. Το οξειδωτικό στρες πιστεύεται επίσης ότι σχετίζεται με καρδιαγγειακές παθήσεις, καθώς η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) στο αγγειακό

ενδοθήλιο είναι προάγγελος της δημιουργίας αθηρωματικών πλακών. Είναι ακόμα γνωστός ο ρόλος του στον τραυματισμό κάποιου ιστού που εμφανίζεται μετά από επαναιμάτωση κατόπιν υποξίας.

Αυτό συμβαίνει επειδή η αποκατάσταση της ροής του οξυγόνου, παρ' όλη την αναγκαιότητά της για την επιβίωση του ιστού, οδηγεί στο σχηματισμό ROS. Ο καπνός του τσιγάρου, με τα διάφορα εποξειδία και υπεροξειδία που περιέχει, καθώς και η εισπνοή ανόργανων σωματιδίων όπως η άσβεστος προκαλούν οξειδωτική βλάβη των πνευμόνων. Έχει διαπιστωθεί πως το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται και στην εμφάνιση πολλών άλλων ασθενειών, όπως καρκίνου, δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, μυοκαρδιακών βλαβών, σχιζοφρένειας, διπολικής διαταραχής και συνδρόμου εύθραυστου Χ χρωμοσώματος. Τέλος, το οξειδωτικό στρες φαίνεται ότι κρύβεται πίσω από το σύνδρομο της χρόνιας κόπωσης (*B.N. Ames et al., 1993, Cooke et al., 2003*).



Εικόνα 4. Ασθένειες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες

1.2.4. Επιδράσεις πολυφαινολών από συστατικά ελαιολάδου και Υ.Α.Ε

Τα τελευταία χρόνια το πολυφαινολικό προφίλ των Υ.Α.Ε (Υγρά Απόβλητα Ελαιολιβερίου) έχει κινήσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Ο λόγος είναι οι σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών που περιέχονται σε αυτά, οι οποίες σχετίζονται με την πρόληψη πολλών χρόνιων ασθενειών, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, καρκίνος, διαβήτης τύπου 2, νευροεκφυλιστικές ασθένειες και οστεοπόρωση (Giacosa et.al. 2012; Scoditti et. al. 2012; Castaner et. al., 2011; Yamada et.al. 2009; Perez-Jimenez et al., 2010; Scalbert et al., 2005; Dew et. al., 2005).

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια πιλοτική έρευνα καθώς είναι η πρώτη όπου πολυφαινολικά πρόσθετα από επεξεργασμένα Υ.Α.Ε. σε μορφή σκόνης, προστίθενται στην τροφοδοσία νερού των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής νεαρής ηλικίας, με σκοπό την αιματολογική ανάλυση των δεικτών του οξειδωτικού στρες.

Τα Υ.Α.Ε. χαρακτηρίζονται από βαρύ φορτίο ρύπων, με κύριο ρυπαντή τις πολυφαινόλες (Mebirouk M., et. al., 2007; Tsimidou et. al. 1992; Ntougias et. al, 2013). Η ύπαρξη διάφορων πολυφαινολών ευθύνεται για το έντονο σκούρο χρώμα και τη χαρακτηριστική μυρωδιά των Υ.Α.Ε. Όταν απομονώνονται οι πολυφαινόλες από το φορτίο των Υ.Α.Ε., δημιουργείται ένα προϊόν, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλές γεωργικές εφαρμογές, όπως η υδρολίπανση και η ενσίρωση. (Gkoutsidis et al., 2011; Ntougias et. Al, 2013), ενώ το πολυφαινολικό προϊόν μπορεί να εκμεταλλευτεί αναλόγως λόγω των σημαντικών αντιοξειδωτικών του επιδράσεων.

1.3. Σκοπός

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

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Γενικά

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

- Εκτροφή κοτόπουλων (Ημερήσια διάλυση πολυφαινολικής σκόνης στο νερό και παρακολούθηση συνθηκών ομαλής διαβίωσης – ανάπτυξης).
- Παρακολούθηση ανάπτυξης κοτόπουλων (Μέτρηση αύξησης ζωϊκού βάρους κάθε πέντε (5) μέρες).
- Εκτέλεση δυο (2) αιμοληψιών.

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

- Ταχεία και ασφαλή μεταφορά των δειγμάτων των αιμοληψιών (150 δείγματα) και τοποθέτησή τους σε ψυγείο στους -80°C .
- Επεξεργασία του αίματος. (Λήψη πλάσματος – αιμολύματος).
- Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.

2.2. Περιγραφή Σκόνης Πολυφαινολικού Εκχυλίσματος

Το προϊόν με την εμπορική επωνυμία **MEDOLIVA®**, παράγεται σύμφωνα με μία κατοχυρωμένη διαδικασία, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη καθαρά φυτικά νερά που προέρχονται από τους διαχωριστήρες προσεκτικά επιλεγμένων ελαιουργείων που παράγουν μόνο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο αποκλειστικά από βιολογικές καλλιέργειες ελιάς στην Ελλάδα.



Εικόνα 5. Προϊόντα πολυφαινολικού εκχυλίσματος.

Η κατοχυρωμένη με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας διαδικασία παραγωγής δεν χρησιμοποιεί καθόλου οργανικούς διαλύτες ή άλλα επικίνδυνα υλικά αλλά μόνον υπέρ καθαρό πόσιμο νερό και εφαρμόζει μια φιλική προς το περιβάλλον λειτουργία, έχοντας

υιοθετήσει την οδηγία της ΕΕ που αφορά στην Αρχή της Ολικής Αξιοποίησης (Principle of Total Discharge).

Το προϊόν παράγεται σε υγρή μορφή η οποία είναι σταθερή και ασφαλής χωρίς ανάγκη οποιασδήποτε προσθήκης συντηρητικού. Η μετατροπή του σε μορφή σκόνης, γίνεται με χρήση **αντιεκρηκτικής τεχνολογίας συσκευής ξήρανσης με ψεκασμό (Spray Dryer)**.

Περιγραφή προϊόντος

Υγρό φυσικό αντιοξειδωτικό, που παράγεται από την υδατώδη φάση του ελαιοκάρπου, με υψηλή περιεκτικότητα σε υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη οι οποίες είναι γνωστές ως τα πιο αποτελεσματικά φυσικά αντιοξειδωτικά με πλήθος επιστημονικών αναφορών για την συμβολή τους στην ανθρώπινη υγεία που οφείλεται στη δράση τους ως επιβραδυντές ελεύθερων ριζών. Το προϊόν περιέχει επίσης σημαντικές ποσότητες καφεϊκού και κουμαρικού οξέος, κατεχίνες και ανθοκυάνες. Η περιεκτικότητα το προϊόντος MEDOLIVA ® σε υδροξυτυροσόλη / τυροσόλη είναι 30 φορές περισσότερο από ότι στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο.

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Χρώμα: σκούρο μαύρο

Ιξώδες: Χαμηλό

Συνολικά στερεά: 10% w / w ελάχιστο ή 24 BRIX

Οσμή: Χαρακτηριστική του ελαιοκάρπου

Γεύση: Πικρή φυσικό χαρακτηριστικό της πολυφαινολικής του σύνθεσης

pH: $4,5 \pm 0,1$

Χημική σύσταση

Το προϊόν έχει αναλυθεί με HPLC και περιέχει τις ακόλουθες πολυφαινόλες:

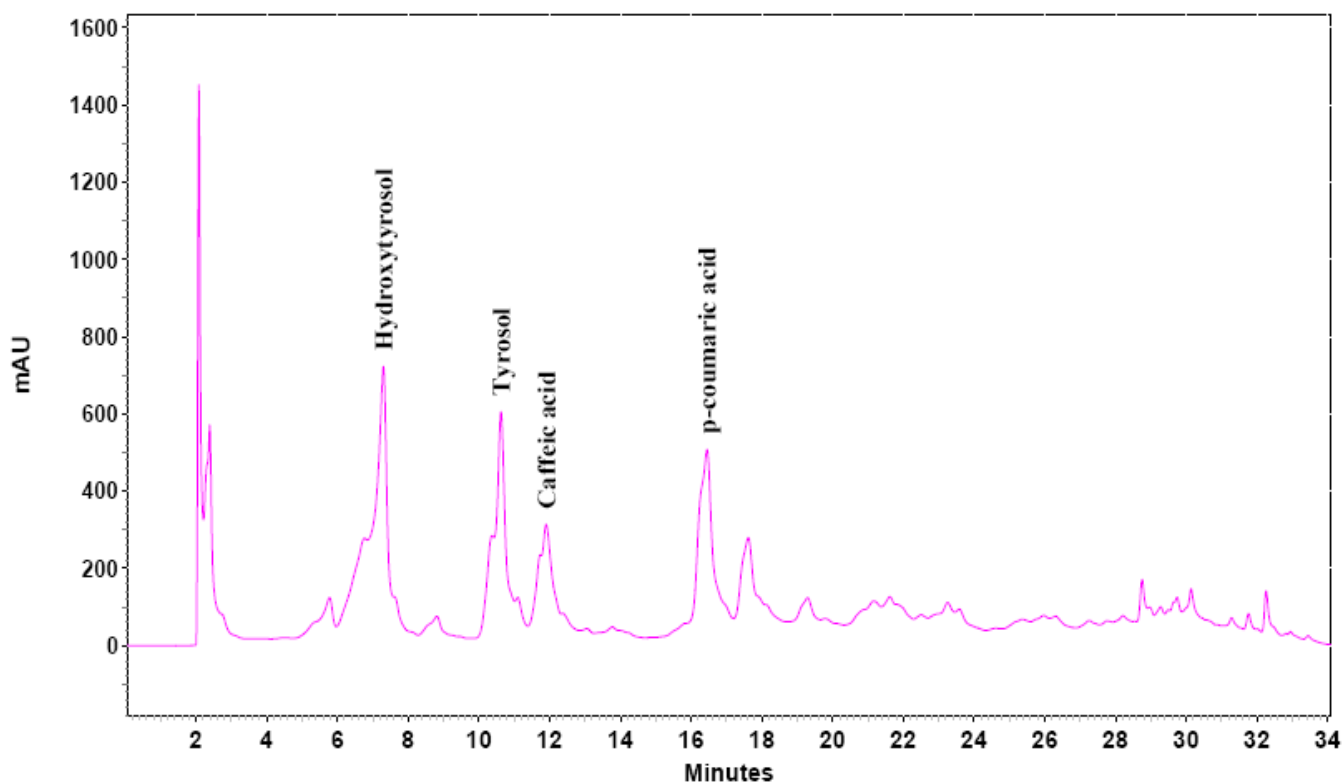
A) Υδροξυτυροσόλη

B) Τυροσόλη

Γ) Καφεϊκό οξύ

Δ) ρ-κουμαρικό οξύ

E) Ανθοκυάνες και κατεχίνες



Εικόνα 6. Χρωματογραφία (HPLC) του Πολυφαινολικού Προφίλ του Προϊόντος.

Στο πείραμά μας χρησιμοποιήθηκαν στο σύνολο 75 κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, υβρίδια F1 SASSO / HUBBARD, τα οποία χωρίστηκαν σε 3 ομάδες των 25 ατόμων, ως εξής:

Ομάδα	Συγκέντρωση πολυφαινολικής σκόνης	Ποσότητα πολυφαινολικής σκόνης / 10 L H ₂ O
1η	Control	-
2η	200ppm	2gr
3η	500ppm	5gr

Πίνακας 1. Συγκεντρώσεις πολυφαινολικής σκόνης στις ομάδες των κοτόπουλων

2.3. Περιγραφή Σιτηρεσίου - Βάρη

Και οι τρεις (3) ομάδες λάμβαναν τροφή, η οποία ανανεωνόταν καθημερινά, όπως και το νερό που τους τροφοδοτούνταν.

*ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ	ΚΟΤΟΠΟΥΛΩΝ	ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ %
	1-30 ΗΜΕΡΩΝ	30 ΗΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΑΝΩ
Υγρασία	12	12
Αζωτούχες	21	19
Λιπαρές ουσίες	3,7	3,7
Ινώδεις ουσίες	4,5	3,5
Τέφρα	5,6	5,5
Ασβέστιο	1,2	1,05
Φώσφορος	0,7	0,73
Νάτριο	0,18	0,18
Λυσίνη	1,1	1,0
Μεθειονίνη	0,48	0,4

Πίνακας 2. Σύσταση σιτηρεσίου.

*Μορφή: αλευρώδης

Τα κοτόπουλα και των τριών (3) ομάδων ζυγίζονταν κάθε πέντε (5) μέρες, ώστε να μπορέσει να υπολογιστεί η καμπύλη αύξησης βάρους, καθώς και η απόδοση σε κρέας μετά τη σφαγή των κοτόπουλων.

		ΚΙΛΑ ΟΜΑΔΩΝ		
ΗΛΙΚΙΑ (ΗΜΕΡΕΣ)	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	CONTROL	200 ppm	500 ppm
15	20-Sep	7,5	8	8,5
20	26-Sep	11,8	12,4	13,6
25	30-Sep	16	16,8	18,9
30	05-Oct	21,4	22	25
35	10-Oct	24,1	26,5	29,4
40	13-Oct	26,2	30,3	33,9
45	18-Oct	31	36,8	38,6
50	24 -Οκτ	40,2	45,7	49,7
55	29-Oct	44,4	48,5	53,4
60	02-Nov	50,3	54,9	57,8
Σφάγιο Βάρος				
60	02-Nov	40,4	47,1	50,0

Πίνακας 3. Μετρήσεις βάρους κοτόπουλων.

Απόδοση σε κρέας %

CONTROL	200ppm	500ppm
80,3	85,8	86,5

Πίνακας 4. Απόδοση σε κρέας μετά τη σφαγή.

2.4. Αιμοληψία

Εκτελέστηκαν δυο (2) αιμοληψίες ακολουθώντας την διαδικασία που περιγράφεται από τους Ison A.J.et.al.(2005), όταν τα κοτόπουλα ήταν ηλικίας 40 και 60 ημερών, τα οποία λάμβαναν το πολυφαινολικό εκχύλισμα για 25 και 45 ημέρες αντίστοιχα. Σύμφωνα με μελέτη συλλογής αίματος των πουλερικών Spiegle S, et. al.,(2005), η μέγιστη ποσότητα του αίματος που μπορεί να συλλεχθεί από ένα υγιές κοτόπουλο, είναι το 1% του σωματικού του βάρους. Έτσι, για τις πειραματικές ανάγκες αποφασίστηκε να λαμβάνονται 4 ml αίματος. Χρησιμοποιήθηκαν:

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

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

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

Εφαρμόζονταν πίεση στην φλέβα, για αποφυγή αιμορραγίας και το αίμα μεταφέρονταν στα σωληνάρια συλλογής. Το ληφθέν αίμα 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 σε μισή ώρα, μετά το πέρας της αιμοληψίας.

2.4.1. Επεξεργασία Αίματος.

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

1. Τοποθετούμε τα σωληνάρια συλλογής αίματος στην φυγόκεντρο και φυγοκεντρούμε στα 1370 g, για 10 λεπτά, στους 4 °C.
2. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (πλάσμα) και το χωρίζουμε σε φιαλίδια eppendorf, 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 4020 g, για 15 λεπτά, στους 4 °C.
5. Συλλέγουμε το υπερκείμενο, που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μL).
6. Χωρίζουμε σε eppendorf το αιμόλυμα ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν. Διατήρηση στους -20 °C.

Στην συνέχεια καθαρίζεται το αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης.

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

2.5. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες

2.5.1. Γενικά

Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστηριότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Για την

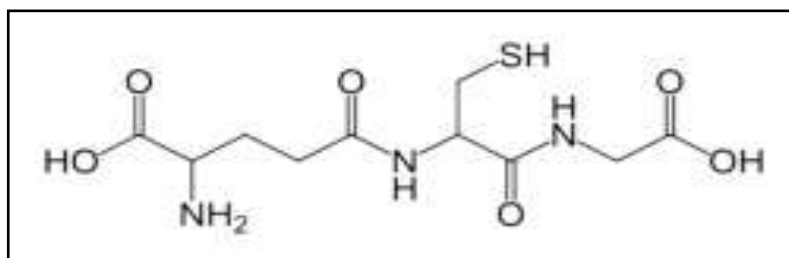
αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες, ένας από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων είναι οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, ενώ για την καταστροφή των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

2.5.2. Μέθοδοι

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

2.5.2.1. Μέτρηση Γλουταθειόνης (GSH)

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

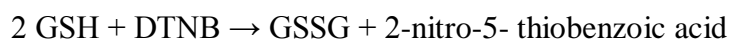


Εικόνα 7. Συντακτικός τύπος της Γλουταθειόνης.

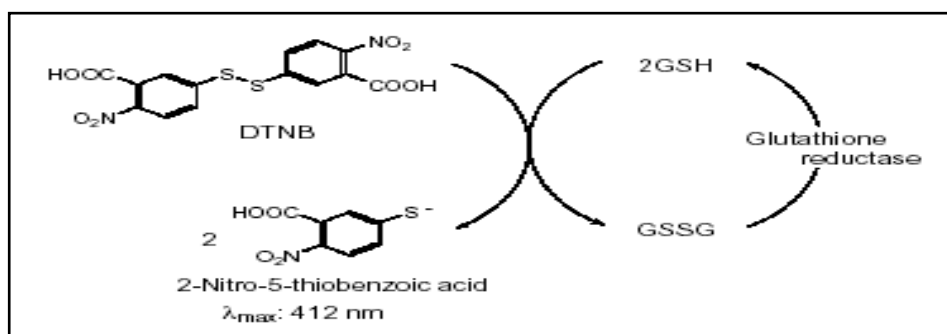
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battin et al., 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι, επίσης, ζωτικής σημασίας 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 et.al., 2004).



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



Εικόνα 8. Ανακύκλωση Και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 67 mM (pH 7.95).

MB (KH_2PO_4): 136

MB (Na_2HPO_4): 178

Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 500 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 5.94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.95.

□ **DTNB** (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό\

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

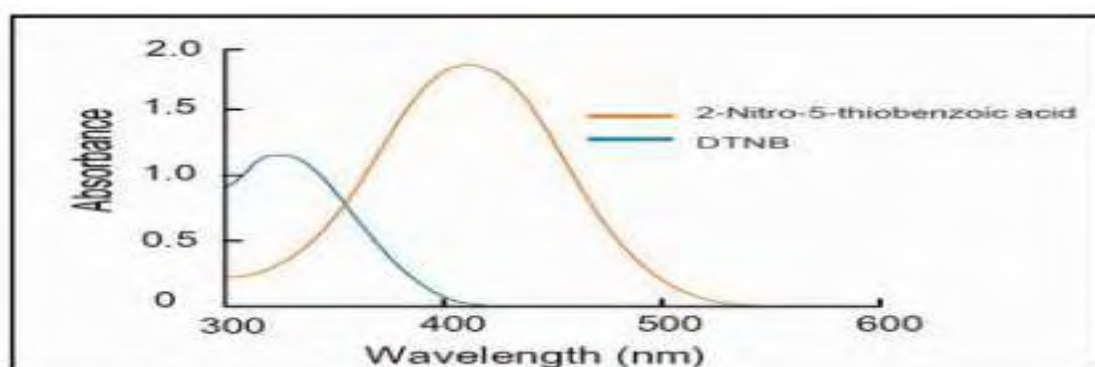
300μL αιμολύματος προστίθενται σε 300μL TCA 5% και φυγοκεντρούνται στα 16.000g για 5 min στους 5°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και διατηρείται σε φιαλίδιο erpendorf. Σε 300 μL αιμολύματος προστίθενται 90μL TCA 5%, Ανακινούνται με vortex και φυγοκεντρούνται στα 16.000 g για 5min στους 5°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό erpendorf για τη συνέχεια του πειράματος.

Προσθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια erpendorf:

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

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

Αναδεύουμε τα erpendorf και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm. (Roland F. Beers, Jr. and Irwin W. Sizer. 1952).



Εικόνα 9. Φάσμα απορρόφησης 2-Nitro-5-thiobenzoic acid.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα GSH (mmol/L) = $(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta \text{abs}_{\text{τυφλού}} / 13.6) \times 262.6$, όπου 262.6 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 (300μL αιμολ. / 300μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραίωση (390μL / 300μL) που έγιναν από το 5% TCA. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

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.

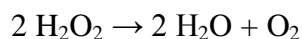
2.5.2.2. Μέτρηση Καταλάσης

Αρχή της μεθόδου

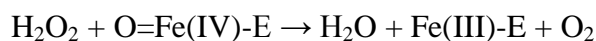
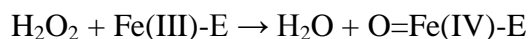
Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Για να διαχειριστεί αυτό το πρόβλημα, η ενζυμική καταλάση χρησιμοποιείται συχνά για να καταλύσει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου σε αβλαβή οξυγόνο και νερό. *Chelikani P, et. al., (2004)*. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο.

Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων (*Boon EM, et. al. (2007)*). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Το ιδανικό της

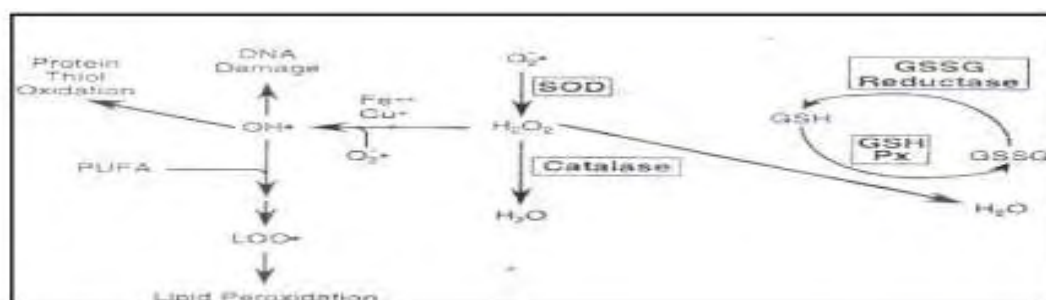
pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



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



Εικόνα 10. Μονοπάτι αναγωγής του H_2O_2 σε H_2O

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



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

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 67mM (pH 7.4)

MB (KH_2PO_4): 136

MB (Na_2HPO_4): 178

Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100mL KH_2PO_4 (67 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν

χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂).

Το διάλυμα H₂O₂ είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

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

Πίνακας 6. Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης.

- 1.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.
- 2.Μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV).
- 3.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.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = (Δ Abs_{sample} per min / 40) x(750 x 1000 x 10 x 2) / Conc. Hb (mg/mL).

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μ mol/mL. Το 750 είναι ο παράγοντας αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μ L) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μ L) (3000/4=750), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραιώση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των

ερυθροκυττάρων.

Ο υπολογισμός της δραστηριότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοφαιρίνη.

ΔAbs = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

$U = \mu\text{mol}/\text{min}$.

$\Delta \text{Abs}_{\text{blank}}$ είναι πάντοτε μηδέν και έτσι δεν απαιτείται μέτρηση του τυφλού.

2.5.2.3. Μέτρηση Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC)

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

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

Αρχή της μεθόδου

Η TAC του ορού στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH^\bullet) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine).

Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4)

MB (KH_2PO_4): 136

MB (Na_2HPO_4): 178

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

DPPH 0.1 mM, MB: 394.32

Διαλύουμε 0.02 g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200 μL του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19.8 mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα, συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο). Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 mL είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως, στο οποίο φτιάχνουμε το DPPH για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

Ασκορβικό οξύ 10 mM

Είναι έτοιμο προς χρήση.

Φυσιολογικά, η τιμή της απορρόφησης για το δείγμα που περιέχει το ασκορβικό οξύ (Positive Control) θα πρέπει να είναι χαμηλότερη και από την τιμή των δειγμάτων αλλά και του τυφλού. Ο λόγος είναι η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος (ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο) που έχουμε επιλέξει. Η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων, θα πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές του τυφλού (η μεγαλύτερη τιμή) και του θετικού ελέγχου (η μικρότερη τιμή).

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorf:

	Blank	Θετικό control	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μL	495 μL	480 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL	500 μL
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	-	5 μL	-

Πλάσμα	-	-	20 μ L
--------	---	---	------------

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

Ανακινούμε τα Eppendorfs μερικές φορές και τα επωάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης η αντιοξειδωτικές ουσίες του ορού, εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη. **Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25°C** (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση).

Μεταφέρουμε 900 mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ, % 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 (1000 μL στην κυψελίδα / 20 μL πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 50).

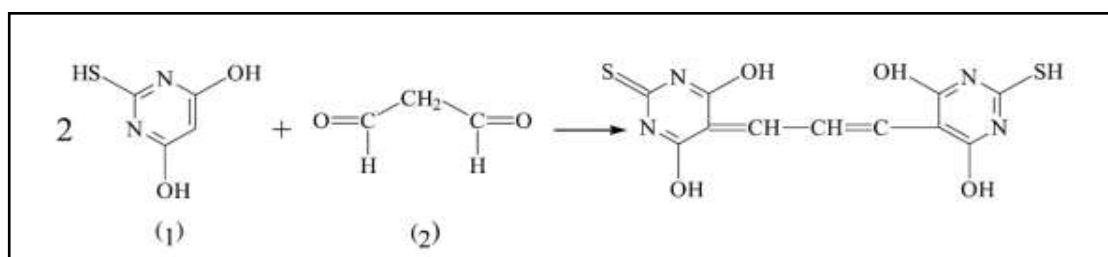
δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L σε mL ορού.

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

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



Εικόνα 11. Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA.

Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος του Keles et al., (2001).

Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95° C.

Αντιδραστήρια

Tris-HCl 200 mM (pH 7.4).

MB (Tris): 121.14.

MB (HCl): 36.46 (stock 37%) [10.1 N].

Για να παρασκευάσουμε ≈100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0.1 N). Για το Tris ζυγίζουμε 0.61 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0.42 mL του stock 37% HCl (10.1 N) σε 42 mL νερού. Σε

ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25 mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42 mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100 mL. Ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7.4.

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

Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM).

MB (TBA): 144.1

MB (Na₂SO₄): 142.04.

Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος, ζυγίζουμε 2.84 g Na₂SO₄ και 0.08 g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

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

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

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL πλάσματος (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό).

Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Προσθέτουμε 1 mL Na₂SO₄ – TBA και επωάζουμε στους 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο.

Μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min.

Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε.

Μεταφέρουμε 1 mL σε eppendorf και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25°C για 3 min.

Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί

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

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

2.5.2.5. Μέτρηση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων

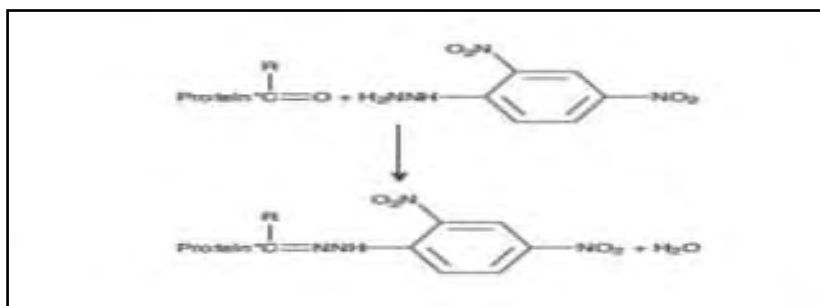
Αρχή της μεθόδου

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 σοβαρές 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-δινιτριφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δινιτροφαινυλδραζονίου. Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο Patsoukis et. al., (2004).



Εικόνα 12. Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPΗ (δίνιτροφαινυλνδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλνδραζονίου.

Αντιδραστήρια

Διάλυμα HCl 2.5 N

HCl: MB 36.46; stock 37% (10.1 N)

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

DNPΗ 14 mM (MB: 198.1)

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

Ουρία 5 M (pH 2.3). (MB: 60.06)

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

Πειραματικό πρωτόκολλο

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

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

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

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

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

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

Υπολογισμοί

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

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

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανά πρωτεΐνη πλάσματος μπορεί να γίνει μέσω της εξίσωσης:

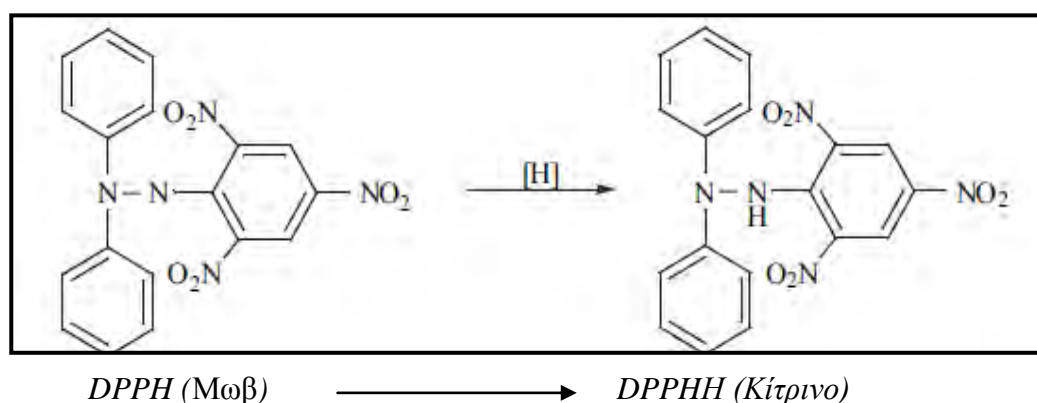
συγκ. πρωτ. καρβ. (nmol/mg) = συγκ. πρωτ. καρβ. nmol/mL / συγκ. πρωτ. mg/mL.

Συγκέντρωση πρωτεϊνών = 70mg/mL

2.6. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH^{*}

Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand-Williams et al. Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al, 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH^{*} μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH^{*}) είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH^{*}) **ανάγεται**, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 17). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Εικόνα 13. Η Αναγωγή του DPPH^{*} σε DPPH:H.

Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH[•] την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μ l μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μ M ρίζας DPPH[•]) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλίσμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 50, 100, 250, 500, 1000 μ g/ml). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μ l. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας, με σταθερό γρήγορο ρυθμό, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5).

Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (Blank). Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη και DPPH αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες.

Επειδή υπάρχει πιθανότητα η ίδια η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη. Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα, ενώ το διάλυμα της ρίζας DPPH[•] σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

	Blank	Control	C1	C2	C3	C4
Εκχύλισμα	-	-	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Μεθανόλη	1000 μ l	950 μ l	900 μ l	900 μ l	900 μ l	950 μ l
DPPH[•]	-	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 8. Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων.

Από τη φωτομέτρηση υπολογίστηκε το IC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλίσμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC_{50} , τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

2.7. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS). Για τη στατιστική ανάλυση υπολογιζόταν αρχικά οι παράμετροι της περιγραφικής στατιστικής η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard error).

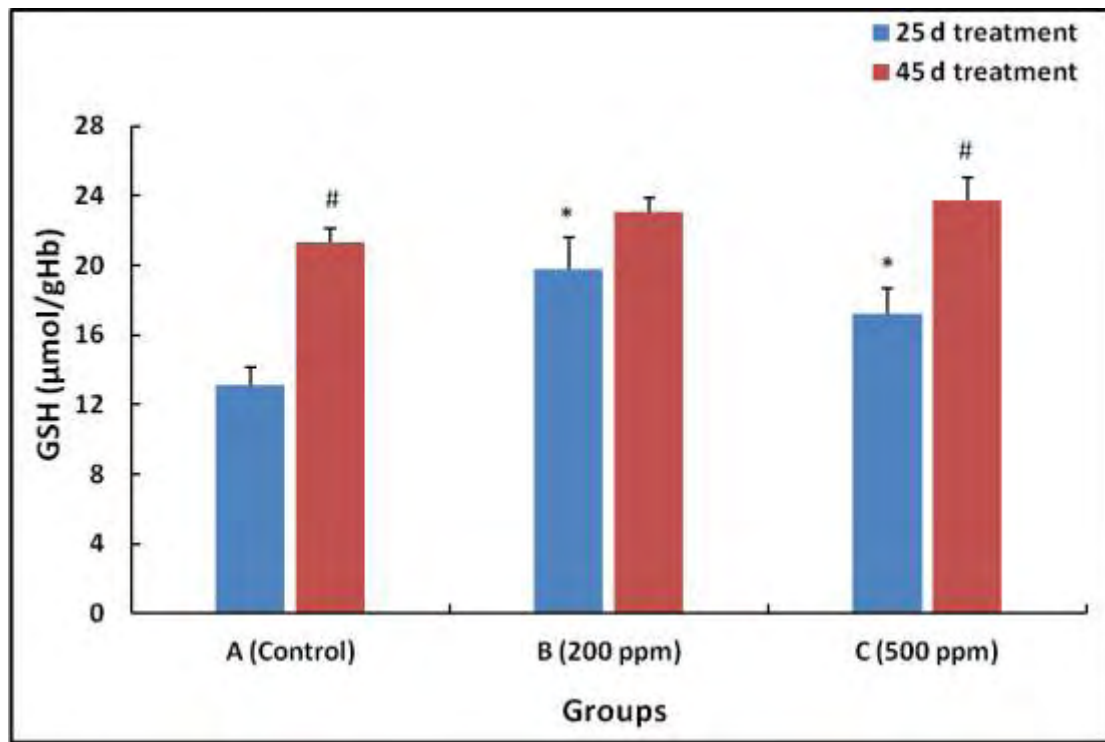
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του τεστ του Dunnett. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$.

Οι εξαρτημένες μεταβλητές ήταν:

- Η εξουδετέρωση των ριζών DPPH[•], ABTS^{•+}.
- Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC).
- Η μεταβολή της δραστηρότητας της CAT.
- Η μεταβολή της συγκέντρωσης της GSH.
- Η μεταβολή του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS.
- Η μεταβολή του δείκτη των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. GSH



Γράφημα 1. *GSH στο Αιμόλυμα των Κοτόπουλων.*

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά αιμοληψία.

$p < 0,05$ μεταξύ των ομάδων στον χρόνο.

1 ^η Αιμοληψία	average	sem	2 ^η Αιμοληψία	average	sem
A (Control)	13,109	1,002	A	21,342	0,770
B (200 ppm)	19,780	1,822	B	23,037	0,863
C (500 ppm)	17,197	1,510	C	23,691	1,358

Πίνακας 9. *Αποτελέσματα μετρήσεων της GSH (μmol/gHb) στο Αιμόλυμα.*

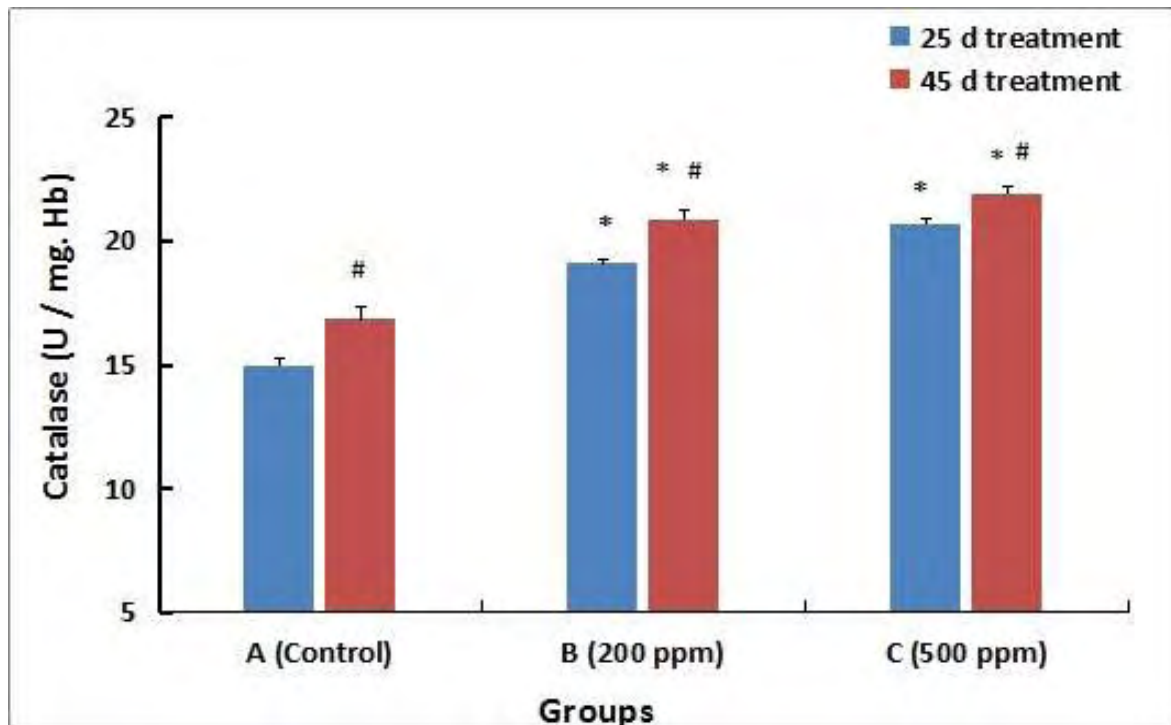
	1η Αιμοληψία	2η Αιμοληψία
B	50,9	7,94
C	31,2	11,0

Πίνακας 10. *Αύξηση GSH % σε σχέση με Control.*

	Αύξηση % από τις 25 στις 45 ημέρες αγωγής
A	62,8
B	16,5
C	37,8

Πίνακας 11. *Αύξηση GSH % μεταξύ των ομάδων σε σχέση με τον Χρόνο.*

3.2. Καταλάση



Γράφημα 2. Δραστικότητα Καταλάσης στο Αιμόλυμα των Κοτόπουλων.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά αιμοληψία.

$p < 0,05$ μεταξύ των ομάδων στον χρόνο.

1 ^η Αιμοληψία	average	sem	2 ^η Αιμοληψία	average	sem
A (Control)	14,929	0,353	A	16,805	0,517
B (200 ppm)	19,049	0,189	B	20,831	0,409
C (500 ppm)	20,658	0,237	C	21,877	0,296

Πίνακας 12. Αποτελέσματα μετρήσεων της Δραστικότητας της Καταλάσης (U/mg Hb) στο Αιμόλυμα.

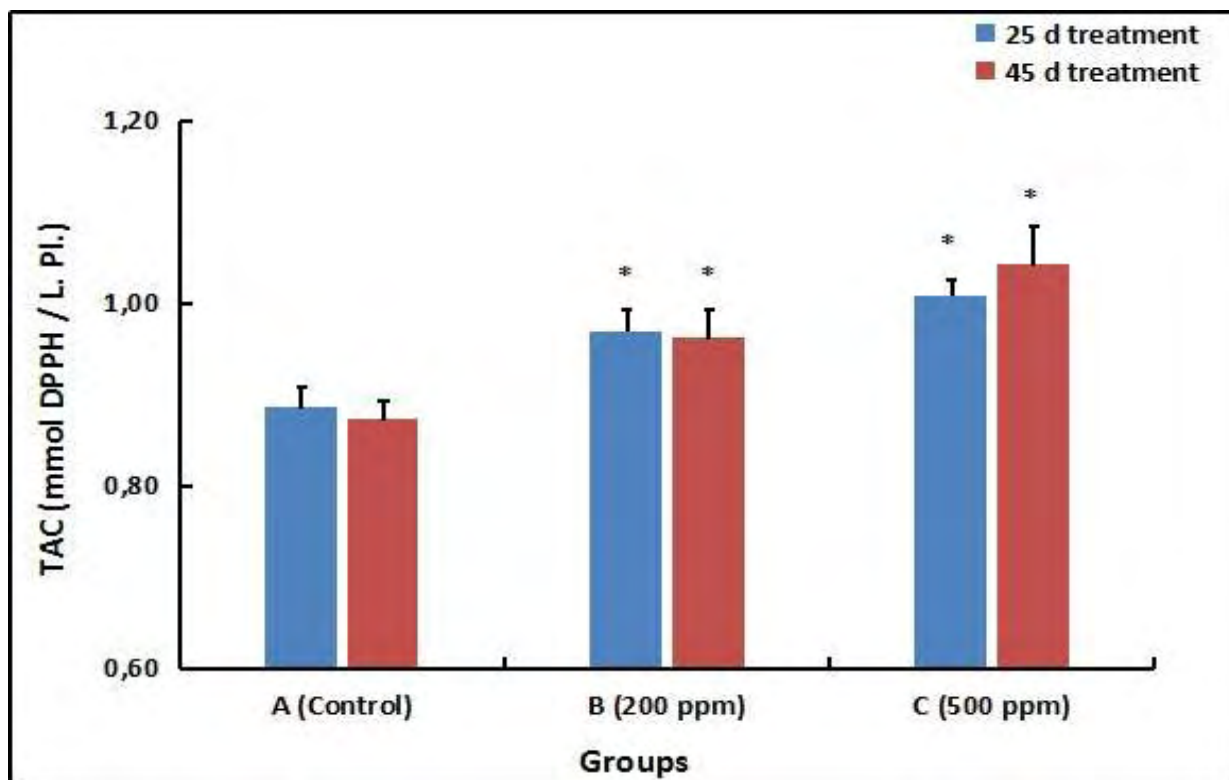
	1η Αιμοληψία	2η Αιμοληψία
B	27,6	24,0
C	38,4	30,2

Πίνακας 13. Αύξηση Καταλάσης % σε σχέση με Control.

	Αύξηση % από τις 25 στις 45 ημέρες αγωγής
A	12,6
B	9,40
C	5,90

Πίνακας 14. Αύξηση Καταλάσης % μεταξύ των ομάδων σε σχέση με το Χρόνο.

3.3. TAC



Γράφημα 3. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα στο Πλάσμα των Κοτόπουλων.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά αιμοληψία.

$p < 0,05$ μεταξύ των ομάδων στον χρόνο.

1 ^η Αιμοληψία	average	sem	2 ^η Αιμοληψία	average	sem
A (Control)	0,88	0,02	A	0,87	0,02
B (200 ppm)	0,97	0,02	B	0,96	0,03
C (500 ppm)	1,01	0,02	C	1,04	0,04

Πίνακας 15. Αποτελέσματα μετρήσεων της TAC (mmol DPPH/ L. Pl.) στο Πλάσμα.

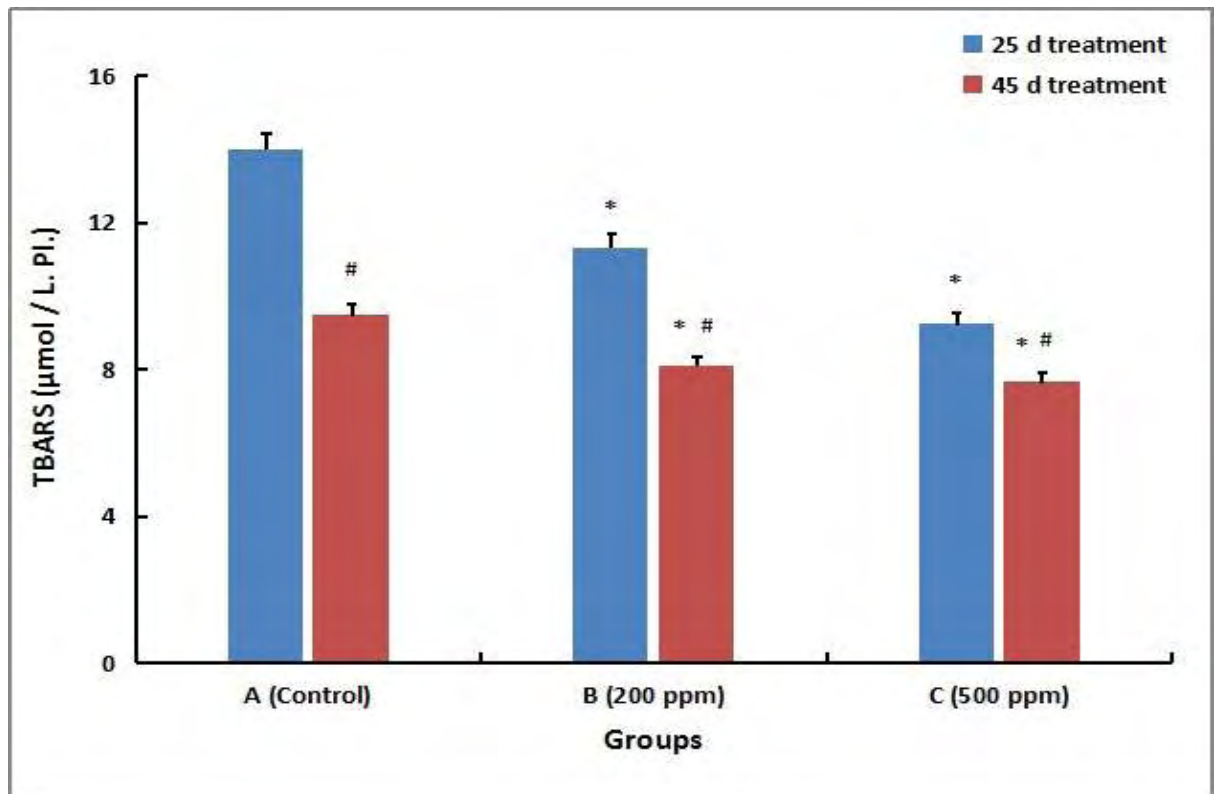
	1η Αιμοληψία	2η Αιμοληψία
B	9,50	10,3
C	13,9	19,5

Πίνακας 16. Αύξηση TAC % σε σχέση με Control.

	Αύξηση % από τις 25 στις 45 ημέρες αγωγής
A	-
B	-
C	2,97

Πίνακας 17. Αύξηση TAC % μεταξύ των ομάδων σε σχέση με το Χρόνο.

3.4. TBARS



Γράφημα 4. TBARS στο Πλάσμα των Κοτόπουλων.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά αιμοληψία.
 # $p < 0,05$ μεταξύ των ομάδων στον χρόνο.

1 ^η Αιμοληψία	average	sem	2 ^η Αιμοληψία	average	sem
A (Control)	13,99	0,47	A	9,47	0,34
B (200 ppm)	11,31	0,40	B	8,09	0,27
C (500 ppm)	9,22	0,31	C	7,63	0,28

Πίνακας 18. Αποτελέσματα μετρήσεων των TBARS ($\mu\text{mol DPPH} / \text{L. Pl.}$) στο Πλάσμα.

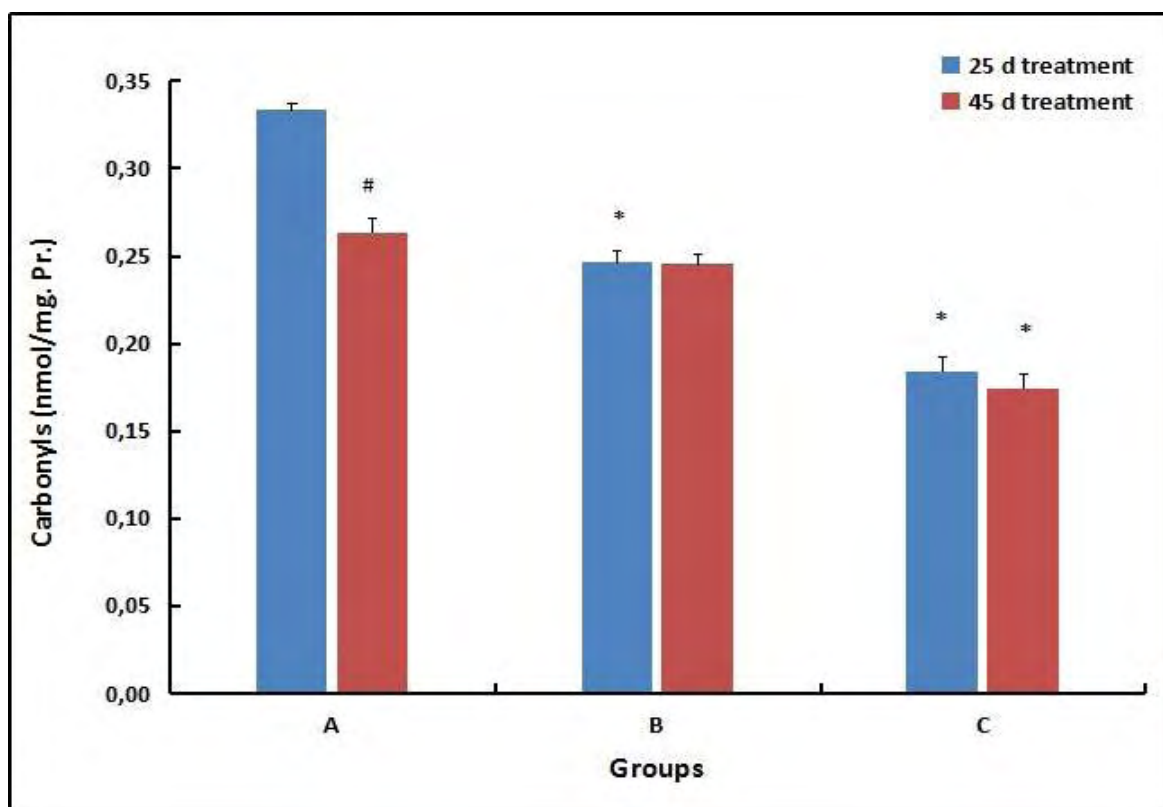
	1η Αιμοληψία	2η Αιμοληψία
B	19,1	14,6
C	34,1	19,4

Πίνακας 19. Μείωση TBARS % σε σχέση με Control.

	Μείωση % από τις 25 στις 45 ημέρες αγωγής
A	32,3
B	28,5
C	17,3

Πίνακας 20. Μείωση TBARS % μεταξύ των ομάδων σε σχέση με τον Χρόνο.

3.5. Πρωτεϊνικά Καρβονόλια



Γράφημα 5. Καρβονύλια στο Πλάσμα των Κοτόπουλων.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά αιμοληψία.

$p < 0,05$ μεταξύ των ομάδων στον χρόνο.

1 ^η Αιμοληψία	average	sem	2 ^η Αιμοληψία	average	sem
A (Control)	0,333	0,004	A	0,263	0,009
B (200 ppm)	0,246	0,007	B	0,245	0,006
C (500 ppm)	0,184	0,008	C	0,174	0,009

Πίνακας 21. Αποτελέσματα μετρήσεων των Καρβονυλίων (nmol /mg Protein.) στο Πλάσμα.

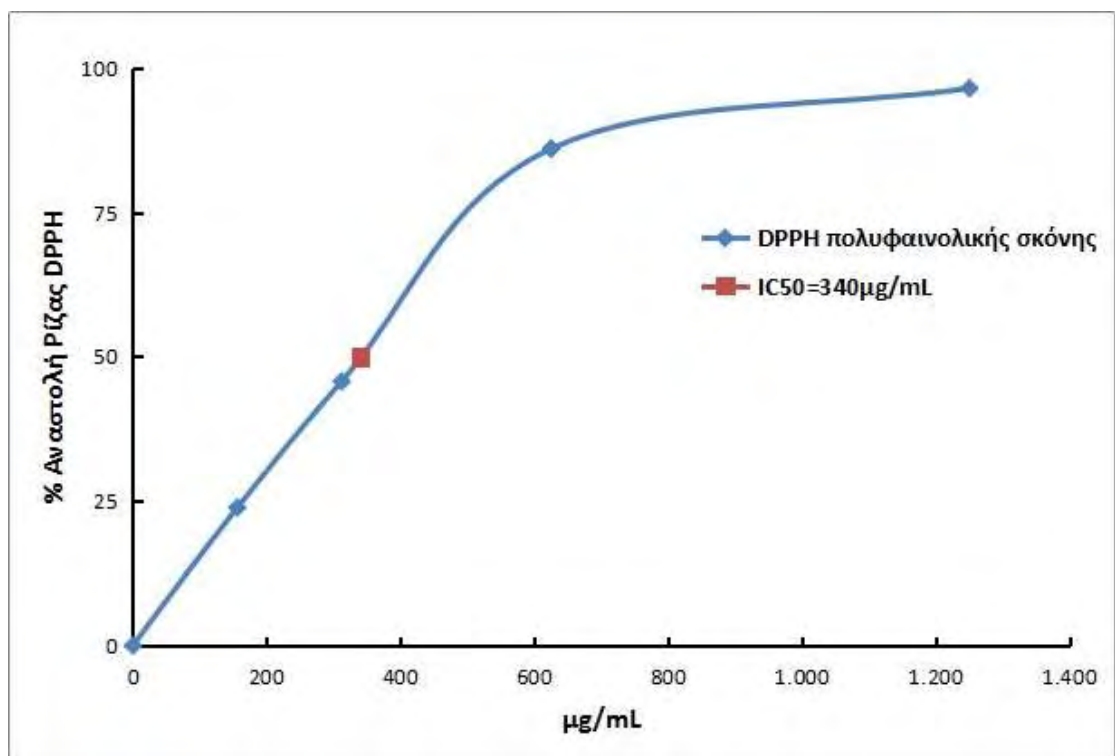
	1η Αιμοληψία	2η Αιμοληψία
B	26,1	6,80
C	44,7	33,8

Πίνακας 22. Μείωση Carb. % σε σχέση με Control.

	Μείωση % από τις 25 στις 45 ημέρες αγωγής
A	21,0
B	-
C	5,43

Πίνακας 23. Μείωση Carb. % μεταξύ των ομάδων σε σχέση με το Χρόνο.

3.6. Αναστολή Ρίζας DPPH



Γράφημα 6. Αναστολή Ρίζας DPPH.

µg/ml	ΑΝΑΣΤΟΛΗ
1.250	96,44
625	85,98
312	45,71
156	23,88
0	0,00

Πίνακας 24. Συγκεντρώσεις πολυφαινολικής σκόνης και αντίστοιχη αναστολή της Ρίζας DPPH.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας έδειξαν, ότι η ενσωμάτωση της πολυφαινολικής σκόνης, που παράγεται από νανοενθυλάκωση με χρήση μαλτοδεξτρίνης, από το υγρό (υδατικό κλάσμα) που προκύπτει από την διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου από την ελιά, βελτίωσε την οξειδοαναγωγική κατάσταση στα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής. Ειδικότερα, η προσθήκη της πολυφαινολικής σκόνης στο πόσιμο νερό των κοτόπουλων, μειώνει την οξείδωση των πρωτεϊνών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες, όπως αποδεικνύεται από την μείωση των επιπέδων των καρβονυλίων στο πλάσμα, υποδεικνύοντας ότι οι αντιοξειδωτικές ενώσεις θα μπορούσαν να αποτρέψουν την οξείδωση των πρωτεϊνών στο αίμα τους. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει τον πολυμερισμό των πρωτεϊνών και την συσσωμάτωση, επηρεάζοντας την πεπτικότητα τους και μειώνοντας έτσι την θρεπτική αξία των τροφών (*Zhang et al., 2013*).

Εκτός από την μείωση της οξείδωσης των πρωτεϊνών, η πολυφαινολική σκόνη στο πόσιμο νερό των κοτόπουλων, μείωσε επίσης την υπεροξείδωση των λιπιδίων, όπως φαίνεται από τη μείωση των επιπέδων TBARS, ενός βιολογικού δείκτη της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι μερικές από τις σημαντικότερες πολυφαινόλες που βρέθηκαν στα απόβλητα των ελαιοτριβείων (π.χ. υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη και καφεϊκό οξύ) είναι αποτελεσματικές στο να αναστέλλουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων (*Cardinali et al., 2012; Rubio-Senent et al., 2015*). Η μείωση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων θα μπορούσε να βελτιώσει την ποιότητα του κρέατος των κοτόπουλων, αφού η οξείδωση των λιπιδίων στο κρέας των πουλερικών είναι μία από τις κύριες αιτίες για τον περιορισμό της ποιότητας του (*Arshad et al., 2013*). Συγκεκριμένα, η οξείδωση των λιπιδίων οδηγεί στην παραγωγή των άσχημης γεύσης και μείωση στη διατροφική αξία του κρέατος. (*Nam and Ahn, 2003*). Έτσι, η χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών όπως οι πολυφαινόλες, είναι ασφαλέστερα από τα συνθετικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται σε ζωοτροφές για τη μείωση της οξείδωσης των λιπιδίων (*Arshad et al., 2013; Starcevic' et al., 2015*).

Η παρατηρούμενη μείωση της οξείδωσης πρωτεϊνών και λιπιδίων στα κοτόπουλα, μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους (TAC). Πράγματι, οι ομάδες των κοτόπουλων που έπιναν νερό που περιείχε

πολυφαινολική σκόνη, παρουσίασαν αυξημένη TAC στο πλάσμα. Επιπλέον, αυτές οι ομάδες παρουσίασαν αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου της καταλάσης, ενός από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα στα ερυθροκύτταρα. Άλλες μελέτες έχουν επίσης αναφέρει πως τα ΥΑΕ, αυξάνουν την δραστηριότητα της καταλάσης στο πλάσμα, το ήπαρ και στους νεφρούς αρουραίων (*Hamden et al., 2009*).

Όσον αφορά στην γλουταθειόνη, παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική αύξηση στις ομάδες των κοτόπουλων που κατανάλωσαν την πολυφαινολική σκόνη, στις 25 ημέρες αγωγής (ηλικίας 40 ημερών), σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Έτσι, τονίζεται η ανάγκη για την προσθήκη αντιοξειδωτικών ενώσεων στις ζωοτροφές των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, ιδίως σε πολύ μικρή ηλικία, όταν ο οργανισμός δεν είναι αρκετά ώριμος για να παράγει επαρκώς από μόνος του αντιοξειδωτικά μόρια όπως η GSH (*Gerasopoulos et al., 2015*).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η παρατηρούμενη βελτίωση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών στα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, οφείλεται κυρίως στο πολυφαινολικό περιεχόμενό του νερού που λάμβαναν. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων περιέχουν πολυφαινόλες όπως η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και το καφεϊκό οξύ και μια σειρά από υψηλότερες μοριακού βάρους φαινολικά που απορρέουν από το οξειδωτικό πολυμερισμό κυρίως η υδροξυτυροσόλη και το καφεϊκό οξύ (*Cardinali et al., 2010, 2012*).

Είναι ενδιαφέρον ότι σε όλους τους δείκτες του οξειδωτικού στρες φάνηκε πως η ομάδα Γ (500 ppm), παρουσίασε τα πλέον ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Αυτή η διαφορά μπορεί να εξηγηθεί από την υψηλότερη συγκέντρωση σε πολυφαινολική σκόνη. Τα παραπάνω αποτελέσματα από όλους τους βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες που ελέγχθηκαν, δείχνουν ότι η προσθήκη της σκόνης αυτής στο πόσιμο νερό των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, βελτιώνει την οξειδοαναγωγική κατάσταση τους.

Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις των ζώων εκτροφής, θεωρείται ότι σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (*Lykkesfeldt and Svendsen, 2007*). Έτσι, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, δείχνουν για την πρώτη φορά ότι η προσθήκη πολυφαινολικής σκόνης στο πόσιμο νερό, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, με τη μείωση της οξειδωτικής βλάβης των βιολογικών μορίων (δηλ. οξείδωση πρωτεϊνών, υπεροξείδωση λιπιδίων) και την αύξηση αντιοξειδωτικών μηχανισμών (π.χ. δράσης της καταλάσης και επίπεδα GSH και TAC).

Επιπλέον, η τεχνική ομογενοποίησης που εφαρμόζεται κατά τη παρασκευή του προϊόντος που επιτυγχάνει την μείωση του μεγέθους των διαλυτών στερεών σε «Νανο-μεγέθη», εγγυάται έτσι, υψηλή αντιοξειδωτική δράση και βελτιωμένη λειτουργικότητα, βασικό χαρακτηριστικό των προϊόντων Νανοτεχνολογίας.

Με βάση τα αποτελέσματα, θα μπορούσε η πολυφαινολική σκόνη να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα σε άλλες τροφές ζώων ή ακόμα και σε ανθρώπινα τρόφιμα ή συμπληρώματα διατροφής, καλλυντικών και προϊόντων προσωπικής φροντίδας. Η χρήση της πολυφαινολικής σκόνης και ιδιαίτερα των υποπροϊόντων από την διαδικασία παρασκευής της, που μελετήθηκε στο πρόσφατο παρελθόν (*Gerasopoulos et al., 2015*), θα μπορούσε να είναι μία καλή λύση στα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκαλούνται από τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–6.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 7915–22.
- Arshad, M.S., Anjum, F.M., Khan, M.I., Shahid, M., Akhtar, S., Sohaib, M. (2013). Wheat germ oil enrichment in broiler feed with α -lipoic acid to enhance the antioxidant potential and lipid stability of meat. *Lipids Health Dis.* 4 (12), 164.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Laughton, M. J., Quinlan, G. J., & Gutteridge, J. M. (1989). The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *The Biochemical Journal*, 258(2), 617–20.
- 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), 1–23.
- Beers, R. F., & Sizer, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 133–40.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–33.
- Cardinali, A., Cicco, N., Linsalata, V., Minervini, F., Pati, S., Pieralice, M. (2010). Biological activity of high molecular weight phenolics from olive mill wastewater. *J. Agric. Food Chem.* 58 (15): pp. 8585–8590.

- Cardinali, A., Pati, S., Minervini, F., D'Antuono, I., Linsalata, V., Lattanzio, V. (2012). Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill wastewater as possible food antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 60 (7): pp. 1822–1829.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 61(2), 192–208.
- Chen, Q., & Ross, A. C. (2012). All-trans-retinoic acid and the glycolipid α -galactosylceramide combined reduce breast tumor growth and lung metastasis in a 4T1 murine breast tumor model. *Nutrition and Cancer*, 64(8), 1219–27.
- Cicerale, S., Lucas, L., & Keast, R. (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 458–79.
- Cooke, M. S. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195–1214.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10), 1195–214.
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk. Lipid peroxidation cannot be used as universal criterion of oxidative stress. 2004. *Progr. Lipid Res*, 43: 200 -227
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10), 1195–214.
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Kokkas, S., Petrotos, K., Kantas, D., Goulas, P., & Kouretas, D. (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, 42–9.

Gerasopoulos, K., Stagos, D., Krouezas, A., Karaveli, C., Barda, C., Gkika, H., ... Kouretas, D. (n.d.). Assessment of Fatty Acid Allocation in Plasma and Tissues in Piglets, Using Feed Supplemented with Byproducts from Processed Olive Mill Wastewater In Vivo (*Athens, Greece*), 30(3), 291–301.

Gerasopoulos, K., Stagos, D., Petrotos, K., Kokkas, S., Kantas, D., Goulas, P., & Kouretas, D. (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, 319–27.

Giacosa, A., Barale, R., Bavaresco, L., Gatenby, P., Gerbi, V., Janssens, J., ... Rondanelli, M. (2013). Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 22(1), 90–5.

Giaginis, C., & Theocharis, S. (2011). Current evidence on the anticancer potential of Chios mastic gum. *Nutrition and Cancer*, 63(8), 1174–84.

Gkoutsidis, P.E., Petrotos, K.B., Kokkora, M.I., Tziortziou, A.D., Christodouloulis, K., Goulas, P. 2011. Olive mill waste water (OMWW) treatment by diafiltration desalination and water treatment. *Volume 30, Issue 1-3, Pages 237-246*.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1–85.

Hamden, K., Allouche, N., Damak, M., Elfeki, A. (2009). Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chem. Biol. Interact.* 180 (3): pp. 421–432.

Ibiebele, T. I., Hughes, M. C., Nagle, C. M., Bain, C. J., Whiteman, D. C., Webb, P. M., & Study of Digestive Health and Australian Cancer Study. (2013). Dietary

- antioxidants and risk of Barrett's esophagus and adenocarcinoma of the esophagus in an Australian population. *International Journal of Cancer*, 133(1), 214–24.
- Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akçay, F. (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), 141–3.
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*, 81(7), 519–33.
- Klein E. A., Thompson I. M., Tangen C. M., Crowley J. J., Lucia M. S., Goodman P. J., Minadian L. M., Ford L. G., Parnes H. J., Gaziano J. M., Karp D. D., Lieber M. M., Walther P. J., Klotz L., Parsons J. K., Chin J. L., Darke A. K., Lippman S. M., Goodman G. E., Meyskens F. L., Baker L. H. (2011) Vitamin E and the Risk of Prostate Cancer The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT) *JAMA* 306(14):1549-1556
- Kroon, P. A., Clifford, M. N., Crozier, A., Day, A. J., Donovan, J. L., Manach, C., & Williamson, G. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(1), 15–21.
- Lykkesfeldt, J., Svendsen, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet. J.* 173 (3): pp. 502–511.
- Mebirouk, M., Sbail, L., Lopez, M., Gonzalez, J. 2007. The absorption of polyphenols from olive oil mill wastewaters by sawdust and biodegradation by the fungus *phanerochaetae chrysosporium*. *Grasas y Aceites* 58(4), pp. 366-371.
- 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 Sci.* 63 (1): pp. 1–8.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.-T., Zhou, T.-T., Liu, B., & Bao, J.-K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6), 487–98.

- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 333(1), 19–39.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N. T., Georgiou, C. D., Angelatou, F., & Matsokis, N. A. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience Letters*, 357(2), 83–6.
- Ramnath, V., Rekha, P. S., & Sujatha, K. S. (2008). Amelioration of heat stress induced disturbances of antioxidant defense system in chicken by brahma rasayana. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 5(1), 77–84.
- Rubio-Senent, F., de Roos, B., Duthie, G., Fernández-Bolaños, J., Rodríguez-Gutiérrez, G. (2015). Inhibitory and synergistic effects of natural olive phenols on human platelet aggregation and lipid peroxidation of microsomes from vitamin E-deficient rats. *European Journal of Nutrition*. Vol. 54, (8): pp. 1287-1295.
- Sengupta, A., Ghosh, S., & Bhattacharjee, S. (n.d.). Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 5(3), 237–45.
- Silverstein, T. D., Jain, R., Johnson, R. E., Prakash, L., Prakash, S., & Aggarwal, A. K. (2010). Structural basis for error-free replication of oxidatively damaged DNA by yeast DNA polymerase η . *Structure (London, England : 1993)*, 18(11), 1463–70.
- Starcevic, K., Krstulovic, L., Brozic, D., Mauric, M., Stojevic, Z., Mikulec, Z. (2015). Production performance, meat composition and oxidative susceptibility in broiler chicken fed with different phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* 95 (6): pp. 1172–1178.
- Tristan P. Dew, Andrea J. Day, and, & Morgan*, M. R. A. (2005). Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components.

- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178–89.
- Vaya, J., & Aviram, M. (2001). Nutritional Antioxidants Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. *Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*, 1(1), 99–117.
- Zhang, W., Xiao, S., Ahn, D.U. (2013). Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53 (11): pp. 1191–1201.