



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα
Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας
«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ, ΜΕ ΘΕΜΑ:

ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ, S-
ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GST), ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΗΣ
ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗΣ (SOD) ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΤΑΣΗΣ ΤΗΣ γ -
ΓΛΟΥΤΑΜΥΛΟΚΥΣΤΕΪΝΗΣ (γ -GCS) ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ (ΗΠΑΡ ΚΑΙ
ΣΠΛΗΝΑ) ΠΡΟΒΑΤΩΝ, ΜΕΤΑ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΡΟΦΗΣ
ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΗΣ ΜΕ ΣΤΕΜΦΥΛΑ

ASSESSMENT OF EXPRESSION AND ACTIVITY OF ENZYMES,
GLUTATHIONE S-TRANSFERASE, SUPEROXIDE DISMUTASE
AND GAMMA-GLUTAMYL CYSTEINE SYNTHETASE IN TISSUES
(LIVER AND SPLEEN) AFTER ADMINISTRATION OF FEED
SUPPLEMENTED WITH GRAPE POMACE.



Τερζοπούλου Ζωή
Βιοχημικός- Βιοτεχνολόγος
Λάρισα, 2016

ΤΕΡΖΟΠΟΥΛΟΥ ΖΩΗ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2016

Έκφραση και Ενζυμική Δραστικότητα των ενζύμων, S- Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης (GST), Υπεροξειδικής Δισμουτάσης (SOD) και Συνθετάσης της γ-Γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS) σε ιστούς (ήπαρ και σπλήνα) προβάτων, μετά από τη χορήγηση τροφής εμπλουτισμένης με στέμφυλα

Assessment of expression and activity of enzymes, glutathione S-transferase, superoxide dismutase and gamma-glutamylcysteine synthetase in tissues (liver and spleen) after administration of feed supplemented with grape pomace

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

Αριστείδης Μ. Τσατσάκης: Καθηγητής Τοξικολογίας και Διευθυντής του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικών Επιστημών & Τοξικολογίας στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης στο Ηράκλειο.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Τοξικολογία». Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές που μου μετέδωσε καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος σπουδών και κυρίως για τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετέχω στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα, καθώς χωρίς τη βοήθειά του θα ήταν αδύνατο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Στάγκο, για την συνεχή και ουσιαστική παρουσία και υποστήριξη του, τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στην συγγραφή αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ ακόμη όλη την ομάδα του εργαστηρίου, για τη συνεργασία και το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα την υποψήφια Μεταδιδάκτορα, Κερασιώτη Ευθαλία. που συνέβαλε στα μέγιστα τόσο στην εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής όσο και στην ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας, τη συνάδελφο Κομίνη Ουρανία για την άποψη συνεργασία και τον Ιωάννη Καφαντάρη που εκτελεί το μεταδιδασκτορικό του και τα δείγματα προήλθαν από το δικό του πρόγραμμα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ξεχωριστά τη συνάδελφο Κόκκα Ελευθερία-Νίκη και την υποψήφια Διδάκτορα Παρασκευή Κούκα για τη φιλία τους και τη βοήθεια που μου προσέφεραν όποτε τη χρειαζόμουν.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να το απευθύνω στους γονείς μου, οι οποίοι με στήριξαν τις σπουδές μου με διάφορους τρόπους, φροντίζοντας για την καλύτερη δυνατή μόρφωση μου και σε ένα σημαντικό άτομο για μένα που βρίσκετε πάντα δίπλα μου, σε ότι και αν χρειαστώ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
Κατάλογος Πινάκων	8
Κατάλογος Διαγραμμάτων	8
Περίληψη	10
ABSTRACT	11
Ιστορική Προέλευση και Γενετική Ποικιλομορφία της Αμπέλου	12
Μορφολογικά χαρακτηριστικά της Αμπέλου	14
Φαινολικές Ενώσεις των καρπών της Αμπέλου	21
Βιοσύνθεση Φαινολικών Ενώσεων στα Σταφύλια	24
Χημική Σύσταση των καρπών της Αμπέλου (Vitis Vinifera)	29
Φυσικές Βιοδραστικές Ενώσεις στα Υποπροϊόντα της Οινοποίησης-Στέμφυλα ..	35
Εναπόθεση των στεμφύλων στο περιβάλλον και τρόποι επαναξιοποίησης τους	38
Ελεύθερες Ρίζες και η Βιολογική τους σημασία	41
Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)	44
Δραστικές Μορφές Αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS)	47
Πηγές Παραγωγής Ελευθέρων Ριζών	48
Οξειδωτικό Στρες και Μοριακοί Μηχανισμοί Πρόκλησης Βλαβών σε Κυτταρικά Συστατικά	55
Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί: Ενζυμικά Συστήματα Ενάντια στο Οξειδωτικό Στρες	59
Κυτταρικοί Αμυντικοί Μηχανισμοί: Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά	70
Αντιοξειδωτική Δράση Φαινολικών Ενώσεων	77
Βιοδιαθεσιμότητα Πολυφαινολών	80
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	86
Σκοπός	87
Πειραματικό Πλάνο: Εκτροφή και Ανάπτυξη Προβάτων	87
Λήψη Ιστών από Ζωτικά Όργανα	88
Παρασκευή Βιολειτουργικής Ζωοτροφής	89
Μέθοδοι και Υλικά	92
Αποτελέσματα	101
Συζήτηση	108
Βιβλιογραφία	113

Κατάλογος Εικόνων

<u>Εικόνα 1:</u> Γενετική ποικιλομορφία αμπελιών.....	13
<u>Εικόνα 2:</u> Πλάγιες ρίζες σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης της ρίζας.....	15
<u>Εικόνα 3:</u> Στην κάτω επιδερμίδα του φύλλου διακρίνονται υποστοματικές κοιλότητες και στόματα. Στα κατάφρακτικά κύτταρα του στόματος διακρίνονται χλωροπλάστες φύλλου...16	
<u>Εικόνα 4:</u> Τριχίδια σε φύλλο ποικιλίας <i>vinifera</i>	16
<u>Εικόνα 5:</u> Το μεσόφυλλο αποτελεί το φωτοσυνθετικό παρέγχυμα του φύλλου. Διακρίνεται σε δρυφακτοειδές και σπογγώδες παρέγχυμα.....	17
<u>Εικόνα 6:</u> Τα άνθη της αμπέλου εμφανίζονται στους κόμβους των καρποφόρων κληματίδων.....	18
<u>Εικόνα 7:</u> Δομικά Χαρακτηριστικά Ώριμης Ράγας.....	19
<u>Εικόνα 8:</u> Ανατομικό τμήμα του περικαρπίου και του μεσοκαρπίου της ράγας σταφυλιού...20	
<u>Εικόνα 9:</u> Συνολική διαγραμματική απεικόνιση της δομής και της λειτουργίας κάθε τμήματος της αμπέλου.....	20
<u>Εικόνα 10:</u> Βασική Δομή Ανθρακικού Σκελετού Φλαβονοειδών.....	21
<u>Εικόνα 11:</u> Κυριότερες κατηγορίες φλαβονοειδών που εντοπίζονται στα σταφύλια.....	22
<u>Εικόνα 12:</u> Χημική Δομή <i>cis</i> και <i>trans</i> Ρεσβερατρόλης.....	23
<u>Εικόνα 13:</u> Περιληπτική Αναπαράσταση της οδού Σικιμικού οξέος.....	24
<u>Εικόνα 14:</u> Βιοσύνθεση Υδροξικινναμικών Οξέων από τη Φαινυλαλανίνη.....	25
<u>Εικόνα 15:</u> Μονοπάτια βιοσύνθεσης δευτερογενών ενώσεων στις ράγες των σταφυλιών...26	
<u>Εικόνα 16:</u> Σχηματική Αναπαράσταση βιοσυνθετικού μονοπατιού φλαβονοειδών. Η σύνθεση των φλαβονολών και προανθοκυανιδινών διαχωρίζεται από το μονοπάτι σύνθεσης ανθοκυανινών.....	28
<u>Εικόνα 17:</u> Διαγραμματική απεικόνιση φάσεων ανάπτυξης και ωρίμανσης των σταφυλιών, στο οποίο παρουσιάζεται αντίστοιχα και η συσσώρευση των χημικών ενώσεων.....	29
<u>Εικόνα 18:</u> Ανάλυση των κυριότερων συστατικών της ράγας.....	30
<u>Εικόνα 19:</u> Πρότυπο κατανομής φαινολικών ενώσεων στους ιστούς των καρπών της αμπέλου.....	31
<u>Εικόνα 20:</u> Φαινολικές Ενώσεις που παράγονται και συγκεντρώνονται στα σταφύλια.....	33
<u>Εικόνα 21:</u> Τα στέμφυλα της οινοποιίας είναι το υπόλειμμα από την έκθλιψη των σταφυλιών για παραγωγή γλεύκους.....	37
<u>Εικόνα 22:</u> Οι πολυφαινόλες μπορούν να ανακτηθούν και να χρησιμοποιηθούν ως λειτουργικές ενώσεις στη φαρμακευτική και στις βιομηχανίες τροφίμων.....	39
<u>Εικόνα 23:</u> Σχηματική απεικόνιση της μεταφοράς ηλεκτρονίων και παραγωγής ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια.....	49
<u>Εικόνα 24:</u> Αναγωγή του μοριακού οξυγόνου εκτός μιτοχονδρίων.....	50
<u>Εικόνα 25:</u> Η έκρηξη παραγωγής ελευθέρων ριζών, κυρίως του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και της ρίζας υδροξυλίου (OH^{\cdot}), που παρατηρείται κατά την ισχαιμία και επαναιμάτωση των ιστών.....	51
<u>Εικόνα 26:</u> Σχηματική απεικόνιση ενεργοποίησης της «αναπνευστικής έκρηξης».....	53
<u>Εικόνα 27:</u> Συνοπτική παρουσίαση των ενδογενών και εξωγενών πηγών παραγωγής ελεύθερων ριζών.....	55
<u>Εικόνα 28:</u> Αλυσιδωτές αντιδράσεις υπεροξειδωσής των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων..56	
<u>Εικόνα 29:</u> Μερικά από τα προϊόντα οξειδωσής των βάσεων του DNA.....	57

<u>Εικόνα 30:</u> Το οξειδωτικό στρες και οι επιπτώσεις του στην πρωτεϊνική δομή.....	58
<u>Εικόνα 31:</u> Ρύθμιση της λειτουργίας των πρωτεϊνών μέσω αντιδράσεων S-γλουταθειονυλίωσης (S-glutathionylation), οι οποίες επηρεάζονται από τα επίπεδα οξειδωμένης και ανηγμένης γλουταθειόνης και από τον τύπο των πρωτεϊνών.....	59
<u>Εικόνα 32:</u> Η αντίδραση αναγωγής του H ₂ O ₂ που καταλύεται από την “υπεροξειδάση της γλουταθειόνης” (GPx).....	61
<u>Εικόνα 33:</u> Απεικόνιση της δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), της καταλάσης (CAT), της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX) και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR).....	63
<u>Εικόνα 34:</u> Μηχανισμός δράσης περοξυρεδοξίνης (Prx) με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H ₂ O ₂).....	64
<u>Εικόνα 35:</u> Επιλεγμένα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα των GST ενζύμων.....	66
<u>Εικόνα 36:</u> Μονομερής (αριστερά) και διμερής (δεξιά) δομή της GST.....	67
<u>Εικόνα 37:</u> Διασύνδεση GSH- εξαρτώμενων αντιοξειδωτικών ενζύμων.....	69
<u>Εικόνα 38:</u> Χημική δομή του ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C) και των προϊόντων της οξειδωσής του.....	71
<u>Εικόνα 39:</u> Αντιοξειδωτική προστασία έναντι της υπεροξειδωσής λιπιδίων.....	71
<u>Εικόνα 40:</u> Το “αντιοξειδωτικό δίκτυο” και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της βιταμίνης C, της βιταμίνης E και των οξειδοαναγωγικών κύκλων θειόλης.....	72
<u>Εικόνα 41:</u> Πορεία βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης (GSH).....	75
<u>Εικόνα 42:</u> Αντιοξειδωτική δράση της γλουταθειόνης (GSH).....	76
<u>Εικόνα 43:</u> Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινόλων.....	77
<u>Εικόνα 44:</u> Εκκαθάριση ελευθέρων ριζών (R [•]) από ένα φλαβονοειδές.....	78
<u>Εικόνα 45:</u> Διαρθρωτικά χαρακτηριστικά που ορίζουν την μέγιστη αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών.....	79
<u>Εικόνα 46:</u> Σχηματική αναπαράσταση της μεσολαβούμενης, από πολυφαινόλες και φλαβονοειδή, κυτταρική σηματοδότηση.....	80
<u>Εικόνα 47:</u> Πιθανές θέσης σύζευξης των πολυφαινόλων κατά τη διάρκεια αντιδράσεων μεταβολισμού φάσης II.....	81
<u>Εικόνα 48:</u> Συνοπτική παρουσίαση του μεταβολισμού και της απορρόφησης των φυτικών πολυφαινόλων.....	83
<u>Εικόνα 49:</u> Οι κύριοι μεταβολίτες των φλαβονοειδών, όπως προκύπτουν μετά τη μετατροπή τους από την εντερική μικροχλωρίδα.....	84

Πειραματικό Μέρος

<u>Εικόνα 1:</u> Πειραματική διαδικασία εκτροφής – απογαλακτισμού των αναπτυσσόμενων αρνιών.....	87
<u>Εικόνα 2:</u> Οι εγκαταστάσεις πειραματισμού με τους αναπτυσσόμενους αμνούς.....	88
<u>Εικόνα 3:</u> Συλλογή, αποθήκευση και διατήρηση των ιστών.....	89
<u>Εικόνα 4:</u> Διαδικασία συσκευασίας του ενσπώματος στεμφύλων.....	91
<u>Εικόνα 5:</u> Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD στα δείγματα βασίστηκε στη μέθοδο του νιτροτετραζολιακού άλατος (NBT).....	94
<u>Εικόνα 6:</u> Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα Western που δείχνουν την επίδραση της εμπλουτισμένης ζωοτροφής με στέμφυλα, στην έκφραση του ενζύμου συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), στον ιστό ήπατος προβάτων ηλικίας 42 ημερών.....	105

Εικόνα 7: Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα Western που δείχνουν την επίδραση της εμπλουτισμένης ζωοτροφής με στέμφυλα, στην έκφραση του ενζύμου συνθετάση της γ-γλουταμιλοκουστεΐνης (GCS), στον ιστό ήπατος προβάτων ηλικίας 70 ημερών.....106

Εικόνα 8: Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα Western που δείχνουν την επίδραση της εμπλουτισμένης ζωοτροφής με στέμφυλα, στην έκφραση του ενζύμου συνθετάση της γ-γλουταμιλοκουστεΐνης (GCS), στον ιστό σπλήνα προβάτων ηλικίας 42 ημερών.....107

Εικόνα 9: Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα Western που δείχνουν την επίδραση της εμπλουτισμένης ζωοτροφής με στέμφυλα, στην έκφραση του ενζύμου συνθετάση της γ-γλουταμιλοκουστεΐνης (GCS), στον ιστό σπλήνα προβάτων ηλικίας 70 ημερών.....107

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Ορισμένα από τα κύρια παράγωγα υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκιναμικού οξέος.....23

Πίνακας 2: Οι φαινολικές ενώσεις στα υποπροϊόντα οινοποίησης.....36

Πίνακας 3: Επεξεργασία αποβλήτων οινοποίησης, οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες και οι διαφορετικές τους χρήσεις.....39

Πίνακας 4: Ταξινόμηση των ελεύθερων ριζών και οι κύριες επιδράσεις τους.....43

Πίνακας 5: Δραστικές μορφές οξυγόνου.....44

Πίνακας 6: Ένζυμα των υπεροξεισωματίων που συμμετέχουν στην παραγωγή των ROS.....51

Πίνακας 7: Φυσικά χαρακτηριστικά και θέσεις στους ιστούς των πρωτεϊνών υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης(GPX) σε ανθρώπους.....62

Πειραματικό Μέρος

Πίνακας 1: Πειραματικό ΜΣΖ που χορηγήθηκε στα αναπτυσσόμενα αρνιά της ομάδας του μάρτυρα και της ομάδας στεμφύλων, μέχρι τον απογαλακτισμό.....90

Πίνακας 2: Πειραματικό ΜΣΖ που χορηγήθηκε στα αναπτυσσόμενα αρνιά της ομάδας του μάρτυρα και της ομάδας των στέμφυλων μετά τον απογαλακτισμό.....90

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Η δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης SOD (% αναστολή) στον ιστό ήπατος, προβάτων κρεατοπαραγωγής ηλικίας 42 ημερών.....101

Διάγραμμα 2: Η δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης SOD (% αναστολή) στον ιστό ήπατος, προβάτων ηλικίας 70 ημερών.....101

Διάγραμμα 3: Η δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης SOD (% αναστολή) στον ιστό σπλήνα, προβάτων ηλικίας 42 ημερών.....102

Διάγραμμα 4: Η δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης SOD (% αναστολή) στον ιστό σπλήνα, προβάτων ηλικίας 70 ημερών.....102

Διάγραμμα 5: Τα επίπεδα δραστικότητας της S- τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (U/mg πρωτεΐνης), στον ιστό ήπατος, προβάτων ηλικίας 42 ημερών.....103

Διάγραμμα 6: Τα επίπεδα δραστικότητας της S- τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (U/mg πρωτεΐνης), στον ιστό ήπατος, προβάτων ηλικίας 70 ημερών.....103

Διάγραμμα 7: Τα επίπεδα δραστικότητας της S- τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (U/mg πρωτεΐνης), στον ιστό σπλήνα, προβάτων ηλικίας 42 ημερών.....104

Διάγραμμα 8: Τα επίπεδα δραστηριότητας της S- τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (U/mg πρωτεΐνης), στον ιστό σπλήνα, προβάτων ηλικίας 70 ημερών.....104

Διάγραμμα 9: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης του ενζύμου συνθετάση της γ- γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), στον ιστό ήπατος προβάτων ηλικίας 42 ημερών, με Western blot.....105

Διάγραμμα 10: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης του ενζύμου συνθετάση της γ- γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), στον ιστό ήπατος προβάτων ηλικίας 70 ημερών, με Western blot.106

Διάγραμμα 11: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης του ενζύμου συνθετάση της γ- γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), στον ιστό σπλήνα προβάτων ηλικίας 42 ημερών, με Western blot.106

Διάγραμμα 12: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης του ενζύμου συνθετάση της γ- γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), στον ιστό σπλήνα προβάτων ηλικίας 70 ημερών, με Western blot.107

Περίληψη

Σκοπός της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής ειδίκευσης, ήταν η εκτροφή στο στάδιο του απογαλακτισμού είκοσι οχτώ (28) προβάτων, της Ελληνικής φυλής «Χιώτικα», με πολυφαινολικά πρόσθετα από στέμφυλα και στη συνέχεια έλεγχος της αντιοξειδωτικής τους δράσης στον ιστό του ήπατος και του σπλήνα. Τα πρόβατα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, στην ομάδα ελέγχου, η οποία σιτίστηκε με το βασικό σιτηρέσιο και στην ομάδα η οποία σιτίστηκε με σιτηρέσιο που περιλάμβανε πολυφαινολικά πρόσθετα από στέμφυλα, ώστε τελικά να προσδιοριστεί η ενζυμική δράση της υπεροξειδική δισμουτάσης (SOD) και S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) καθώς και η πρωτεϊνική έκφραση της συνθετάσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCS), σαράντα δύο (42) και εβδομήντα ημέρες (70) από τη γέννησή τους, στον ιστό του ήπατος και του σπλήνα. Μέχρι και τις δέκα πέντε (15) ημέρες από τη γέννηση τους, τα πρόβατα τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα. Από εκείνη τη μέρα και μέχρι την τεσσαρακοστή δεύτερη (42) ημέρα, η τροφή τους εκτός από γάλα περιείχε και το σιτηρέσιο απογαλακτισμού. Τέλος, ο πλήρης απογαλακτισμός πραγματοποιήθηκε από την τεσσαρακοστή δεύτερη(42) ημέρα μέχρι και την εβδομηκοστή (70) ημέρα από τη γέννηση τους, όπου τα πρόβατα τρέφονταν μόνο με το πειραματικό σιτηρέσιο. Τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα που καταγράφηκαν, ήταν η αύξηση της δραστικότητας της GST κατά 21% και 30.7% στον ηπατικό ιστό προβάτων ηλικίας 42 και 70 ημερών αντίστοιχα, ενώ στο σπλήνα στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστικότητας της GST παρατηρήθηκε μόνο στα πρόβατα ηλικίας 70 ημερών κατά 29%, συγκρίνοντας σε κάθε περίπτωση την ομάδα ελέγχου με την πολυφαινολική ομάδα. Όσον αφορά τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της γ-GCS, η μόνη στατιστικά σημαντική αύξηση σημειώθηκε στον ιστό του ήπατος, προβάτων ηλικίας 42 ημερών, κατά 36% για την πολυφαινολική ομάδα, χωρίς καμία σημαντική μεταβολή στο σπλήνα. Τέλος, η δραστικότητα της SOD, δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή τόσο στο ήπαρ όσο και στο σπλήνα.

ABSTRACT

The aim of the present study was to raise young sheep with feed containing polyphenolic additives from grapes, in order to examine the effects on the redox status in tissues liver and spleen.

For this purpose, feed containing polyphenolic additives was given to twenty eight (28) young sheep at the stage of ablactation. The raising of the lambs was performed according to the group to which they belonged, with different diets. The first group (control group) was fed with basic diet and the second group was received special feed with polyphenolic additives from grapes. Tissues were collected from the experimental animals at 3 different time-points. The first time-point was fifteen (15) days after the birth of sheep, the second time-points was at forty two (42) days, and the last time-point was at seventy (70) days after birth. Up to fifteen (15) days after their birth, the sheep were fed only with breast milk. From that day until the forty-second (42) days, their food except milk included and the weaning diet. Finally, complete ablactation took place from forty-second (42) days up to seventy (70) days of their birth, where the sheep were fed only with experimental diet. The effects of grape pomace on the redox state of tissues, liver and spleen, were assessed by determining the activity of the enzyme, superoxide dismutase (SOD), S-glutathione transferase (GST), as well as the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase (γ -GCS). Regarding the results, it should be noted that the activity of the GST, increased by 21% and 30.7% in 42-day and 70-day respectively in liver tissue, whereas statistically significant increase of GST activity was only observed in 70-day spleen tissue, compared to the control group. Regarding protein expression levels of gamma-GCS, the only statistically significant increase was observed in 42-day in liver tissue by 36% for the polyphenolic group, with no significant difference in the spleen tissue. Finally, the enzymatic activity of SOD showed no statistically significant changes in both liver and spleen tissue.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ιστορική Προέλευση και Γενετική Ποικιλομορφία της Αμπέλου

Το αμπέλι είναι ένα αγγειόσπερμο φυτό, που ανήκει στην τάξη των Ραμνωδών (Rhamnales) και στην οικογένεια των Αμπελοειδών (Vitaceae), με πολλές ποικιλίες που καλλιεργούνται στις εύκρατες περιοχές της γης (New World Encyclopedia, 2008). Είναι θαμνώδες και αναρριχώμενο, με κορμό και βραχίονες που αποτελούν το κυρίως μέρος και λεπτές-κυλινδρικές διακλαδώσεις (τις κληματίδες) που είναι οι βλαστοί του τελευταίου έτους. Οι κληματίδες διαιρούνται κατά το μήκος τους σε κόμβους ή γόνατα, από τα οποία φύονται τα φύλλα, τα μάτια, οι έλικες και οι ταξιανθίες (Ι. Αναστασιάδη, 2007).

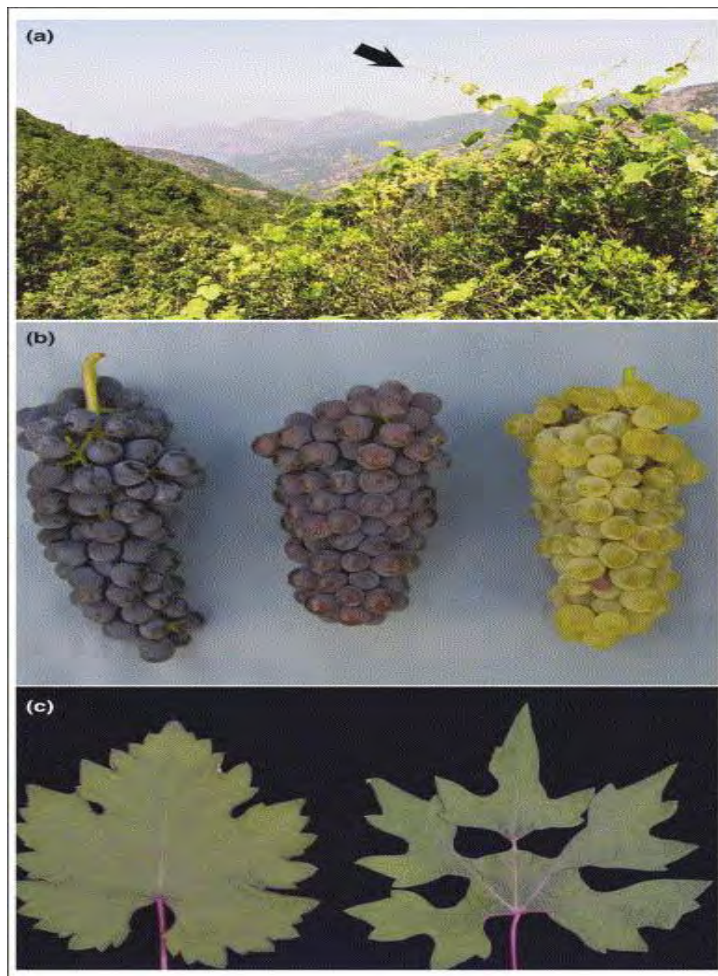


Το αμπέλι καλλιεργείται κυρίως για τον καρπό του, το σταφύλι. Το σταφύλι είναι μοναδικό, όχι μόνο για την σημαντική του παρουσία στον τομέα της παγκόσμιας καλλιέργειας, αλλά έχει και αρχαία ιστορική σύνδεση με την ανάπτυξη του ανθρώπινου πολιτισμού. Το κύριο προϊόν του, το κρασί, θεωρήθηκε το ποτό των θεών, αφιερωμένο στο Διόνυσο και το Βάκχο, ενώ άλλοι πολιτισμοί της Μεσογείου, πίστευαν πως το κρασί ξεπήδησε από το αίμα των ανθρώπων που είχαν πολεμήσει τους θεούς» (Patrice This, 2006). Τα πρώτα δείγματα αμπελοκαλλιέργειας στον ελλαδικό χώρο έχουν βρεθεί στην ανατολική Μακεδονία και συγκεκριμένα κοντά στις Κρηνίδες της Καβάλας όπου βρέθηκαν σπόροι σταφυλιού που ανάγονται στα τέλη της προϊστορικής περιόδου (New World Encyclopedia, 2008).

Στην οικογένεια **Vitaceae** ή **Ampelidaceae**, ανήκει το γένος *Vitis*, που είναι μείζονος αγρονομικής σημασίας (Patrice This, 2006). Στο γένος *Vitis* υπάγονται δύο υπογένη, το ***Euvitis*** (το κοινό σταφύλι), με κύριο εκπρόσωπο το είδος *Vitis vinifera* και διάφορα ασιατικά ή αμερικανικά είδη, με χαρακτηριστικότερα τα *V. berlandieri*, *V. riparia* και *V. Rupestris* και το ***Muscadinia***, που περιλαμβάνει κυρίως είδη της Β. Αμερικής που έχουν ως κύριο χαρακτηριστικό τους την αντοχή στις προσβολές της φυλλοξήρας, των νηματωδών και στον ιό του μολυσματικού εκφυλισμού (Ι. Αναστασιάδη, 2007).

Ειδικότερα, στο γένος *Vitis* περιλαμβάνονται περισσότερα από 60 αναγνωρισμένα είδη που συναντώνται κατά κύριο λόγο στην εύκρατη ζώνη του Βορείου Ημισφαιρίου και μεταξύ αυτών, το ***Vitis vinifera*** είναι το μόνο είδος που χρησιμοποιείται ευρέως στην παγκόσμια

βιομηχανία οίνου (Patrice This, 2006). Ορίζεται γενικά ως το Ευρωπαϊκό σταφύλι και αποτελεί γηγενές είδος περιοχών όπως η Μικρά Ασία, η Μαύρη και η Κασπία θάλασσα. Το είδος *V. vinifera* διακρίνεται περαιτέρω στα υποείδη *V. vinifera silvestris* ή *sylvestris* (άγριο αμπέλι) και *V. vinifera sativa* (όλες οι καλλιεργούμενες ποικιλίες). Θα πρέπει να τονιστεί ότι το δεύτερο υποείδος αποτελεί μετεξέλιξη του πρώτου, αλλά και τα δύο εξακολουθούν να συνυπάρχουν στην Ευρασία και στη Βόρειο Αφρική (Ι. Αναστασιάδη, 2007). Η άγρια μορφή είναι σπάνια και εκτείνεται από την Πορτογαλία έως το Τουρκμενιστάν και από τις όχθες του Ρήνου ποταμού έως τα βόρεια δάση της Τυνησίας. Θεωρείται πως είναι ο πρόγονος των σημερινών ποικιλιών και εξακολουθεί να παρατηρείται με τη μορφή άγριων αμπελιών που αναπτύσσονται γύρω από τα δένδρα (Patrice This, 2006). Ο διαχωρισμός με γεωγραφικά κριτήρια έχει γίνει αποδεκτός από τους ειδικούς για λόγους ταξινομήσεως επειδή η μεταξύ τους απόσταση δεν επηρέασε τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, αλλά μόνο τα βιολογικά με επακόλουθο τη δυσχέρεια προσδιορισμού των ορίων του είδους. Επιπλέον αξίζει να αναφερθεί πως, το κύριο αίτιο της ειδογένεσης είναι η αναπαραγωγική απομόνωση, ενώ μεταξύ των λεγόμενων ειδών της αμπέλου γενικά εύκολα λαμβάνει χώρα διασταύρωση μεταξύ τους, γεγονός το οποίο σύμφωνα με την παραπάνω άποψη κάνει την έννοια του είδους αφηρημένης σημασίας (Luan Zyka, 1998).



Εικόνα 1: Γενετική ποικιλομορφία αμπελιών (Patrice This, 2006).

(Α) Το άγριο αμπέλι, μπορεί να αναπτυχθεί περιστασιακά γύρω από άλλα δένδρα (υποδεικνύεται με το βέλος).

(Β) Μεταλλάξεις που αφορούν το χρώμα της ράγας του σταφυλιού της ποικιλίας Pinot (από αριστερά προς τα δεξιά): Noir Pinot (μαύρο), Pinot gris (γκρι), Pinot blanc (λευκό). Τα λευκά σταφύλια εξελικτικά προέρχονται από το κόκκινο σταφύλι λόγω μεταλλάξεων σε δύο ρυθμιστικά γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ανθοκυανινών, που προσδίδουν το κόκκινο χρώμα στο σταφύλι (Walker et al, 2007).

(Γ) Φυλλώδη μετάλλαξη του Cabernet Sauvignon. Το φύλλο άγριου τύπου παρουσιάζεται αριστερά και το μεταλλαγμένο δεξιά.

Με την πάροδο των ετών, η βιολογία του σταφυλιού έχει υποστεί δραματικές αλλαγές, για την εξασφάλιση μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε σάκχαρα, μεγαλύτερη σοδειά και παραγωγή. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, αλλαγές στη ρώγα, στο μέγεθος του τσαμπιού και στο σπόρο ήταν καθοριστικής σημασίας (Patrice This, 2006). Κάθε ποικιλία αμπελιού έχει ένα γενετικό κώδικα (γονότυπος) που μαζί με το οικολογικό περιβάλλον στο οποίο είναι εγκαταστημένη και την εφαρμοζόμενη αμπελοκομική τεχνική, προσδιορίζουν τα χαρακτηριστικά (ποιοτικά και ποσοτικά) των προϊόντων που παράγει.

Μορφολογικά χαρακτηριστικά της Αμπέλου

Ανατομικά Χαρακτηριστικά της Ρίζας

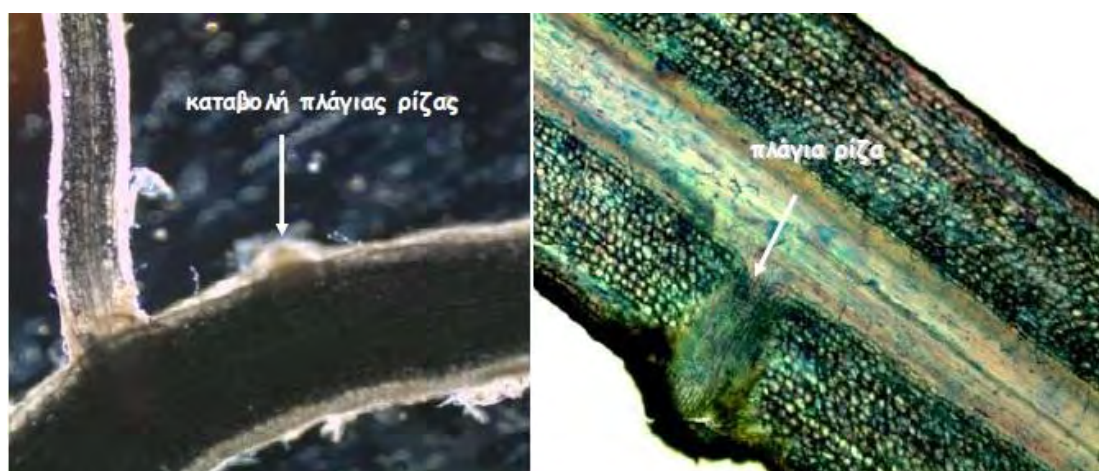
Οι ρίζες είναι εξειδικευμένα όργανα, με βασικές λειτουργίες την απορρόφηση νερού και ανόργανων θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος, τη βιοσύνθεση ρυθμιστών ανάπτυξης (γιββερελλίνες, κυτοκινίνες), την αποθήκευση θρεπτικών ουσιών (άμυλο, σάκχαρα, ιόντα θρεπτικών στοιχείων) αλλά και τη στήριξη του ίδιου του φυτού στο έδαφος (Αλεξάνδρα Ε. Παπαδάκη, 2010). Το ριζικό σύστημα της αμπέλου, σχηματίζεται μέσα στη γη, με ανάλογη προς το υπέργειο σύστημα ανάπτυξη. Μορφολογικά και λειτουργικά η νεαρή ρίζα διαχωρίζεται σε ζώνες. Το ακραίο τμήμα της ρίζας, ή αλλιώς ακρορίζιο, αποτελείται από την καλύπτρα και τη μεριστωματική ζώνη. Η καλύπτρα παράγεται από μία ζώνη κυττάρων εξωτερικά του κορυφαίου μεριστώματος και αποτελείται από παρεγχυματικά κύτταρα.

Περιβάλλει (καλύπτει) και προστατεύει το κορυφαίο μερίστωμα της ρίζας, το οποίο βρίσκεται στη μεριστωματική ζώνη, με αποτέλεσμα η ρίζα να επιμηκύνεται και να διεισδύει στο έδαφος χωρίς να καταστρέφεται. Η μεριστωματική ζώνη αποτελείται από μεριστωματικά κύτταρα αλλά και από κύτταρα με μερική διαφοροποίηση. Τα κύτταρα αυτά δίνουν τους πρωτογενείς ιστούς της ρίζας. Μετά τη μεριστωματική ζώνη συναντάται η ζώνη επιμήκυνσης. Τα κύτταρα εδώ επιμηκύνονται, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ρίζα κατά μήκος. Παράλληλα, τα κύτταρα του αγγειακού συστήματος αρχίζουν να διαφοροποιούνται και να επιμηκύνονται.

Το μεγαλύτερο μέρος των ριζών βρίσκεται σε βάθη 30-150 cm, ανάλογα με τη σύσταση του εδάφους και τη γεωτροπική γωνία των κυρίων ριζών. Τα υποκείμενα με μικρή γεωτροπική γωνία είναι περισσότερο ανθεκτικά στην ξηρασία, αφού οι ρίζες τους αναπτύσσονται σε βαθύτερα στρώματα. Στην περίπτωση πολλαπλασιασμού με μοσχεύματα ή καταβολάδες, οι



ρίζες αναπτύσσονται συνήθως από τους κόμβους και διακλαδίζονται για να σχηματίσουν τελικά πάνω στις διακλαδώσεις τα λεπτότατα απορροφητικά ριζίδια (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007). Τα τελευταία αναπτύσσονται κατά χιλιάδες σε κάθε φυτό κατά τη διάρκεια μιας βλαστικής περιόδου και θεωρείται ότι συμβάλλουν στην αύξηση της απορρόφησης νερού και ανόργανων ιόντων από το έδαφος, έχουν μικρή διάρκεια ζωής και η αποδιοργάνωση τους εμπλουτίζει το έδαφος με οργανικά ιόντα (Αλεξάνδρα Ε. Παπαδάκη, 2010). Η ταχύτητα ανάπτυξης του ριζικού συστήματος εξαρτάται αφενός από το είδος του αμπελιού και από τις εδαφοκλιματολογικές συνθήκες αλλά ελέγχεται κυρίως από τους ρυθμιστές της αύξησης (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007). Οι ποικιλίες που ριζοβολούν δύσκολα ή και καθόλου είτε δεν έχουν ενδογενείς ουσίες που προωθούν τη ριζοβόληση (αυξίνες) είτε έχουν υψηλά επίπεδα αυτών είτε έχουν υψηλά επίπεδα παρεμποδιστών ριζοβόλησης (γιββερλίνες, αμπισσικό οξύ). Ο σχηματισμός και η ανάπτυξη ριζών επηρεάζεται θετικά και από την υψηλή περιεκτικότητα των μοσχευμάτων σε υδατάνθρακες (πηγή ενέργειας για τη διαδικασία της ριζογένεσης), διότι αυξάνεται η ικανότητα δημιουργίας τυχαίων ριζών (Αλεξάνδρα Ε. Παπαδάκη, 2010).

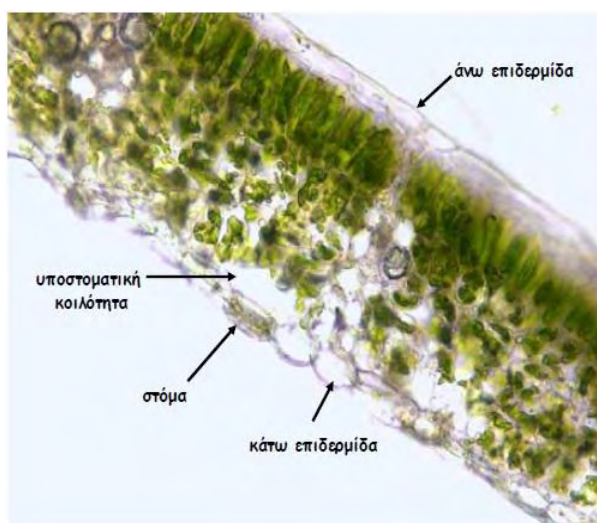


Εικόνα 2: Πλάγιες ρίζες σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης της ρίζας. Α: Φωτογραφία αντιθέτου φάσεως κύριας ρίζας με καταβολή πλάγιας ρίζας και ανεπτυγμένη πλάγια ρίζα. Β: Έκπτυξη πλάγιας ρίζας σε επιμήκη τομή ρίζας (Αλεξάνδρα Ε. Παπαδάκη, 2010).

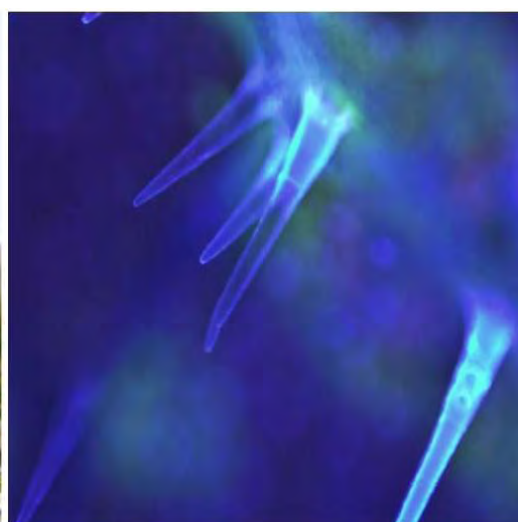
Τέλος, ο χρόνος ριζοβόλησης φαίνεται να επηρεάζεται και από την ηλικία του μοσχεύματος, το μήκος και την τοπόφυση (τμήμα κληματίδας από το οποίο λήφθηκε το μόσχευμα). Μοσχεύματα ενός έτους, μεγαλύτερου μήκους, προερχόμενα από το μέσον της κληματίδας παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό ριζοβόλησης (Αλεξάνδρα Ε. Παπαδάκη, 2010). Γενικά, η πλήρης ανάπτυξη του ριζικού συστήματος, συνήθως ολοκληρώνεται σε 6-8 χρόνια μετά την εγκατάσταση του αμπελιού (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007).

Ανατομικά Χαρακτηριστικά του Φύλλου

Το φύλλο της αμπέλου αποτελείται από δύο τμήματα, το έλασμα και το μίσχο. Το έλασμα αποτελεί το κυρίως τμήμα του φύλλου, στο οποίο καταλήγει το αγωγό σύστημα του πρέμνου. Δέχεται την προσπίπτουσα ηλιακή ακτινοβολία και αποτελεί το βασικό όργανο της φωτοσύνθεσης στα πρέμνα της αμπέλου. Ενώνεται με το βλαστό μέσω του μίσχου, ο οποίος απομακρύνει το έλασμα από το βλαστό, ώστε να αποφεύγονται όσο το δυνατόν περισσότερο οι σκιάσεις μεταξύ των φύλλων και να μη μειώνεται η φωτοσυνθετική απόδοση του φυτού. Παράλληλα, ο μίσχος επιτρέπει την κίνηση των φύλλων και συνεπώς τον καλύτερο αερισμό τους, γεγονός που τα ευνοεί σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών (Αλεξάνδρα Ε. Παπαδάκη, 2010). Τα φύλλα εμφανίζονται στους κόμβους των κληματίδων και είναι εναλλασσόμενα έμμισχα και παλαμοσχιδή, είτε τρίλοβα ή πεντάλοβα (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007). Είναι χαρακτηριστικό ότι η σχετική αναλογία φύλλων-καρπών διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007). Το έλασμα των φύλλων της αμπέλου συγκροτείται από εξειδικευμένους ιστούς με αυστηρά καταμερισμένους ρόλους. Τους βασικούς αυτούς ιστούς αποτελούν η άνω και κάτω επιδερμίδα και το μεσόφυλλο, το οποίο διατρέχεται από το αγωγό σύστημα. Η επιδερμίδα (άνω και κάτω) περιβάλλει το έλασμα του φύλλου (Αλεξάνδρα Ε. Παπαδάκη, 2010).



Εικόνα 3: Στην κάτω επιδερμίδα του φύλλου διακρίνονται υποστοματικές κοιλότητες και στόματα. Στα κατάφρακτικά κύτταρα του στόματος διακρίνονται χλωροπλάστες φύλλου (Αλεξάνδρα Ε. Παπαδάκη, 2010).



Εικόνα 4: Τριχίδια σε φύλλο ποικιλίας *vitifera* (Αλεξάνδρα Ε. Παπαδάκη, 2010).

Η επιδερμίδα της πάνω επιφάνειας είναι σχετικά λεία, στερείται στοματίων και καλύπτεται από μια λεπτή στρώση εφυμενίδας, η οποία προφυλάσσει το φύλλο από την απώλεια νερού και από παθογόνους μικροοργανισμούς. Αντίθετα η κάτω επιδερμίδα (κάτω επιφάνεια του φύλλου) δεν παρουσιάζει καλά ανεπτυγμένη εφυμενίδα, είναι συνήθως χνοώδης και περιλαμβάνει διαφοροποιημένα επιδερμικά κύτταρα που δημιουργούν σχηματισμούς υψηλής εξειδίκευσης (Αλεξάνδρα Ε. Παπαδάκη, 2010). Οι σημαντικότεροι σχηματισμοί είναι τα

στόματα, τα οποία κατανέμονται άτακτα στην κάτω επιφάνεια του φύλλου της αμπέλου και φέρνουν σε επικοινωνία τους μεσοκυττάρους χώρους του μεσόφυλλου με την ατμόσφαιρα, με αποτέλεσμα να επιτρέπουν την ανταλλαγή αερίων (CO₂, O₂) και την εξαγωγή υδρατμών προς το περιβάλλον. Στην κατηγορία αυτών των σχηματισμών υψηλής εξειδίκευσης ανήκουν και τα τριχίδια, τα οποία είναι προεκβολές επιδερμικών κυττάρων και αποτελούν το χνοασμό του φύλλου της αμπέλου. Γενικά, η παρουσία χνοασμού στο φύλλο προστατεύει από προσβολές παθογόνων και εντόμων, από αφυδάτωση, διότι μειώνεται η διάχυση των υδρατμών από τα στόματα στην ατμόσφαιρα, και από την έντονη ηλιακή ακτινοβολία, διότι ανακλά μέρος αυτής (Αλεξάνδρα Ε. Παπαδάκη, 2010).

Η άνω και κάτω επιδερμίδα περικλείουν το μεσόφυλλο, παρεγχυματικό ιστό του ελάσματος του φύλλου, όπου λαμβάνει μέρος η φωτοσύνθεση. Αποτελείται από κύτταρα φωτοσυνθετικού παρεγχύματος, τα οποία περιέχουν πολυάριθμους χλωροπλάστες και διακρίνεται σε δρυφακτοειδές ή πασσαλώδες παρέγχυμα και σπογγώδες παρέγχυμα (Αλεξάνδρα Ε. Παπαδάκη, 2010).



Εικόνα 5: Το μεσόφυλλο αποτελεί το φωτοσυνθετικό παρέγχυμα του φύλλου. Διακρίνεται σε δρυφακτοειδές και σπογγώδες παρέγχυμα (Αλεξάνδρα Ε. Παπαδάκη, 2010).

Ανατομικά Χαρακτηριστικά του Καρπού

Τα μικρά πρασινωπά άνθη του αμπελιού είναι συνήθως αρρενοθήλεα γόνιμα. Μετά τη γονιμοποίησή τους σχηματίζονται οι καρποί της αμπέλου, οι ράγες των σταφυλιών σε διάφορα σχήματα και μεγέθη, κυρίως ανάλογα με την ποικιλία (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007). Η ράγα είναι ένας σαρκώδης καρπός που φέρει μη- αποσχιζόμενο, σε όλο του το βάθος, σαρκώδες περικάρπιο και περιλαμβάνει δύο συγκαρπικά καρπόφυλλα. Το κάθε καρπόφυλλο αποτελείται από δύο ανάτροπους σπερματικές βλάστες, διατεταγμένες σε αξονική θέση. Οι τέσσερις σπερματικές βλάστες μετατρέπονται κατά την ωρίμανση, σε γίγαρτα (Καραμολέγκου Μαργαρίτα, 2006). Συνεπώς, ο αριθμός των γιγάρτων κυμαίνεται από μηδέν έως τέσσερα και αποτελούν το 10% του βάρους των ραγών. Τα γίγαρτα αποτελούνται από ένα οξύ μέρος, το ράμφος και από το ωοειδές τμήμα που καλείται σώμα. Το σώμα διαιρείται από ένα αυλάκι σε δύο λοβούς. Το γίγαρτο εσωτερικά εμπεριέχει τη σάρκα ή τον ιστό, όπως ονομάζεται διαφορετικά, που εσωτερικά του οποίου βρίσκεται το

έμβρυο που αναπτύσσεται από τον εμβρυόσακκο και προστατεύεται εσωτερικά από το κέλυφος.



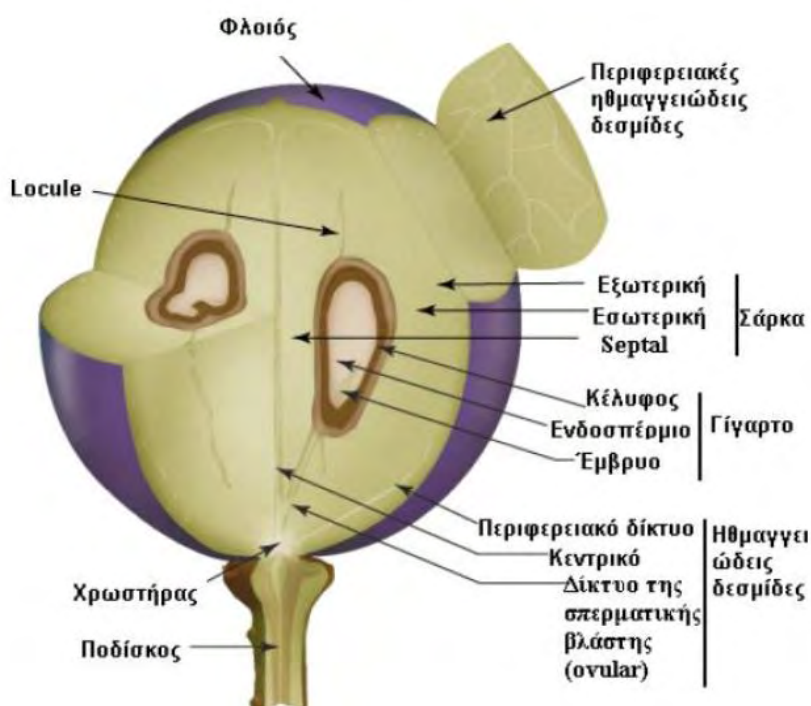
Εικόνα 6: Τα άνθη της αμπέλου εμφανίζονται στους κόμβους των καρποφόρων κληματίδων (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007).

Το κέλυφος αποτελείται από τρία στρώματα: το εξωτερικό, το μεσαίο και το εσωτερικό. Η ανάπτυξη αγίγαρτων ραγών ή ραγών με γίγαρτα τα οποία στερούνται των εμβρύων οφείλεται στο φαινόμενο της εξ ερεθισμού παρθενοκαρπίας και στενοσπερμοκαρπίας, αντίστοιχα. Έχει διαπιστωθεί, λοιπόν στις εγγίγαρτες ποικιλίες υψηλότερος ρυθμός αύξησης των ραγών κατά την αρχική φάση ανάπτυξης και εντονότερη επίσχεση του

ρυθμού αύξησης κατά τη φάση II. Αυτή η παρατήρηση συνάδει με το γεγονός πως σ' αυτές τις ποικιλίες εντοπίζονται υψηλότερες συγκεντρώσεις αυξητικών ουσιών και αμπισισικού οξέος σε σχέση με τις αγίγαρτες ποικιλίες. Γενικά το μέγεθος και η σύνθεση των ραγών επηρεάζεται από την παρουσία των γιγάρτων, με αποτέλεσμα όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των γιγάρτων τόσο μεγαλύτερου όγκου να είναι η ράγα, με συγκριτικά μικρότερες συγκεντρώσεις σακχάρων και νιτρωδών συστατικών αλλά με μεγαλύτερα επίπεδα οξύτητας (Δημοπούλου, 2008).

Η ράγα του σταφυλιού είναι στην πραγματικότητα ένα ανεξάρτητο βιοχημικό εργοστάσιο, αφού εκτός των πρωτογενών μεταβολιτών που είναι αναγκαίοι για την επιβίωση του φυτού (νερό, σάκχαρα, αμινοξέα), έχει την ικανότητα να βιοσυνθέτει ένα πλήθος επιπλέον συστατικών, τα οποία συμβάλουν στη γεύση και το άρωμα του παραγόμενου οίνου (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007). Το ξύλωμα είναι το αγγειακό σύστημα, που στα αρχικά στάδια ανάπτυξης της ράγας, συμβάλει στη μεταφορά νερού, ανόργανων αλάτων, ρυθμιστών ανάπτυξης και θρεπτικών συστατικών από το ριζικό σύστημα, αλλά σταδιακά η λειτουργία του εξαλείφεται ή μειώνεται (James Kennedy, 2002). Στα μετέπειτα στάδια ανάπτυξης, κεντρικό ρόλο στην αγγείωση καταλαμβάνει το φλοιώμα που εμπλέκεται στη φωτοσύνθεση και στη μεταφορά σακχάρων, κυρίως σουκρόζης (James Kennedy, 2002). Υπάρχει ένα μεγάλο σύνολο βιβλιογραφικών αναφορών για την ονοματολογία των ιστών της ράγας (Pratt 1971; Viala και Pechoutre 1910; Guillon 1905; Ribereau- Gayon et al. 1998), σύμφωνα όμως με τον Fournioux (1982) ο καρπός αποτελείται από τρία κύρια τμήματα: α) το περικάρπιο ή φλοιό, που δομείται από την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και το υπόδερμα β) το μεσοκάρπιο ή αλλιώς σάρκα και γ) το ενδοκάρπιο, δηλαδή το εσωτερικό στρώμα της σάρκας. Η σύσταση κάθε τμήματος είναι διαφορετική. Γενικά, ο φλοιός χαρακτηρίζεται από μικρή

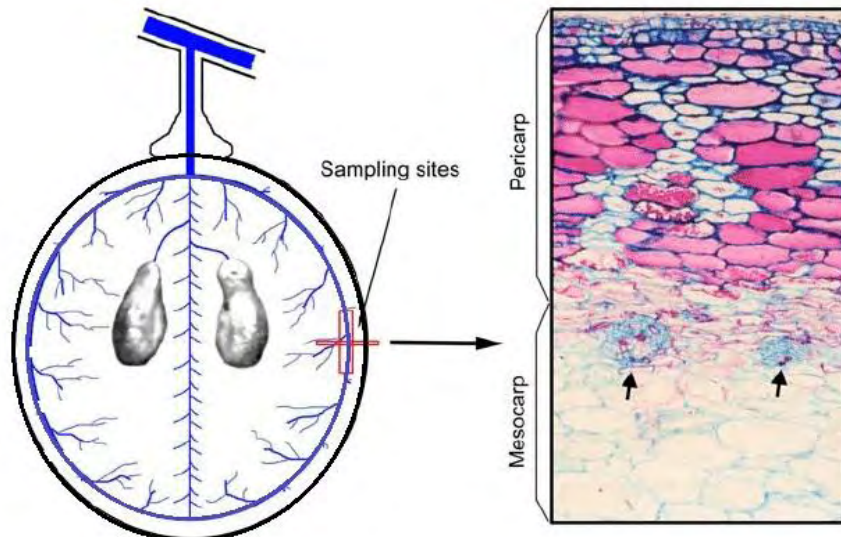
περιεκτικότητα σε σάκχαρα αλλά πλούσια περιεκτικότητα σε οξέα και κατιόντα, το μεσοκάρπιο εμφανίζει εντελώς αντίστροφη σύσταση, ενώ το ενδοκάρπιο περιέχει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σακχάρων καθώς και κατιόντων μαζί με οξέα, συγκριτικά με το μεσοκάρπιο (Δημοπούλου Ειρήνη, 2008). Ο φλοιός αποτελεί το 5-10% του συνολικού βάρους της ράγας. Είναι ένα δερματώδες σύστημα που περιλαμβάνει την εφυμενίδα, την εξωτερική επιδερμίδα του περικάρπιου, το κολλεγχυματικό υπόδερμα και άλλους ιστούς πλούσιους σε βιταμίνη C και ουσίες που συνεισφέρουν στο χρώμα, το άρωμα και τη γεύση.



Εικόνα 7: Δομικά Χαρακτηριστικά Όριμης Ράγας (James Kennedy, 2002).

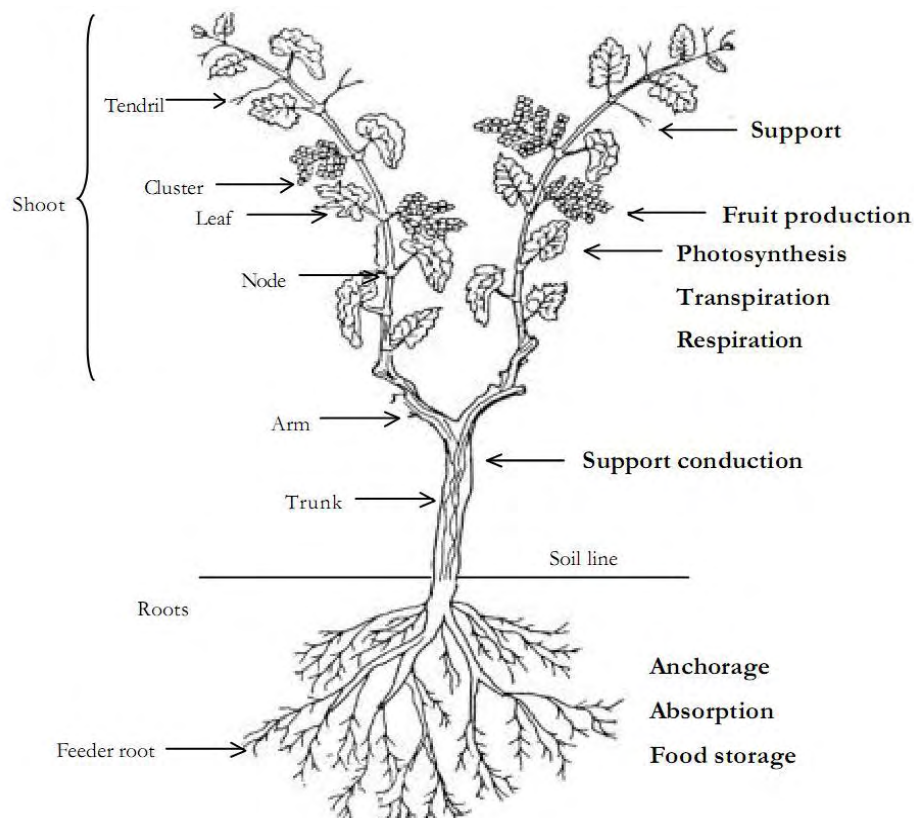
Η επιδερμίδα αποτελείται από μία ή δύο στιβάδες επαπτόμενων επιμηκυμένων κυττάρων, που αποτελούν το στρώμα του φλοιού στο οποίο περιέχονται αρωματικές και πρόδρομες αρωματικές ενώσεις κάθε ποικιλίας, που συσσωρεύονται κυρίως την περίοδο της ωρίμανσης των καρπών και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου οίνου (William McGlynn, 2012). Αντίστοιχα, το υπόδερμα αποτελείται από έξι έως δέκα στιβάδες κυττάρων. Τα κύτταρα του φλοιού είναι ενεργά μεταβολικά, καθώς διεξάγουν πολλές βιοχημικές και φυσιολογικές μεταβολές κατά την πορεία ανάπτυξης των ραγών. Ο αριθμός των στιβάδων του φλοιού και το μέγεθός τους αποτελεί χαρακτηριστικό κάθε ποικιλίας (Δημοπούλου, 2008). Τα κύτταρα που συνθέτουν τη σάρκα της ράγας του σταφυλιού, δομικά είναι μεγαλύτερα και πιο σφαιρικά, σε σχέση με αυτά του φλοιού. Πιο συγκεκριμένα, τα παρεγχυματικά κύτταρα που δομούν τη σάρκα, αποτελούνται από κυτταρικές κύστες (κενοτόπια) που περιέχουν τον κυτταρικό χυμό (γλεύκος). Ο κυτταρικός χυμός αντιπροσωπεύει το 64-90% του βάρους των ραγών. Η σάρκα απαρτίζεται από κύτταρα του μεσοκαρπίου και από κύτταρα της εξωτερικής και εσωτερικής

στιβάδας του ενδοκαρπίου. Αυτά σχηματίζουν είκοσι με τριάντα περίπου στιβάδες πενταγωνικών ή εξαγωνικών κυττάρων, στα πρώτα επίπεδα των οποίων, τα τοιχώματα τους είναι λεπτά και εύθραυστα, με αποτέλεσμα να δημιουργείται κάτω από το φλοιό μια πλήρη



Εικόνα 8: Ανατομικό τμήμα του περικαρπίου και του μεσοκαρπίου της ράγας σταφυλιού (Xiao-Yan Zhang et al, 2006).

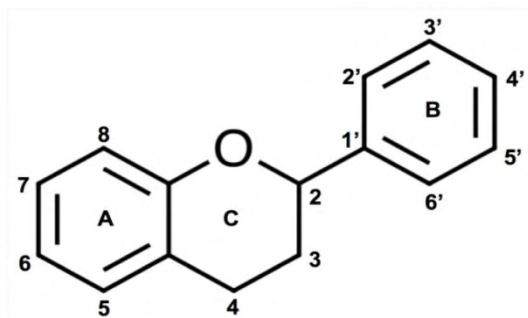
ζώνη υγρού (Δημοπούλου, 2008). Επιπλέον οι μεμβράνες των συνεχόμενων κυττάρων δεν είναι ενωμένες μεταξύ τους σε όλη την περιφέρεια, αλλά αφήνουν στις γωνίες μικρούς, επικοινωνούντες χώρους μέσα από τους οποίους γίνονται οι εναλλαγές αερίων με το εξωτερικό περιβάλλον.



Εικόνα 9: Συνολική διαγραμματική απεικόνιση της δομής και της λειτουργίας κάθε τμήματος της αμπέλου.

Φαινολικές Ενώσεις των καρπών της Αμπέλου

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια μεγάλη οικογένεια δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά, που δρουν φυτοπροστατευτικά ως ενεργοί αναστολείς ανάπτυξης άλλων ζωντανών συστημάτων (Natacha Fontes et al, 2011). Προσθέτουν χρώμα και γεύση στους καρπούς, η οποία είναι συνήθως στυφή και πικρή, συμβάλλοντας στην ποιότητα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Επιπλέον, παίζουν σημαντικό ρόλο για την ανθρώπινη υγεία, λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης (Natacha Fontes et al, 2011). Χαρακτηρίζονται ως φυσικά μόρια, με μικρό μοριακό βάρος και την ύπαρξη ενός τουλάχιστον φαινολικού δακτυλίου (C6), με μία ομάδα υδροξυλίου ή άλλες χαρακτηριστικές ομάδες (António Teixeira et al, 2013).



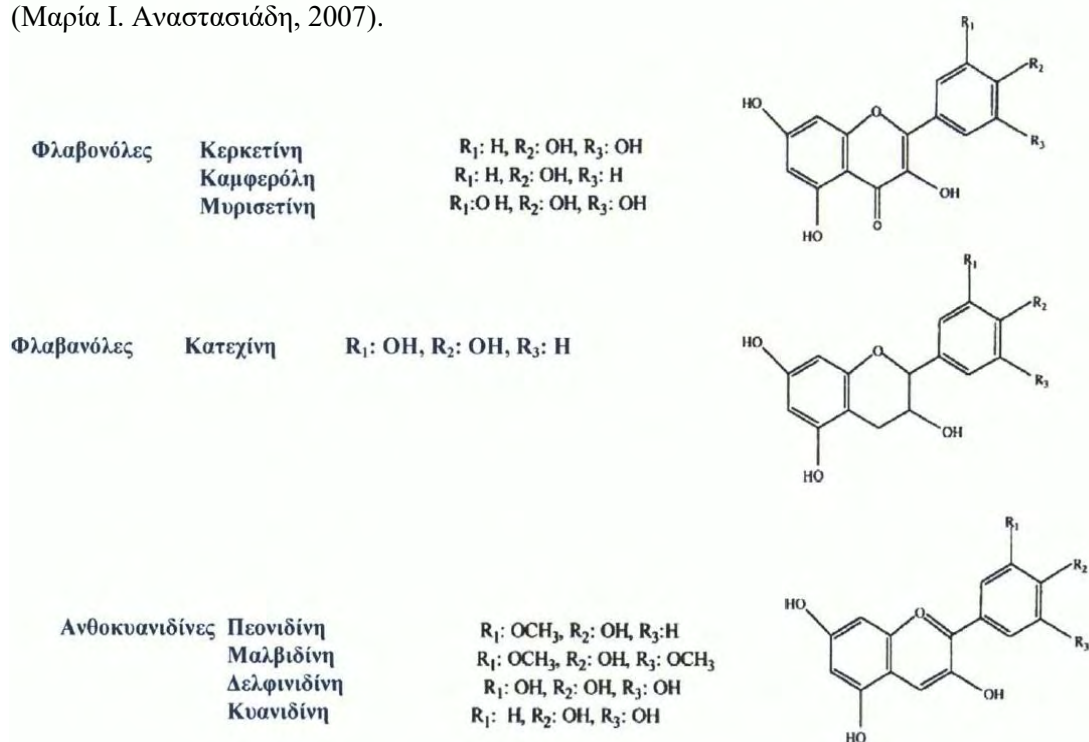
Εικόνα 10: Βασική Δομή Ανθρακικού Σκελετού Φλαβονοειδών (António Teixeira et al, 2013).

Οι φαινολικές ενώσεις των καρπών της αμπέλου διακρίνονται ανάμεσα στις μη φλαβονοειδείς ενώσεις (μονομοριακές φαινόλες), που αποτελούνται από έναν απλό φαινολικό δακτύλιο και στα φλαβονοειδή (πολυμοριακές φαινόλες), η χημική δομή των οποίων αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε δύο φαινολικούς

δακτυλίου που ενώνονται μεταξύ τους με μία αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα (C6-C3-C6). Τα μη φλαβονοειδή διακρίνονται στις επιμέρους ομάδες, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, τα υδροξυκινναμικά οξέα, τις πτητικές φαινόλες και τα στιλβένια, ενώ τα φλαβονοειδή σύμφωνα με την κατάσταση οξείδωσης του (C) δακτυλίου, χωρίζονται σε έξι δομικές τάξεις: τις φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες και τις ανθοκυανίνες (António Teixeira et al, 2013).

Τα **φλαβονοειδή** συνιστούν την πλέον πολυπληθή ομάδα φυτοχημικών φαινολικών ενώσεων, αριθμώντας περίπου τα μισά από τα συνολικά 8.000 φαινολικά παράγωγα που απαντώνται στα φυτά (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007). Σε γενικές γραμμές, σύμφωνα με τη δομή τους, οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες αποτελούν τις πλέον διαδεδομένες και δομικά διαφοροποιημένες μορφές. Οι **φλαβονόλες** είναι μία κατηγορία φλαβονοειδών με σκελετό 3-υδροξυφλαβόνης. Διαφέρουν όσον αφορά τον αριθμό και τον τύπο των υποκαταστατών του δακτυλίου B, ενώ εντοπίζονται συνήθως ως γλυκοσίδια, γαλακτοσίδια, ραμνοσίδια και γλυκουρονίδια, με τον δεσμό σακχάρου, να επισυνάπτεται στη θέση -3, του σκελετού των φλαβονοειδών (António Teixeira et al, 2013). Στις ρόγες των σταφυλιών συντίθενται καμπερόλη, κερκετίνη, μυρκετίνη αλλά και μεθυλιωμένες μορφές φλαβονολών (António Teixeira et al, 2013). Η κερκετίνη είναι γνωστό ότι συμπεριφέρεται, ως UV-προστατευτικό

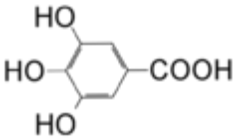
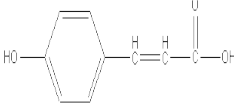
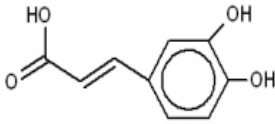
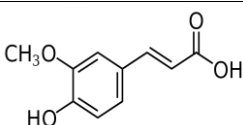
μόριο, ενώ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην χρώση των καρπών μαζί με τις ανθοκυανίνες (António Teixeira, 2013). Οι **ανθοκυανίνες** είναι υπεύθυνες για τον κόκκινο, μοβ και μπλε χρωματισμό των φυτικών τμημάτων. Η δομή τους που προσδιορίστηκε στις ποικιλίες V. Vinifera και το κρασί το 1959, χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός άγλυκου φαινολικού συστατικού, με τυπικό σκελετό C6-C3-C6 (2-φαινυλ-βενζοπυρένιο) και ένα αλδεϋδοσάκχαρο, συνήθως γλυκόζη (António Teixeira et al, 2013). Πρόκειται συγκεκριμένα για γλυκοσίδια και ακυλ-γλυκοσίδια. Ωστόσο, η διαφορά τους με την άγλυκη μορφή, έγκειται στην 3' και 5' θέση του B' δακτυλίου, λόγω της παρουσίας μεθυλ- και υδροξυ-υποκαταστατών (António Teixeira et al, 2013). Στη φύση υπάρχουν συνολικά 17 αγλυκόνες αλλά μόνο έξι εντοπίζονται στην άμπελο: η μαλβιδίνη, η κυανιδίνη, η πεονιδίνη, η δελφινιδίνη και η πετουνιδίνη. Οι ανθοκυανίνες μπορούν επίσης να εστεροποιηθούν με οξέα όπως το οξικό, το κουμαρικό ή το καφεϊκό (António Teixeira et al, 2013). Γενικά, στη φύση τα περισσότερα φλαβονοειδή, εκτός από τις φλαβαν-3-όλες- βρίσκονται ως γλυκοζυλιωμένα υδατοδιαλυτά παράγωγα με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στα κενοτόπια των κυττάρων (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007).



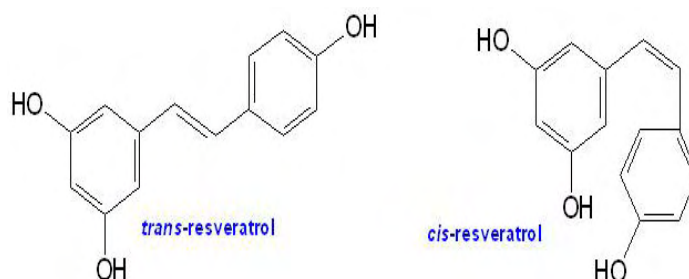
Εικόνα 11: Κυριότερες κατηγορίες φλαβονοειδών που εντοπίζονται στα σταφύλια (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007).

Αντίθετα, τα **υδροξυκινναμωμικά οξέα** σπάνια βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή, αφού συνήθως είναι ως εστέρες ή αμίδια (António Teixeira et al, 2013). Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα βρίσκονται περισσότερο συχνά στα φυτικά είδη και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Η κατηγορία των **στιλβενίων** έχει επιστήσει την προσοχή, λόγω πλεονεκτημάτων που προσφέρουν στην υγεία του ανθρώπου. Τα στιλβένια είναι φαινολικά παράγωγα μικρού μοριακού βάρους που

προκύπτουν από τη φαινυλαλανίνη κατά τη βιοσύνθεση των φαινυλοπροπανίων και μπορούν να υποστούν τροποποιήσεις μετά τη βιοσύνθεσή τους (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007). Συγκεκριμένα υφίστανται γλυκοζυλίωση ή μεθυλίωση, αποκτώντας τελικά επιπρόσθετα χαρακτηριστικά, όπως αντιμυκητιακή δράση (Αντόνιο Τείχειρα et al, 2013). Το κυριότερο μέλος της οικογένειας των στυλβενίων που απαντώνται στα σταφύλια και τους οίνους είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη (3,5,4-τρυδροξυστυλβένιο), το στυλβένιο με την πιο απλή μοριακή δομή, η οποία χρησιμοποιείται ως πρόδρομο μόριο για άλλες ενώσεις, μέσω διαφόρων τροποποιήσεων της μονάδας στυλβενίου. Αυτή ανήκει σε μια κατηγορία ενώσεων που έχουν χαρακτηριστεί ως φυτοαλεξίνες, αφού παράγονται σε συνθήκες βιοτικού και αβιοτικού στρες, όπως για παράδειγμα οι προσβολές από μικροοργανισμούς ή οι κακώσεις των ιστών από την υπεριώδη ακτινοβολία (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007). Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται σε μορφές *cis* και *trans*, αλλά και ως γλυκοζίτης (πικεΐδης, *riceid*) (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007). Η *cis*-ρεσβερατρόλη είναι ένα λιγότερο σταθερό ισομερές *trans*-ρεσβερατρόλης (Αντόνιο Τείχειρα et al, 2013).

Πολυφαινολικά Οξέα	Συστηματική Ονομασία	Χημική Δομή	Μοριακός Τύπος
Γαλλικό Οξύ	3,4,5-τρυδροξυβενζοϊκό οξύ		C ₇ H ₆ O ₅
Κουμαρικό Οξύ	3 - (4 -υδροξυφαινυλο) -2 ακρυλικό		C ₉ H ₈ O ₃
Καφεϊκό οξύ	3 - (3,4-διυδροξυ-φαινυλ)-2-προπενοϊκό οξύ		C ₉ H ₈ O ₄
Φερουλικό οξύ	4 - υδροξυ-3 - μεθοξυ-κινναμικό οξύ		C ₁₀ H ₁₀ O ₄

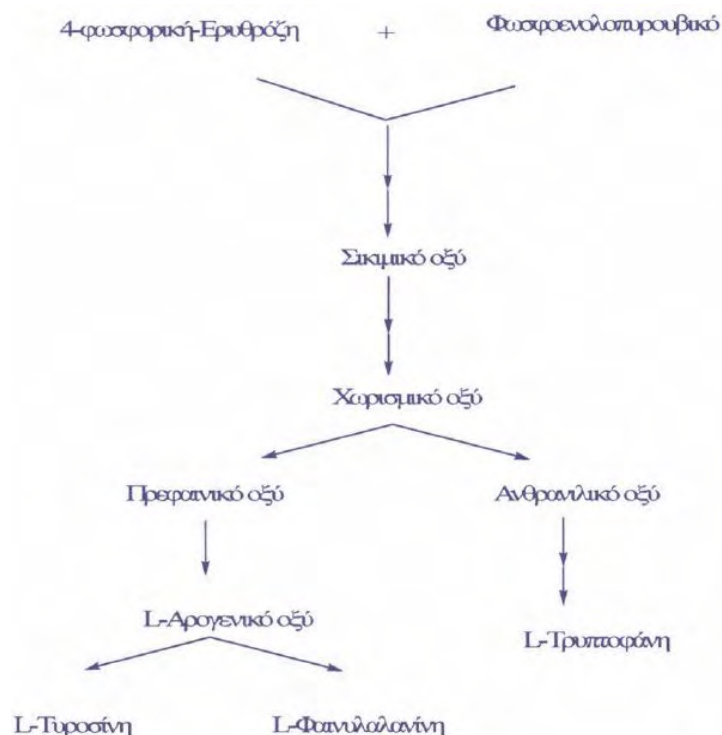
Πίνακας 1: Ορισμένα από τα κύρια παράγωγα υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκινναμικού οξέος.



Εικόνα 12: Χημική Δομή *cis* και *trans* Ρεσβερατρόλης.

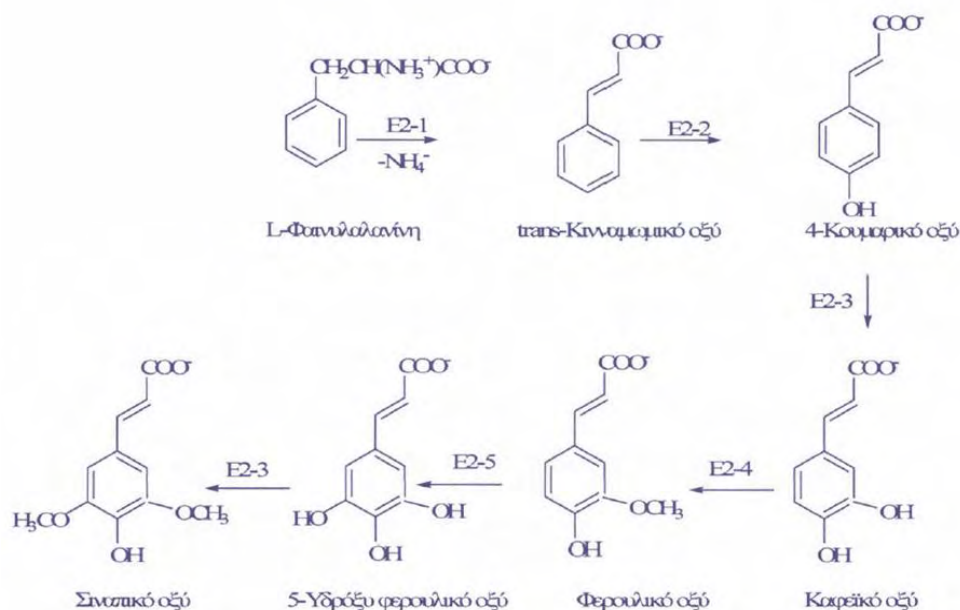
Βιοσύνθεση Φαινολικών Ενώσεων στα Σταφύλια

Στο εξωκάρπιο της ράγας των σταφυλιών, έχει βρεθεί πως η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση φλαβονοειδών, ανιχνεύεται τέσσερις βδομάδες μετά την έναρξη της ανθοφορίας, ακολουθεί μία μείωση και τελικά κορύφωση της έκφρασης κατά την περίοδο της ωρίμανσης (Veraison) (Rita Maria Francisco et al, 2013). Τα φλαβονοειδή συντίθενται κατά μήκος ενός γενικού φαινυλοπροπανοειδούς μονοπατιού, από τη δράση ενός πολυενζυμικού συμπλόκου, που συνδέεται χαλαρά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) (Enrico Braidot et al, 2008). Αυτό το μονοπάτι έχει περιγραφεί σε πολλά φυτικά είδη αλλά και στην άμπελο (*Vitis Vinifera*), όπου η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών, έχει καλώς χαρακτηριστεί τόσο στις ράγες όσο και στα σπέρματα των λευκών και ερυθρών ποικιλιών. Το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ιστών και τις διάφορες ποικιλίες της αμπέλου, ειδικά όσον αφορά τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ανθοκυανινών (Enrico Braidot et al, 2008). Η πρώτη αντίδραση σύνθεσης απλών φαινολικών ενώσεων, στους καρπούς της αμπέλου, περιλαμβάνει την απαμίνωση της φαινυλαλανίνης. Η φαινυλαλανίνη ανήκει στην κατηγορία των αρωματικών αμινοξέων (L-τυροσίνη, L-τρυπτοφάνη), που παράγονται μέσω της οδού σικιμικού οξέος και αποτελούν σημαντικές πρόδρομες ουσίες των αυξητικών φυτοορμονών και ποικίλων δευτερογενών μεταβολιτών όπως των φαινυλο-προπανοειδών (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007).



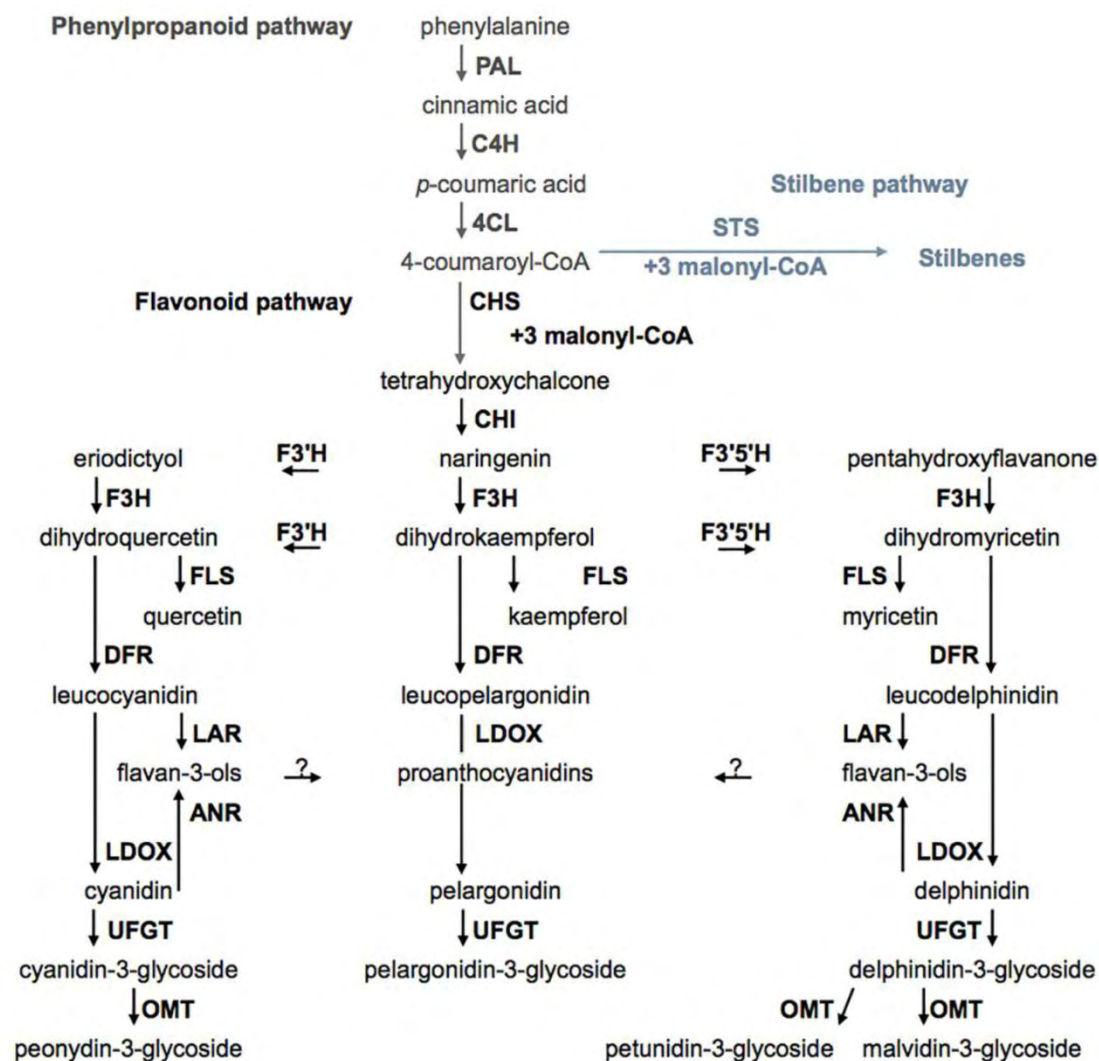
Εικόνα 13: Περίληπτική Αναπαράσταση της οδού Σικιμικού οξέος (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007).

Η οδός της φαινυλαλανίνη/υδροξικινναμικού, ορίζεται ως ο “Γενικός Μεταβολισμός Φαινυλοπροπανίων” και περιλαμβάνει αντιδράσεις που οδηγούν στον μετασχηματισμό της L-φαινυλαλανίνης, σε υδροξικινναμικά οξέα, θειοεστέρες του συνενζύμου A (CoA) και 1-O-ακυλογλυκοσίδες, τα οποία συμμετέχουν σε διάφορες επιμέρους αντιδράσεις, όπως για παράδειγμα η συμπύκνωση των φαινυλοπροπανίων με το μαλονυλο-συνένζυμο A (για τη σύνθεση των φλαβονοειδών των ισοφλαβονοειδών και των στυλβενίων), αντιδράσεις αναγωγής με το NADPH (για το σχηματισμό των λιγνινών) και οι αντιδράσεις σύζευξης (οδηγούν στο σχηματισμό εστέρων και αμιδίων τους) (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007).



Εικόνα 14: Βιοσύνθεση Υδροξικινναμικών Οξέων από τη Φαινυλαλανίνη (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007).

Πιο αναλυτικά, η αλληλεπίδραση μεταξύ της φαινυλαλανίνης και των δευτερογενών φαινυλοπροπανίων ελέγχεται από μια λύαση (phenylalanine ammonia lyase, PAL) (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007). Η αντίδραση απαμίνωσης της φαινυλαλανίνης καταλύεται από αυτό το ένζυμο (αμμωνιακή λύαση της φαινυλαλανίνης, PAL), με αποτέλεσμα την παραγωγή του κινναμωμικού οξέος ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CHCHCO}_2\text{H}$). Εν συνεχεία το ένζυμο 4-υδροξυλάση του κινναμωμικού οξέος (cinnamic acid 4-hydroxylase, C4H), μετατρέπει το κινναμωμικό οξύ σε π-κουμαρικό, μέσω υδροξυλίωσης (António Teixeira et al, 2013). Τελικά, το π-κουμαρικό εστεροποιείται από το ένζυμο 4-κουμαρική-CoA λιγάση (4CL), με αποτέλεσμα το σχηματισμό του 4-κουμαρουλ-CoA, που θα αποτελέσει με τη σειρά του το υπόστρωμα δύο ενζύμων, της συνθετάσης χαλκόνης (CHS) και της συνθετάσης του στυλβενίου (STS) (António Teixeira et al, 2013).



Εικόνα 15: Μονοπάτια βιοσύνθεσης δευτερογενών ενώσεων στις ράγες των σταφυλιών. Αμμωνιακή Λύση Φαινυλαλανίνης (PAL), 4-υδροξυλάση του κινναμωμικού οξέος (C4H), 4-κουμαρική-CoA λιγάση (4CL), συνθετάση στυλβενίου (STS), συνθετάση της χαλκόνης (CHS), ισομεράση της χαλκόνης (CHI), 3'-υδροξυλάση φλαβονοειδούς (F3'H), 3',5'-υδροξυλάση φλαβονοειδούς (F3'5'H), 3'-υδροξυλάση φλαβονόλης (F3H), συνθάση φλαβονόλης (FLS), αναγωγή διυδροφλαβονόλης (DFR), αναγωγή της λευκοανθοκυανιδίνης (LAR), αναγωγή της ανθοκυανιδίνης (ANR), διοξυγενάση λευκοανθοκυανιδίνης (LDOX), 4'-αναγωγή διυδροφλαβονόλης (DFR), Ο-μεθυλοτρανσφεράση (OMT), φλαβονοειδή 3-O-γλυκοσυλ- τρανσφεράση της UDP- γλυκόζης (UFGT) (António Teixeira et al, 2013).

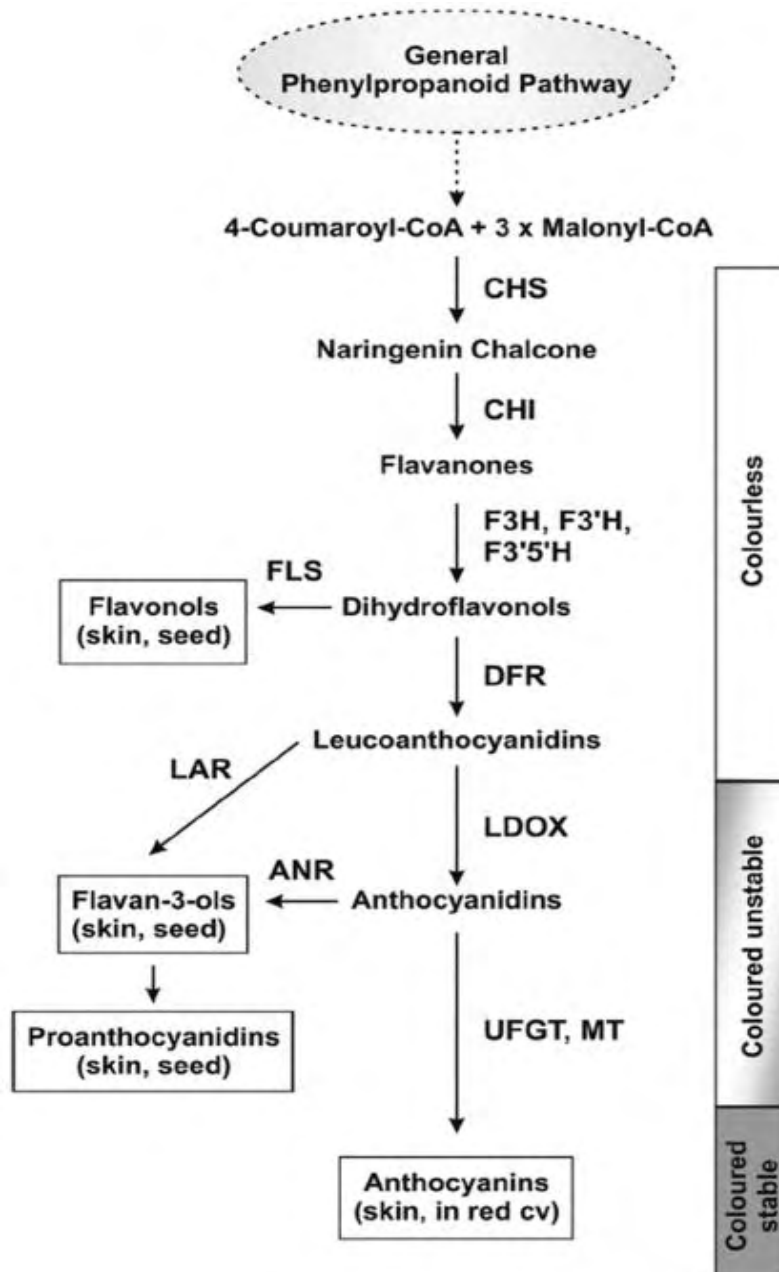
Το πρώτο βήμα της οδού στυλβενίου, ελέγχεται από τη συνθετάση του στυλβενίου (STS), ενώ η ανταγωνιστική δράση μεταξύ των ενζύμων STS και CHS, για το ίδιο υπόστρωμα (4-κουμαρουλ-CoA), ρυθμίζει το σημείο εισόδου είτε στο μονοπάτι βιοσύνθεσης φλαβονοειδών είτε στο μονοπάτι βιοσύνθεσης στυλβενίων (António Teixeira et al, 2013). Και τα δύο ένζυμα, με ανάλογο τρόπο, πραγματοποιούν τρεις αντιδράσεις συμπύκνωσης, για την παραγωγή ρεσβερατρόλης. Η trans-ρεσβερατρόλη (3, 5, 4'-trans-υδροξυστυλβένιο), είναι το κυριότερο μέλος της οικογένειας των στυλβενίων που απαντώνται στα σταφύλια και συντίθεται από π-κουμαροϋλοσυνένζυμο A και τρία μόρια μαλονυλοσυνενζύμου A, μια αντίδραση που καταλύεται από τη συνθετάση του στυλβενίου (STS). Κατά την αντίδραση της STS, η τελική

καρβοξυλομάδα απομακρύνεται πριν σχηματιστεί ο δακτύλιος (A), προκαλώντας μια διαφορετική αναδίπλωση του δακτυλίου στη ρεσβερατρόλη, σε σύγκριση με το προϊόν της CHS, την τετραυδροξυχαλκόνη (António Teixeira et al, 2013). Αναλυτικότερα, η συνθετάση της χαλκόνης (CHS) είναι το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση των υδροξικιναμωμικών οξέων για το σχηματισμό του βασικού σκελετού 15 C στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών. Η αντίδραση που καταλύει είναι η συμπύκνωση του 4-κουμαροϋλοσυνένζυμου A με τρία μόρια μαλονυλοσυνένζυμου A σχηματίζοντας τη χαλκόνη της ναριγενίνης που αποτελεί το πρώτο ενδιάμεσο προϊόν που διαθέτει το δακτύλιο B, ο οποίος αποτελεί το χαρακτηριστικό όλων σχεδόν των φλαβονοειδών. Αυτό πραγματοποιείται με σταδιακή προσθήκη μορίων οξικού οξέος από το μαλονυλοσυνένζυμο A, στο 4-κουμαροϋλοσυνένζυμο, τα οποία προσανατολίζονται τυχαία με αποτέλεσμα το σχηματισμό του δακτυλίου A των φλαβονοειδών (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007). Στη συνέχεια, η κυκλοποίηση της χαλκόνης προς τη φλαβονόνη ναριγγενίνη καταλύεται από την ισομεράση της χαλκόνης. Η ναριγγενίνη αποτελεί το πρόδρομο μόριο για την ενζυματική σύνθεση ποικίλων φλαβονοειδών, όπως οι φλαβονόνες και οι ανθοκυανίνες (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007). Ειδικότερα, το ένζυμο φλαβονοειδή 3-O-γλυκοσυλ-τρανσφεράση της UDP-γλυκόζης (UFGT), καταλύει την γλυκοζυλίωση των ανθοκυανιδίων για την παραγωγή ανθοκυανινών, που πρόκειται για έγχρωμα και σταθερά προϊόντα (Enrico Braidot et al, 2008).

Η βιοσύνθεση των προανθοκυανιδινών (PAs), ακολουθεί την ίδια πορεία με αυτή των ανθοκυανινών, αλλά διακλαδίζεται από αυτήν μετά την αναγωγή της λευκοκυανιδίνης (ή κυανιδίνης) προς κατεχίνη (ή επικατεχίνη), με ενζυμική αντίδραση που καταλύεται από την αναγωγή της λευκοανθοκυανιδίνης (LAR) ή την αναγωγή της ανθοκυανιδίνης (ANR), αντίστοιχα (Enrico Braidot et al, 2008). Γενικά, όλα τα φλαβονοειδή προέρχονται από την τετραυδροξυχαλκόνη, με αποτέλεσμα στο μονοπάτι βιοσύνθεσης φλαβονοειδών τελικά να σχηματίζονται διαφορετικοί μεταβολίτες, όπως φλαβονόλες, φλαβαν-3-όλες, προανθοκυανιδίνες και ανθοκυανίνες (António Teixeira et al, 2013).

Στις ερυθρές ποικιλίες, όλα τα γονίδια εκφράζονται στην επιδερμίδα, αλλά με διαφορετικό χρονικό μοτίβο. Στη σάρκα της ράγας η έκφρασή τους είναι χαμηλή και πιο συγκεκριμένα, η αμμωνιακή λυάση της φαινυλαανίνης (PAL) και η φλαβονοειδή 3-O-γλυκοσυλ-τρανσφεράση της UDP-γλυκόζης (UFGT), δεν εκφράζονται. Αυτά τα ένζυμα εμπλέκονται στο πρώτο και τελευταίο στάδιο της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών, αντίστοιχα (Enrico Braidot et al, 2008). Απουσία έκφρασης της UFGT παρατηρείται και στα σπέρματα των καρπών της αμπέλου. Η έκφραση των γονιδίων VvLAR1, VvLAR2 και VvANR στην επιδερμίδα και τα σπέρματα των καρπών των ερυθρών ποικιλιών, επίσης φαίνεται να ρυθμίζεται χρονικά, ξεκινώντας από την ανάπτυξη των σταφυλιών μέχρι και την έναρξη της ωρίμανσης, ενώ διαφοροποιήσεις παρατηρούνται ακόμα και στο επίπεδο των ιστών.

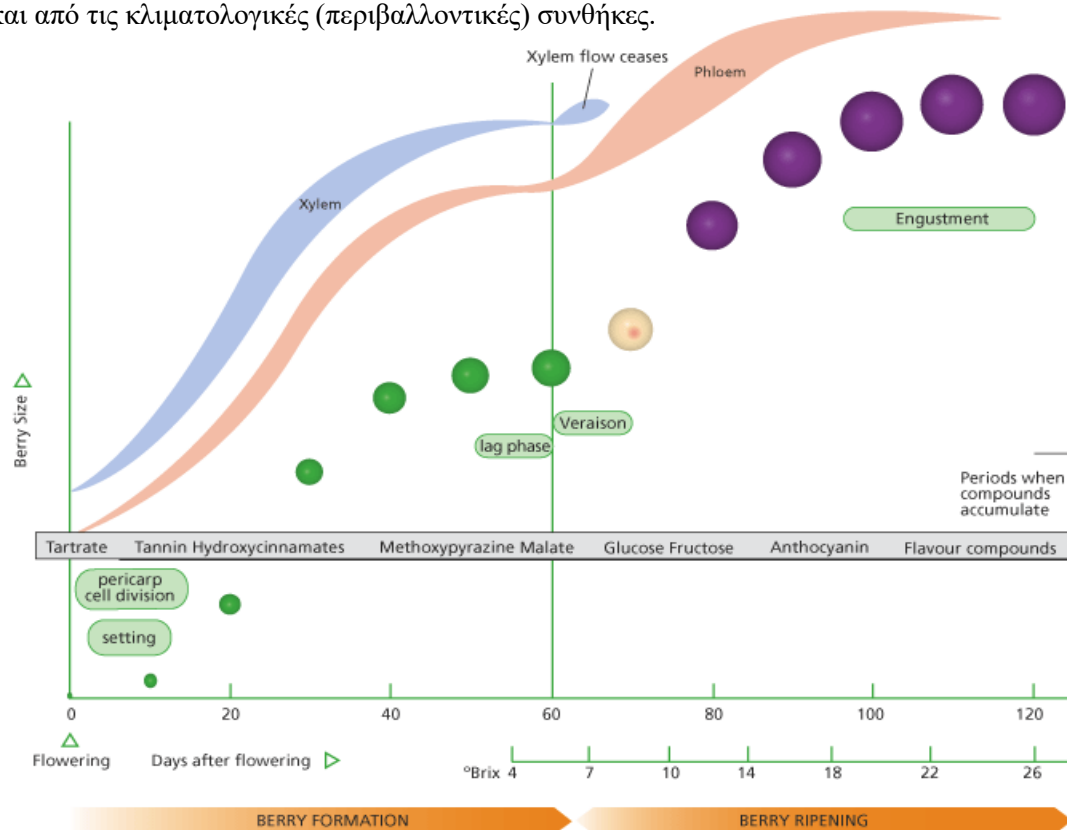
Χαρακτηριστικά τα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω γονιδίων, είναι υψηλότερα στα σπέρματα, με το γονίδιο VnLAR1, να εκφράζεται αποκλειστικά σ' αυτά (Enrico Braidot et al, 2008). Αντιθέτως, στις λευκές ποικιλίες η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών, αποδείχθηκε ότι διεξάγεται μόνο στην επιδερμίδα των καρπών. Επιπλέον η UFGT δεν είναι ανιχνεύσιμη, ενώ η έκφραση των υπόλοιπων γονιδίων είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των ερυθρών ποικιλιών (Enrico Braidot et al, 2008).



Εικόνα 16: Σχηματική Αναπαράσταση βιοσυνθετικού μονοπατιού φλαβονοειδών. Η σύνθεση των φλαβονολών και προανθοκυανιδινών διαχωρίζεται από το μονοπάτι σύνθεσης ανθοκυανινών (Enrico Braidot et al, 2008).

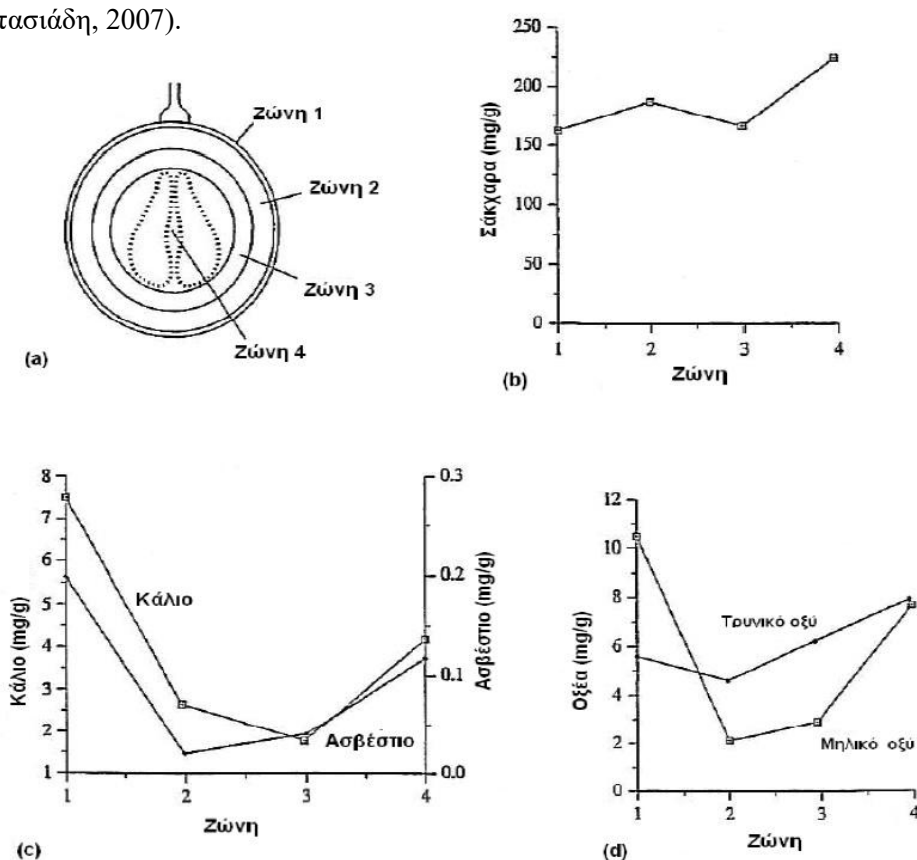
Χημική Σύσταση των καρπών της Αμπέλου (*Vitis Vinifera*)

Η ανάπτυξη των σταφυλιών χαρακτηρίζεται από δύο διαδοχικές περιόδους σιγμοειδούς ανάπτυξης, οι οποίες διαχωρίζονται από μία λανθάνουσα φάση, στην οποία το μέγεθος της ράγας παραμένει σταθερό (J. Kennedy, 2002). Η πρώτη περίοδος ανάπτυξης, ξεκινά από την ανθοφορία και διαρκεί μέχρι και εξήντα μέρες αργότερα. Κατά τη διάρκεια αυτής λαμβάνουν χώρα κυτταρικές διαιρέσεις που σχετίζονται με το μέγεθος των καρπών, ενώ παράλληλα σχηματίζεται το έμβryo κάθε σπέρματος. Η περιεκτικότητα των θρεπτικών συστατικών και ενώσεων ποικίλει καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης των σταφυλιών (J. Kennedy, 2002). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείτε συσσώρευση διαλυμένων ουσιών και κυρίως τρυγικού και μηλικού οξέος. Αυτές οι ενώσεις κατανέμονται διαφορετικά στους διάφορους ιστούς, με τα επίπεδα του τρυγικού να είναι υψηλότερα προς το εξωτερικό μέρος της αναπτυσσόμενης ράγας και το μηλικό οξύ να έχει μεγαλύτερες τιμές στη σάρκα (J. Kennedy, 2002). Αυτά τα οξέα παρέχουν αργότερα στον παραγόμενο οίνο, την απαραίτητη οξύτητα και επομένως είναι ζωτικής σημασίας για την ποιότητα του. Η έναρξη της 2^{ης} φάσης ανάπτυξης ή ωρίμανσης του καρπού (*Veraison*), χαρακτηρίζεται από την αποσκλήρυνση και τον χρωματισμό των καρπών. Συνολικά, οι ρόγες των σταφυλιών διπλασιάζονται σε όγκο, ωστόσο όμως ορισμένες ουσίες που παράγονται κατά την 1^η φάση ανάπτυξης μειώνουν τα επίπεδά τους (J. Kennedy, 2002). Μεταξύ αυτών είναι και το μηλικό οξύ, η συγκέντρωση του οποίου φαίνεται να επηρεάζεται και από τις κλιματολογικές (περιβαλλοντικές) συνθήκες.



Εικόνα 17: Διαγραμματική απεικόνιση φάσεων ανάπτυξης και ωρίμανσης των σταφυλιών, στο οποίο παρουσιάζεται αντίστοιχα και η συσσώρευση των χημικών ενώσεων (J. Kennedy, 2002).

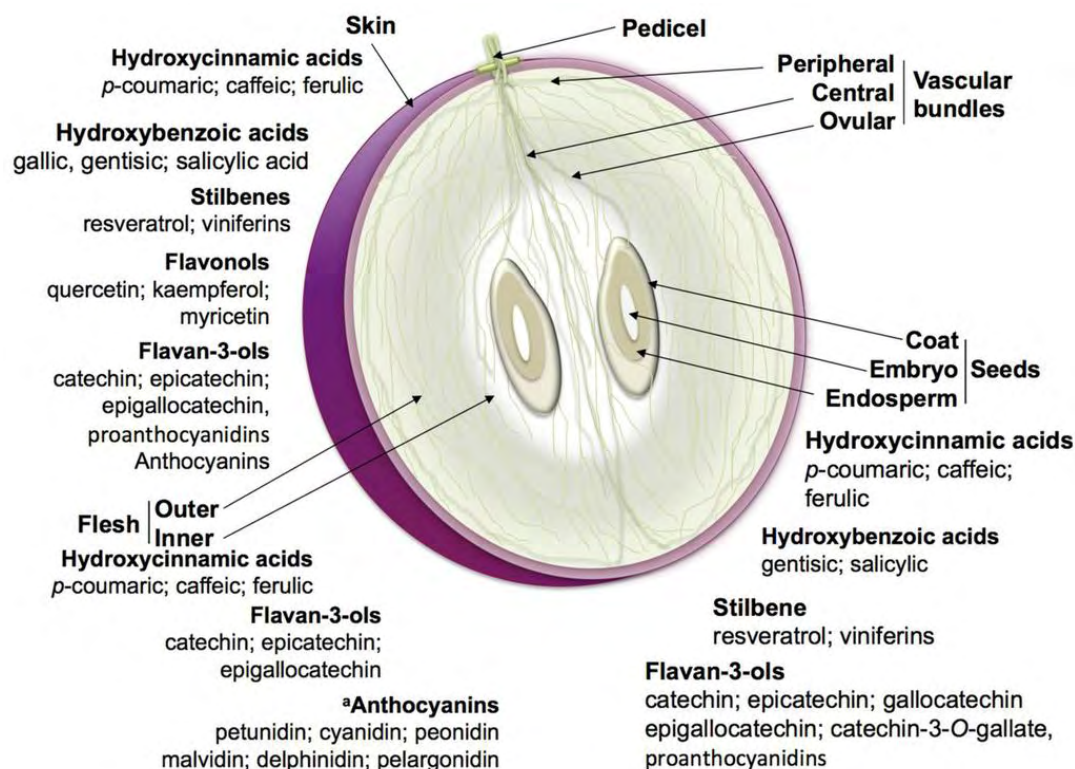
Πιο αναλυτικά, τα σταφύλια που καλλιεργούνται σε θερμότερες περιοχές τείνουν να έχουν μικρότερες συγκεντρώσεις μηλικού οξέος, σε σχέση με αυτά που καλλιεργούνται σε ψυχρότερες περιοχές (J. Kennedy, 2002). Παρά λοιπόν, τις σημαντικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα όσον αφορά τις χημικές ενώσεις της 1^η φάσης ανάπτυξης, παρατηρείται εξαιρετικά μεγάλη αύξηση για άλλες ενώσεις και κυρίως για τα σάκχαρα τις σάρκας (J. Kennedy, 2002). Η σουκρόζη που παράγεται κατά τη φωτοσύνθεση, μεταφέρεται στους καρπούς του σταφυλιού και κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης υδρολύεται στα συστατικά σάκχαρα γλυκόζη και φρουκτόζη, τα επίπεδα των οποίων επηρεάζονται και από το χρονικό διάστημα παραμονής των σταφυλιών στο αμπέλι, την αφυδάτωση και την καταπόνηση της καλλιέργειας. Η συγκέντρωσή τους στη σάρκα κυμαίνεται από 150-250 g/l, ενώ άλλα σάκχαρα όπως η σακχαρόζη (1-3 g/l) υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες (Μαρία Ι. Αναστασιάδη, 2007).



Εικόνα 18: Ανάλυση των κυριότερων συστατικών της ράγας: (b) σακχάρων, (c) κατιόντων και (d) οξέων, εκφρασμένων σε mg/g νωπού βάρους στα διαφορετικά της τμήματα. Η ζώνη (1) αντιστοιχεί στο φλοιό, η ζώνη (2) και (3) στο μεσοκάρπιο και η ζώνη (4) στο ενδοκάρπιο (Possner και Kliewer, 1985).

Διαφοροποιήσεις σημειώνονται και για τις φαινολικές ενώσεις, στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα είναι η τρίτη πιο άφθονη κατηγορία φαινολικών ενώσεων που συναντάται στις ρόγες των σταφυλιών, μετά τις προανθοκυανιδίνες και τις ανθοκυανίνες (António Teixeira et al, 2013). Συσσωρεύονται κυρίως στο φλοιό και τη σάρκα των ερυθρών και λευκών ποικιλιών, συμβάλλοντας στην αμαύρωση του χρώματος, καθώς οξειδώνονται μαζί με μη-φαινολικά μόρια. Από πλευράς, συγκέντρωσης, το π-κουμαρικό, το

καφεϊκό και το φερουλικό οξύ είναι οι επικρατέστερες φαινολικές ενώσεις που είναι παρούσες στους καρπούς κατά κύριο λόγο ως trans ισομερή, σε ελεύθερη μορφή με μικρές συγκεντρώσεις, αλλά και κυρίως εστεροποιημένα με τρυγικό οξύ, σχηματίζοντας εστέρες τρυγικού, όπως το καφταρικό οξύ, που είναι ιδιαίτερα οξειδώσιμα συστατικά του σταφυλικού χυμού (António Teixeira et al, 2013). Η σύνθεση των υδροξικιναμωμικών οξέων λαμβάνει χώρα κυρίως πριν την περίοδο της ωρίμανσης (Veraison). Αντίθετα κατά τη διάρκεια αυτής, η συγκέντρωσή τους μειώνεται, καθώς αυξάνεται ο όγκος των σταφυλιών και η αραιώση των διαλυμένων ουσιών, αν και το περιεχόμενο κάθε ρόγας παραμένει σχεδόν σταθερό (António Teixeira et al, 2013). Επιπλέον, τα υδροξικιναμωμικά οξέα παρά το γεγονός ότι συγκεντρώνονται κυρίως στη σάρκα των καρπών, είναι παρόντα και σε άλλους ιστούς, όπως το υπόδερμα και το μεσοκάρπιο, όπου μπορούν να συζευχθούν με μονογλυκοζίτες των ανθοκυανινών, σχηματίζοντας ακυλιωμένες ανθοκυάνες (António Teixeira et al, 2013).



Εικόνα 19: Πρότυπο κατανομής φαινολικών ενώσεων στους ιστούς των καρπών της αμπέλου (António Teixeira et al, 2013).

Σε αντίθεση με τα υδροξικιναμωμικά οξέα, τα επίπεδα των υδροξυβενζοϊκών οξέων και των παραγώγων τους, είναι συνήθως χαμηλά. Τα πιο διαδεδομένα υδροξυβενζοϊκά οξέα στους καρπούς της αμπέλου είναι, το γεντισικό οξύ, το σαλικυλικό οξύ, το γαλλικό οξύ, και το υδροξυβενζοϊκό οξύ, τα οποία βρίσκονται κυρίως στην ελεύθερη μορφή τους (António Teixeira et al, 2013). Το γεντισικό οξύ συσσωρεύεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, όπως και το σαλικυλικό οξύ, το οποίο σε μοριακό επίπεδο εμπλέκεται στην κυτταρική σηματοδότηση (António Teixeira et al, 2013). Αντίθετα το γαλλικό οξύ ανιχνεύεται σε μεγαλύτερες

συγκεντρώσεις και μάλιστα στα σπέρματα, όπου βρίσκεται συνήθως με τη μορφή εστέρων των φλαβονολών-3 (κατεχινών). Η παρουσία του γαλλικού οξέος είναι ιδιαίτερα σημαντική λόγω του ρόλου του ως πρόδρομο μόριο των υδρολυόμενων ταννινών (Ana Teixeira et al, 2014). Μια ακόμη τάξη των μη-φλαβονοειδών που έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον αν και υπάρχει σε μικρές ποσότητες στο κρασί, είναι τα στιλβένια (António Teixeira et al, 2013). Οι ενώσεις αυτές εμφανίζονται φυσικά σε ορισμένα φυτικά είδη, όπως και σ' αυτά του γένους *Vitis*. Συντίθενται στο φλοιό κατά την διάρκεια της ωρίμανσης (Veraison), με τα επίπεδά τους να αυξάνονται σε περιπτώσεις μόλυνσης ή λόγω απόκρισης στο αβιοτικό στρες. Το περιεχόμενο σε στιλβένια, διαφοροποιείται στους καρπούς των διάφορων ποικιλιών (António Teixeira et al, 2013). Κύριος εκπρόσωπος αυτής της οικογένειας, η ρεσβερατρόλη, εντοπίζεται στους φλοιούς και όχι στα γίγαρτα, η συγκέντρωση της οποίας κυμαίνεται από 1 έως 3mg/l (Ελένη Α. Συμεού, 2010).

Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, από πλευράς ανατομίας εντοπίζονται στο σταφύλι, κυρίως σε περιφερειακά στρώματα του περικαρπίου (φλοιού) και του περιβλήματος του σπόρου. Ειδικότερα τα περισσότερα από τα φλαβονοειδή του φλοιού, είναι άφθονα στα εσωτερικά τοιχώματα του υποδερμικού ιστού (António Teixeira et al, 2013). Εκεί ανιχνεύονται σε μεγαλύτερο βαθμό οι ανθοκυανίνες και οι προανθοκυανιδίνες (γνωστές και ως ταννίνες) και σε μικρότερο βαθμό οι φλαβαν-3-όλες και οι φλαβονόλες. Οι φλαβονόλες συγκεκριμένα, απαντώνται μόνο στο κλάσμα του φλοιού, ενώ η συγκέντρωσή τους γενικά ποικίλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των ποικιλιών (António Teixeira et al, 2013). Εντοπίζονται συνήθως υπό τη μορφή γλυκοζιτών, αλλά βρίσκονται και σε σημαντικές ποσότητες των εστέρων τους με το γλυκουρονικό οξύ (Ελένη Α. Συμεού, 2010). Οι τιμές τους κυμαίνονται από 0.018 mg έως 0.176 mg ανά g σταφυλιών, των οποίων το περιεχόμενο επηρεάζεται έντονα από περιβαλλοντικούς παράγοντες και ιδιαίτερα από την ηλιακή ακτινοβολία (António Teixeira et al, 2013). Η σύνθεση των φλαβονολών λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων ανάπτυξης του καρπού και ολοκληρώνεται κατά την ωρίμανση (Veraison) (António Teixeira et al, 2013). Από την άλλη πλευρά οι φλαβαν-3-όλες είναι η πιο άφθονη κατηγορία φαινολικών ενώσεων στις ρόγες των σταφυλιών. Η δομή τους είναι είτε μονομερής (κατεχίνες) είτε πολυμερής, σχηματίζοντας τις γνωστές προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι κατεχίνες είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα των φλαβαν-3-ολών και χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας ομάδας υδροξυλίου στην 3 θέση του δακτυλίου C (Ελένη Α. Συμεού, 2010). Οι πέντε πιο βασικές ενώσεις αυτών στα σταφύλια είναι τα ισομερή, (+) κατεχίνη, (-) επικατεχίνη, (+) γαλλοκατεχίνη, (-) επιγαλλοκατεχίνη και κατεχίνη-3-O-γαλλικό (António Teixeira et al, 2013). Αντίθετα οι προανθοκυανιδίνες, είναι μια διαφορετική ομάδα ενώσεων, που σχηματίζονται από την ένωση τριών έως δέκα μονάδων φλαβαν-3-ολών, που συνδέονται με C₄-C₆ και C₄-C₈ δεσμούς (António Teixeira et

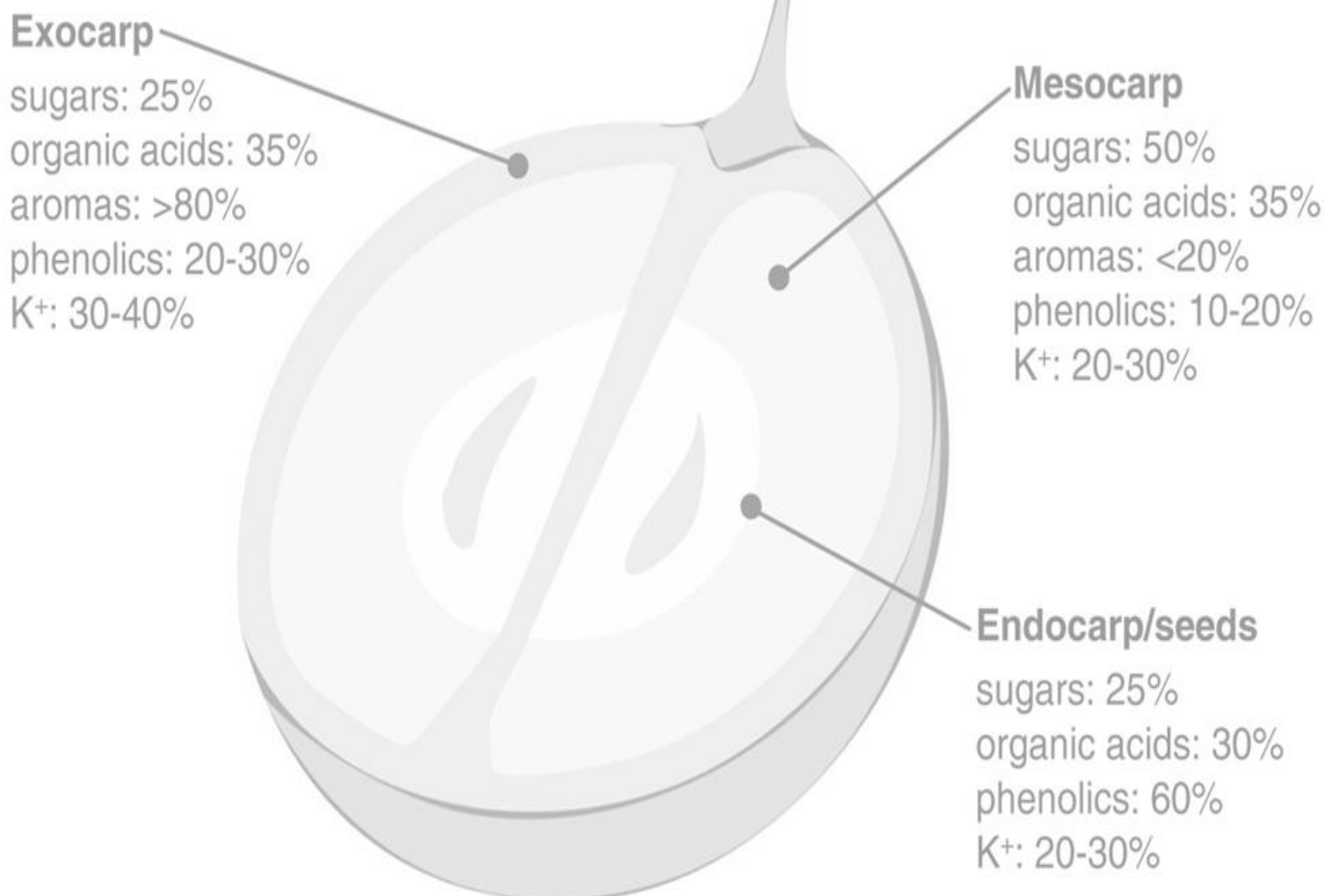
al, 2013). Αυτές οι φαινολικές ενώσεις είναι η πιο άφθονη κατηγορία διαλυτών πολυφαινολών στους καρπούς της αμπέλου. Το μέγεθός τους ποικίλει και μπορεί να εμφανίζονται είτε ως διμερή είτε ως πολυμερή με περισσότερες από 40 μονάδες (António Teixeira et al, 2013). Σχετικά με την κατανομή των κατεχινών και των προανθοκυανιδινών στο σταφύλι, πρέπει να αναφερθεί πως τα γίγαρτα περιέχουν τις περισσότερες κατεχίνες (Μ.Ο. 65%) και προανθοκυανιδίνες (Μ.Ο. 56%) (Ελένη Α. Συμεού, 2010). Τα ποσοστά αυτά είναι επί του συνόλου των κατεχινών και προανθοκυανιδινών, ενώ τα υπόλοιπα μοιράζονται εξίσου στους βοστρύχους και τους φλοιούς αφού ο χυμός δεν περιέχει σχεδόν καθόλου (Ελένη Α. Συμεού, 2010). Το ποσοστό των προανθοκυανιδινών των βοστρύχων είναι παρόμοιο με αυτό των φλοιών, όμως διαφέρει ριζικά η σύστασή τους. Σε αντίθεση με τους φλοιούς, οι προανθοκυανιδίνες στους βοστρύχους είναι ακυλιωμένες και έχουν ιδιαίτερα στυφή γεύση (Ελένη Α. Συμεού, 2010).

Compound	Level of synthesis a			Location	Berry phenological scale b			
	Skin	Flesh	Seed		Blooming	Green stage	Veraison	Ripening
<i>Nonflavonoids</i>								
Hydroxycinnamic acids	++	+++	++	Hypodermal cells and placental cells of the pulp; primarily in the vacuoles of mesocarp cells.	+++	+++	+	+
Hydroxybenzoic acids	+	-	++					
Stilbenes	+++	+	++	Berry skin and seeds.	-	+	++	+++
<i>Flavonoids</i>								
Flavonols	++	-	-	Dermal cell vacuoles of the skin tissue and cell wall of skin and seeds.	++	+	+++	++
Flavan-3-ols	++	+	+++	Specific vacuoles of hypodermal skin cells and seed coat soft parenchyma.	+	++	+++	++
Anthocyanins	+++	-*	-	Cell layers below the epidermis; storage confined to the vacuoles and cytoplasmic vesicles named anthocyanoplasts.	-	-	+	+++

Εικόνα 20: Φαινολικές Ενώσεις που παράγονται και συγκεντρώνονται στα σταφύλια (António Teixeira et al, 2013).

Επιπλέον οι προανθοκυανιδίνες εντοπίζονται στα κύτταρα του υποδερμικού ιστού, στο φλοιό της ρόγας και στο μαλακό παρέγχυμα του περιβλήματος κάθε σπέρματος (António Teixeira et al, 2013). Μάλιστα έχουν μεγαλύτερο μέσο μέγεθος στο φλοιό σε σχέση με τα γίγαρτα, καθώς είναι υπεύθυνες για συγκεκριμένες οργανοληπτικές ιδιότητες όπως η στυπτικότητα και η πικράδα (António Teixeira et al, 2013). Διαφοροποιήσεις όσον αφορά τη σύσταση ισχύουν και για τις κατεχίνες. Συγκεκριμένα οι βόστρυχοι περιέχουν σχεδόν αποκλειστικά (+)

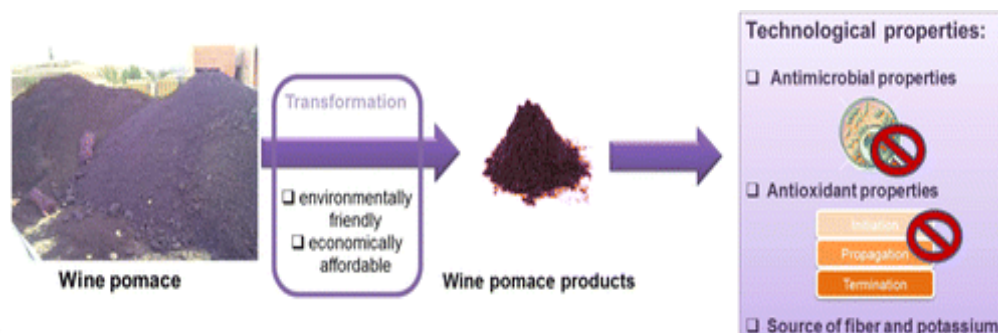
κατεχίνη, ενώ υψηλό είναι το ποσοστό της στους φλοιούς. Στα γίγαρτα η (-) επικατεχίνη συναγωνίζεται την (+) κατεχίνη, ενώ στους φλοιούς η (-) επικατεχίνη είναι σαφώς λιγότερη από την (+) κατεχίνη (Ελένη Α. Συμεού, 2010). Σε αντίθεση με τις προανθοκυανιδίνες η συσσώρευση των ανθοκυανινών στις ερυθρές ποικιλίες ξεκινά κατά τη Veraison και φτάνει στο μέγιστο επίπεδο, στα τελευταία στάδια της ωρίμανσης, όπου και η σύνθεσή τους τελικά σταματά (António Teixeira et al, 2013). Η παραγωγή τους λαμβάνει χώρα στο κυτοσόλιο των επιδερμικών κυττάρων, συν- εντοπίζονται με τις προανθοκυανιδίνες στο στρώμα του υποδερμικού ιστού και στη συνέχεια αποθηκεύονται στο χυμοτόπιο (António Teixeira et al, 2013). Καθώς τα σταφύλια ωριμάζουν καταλαμβάνουν όλο και μεγαλύτερο χώρο, προκαλώντας ζημιά στο κυτόπλασμα (Ελένη Α. Συμεού, 2010). Η συγκέντρωσή τους ακολουθεί θετική διαβάθμιση, από το εξωτερικό προς το εσωτερικό μέρος των σταφυλιών, με αποτέλεσμα τα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στη σάρκα να είναι περισσότερο χρωματισμένα σε σχέση με αυτά που είναι κοντά στην επιδερμίδα (Ελένη Α. Συμεού, 2010). Σε ορισμένες ποικιλίες και ιδιαίτερα στις μαύρες η συσσώρευσή τους στο φλοιό παραλληλίζεται με τη συγκέντρωσή τους στη σάρκα, με αποτέλεσμα τα σταφύλια να είναι πλούσια σε χρώμα (António Teixeira et al, 2013). Οι ανθοκυανίνες απαντώνται επίσης στα φύλλα, κυρίως στο τέλος της περιόδου ανάπτυξης, αν και στην περίπτωση αυτή η κατανομή τους είναι διαφορετική, αφού κυριαρχεί η κυανιδίνη (Ελένη Α. Συμεού, 2010).



Φυσικές Βιοδραστικές Ενώσεις στα Υποπροϊόντα της Οινοποίησης-Στέμφυλα

Το σταφύλι αποτελεί τη μεγαλύτερη καλλιέργεια φρούτου, σε όλο τον κόσμο (Jorge Domínguez et al, 2014). Χαρακτηριστικά, η ετήσια παραγωγή του σε παγκόσμιο επίπεδο ανέρχεται σε περίπου 70 εκατομμύρια τόνους (FAO, 2014) και το μεγαλύτερο μέρος αυτής (80%) χρησιμοποιείται για την παραγωγή κρασιού (Jorge Domínguez et al, 2014). Το κύριο υποπροϊόν της οινοποίησης είναι τα στέμφυλα. Τα στέμφυλα της οινοποιίας είναι το υπόλειμμα από την έκθλιψη των σταφυλιών για παραγωγή γλεύκους. Αποτελούνται από τους μίσχους, τα υπολείμματα της σάρκας, τους φλοιούς και τα σπέρματα των σταφυλιών, η μεταξύ των οποίων αναλογία εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία, τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, την ανάπτυξη των βοστρύχων και από τη μέθοδο έκθλιψης (Ι. Φεγγέρος, 1985). Σήμερα, παράγονται περίπου 9 εκατομμύρια τόνοι αυτού του οργανικού υπολείμματος, το οποίο αποτελεί το 20% (w/w) κατά μέσο όρο, του συνόλου των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κρασιού (Ana Teixeira et al, 2014). Το φυτοχημικό προφίλ αυτού του αγρο-βιομηχανικού υποπροϊόντος, υποστηρίζει τη χρήση του ως μια ενδιαφέρουσα πηγή βιοενεργών φυτοχημικών συστατικών (Ana Teixeira et al, 2014). Όσον αφορά τη γενική σύνθεση των στεμφύλων, το ποσοστό υγρασίας κυμαίνεται από 50% έως 72% ανάλογα με την ποικιλία των σταφυλιών και το στάδιο της ωρίμανσης τους. Επιπλέον τα αδιάλυτα υπολείμματα αυτού του υλικού, έχουν ένα περιεχόμενο λιγνίνης που κυμαίνεται από 16,8% έως 24,2% και ένα πρωτεϊνικό περιεχόμενο, μικρότερο από 4% (Ana Teixeira et al, 2014). Οι πολυμερείς ουσίες των κυτταρικών τοιχωμάτων (πολυσακχαρίτες), είναι οι κύριες πεπτικές ουσίες που υπάρχουν στα στέμφυλα και κυμαίνονται από 37% έως 54% (Ana Teixeira et al, 2014). Η κυτταρίνη είναι ο δεύτερος τύπος των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος που βρίσκεται σε αφθονία στα υποπροϊόντα της οινοποίησης, σε ποσοστά 27% έως 37%. Κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, ένα μέρος των φαινολικού περιεχομένου των σταφυλιών μεταφέρεται στο κρασί, αλλά ένα υψηλό ποσοστό παραμένει στα υποπροϊόντα και κυρίως στα στέμφυλα (L.F. Ribeiro et al, 2015). Ειδικότερα, κατά την ερυθρά οινοποίηση τα στέμφυλα εξαιρουμένων των βοστρύχων που διαχωρίζονται πριν την πίεση των σταφυλιών, συμμετέχουν στη ζύμωση του γλεύκους σε οίνο προκειμένου να εκχυλιστούν οι χρωστικές και άλλες ουσίες που επηρεάζουν θετικά τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου. Δηλαδή οι φλοιοί και οι σπόροι βρίσκονται σε επαφή για αρκετές ημέρες κατά τη ζύμωση του κρασιού, υπόκεινται έτσι σε μία απλή αλλά παρατεταμένη αιθανολική εξόρυξη, παρέχοντας στο κρασί υψηλή περιεκτικότητα σε φαινόλες. Παρ' όλα αυτά τα κατάλοιπα που απομένουν μετά τη ζύμωση, οι φλούδες, οι σπόροι και ο πυρήνας των σπόρων, εξακολουθούν να περιέχουν υψηλά επίπεδα πολυφαινόλων, με τις περισσότερες να διατηρούνται στο κεντρικό μέρος του φλοιού (Pinelo et al, 2006). Η ποιοτική και ποσοτική

κατανομή των φαινολικών ενώσεων στα στέμφυλα μπορεί να παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις, ανάλογα με πολλούς παράγοντες όπως την ποικιλία, τις εδαφοκλιματολογικές συνθήκες, την ωρίμανση, τη γεωγραφική περιοχή, τις τεχνικές αμπελοργαγίας και οινοποίησης (L.F. Ribeiro et al, 2015).



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

Πίνακας 2: Οι φαινολικές ενώσεις στα υποπροϊόντα οινοποίησης. Οι τιμές του πίνακα είναι εκφρασμένες σε mg/g (Pinelo et al, 2006).

Με βάση το πολυφαινολικό περιεχόμενο, πολλές μελέτες έχουν τονίσει την αντιοξειδωτική δράση αυτού του υποπροϊόντος, προτείνοντας τα στέμφυλα ως μια φυσική πηγή αντιοξειδωτικών (Ana Teixeira et al, 2014). Κατά την εξέταση των επιμέρους συστατικών τους, έχει βρεθεί πως τα γίγαρτα αποτελούν το 38%-52% του ξηρού υλικού (Ana Teixeira et al, 2014). Η σχετική τους αναλογία έχει εντοπιστεί και σε χαμηλότερο ποσοστό (15%), υποδηλώνοντας πως η τεχνική οινοποίησης, επηρεάζει την σύνθεση του τελικού υλικού. Τα γίγαρτα στα στέμφυλα αποτελούνται κατά (w/w) 40% από φυτικές ίνες, 60% από αιθέριο έλαιο, 11% από πρωτεΐνες, 7% από φαινολικές ενώσεις όπως τανίνες και άλλες ενώσεις όπως σάκχαρα και ανόργανα άλατα. Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στο (πολυ)φαινολικό περιεχόμενο στα γίγαρτα, καθώς αποτελεί το 60-70% του συνόλου των εκχυλίσιμων ενώσεων (Ana Teixeira et al, 2014). Από την άλλη πλευρά, οι φλοιοί των σταφυλιών αποτελούν το 65% των στεμφύλων, κατά μέσο όρο. Η περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις είναι υψηλή, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αν και η τελική τους απόδοση εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τις τεχνικές διαχείρισής τους (Ana Teixeira et al, 2014). Οι μίσχοι απομακρύνονται κατά

τη διάρκεια της οινοποίησης, για να αποφευχθεί η αρνητική τους επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού εξαιτίας της στυφής γεύσης που προσφέρουν (Ana Teixeira et al, 2014). Αποτελούν το 1,4-7,0% της πρώτης ύλης επεξεργασίας και η σύστασή τους χαρακτηρίζεται κυρίως από την παρουσία προανθοκυανιδινών. Ο μέσος όρος της ποσοστιαίας υγρασίας τους έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται από 55% έως 80%, με τη μεταβλητότητα να αποδίδεται στην ποικιλία του σταφυλιού (Ana Teixeira et al, 2014). Επιπλέον το περιεχόμενό τους σε αλκοολούχα αδιάλυτα κατάλοιπα είναι το 71%, κατά μέσο όρο, της ξηράς ουσίας, χωρίς να υπάρχουν διαφοροποιήσεις ανάμεσα στις λευκές και ερυθρές ποικιλίες (Ana Teixeira et al, 2014). Όσον αφορά τη φαινολική τους σύνθεση, οι μίσχοι έχει αποδειχθεί ότι περιέχουν φλαβαν-3-όλες, υδροξυκινναμωμικά οξέα, μονομερείς και oligομερείς φλαβονόλες, και στυλβένια. Από αυτή την άποψη οι φαινολικές ενώσεις στους μίσχους είναι περίπου το 5,8% επί του ξηρού βάρους.

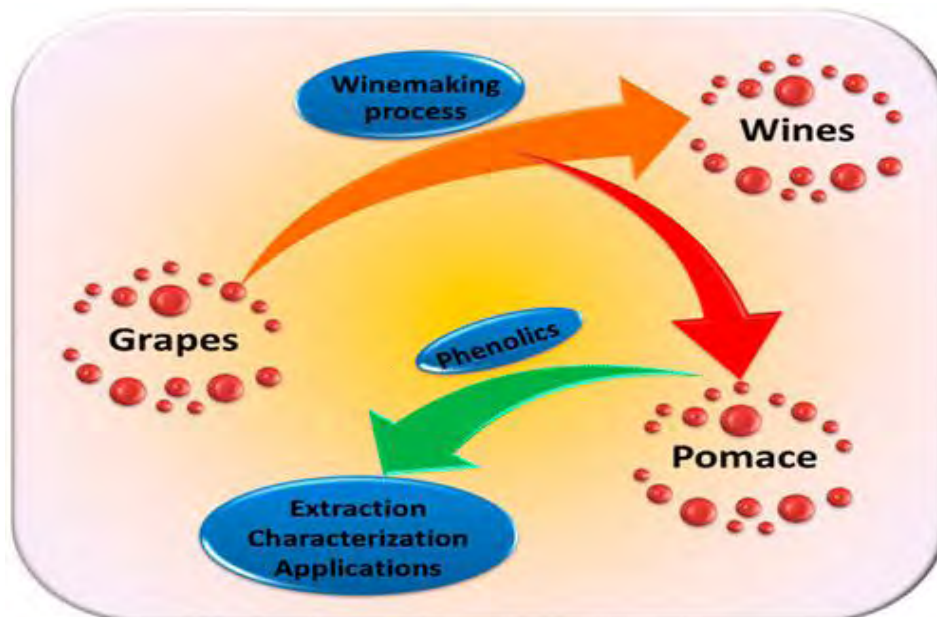


Εικόνα 21: Τα στέμφυλα της οινοποιίας είναι το υπόλειμμα από την έκθλιψη των σταφυλιών για παραγωγή γλεύκους.

Εναπόθεση των στεμφύλων στο περιβάλλον και τρόποι επαναξιοποίησής τους

Τα στέμφυλα είναι μια δυνητικά πολύτιμη πηγή, που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένα πλούσιο θρεπτικό οργανικό βελτιωτικό εδάφους. Ωστόσο, η υπερπαραγωγή τους έχει οδηγήσει σε ακατάλληλη διάθεση του υλικού στη γεωργική γη, καθώς η εφαρμογή της ακατέργαστης μορφής τους μπορεί να βλάψει τις καλλιέργειες, λόγω της απελευθέρωσης υπερβολικών ποσοτήτων φυτοτοξικών πολυφαινολών στο έδαφος που αντιστέκονται στη βιολογική αποδόμηση (Jorge Domínguez et al, 2014). Συγκεκριμένα, οι πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα να προκαλούν καθίζηση πρωτεϊνών, καθώς δεσμεύονται μ' αυτές, μέσω δεσμών υψηλής συγγένειας για τις ομάδες αμιδίου, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται σύμπλοκα που είναι αδύνατο να χρησιμοποιηθούν από τη βιοκοινότητα (Bustamande et al., 2008). Επιπλέον, λόγω της χημικής τους δραστηριότητας, επιδρούν άμεσα στους μικροοργανισμούς του εδάφους που εμπλέκονται στην ανοργανοποίηση- ακινητοποίηση του αζώτου, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του ανόργανου αζώτου, την ακινητοποίησή του και την αναστολή της βλάστησης (Bustamande et al., 2008). Επίσης, από την ανάλυση των υπολειμμάτων της βιομηχανίας οίνου, διαπιστώθηκε σ' αυτά όξινο pH, με τις τιμές του να κυμαίνονται από 3,8 έως 6,8, υψηλό οργανικό περιεχόμενο από 669-920 gkg⁻¹ που οφείλεται στην προσθήκη ουσιών και μικροοργανισμών όπως οι πρωτεΐνες και οι ζύμες κατά την οиноποίηση, μεγάλες συγκεντρώσεις μακροθρεπτικών και ιδίως καλίου (11,9-72,8 gkg⁻¹), λόγω καθίζησης του όξινου τρυγικού καλίου κατά τη διαδικασία της οиноποίησης, υψηλές συγκεντρώσεις πολυφαινολών (1,2-19,0 gkg⁻¹), χαμηλές συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων (Fe, Cu, Mn, Zn), όπως του Cu λόγω καθίζησης του θείου και του σιδήρου, αλλά και βαριών μετάλλων (κυρίως Pb). Όσον αναφορά τα βαρέα μέταλλα, τα επίπεδά τους παρουσίαζαν μεταβλητότητα, κάτι που μπορεί να οφείλεται στο έδαφος, στα εξαρτήματα του εξοπλισμού οиноποίησης και απόσταξης, στο υλικό των φιαλών, στα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στο αμπέλι, όπως ακόμα και στη βροχή ειδικά στην περίπτωση του Pb (Bustamande et al., 2008). Οι ιδιότητες αυτές είναι ασύμβατες με τις γεωργικές απαιτήσεις και ως εκ τούτου τα υποπροϊόντα αυτά θα πρέπει να υφίστανται κατάλληλη επεξεργασία πριν τη χρήση. Ειδικότερα, οι πολυφαινόλες μπορούν να ανακτηθούν και να χρησιμοποιηθούν ως λειτουργικές ενώσεις στη φαρμακευτική και στις βιομηχανίες τροφίμων, με το μεγαλύτερο ποσοστό τους (60%) στα στέμφυλα να προέρχεται κυρίως από τα γίγαρτα (Jorge Domínguez et al, 2014). Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την προώθηση της επαναχρησιμοποίησής τους και συνεπώς, ένα μικρό κλάσμα στεμφύλων που παράγεται από τη βιομηχανία του οίνου, χρησιμοποιείται για την παραγωγή αιθανόλης, για την εκχύλιση οργανικών οξέων, για την παραγωγή ελαίου από τα γίγαρτα του σταφυλιού (γίγαρτέλαιου),

για την εκχύλιση φλαβονοειδών (κυρίως ανθοκυανίνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες, φαινολικά οξέα, και ρεσβερατρόλη), που μπορούν να αξιοποιηθούν ως διατροφικά συμπληρώματα άλλα



Εικόνα 22: Οι πολυφαινόλες μπορούν να ανακτηθούν και να χρησιμοποιηθούν ως λειτουργικές ενώσεις στη φαρμακευτική και στις βιομηχανίες τροφίμων.

και για τη διατροφή των ζώων, παρ' όλο που το υψηλό τους περιεχόμενο σε λιγνίνη και σε μη εύπεπτους πολυσακχαρίτες τα καθιστά δύσπεπτα (Jorge Domínguez et al, 2014). Επιπλέον, οι ταννίνες, μια ειδική υποομάδα των πολυφαινολών, είναι σε θέση να σχηματίσουν αδιάλυτα σύμπλοκα με ιόντα δισθενούς μετάλλου, ιδιαίτερα σιδήρου (Fe), στο λεπτό έντερο, με αποτέλεσμα να μειώνεται η απορρόφησή τους (Anja Fiesel et al, 2015). Στην τελευταία περίπτωση, λόγω αυτής τους της ιδιαιτερότητας, απαιτούνται επιπρόσθετες διαδικασίες ζύμωσης, ώστε να αποφεύγονται οι γαστρεντερικές διαταραχές όταν αυτό το υλικό ενσωματώνεται σε τρόφιμα/ζωοτροφές, για την αξιοποίησή του (Ana Teixeira et al, 2014).

Final products	Treatment	Physicochemical characteristics	Uses
Grape skins, seeds and stems	Acidolysis of a polymeric proanthocyanidic fraction of grape pomace in the presence of cysteamine	Flavanol content	Source of flavanols
Grape seed extract (GSE)	Pre- and post-mortem use of grape seed in feeding experiment	Phenol content	Feedstuff for dark poultry meat
Grape skin pulp	Fermentation by <i>Aureobasidium pullulan</i>	Ethanol precipitate	Pullulan production
Grape seeds	Solid-state cultivation by <i>Trametes hirsuta</i>	Lignocellulosic content	Laccase production
Grape pomace	Solid-state cultivation by <i>Pleurotus</i> sp.	Pruning content, high phenolic components and total sugars	Feedstuff for animals

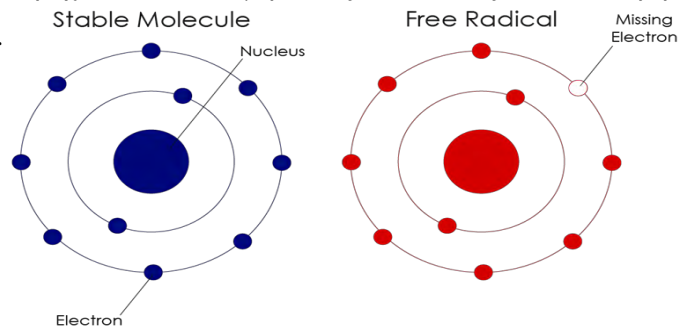
Πίνακας 3: Επεξεργασία αποβλήτων οινοποίησης, οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες και οι διαφορετικές τους χρήσεις (Ioannis S. Arvanitoyannis et al, 2005).

Ως ζωοτροφή, ορίζεται κάθε ύλη η οποία μετά την πρόσληψή και την πέψη της μπορεί να απορροφηθεί και να χρησιμοποιηθεί από τον οργανισμό του ζώου. Σήμερα, ένας από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζει την οικονομικότητα της κτηνοτροφικής παραγωγής είναι αναμφίβολα οι δαπάνες διατροφής των ζώων. Τούτο γίνεται περισσότερο κατανοητό αν λάβουμε υπόψη μας ότι το κόστος διατροφής των ζώων αντιπροσωπεύει το 60-70% του συνολικού κόστους των παραγομένων κτηνοτροφικών προϊόντων (Ι. Φεγγέρος, 1985). Στη χώρα μας, λόγω του ότι δεν έχουμε επάρκεια σε ζωοτροφές, γίνεται εισαγωγή από το εξωτερικό μεγάλου αριθμού ζωοτροφών, σε μεγάλες ποσότητες, με αποτέλεσμα την αύξηση του κόστους διατροφής. Για να είναι συμφέρουσα η χρήση των στεμφύλων στη διατροφή των ζώων, πρέπει το κόστος παραγωγής τους να είναι συμβατό με τη θρεπτική τους και τη γενικότερη διαιτητική τους αξία (Ι. Φεγγέρος, 1985). Ειδικότερα, όσον αφορά τη διαχείριση τους, τα στέμφυλα προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφή, θα πρέπει να συντηρηθούν ώστε να είναι δυνατή η εκμετάλλευσή τους καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Ένας τρόπος συντήρησης τους είναι η ενσίρωση, μέθοδος που εφαρμόζεται με επιτυχία σε άλλες οινοπαραγωγές χώρες (Ι. Φεγγέρος, 1985). Δεδομένου ότι οι δαπάνες της ενσίρωσης είναι σχετικά χαμηλές, απομένει να διερευνηθεί η θρεπτική αξία των στεμφύλων καθώς και των δυνατοτήτων που παρέχουν για τη χρήση τους στη διατροφή των ζώων. Η επί αυτού του θέματος η διεθνής βιβλιογραφία είναι πολύ περιορισμένη και όχι διεξοδική. Οι παλαιότερες εργασίες αναφέρονται στον προσδιορισμό της χημικής σύστασης των στεμφύλων, ενώ την τελευταία δεκαετία περιορίζονται σε διαπιστώσεις για τη χρήση των στεμφύλων χωρίς βαθύτερη διερεύνηση της συμπεριφοράς τους ως ζωοτροφή (Ι. Φεγγέρος, 1985).



Ελεύθερες Ρίζες και η Βιολογική τους σημασία

Ως ελεύθερη ρίζα (free radical) ορίζεται οποιοδήποτε άτομο, μόριο ή ιόν, που διαθέτει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους και είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη (Jenkins, 1988). Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια. Τα ηλεκτρόνια είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών, σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα, γύρω από τον οποίο περιφέρονται.



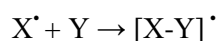
Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια σε κάθε τροχιακό, ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο και περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό, εμφανίζοντας μικρότερη ενεργειακή κατάσταση, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο 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. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με τους παρακάτω τρόπους:

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

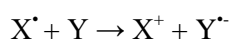
Ως βιολογικά ασταθή και δραστικά μόρια, οι ελεύθερες ρίζες τείνουν να "αποσπάσουν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια, με αποτέλεσμα την πρόκληση μιας σειράς αντιδράσεων στις οποίες παρατηρείτε μεταφορά ηλεκτρονίων, οι οποίες ονομάζονται οξειδοαναγωγικές (redox) (Halliwell & Gutteridge, 1990). Ως οξείδωση χαρακτηρίζεται η απώλεια ηλεκτρονίων από ένα άτομο ενώ αναγωγή η προσάρτησή τους σε αυτό. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους, οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες. Αν συμβεί αυτό, το μόριο που έχασε το ηλεκτρόνιό του μετατρέπεται σε νέα ρίζα η οποία με τη σειρά της "αποσπά" ηλεκτρόνιο με αντιπαράλληλη στροφορμή (spin) από άλλο μόριο κ.ο.κ.. Η αλυσιδωτή αυτή αντίδραση μπορεί να συνεχιστεί επί μακρόν. Το υπόβαθρο

για τη διεργασία αυτή αποτελεί η εγγενής τάση ατόμων, ιόντων, μορίων και γενικά ενεργειακών συστημάτων, φυσικά και των ριζών, να διατηρούνται στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας (ground state or atomic unexcited state) (Halliwell & Gutteridge, 1990). Οι ελεύθερες ρίζες λοιπόν, μπορούν να αντιδράσουν με μόρια ή άτομα με τους εξής τρόπους:

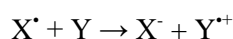
1. Προσθετικώς, όταν η ελεύθερη ρίζα συνδέεται με ένα μόριο ή άτομο (π.χ. προσθήκη της ρίζας OH[•] στη βάση γουανίνη του DNA):



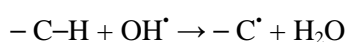
2. Αναγωγικώς, όταν η ελεύθερη ρίζα δρα ως αναγωγικός παράγοντας, παραχωρώντας το ασύζευκτό της ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο ή άτομο:



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



4. Αφαιρετικώς, όταν η ελεύθερη ρίζα αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από τον ανθρακικό σκελετό μιας οργανικής ένωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας αντίδρασης είναι η προσβολή των πλευρικών αλυσίδων λιπαρών οξέων από την ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου, με την οποία αρχίζει η σειρά αντιδράσεων της υπεροξειδωτικής των λιπιδίων, που είναι ο κύριος μηχανισμός πρόκλησης οξειδωτικών βλαβών σε βιολογικές μεμβράνες (Halliwell and Gutteridge, 1999).



Η δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών εξαρτάται από μόρια ή τις άλλες ρίζες στο περιβάλλον, από τη φύση (π.χ. πολικότητα) του περιβάλλοντος μέσου, ενώ έρευνες έχουν αποδείξει πως η δραστηριότητά τους εξαρτάται και από τη σχέση όγκου-επιφάνειας, καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως η ρίζα του υδροξυλίου (OH[•]) είναι η πιο δραστική (Gerogianni & Gourgoulianis, 2006). Επιπλέον, ο χρόνος ημιζωής τους είναι πολύ μικρός, κυμαίνεται από χιλιοστά του δευτερολέπτου έως νανοδευτερόλεπτα (Cheeseman & Slater, 1993).

Οι ελεύθερες ρίζες έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση της ζωής στη γη όταν με την μεσολάβησή τους, σχηματίστηκαν τα πρώτα αμινοξέα και νουκλεοτίδια από ανόργανα συστατικά πριν 3.5-4.000.000 χρόνια (J. Raymond, 2006). Στη συνέχεια η παραγωγή του οξυγόνου ως προϊόν μεταβολισμού των κυανοβακτηρίων και η τοξική του δράση στους

αναερόβιους οργανισμούς αποτέλεσε πίεση επιλογής για την ανάπτυξη μηχανισμών εξουδετέρωσης, για την εξέλιξη σε πολυκύτταρες δομές με κύρια πηγή ενέργειας τα μιτοχόνδρια και παράλληλα οδήγησε την ζωή από τα βάθη των ωκεανών στην επιφάνεια της γης (J. Raymond, 2006). Ελεύθερες ρίζες παράγονται συνεχώς σαν διαδικασία της φυσιολογικής αερόβιας ζωής στον ανθρώπινο οργανισμό προερχόμενες τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς πηγές (J. Raymond, 2006).

Ελεύθερη Ρίζα		Χρόνος ημιζωής	Κύριες επιδράσεις
Δραστικές μορφές οξυγόνου	ROS		
Ανιόν σουπεροξειδίου	$O_2^{\cdot-}$	10^{-5} sec	Οξειδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών, DNA βλάβη
Όζον	O_3	1μsec	
Μονήρες οξυγόνο	1O_2	10^{-9} sec	
Ρίζα υδροξυλίου	OH^{\cdot}	Stable	
Υπεροξείδιο υδρογόνου	H_2O_2	Stable	
Υποχλωριώδες οξύ	$HOCl$	10^{-6} sec	
Ρίζα αλκοξυλίου	RO^{\cdot}	7 sec	
Ρίζα υπεροξυλίου	RO_2^{\cdot}		
Ρίζα υδρουπεροξυλίου	RO_2H^{\cdot}		
Δραστικές μορφές αζώτου	RNS		
Μονοξειδίο αζώτου	NO^{\cdot}		Οξειδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών, DNA βλάβη
Διοξειδίο αζώτου	NO_2^{\cdot}	1-10 sec	
Νιτρικό υπεροξείδιο	$ONOO^{\cdot-}$	0.05	
Δραστικές μορφές θείου	RSS		
Ρίζα θείου	RS^{\cdot}		Οξειδωση πρωτεϊνών, DNA βλάβη, παραγωγή ROS

Πίνακας 4: Ταξινόμηση των ελεύθερων ριζών και οι κύριες επιδράσεις τους.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μια ετερογενής ομάδα μορίων. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα πρωτόνιο κι ένα ηλεκτρόνιο. Στις ελεύθερες ρίζες συγκαταλέγονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που προέρχονται από το οξυγόνο, οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCIS) που προέρχονται από το χλώριο. Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες ριζών μπορούν να προέρθουν από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (Giles & Jacob, 2002).

Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)

Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ) ή Reactive Oxygen Species (ROS), αναφέρεται σε ενώσεις που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων καθώς και σε οργανικές ρίζες ή ρίζες οξυγόνου και υπεροξειδία, που παράγονται από ενώσεις που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου. Στις ΔΜΟ ανήκουν οι ρίζες σουπεροξειδίου ή ανιόντος υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}), υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot}), αλκοξειδίου (RO^{\cdot}) και υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot}), ενώ περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), το υποβρωμιώδες οξύ ($HOBr$), το όζον (O_3) και το μονήρες οξυγόνο (1O_2). Το μόριο του οξυγόνου, που αναπνέουμε, στη βασική του (μη διεγερμένη) κατάσταση (ground-state O_2) εμπίπτει στον ορισμό της ελεύθερης ρίζας αφού διαθέτει δύο μονήρη (ή ασύζευκτα) ηλεκτρόνια με ίδια κατεύθυνσης στροφορμές (spin), που καταλαμβάνουν το καθένα ένα διαφορετικό μοριακό τροχιακό (E. Συντιγάκη, 2010). Η αφθονία του στα βιολογικά συστήματα, το καθιστά το σημαντικότερο παράγοντα δημιουργίας ελευθέρων ριζών στις αερόβιες μορφές ζωής.

Ελεύθερες Ρίζες (Free Radicals)	Μη-ρίζες (Non-radicals)
Ρίζα υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$, superoxide radical)	Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2 , hydrogen peroxide)
Ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot} , hydroxyl radical)	Υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$, hypochlorous acid)
Υπεροξυλική ρίζα (RO_2^{\cdot} , peroxy radical)	Όζον (O_3)
Αλκοξυλική ρίζα (RO^{\cdot} , alkoxy radical)	Μονήρες οξυγόνο (1O_2 , singlet oxygen).
Υδροϋπεροξυλική ρίζα (HO_2^{\cdot} , hydroperoxy radical)	Υπεροξνιτρώδες ($ONOO^{\cdot}$, peroxy nitrite)

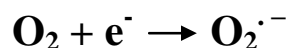
Πίνακας 5: Δραστικές μορφές οξυγόνου (Halliwell and Gutteridge, 1999).

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

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

Κύρια Είδη Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS)

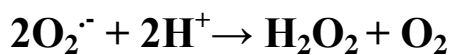
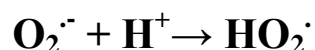
Η ρίζα του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), είναι ένα ανιόν αρνητικά φορτισμένο και σχετικά αδιαπέραστο από μεμβράνη. Όπως προαναφέρθηκε, παράγεται από την αναγωγή του οξυγόνου από ένα e^- σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Ενδοκυτταρικά, μπορεί να σχηματιστεί από την απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων στο O_2 από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του μιτοχονδρίου, από τα ανοσολογικά κύτταρα της φλεγμονής ως μέρος της διαδικασίας κατά την οποία αντιστέκονται στην εισβολή μικροοργανισμών, ενώ μικρές ποσότητες που δρουν σαν σηματοδοτικά μόρια, παράγονται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένων, των ενδοθηλιακών κυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των ινοβλαστών. Η ρίζα του υπεροξειδίου παράγεται επίσης από τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης, του NADPH κατά τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ (Ε. Κερασιώτη, 2014).

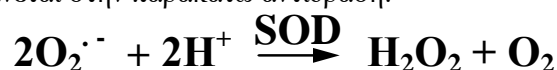
Το $O_2^{\cdot-}$ είναι ρίζα με πολύ μικρό χρόνο ημίσειας ζωής (περίπου 10^{-6} s), πολύ δραστική και κυτταροτοξική, καθώς η αυξημένη παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ μπορεί να καταστρέψει τη δομή πρωτεϊνών, λιπιδίων και DNA.

Υδροϋπεροξειδική ρίζα (HO_2^{\cdot}), παράγεται κατά την πρόσληψη ενός πρωτονίου από το ανιόν του υπεροξειδίου, με την καταλυτική δράση της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD). Κατά τη διάρκεια της ηρεμίας το μεγαλύτερο μέρος του $O_2^{\cdot-}$ που παράγεται από τα μιτοχόνδρια ανάγεται από τη SOD σε HO_2^{\cdot} και σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα.



Η υδροϋπεροξειδική ρίζα, λόγω της μειωμένης πολικότητας της και του μεγαλύτερου χρόνου ημιζωής σε σχέση με το ανιόν του υπεροξειδίου, μπορεί να δρα κυτταροτοξικά σε θέσεις απομακρυσμένες από τον τόπο παραγωγής της, καθώς μπορεί να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες (Powers & Lennon, 2000).

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), είναι ένα δραστικό μόριο, σταθερό, με μεγάλο χρόνο ημιζωής μέσα στο κύτταρο (περίπου 10 λεπτά) και μηδενικό ηλεκτρικό φορτίο, γεγονός που το καθιστά ικανό να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες και να προκαλεί βλάβες σε βιολογικά συστήματα αρκετά μακριά από τον τόπο παραγωγής του (Close & McArdle, 2007). Σχηματίζεται από οξειδάσες, όπως οι οξειδάσες των αμινοξέων, η οξειδάση της γλυκόζης και η οξειδάση του γλυκολικού, οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο. Σχηματίζεται επίσης με αυτο-οξειδοαναγωγή της ρίζας υπεροξειδίου όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση:



Ενώ μπορεί να παραχθεί και από την υδροϋπεροξειδική ρίζα μαζί με το ανιόν υπεροξειδίου, με την καταλυτική δράση της SOD είτε απευθείας από την υδροϋπεροξειδική ρίζα (HO_2^{\cdot}).



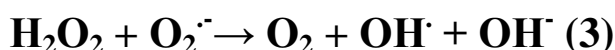
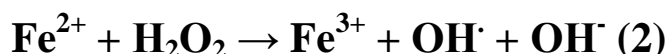
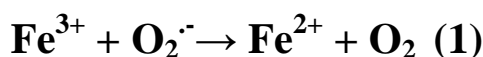


Το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι κυτταροτοξικό αλλά θεωρείται ένας σχετικά ασθενής οξειδωτικός παράγοντας (Ε. Κερασιώτη, 2014). Η κυτταροτοξικότητά του εμφανίζεται μέσω της ικανότητάς του να παράγει ελεύθερες ρίζες μέσω μεταλλο-καταλυόμενων αντιδράσεων όπως η αντίδραση Fenton:



Επιπλέον, το H_2O_2 μπορεί να ενεργοποιεί διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια αντιδρώντας με πολλά διαφορετικά κυτταρικά μόρια του οργανισμού και να οδηγεί στην παραγωγή διάφορων παραγόντων, ακόμα και αντιμικροβιακών, όπως το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), είναι η πιο δραστική ρίζα που συναντάμε στα βιολογικά συστήματα, λόγω της ιδιότητάς της να προκαλεί αλυσιδωτές αντιδράσεις με άλλα μόρια (δευτερογενείς ρίζες), γεγονός που την καθιστά πολύ επικίνδυνη. Ο χρόνος ημιζωής της *in vivo* είναι σύντομος, περίπου 10^{-9} sec, που σημαίνει πως όταν παράγεται αντιδρά κοντά στην περιοχή σχηματισμού της (Marian Valko et al., 2006). Η ρίζες υδροξυλίου παράγονται όταν σε συνθήκες στρες, η περίσσεια ριζών υπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$) δρουν οξειδωτικά, απελευθερώνοντας το δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}) από μόρια στα οποία είναι δεσμευμένος (κυρίως σε πρωτεΐνες όπως φερριτίνη, λακτοφερρίνη και αιμοσφαιρίνη), με αποτέλεσμα την αντίδρασή του με το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Marian Valko et al., 2006). Ειδικότερα, πρώτος ο Fenton υποστήριξε πως η ρίζα υδροξυλίου παράγεται από την οξείδωση του δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) σε τρισθενή από το υπεροξειδίο του υδρογόνου (αντίδραση 2) (Fenton, 1984), ενώ αργότερα η αντίδραση που πρότεινε τροποποιήθηκε από τους Haber-Weiss, για να συμπεριλάβει την αναγωγή του δισθενούς σιδήρου από το ανιόν του υπεροξειδίου (αντίδραση 1 και 3):

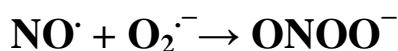


Η αντίδραση καταλύεται παρουσία και άλλων μετάλλων μετάπτωσης όπως ο μονοσθενής χαλκός (Cu^+) και το δισθενές κοβάλτιο (Co^{2+}), αλλά το επικρατέστερο μέταλλο είναι ο δισθενής σίδηρος. Τέλος, η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που

αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις της ρίζας υδροξυλίου είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου (Halliwell and Gutteridge, 1999).

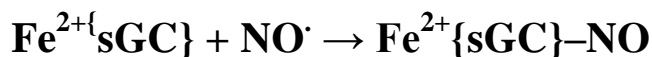
Δραστικές Μορφές Αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS)

Στις δραστικές μορφές αζώτου, περιλαμβάνονται οι ελεύθερες ρίζες στις οποίες το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο είναι τοποθετημένο σε άτομο του αζώτου, όπως το μονοξειδίο του αζώτου (NO[•]) και το διοξειδίο του αζώτου (NO₂[•]), καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες και/ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες. Το μονοξειδίο του αζώτου (NO[•]), είναι ένα μικρό μόριο που διαθέτει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και γι' αυτό δρα ως ελεύθερη ρίζα. Παράγεται βιολογικά στους ιστούς, από το αμινοξύ L-αργινίνη, μέσω των συνθετασών του μονοξειδίου του αζώτου (NOSs). Υπάρχουν τρεις τύποι συνθετασών: η νευρωνική NOS (nNOS), η ενδοθηλιακή NOS (eNOS) και η επαγωγίμη NOS (iNOS) που κυρίως βρίσκεται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις (Marian Valko et al., 2006). Αυτά τα ένζυμα μεταβολίζουν την L-αργινίνη σε NO και L-κιτρουλλίνη, μέσω μιας οξειδωτικής αντίδρασης πέντε ηλεκτρονίων, χρησιμοποιώντας την NADPH. Το NO[•], είναι μια άφθονη δραστική ρίζα που δρα ως σημαντικό οξειδωτικό μόριο στην βιολογική σηματοδότηση σε μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών φυσιολογικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένων της νευροδιαβίβασης, της ρύθμιση της πίεσης του αίματος, τους μηχανισμούς άμυνας και τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος (Marian Valko et al., 2006). Ο χρόνος ημιζωής του είναι μόνο μερικά δευτερόλεπτα σε ένα υδάτινο περιβάλλον, ενώ έχει μεγαλύτερη σταθερότητα σε συνθήκες με χαμηλότερη συγκέντρωση οξυγόνου (χρόνος ημιζωής > 15s). Επιπλέον δεδομένου ότι είναι υδρόφιλο και λιπόφιλο μόριο, το NO[•] διαχέεται εύκολα στο κυτταρόπλασμα και μέσω των πλασματικών μεμβρανών. Στο εξωκυτταρικό περιβάλλον αντιδρά με το οξυγόνο και το H₂O για το σχηματισμό νιτρικών και νιτροδών ανιόντων, ενώ επηρεάζει τη νευροδιαβίβαση και τη συναπτική πλαστικότητα στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Σε συνθήκες φλεγμονής, το NO[•] αντιδρά με τη ρίζα υπεροξειδίου (O₂^{•-}), παράγοντας ένα πιο δραστικό οξειδωτικό μόριο, το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου (ONOO⁻), έναν ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα, που μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA, μείωση των ομάδων θειόλης και οξείδωση των λιπιδίων (Marian Valko et al., 2006).



Ο ρυθμός μεταβολής αυτής της αντίδρασης έχει πολύ μεγάλη τιμή, σε σχέση με άλλες αντιδράσεις του NO[•] (τρεις φορές πιο γρήγορη από την αυτοοξειδοαναγωγή του O₂^{•-} προς παραγωγή H₂O₂ και ακόμη πιο γρήγορη από την αντίδραση του NO με πρωτεΐνες της αίμης), κάτι που υποδεικνύει πως η τοξική δράση του συνδέεται πρωτίστως με την ικανότητά του να

συνδυάζεται με τα ανιόντα υπεροξειδίου. Τέλος, το μονοξειδίο του αζώτου συνδέεται άμεσα και με ορισμένα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης. Στην πραγματικότητα, πολλές φυσιολογικές του επιδράσεις, ασκούνται ως αποτέλεσμα τις σύνδεσής του στο Fe^{2+} , στις ομάδες αίμης του ενζύμου διαλυτή γουανιλική κυκλάση (sGC), με αποτέλεσμα την παραγωγή του $Fe^{2+}-NO$, ως προϊόν (Marian Valko et al., 2006).



Η υπερπαραγωγή των δραστικών μορφών του αζώτου σε συνδυασμό με την αδυναμία του οργανισμού να τις εξουδετερώσει και να τις εξαλείψει, μπορεί να οδηγήσει σε αντιδράσεις νιτροσυλίωσης που συχνά αλλάζουν τη δομή των πρωτεϊνών και αναστέλλουν τη φυσιολογική λειτουργία τους (Marian Valko et al., 2006).

Πηγές Παραγωγής Ελευθέρων Ριζών

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και γενικότερα οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται στα κύτταρα δια μέσου διάφορων φυσικών και βιοχημικών διαδικασιών, στις οποίες η διάσπαση των ομοιοπολικών δεσμών, έχει ως αποτέλεσμα τα μόρια, τα άτομα ή τα ιόντα που θα προκύψουν να έχουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στοιβάδα και να είναι χημικά ασταθή (Halliwell & Gutteridge, 2007). Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται στον οργανισμό από ενδογενείς και εξωγενείς πηγές (Close & McArdle, 2007; Halliwell & Gutteridge, 2007).

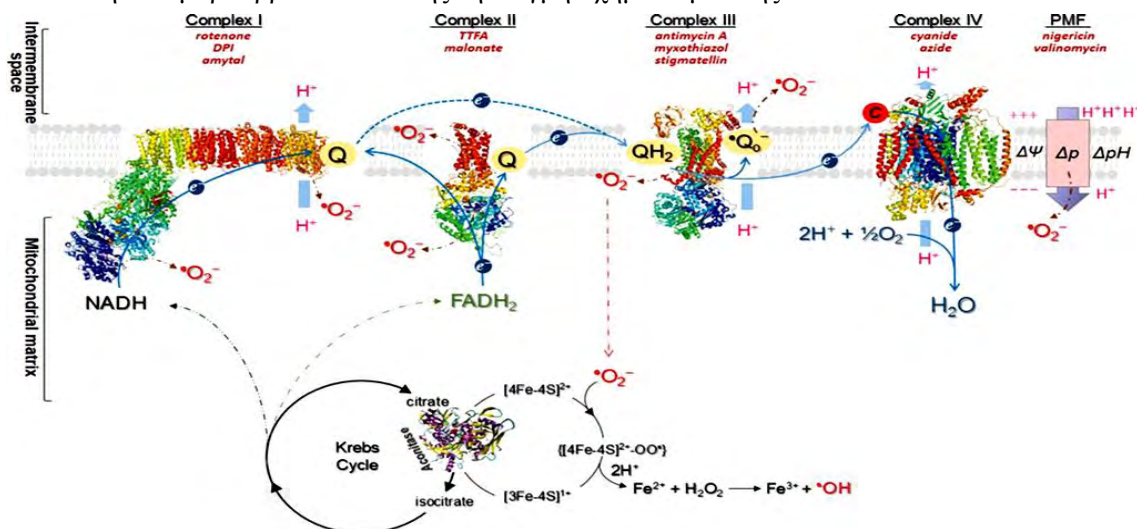
Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Οι ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών, επιτρέπουν την παραγωγή και το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών στο εσωτερικό του κυττάρου, την απελευθέρωσή τους στη γύρω περιοχή και τη δυνατότητα να δράσουν ενδοκυτταρικά. Ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα τα οποία χρησιμοποιούν οξυγόνο για την λειτουργία τους. Οι κύριες πηγές παραγωγής ROS σε επίπεδο κυττάρου είναι:

1) ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS) / ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ

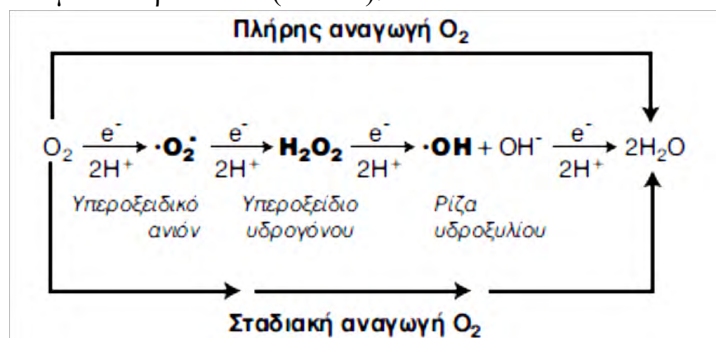
Το 95% του οξυγόνου που καταναλώνει ο οργανισμός χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια, η οποία αποθηκεύεται υπό μορφή δεσμών υψηλής ενέργειας, στο μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate, ATP), με τη διεργασία της "οξειδωτικής φωσφορυλίωσης" (N. Παπαγαλάνης, 2014). Η παραγωγή του ATP, προωθείται με μεταφορά ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα όπου το καθένα λειτουργεί διαδοχικά ως δέκτης και δότης ηλεκτρονίων και ταυτόχρονη μετατροπή του NADH και του FADH₂, στην ανηγμένη μορφή τους, που χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη σταθερότητα. Η "**αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων**" (electron transport chain) αποτελείται από τρία συμπλέγματα

πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (integral membrane proteins): το σύμπλεγμα NADH διϋδρογενάσης [NADH dehydrogenase complex (I)], το σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c [cytochrome c reductase complex (III)] και το σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c [cytochrome c oxidase complex (IV)], καθώς και δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ubiquinone και cytochrome c), τα οποία μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο (N. Παπαγαλάνης, 2014). Τελικός σταθμός των μεταφερομένων ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο (O_2) το οποίο ανάγεται (προσθήκη ηλεκτρονίων) και παρουσία και πρωτονίων (ιόντων υδρογόνου) σχηματίζεται νερό (H_2O). Αυτό αφορά το 95-99% του οξυγόνου. Εντούτοις, ιδίως από τα συμπλέγματα I και III, λόγω διαρροής ηλεκτρονίων (1-3%), διαφεύγουν μικρές ποσότητες μονήρους οξυγόνου (1O_2 , singlet oxygen) και υπεροξειδίου (O_2^-). Ειδικότερα, στο σύμπλεγμα I, η κύρια θέση διαρροής ηλεκτρονίων στο οξυγόνο φαίνεται να είναι τα συμπλέγματα σιδήρου-θείου και στο σύμπλεγμα III φαίνεται να είναι η Q_{10} ημικίννη (Muller et al., 2004). Παρ' όλα αυτά, τόσο το 1O_2 όσο και το O_2^- , εξουδετερώνονται από τοπικά αντιοξειδωτικά συστήματα που υπάρχουν στη θεμέλια ουσία: την υπεροξειδική δισμουτάση που περιέχει μαγνήσιο (MnSOD), η οποία μετατρέπει το υπεροξείδιο σε H_2O_2 , το σύστημα θεωρεδοξίνης-περοξυρεδοξίνης (theoredoxin-peroxyredoxin) και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), τα οποία μετατρέπουν το υπεροξείδιο σε H_2O (N. Παπαγαλάνης, 2014). Ένα μικρό ποσοστό του H_2O_2 , όπως και το παραγόμενο σε άλλους ιστούς, διαφεύγει στο κυτταρόπλασμα και κινητοποιεί συγκεκριμένες σηματοδοτικές οδούς. Όπως προαναφέρθηκε, το H_2O_2 αποτελεί αναμφίβολα ένα ασθενές οξειδωτικό αλλά αρκετά επικίνδυνο αφού συμμετέχει στον σχηματισμό της εξαιρετικά δραστηκής ρίζας $OH\cdot$ (αντίδραση Fenton) που αντιδρά με οποιοδήποτε μόριο βρεθεί δίπλα της τη στιγμή σχηματισμού της.



Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση της μεταφοράς ηλεκτρονίων και παραγωγής ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια: **c**= κυτόχρωμα, **Q** = συνένζυμο Q, **QH₂** = ανημένο συνένζυμο **Q₁₀**, **Q_o⁻** = οξειδωμένο συνένζυμο **Q₁₀**, **NADH** = ανημένο νικοτιναμίδο-αδενίνουοκλεοσίδιο, **O₂⁻** = ιόν σουπεροξειδίου, **FADH₂**= οξειδωμένη μορφή του διουοκλεοτιδίου φλαβίνης αδενίνης (FAD) (Yeong-Renn Chen and Jay L. Zweier, 2014).

Εκτός των μιτοχονδρίων, στον υπόλοιπο οργανισμό η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου γίνεται σταδιακά, δηλαδή σε κάθε βήμα προστίθεται και ένα ηλεκτρόνιο, με συνέπεια το σχηματισμό των ενδιάμεσων προϊόντων (Εικόνα).



Εικόνα 24: Αναγωγή του μοριακού οξυγόνου εκτός μιτοχονδρίων (N. Παπαγαλάνης, 2014).

Τα μιτοχόνδρια, αποτελούν την μεγαλύτερη πηγή ελεύθερων ριζών του οργανισμού. Ο ρυθμός παραγωγής ελευθέρων ριζών στην αναπνευστική αλυσίδα καθορίζεται από την ανάγκη του οργανισμού σε ενέργεια, από τη μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου, από την ανάγκη για θερμορύθμιση, από άλλους παράγοντες που ποικίλουν κατά την άσκηση (Close & McArdle, 2007; Halliwell & Gutteridge, 2007), καθώς και από τη βλάβη των μιτοχονδρίων (N. Παπαγαλάνης, 2014).

II) ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΣΤΑ ΥΠΕΡΟΞΕΙΣΩΜΑΤΙΑ

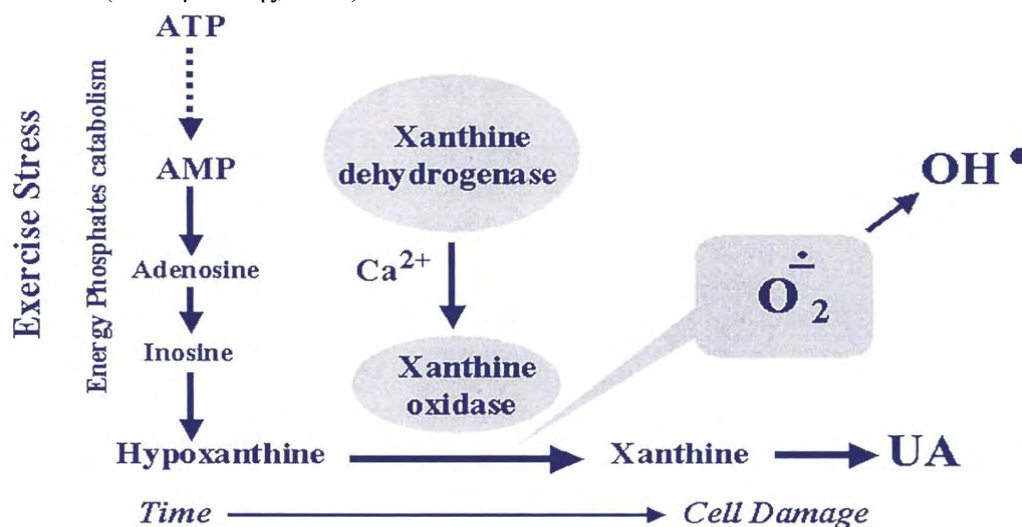
Τα υπεροξεισωμάτια, είναι κυτταρικά οργανίδια που συμμετέχουν σε πολλές μεταβολικές διεργασίες, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενέργειας με τη μορφή θερμότητας (Michael Schrader, 2006). Σ' αυτές περιλαμβάνονται η βιοσύνθεση φωσφολιπιδίων, το οξειδωτικό κομμάτι της οδού φωσφορικών πεντοζών, ο μεταβολισμός πουρινών και πολυαμινών, η οξείδωση αμινοξέων και η β-οξείδωση της μακράς αλυσίδας των λιπαρών οξέων. Πολλά από τα εξειδικευμένα ένζυμα που είναι υπεύθυνα γι' αυτά τα μονοπάτια λειτουργούν ως οξειδάσες (φλαβοπρωτεΐνες), με αποτέλεσμα την παραγωγή H₂O₂. Κύρια διεργασία σχηματισμού H₂O₂ στα υπεροξεισωμάτια, είναι β-οξείδωση των λιπαρών οξέων (Michael Schrader, 2006). Τα λιπαρά οξέα στο εσωτερικό των υπεροξεισωματίων οξειδώνονται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο αφαιρείται ένα ζευγάρι ατόμων υδρογόνου από το ενεργοποιημένο μόριο του λιπαρού οξέος και στη συνέχεια τα δύο άτομα υδρογόνου προσλαμβάνονται από το O₂ για να σχηματισθεί το H₂O₂. Η **ακετυλ-CoA οξειδάση (ACOX)** καταλύει το πρώτο και καθοριστικό ενζυμικό στάδιο της β-οξείδωσης των λιπαρών οξέων, ενώ διαθέτει μια προσθετική ομάδα δινουκλεοτιδίου αδενίνης φλαβίνης (FAD) που συνδέεται μη ομοιοπολικά με το ενεργό της κέντρο και είναι υπεύθυνη για την μεταφορά των ατόμων υδρογόνου. Ανάμεσα στα ένζυμα που συμβάλλουν στην παραγωγή των ROS στα υπεροξεισωμάτια, είναι και η **οξειδάση της ξανθίνης (XO)**, η οποία είναι κυρίως υπεύθυνη για την παραγωγή υπεροξειδίου (O₂⁻).

Enzymes in peroxisomes that generate ROS		
Enzyme	Substrate	ROS
(1) Acyl-CoA oxidases		
(a) Palmitoyl-CoA oxidase	Long chain fatty acids	H ₂ O ₂
(b) Pristanoyl-CoA oxidase	Methyl branched chain fatty acids	H ₂ O ₂
(c) Trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase	Bile acid intermediates	H ₂ O ₂
(2) Urate oxidase	Uric acid	H ₂ O ₂
(3) Xanthine oxidase	Xanthine	H ₂ O ₂ , O ₂ ^{•-}
(4) D-amino acid oxidase	D-Proline	H ₂ O ₂
(5) Pipecolic acid oxidase	L-pipecolic acid	H ₂ O ₂
(6) D-aspartate oxidase	D-aspartate, N-methyl-D-aspartate	H ₂ O ₂
(7) Sarcosine oxidase	Sarcosine, pipecolate	H ₂ O ₂
(8) L-alpha-hydroxy acid oxidase	Glycolate, lactate	H ₂ O ₂
(9) Poly amine oxidase	N-Acetyl spermine/ spermidine	H ₂ O ₂
(10) Nitric oxide synthase	L-Arginine	•NO

Πίνακας 6: Ένζυμα των υπεροξεισωματίων που συμμετέχουν στην παραγωγή των ROS (Michael Schrader, 2006).

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ

Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) απαμινώνεται σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP) εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται λόγω της σύσπασης του μυοκαρδίου. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή, το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ, μια αντίδραση που καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύεται από σχηματισμό του υπεροξειδίου (O₂^{•-}) (Παπαγαλάνης, 2014). Το O₂ λειτουργεί ως δέκτης ηλεκτρονίων στην παραπάνω αντίδραση, η οποία έχει ως απαραίτητη προϋπόθεση η XO να μετατραπεί από την ανηγμένη στην οξειδωμένη της μορφή από μία ενδοκυτταρική πρωτεάση που ενεργοποιείται από το Ca²⁺ (Παπαγαλάνης, 2014).



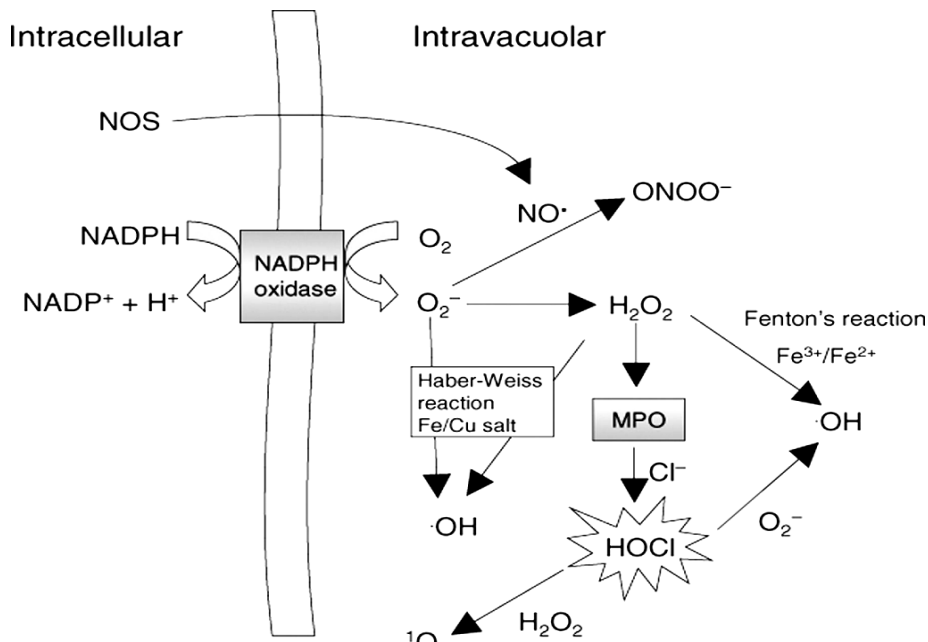
Εικόνα 25: Η έκρηξη παραγωγής ελευθέρων ριζών, κυρίως του υπεροξειδίου (O₂^{•-}) και της ρίζας υδροξυλίου (OH[•]), που παρατηρείται κατά την ισχαιμία και επαναϊμάτωση των ιστών.

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται εν μέρει στην ισχαιμία, κυρίως όμως στην άμεση μετά-ισχαιμική περίοδο και προκαλούν σοβαρές οξειδωτικές βλάβες στους ιστούς, λόγω της εκτεταμένης λιπιδικής υπεροξειδωσης που προκαλείται στις κυτταρικές μεμβράνες. Το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης παρατηρείται μετά από χειρουργικές επεμβάσεις, μετά από ισχαιμικό σοκ και κατά τη διάρκεια της άσκησης (Παπαγαλάνης, 2014).

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΦΑΓΟΚΥΤΩΣΗ

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος με φαγοκυτταρική λειτουργία (ουδετερόφιλα, μακροφάγα και πολυμορφοπύρρηνα λεμφοκύτταρα), όταν έρθουν σε επαφή με μικρόβια, αυξάνουν απότομα και σε πολύ μεγάλο βαθμό την κατανάλωση οξυγόνου, ένα φαινόμενο που ονομάζεται «αναπνευστική έκρηξη», με αποτέλεσμα να παράγουν ποσότητες ανιόντος του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και της ρίζας του υδροξυλίου (OH^{\cdot}) (Παπαγαλάνης, 2014). Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών επιτελείται με έναν πολύπλοκο ενζυμικό μηχανισμό ο οποίος βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των φαγοκυττάρων, κυρίως των λευκοκυττάρων, και ονομάζεται **οξειδάση του νικοτινάμιδο αδένινο δινουκλεοτιδίου (NADPH-oxidase)**. Οι NADPH οξειδάσες είναι μια οικογένεια ενζύμων που αποτελείται μέχρι σήμερα από 7 γνωστά ισόμορφα και είναι κατανεμημένες σε μια ποικιλία ιστών, ενώ η έκφρασή τους ρυθμίζεται σε επίπεδο μεταγραφής τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (Παπαγαλάνης, 2014). Οι πέντε από αυτές έχουν ως κεντρική καταλυτική μονάδα την NADPH οξειδάση (NOX), και αναφέρονται ως NOX-1, NOX-2, NOX-3, NOX-4 και NOX-5, και οι δύο υπόλοιπες την διπλή (dual) οξειδάση και αναφέρονται ως DUOX-1 και DUOX-2. Το υπεροξείδιο είναι το προϊόν των NOX1, NOX2 και NOX5 ενώ οι οξειδάσες NOX4, DUOX1 και DUOX2 παράγουν H_2O_2 . Η διέγερση των φαγοκυττάρων και η ενεργοποίηση του παραπάνω ενζυμικού μηχανισμού προκαλείται από ένα μεγάλο αριθμό ουσιών με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας σειράς αλληλοδιαδοχικών φαινομένων που οδηγούν στη φωσφορυλίωση των κυτοπλασματικών υπομονάδων, τη μεταφορά τους στη μεμβράνη και την ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης (Παπαγαλάνης, 2014). Η αναγωγή του O_2 σε $O_2^{\cdot-}$ πραγματοποιείται με την πρόσληψη ηλεκτρονίων τα οποία προέρχονται από NADPH. Ειδικά για τις NOX4, DUOX1 και DUOX2, λόγω της στερεοχημικής τους διαμόρφωσης, το παραγόμενο υπεροξείδιο καθυστερεί να απελευθερωθεί από το μόριο της οξειδάσης ώστε να συντίθεται και ένα δεύτερο μόριο υπεροξειδίου πριν αποσπασθεί το πρώτο, και να δημιουργείται H_2O_2 με τη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD). Οι παραπάνω δύο ελεύθερες ρίζες που τελικά παράγονται δεν είναι αρκετά δραστικές ώστε να εξουδετερώσουν επαρκώς τα μικρόβια που εισέρχονται στον οργανισμό ή να αντιμετωπίσουν τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Για το λόγο αυτό εκλύεται το ένζυμο **μυελοϋπεροξειδάση (MPO)**, μία λυσοσωμική πρωτεΐνη που υπάρχει στα κοκκία των πολυμορφοπυρήνων ουδετερόφιλων (PMN), η οποία χρησιμοποιεί

το H₂O₂ σαν υπόστρωμα για την οξειδωση ιόντων χλωρίου σε υποχλωριώδες οξύ (hypochlorous acid, HOCl) (Παπαγαλάνης, 2014).

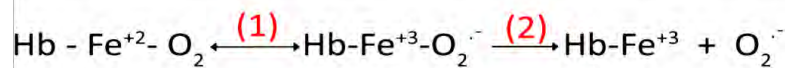


Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση ενεργοποίησης της «αναπνευστικής έκρηξης» (Kevin Kavanagh and Emer P. Reeves, 2004).

Εκτός από το υποχλωριώδες οξύ που απελευθερώνεται από το φαγόσωμα για την καταστροφή των μικροβίων, η MPO είναι υπεύθυνη, για την παραγωγή υδροξυλικής ρίζας ($\cdot\text{OH}$), μοριακού χλωρίου, μονήρους οξυγόνου (singlet oxygen, $^1\text{O}_2$) και όζοντος (O_3). Τα μόρια αυτά δεν περιορίζονται μόνο στο φαγόσωμα, αλλά επίσης διοχετεύονται στον εξωκυττάριο χώρο και προκαλούν οξειδωτική βλάβη πρωτεϊνών και λιπιδίων (Παπαγαλάνης, 2014).

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΥΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Περίπου το 3% της **αιμοσφαιρίνης** στον οργανισμό οξειδώνεται καθημερινά από οξυαιμοσφαιρίνη ($\text{Fe}^{+2}\text{-O}_2$) σε μεθαιμοσφαιρίνη (Fe^{+3}) και ανιόν υπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Ο μηχανισμός αυτής της συνεχούς αυτοοξειδωσης μπορεί απλοϊκά να περιγραφεί ως εξής (Δ. Γαλάρης, 2015):



Σε μια πρώτη φάση, λαμβάνει χώρα ένας διαχωρισμός μεταξύ των ηλεκτρονίων του Fe^{2+} και του O_2 . Αυτό ενδέχεται μερικές φορές να οδηγήσει στη διάσπαση και, συνεπώς, στην απελευθέρωση ενός μορίου $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Δ. Γαλάρης, 2015). Ως εκ τούτου, τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι συνεχώς εκτεθειμένα σε μια σταθερή δημιουργία $\text{O}_2^{\cdot-}$ και κατά συνέπεια, για την εξουδετέρωσή του απαιτούνται τα κατάλληλα ένζυμα. Μερικές ανώμαλες μορφές αιμοσφαιρίνης, όπως οι α - και οι β -αλυσίδες, οι οποίες συσσωρεύονται στις θαλασσαιμίες,

οξειδώνονται πιο γρήγορα και πιο εύκολα, με συνέπεια τα ερυθροκύτταρα των ασθενών αυτών να είναι εκτεθειμένα σε ισχυρότερο οξειδωτικό στρες (Δ. Γαλάρης, 2015).

Από την άλλη πλευρά, η **αυτοοξειδωση της μυοσφαιρίνης** μπορεί με ανάλογο τρόπο να απελευθερώσει H_2O_2 . Στη συνέχεια το H_2O_2 μπορεί να συμμετάσχει σε αλυσιδωτές αντιδράσεις με αποτέλεσμα τη δημιουργία ιδιαίτερα δραστικών δευτερογενών ριζών. Οι παραπάνω αντιδράσεις είναι ιδιαίτερα έντονες κατά τη διάρκεια της άσκησης σε σχέση με την κατάσταση ηρεμίας (Μ. Καλαφάτη, 2014).

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΑΠΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΥΤΟΟΞΕΙΔΩΣΗΣ

Η αυτοοξειδωση είναι μία αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση με το οξυγόνο η οποία εξελίσσεται με το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών και διακρίνεται στα εξής τρία στάδια: έναρξη, διάδοση, τερματισμός (Μ. Καλαφάτη, 2014). Πολλά μόρια με σημαντικούς βιολογικούς ρόλους, όπως για παράδειγμα οι **τετραϋδροπτερίνες**, οι **θειολικές ενώσεις** (περιέχουν μια $-SH$ ομάδα), ο νευροδιαβιβαστής **ντοπαμίνη**, οι ορμόνες **αδρεναλίνη**, **νοραδρεναλίνη** και **L-DOPA** (διυδροξυφαινυλαλανίνη), οι **ανηγμένες φλαβοενώσεις** (FMNH₂ και FADH₂) και πολλές άλλες, παρουσία O_2 , έχουν την ικανότητα αυτοοξειδωσης, σχηματίζοντας $O_2^{\cdot-}$ (Μ. Καλαφάτη, 2014). Το σχηματιζόμενο $O_2^{\cdot-}$, στη συνέχεια, συμβάλλει στην περαιτέρω οξείδωση των εν λόγω ενώσεων σε μια σειρά πολύπλοκων αντιδράσεων. Οι αντιδράσεις αυτές ευνοούνται παρουσία ιόντων μετάλλων μετάπτωσης, κυρίως σιδήρου και χαλκού (Μ. Καλαφάτη, 2014).

Έναρξη: R^* (ελεύθερη ρίζα)

Διάδοση: $R^* + O_2 \rightarrow ROO^*$ (ρίζα υπεροξειδίου)

$ROO^* + RH \rightarrow R^* + ROOH$

Τερματισμός: $R^* + R^* \rightarrow R-R$

$ROO^* + R^* \rightarrow ROOR$

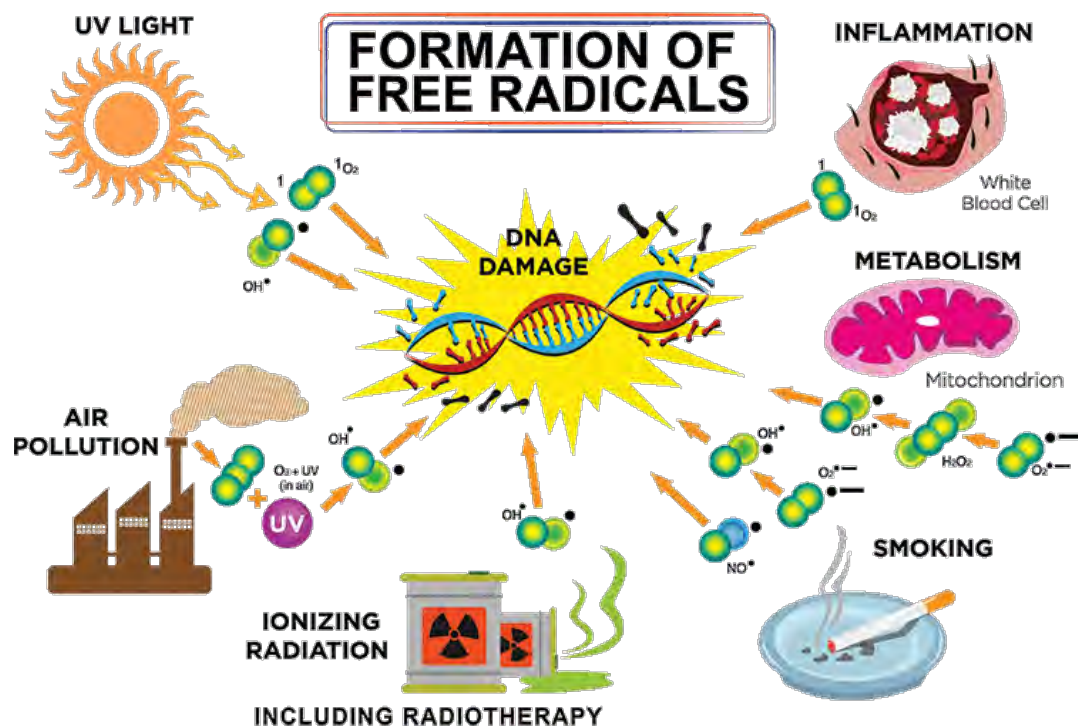
$ROO^* + ROO^* \rightarrow ROOR + O_2$ (αδρανή προϊόντα)

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΑΠΟ ΟΞΕΙΔΩΑΝΑΓΩΓΙΚΗ ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟ ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, μία διαδικασία που πραγματοποιείται αρκετά συχνά εξαιτίας της μικρής ποσότητας ενέργειας που απαιτείται για να πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις. Στις ουσίες, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα για οξειδοαναγωγική ανακύκλωση, περιλαμβάνονται διάφορες ομάδες χημικών μορίων όπως οι **κινάσες** και οι **αρωματικές αμίνες**. Επιπρόσθετα, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν ως παραπροϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων που καταλύονται από οξειδωτικά ένζυμα, όπως οι **λιποξυγονάσες**, οι **κυκλοοξυγονάσες**, οι **υπεροξειδάσες** και οι **αφυδρογονάσες** (Cheeseman & Slater, 1993).

Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται διάφοροι, ετερογενείς παράγοντες όπως είναι η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου, η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αλλά και η άσκηση. Πολλά φάρμακα, επίσης, ευθύνονται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά και άλλες ξеноβιοτικές ουσίες όπως τοξίνες, εντομοκτόνα και το αλκοόλ. Η διατροφή μπορεί επίσης να παίζει σημαντικό ρόλο (Cheeseman & Slater, 1993).



Εικόνα 27: Συνοπτική παρουσίαση των ενδογενών και εξωγενών πηγών παραγωγής ελεύθερων ριζών.

Οξειδωτικό Στρες και Μοριακοί Μηχανισμοί Πρόκλησης Βλαβών σε Κυτταρικά Συστατικά

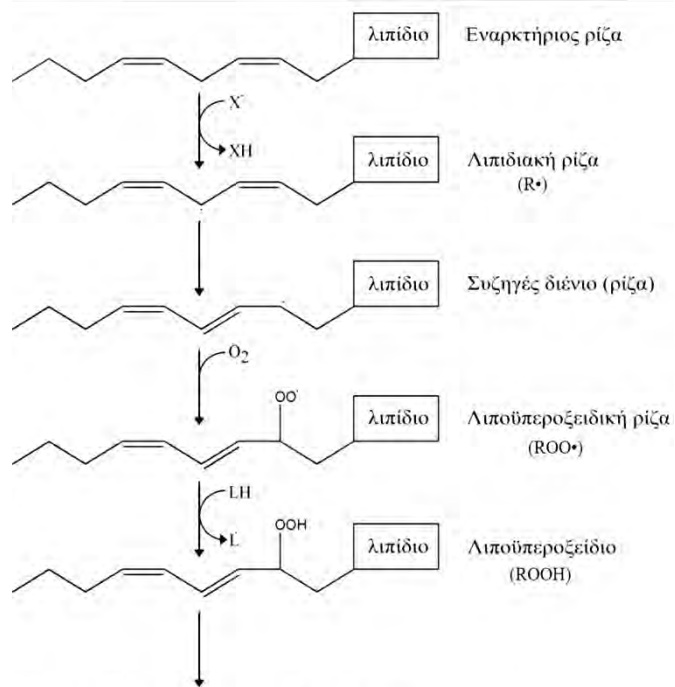
Οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες. Χαρακτηριστικά, δρουν ως σηματοδοτικά μόρια και συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία (Reid, 2001), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μυϊκή συστολή και την έκφραση γονιδίων, ενώ συνεισφέρουν και στο ανοσοποιητικό σύστημα, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης (Finaud et al., 2006). Επιπλέον, οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ενζυμική ενεργοποίηση, την αποτοξικοποίηση φαρμάκων και την αναπλήρωση του γλυκογόνου (Jenkins, 1988).

Ωστόσο, η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών σχετίζεται με αρνητικές επιδράσεις για τον ανθρώπινο οργανισμό, λόγω της οξειδωτικής και τοξικής του δράσης. Γι' αυτό η συμβίωση του οργανισμού μαζί τους έχει διασφαλισθεί με την ανάπτυξη μηχανισμών

εξουδετέρωσής τους, τα αντιοξειδωτικά. Η διαταραχή της ισορροπίας προ-οξειδωτών και αντιοξειδωτικών προς όφελος των πρώτων, καταλήγοντας σε οξειδωτικές βλάβες (oxidative damage), ονομάζεται **οξειδωτικό στρες (oxidative stress)** (Sies et al., 1991).

Όλα τα βασικά συστατικά των κυττάρων (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες) αποτελούν στόχο των δραστικών ελευθέρων ριζών. Ο καλύτερα μελετημένος μοριακός μηχανισμός οξείδωσης κυτταρικών συστατικών είναι αυτός της **λιπιδιακής υπεροξείδωσης**, που αφορά κυρίως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) που είναι συνδεδεμένα στα φωσφολιπίδια, τα βασικά συστατικά των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών (Δ. Γαλάρης, 2015).

Πρόκειται για μια κυκλικά ανατροφοδοτούμενη αλυσιδωτή διαδικασία, η οποία, εάν αρχίσει και δεν ανασταλεί εγκαίρως, μπορεί να οξειδώσει όλο το βιολογικό υλικό. Το έναυσμα της υπεροξείδωσης μπορεί να προκληθεί από οποιαδήποτε ελεύθερη ρίζα, αρκεί να είναι τόσο δραστική, ώστε να μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου (H) από μια μεθυλομάδα. Η απόσπαση του ατόμου του υδρογόνου έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας νέας ελεύθερης ρίζας στο αντίστοιχο άτομο άνθρακα



Διάσπαση και δημιουργία διαφόρων προϊόντων (κυρίως αλδευδών) αλλά και δημιουργία νέων ελευθέρων ριζών.

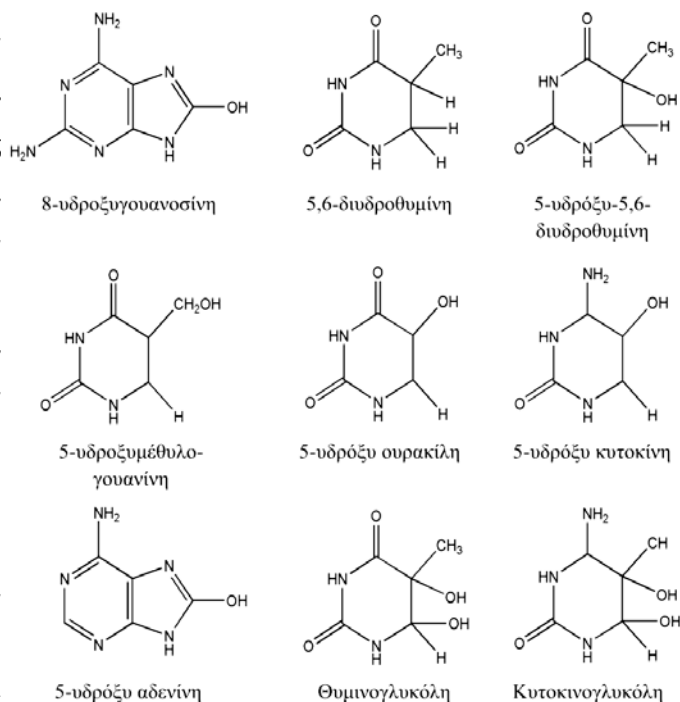
Εικόνα 28: Αλυσιδωτές αντιδράσεις υπεροξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Δ. Γαλάρης, 2015).

Η ρίζα του λιπαρού οξέος που δημιουργείται είναι πολύ ασταθής, με αποτέλεσμα τον γρήγορο ανασυνδυασμό της με ηλεκτρόνια από τους διπλανούς διπλούς δεσμούς και τον σχηματισμό αφενός συζυγών διενίων (conjugated dienes, αλληλουχία διπλού-μονού-διπλού δεσμών) και αφετέρου μιας νέας ελεύθερης ρίζας στο αντίστοιχο άτομο άνθρακα του διπλού δεσμού. Η νέα ελεύθερη ρίζα είναι σχετικά πιο σταθερή και προλαβαίνει να αντιδράσει με μοριακό οξυγόνο, το οποίο συνήθως υπάρχει άφθονο στο περιβάλλον, δημιουργώντας μια ρίζα υπεροξειδίου (ROO•). Η ρίζα αυτή, με τη σειρά της, έχει την ικανότητα να αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, δημιουργώντας μ' αυτόν τον τρόπο μια νέα ελεύθερη ρίζα και ένα υπεροξειδίο του λιπαρού οξέος (ROOH) (Δ. Γαλάρης, 2015). Η έκθεση των λιπιδικών υπεροξειδίων σε ιόντα Fe^{+2} ή Cu^{+2} του μεμβρανικού περιβάλλοντος μπορεί να προκαλέσει την αποικοδόμησή τους σε μια πληθώρα προϊόντων (εποξειδία, κορεσμένες αλδεύδες, κετόνες, υδρογονάνθρακες, μαλονική διαλδεύδη και

ισοπροστάνες), που είναι τοξικά και ευθύνονται για μεγάλο μέρος των βιοφυσικών και βιοχημικών διαταραχών. Σε γενικές γραμμές, τα αποτελέσματα της υπεροξειδωσής των λιπιδίων στις κυτταρικές μεμβράνες συνίστανται κυρίως στη μείωση της ρευστότητας και στην αύξηση της διαπερατότητάς τους σε μόρια όπως το Ca^{2+} και τα H^+ , καθώς και στην απενεργοποίηση μεμβρανικών ενζύμων (Δ. Γαλάρης, 2015).

Το DNA μπορεί να υποστεί έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών οξειδωτικών βλαβών, ανάλογα με τους παράγοντες που τις προκαλούν. Η οξειδωτική τροποποίηση του DNA μπορεί να αφορά τη σχάση των αλυσίδων (μονών και διπλών), ανταλλαγή αδελφών χρωματιδίων (sister chromatid exchange), διασυνδέσεις του τύπου DNA-DNA ή DNA-

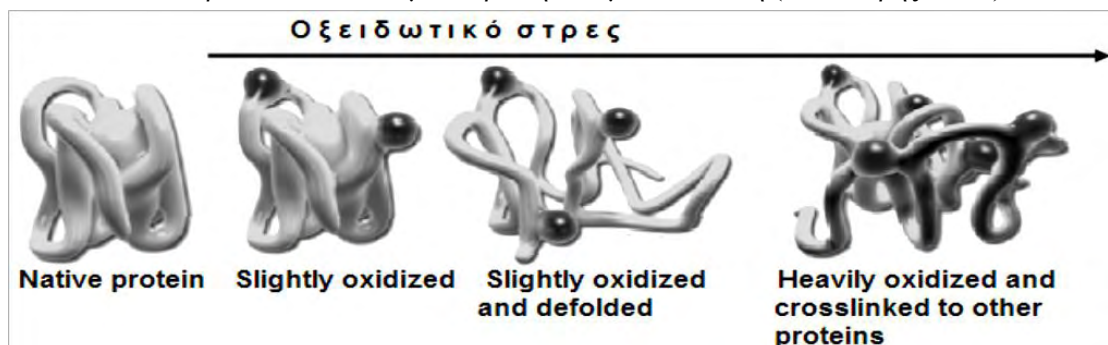
πρωτεΐνης και τροποποιήσεις των βάσεων, με αποτέλεσμα διαταραχές κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, της μεταγραφής και της μετάφρασης των πρωτεϊνών αλλά και την πρόκληση μεταλλάξεων, οι οποίες τελικά ενδέχεται να οδηγήσουν στην εμφάνιση και την εξέλιξη παθολογικών καταστάσεων ή ακόμα και στον θάνατο (Δ. Γαλάρης, 2015). Το ποσοστό των οξειδωτικών βλαβών στο DNA, ακόμα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, είναι αρκετά υψηλό.



Εικόνα 29: Μερικά από τα προϊόντα οξείδωσης των βάσεων του DNA (Δ. Γαλάρης, 2015).

Υπολογίζεται ότι σε κάθε χρονική στιγμή μία βάση στις 130.000 είναι τροποποιημένη οξειδωτικά. Οι βλάβες στο μιτοχondριακό DNA φαίνεται να είναι πολύ περισσότερες και υπολογίζονται σε μία τροποποιημένη βάση ανά 8.000. Τα μόρια του RNA είναι, επίσης, πολύ πιο ευαίσθητα στην οξείδωση από τα μόρια του DNA (Δ. Γαλάρης, 2015). Οι παρατηρήσεις αυτές θα πρέπει να συνδέονται με το γεγονός ότι τα μόρια του μιτοχondριακού DNA και του RNA δεν είναι οργανωμένα σε συμπαγή διάταξη, ενώ επιπλέον το μιτοχondριακό DNA βρίσκεται πλησίον της αναπνευστικής αλυσίδας, η οποία θεωρείται η κύρια πηγή δημιουργίας δραστικών μορφών οξυγόνου (Δ. Γαλάρης, 2015). Σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη, οι ρίζες του υδροξυλίου ($OH\cdot$) αποτελούν την κύρια αιτία για την πρόκληση οξειδωτικών βλαβών στο DNA, προσβάλλοντας τόσο τις αζωτούχες βάσεις, όσο και τον ιστό της δεοξυριβόζης. Αν και είναι δυνατόν να τροποποιηθούν οξειδωτικά και οι τέσσερις βάσεις του

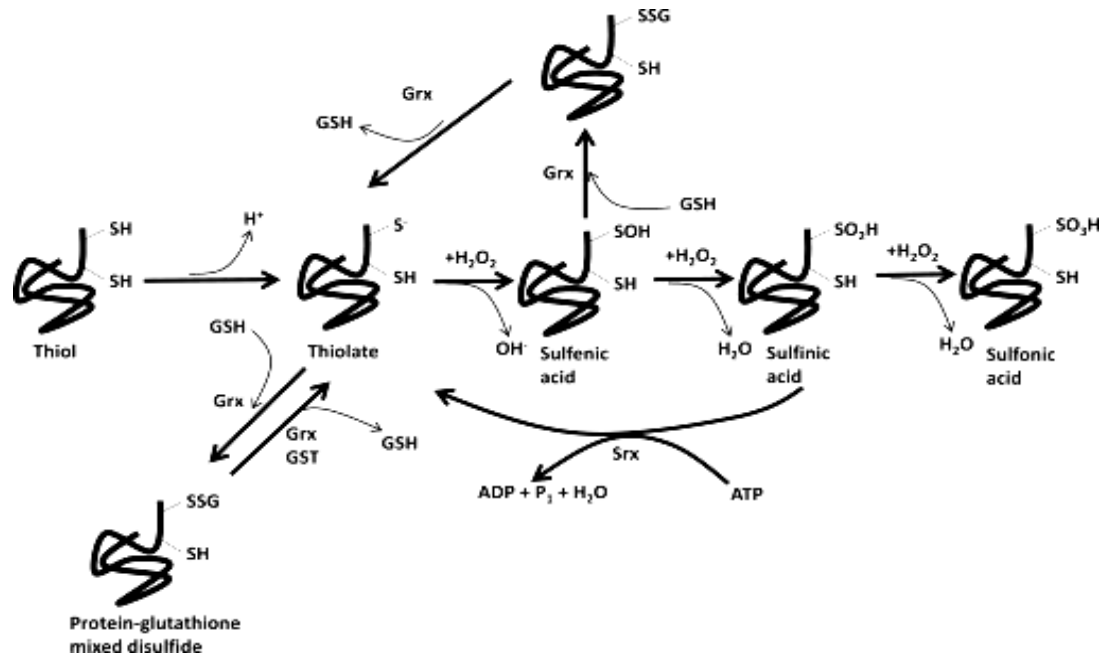
DNA, οι πυραμίδες κυτοσίνη και ειδικά η θυμίνη είναι εξαιρετικά ευαίσθητες σε τέτοιου είδους τροποποιήσεις. Το οξειδωμένο DNA μπορεί να επιδιορθωθεί επί τόπου (in situ). Μη επαρκής επιδιόρθωση του έχει ως αποτέλεσμα, ανάλογα με την ένταση του φαινομένου, την ενσωμάτωση μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό, με αποτέλεσμα τον μετασχηματισμό του και τελικά τον κυτταρικό θάνατο είτε με νέκρωση είτε με απόπτωση (Δ. Γαλάρης, 2015).



Εικόνα 30: Το οξειδωτικό στρες και οι επιπτώσεις του στην πρωτεϊνική δομή. (Jung et al., 2007).

Οι **πρωτεΐνες** αποτελούν στόχους οξείδωσης ανάλογα με τα κατάλοιπα αμινοξέων που περιέχει η καθεμιά. Τα αμινοξέα κυστεΐνη, μεθειονίνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη και ιστιδίνη είναι πιο ευαίσθητα σε οξειδωτικές τροποποιήσεις σε σύγκριση με τα υπόλοιπα (Δ. Γαλάρης, 2015). Οι οξειδωτικές τροποποιήσεις καταλοίπων αμινοξέων στις πρωτεΐνες, εκτός από τις βλαπτικές επιπτώσεις που μπορεί να έχουν, επιτελούν και φυσιολογικούς ρόλους, συμμετέχοντας στη διαδικασία μεταγωγής σημάτων εντός των κυττάρων (redox signaling). Οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι δυνατόν να υποστούν σημαντικές οξειδωτικές τροποποιήσεις χωρίς σοβαρές επιπτώσεις στη λειτουργικότητά τους. Μόνο όταν θιγούν απαραίτητα αμινοξέα ή προσθετικές ομάδες στο ενεργό τους κέντρο (ή σε αλλοστερικά κέντρα), επηρεάζεται η γενικότερη λειτουργία τους (Stadtman, 2006). Το H_2O_2 και το O_2^- έχουν περιορισμένη ικανότητα οξείδωσης πρωτεϊνών, εκτός ορισμένων εξαιρέσεων, με σημαντική φυσιολογική σημασία. Χαρακτηριστικά, το O_2^- μπορεί να αντιδράσει με προσθετικές ομάδες πρωτεϊνών που αποτελούνται από σύμπλοκα Fe-S. Οι αντιδράσεις αυτές είναι σημαντικές, διότι απελευθερώνουν ιόντα σιδήρου, τα οποία στη συνέχεια καταλύουν τη δημιουργία εξαιρετικά δραστικών ελευθέρων ριζών (αντίδραση Fenton). Επιπλέον, η οξείδωση ορισμένων ευαίσθητων θειολικών ομάδων σε κατάλοιπα κυστεΐνης, από το H_2O_2 , αποτελεί το έναυσμα για τη μεταγωγή μιας πλειάδας διαφορετικών σημάτων στα κύτταρα (Brewer, et al., 2015). Από την άλλη πλευρά, η μη ελεγχόμενη οξειδωτική τροποποίηση ενζύμων, υποδοχέων, πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος, πρωτεϊνών μεταφοράς ιόντων κ.τ.λ. μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση ανωμαλιών στη γενική λειτουργία του οργανισμού. (Δ. Γαλάρης, 2015). Οι επιπτώσεις της δημιουργίας ελευθέρων ριζών σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη εξαρτώνται από: α) την περιεκτικότητα της πρωτεΐνης σε αμινοξέα ευαίσθητα σε οξείδωση από τη δράση ελευθέρων ριζών, β) το πόσο σημαντικά

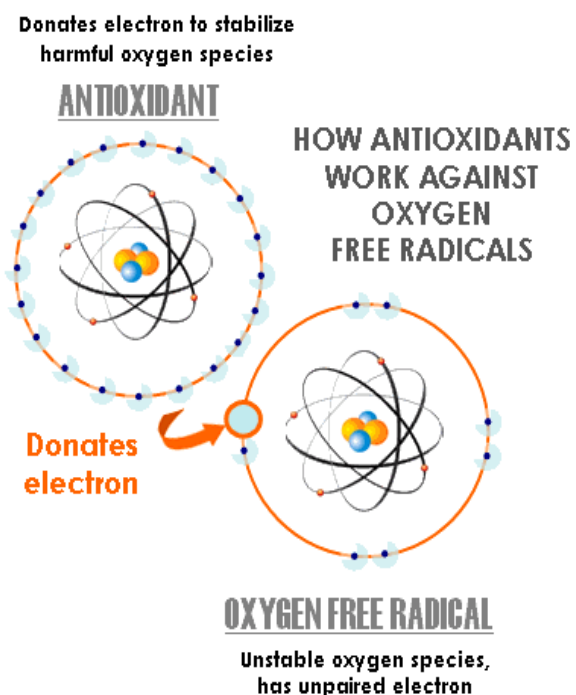
είναι αυτά τα αμινοξέα για τη δράση της πρωτεΐνης και γ) την ικανότητα των κυττάρων να διορθώνουν τις βλάβες στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη (Δ. Γαλάρης, 2015).



Εικόνα 31: Ρύθμιση της λειτουργίας των πρωτεϊνών μέσω αντιδράσεων S-γλουταθειονυλίωσης (S-glutathionylation), οι οποίες επηρεάζονται από τα επίπεδα οξειδωμένης και ανηγμένης γλουταθειόνης και από τον τύπο των πρωτεϊνών (Ryan J. Mailloux, 2015).

Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί: Ενζυμικά Συστήματα Ενάντια στο Οξειδωτικό Στρες

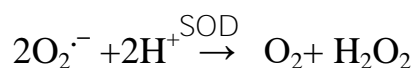
Ως **αντιοξειδωτικό** μπορεί να οριστεί κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell & Gutteridge, 1998). Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να εμποδίσουν το σχηματισμό ριζών, να μετατρέψουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά στοιχεία και να βοηθήσουν στην επιδιόρθωση των βλαβών



που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Η σύσταση και η διάρθρωση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών διαφέρει όχι μόνο μεταξύ των διαφόρων ιστών αλλά ακόμα και μεταξύ διαφόρων τύπων κυττάρων του ίδιου ιστού. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνουν την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), την καταλάση (CAT), την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP_x) και την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), που αποτελούν την πρώτη και κύρια γραμμή άμυνας εναντίον της οξειδωτικής πίεσης. Η συντονισμένη δράση τους έχει ως αποτέλεσμα την τελική αναγωγή του O₂ σε H₂O, χωρίς ανεξέλεγκτες οξειδώσεις των κυτταρικών συστατικών.

ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΗ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗ (SOD)

Αν και το ένζυμο αυτό απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1939, μόλις το 1969 οι McCord και Fridovich απέδειξαν την αντιοξειδωτική δράση της SOD. Η **δισμουτάση του υπεροξειδίου** απαντάτε σε αρκετές ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη φύση του μετάλλου του ενεργού κέντρου, τη σύνθεση των αμινοξέων, καθώς και τον αριθμό των υπομονάδων, τους συμπράγοντες και άλλα χαρακτηριστικά. Στον άνθρωπο διακρίνονται τρεις μορφές SOD, η κυτταροπλασματική CuZnSOD (δισμουτάση χαλκού-ψευδαργύρου), η μιτοχονδριακή MnSOD (δισμουτάση μαγγανίου) και η εξοκυττάρια SOD, που πρόκειται για ένα γλυκοζυλιωμένο ετεροτετραμερές η δραστηριότητα του οποίου εξαρτάται από το χαλκό ψευδάργυρο (Suzuki et al., 2000). Η CuZnSOD είναι ένα ένζυμο με μοριακό βάρος περίπου 32 kDa, το οποίο αποτελείται από δύο ταυτόσημες υπομονάδες. Στο ενεργό κέντρο φέρει ιόντα χαλκού και ψευδαργύρου και η ενζυμική της δραστηριότητα είναι σχετικά ανεξάρτητη από το pH στο εύρος 5–9,5. Εκτός από το κυτταρόπλασμα απαντάτε και στο διάμεσο χώρο των μιτοχονδρίων. Αντίθετα, η MnSOD είναι ένα ομοτετραμερές, με μοριακό βάρος 95 kDa, το οποίο περιέχει από ένα άτομο μαγγανίου στο ενεργό κέντρο κάθε υπομονάδας. Απαντάτε στη θεμέλια ουσία των μιτοχονδρίων, όσο και στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Το O₂⁻, που παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορλίωση στα μιτοχόνδρια ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (MnSOD), ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD (CuSOD), η οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα. Έχει υπολογιστεί ότι παρουσία της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου, η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ισορροπίας (steady state) του O₂⁻ είναι περίπου ίση με 10⁻¹¹M.

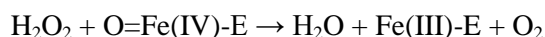
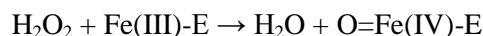


Το H₂O₂ που σχηματίζεται κυρίως από την παραπάνω αντίδραση, μπορεί να απομακρυνθεί στη συνέχεια με τη δράση ορισμένων άλλων ενζύμων. Ένα από αυτά, η καταλάση (CAT).

ΚΑΤΑΛΑΣΗ (CAT)

Η **καταλάση** έχει βρεθεί σχεδόν σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, κυρίως σε κυτταρικά οργανίδια που καλούνται υπεροξεισωμάτια αλλά και στα μιτοχόνδρια των καρδιακών

κυττάρων. Η συγκέντρωσή της είναι μεγαλύτερη στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα, ενώ ο εγκέφαλος, η καρδιά και οι μύες έχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Το μόριο της καταλάσης είναι τετραμερές και αποτελείται από 4 δακτυλίους πορφυρίνης με ένα άτομο σιδήρου στο κέντρο. Επίσης, κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH, το οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου. Τα υπεροξεισωμάτια παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση του κυττάρου (Antunes et al., 2002). Η καταλάση χρησιμοποιεί το ίδιο μόριο (H₂O₂) τόσο ως δότη όσο και ως δέκτη ηλεκτρονίων. Κατά συνέπεια, το ένα μόριο H₂O₂ ανάγεται με δύο ηλεκτρόνια σε H₂O, ενώ το άλλο οξειδώνεται με δύο ηλεκτρόνια σε O₂.

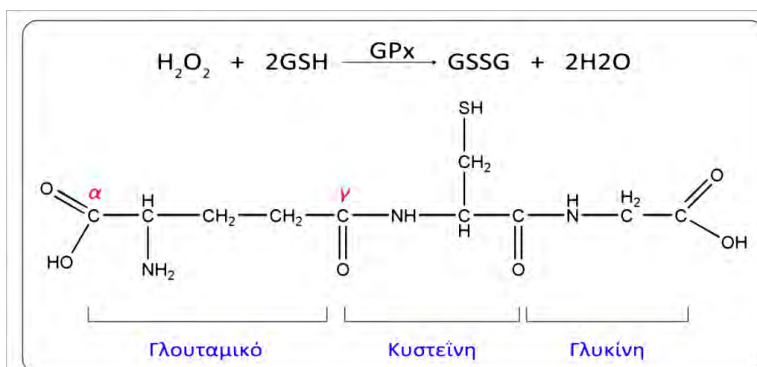


(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεμένη στο ένζυμο).

Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει ένα εκατομμύριο μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου κάθε min.

ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GPX)

Εκτός από την καταλάση, η οποία ανακαλύφθηκε πρώτη, σήμερα είναι γνωστές και άλλες οικογένειες ενζύμων που έχουν την ικανότητα απομάκρυνσης του H₂O₂. Το ένζυμο “υπεροξειδάση της GSH” (GPx) χρησιμοποιεί ηλεκτρόνια από την οξείδωση του τριπεπτιδίου γλουταθειόνης (GSH), για την αναγωγή του H₂O₂ σε H₂O (Cristina Espinosa-Diez et al., 2015). Στα θηλαστικά έχουν εντοπιστεί πέντε είδη υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX1-GPX5), με την κάθε μορφή GP_x να διαφέρει ως προς την ειδικότητα του υποστρώματος και την κυτταρική θέση. Οι διαφορετικές μορφές του ενζύμου της GP_x, εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο και σε ιστούς όπως στην καρδιά, τους πνεύμονες, το ήπαρ και τον εγκέφαλο (Cristina Espinosa-Diez et al., 2015).



Εικόνα 32: Η αντίδραση αναγωγής του H₂O₂ που καταλύεται από την “υπεροξειδάση της γλουταθειόνης” (GPx) (επάνω) και η χημική δομή της γλουταθειόνης (GSH) (κάτω). Η GSH απαρτίζεται από τα αμινοξέα γλουταμικό, κυστεΐνη και γλυκίνη (Δ. Γαλάρης, 2015).

Το ένζυμο αυτό είναι απόλυτα εξειδικευμένο όσον αφορά τον δότη των ηλεκτρονίων (GSH), ενώ έχει την ικανότητα να ανάγει έναν μεγάλο αριθμό υπεροξειδίων, εκτός από το H₂O₂. Για

παράδειγμα, υποστρώματα της GPx αποτελούν, μεταξύ άλλων, οργανικά υπεροξειδία, υπεροξειδία λιπαρών οξέων και υπεροξειδία της χοληστερόλης. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, τα υπεροξειδία ανάγονται στις αντίστοιχες αλκοόλες (Δ. Γαλάρης, 2015).



(το ROOH συμβολίζει τα διάφορα υπεροξειδία)

Το ενεργό ένζυμο αποτελείται από 4 υπομονάδες καθεμία από τις οποίες έχει στο ενεργό της κέντρο το αμινοξύ σεληνοκυστεΐνη στο οποίο το στοιχείο σελήνιο (Se) έχει αντικαταστήσει το θείο (S) της κυστεΐνης. Αν και μεγάλες ποσότητες σεληνίου είναι τοξικές, ίχνη αυτού του στοιχείου είναι απαραίτητα για την ομαλή λειτουργία των οργανισμών. Ένα άλλο είδος υπεροξειδάσης της GSH έχει επίσης αναγνωθεί, το οποίο δεν χρειάζεται Se για τη δράση του. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένα από τα ισοένζυμα της οικογένειας “τρανσφεράσες της GSH” (glutathione S-transferase GST) (Δ. Γαλάρης, 2015).

Ιδιότητα	GP _x 1	GP _x 2	GP _x 3	GP _x 4	GP _x 5
Κυτταρική θέση	Κυτοσόλιο, Μιτοχόνδρια	Κυτοσόλιο	Κυτοσόλιο, Εξωκυττάριος χώρος	Μιτοχόνδρια	Εξωκυττάριος χώρος
Υπομονάδα	Τετραμερές	Τετραμερές	Τετραμερές	Μονομερές	Διμερές
Μοριακό βάρος, kDa	21	22	22.5	19	24
Ιστός	Όλοι οι ιστοί	Στομάχι, Έντερο	Όλοι οι ιστοί	Καρδιά, Εγκέφαλος	Ήπαρ, Νεφροί

Πίνακας 7: Φυσικά χαρακτηριστικά και θέσεις στους ιστούς των πρωτεϊνών υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX) σε ανθρώπους (Κερασιώτη, 2014).

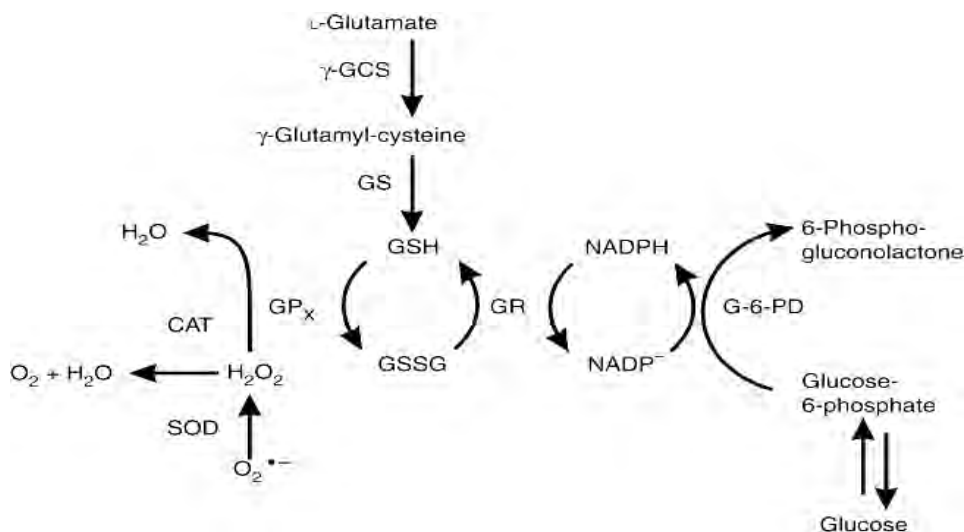
ΑΝΑΓΩΓΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GR)

Κάτω από κανονικές συνθήκες, η τιμή του κλάσματος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH/GSSG) εντός των κυττάρων είναι αρκετά υψηλή και κυμαίνεται μεταξύ του 50 και του 100. Μείωση αυτής της τιμής κάτω από ένα όριο συνεπάγεται σοβαρές συνέπειες σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως, μεταξύ άλλων, στη σύνθεση των πρωτεϊνών και στην έκφραση γονιδίων. Η **αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)** είναι υπεύθυνη για την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε GSH και συνεπώς για τη διατήρηση της φυσιολογικής αναλογίας GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου.



Αποτελείται από δύο υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH. Το NADPH, το οποίο καταναλώνεται στην παραπάνω αντίδραση, ανάγεται με τη σειρά του με

διάφορους τρόπους από τους οποίους ο σημαντικότερος είναι το παρακύκλωμα των φωσφορικών πεντοζών (PGP) στη γλυκόλυση.

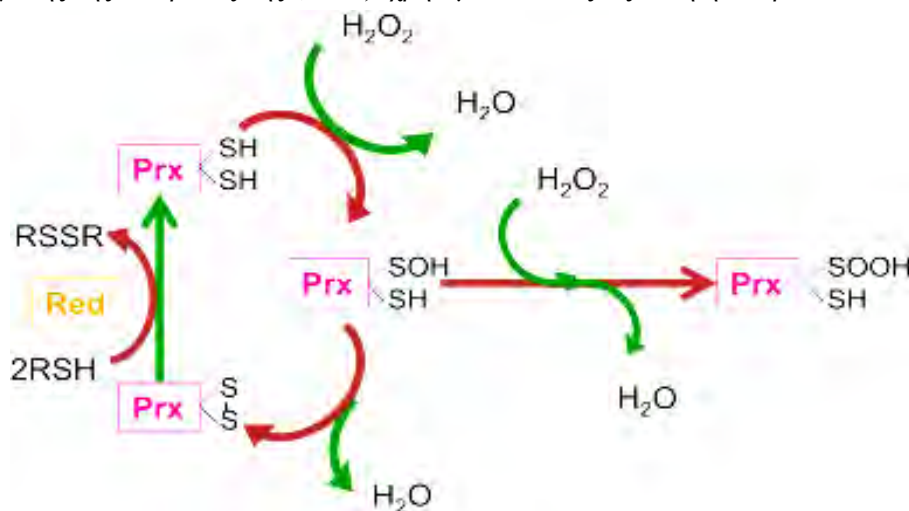


Εικόνα 33: Απεικόνιση της δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), της καταλάσης (CAT), της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR). GPx = υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, GR = αναγωγή της γλουταθειόνης, GSSG = οξειδωμένη γλουταθειόνη, GSH = ανηγμένη γλουταθειόνη, γ-GCS = γ-γλουτάμλο-κυστεΐνη, NADPH = νικοτινάμιδο δινουκλεοσιδικό φωσφορικό.

ΠΕΡΟΞΥΡΕΔΟΞΙΝΕΣ (PRX)

Στις οικογένειες των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την προστασία των κυττάρων από τη συσσώρευση υψηλών συγκεντρώσεων δραστικών μορφών οξυγόνου συμπεριλαμβάνονται και οι **περοξυρεδοξίνες (Prx)** (Chae, Oubrahim et al., 2012). Τα ένζυμα της οικογένειας αυτής έχουν μοριακό βάρος 20-30 kDa και είναι υπεροξειδάσες που δεν διαθέτουν αίμη ή σελήνιο, όπως οι καταλάσες και οι υπεροξειδάσες της GSH, αντίστοιχα. Βρίσκονται σε αφθονία σε όλα τα είδη κυττάρων (αποτελούν περίπου το 1% των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών του κυττάρου) και έχει προταθεί ότι μπορούν να δράσουν με διαφορετικούς μηχανισμούς, τόσο για να προστατεύσουν από το οξειδωτικό στρες όσο και για να προωθήσουν την ενδοκυττάρια μεταγωγή σημάτων (Rhee, Chae et al., 2005). Η αρχική ονομασία του ενζύμου ήταν “υπεροξειδάσες της θειορεδοξίνης”, η οποία στη συνέχεια μετατράπηκε σε “περοξυρεδοξίνες” (Chae, Chung et al., 1994), αντιπροσωπεύοντας κατάλληλα την οικογένεια υπεροξειδασών όπου η κυστεΐνη είναι η κύρια περιοχή της οξειδωσης. Στα κύτταρα των θηλαστικών εκφράζονται 6 διαφορετικές ισομορφές περοξυρεδοξίνης (PrxI έως PrxVI). Η δράση τους εκδηλώνεται κυρίως μέσω της αναγωγής του H₂O₂, αλλά και άλλων οργανικών υπεροξειδίων με δύο ηλεκτρόνια, σε H₂O και αλκοόλες, αντίστοιχα. Ως δότες ηλεκτρονίων χρησιμοποιούν τις θειολικές ομάδες της θειορεδοξίνης. Δύο διατηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης στο αμινοτελικό (S_R) και στο καρβοξυτελικό (S_N) συμμετέχουν στην κατάλυση αποδίδοντας ηλεκτρόνια. Σε πρώτη φάση, τα υπεροξειδία οξειδώνουν τα

αποπρωτονιωμένα S_P^- κατάλοιπα σε σουλφενικό οξύ. Τα οξειδωμένα σουλφενικά κατάλοιπα (S_POH), στη συνέχεια, αντιδρούν και σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς με τα αντίστοιχα S_R κατάλοιπα της άλλης υπομονάδας του διμερούς. Το οξειδωμένο ολοένζυμο ανάγεται εκ νέου με τη βοήθεια της θειορεδοξίνης (Trx), η οποία αναγεννάται μέσω της δράσης της αναγωγάσης της θειορεδοξίνης (TrxR), χρησιμοποιώντας ως δότη ηλεκτρονίων το NADPH.



Εικόνα 34: Μηχανισμός δράσης περοξυρεδοξίνης (Prx) με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Ο δισουλφιδικός δεσμός μπορεί να αναχθεί μέσω θειορεδοξίνης (Trx) (Cristina Espinosa-Diez et al., 2015).

ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΗΣ (TRX) ΚΑΙ ΓΛΟΥΤΑΡΕΔΟΞΙΝΗΣ (GRX)

Εκτός από τις περοξυρεδοξίνες (Prx), δύο ακόμη οικογένειες πρωτεϊνών, με παρόμοια δομή, συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος στα κύτταρα μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων (redox signaling). Πρόκειται για τις **θειορεδοξίνες (Trx)** και τις **γλουταρεδοξίνες (Grx)** (Ahsan, Lekli et al., 2009). Τα μέλη αυτών των οικογενειών βρίσκονται σε αφθονία σε όλους τους οργανισμούς, τους ιστούς και τα διαφορετικά είδη κυττάρων. Σε συνδυασμό με τις πρωτεΐνες αναγωγάση της θειορεδοξίνης (TrxR, thioredoxin reductase), αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR, glutathione reductase) και περοξυρεδοξίνη (Prx, proxioredoxin) αποτελούν τα συστήματα θειορεδοξίνης και γλουταρεδοξίνης, τα οποία καθορίζουν εν πολλοίς την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων. Και στις δύο περιπτώσεις τα ηλεκτρόνια που χρησιμοποιούνται προέρχονται από το NADPH, το οποίο παράγεται κυρίως στο παρακύκλωμα των φωσφορικών πεντοζών. Στην πρώτη περίπτωση, τα ηλεκτρόνια διοχετεύονται στη θειορεδοξίνη (Trx), μέσω της δράσης του ενζύμου αναγωγάση της θειορεδοξίνης (TrxR), η οποία έχει σελήνιο (Se) αντί για θείο (S) σε μία από τις κυστεΐνες στο ενεργό της κέντρο, καθώς οξειδώνεται πιο εύκολα και κατά συνέπεια, διευκολύνει τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις αυτού του τύπου (Δ. Γαλάρης, 2015).

Η θειορεδοξίνη (Trx) είναι μια ευρέως διαδεδομένη πρωτεΐνη μοριακού βάρους ~12 kDa. Συναντάται σε πολλά κυτταρικά διαμερίσματα, όπως στο κυτταρόπλασμα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στα μιτοχόνδρια. Το όνομά της προέρχεται από την ικανότητά

της να συμμετέχει στην οξειδοαναγωγική διαδικασία της δημιουργίας και του ανοίγματος ενδοπρωτεϊνικών ή/και διαπρωτεϊνικών δισουλφιδικών δεσμών (PSSX). Μ' αυτόν τον τρόπο αποτελεί τον δότη των ηλεκτρονίων για την περοξυρεδοξίνη και την επακόλουθη αναγωγή του H_2O_2 σε H_2O , όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Δ. Γαλάρης, 2015). Η θειορεδοξίνη, όμως, δεν έχει τη δυνατότητα αναγωγής των δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ της γλουταθειόνης και διαφόρων πρωτεϊνών (γλουταθειονυλίωση των πρωτεϊνών), όπως έχει την ευχέρεια να κάνει η γλουταρεδοξίνη. Στην περίπτωση του συστήματος της γλουταρεδοξίνης, τα ηλεκτρόνια προέρχονται επίσης από το NADPH, αλλά διοχετεύονται στη γλουταρεδοξίνη μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης και της γλουταθειόνης (Δ. Γαλάρης, 2015). Η γλουταρεδοξίνη επίσης έχει την ικανότητα αναγωγής πρωτεϊνικών δισουλφιδικών δεσμών, αλλά επιπλέον μπορεί και ανάγει δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ γλουταθειόνης και πρωτεϊνών, ρυθμίζοντας μ' αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα της γλουταθειονυλίωσης στα κύτταρα. Η αναγωγή πρωτεϊνικών δισουλφιδικών δεσμών από τις πρωτεΐνες θειορεδοξίνη και γλουταρεδοξίνη βασίζεται σε μια διατηρημένη αλληλουχία (Cys-X-X-Cys) στο ενεργό κέντρο των εν λόγω ενζύμων. Ο γενικός αυτός μηχανισμός καλείται “μηχανισμός των θειολικών ομάδων” και περιλαμβάνει αλληλοδιαδοχικά βήματα σχηματισμού και αναγωγής των δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των δύο κυστεϊνών (Δ. Γαλάρης, 2015).

Τα συστήματα της θειορεδοξίνης και της γλουταρεδοξίνης συμμετέχουν και ρυθμίζουν έναν μεγάλο αριθμό βασικών κυτταρικών λειτουργιών (σύνθεση DNA, κυτταρικό πολλαπλασιασμό, απόπτωση), ρυθμίζουν την ενεργότητα μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NF-κB και ο AP1, την έκφραση κυτταροκινών και την απομάκρυνση δραστικών μορφών οξυγόνου, όπως το H_2O_2 (Abate, Patel et al., 1990; Matthews, Wakasugi et al., 1992).

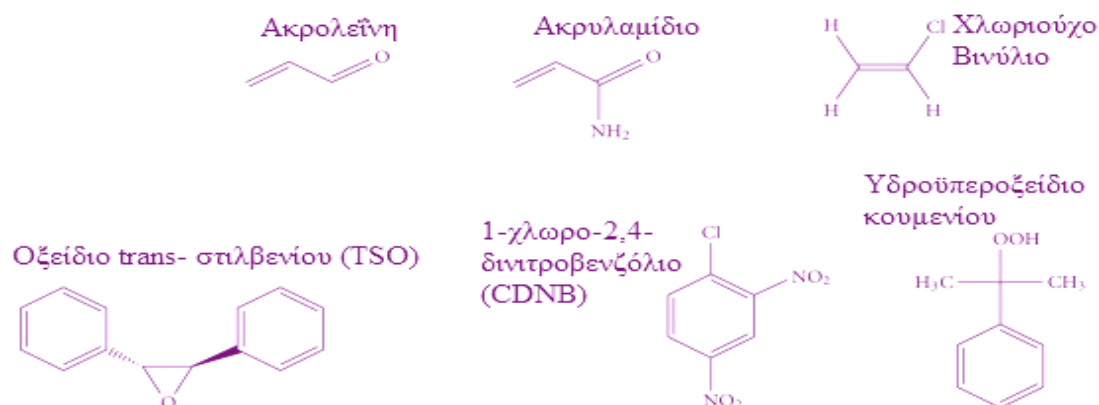
Άλλα Αμυντικά Ένζυμα

Εκτός των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση του $O_2^{\cdot -}$ και του H_2O_2 (SOD, καταλάση, υπεροξειδάση της GSH και περοξυρεδοξίνη), υπάρχει και μια σειρά άλλων αμυντικών ενζύμων τα οποία είτε υποβοηθούν τα βασικά ένζυμα στη δράση τους (αναγωγάση της γλουταθειόνης, ένζυμα του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών), είτε προστατεύουν από τη δημιουργία ελευθέρων ριζών με διάφορους τρόπους (τρανσφεράσες της GSH), είτε βοηθούν στην επιδιόρθωση των οξειδωμένων βασικών κυτταρικών συστατικών (φωσφατάση A2, αναγωγάση της μεθειονίνης), είτε τέλος μεταβολίζουν τα βλαπτικά προϊόντα της οξειδωσης (πρωτεάσες, αλδευδικές δεϋδρογονάσες), μετατρέποντάς τα συνήθως σε σχετικά πιο αβλαβείς ενώσεις (Δ. Γαλάρης, 2015).

Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης (GST)

Οι **τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs)** είναι μια οικογένεια ενζύμων που έχουν την ικανότητα να καταλύουν τη σύζευξη της σουλφυδρυλομάδας της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) με τις ηλεκτρονιόφιλες ομάδες μιας μεγάλης ποικιλίας υδρόφοβων ενώσεων (Mannervik & Danielson, 1988). Συγκεκριμένα, η θεμελιώδης βάση για όλες τις

καταλυτικές δραστηριότητες των GSTs, οφείλεται στη δυνατότητά τους να μειώνουν το pKa μιας ομάδας σουλφιδρυλίου της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) από την τιμή 9 σε υδατικό διάλυμα σε περίπου τιμή 6,5 όταν η GSH δεσμεύεται στο ενεργό τους κέντρο. Η γλουταθειόνη βρίσκεται υπό τη μορφή θειολικού ανιόντος (GS⁻) σε ουδέτερο pH όταν συμπλοκοποιείται με το ένζυμο GST, το οποίο καταλύει την αντίδραση, μέσα από την συνολική του ικανότητα να προωθήσει το σχηματισμό του GS⁻ και να δεσμεύει πλησίον αυτού υδρόφοβες ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις (Daniel W. Nebert, Vasilis Vasiliou, 2004).

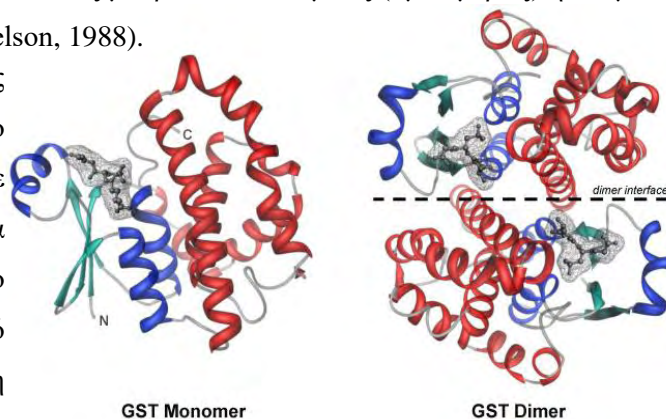


Εικόνα 35: Επιλεγμένα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα των GST ενζύμων (P. David Josephy, 2010).

Στα ηλεκτρονιόφιλα μόρια που μπορούν να δράσουν ως υποστρώματα των GSTs περιλαμβάνεται μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων, όπως ενδογενείς τοξικοί μεταβολίτες, εποξειδία, προϊόντα οξειδωτικού στρες, περιβαλλοντικές τοξίνες και καρκινογόνοι παράγοντες. Μια ένωση πρέπει να διαθέτει τρία χαρακτηριστικά ώστε να μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα του ενζύμου: α) να είναι υδρόφοβη, β) να περιέχει ένα ηλεκτρονιόφιλο άτομο άνθρακα και γ) να αντιδρά μη ενζυμικά με τη γλουταθειόνη σε ανιχνεύσιμο βαθμό (Sipes & Gandolfi, 1991). Οι GSTs ανιχνεύονται μόνο σε αερόβιους οργανισμούς όπως και η GSH (Fahey & Sundquist, 1991). Γι' αυτό έχει προταθεί ότι η αρχική λειτουργία των ενζύμων αυτών ήταν η προστασία του κυττάρου από την τοξικότητα προϊόντων του οξειδωτικού μεταβολισμού (Mannervik & Danielson, 1988). Γενικά, οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν πολλαπλές ισομορφές μεταφοράς της GST. Καθεμία απ' αυτές τις ισομορφές έχει διαφορετική εξειδίκευση όσον αφορά τα υποστρώματα, αλλά και όσον αφορά άλλες ιδιότητές τους. Η επαγόμενη έκφραση των πολλαπλών μορφών S-μεταφοράς γλουταθειόνης, πιθανότατα να οφείλεται στην εξελικτική απόκριση των κυττάρων για την προστασία τους από τη χημική τοξικότητα και το οξειδωτικό στρες (Rosanna Rinaldi et al., 2002). Η οικογένεια των GST γονιδίων, περιλαμβάνει συνολικά 16 γονίδια σε 6 υποοικογένειες. Παρά το μεγάλο αριθμό μελετών που υπάρχουν και αφορούν τη συγκεκριμένη οικογένεια γονιδίων, υπάρχει σύγχυση όσον αφορά την ονοματολογία και την ταξινόμησή τους (Daniel W. Nebert, Vasilis Vasiliou, 2004).

Οι κυτταροπλασματικές μορφές του ενζύμου (cGSTs), κατατάσσονται σε έξι διαφορετικές ομάδες που χαρακτηρίζονται από τα ελληνικά γράμματα α (GSTA), μ (GSTM), π (GSTP), θ (GSTT), ω (GSTO) και ζ (GSTZ), σύμφωνα με τις καταλυτικές, φυσικοχημικές, ανοσολογικές τους ιδιότητες και τη δομή. Συγκεκριμένα οι κυτταροπλασματικές GSTs αποτελούνται από δύο υπομονάδες, οι οποίες μπορεί να είναι όμοιες (ομοδιμερείς) ή ανόμοιες (ετεροδιμερείς) (Mannervik & Danielson, 1988).

Κάθε υπομονάδα έχει μέγεθος περίπου 25kDa. Το ένζυμο έχει δύο ενεργά κέντρα, από ένα σε κάθε υπομονάδα (Mannervik 1985), τα οποία λειτουργούν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Κάθε ενεργό κέντρο έχει δύο υποπεριοχές: α) τη G- περιοχή όπου δεσμεύεται η GSH και σχηματίζεται από μια συντηρημένη N-τελική α/β περιοχή και β) την H-περιοχή, με υδρόφοβο χαρακτήρα, όπου δεσμεύεται το επίσης υδρόφοβο ηλεκτρονιόφιλο υπόστρωμα και δημιουργείται από έναν πιο μεταβλητό α-ελικοειδή τομέα (Mannervik, 1985).



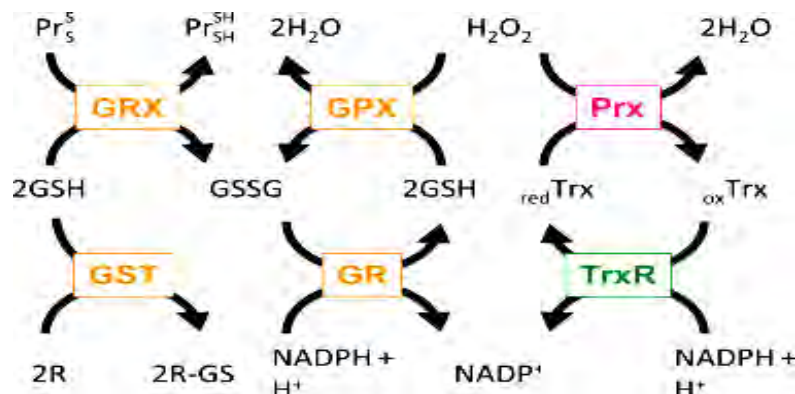
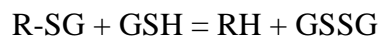
Εικόνα 36: Μονομερής (αριστερά) και διμερής (δεξιά) δομή της GST. Διακρίνεται το N-τελικό άκρο (μπλε/κυανό), ο α-ελικοειδής τομέας (κόκκινο) και η GSH (σκουρό γκρι) (Richard Armstrong, 2010-2014).

Γενικά, ο φυσιολογικός ρόλος των GSTs είναι η προστασία των κυττάρων από επικίνδυνα ξενοβιοτικά τα οποία είτε εισέρχονται απευθείας από το περιβάλλον είτε σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού τους, παραδείγματος χάριν, μέσω του συστήματος του κυτοχρώματος P-450. Είναι γνωστό ότι πολλά από τα εν λόγω ξενοβιοτικά έχουν την ικανότητα δημιουργίας ελευθέρων ριζών στα κύτταρα και, κατά συνέπεια, η δράση τους είναι προστατευτική. Οι συγκεντρώσεις των ενζύμων της μεταφοράς της γλουταθειόνης στο ήπαρ είναι ιδιαίτερα αυξημένες και τα σύμπλοκα GS/ξενοβιοτικών που δημιουργούνται είτε κατακερματίζονται, σχηματίζοντας μερκαπτουρικά οξέα τα οποία εκκρίνονται στα ούρα, είτε μεταφέρονται στη χοληδόχο κύστη με τη βοήθεια ειδικών μεταφορέων και με ταυτόχρονη κατανάλωση ενέργειας υπό μορφή ATP. Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ξενοβιοτικών έχει πολλές φορές ως αποτέλεσμα τη μείωση των ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων της γλουταθειόνης και κατά συνέπεια, τη μείωση της ολικής αμυντικής ικανότητας του συγκεκριμένου ιστού. Η σύνδεση των ξενοβιοτικών με τη γλουταθειόνη αποτελεί συνήθως το πρώτο βήμα για την αποτοξίνωσή τους. Μερικές φορές, όμως, συμβαίνει το σχηματιζόμενο προϊόν, σύζευξης της γλουταθειόνης με το ξενοβιοτικό, να είναι πιο τοξικό από την αρχική ένωση, ώστε τελικά να προκαλεί κυτταρική βλάβη.



Οι GSTs έχουν επιπλέον την ικανότητα να δεσμεύουν υδρόφοβα οργανικά ανιόντα τα οποία δεν αποτελούν υπόστρωμα του ενζύμου (Clark, 1989). Τα οργανικά μόρια (φάρμακα, αντιβιοτικά, ισχυρές τοξικές ουσίες όπως το βρωμοβενζόλιο) μπορούν να συνδεθούν ομοιοπολικά ή μη, είτε στο ενεργό κέντρο είτε σε κάποιο άλλο σημείο του ενζύμου (Clark, 1989). Η συγκεκριμένη δράση του ενζύμου οδηγεί σε μείωση της ελεύθερης συγκέντρωσης ή ακόμη και σε αδρανοποίηση των ξеноβιοτικών ουσιών παρόλο που δεν συνδέονται με τη GSH. Με τον τρόπο αυτό το ένζυμο αποτελεί έναν παθητικό μηχανισμό αποτοξίνωσης. Ανάλογα, η GST ως ενδοκυτταρική πρωτεΐνη μεταφοράς προσδέεται και με ενδογενή μόρια- μη υποστρώματα, όπως η χολερυθρίνη, τα στεροειδή, τα χολικά οξέα και άλλα υδρόφοβα και αμφιπαθή μόρια, στο ενεργό της κέντρο ή σε κάποια άλλη περιοχή, με αποτέλεσμα άλλοτε να αναστέλλεται ή να διεγείρεται η καταλυτική της δράση (Thomas D. Boyer, 1989). Η συγγένεια με τα παραπάνω μόρια ποικίλλει, ενώ αξίζει να αναφερθεί πως ο βαθμός της αναστολής εξαρτάται από το pH (Thomas D. Boyer, 1989).

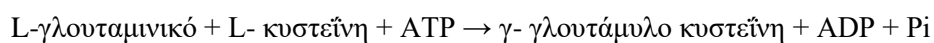
Όσον αφορά την ενζυμική δράση των GSTs, θα πρέπει να αναφερθεί πως υπάρχουν μερικά είδη που εμφανίζουν δραστικότητα υπεροξειδάσης γλουταθειόνης και αντιδρούν με οργανικά υπεροξειδία, προστατεύοντας τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη. Οι συγκεκριμένες ισομορφές αποτελούν συνήθως το μέρος της ενεργότητας των υπεροξειδασών της GSH που δεν περιέχουν σελήνιο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Mannervik & Danielson, 1988). Σ' αυτό τον τύπο αντίδρασης σχηματίζεται αρχικά ένα ασταθές ενδιάμεσο (GS-R), που πρόκειται για το ενζυμικό προϊόν, το οποίο προσβάλλεται εν συνεχεία μη ενζυμικά από ένα δεύτερο μόριο της GSH, αποδίδοντας το τελικό προϊόν και το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG) (Thomas D. Boyer, 1989). Το γεγονός πως η δραστικότητα των GSTs εξαρτάται από την παρουσία της γλουταθειόνης, τονίζει περισσότερο τη σημασία τους ως αντιοξειδωτικά μόρια.



Εικόνα 37: Διασύνδεση GSH- εξαρτώμενων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) ανάγεται από τις περοξυρεδοξίνες (Prx) ή από τις υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPXs), οι οποίες καταλύουν ταυτόχρονα την οξείδωση της γλουταθειόνης (GSH). Οι οξειδωμένες υπεροξειδάσες (GPXs), ανάγονται μέσω των θειορεδοξινών (Trxs), οι οποίες εν συνεχεία ανάγονται από τις αναγωγάση θειορεδοξίνης (TrxR), με NADPH- εξαρτώμενο τρόπο. Αντίστοιχα, παρουσία NADPH, η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) ανάγεται από την αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR). Επιπλέον, οι γλουταρεδοξίνες (Grx) καταλύουν την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών (S-S) στις πρωτεΐνες (Pr), ενώ η S- τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), χρησιμοποιεί τη ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH), για να συζεύξουν και να αποτοξινώσουν τις δραστικές ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις (Cristina Espinosa-Diez et al., 2015).

ΣΥΝΘΕΤΑΣΗ ΤΗΣ Γ-ΓΛΟΥΤΑΜΥΛΟΚΥΣΤΕΪΝΗΣ (Γ-GCS)

Η **συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCS)** ή λιγάση της γλουταμικής κυστεΐνης (GCL), είναι το πρώτο ένζυμο του μονοπατιού της γλουταθειόνης, που καταλύει τη χημική αντίδραση:



Η συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCS), είναι ένα πρωτεϊνικό ετεροδιμερές, που προκειμένου να καταλύσει το πρώτο βήμα βιοσύνθεσης της GSH, απαιτεί την παρουσία είτε Mn^{+2} είτε Mg^{+2} . Αποτελείται από μία καταλυτική (GCLC) και μία ρυθμιστική (GCLM) υπομονάδα. Η GCLC (637 αμινοξέα, 73 kDa) αντιπροσωπεύει όλη την ενζυματική δράση, ενώ η GCLM (274 αμινοξέα, 33 kDa) αυξάνει την καταλυτική αποδοτικότητα της GCLC (Cristina Espinosa-Diez et al., 2015). Μια ένδειξη της σημασίας αυτού του ενζύμου στη βιοσύνθεση της γλουταθειόνης, είναι ότι ποντίκια χωρίς την GCLC πεθαίνουν πριν καν γεννηθούν, ενώ ποντίκια χωρίς την GCLM δεν επιδεικνύουν ιδιαίζοντα φαινότυπο, αλλά έχουν σημαντικά μειωμένη γλουταθειόνη και αυξημένη ευαισθησία σε τοξικές προσβολές (Cristina Espinosa-Diez et al., 2015). Σχεδόν κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο, από τα φυτά μέχρι τους ζυμομύκητες και τον άνθρωπο, εκφράζουν μια μορφή της πρωτεΐνης GCS, για το σκοπό της σύνθεσης της GSH.

Η ενζυμική δραστηριότητα της GCS, επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες και κυρίως από μεταγραφικές και μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που αφορούν την έκφραση των δύο υπομονάδων που συνθέτουν το ένζυμο. Χαρακτηριστικά, ρυθμιστικοί παράγοντες μεταγραφής είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με τους υποκινητές των γονιδίων, που είναι υπεύθυνα για την έκφραση των υπομονάδων της GCS, στους οποίους περιλαμβάνονται μέλη της οικογένειας Nrf2 παραγόντων μεταγραφής αλλά και οι οικογένειες πρωτεϊνών AP1, AP3, NF-κB, Maf, JunD. Από αυτή την άποψη, το οξειδωτικό στρες έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει τη δραστηριότητα της GCS, ενώ πρόσφατα ευρήματα τονίζουν πως η κυτταρική ενεργότητα του ενζύμου ρυθμίζεται και μέσω ενός οξειδοαναγωγικού μηχανισμού, κατά τον οποίο σε οξειδωτικές συνθήκες προωθείται ο σχηματισμός του ολοενζύμου, ενώ σε αναγωγικές συνθήκες αναστέλλεται. Επίσης μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων των υπομονάδων, παίζουν ένα ρυθμιστικό ρόλο στο σχηματισμό του ενζύμου και κατ' επέκταση

στη δραστηριότητά του. Τέλος η χαμηλή συγκέντρωση της κυστεΐνης (υπόστρωμα), δρα ως ένας περιοριστικός παράγοντας για το ένζυμο, ενώ η GSH είναι ικανή να αναστείλει τη δράση του, ρυθμίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη σύνθεσή της. Λαμβάνοντας λοιπόν, υπόψη το ρόλο της GCS ως ένζυμο περιορισμού στο ρυθμό βιοσύνθεσης της GSH, πλέον οι θεραπευτικές στρατηγικές που έχουν ως στόχο να μεταβάλλουν την παραγωγή της GSH, έχουν επικεντρωθεί στη GCS (Christopher C. Franklin, et al., 2009).

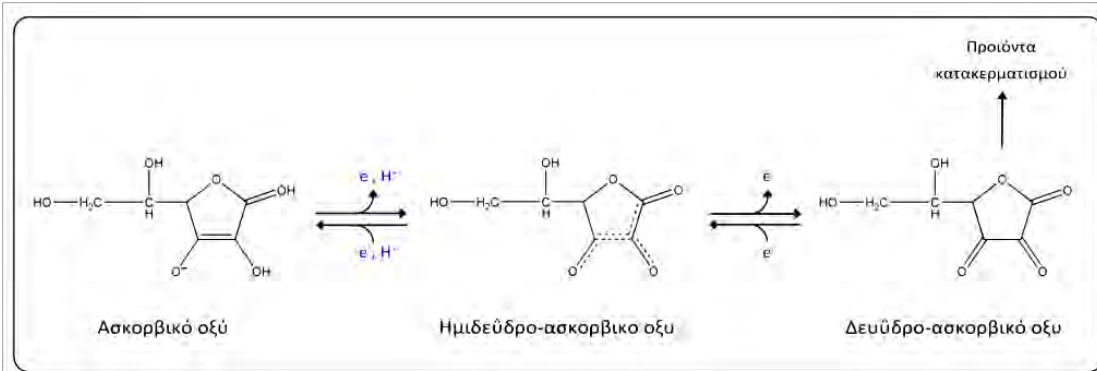
Κυτταρικοί Αμυντικοί Μηχανισμοί: Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

Εκτός από τα ένζυμα/πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες, τα κύτταρα διαθέτουν επιπλέον μικρομοριακές ενώσεις, οι οποίες είναι ικανές να εξουδετερώνουν τις δραστικές ελεύθερες ρίζες, όταν αυτές σχηματίζονται και αρχίζουν να δρουν ανεξέλεγκτα. Τα συγκεκριμένα μόρια καλούνται συνήθως “εκαθαριστές ελευθέρων ριζών” (free radical scavengers) ή απλώς “αντιοξειδωτικά”. Πρόκειται για ενώσεις που είτε είναι ενδογενείς είτε λαμβάνονται μέσω της διατροφής και μπορούν να λάβουν ηλεκτρόνιο από μια ρίζα ή να δώσουν ηλεκτρόνιο προς σχηματισμό σταθερών παραπροϊόντων. Η αντίδραση οδηγεί σε οξείδωση του αντιοξειδωτικού, το οποίο πρέπει να αναγεννηθεί ή να αντικατασταθεί. Εξ ορισμού, η αντιοξειδωτική ρίζα είναι σχετικά αδρανής και δεν μπορεί να αντιδράσει με άλλα μόρια.

Αντιοξειδωτικές ενώσεις που προσλαμβάνονται με τη διατροφή

ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ (ΒΙΤΑΜΙΝΗ C)

Το **ασκορβικό οξύ** είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη και ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά τόσο στο εξωκυττάριο υγρό όσο και στο κυτταρόπλασμα (Bigard, 2001; Palmer et al., 2003). Η συγκέντρωσή του είναι άφθονη σε ιστούς όπου η παραγωγή των ROS είναι πιο σημαντική. Αυτό το φαινόμενο ορίζεται ως προσαρμογή απέναντι στο οξειδωτικό στρες (Goldfarb et al., 2011). Το ασκορβικό οξύ έχει δύο υδροξυλομάδες (-OH) οι οποίες μπορούν να ιονιστούν. Κατά συνέπεια, σε φυσιολογικό pH έχει τη μορφή μονοανιόντος. Το μονοφορτισμένο ασκορβικό ανιόν, είναι σε θέση να εξουδετερώσει μια ελεύθερη ρίζα (RO·) με την παροχή μιας ρίζας υδρογόνου (H·) ή (ισοδύναμα) με την παροχή ενός πρωτονίου και ενός ηλεκτρονίου ($H\cdot = H^+ + e^-$), σχηματίζοντας το αδρανές παράγωγο της ρίζας (ROH). Το αποτέλεσμα είναι η ελεύθερη ανιοντική ασκορβική ρίζα, η οποία είναι σταθερή λόγω συντονισμού και συχνά αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως ρίζα ημιδεϋδροασκορβικού οξέος. Απώλεια ενός επιπλέον ηλεκτρονίου από την ανιοντική ρίζα οδηγεί στον σχηματισμό του δεϋδροασκορβικού οξέος.

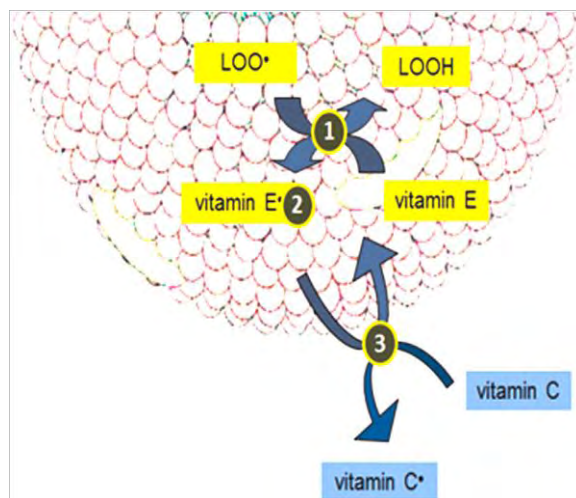


Εικόνα 38: Χημική δομή του ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C) και των προϊόντων της οξειδωσής του (Δ. Γαλάρης, 2015).

Το ασκορβικό αντιδρά απευθείας με δραστικές μορφές οξυγόνου, όπως το $O_2^{\cdot-}$, την ελεύθερη ρίζα του υδροξυλίου (OH^{\cdot}) και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), αλλά και με τις θειολικές ρίζες σε πρωτεϊνικά κατάλοιπα κυστεΐνης ($-S^{\cdot}$) (Goldfarb et al., 2011). Επιπλέον, έχει την ικανότητα να ανάγει τον Fe^{3+} σε Fe^{2+} όσο και το Cu^{2+} , συμβάλλοντας στη διατήρηση αυτών των ιόντων στο ενεργό κέντρο των ενζύμων στην ανηγμένη μορφή τους και κατ' επέκταση, στη διατήρηση της λειτουργικότητας αυτών των ενζύμων (Δ. Γαλάρης, 2015). Μεγάλο ενδιαφέρον έχει αναπτυχθεί, επίσης, γύρω από την ικανότητα του ασκορβικού οξέος να αναγεννά την α-τοκοφερόλη από τη μορφή της ελεύθερης ρίζας της, η οποία σχηματίζεται κατά τη διάρκεια εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών στο λιπιδιακό περιβάλλον των κυτταρικών μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών (Δ. Γαλάρης, 2015). Τέλος, εντός του κυττάρου, το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειονίνη παρουσιάζουν συνεργό δράση για να προστατέψουν το κύτταρο από οξειδωτικές βλάβες.

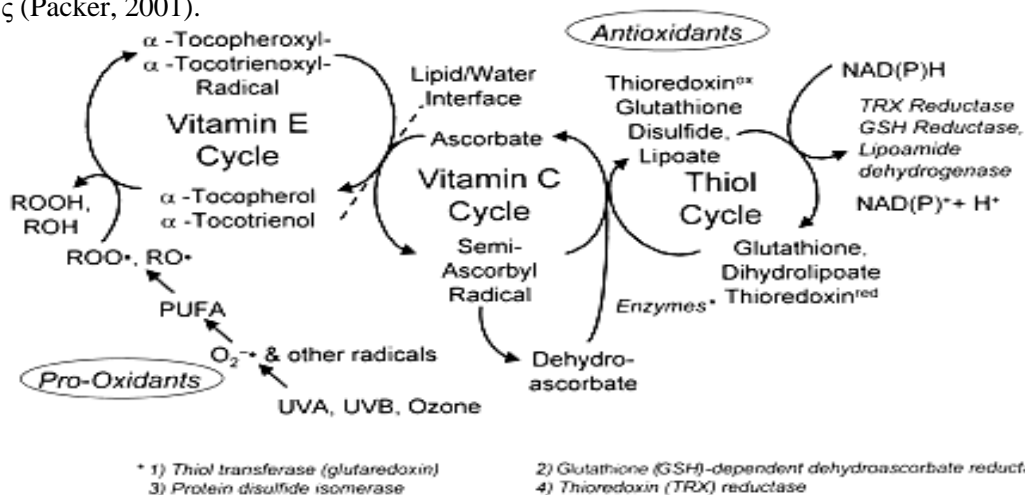
ΒΙΤΑΜΙΝΗ Ε (ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ)

Η βιταμίνη Ε είναι λιποδιαλυτή και απαντάτε σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Η α-τοκοφερόλη είναι η πλέον δραστική μορφή της βιταμίνης Ε στους ανθρώπους και αποτελεί ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Η κύρια αντιοξειδωτική της δράση αφορά στην προστασία κατά της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Η βιταμίνη Ε εντοπίζεται συνεπώς και στις κυτταρικές μεμβράνες, με τη φαινολική της υδροξυλική ομάδα να βρίσκεται μεταξύ της μεμβράνης και της υδατικής φάσης, όπως συμβαίνει και με τις πολικές κεφαλές των φωσfolιπιδίων. Οι ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται κατά την αντιοξειδωτική δράση της α-τοκοφερόλης δεν είναι πάντοτε τόσο ανενεργές και συνεπώς



Εικόνα 39: Αντιοξειδωτική προστασία έναντι της υπεροξειδωσής λιπιδίων (Misha F. Vrolijk et al., 2015).

είναι ικανές να αφαιρέσουν άτομα υδρογόνου (H[·]) από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, προκαλώντας το έναυσμα για αλυσιδωτές αντιδράσεις λιπιδιακής υπεροξειδωσης (Δ. Γαλάρης, 2015). Η γρήγορη επανακύκλωση της α-τοκοφερόλης, μέσω του ασκορβικού ή άλλων οξειδωτικών παραγόντων, αποτρέπει τέτοιες προοξειδωτικές επιπτώσεις (Packer, 2001). Πιο συγκεκριμένα η βιταμίνη E, δεν δρα απομονωμένη από τα άλλα αντιοξειδωτικά αλλά αποτελεί μέρος ενός συνόλου οξειδοαναγωγικών κύκλων, αντιοξειδωτικών που ονομάζεται ‘αντιοξειδωτικό δίκτυο’. Η βιταμίνη C μπορεί να συμβάλλει στην αναγέννηση της βιταμίνης E άμεσα, ενώ τα αντιοξειδωτικάθειόλης όπως η γλουταθειόνη και το λιποϊκό οξύ μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην αναγέννησή της έμμεσα μέσω της βιταμίνης C, ώστε από την οξειδωμένη της μορφή να μετατραπεί στην ανηγμένη (Packer, 2001). Τα συστήματα αυτά δρουν συνεργικά για τη σταθερή διατήρηση της συγκέντρωσης των ριζών της βιταμίνης E σε χαμηλά επίπεδα, αλλά και για να περιοριστεί η κατανάλωση ή η απώλεια της (Packer, 2001).



Εικόνα 40: Το “αντιοξειδωτικό δίκτυο” και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της βιταμίνης C, της βιταμίνης E και των οξειδοαναγωγικών κύκλωνθειόλης (Packer, 2001).

ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ.

Πρόκειται για χρωστικές, που απαντούν στα φυτά και σε μικροοργανισμούς, αλλά δεν συντίθενται από τα ζώα. Ευθύνονται για το ερυθρό, το κίτρινο και το πορτοκαλί χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Στη φύση υπάρχουν περίπου 600 καροτενοειδή και ταξινομούνται στα καροτένια, τα ξανθόφιλα (περιέχουν οξυγόνο) και το λυκοπένιο. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό της χημικής τους δομής, αποτελούν οι πολλές εναλλαγές μονών και διπλών δεσμών στο κεντρικό τμήμα του μορίου τους, γεγονός που επιτρέπει τη διάχυση των ηλεκτρονίων σχεδόν σε όλο το μήκος του μορίου (Δ. Γαλάρης, 2015). Ο πιο γνωστός φυσιολογικός ρόλος των καροτενοειδών είναι ότι αποτελούν πρόδρομα μόρια για τη **βιταμίνη A** ή ρετινόλη, μια λιποδιαλυτή βιταμίνη παρούσα σε πολλές λιπιδικές ουσίες. Αν και περισσότερα από 50 είδη καροτενοειδών μπορούν να αποτελέσουν πρόδρομα της βιταμίνης A, το **β-καροτένιο** θεωρείται το πιο σημαντικό (Δ. Γαλάρης, 2015). Οι σημαντικότερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες των καροτενοειδών είναι η ικανότητά τους να

απενεργοποιούν το μονήρες οξυγόνο ($^1\text{O}_2$), να αναστέλλουν τη λιπιδιακή υπεροξειδωση, ενώ μπορούν να αντιδράσουν με διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες ως δότες ηλεκτρονίων αλλά και με υπεροξειδικές ρίζες (ROO^\cdot), δημιουργώντας σύμπλοκα. Οι δημιουργούμενες ρίζες των καροτενοειδών (Car^\cdot) μπορούν, όπως και αυτές της τοκοφερόλης, είτε να αντιδράσουν μεταξύ τους σε μια αντίδραση ανακατανομής είτε να ανακυκλωθούν, αντιδρώντας με άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπως με τη βιταμίνη C και τη βιταμίνη E (Δ. Γαλάρης, 2015).

ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Ένας πολύ μεγάλος αριθμός **φαινολικών ενώσεων** συναντώνται στο φυτικό βασίλειο και οι περισσότερες απ' αυτές έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και συνεπώς μπορούν να δράσουν ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών και άλλων ισχυρών προοξειδωτικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα των ελευθέρων ριζών ROO^\cdot και OH^\cdot και των δραστικών οξειδωτικών παραγόντων ONOO^\cdot και HOCl . Εκτός της ικανότητάς τους να δρουν ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών, πολλές από τις εν λόγω φαινόλες έχουν την ικανότητα να μειώνουν τη δημιουργία υπεροξειδίων. Η δράση τους έχει συσχετισθεί με την πρόληψη ή/και την καθυστέρηση εμφάνισης χρόνιων και εκφυλιστικών παθήσεων όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η αρθρίτιδα, η γήρανση, η απώλεια μνήμης, το εγκεφαλικό, η νόσος του Alzheimer και η φλεγμονή.

Ενδογενείς αντιοξειδωτικές ενώσεις

ΣΥΝΕΝΖΥΜΟ Q10

Το **συνένζυμο Q₁₀** (CoQ_{10}) είναι ένα ενδογενές λιπόφιλο μόριο, το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση ATP και είναι παρόν στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Linnane et al., 2002). Εκτός των μιτοχονδρίων, βρίσκεται και σε άλλες κυτταρικές μεμβράνες, καθώς και στις λιποπρωτεΐνες. Το CoQ_{10} είναι γνωστό ότι ενεργεί ως αντιοξειδωτικό με άμεση δράση απέναντι στις ρίζες υπεροξυλίου ή με έμμεση δράση αναγεννώντας τις βιταμίνες C και E (Crane, 2001). Το CoQ_{10} έχει επίσης ωφέλιμες επιδράσεις, όπως η προστασία απέναντι σε καρδιαγγειακές ασθένειες, καρκίνο και κυτταρική γήρανση ή απόπτωση.

ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗ

Η **χολερυθρίνη** είναι το τελικό προϊόν καταβολισμού της πρωτεΐνης της αίμης. Η οξυγενάση της αίμης διασπά τον δακτύλιο της αίμης προς σχηματισμό χολοπρασίνης, η οποία στη συνέχεια ανάγεται από τη ρεδοουκτάση της χολοπρασίνης σε χολερυθρίνη (Stocker, 2004). Αν και τόσο η χολερυθρίνη όσο και η χολοπρασίνη είναι αναγωγικά είδη, η χολερυθρίνη θεωρείται το καλύτερο φυσιολογικό αντιοξειδωτικό (Baranano et al., 2002). Πράγματι, η χολερυθρίνη κατέχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση απέναντι στις ρίζες υπεροξυλίου και προστατεύει τα κύτταρα από τοξικά επίπεδα του H_2O_2 (Baranano et al., 2002; Stocker et al., 1987).

ΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ

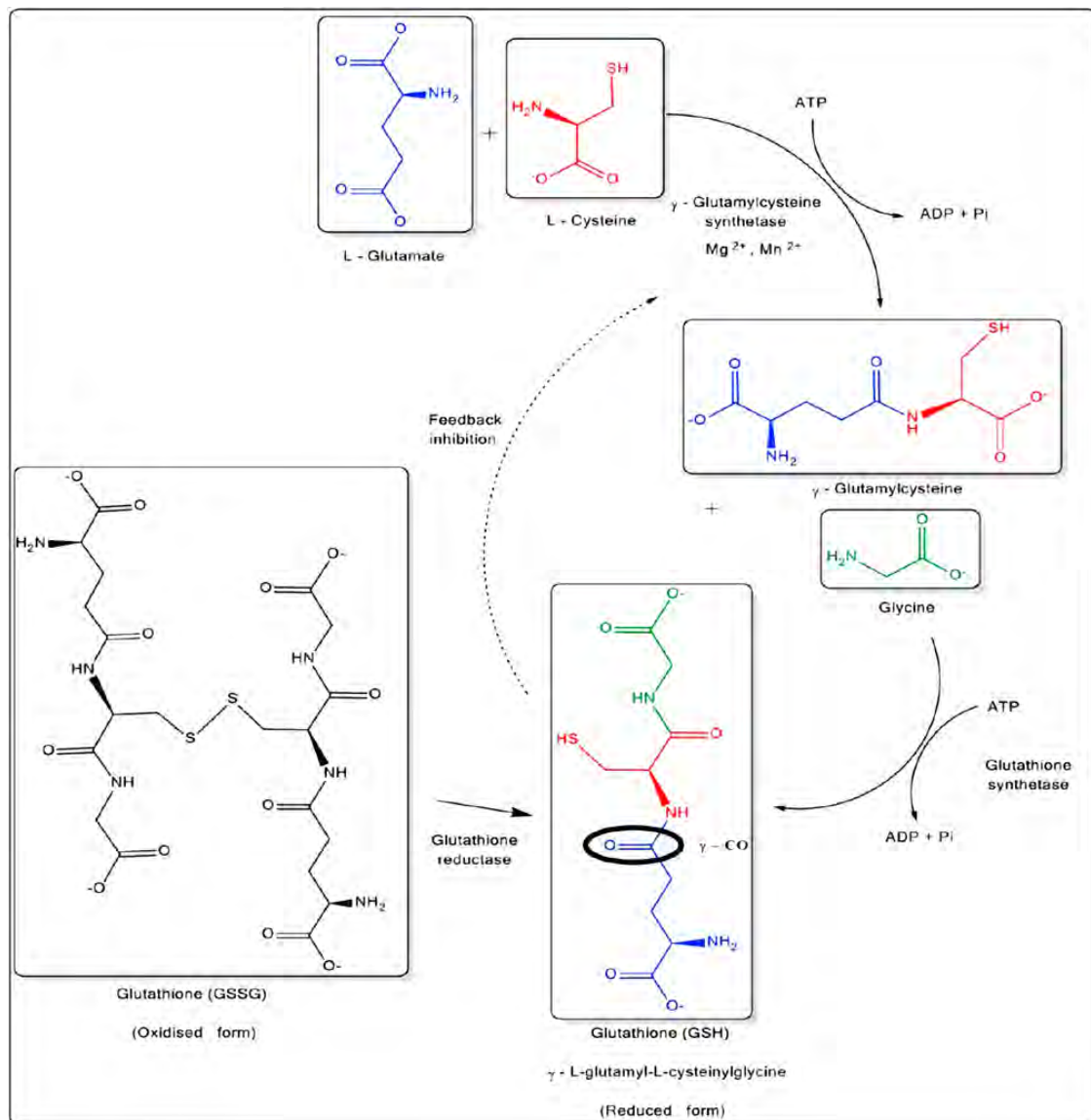
Το **ουρικό οξύ** είναι το τελικό προϊόν μεταβολισμού των πουρινών στους ανθρώπους (Svensson et al., 2002). Η έντονη φυσική δραστηριότητα αυξάνει τις συγκεντρώσεις του ουρικού οξέος στο πλάσμα. Το ουρικό οξύ του πλάσματος (0.2-0.4 mM), διαχέεται στους μύες με σκοπό να τους προστατεύσει από την προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες οξείδωση (Hellsten et al., 1998). Πράγματι, το ουρικό οξύ στο πλάσμα και τον μυ, είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά με άμεσες επιδράσεις στο $^1\text{O}_2$, το HOCL, τις ρίζες υπεροξυλίου, το ONOO⁻ ή το όζον (O_3) (Wayner et al., 1987). Κάποιες μελέτες δείχνουν ότι το ουρικό οξύ αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό κομμάτι (>50%) της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (Wayner et al., 1987). Έτσι, προστατεύει τα ερυθροκύτταρα, τις κυτταρικές μεμβράνες, το υαλουρονικό οξύ και το DNA από οξείδωση. Μια άλλη σημαντική αντιοξειδωτική ιδιότητα του ουρικού οξέος είναι η ικανότητά του να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου. Αυτή η διαδικασία εμποδίζει τον Fe^{3+} να δράσει προ-οξειδωτικά, την οξείδωση της βιταμίνης C και τη λιπιδική υπεροξείδωση (Sevanian et al., 1991).

ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSH)

Το μικρού μοριακού βάρους τριπεπτίδιο **γλουταθειόνη** (L-γ-γλουτάμυλο-L-κυστεΐνυλο-γλυκίνη) ή διαφορετικά GSH συναντάται σε ζώα, φυτά και μερικά βακτηρίδια. Αποτελείται από τα αμινοξέα, γλουταμινικό οξύ (Glu), κυστεΐνη (Cys) και γλυκίνη (Gly) και περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα (Cristina Espinosa-Diez et al., 2015). Είναι η πιο άφθονη μη πρωτεϊνική πηγήθειόλης στο κύτταρο και οι συγκεντρώσεις της στους περισσότερους ιστούς είναι στην κλίμακα των millimolar. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της γλουταθειόνης κυμαίνεται ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. Ειδικότερα, απαντάτε σε αφθονία στο κυτταρόπλασμα (0,5–11 mM), στον πυρήνα (3–15 mM) και στα μιτοχόνδρια (5–11 mM), όπου αποτελεί και την κύρια διαλυτή αντιοξειδωτική ουσία (Sies, 1999). Στον πυρήνα, η γλουταθειόνη διατηρεί την οξειδοαναγωγική κατάσταση των πρωτεϊνών που φέρουν σουλφυδρυλικές ομάδες και είναι απαραίτητες για την επιδιόρθωση και την έκφραση του DNA.

Η γλουταθειόνη είναι ένα υδατοδιαλυτό μόριο, το οποίο συντίθεται στο ήπαρ και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρεται στους ιστούς. Σε κυτταρικό επίπεδο η σύνθεσή της λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα σε δύο ATP- εξαρτώμενα βήματα: στο πρώτο το L-γλουταμινικό οξύ και η κυστεΐνη συνδέονται με την δράση του ενζύμου **συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCS)** ή λιγάση της γλουταμικής κυστεΐνης (GCL) και σχηματίζουν τη γ-γλουταμυλοκυστεΐνη (Cristina Espinosa-Diez et al., 2015). Η κυστεΐνη είναι πολύ σημαντική για την βιολογική και αντιοξειδωτική δράση της γλουταθειόνης επειδή παρέχει τον σουλφυδρυλικό δεσμό που οξειδώνεται, ανάγοντας τις ελεύθερες ρίζες. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί, ότι το Glu σχηματίζει τον πεπτιδικό δεσμό με την κυστεΐνη, χρησιμοποιώντας τη γ-καρβοξυλική του ομάδα και όχι το α-καρβοξύλιο που χρησιμοποιείται

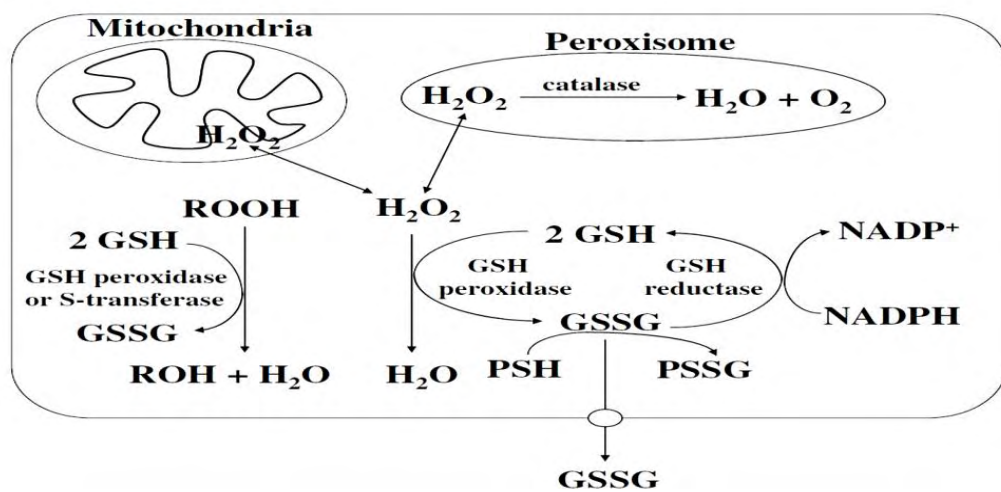
συνήθως στους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών. Αυτή η ασυνήθιστη διαφορά, σχετίζεται με την ανθεκτικότητα της GSH στην αποικοδόμηση-υδρόλυση, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο από την γ-γλουταμυλο-τρανσπεπτιδάση (GGT) εξωκυτταρικά. Στο δεύτερο βήμα, η γ-γλουταμυλοκυστεΐνη συνδέεται στο C-τελικό της άκρο με την γλυκίνη, μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση της γλουταθειόνης (GS). Η σύνθεση της γλουταθειόνης, ελέγχεται από επανατροφοδοτική αναστολή (feedback) των ενζύμων που την συνθέτουν (Cristina Espinosa-Diez et al., 2015), που σημαίνει πως η GSH έχει την ικανότητα να αναστέλλει αντιστρεπτά τη συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης. Επίσης όσον αφορά τα αμινοξέα γλυκίνη και γλουταμινικό, αξίζει να αναφερθεί πως είναι άφθονα, σε σχέση με την κυστεΐνη. Αυτό σημαίνει πως η συγκέντρωση της κυστεΐνης έχει την τάση να δρα ως περιοριστικός παράγοντας στη σύνθεση της γλουταθειόνης. Η GSH, λοιπόν μπορεί να λειτουργήσει ως ένας αποθηκευτικός παράγοντας για την κυστεΐνη, η οποία σε ελεύθερη μορφή είναι εξαιρετικά ασταθής και αυτό-οξειδώνεται ταχύτατα σε κυστίνη.



Εικόνα 41: Πορεία βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης (GSH) (Narciso Couto et al., 2016).

Αν και κατά το πλείστον (95%) η γλουταθειόνη, βρίσκεται στην ανηγμένη της μορφή (GSH), ένα μέρος της μπορεί να οξειδωθεί, δημιουργώντας δισουλφιδικούς δεσμούς (-S-S-) είτε με ένα άλλο μόριο GSH (GSSG, δισουλφίδιο της GSH) είτε με άλλα μόρια τα οποία έχουν θειολικές ομάδες (μικτά δισουλφίδια) (Sies, 1999). Ο λόγος GSH/ GSSG αποτελεί αξιόπιστο μέτρο του οξειδωτικού stress ενός οργανισμού. Αυξημένη οξείδωση της γλουταθειόνης, όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις αυξημένης παραγωγής υπεροξειδίων, συνεπάγεται υψηλή ταχύτητα αναγωγής της, για να διατηρηθεί σχετικά σταθερός ο λόγος GSH/GSSG. Η γλουταθειόνη ανακυκλώνεται από τη δράση της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης (glutathione reductase, GR), ενώ σε περιπτώσεις οξειδωτικής πίεσης η έκκριση, μέσω εξειδικευμένων μεταφορέων, της GSSG από το κύτταρο, έχει πραγματικά παρατηρηθεί (Cristina Espinosa-Diez et al., 2015). Η GSH στο κυτταρόπλασμα ανακυκλώνεται γρήγορα, μέσα σε 2-3 ώρες, ενώ στα μιτοχόνδρια έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής (≈ 30 ώρες).

Η GSH εξυπηρετεί πολλές λειτουργίες για την προστασία των ιστών από οξειδωτική βλάβη και τη διατήρηση του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος σε ανηγμένη κατάσταση (Meister & Anderson, 1983). Συγκεκριμένα, έχει την ικανότητα να ανάγει το υδρογόνο και τα οργανικά υπεροξειδία μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP_x), ενώ αποτελεί υπόστρωμα και για την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) (Halliwell and Gutteridge, 1999). Ωστόσο, συμμετέχει άμεσα και σε μια πλειάδα άλλων σημαντικών βιοχημικών συστημάτων. Συγκεκριμένα, προστατεύει τις -SH ομάδες των πρωτεϊνών από την οξείδωση και την επακόλουθη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών είτε ενδομοριακά (στην ίδια πρωτεΐνη) είτε με διαφορετικές πρωτεΐνες (Sies, 1999), συμμετέχει στην κυτταρική επικοινωνία (μεταγωγή του σήματος), στον μεταβολισμό του ασκορβικού οξέος, στην ανακύκλωση της βιταμίνης E, στη μεταφορά ιόντων Cu, στην αναδίπλωση αλλά και τον κατακερματισμό των πρωτεϊνών. Αποτελεί επίσης συμπάραγοντα σε διάφορα ένζυμα, όπως οι γλυοξυλάσες και τα ένζυμα που καταλύουν τη δημιουργία των λευκοτριενίων (Halliwell and Gutteridge, 1999).

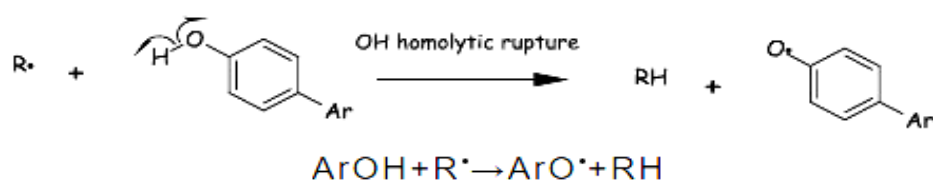


Εικόνα 42: Αντιοξειδωτική δράση της γλουταθειόνης (GSH) (Shelly C. Lu, 2009).

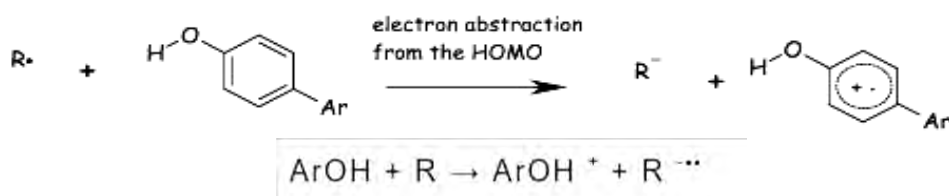
Αντιοξειδωτική Δράση Φαινολικών Ενώσεων

Ως πρωτογενή αντιοξειδωτικά, οι πολυφαινόλες αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες, με μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου (HAT) (1^{ος} μηχανισμός) ή με ενιαία μεταφορά ηλεκτρονίων (SET) (2^{ος} μηχανισμός), ενώ έχουν και την ικανότητα χηλίωσης των ελεύθερων μετάλλων (3^{ος} μηχανισμός).

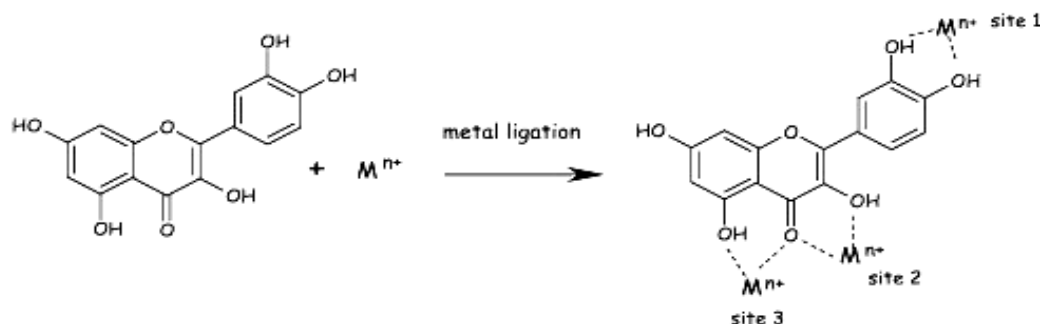
1. Hydrogen Atom Transfer (HAT)



2. Single Electron Transfer (SET)

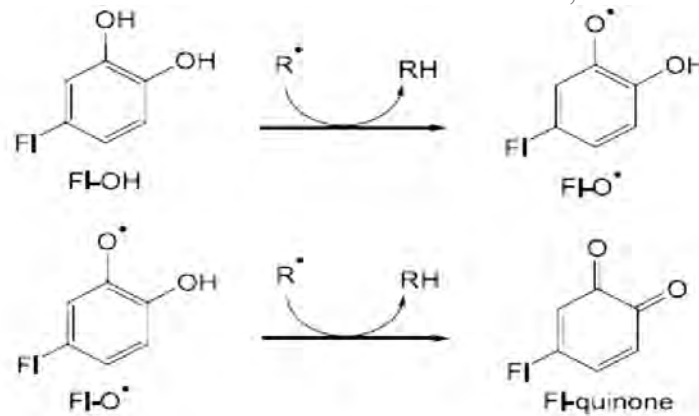


3. Transition Metals Chelation (TMC)



Εικόνα 43: Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών (Monica Leopoldini, 2011).

Στις δύο πρώτες περιπτώσεις τα προϊόντα είναι γενικά αβλαβή, καθώς ακόμα και αν η αντίδραση οδηγήσει στο σχηματισμό μιας άλλης ρίζας (φαινοξυλική ρίζα ή ημικινόνη), τότε και αυτή θα είναι λιγότερο δραστική σε σχέση με την αρχική, λόγω σταθεροποίησής της από άλλους παράγοντες ή λόγω αντίδρασής της με μια άλλη ρίζα ώστε να αποκτήσει σταθερή δομή κινόνης (Monica Leopoldini, 2011; D. Procházková et al., 2011). Ωστόσο, υπάρχουν παράμετροι που επηρεάζουν την διεξαγωγή κάθε πορείας. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τον πρώτο μηχανισμό, η ενθαλπία διάσπασης δεσμού (BDE), του φαινολικού O-H δεσμού, αποτελεί σημαντικό κριτήριο για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Έχει διαπιστωθεί πως όσο μειώνεται η τιμή της, τόσο ευκολότερα επιτυγχάνεται η διάσπαση του φαινολικού O-H δεσμού και άρα η αντίδραση με τις ελεύθερες ρίζες (Monica Leopoldini, 2011). Αντίστοιχα, στο δεύτερο μηχανισμό το δυναμικό ιονισμού αποτελεί την κύρια παράμετρο για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης, καθώς όσο πιο μικρή είναι

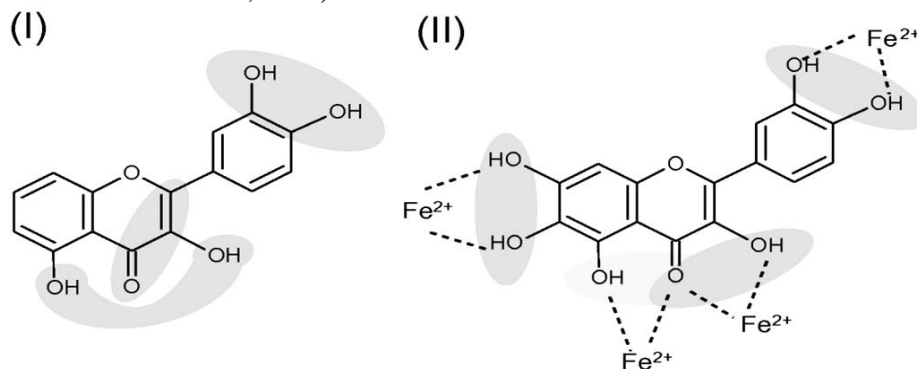


Εικόνα 44: Εκκαθάριση ελευθέρων ριζών ($R\cdot$) από ένα φλαβονοειδές. Η ημικινόνη (Fl-O \cdot) αντιδρά με τη δεύτερη ρίζα, αποκτώντας σταθερή δομή κινόνης (D. Procházková et al., 2011).

η τιμή του, τόσο πιο εύκολα διεξάγεται η απόσπαση του ηλεκτρονίου και άρα η αντίδραση με τις ελεύθερες ρίζες (Monica Leoroldini, 2011). Η εξαιρετική ικανότητα των πολυφαινολών να εξουδετερώνουν τις ROS, ενεργώντας ως ισχυροί δότες ηλεκτρονίων ή υδρογόνου, οφείλεται στο δυναμικό οξειδοαναγωγής τους (E°) (Cesar G. Fraga, 2010). Το δυναμικό οξειδοαναγωγής των πολυφαινολών κυμαίνεται στα 330-840 mV, με αυτές τις σχετικά χαμηλές τιμές να αποτελούν τις κινητήριες δυνάμεις, για την μετακίνηση ηλεκτρονίων σε μόρια με υψηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής, όπως για παράδειγμα είναι το υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\cdot-}$), η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot OH$) και η ρίζα αλκυλίου ($RO\cdot$). Τέλος, υπάρχει και ένας τρίτος μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών, που σχετίζεται όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με την ικανότητά τους να αντιδρούν με τα ιόντα των μετάλλων μετάπτωσης, με αποτέλεσμα το σχηματισμό σταθερών συμπλοκοποιημένων ενώσεων, που παρεμποδίζουν την αντίδραση των μετάλλων με τις ελεύθερες ρίζες (αντίδραση Fenton) (Cesar G. Fraga, 2010). Έχουν βρεθεί πολλές διαφορές όσον αφορά την ικανότητα συμπλοκοποίησης των πολυφαινολών, ενώ είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη πως η χηλίωση των μετάλλων μετάπτωσης δεν έχει πάντα σαν αποτέλεσμα αντιοξειδωτική δράση (Cesar G. Fraga, 2010).

Γενικά, η χημική σύνθεση των πολυφαινολών, τις καθιστά ιδανικές αντιοξειδωτικές ενώσεις, ενώ έχει βρεθεί πως είναι περισσότερο αποτελεσματικές ακόμα και από την βιταμίνη E και το ασκορβικό οξύ σε κυτταρικό επίπεδο (D. Procházková et al., 2011). Η βιολογική δράση των πολυφαινολών και των φλαβονοειδών, εξαρτάται άμεσα από την έκταση, τη φύση και τη θέση των υποκαταστατών και κυρίως από τον αριθμό των ομάδων υδροξυλίου στο μόριο του φλαβονοειδούς. Οι ομάδες υδροξυλίου και καρβονυλίου στις πολυφαινόλες παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τα ιόντα μετάλλων (Cesar G. Fraga, 2010). Χαρακτηριστικά, τα φλαβονοειδή με πολλαπλές ομάδες υδροξυλίου και την ομάδα καρβονυλίου στη θέση 4 επί του δακτυλίου C μπορεί να προσφέρουν διάφορες διαθέσιμες θέσεις για συμπλοκοποίηση μετάλλων (Monica Leoroldini, 2011). Επίσης, τα φλαβονοειδή που έχουν υδροξυλομάδες στις θέσεις 3 και 4 του B δακτυλίου, έχουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα (D.

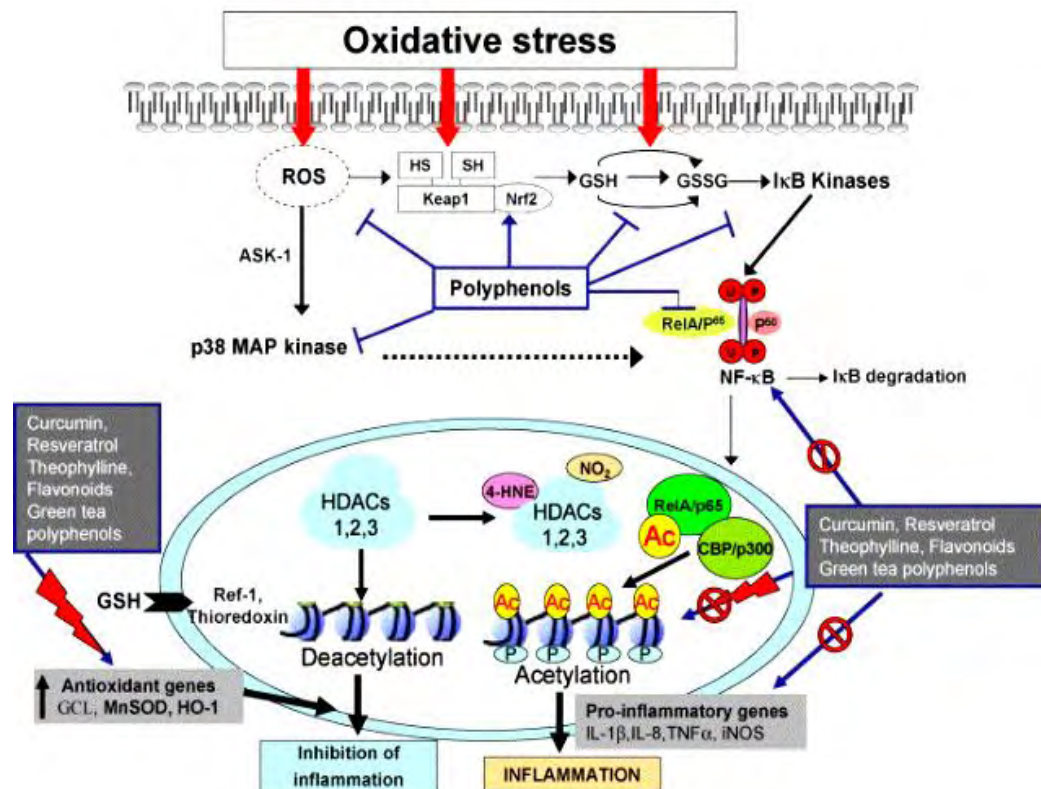
Procházková et al., 2011). Ειδικότερα έχει παρατηρηθεί πως, όσο περισσότερες είναι οι υδροξυλομάδες στο μόριο των φλαβονοειδών, τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική τους δράση (D. Procházková et al., 2011).



Εικόνα 45: Διαρθρωτικά χαρακτηριστικά που ορίζουν την μέγιστη αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών, όπως φαίνεται στις σκουρόχρωμες περιοχές (I), ενώ οι διακεκομμένες γραμμές και έντονες περιοχές στη δεύτερη περίπτωση (II) παρουσιάζουν τις ομάδες που συμμετέχουν στη χηλίωση (Cesar G. Fraga, 2010).

Επιπλέον τα φλαβονοειδή, έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων και συνεπώς τη χαλάρωση και τη διαπερατότητα των μεμβρανών, βάση της χημικής τους δομής. Η παρουσία υδρόφιλων και υδρόφοβων περιοχών στις περισσότερες πολυφαινόλες τις επιτρέπει να εντοπίζονται σε διαφορετικά επίπεδα των μεμβρανών: α) στην επιφάνεια της λιπιδικής διπλοστιβάδας μαζί με τις πολικές κεφαλές των λιπιδίων, ή/και β) στο εσωτερικό της διπλοστιβάδας, αλληλεπιδρώντας με τις υδρόφοβες αλυσίδες των λιπιδίων (Cesar G. Fraga, 2010). Τα δομικά χαρακτηριστικά των πολυφαινόλων και συνεπώς και η τρισδιάστατη δομή τους, καθορίζουν την προσρόφηση ή διείσδυση στη μεμβράνη. Ειδικότερα, φαίνεται πως η αλληλεπίδραση με τις κεφαλές λιπιδίων σχετίζεται θετικά με τον αριθμό των υδροξυλικών ομάδων και αντιστρόφως με την υδροφοβικότητα των μορίων, ενώ ακόμα και τροποποιήσεις όπως η μεθυλίωση των ομάδων υδροξυλίου θα μπορούσαν να αποτρέψουν την αλληλεπίδραση με την κυτταρική μεμβράνη. Κατ' αυτόν τον τρόπο οι πολυφαινόλες μπορούν να επηρεάσουν τις κυτταρικές λειτουργίες, μέσω τροποποίησης της δομής της μεμβράνης ή των φυσικών της χαρακτηριστικών, όπως η ρευστότητα και οι ηλεκτρικές ιδιότητες (Cesar G. Fraga, 2010). Αυτές οι αλλαγές μπορούν με τη σειρά τους να επηρεάσουν περαιτέρω τις αντιδράσεις με τα ένζυμα, τις αλληλεπιδράσεις υποδοχέα-προσδέτη, τη ροή ιόντων ή/και μεταβολιτών, τη διαμόρφωση μεταγωγής σήματος, ενώ με βάση τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες μπορούν να αποτελέσουν ένα φυσικό εμπόδιο για τις υδροδιαλυτές ρίζες. Ακόμα και ενσωματωμένες στη λιπιδική διπλοστιβάδα, μπορούν άμεσα να εξουδετερώσουν λιποδιαλυτές ρίζες, προστατεύοντας τα συστατικά των μεμβρανών από την οξείδωση, με πρόσφατες ενδείξεις να αποδεικνύουν επιλεκτικότητα των πολυφαινόλων για εξειδικευμένες περιοχές της μεμβράνης (Cesar G. Fraga, 2010). Οι πολυφαινόλες επίσης αλληλεπιδρούν και με πρωτεΐνες, συνήθως πλούσιες σε προλίνη, με αποτέλεσμα τη

δημιουργία μικρών συσσωματωμάτων και τελικά την καταβύθιση τους, ενώ συμβάλλουν και στην ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων.

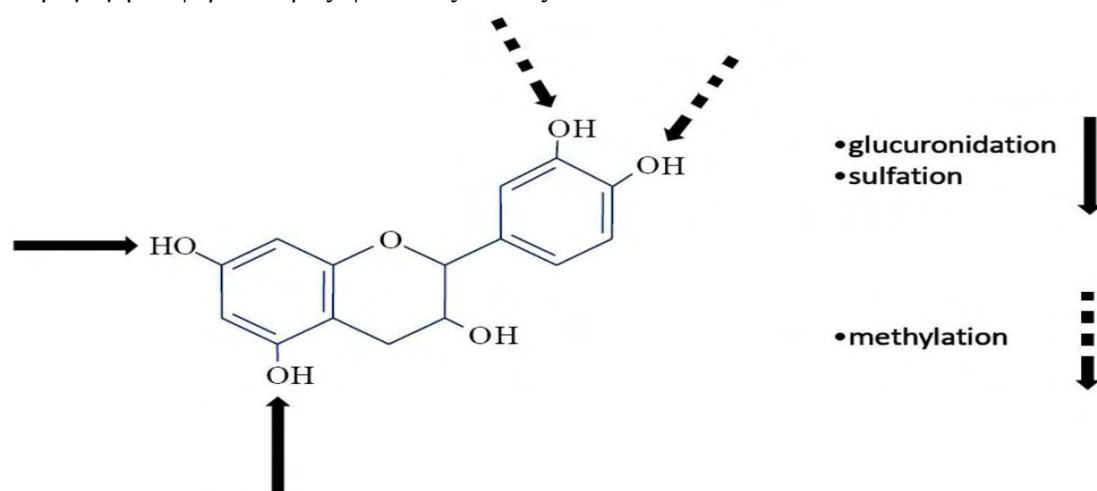


Εικόνα 46: Σχηματική αναπαράσταση της μεσολαβούμενης, από πολυφαινόλες και φλαβονοειδή, κυτταρική σηματοδότηση (Irfan Rahman, 2006).

Βιοδιαθεσιμότητα Πολυφαινολών

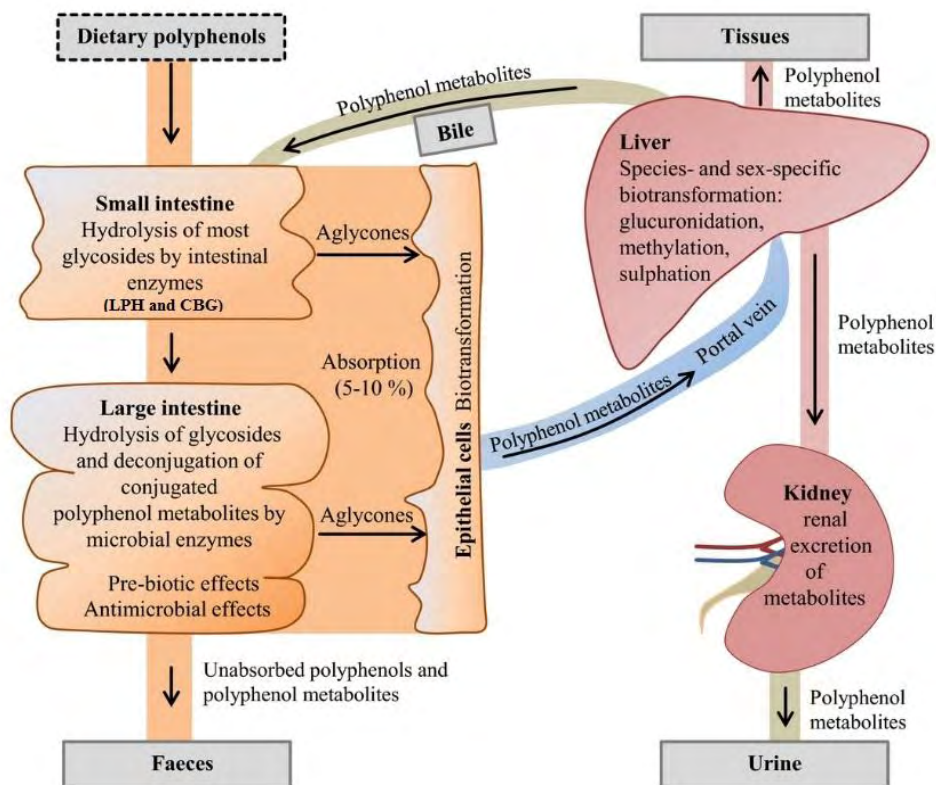
Ο όρος βιοδιαθεσιμότητα χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην φαρμακολογία για να οριστεί η έννοια του ποσοστού και της έκτασης στην οποία μία δραστική ουσία φτάνει στο σημείο δράσης της. Αν και έχουν προταθεί διάφοροι ορισμοί αυτός που έχει επικρατήσει περιλαμβάνει την έννοια της πρόσληψης του θρεπτικού συστατικού και στη συνέχεια τη μεταφορά του από τη συστηματική κυκλοφορία στις ειδικές περιοχές στόχους όπου μπορεί να ασκήσει τη βιολογική του δράση (Massimo D'Archivio, 2010). Η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολικών ενώσεων στο λεπτό έντερο είναι πολύ χαμηλή. Με βάση τα στοιχεία και τις εκτιμήσεις, λιγότερο από 5% έως 10% των φυτικών πολυφαινολών απορροφάται (D. K. Gessner et al, 2016). Ωστόσο, η μελέτη του μεταβολισμού τους είναι ζωτικής σημασίας ώστε τελικά να καθοριστεί ποια απορροφάται καλύτερα και ποιες οδηγούν στο σχηματισμό βιοδραστικών μεταβολιτών (Laura Marín et al, 2015). Μετά την πρόσληψη των φλαβονοειδών, οι χαρακτηριστικές ομάδες σακχάρου διασπώνται από το φαινολικό δακτύλιο και απορροφώνται στο λεπτό έντερο. Η υδρόλυση των γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών πραγματοποιείται σύμφωνα με δύο μηχανισμούς. Ο πρώτος περιλαμβάνει τη δράση της υδρολάσης της λακτάσης (LPH). Το ένζυμο αυτό, εντοπίζεται στα κύτταρα που καλύπτουν

τις λάχνες του λεπτού εντέρου και φέρει δύο καταλυτικές υπομονάδες, μία για την υδρόλυση της λακτόζης (LH) και μία για την απογλυκοζυλίωση των πολυφαινολών. Οι αγλυκόνες που απελευθερώνονται εισάγονται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου με παθητική διάχυση, ως αποτέλεσμα της αυξημένης τους λιποφιλίας. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει τη δράση της κυτοσολικής β-γλυκοσιδάσης (CBG) που είναι παρούσα στο εσωτερικό των επιθηλιακών κυττάρων όπου τα πολικά γλυκοσίδια μεταφέρονται μέσω του ενεργού Na^+ εξαρτώμενου-μεταφορέα γλυκόζης SGT1 (Massimo D'Archivio, 2010). Αντίθετα, τα φλαβονοειδή που συνδέονται με μία ομάδα ραμνόζης, μεταφέρονται στο κόλον όπου υδρολύονται από τις αραμνοσιδάσες, ένζυμα που εκκρίνονται από την κολονική μικροχλωρίδα (όπως το *Bifidobacterium dentium*), προκειμένου να διεξαχθεί η απορρόφησή τους (Laura Marín et al, 2015). Οι φλαβαν-3-όλες, όπως η (-)-επικατεχίνη, συχνά είναι ακυλιωμένες με γαλλικό οξύ, αλλά ποτέ γλυκοζυλιωμένες, με αποτέλεσμα αυτές οι ενώσεις να απορροφώνται σε επίπεδο εντεροκυττάρων, χωρίς να υποστούν αποσύνδεση ή υδρόλυση (Laura Marín et al, 2015). Από την άλλη πλευρά, οι προανθοκυανιδίνες είναι πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους και συνεπώς ολιγομερή μεγαλύτερα από τριμερή, είναι αδύνατο να απορροφηθούν στο λεπτό έντερο στη φυσική τους μορφή. Η άλλη κύρια οικογένεια των πολυφαινολών, τα υδροξυκιναμωμικά οξέα συνήθως εστεροποιούνται προς σάκχαρα, οργανικά οξέα, και λιπίδια (Laura Marín et al, 2015). Εξαιτίας της μη παρουσίας εστερασών στους ιστούς για την υδρόλυσή τους, ο μεταβολισμός τους λαμβάνει χώρα στη κολονική μικροχλωρίδα, αν και το ένα τρίτο της απορρόφησής τους μπορεί επίσης να λάβει χώρα στο λεπτό έντερο (Laura Marín et al, 2015). Χαρακτηριστικά, μερικά υδροξυκιναμωμικά οξέα, όπως οι ελλαγιτανίνες, δεν υδρολύονται από τα ένζυμα LPH και CBG, όπως άλλες φαινολικές ενώσεις και καθώς δεν μπορούν να απορροφηθούν στο λεπτό έντερο, μεταφέρονται στο κόλον όπου διασπώνται οι χαρακτηριστικές τους ομάδες. Τα άγλυκα τμήματα που προκύπτουν, μεταβολίζονται εκτενώς από τη μικροβιακή χλωρίδα, οδηγώντας στην παραγωγή διάφορων υδροξυφαινολοξικών οξέων.



Εικόνα 47: Πιθανές θέσεις σύζευξης των πολυφαινολών κατά τη διάρκεια αντιδράσεων μεταβολισμού φάσης II (Massimo D'Archivio, 2010).

Μόλις τα τελικά παράγωγα των αντιδράσεων υδρόλυσης ή οι αγλυκόνες απορροφηθούν στο λεπτό έντερο ή στο κόλον, υφίστανται μεταβολισμό φάσης II σε επίπεδο εντεροκυττάρων (Laura Marín et al, 2015). Οι δομικές τροποποιήσεις που υφίστανται σχετίζονται με αντιδράσεις σύζευξης, δηλαδή όλες εκείνες τις αντιδράσεις που οδηγούν στην προσθήκη κάποιου ενδογενούς υδατοδιαλυτού μορίου, για τη παραγωγή ενεργών μεταβολιτών. Η σύζευξη μπορεί να πρόκειται για μεθυλίωση (στις θέσεις C3 ή C4 από την κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράση, COMT), σύνδεση με ομάδες θείου (στις θέσεις C3,C4,C5 ή C7 από τις θειοτρανσφεράσες, SULT) ή για γλυκουρονιδίωση (μέσω UDP-γλυκουρονοσυλ-τρανσφεράσης), μεταβολικές διεργασίες απαραίτητες για τον περιορισμό πιθανών τοξικών επιδράσεων (Massimo D'Archivio, 2010). Στη συνέχεια αυτά τα προϊόντα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, μέσω της πυλαίας φλέβας, φθάνοντας τελικά στο ήπαρ όπου μπορεί να υποβληθούν και πάλι σε μεταβολισμό φάσης II, ως εκ τούτου να συζευχθούν, να περάσουν στην κυκλοφορία μέχρι τελικά να απεκκριθούν (Laura Marín et al, 2015). Όσον αφορά τις αντιδράσεις σύζευξης, η κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράση (COMT) καταλύει τη μεταφορά μιας ομάδας μεθυλίου από μία αδένοσυλ-μεθειονίνη, σε πολυφαινόλες όπως η κερκετίνη, η κατεχίνη, το καφεϊκό οξύ και η κυανιδίνη, κυρίως στο ήπαρ και τα νεφρά αν και αυτό το ένζυμο είναι παρόν σε ένα ευρύ φάσμα ιστών (Massimo D'Archivio, 2010). Αντίστοιχα οι σουλφοτρανσφεράσες (SULT) καταλύουν τη μεταφορά μιας ομάδας θείου, σε μία ομάδα υδροξυλίου σε διάφορα υποστρώματα, όπως οι πολυφαινόλες, μία διεργασία που λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ. Τέλος μετά τη γλυκουρονιδίωση των πολυφαινολών στα εντεροκύτταρα, περαιτέρω σύζευξή τους στο ήπαρ πραγματοποιείται από τη ουριδινο-5'-διωσφορική γλυκουρονοσυλ-τρανσφεράση (UGT), που βρίσκεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου σε πολλούς ιστούς και καταλύει τη μεταφορά ενός γλυκουρονικού οξέος από το UDP-γλυκουρονικό οξύ σε πολυφαινόλες (Massimo D'Archivio, 2010). Αν και η διαδικασία της σύζευξης αφενός παράγει ενεργούς μεταβολίτες από τις πολυφαινόλες, από την άλλη μειώνει το συνολικό ποσό των πολυφαινολών στο αίμα, αυξάνοντας την απέκρισσή τους, στη χολή ή τα ουροφόρα σωληνάκια, χάριν στην υψηλή τους διαλυτότητα και το υψηλό μοριακό τους βάρος (Massimo D'Archivio, 2010). Συγκεκριμένα το μεγαλύτερο ποσοστό των πολυφαινολών που περνά μέσω του λεπτού εντέρου χωρίς να απορροφάται (περίπου το 90-95% των προσλαμβανόμενων πολυφαινολών), μαζί με τους συζευγμένους μεταβολίτες τους, απεκκρίνονται ως συστατικά της χολής και μεταφέρονται πάλι πίσω στο έντερο, μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας, όπου θα αποσυζευχθούν και θα αναγεννηθούν από τη μικροβιακή χλωρίδα πριν απορροφηθούν εκ νέου (Laura Marín et al, 2015). Μόλις οι μεταβολίτες των πολυφαινολών απορροφηθούν στην κυκλοφορία, η διαθεσιμότητά τους στους ιστούς εξαρτάται από τη συγγένεια πρόσδεσης τους με την αλβουμίνη, η οποία φαίνεται να διαφοροποιείται ανάλογα με τη χημική τους δομή (D. K. Gessner et al, 2016). Κατ' αυτόν τον τρόπο επηρεάζεται η μεταφορά των πολυφαινολών στους ιστούς όπως και ο



Εικόνα 48: Συνοπτική παρουσίαση του μεταβολισμού και της απορρόφησης των φυτικών πολυφαινολών (D. K. Gessner et al, 2016).

ρυθμός απομάκρυνσή τους από την κυκλοφορία. Οι μεταβολίτες που δεν απορροφώνται αποβάλλονται μέσω των κοπράνων, ενώ έχει αποδειχθεί πως ένα μέρος τους, χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα από μικροοργανισμούς του παχέος εντέρου για την ανάπτυξή τους (D. K. Gessner et al, 2016). Αξίζει να σημειωθεί ότι αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει πως οι μεταβολίτες των πολυφαινολών διαμορφώνουν τη σύνθεση της μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου, ενώ παράλληλα προάγουν την ανάπτυξη ευεργετικών βακτηρίων και αναστέλλουν αυτή των παθογόνων (D. K. Gessner et al, 2016). Η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στο λεπτό έντερο εξηγείται κυρίως από το γεγονός ότι η ικανότητα υδρόλυσης τους από τα πεπτικά ή μικροβιακά ένζυμα, είναι γενικά περιορισμένη, είτε λόγω έλλειψης κατάλληλης ενζυμικής δραστηριότητας είτε λόγω χαμηλού μικροβιακού πληθυσμού (D. K. Gessner et al, 2016). Η ενζυμική υδρόλυση εστέρων, γλυκοσιδίων ή συμπλόκων των πολυφαινολών με συστατικά των κυττάρων (πρωτεΐνες, λιπίδια, οργανικά οξέα), όπως εντοπίζονται συχνά στα φυτικά είδη, είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την απορρόφησή τους καθώς μόνο οι άγλυκες μορφές και λίγοι γλυκοζίτες, μπορούν να απορροφηθούν στο λεπτό έντερο και όχι πολύπλοκες πολυμερείς φαινολικές ενώσεις (D. K. Gessner et al, 2016). Ένας επιπλέον λόγος της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών στους ιστούς-στόχους μετά την απορρόφηση τους, είναι πως αυτές οι ενώσεις αναγνωρίζονται από τον οργανισμό ως ξеноβιοτικές ουσίες, με αποτέλεσμα τη βιομετατροπή τους, μέσω μονοπατιών

αποτοξικοποίησης για το σχηματισμό υδρόφιλων συζευγμένων μεταβολιτών, που εν μέρει μεταφέρονται στο αίμα και στους ιστούς αλλά γρήγορα απεκκρίνονται μέσω των ούρων και της χολής (D. K. Gessner et al, 2016).

Precursors	Main metabolites identified	Bacteria	
Flavonols	Kaempferol	2-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)acetic acid	<i>Clostridium orbiscidens</i>
	Quercetin	2-(3-Hydroxyphenyl)acetic acid 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionic acid 3-(3-Hydroxyphenyl)propionic acid	<i>C. orbiscidens, Eubacterium oxidoreducens</i> <i>Eubacterium ramulus</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i>
	Myricetin	2-(3,5-Dihydroxyphenyl)acetic acid 2-(3-Hydroxyphenyl)acetic acid	<i>C. orbiscidens, E. oxidoreducens</i>
Flavanones	Naringenin	3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid	<i>Clostridium</i> strains <i>E. ramulus</i>
Flavan-3-ols	Catechin	3-(3-Hydroxyphenyl)propionic acid	<i>Clostridium coccoides, Bifidobacterium</i> spp.
	Epicatechin	5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone 5-(3,4-Dihydroxyphenyl)valeric acid 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionic acid	
	Epigallocatechin	5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone 5-(3',5'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone	
Anthocyanins	Cyanidin	3,4-Dihydroxybenzoic acid	<i>Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus</i> LA-5, <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12
	Peonidin	3-Methoxy-4-hydroxybenzoic acid	
	Pelargonidin	4-Hydroxybenzoic acid	
	Malvidin	3,4-Dimethoxybenzoic acid	
Isoflavones	Daidzein	(S)-Equol	<i>Bacteroides ovatus, Streptococcus intermedius, Ruminococcus productus, Eggerthella</i> sp.Julong 732, <i>Enterococcus faecium</i> EPI1, <i>Lactobacillus mucosae</i> EPI2, <i>Fingoldia magna</i> EPI3
	Genistein	O-Demethylangolensin	<i>Clostridium</i> spp. HGHA136
	Formononetin	6'-Hydroxy-O-desmethylanholensin	
	Biochanin A	Daidzein Genistein	
Flavones	Luteolin, apigenin	3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid, 3-(3-hydroxyphenyl)-propionic acid, and 4-hydroxycinnamic acid, phloretin	<i>C. orbiscidens, Enterococcus avium</i>

Εικόνα 49: Οι κύριοι μεταβολίτες των φλαβονοειδών, όπως προκύπτουν μετά τη μετατροπή τους από την εντερική μικροχλωρίδα (Laura Marín et al, 2015).

Όλες αυτές οι τροποποιήσεις επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη βιολογική δράση των πολυφαινολών και κατά συνέπεια, οι ενώσεις που φθάνουν στα κύτταρα και στους ιστούς να είναι χημικά, βιολογικά και σε πολλές περιπτώσεις λειτουργικά διαφορετικές από την αρχική μορφή ((Massimo D'Archivio, 2010). Ως αποτέλεσμα της χαμηλής απορρόφησης, της εκτεταμένης βιομετατροπής και της απέκκρισης των μεταβολιτών, οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στο πλάσμα και στους ιστούς παραμένουν σχετικά χαμηλές (D. K. Gessner et al, 2016). Συνοψίζοντας τα παραπάνω, μπορούμε να πούμε ότι η έκταση, ο ρυθμός απορρόφησης και συνεπώς η βιοδιαθεσιμότητα των φυτικών πολυφαινολών, επηρεάζεται καθοριστικά από τη χημική τους δομή, το βαθμό πολυμερισμού τους ή τη σύζευξή τους με

συστατικά του φυτικού κυττάρου, ενώ δεν είναι απαραίτητο οι πιο άφθονες πολυφαινόλες στα φυτικά είδη να είναι εκείνες με τη μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα (D. K. Gessner et al, 2016). Σε αντίθεση με το μεγάλο αριθμό μελετών που αφορούν τον ανθρώπινο οργανισμό, μελέτες σχετικά με την βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών σε μηρυκαστικά είναι πολύ σπάνιες. Υπάρχουν ωστόσο, ορισμένες που αποδεικνύουν ότι τουλάχιστον ένα μικρό μέρος των πολυφαινολών απορροφώνται από τη διατροφή των μηρυκαστικών. Στα πρόβατα χαρακτηριστικά, έχει παρατηρηθεί πως η συγκέντρωση ορισμένων πολυφαινολών όπως της επικατεχίνης, αυξάνονται στο πλάσμα μετά από τη χορήγηση τεσσάρων διαφορετικών φυτικών εκχυλισμάτων (σταφυλιών, ροσμαρί, εσπεριδοειδών, κατιφέ) πλούσια σε πολυφαινόλες (D. K. Gessner et al, 2016). Σήμερα, η αξιολόγηση της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών πρόσφατα κερδίζει αυξανόμενο ενδιαφέρον, καθώς οι βιομηχανίες εμπλέκονται συνεχώς στην ανάπτυξη νέων προϊόντων, που ορίζονται ως «λειτουργικά», καθώς παρέχουν οφέλη για την υγεία πέρα από τη θρεπτική τους αξία. Ωστόσο, παρά το μεγάλο όγκο των διαθέσιμων δεδομένων, οριστικά συμπεράσματα για τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών δεν έχουν επιτευχθεί, με αποτέλεσμα να κρίνονται αναγκαίες περαιτέρω μελέτες.

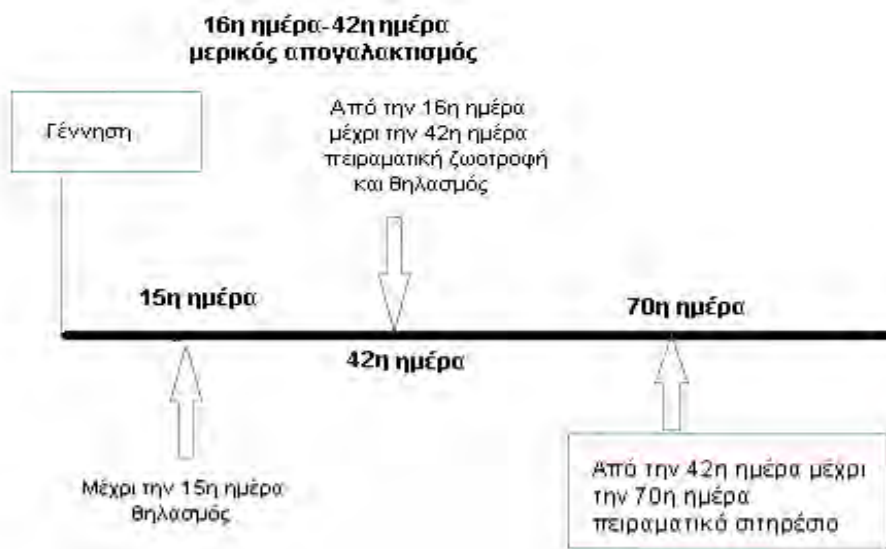
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός

Σκοπός, της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης των στεμφύλων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών, ήπατος και σπλήνας, νεαρών προβάτων, προσδιορίζοντας την ενζυμική δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και την πρωτεϊνική έκφραση της συνθετάσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCS).

Πειραματικό Πλάνο: Εκτροφή και Ανάπτυξη Προβάτων

Για το σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε εκτροφή νεαρών προβάτων, με εφαρμογή σιτηρεσίου και συνθηκών ομαλής διαβίωσης και ανάπτυξης, στις πειραματικές εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής Γιαννιτσών του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ. Συγκεκριμένα, αξίζει να αναφερθεί πως στις σταυλικές εγκαταστάσεις που εκτράφηκαν τα παραγωγικά ζώα η κυκλοφορία του αέρα, η θερμοκρασία και οι συγκεντρώσεις αερίων τηρούνταν μέσα σε όρια που δεν είναι επιβλαβή για τα ζώα. Επίσης οι χώροι καθαρίζονταν σχολαστικά, απομακρύνοντας τα κόπρανα, τα ούρα και τα υπολείμματα τροφής, όσον το δυνατόν ταχύτερα. Κατά διαστήματα παρέχονταν σε όλα τα ζώα, σιτηρέσιο κατάλληλο και προσαρμοσμένο στην ηλικία, το βάρος, τη συμπεριφορά και τις φυσιολογικές τους ανάγκες, ενώ είχαν συνεχή πρόσβαση σε πόσιμο νερό.



Εικόνα 1: Πειραματική διαδικασία εκτροφής – απογαλακτισμού των αναπτυσσόμενων αρνιών.

Συνολικά, επιλέχθηκαν 24 αρσενικά αρνιά φυλής Χίου, ηλικίας περίπου 15 ημερών, από το ποίμνιο του Ινστιτούτου Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής Γιαννιτσών. Τα αρνιά χωρίστηκαν σε δύο (2) ομοιόμορφες πειραματικές ομάδες, ως προς το σωματικό βάρος ($7,99 \pm 1,801$ Kg) και την ηλικία ($15,4 \pm 3,53$ ημέρες). Παρέμειναν με τις μητέρες τους για θηλασμό, μέχρι την ηλικία απογαλακτισμού, σε ομαδικά κελιά και ταυτόχρονα είχαν πρόσβαση στο πειραματικό

μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΜΣΖ) και σανό μηδικής, για κατανάλωση κατά βούληση. Ο πειραματισμός χωρίστηκε σε δύο (2) φάσεις. Στην πρώτη φάση, στην ομάδα του μάρτυρα (ομάδα Α, n=12) χορηγήθηκε σύνθετος ΜΣΖ ανάπτυξης, ενώ στην ομάδα Β (n=12) χορηγήθηκε ΜΣΖ, στο οποίο ενσωματώθηκε ενσίρωμα μίγματος αραβόσιτου και στέμφυλων οινοποιίας, σε αντικατάσταση του καρπού αραβόσιτου. Τα πειραματικά ΜΣΖ ήταν ισοενεργειακά και ισοπρωτεϊνικά και ισόρροπα ως προς τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων αρνιών. Από την έναρξη του πειραματισμού και μέχρι τον απογαλακτισμό (ηλικία 42 ημερών) τα αρνιά είχαν συνεχή πρόσβαση στο πειραματικό σιτηρέσιο σε ξεχωριστό χώρο, στην οποία δεν είχαν πρόσβαση οι μητέρες τους. Τα αρνιά απομακρύνονταν από τις μητέρες τους καθημερινά μια ώρα το πρωί και μια ώρα το απόγευμα κατά τη διάρκεια του ταΐσματος των μητέρων. Στην ηλικία των 42 ημερών πραγματοποιήθηκε ο απογαλακτισμός των αρνιών. Στην ηλικία αυτή έξι αρνιά από κάθε ομάδα οδηγήθηκαν στη σφαγή, ενώ τα υπόλοιπα έξι (6) διατηρήθηκαν μέχρι την ηλικία των 70 ημερών (φάση δεύτερη), που τα ζώα εσφάγησαν. Στη φάση αυτή συνεχίστηκε η χορήγηση στα αρνιά των πειραματικών σιτηρεσίων, για κατανάλωση κατά βούληση. Καθόλη τη διάρκεια του πειραματισμού και στις δύο φάσεις, χορηγούνταν καθημερινά το σιτηρέσιο των αρνιών, η ποσότητα του οποίου αυξανόταν ανάλογα με την κατανάλωση. Σε καθημερινή βάση πριν τη χορήγηση του σιτηρεσίου ζυγίζονταν τα υπολείμματα της τροφής της προηγούμενης μέρας, με σκοπό να καταγραφεί η κατανάλωση τροφής. Τα αρνιά ζυγίζονταν περιοδικά, καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.



Εικόνα 2: Οι εγκαταστάσεις πειραματισμού με τους αναπτυσσόμενους αμινούς.

Λήψη Ιστών από Ζωτικά Όργανα

Οι σφαγές των προβάτων πραγματοποιήθηκαν από εξειδικευμένο προσωπικό στο σφαγείο του Ινστιτούτο Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής Γιαννιτσών, 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.

Οι ιστοί ήπαρ και σπλήνα, 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 3: Συλλογή, αποθήκευση και διατήρηση των ιστών.

Παρασκευή Βιολειτουργικής Ζωοτροφής

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η διατροφή σήμερα αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στη ζωική παραγωγή καθώς δεν επηρεάζει μόνο την υγεία και την παραγωγικότητα των αγροτικών ζώων, αλλά και το κόστος παραγωγής των παραγόμενων κτηνοτροφικών προϊόντων. Η ορθή επιλογή και κατάρτιση των ζωοτροφών απαιτεί την ακριβή γνώση της θρεπτικής τους αξίας, ώστε να καλύπτουν επαρκώς τις διατροφικές ανάγκες των ζώων, συμπεριλαμβάνοντας 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 της παρακάτω βιολειτουργικής ζωοτροφής, χρησιμοποιήθηκαν συστατικά που περιέχουν όλες τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες που πληρούν τις ενεργειακές ανάγκες και εξασφαλίζουν την υγεία των προβάτων καθώς επίσης ενσωματώθηκαν, ως πρόσθετες ύλες, βιοδραστικά συστατικά φυτικής και ζωικής προέλευσης με αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική δράση. Η διατροφή των προβάτων με τις συγκεκριμένες βιολειτουργικές ζωοτροφές αναμένουμε να βοηθήσει σημαντικά ειδικότερα στην ηλικία απογαλακτισμού όπου τα νεαρά ζώα είναι επιρρεπή σε ασθένειες λόγω της μειωμένης αντιοξειδωτικής τους άμυνας και εξαιτίας του στρες απογαλακτισμού. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν δύο είδη σιτηρεσίων, πριν τον απογαλακτισμό και μετά τον απογαλακτισμό: το κανονικό σιτηρέσιο (χορήγηση σε ομάδα Α, ελέγχου-control) και το σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με ενσίρωμα στέμφυλων (χορήγηση σε ομάδα Β). Η σύσταση του σιτηρεσίου για την ομάδα control (Α) είναι: καλαμπόκι, γάλα φυράματος, σογιάλευρο, πίτυρα, ισορροπιστής αρνιών,

μονοφωσφορικό ασβέστιο, μαρμαρόσκονη, άλας ενώ για την ομάδα (B): καλαμπόκι ενσιρωμένο με εκχύλισμα στεμφύλων, γάλα φυράματος, σογιάλευρο, πίτυρα, ισορροπιστής αρνιών, μονοφωσφορικό ασβέστιο, μαρμαρόσκονη και άλας, με τα ακριβή ποσοστά αυτών να παρουσιάζονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες.

ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟΥ ΟΜΑΔΑΣ ΜΑΡΤΥΡΑ		ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟΥ ΟΜΑΔΑΣ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ	
ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%	ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%
ΚΑΡΠΟΣ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ	45	ΕΝΣΙΡΩΜΑ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ & ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ	45
ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ	9	ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ	9
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	21	ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	21
ΓΑΛΑ	20	ΓΑΛΑ	20
ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5	ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5
ΑΛΑΣ	0,5	ΑΛΑΣ	0,5
ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ	1,2	ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ	1,2
ΦΩΣΦ.	0,8	ΦΩΣΦ. ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ	0,8
ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ			

Πίνακας 1: Πειραματικό ΜΣΖ που χορηγήθηκε στα αναπτυσσόμενα αρνιά της ομάδας του μάρτυρα και της ομάδας στεμφύλων, μέχρι τον απογαλακτισμό.

ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟΥ ΟΜΑΔΑΣ ΜΑΡΤΥΡΑ		ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟΥ ΟΜΑΔΑΣ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ	
ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%	ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%
ΚΑΡΠΟΣ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ	45	ΕΝΣΙΡΩΜΑ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ & ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ	45
ΚΑΡΠΟΣ ΣΙΤΟΥ	13	ΚΑΡΠΟΣ ΣΙΤΟΥ	13
ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ	15	ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ	15
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	18	ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	18
ΗΛΙΑΛΕΥΡΟ	4	ΗΛΙΑΛΕΥΡΟ	4
ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5	ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5
ΑΛΑΣ	0,5	ΑΛΑΣ	0,5
ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ	1,2	ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ	1,2
ΦΩΣΦ.	0,8	ΦΩΣΦ. ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ	0,8
ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ			

Πίνακας 2: Πειραματικό ΜΣΖ που χορηγήθηκε στα αναπτυσσόμενα αρνιά της ομάδας του μάρτυρα και της ομάδας των στέμφυλων μετά τον απογαλακτισμό.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΝΣΙΡΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ

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. 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.



Εικόνα 4: Διαδικασία συσκευασίας του ενσιρώματος στεμφύλων.

Το ενσιρωμένο καλαμπόκι περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας, οργανικά οξέα, όπως γαλακτικό οξύ και χορηγείται στα ζώα σαν χονδροειδής ζωοτροφή. Με την ανάμειξη των συστατικών το ενσίρωμα τοποθετήθηκε σε σακούλες κενού αέρος και ακολούθησε η διαδικασία ζύμωσης, χάριν στη προσθήκη βακτηρίων (*Lactobacillus*) τα οποία επιβιώνουν σε αναερόβιες συνθήκες. 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. Το pH του τελικού ενσιρώματος, θα πρέπει να είναι μικρότερο του 4,1 για τη διατήρηση των όξινων συνθηκών που εξασφαλίζουν την διατήρηση της υγρασίας και της γεύσης του. Γι' αυτό το σκοπό ανά τακτά χρονικά διαστήματα, λαμβάνονταν δείγματα με σκοπό τη μέτρηση και τη ρύθμιση του pH. Ο προσδιορισμός του έγινε με 2 μεθόδους. Στην πρώτη μέθοδο έγινε αραιώση 1/10 του ενσιρώματος. Δηλαδή σε 1 γραμμάριο ενσιρώματος προστέθηκαν 9 ml απεσταγμένου νερού και το μίγμα αναδεύθηκε έντονα με vortex για τουλάχιστον 20 λεπτά, με την τιμή του pH τελικά να είναι 3,82. Με την δεύτερη μέθοδο έγινε αραιώση 1/2 του ενσιρώματος. Δηλαδή σε 5 γραμμάρια ενσιρώματος προστέθηκαν 5 ml απεσταγμένου νερού και ανάλογα όπως αναφέρθηκε πιο πάνω ακλούθησε έντονη ανάδευση με vortex για τουλάχιστον 20 λεπτά. Τέλος μετρήθηκε το pH με την τιμή του να είναι 3,80, παρόμοια σε σχέση με την πρώτη μέθοδο. Χωρίς να παρουσιάζονται λοιπόν σημαντικές διαφορές στην τιμή του pH, τελικά η διαδικασία ολοκληρώθηκε με τον τερματισμό της παραγωγής του διοξειδίου του άνθρακα από τα βακτήρια, με το τελικό προϊόν να χαρακτηρίζεται από την μη

παρουσία διοξειδίου, από σκούρο χρώμα, από μεγάλα ποσοστά υγρασίας και οργανικών οξέων, όπως το γαλακτικό οξύ.

ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΕΝΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ

Η αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των πειραματικών ζωοτροφών πραγματοποιήθηκε, σύμφωνα τη μέθοδο προσδιορισμού εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH και τη μέθοδο εκτίμησης της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS, τόσο για την ζωοτροφή control όσο και για την εμπλουτισμένη ζωοτροφή. Με τη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH, η ημιμέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC50) της εμπλουτισμένης ζωοτροφής με τα υποπροϊόντα οινοποίησης (στέμφυλα), βρέθηκε ίση με IC50= 11,9 mg/ml, παρουσιάζοντας διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου με IC50= 25,5 mg/ml, ενώ με την μέθοδο της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS τα πειραματικά σιτηρέσια είχαν IC50=12 mg/ml και IC50=5,6 mg/ml, αντίστοιχα (I. Kafantaris et al., 2016). Αυτές οι διαφοροποιήσεις οφείλονται στο γεγονός πως τα βιοδραστικά συστατικά των ζωοτροφών εξουδετερώνουν με διαφορετικό τρόπο την ρίζα του ABTS σε σχέση με εκείνη του DPPH. Ωστόσο, και στις δύο μεθόδους η δραστηριότητα της ζωοτροφής που είναι εμπλουτισμένη με τα στέμφυλα είναι περίπου διπλάσια σε σχέση με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου (I. Kafantaris et al., 2016).

Μέθοδοι και Υλικά

1.ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ

Οι ιστοί, ήπαρ και σπλήνα, υποβλήθηκαν σε κατάλληλη επεξεργασία και ομογενοποίηση προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στις πειραματικές τεχνικές. Ειδικότερα, για τις μεθόδους προσδιορισμού της δραστηριότητας της SOD και της GST, οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε Phosphate Buffer 0.1 M (100 mg ιστού/0.5 ml), με pH 7.4 που περιείχε 0.1 M K₂HPO₄ και 0.1 M KH₂PO₄ και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH). Ακολούθως, το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους (sonication) για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε (10.000g-15min-4°C). Η λήψη και η φύλαξη του υπερκείμενου πραγματοποιήθηκε σε φιαλίδια Eppendorf των 1.5 mL, τα οποία ψύχθηκαν αμέσως και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.

Ειδικά για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής έκφρασης του ενζύμου GCS με τη μέθοδο Western blot, οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε Cytosolic Lysis Buffer 10 mM (100 mg ιστού/ml), με pH 7,9 που περιείχε 10 mM HEPES, 10 mM KOH, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM

DTT και 0,5% NP-40. Αυτό το buffer έχει την ικανότητα να διαλυτοποιεί τις πρωτεΐνες πιο αποτελεσματικά και ως εκ τούτου είναι πιθανότερο να δώσει υψηλότερη απόδοση. Γι' αυτό το λόγο, εν συνεχεία τα ομογενοποιημένα δείγματα ανακινούνται για 45λεπτά σε πάγο, χωρίς επεξεργασία με υπερήχους. Τέλος, ακολουθεί φυγοκέντρηση (12.000 rpm-20 min-4°C) και μεταφορά του υπερκείμενου σε φιαλίδια Eppendorf των 1.5 mL, τα οποία διατηρούνται στους -80°C.

2.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ BRADFORD

Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης μέσω του αντιδραστήριου Bradford. Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστήριου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm (Bradford, 1976).

Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/mL ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 µg/mL. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20 µL διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 mL διαλύματος αντιδραστήριου Bradford. Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επώάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20 µL Phosphate Buffer/Cytosolic Lysis Buffer και 1 mL διαλύματος αντιδραστήριου Bradford. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 50-1400 αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20 µL προστίθενται κάθε φορά σε 1 mL διαλύματος αντιδραστήριου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

3.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ SOD

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD στα δείγματα βασίστηκε στη μέθοδο του νιτροτετραζολιακού άλατος (NBT) σύμφωνα με τους Oberly & Spitz (1984). Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) καταλύει την αναγωγή της ρίζας υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) σε υπεροξείδιο του

υδρογόνου (H_2O_2) και νερό (H_2O). Ως εκ τούτου αυτό το ένζυμο αποτελεί σημαντική άμυνα του οργανισμού έναντι τις τοξικότητας των ελεύθερων ριζών. Σ' αυτή τη μέθοδο, τα ιόντα υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot -}$), που παράγονται κατά τη μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό και υπεροξείδιο του υδρογόνου από την οξειδάση της ξανθίνης (XOD), μετατρέπουν το νιτροτετραζολιακό άλας (NBT) σε νιτροτετραζολιακό άλας-διφορμαζάνη (NBT-diformazan), η οποία απορροφά στα 560 nm. Η παρουσία του ενζύμου της SOD στο δείγμα, έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης των ιόντων υπεροξειδίου και ως εκ τούτου το ποσοστό σχηματισμού NBT-διφορμαζάνης. Η έκταση αυτής της μείωσης σχηματισμού NBT-διφορμαζάνης, αποτελεί μέτρο της δραστηριότητας της SOD στο πειραματικό δείγμα.

Πιο αναλυτικά, 800 μl Buffer Master Mix (1.34 mM DETAPAC Buffer σε 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.8); 2.24 mM NBT; 10^{-4} M ξανθίνης) αναμιγνύονται με 100 μl 1.34 mM DETAPAC Buffer. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε κυψελίδα και γίνεται μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου. Έπειτα στην κυψελίδα προστίθενται ~60 mU οξειδάσης της ξανθίνης και μετράται η μεταβολή στην απορρόφηση για 3 min στα 560 nm. Ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης καταγράφεται και χρησιμοποιείται ως ο ρυθμός του μάρτυρα (control rate). Στη συνέχεια 100 μl ιστού προστίθενται σε 800 μl Buffer Master Mix και γίνεται μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου. Έπειτα προστίθενται ~60mU οξειδάσης της ξανθίνης και μετράται η μεταβολή στην απορρόφηση για 3 min στα 560 nm. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μέτρηση απαιτεί >10μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Οι ιστοί ήπαρ και σπλήνα, αραιώθηκαν κατά 1:3 με 1.34 mM DETAPAC Buffer.

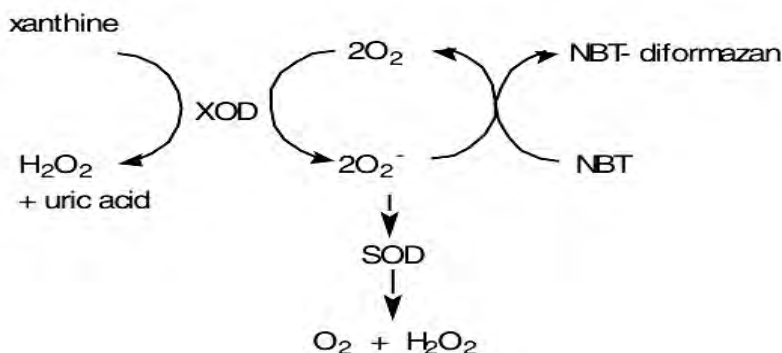
Το ποσοστό αναστολής υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = [(control \text{ rate} - sample \text{ rate}) / control \text{ rate}] \times 100 / C_{\delta}$$

Control rate: Ο ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης του μάρτυρα ανά λεπτό.

Sample rate: Ο ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης του δείγματος ανά λεπτό.

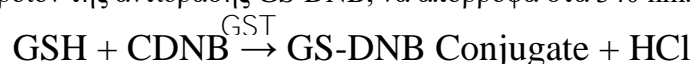
C_{δ} : Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.



Εικόνα 5: Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD στα δείγματα βασίστηκε στη μέθοδο του νιτροτετραζολιακού άλατος (NBT) σύμφωνα με τους Oberly & Spitz (1984).

4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ GST

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST βασίστηκε στη μέθοδο των Habig et al. (1974). Βασική αρχή της μεθόδου, είναι πως η GST καταλύει την σύζευξη της L-γλουταθειόνης με το CDNB (1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο), μέσω της θειολικής ομάδας της γλουταθειόνης, με αποτέλεσμα το προϊόν της αντίδρασης GS-DNB, να απορροφά στα 340 nm.



Πιο αναλυτικά, αναμιγνύονται 920 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (100 mM, pH 7.4) με 50 μl GSH (1 mM) και 20 μl CDNB (1 mM) και τα δείγματα επωάζονται για 5 min στους 30°C. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 10 μl ιστού και μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης στα 340 nm για 3 min. Ο ιστός του ήπατος αραιώνεται πριν προστεθεί κατά 1:3 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (100 mM, pH 7.4), ενώ για το σπλήνα αντί για 10 μl ιστού προστίθενται 20 μl και αντίστοιχα 910 μl ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (100 mM, pH 7.4). Τα δείγματα που δεν περιέχουν ιστό αποτελούν το τυφλό. Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου πραγματοποιείται με το τυφλό. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μεταβολή της απορρόφησης βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης της GST με το υπόστρωμα (CDNB). Αυτό σημαίνει πως η μεταβολή της οπτικής απορρόφησης οφείλεται στην δημιουργία του συμπλόκου CDNB-GST, που ανιχνεύεται στα 340nm μετά από 3 λεπτά αντίδρασης. Η δραστηριότητα της GST υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του CDNB.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τα Unit της GST του δείγματος ανά mg της πρωτεΐνης του δείγματος. Η μέτρηση απαιτεί >10μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα.

Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$U \text{ GST} / \text{mg πρωτεΐνης} = [(\Delta A_{\text{δείγματος}} / \text{min} / 0.0096) \times \Sigma A_{\text{δείγματος}}] / C_{\delta}$$

$\Delta A_{\text{δείγματος}} / \text{min}$: Η μέση τιμή της μεταβολής της απορρόφησης ανά min.

$\epsilon_{240} \text{CDNB}$ ($\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 0.0096 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του CDNB.

$\Sigma A_{\text{δείγματος}}$: Συντελεστής αραιώσης του δείγματος ιστού.

C_{δ} : Η συγκέντρωση mg/ml της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ENZYMΟΥ GCS ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ WESTERN BLOT

Η τεχνική Western blotting (ή ανοσοαποτύπωση) είναι μια σημαντική τεχνική που χρησιμοποιείται στην κυτταρική και μοριακή βιολογία. Χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση και ανάλυση πρωτεϊνών βασισόμενη στην ικανότητα τους να συνδέονται με ειδικά αντισώματα. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Towbin et al. (1979) και έκτοτε έχει γίνει μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους της έρευνας. Χρησιμοποιώντας

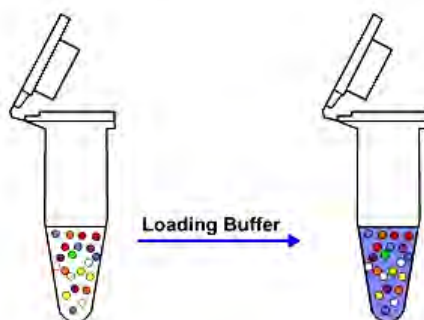
αυτή την τεχνική οι επιστήμονες μπορούν να προσδιορίσουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες από ένα μίγμα πρωτεϊνών που εξάγεται από κύτταρα ή δείγματα ιστού όπως στη συγκεκριμένη περίπτωση. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί τρεις συνιστώσες για να ολοκληρωθεί: 1) διαχωρισμός βάσει μεγέθους, 2) μεταφορά σε στερεό υπόστρωμα και 3) σήμανση της πρωτεΐνης με το κατάλληλο πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα.

Στη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, το μίγμα της πρωτεΐνης εφαρμόζεται σε πηκτική ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE, native PAGE, ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων) για την ταξινόμηση των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθος, το φορτίο ή άλλες διαφορές στις επιμέρους πρωτεϊνικές ζώνες. Οι διαχωρισμένες πρωτεϊνικές ζώνες στη συνέχεια μεταφέρονται σε μια μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης, PVDF). Αυτή η διαδικασία ονομάζεται στύπωση. Οι πρωτεΐνες προσκολλώνται στη μεμβράνη με το ίδιο μοτίβο όπως είχαν διαχωριστεί. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες είναι προσβάσιμες στην πρόσδεση αντισωμάτων για ανίχνευση.

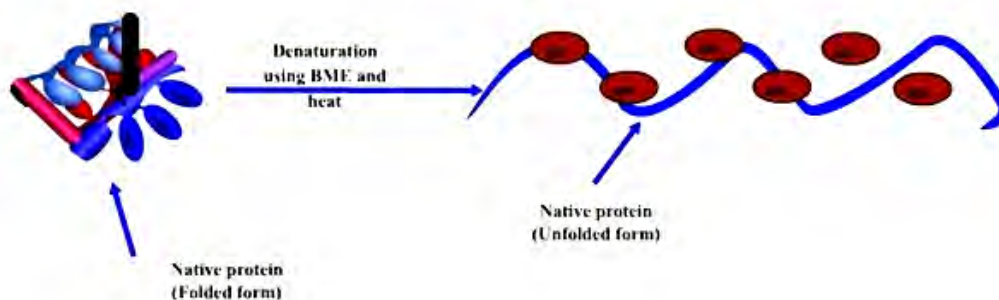
Η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα:

Βήμα 1: Προετοιμασία δείγματος

Το πρώτο βήμα στην προετοιμασία δείγματος είναι η απομόνωση της πρωτεΐνης από το δείγμα ιστού, ήπαρ ή σπλήνα. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η πρωτεϊνική συγκέντρωση του δείγματος. Έπειτα στο δείγμα προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα (συνήθως Laemmli buffer) που περιέχει SDS, γλυκερόλη και β-μερκαπτοαιθανόλη (BME).

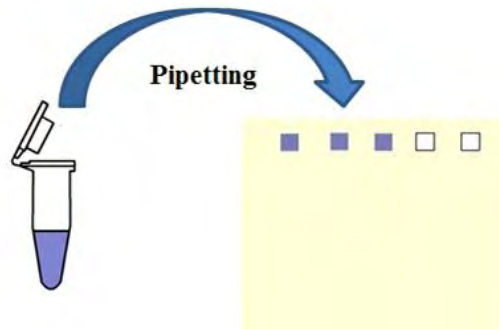


Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται και θερμαίνονται για 3 λεπτά κοντά στο σημείο βρασμού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μετουσίωση των πρωτεϊνών και τελικά την πρόσδεσή τους με το SDS.

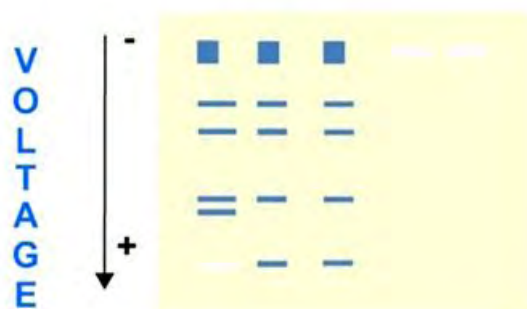


Βήμα 2: SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Αρχικά τα δείγματα τοποθετούνται στα πηγαδάκια στην κορυφή του τζελ. Ένας δείκτης μοριακού βάρους συνήθως φορτώνεται σε ένα από τα πηγαδάκια, το οποίο καθορίζει το μοριακό βάρος των άλλων πρωτεϊνών στο πήκτωμα. Το πρωτεϊνικό μέγεθος μετράται σε kilodaltons (kDa). Η γλυκερόλη που περιέχεται στα δείγματα τα βοηθάει να βυθίζονται στα πηγαδάκια και το μπλε χρώμα επιτρέπει την οπτικοποίηση των δειγμάτων καθώς το τζελ τρέχει.

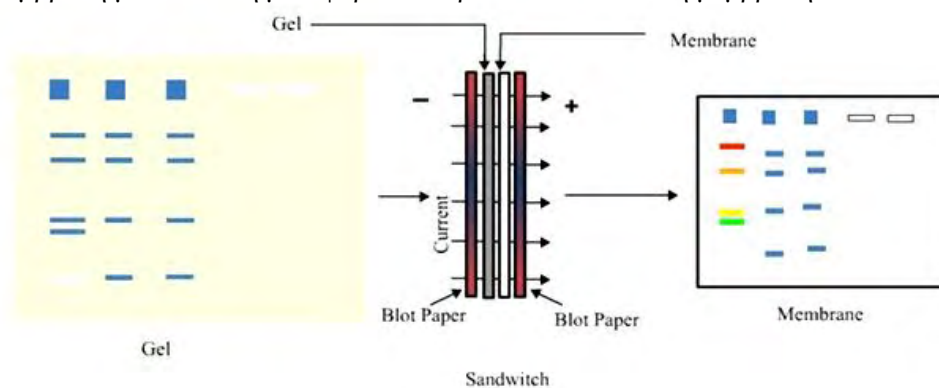


Μόλις φορτωθεί ο δείκτης και τα δείγματα, εφαρμόζεται τάση ρεύματος (~ 150 V) στην πηκτή ηλεκτροφόρησης. Καθώς ο πόλος στην κορυφή της πηκτής είναι αρνητικός και στην άλλη άκρη είναι θετικός, επειδή οι πρωτεΐνες έχουν προσδεθεί με το αρνητικά φορτισμένο SDS μετακινούνται διαμέσου της πηκτής προς τον θετικό πόλο.



Βήμα 3: Μεμβρανική μεταφορά

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα τοποθετείται απέναντι σε μια μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης ή PVDF). Στη συνέχεια ρεύμα διέρχεται διαμέσου του πηκτώματος προς την μεμβράνη με σκοπό τη μεταφορά των πρωτεϊνών πάνω στη μεμβράνη.

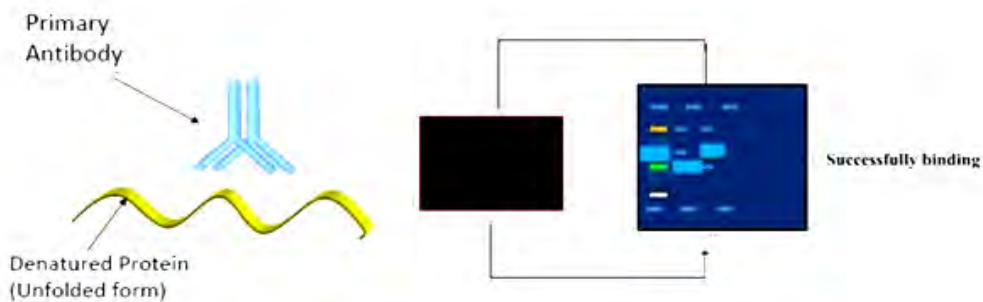


Βήμα 4: Ανοσοαποτύπωση

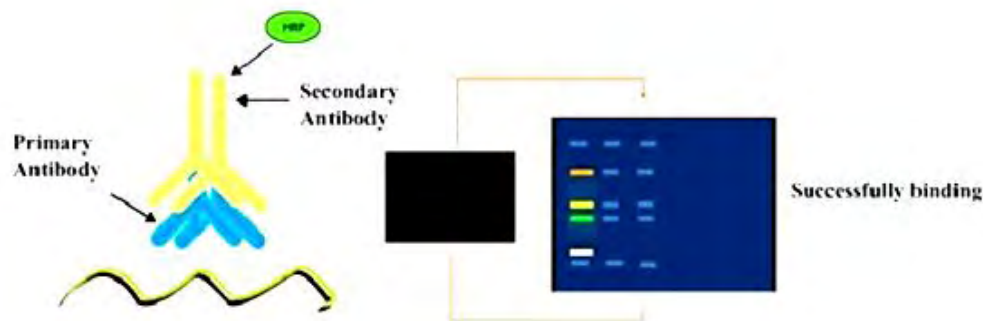
Το πρώτο βήμα στην ανοσοαποτύπωση είναι το πλύσιμο και μπλοκάρισμα της μεμβράνης με μια μη-ειδική πρωτεΐνη. Η μη-ειδική πρωτεΐνη προσδένεται στην επιφάνεια της μεμβράνης όπου η πρωτεΐνη δεν είναι παρούσα και έτσι αποτρέπει την πρόσδεση του αντισώματος και την εμφάνιση μη-ειδικού σήματος.



Στη συνέχεια προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα στο διάλυμα που βρίσκεται η μεμβράνη, το οποίο αναγνωρίζει μια ειδική αμινοξική αλληλουχία μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης.



Στη συνέχεια πραγματοποιείται πλύση για να απομακρυνθεί το αδέσμευτο πρωτογενές αντίσωμα και προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα. Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει το πρωτογενές και συνήθως είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP.

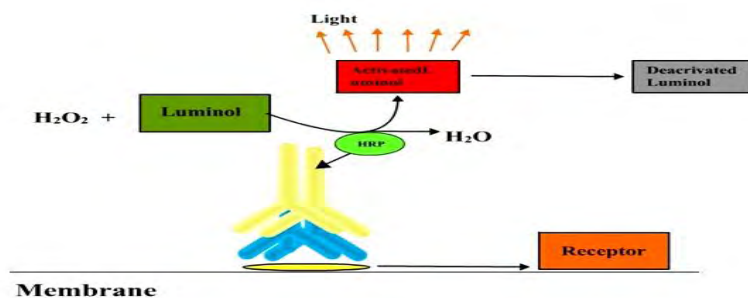


Τέλος, πραγματοποιείται πλύση για την απομάκρυνση του αδέσμευτου δευτερογενούς αντισώματος. Μη-ειδική δέσμευση των πρωτογενών και των δευτερογενών αντισωμάτων μπορεί να συμβεί αλλά οι πλύσεις ελαχιστοποιούν αυτό το πρόβλημα. Ο χρόνος επώασης του

πρωτογενούς και του δευτερογενούς αντισώματος επηρεάζει άμεσα την ειδικότητα και την ισχύ της δέσμευσης.

Βήμα 5: Ανίχνευση

Η μέθοδος ανίχνευσης βασίζεται στο ένζυμο με το οποίο είναι συζευγμένο το δεύτερο αντίσωμα. Το πιο κοινό ένζυμο που χρησιμοποιείται στη μέθοδο Western blotting είναι το HRP και το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι γνωστό ως υπόστρωμα χημειοφωταύγειας.



Όταν το υποστρώμα προστεθεί, το φως που εκπέμπεται μπορεί να ανιχνευθεί είτε με τη χρήση φιλμ είτε με τη χρήση ενός απεικονιστή εικόνων.



Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων της GCS χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης, όπως περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα ιστών, ήπατος και σπλήνας που χρησιμοποιήθηκαν για την τεχνική, περιείχαν 30 mg πρωτεΐνης. Σ' αυτά προστέθηκε 6X Loading buffer και ακολούθησε θέρμανση κοντά στο σημείο βρασμού για 3 min. Στη συνέχεια τα προς ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικά δείγματα "φορτώνονται" και διαχωρίζονται σε 6-10% SDS-PAGE πηκτή ακρυλαμίδης για 45-60 min με τάση ρεύματος 150 V. Η πηκτή ακρυλαμίδου διακρίνεται σε δύο επιμέρους μέρη: στο πρώτο τμήμα ή πηκτή πακεταρίσματος (stacking gel), όπου πακετάρονται τα δείγματα των πρωτεϊνών πριν διαχωριστούν. Η πηκτή πακεταρίσματος έχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμίδης (5%) (ddH₂O, Tris 0.5 M pH 6.8, 30% ακρυλαμίδη, 10% SDS, 10% APS, TEMED), ανεξάρτητο από το μέγεθος των προς ανάλυση πρωτεϊνών. Στο δεύτερο τμήμα ή πηκτή διαχωρισμού (separating/ resolving gel) (ddH₂O, Tris 1.5 M pH 8.8, 30% ακρυλαμίδη, 10% SDS, 10% APS, TEMED), της οποίας το ποσοστό ακρυλαμίδης εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των μορίων προς διαχωρισμό. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί μεταφορά και καθήλωση των ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων μορίων από την πηκτή

ακρυλαμιδίου σε μεμβράνη (PVDF). Συγκεκριμένα, το πήκτωμα τοποθετείται μέσα σε μία κασετίνα που περιέχει τα εξής υλικά με την ακόλουθη σειρά: σφουγγαράκι, διηθητικό χαρτί Whatman, το πήκτωμα και από πάνω τη μεμβράνη PVDF, διηθητικό χαρτί Whatman και σφουγγαράκι. Κλείνουμε την κασετίνα και τοποθετείται σε μια ειδική θήκη μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ηλεκτροφορείται για 2 h με τάση ρεύματος τα 110 V. Μετά την επιτυχή μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη, η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα 1× TBST (50 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης στους 4°C overnight. Την επόμενη ημέρα η μεμβράνη επωάζεται για 1 h με το πρωτογενές αντίσωμα γ -GCSs (H-300) (rabbit polyclonal IgG) της εταιρίας Santa Cruz Biotechnology σε διάλυμα 1× TBST (10 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης με ταυτόχρονη ανάδευση. Ακολουθούν 5 πλύσεις των 5 min η καθεμία με το διάλυμα 1× TBST. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα Goat anti-Rabbit IgG (H+L), της εταιρίας Thermo Fisher Scientific για 30 min σε διάλυμα 1× TBST (10 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης με ταυτόχρονη ανάδευση. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 15 min της μεμβράνης με το διάλυμα 1× TBST. Στη συνέχεια, η μεμβράνη εκτίθεται στο αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας για 1 min και η ανίχνευση επιτυγχάνεται με έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας ευαίσθητο στο μπλε φως (Kodak X-OMAT AR και Kodak Biomax XAR film). Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ εξαρτάται από την ένταση και την ποιότητα του σήματος. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό control. Το ποσό του ανοσοδραστικού προϊόντος σε κάθε γραμμή προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Alpha Innotech.

6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

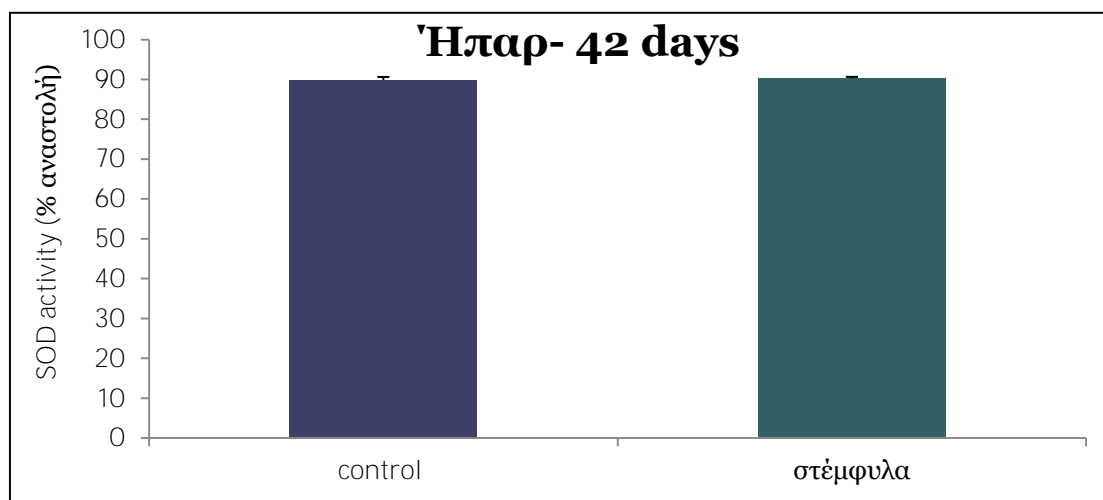
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS). Για τη στατιστική ανάλυση υπολογιζόταν αρχικά για κάθε δείγμα η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard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

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του τεστ του Tukey. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0.05$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

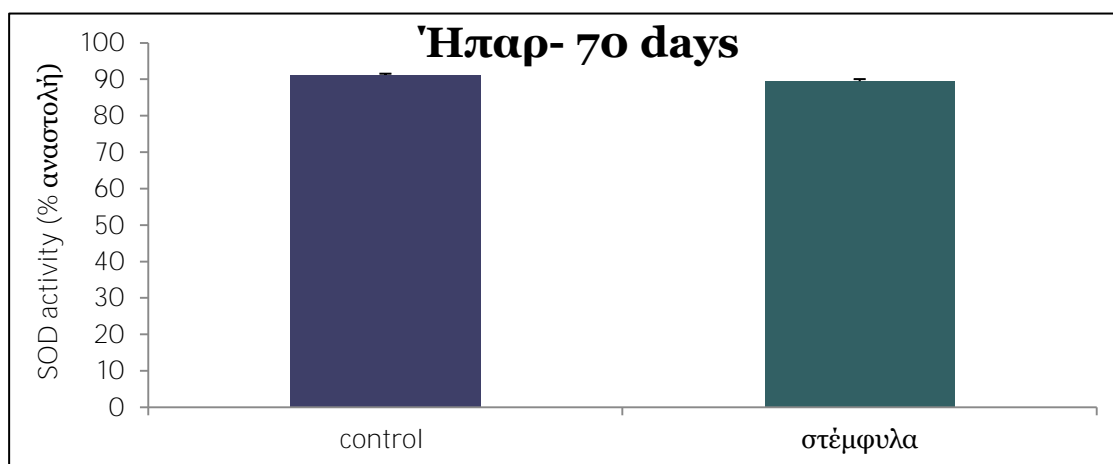
Αποτελέσματα

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ SOD

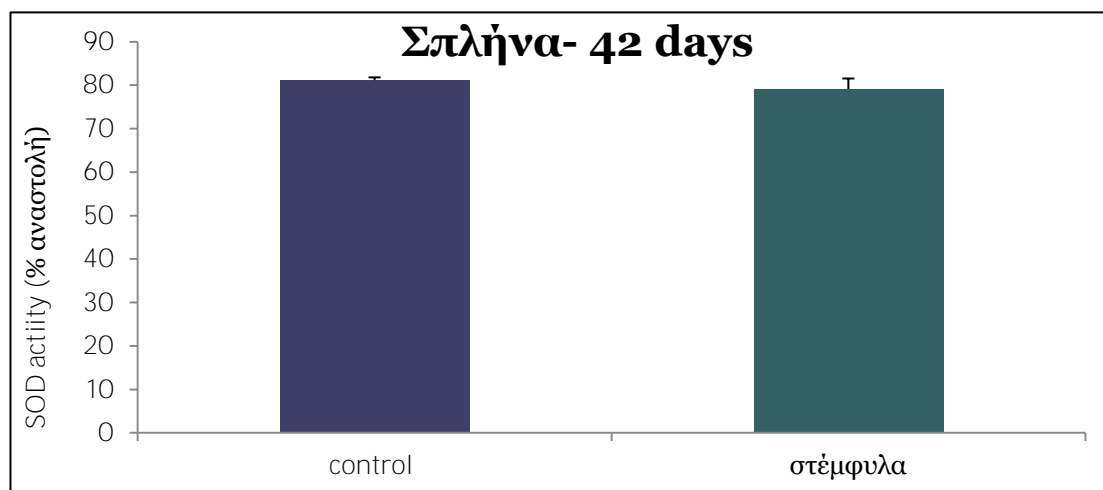
Η % αναστολή της SOD, εκφράζει την ικανότητα του ενζύμου να αναστέλλει το σχηματισμό του NBT-διφορμαζάνης, παρουσία ιόντων υπεροξειδίου, που σχηματίζονται κατά τη μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό και υπεροξείδιο του υδρογόνου, από την οξειδάση της ξανθίνης (XOD). Συνεπώς όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό της %αναστολής, τόσο μεγαλύτερη είναι η δραστικότητα της SOD στο πειραματικό δείγμα. Τόσο στον ιστό του ήπατος όσο και στο σπλήνα, συγκρίνοντας την ομάδα control με την πολυφαινολική ομάδα (στέμφυλα) στις 42 και 70 μέρες, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή (Διάγραμμα 1, 2, 3, 4).



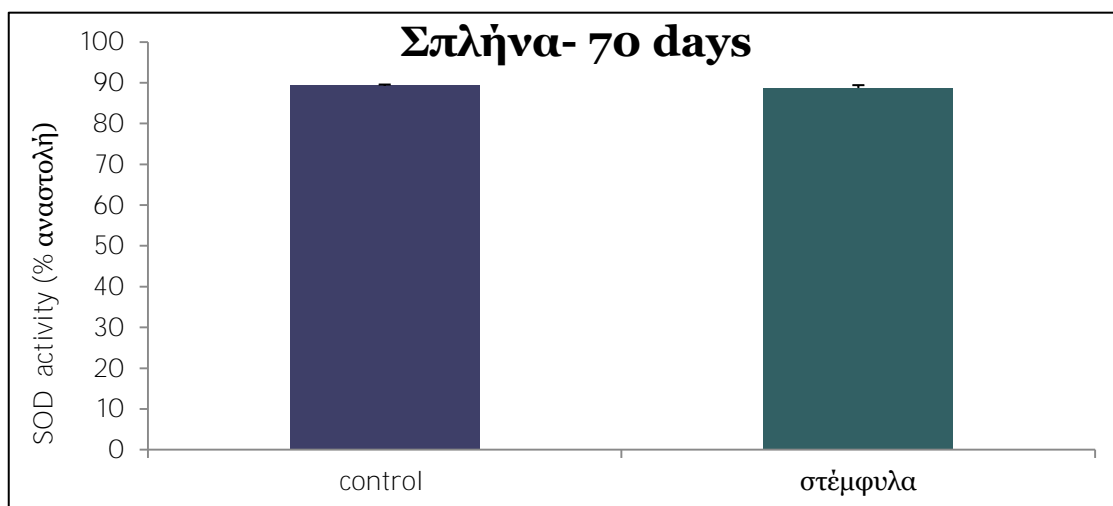
Διάγραμμα 1: Η δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης SOD (% αναστολή) στον ιστό ήπατος, προβάτων ηλικίας 42 ημερών.



Διάγραμμα 2: Η δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης SOD (% αναστολή) στον ιστό ήπατος, προβάτων ηλικίας 70 ημερών.



Διάγραμμα 3: Η δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης SOD (% αναστολή) στον ιστό σπλήνας, προβάτων ηλικίας 42 ημερών.

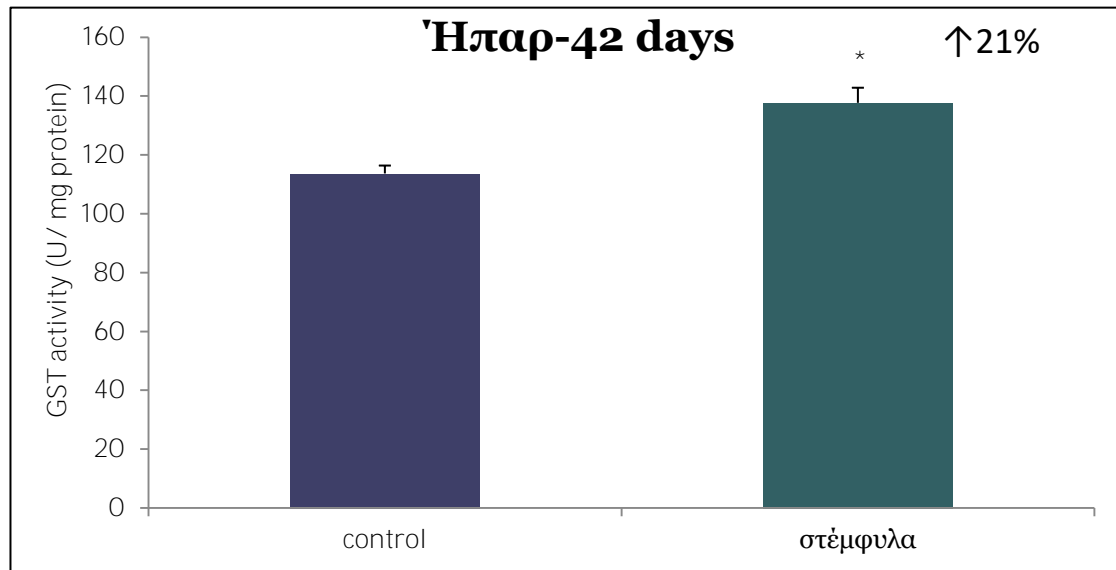


Διάγραμμα 4: Η δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης SOD (% αναστολή) στον ιστό σπλήνας, προβάτων ηλικίας 70 ημερών.

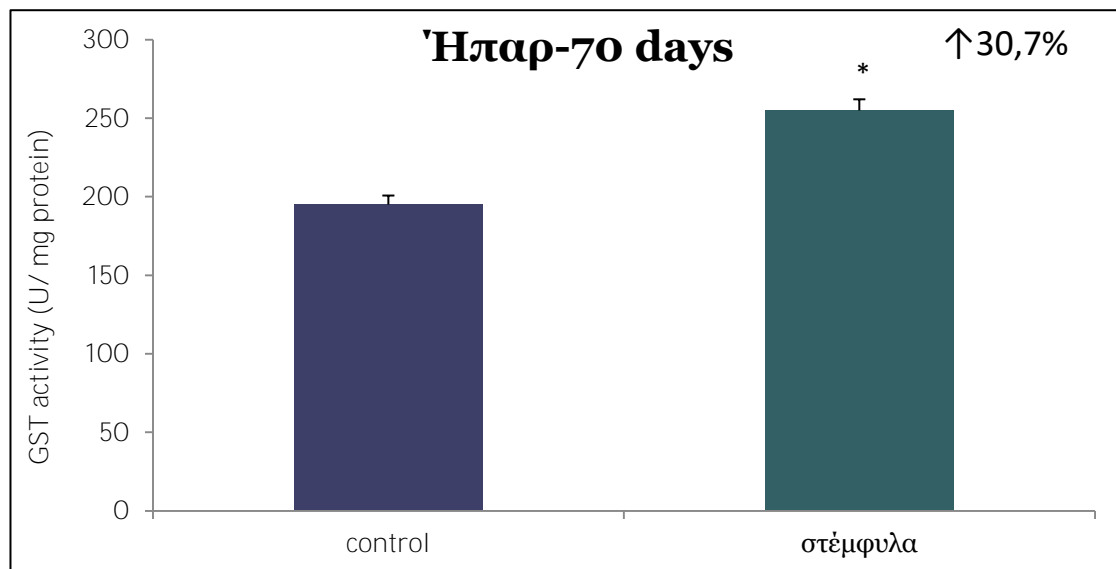
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ GST

Η ενζυμική δραστηριότητα της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), εκφράστηκε ως U GST/ mg πρωτεΐνης, δηλαδή η ποσότητα του ενζύμου της GST που μετατρέπει 1 μmol υποστρώματος ανά λεπτό. Σύμφωνα με τη βασική αρχή της μεθόδου, ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης, είναι ευθέως ανάλογος με τη δραστηριότητα της GST στο πειραματικό δείγμα. Με βάση τα αποτελέσματα που παρατίθενται στα παρακάτω, παρατηρείται όσον αφορά το ήπαρ, συγκρίνοντας την ομάδα control με την πολυφαινολική ομάδα (στέμφυλα), μια στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της GST τόσο στις 42 όσο και στις 70 ημέρες, κατά 21% και 30.7% αντίστοιχα (Διάγραμμα 5, 6). Όσον αφορά το σπλήνα, μεταξύ της ομάδας control και της πολυφαινολικής ομάδας (στέμφυλα), στις 42 ημέρες δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή (Διάγραμμα 7) ενώ στις 70 ημέρες

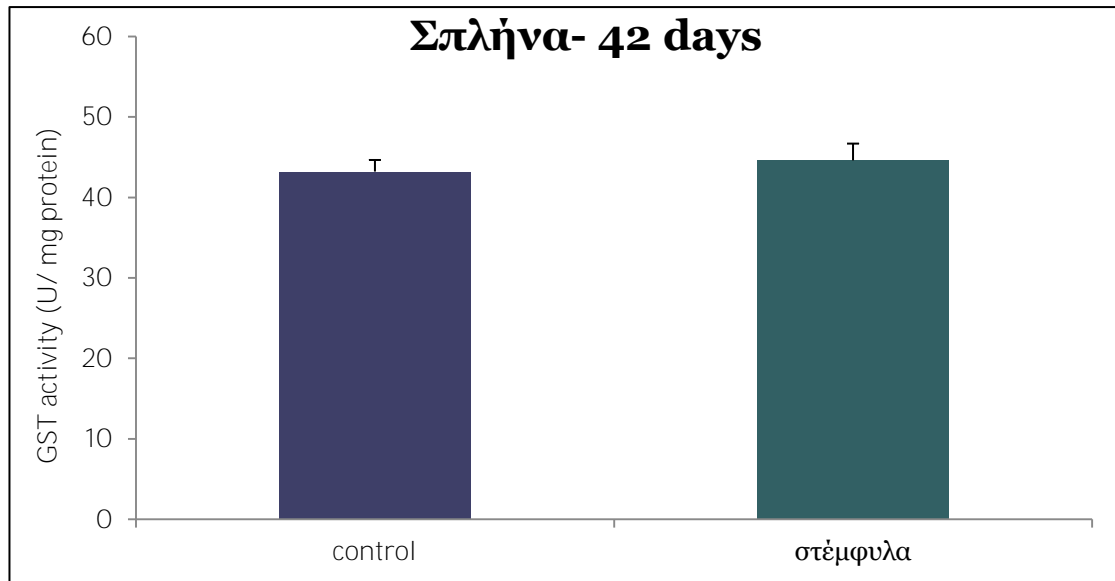
σημειώνεται στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της GST για την πολυφαινολική ομάδα, κατά 29% (Διάγραμμα 8).



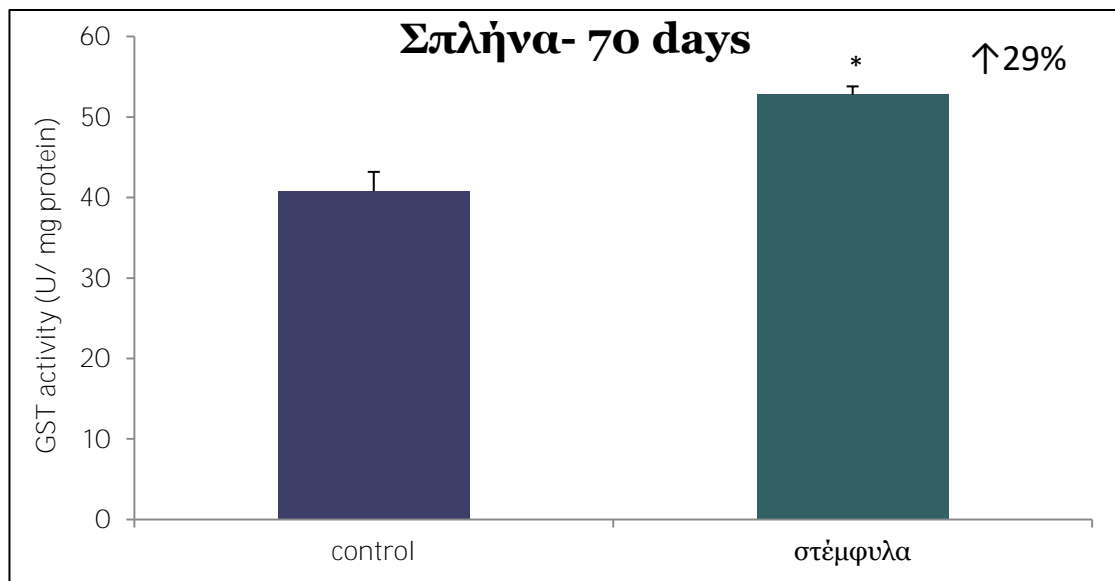
Διάγραμμα 5: Τα επίπεδα δραστηριότητας της S- τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (U/mg πρωτεΐνης), στον ιστό ήπατος, προβάτων ηλικίας 42 ημερών. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control ($p < 0.05$).



Διάγραμμα 6: Τα επίπεδα δραστηριότητας της S- τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (U/mg πρωτεΐνης), στον ιστό ήπατος, προβάτων ηλικίας 70 ημερών. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control ($p < 0.05$).



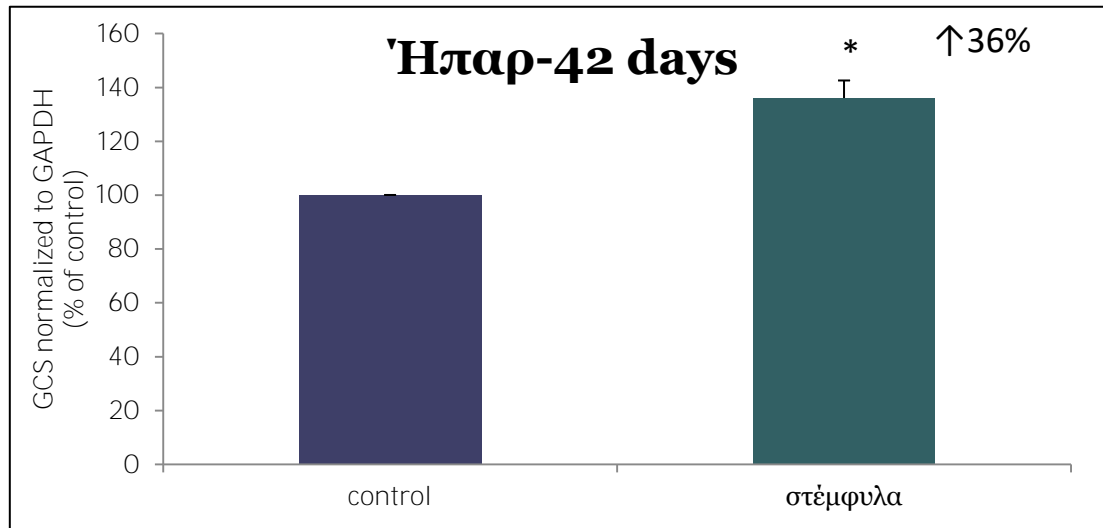
Διάγραμμα 7: Τα επίπεδα δραστικότητας της S- τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (U/mg πρωτεΐνης), στον ιστό σπλήνα, προβάτων ηλικίας 42 ημερών.



Διάγραμμα 8: Τα επίπεδα δραστικότητας της S- τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (U/mg πρωτεΐνης), στον ιστό σπλήνα, προβάτων ηλικίας 70 ημερών. *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control ($p < 0.05$).

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ GCS ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ WESTERN BLOT

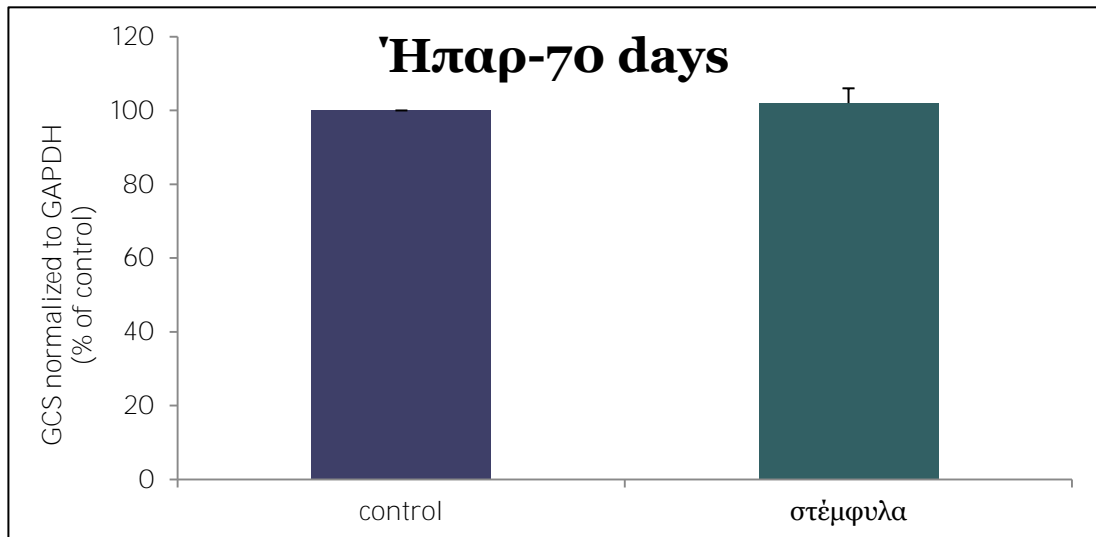
Στο ήπαρ, παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης της GCS, κατά 36% για την πολυφαινολική ομάδα 42 ημερών (Διάγραμμα 9) σε σχέση με την ομάδα control, ενώ στις 70 ημέρες δεν υπήρχε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή (Διάγραμμα 10). Στον σπλήνα, τόσο στις 42 όσο και στις 70 ημέρες δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή (Διάγραμμα 11, 12).



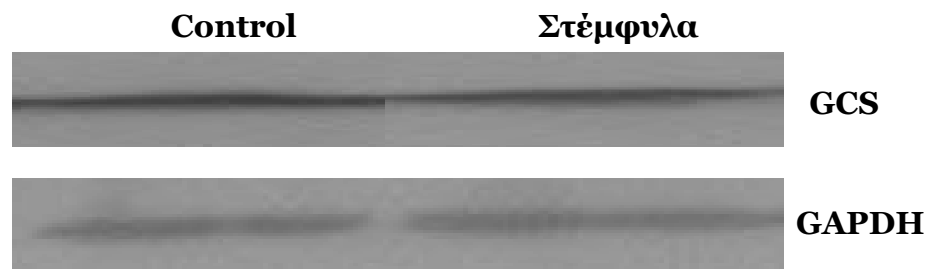
Διάγραμμα 9: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης του ενζύμου συνθετάση της γ- γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), στον ιστό ήπατος προβάτων ηλικίας 42 ημερών, με Western blot. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης είναι εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Οι Στατιστικά Σημαντικές τιμές $*p < 0.05$ ορίζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές Control κάθε ομάδας.



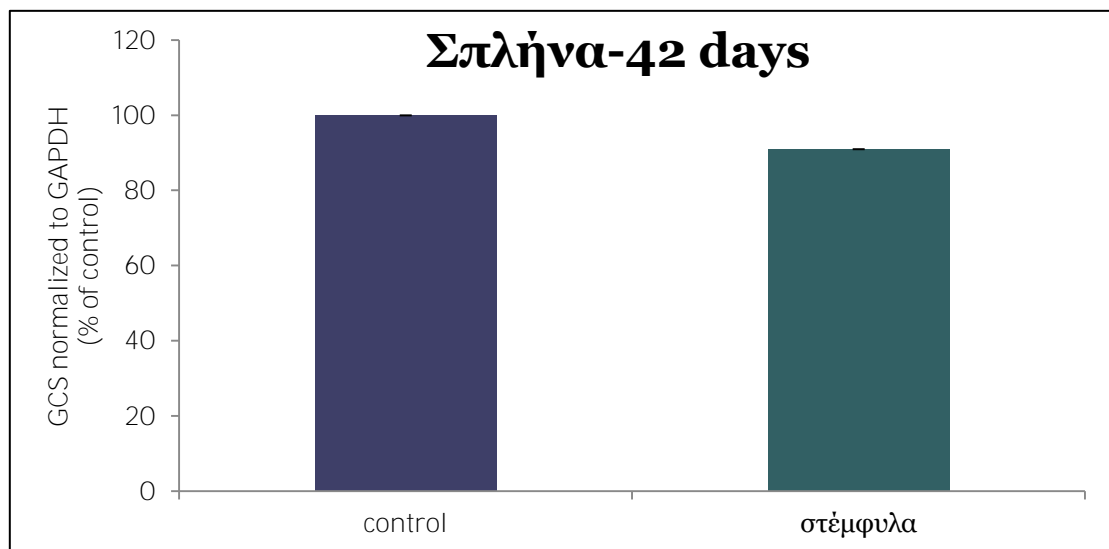
Εικόνα 6: Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα Western που δείχνουν την επίδραση της εμπλουτισμένης ζωοτροφής με στέμφυλα, στην έκφραση του ενζύμου συνθετάση της γ- γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), στον ιστό ήπατος προβάτων ηλικίας 42 ημερών. Ως εσωτερικό control, για κανονικοποίηση και έλεγχο φόρτωσης, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GAPDH.



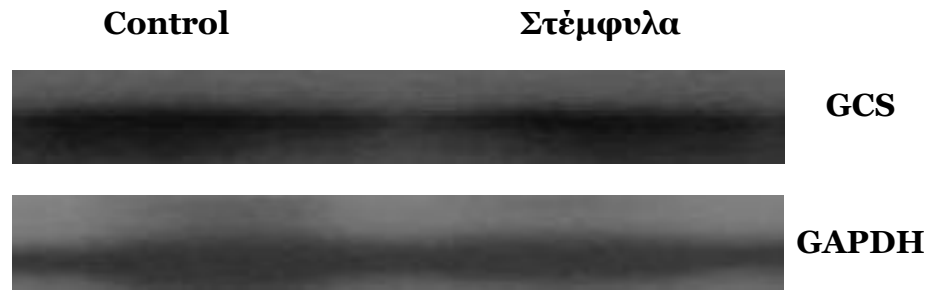
Διάγραμμα 10: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης του ενζύμου συνθετάση της γ- γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), στον ιστό ήπατος προβάτων ηλικίας 70 ημερών, με Western blot. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης είναι εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control.



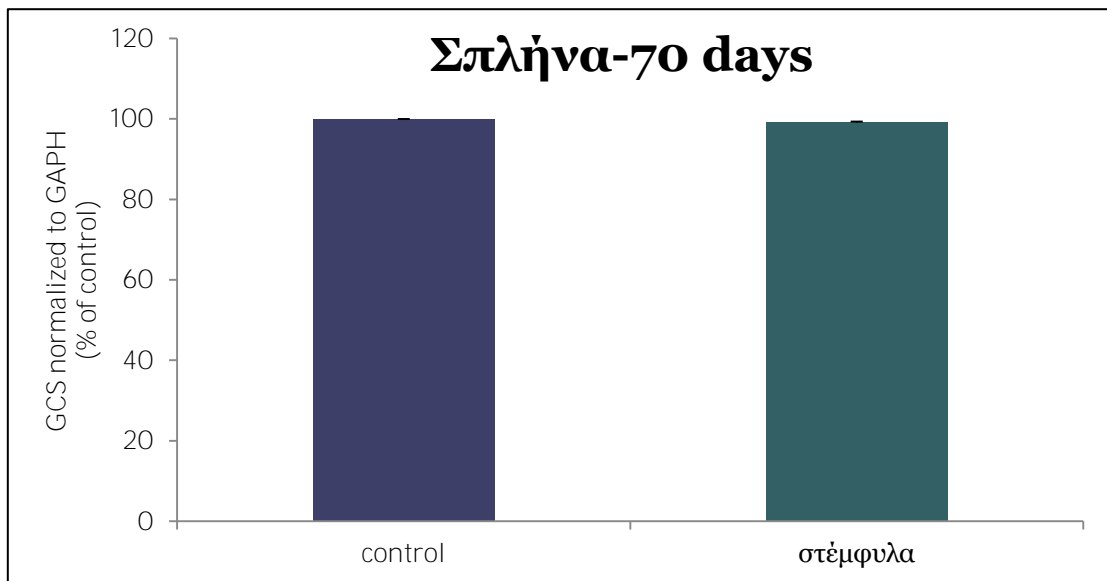
Εικόνα 7: Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα Western που δείχνουν την επίδραση της εμπλουτισμένης ζωοτροφής με στέμφυλα, στην έκφραση του ενζύμου συνθετάση της γ- γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), στον ιστό ήπατος προβάτων ηλικίας 70 ημερών. Ως εσωτερικό control, για κανονικοποίηση και έλεγχο φόρτωσης, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GAPDH.



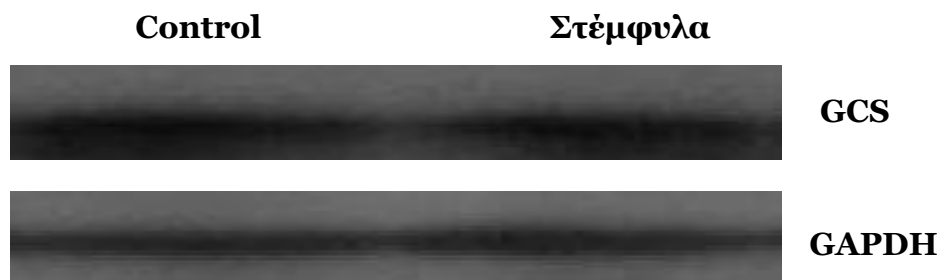
Διάγραμμα 11: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης του ενζύμου συνθετάση της γ- γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), στον ιστό σπλήνα προβάτων ηλικίας 42 ημερών, με Western blot. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης είναι εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control.



Εικόνα 8: Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα Western που δείχνουν την επίδραση της εμπλουτισμένης ζωοτροφής με στέμφυλα, στην έκφραση του ενζύμου συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), στον ιστό σπλήνα προβάτων ηλικίας 42 ημερών. Ως εσωτερικό control, για κανονικοποίηση και έλεγχο φόρτωσης, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GAPDH.



Διάγραμμα 12: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης του ενζύμου συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), στον ιστό σπλήνα προβάτων ηλικίας 70 ημερών, με Western blot. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης είναι εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control.



Εικόνα 9: Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα Western που δείχνουν την επίδραση της εμπλουτισμένης ζωοτροφής με στέμφυλα, στην έκφραση του ενζύμου συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), στον ιστό σπλήνα προβάτων ηλικίας 70 ημερών. Ως εσωτερικό control, για κανονικοποίηση και έλεγχο φόρτωσης, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GAPDH.

Συζήτηση

Σκοπός, της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης των στεμφύλων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών, ήπαρ και σπλήνα, νεαρών προβάτων, προσδιορίζοντας την ενζυμική δραστηριότητα και την πρωτεϊνική έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων. 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 (D. K. Gessner et al, 2016). 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 (D. K. Gessner et al, 2016). Το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς τις ευεργετικές ιδιότητες εκχυλισμάτων από στέμφυλα λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, η οποία βασίζεται κυρίως στην σημαντικά υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, ουριδίνη, γενιστεΐνη, γενιστίνη, τυροσόλη, γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, συριγικό οξύ, μηλικό οξύ, π-μεθόξικουμαρικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, τρυγικό οξύ), στοχεύοντας παράλληλα στην επαναξιοποίηση τους, για την αποτροπή περιβαλλοντικών προβλημάτων (Apostolou et al., 2013).

Πειραματικά μελετήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) και της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) καθώς και η πρωτεϊνική έκφραση της συνθετάσης της γ- γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), στο ήπαρ και στον σπλήνα των προβάτων, 42 και 70 ημέρες μετά τη γέννηση τους. Πιο συγκεκριμένα, η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) καταλύει την αναγωγή της ρίζας υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και νερό (H_2O) και ως εκ τούτου αυτό το ένζυμο αποτελεί σημαντική άμυνα του οργανισμού έναντι της τοξικότητας των ελεύθερων ριζών. Η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων, που είναι απαραίτητα για την αποτοξίνωση διαφορετικών ξеноβιοτικών στους οργανισμούς. Τα ένζυμα αυτά προστατεύουν τα κύτταρα από τοξικές ουσίες, καταλύοντας τη σύζευξη μιας θειολικής ομάδας της γλουταθειόνης (GSH) με ηλεκτρονιόφιλα ξеноβιοτικά, ενώ υπάρχουν και ορισμένες ισομορφές που εμφανίζουν δραστηριότητα υπεροξειδάσης γλουταθειόνης και αντιδρούν με οργανικά υπεροξείδια, προστατεύοντας τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη. Από την άλλη, η συνθετάση της γ- γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS) ή λιγάση της γλουταμικής κυστεΐνης (GCL), είναι το πρώτο ένζυμο του μονοπατιού βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, που καταλύει τη χημική αντίδραση σύνθεσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης από L-γλουταμινικό οξύ και κυστεΐνη. Σχεδόν κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο, εκφράζει μια μορφή της πρωτεΐνης GCS, για τη σύνθεση της GSH, η οποία αποτελεί μέρος του αμυντικού

μηχανισμού έναντι των ελευθέρων ριζών, καθώς χρησιμεύει ως δότης πρωτονίων και να αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες σταθερότητας του δυναμικού οξειδοαναγωγής του κυττάρου. Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των ενζύμων SOD και GST, πραγματοποιήθηκε με φωτομετρικές μεθόδους ενώ για την GCS προσδιορίστηκαν τα επίπεδα πρωτεϊνικής της έκφρασης, με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Western Blot).

Το ήπαρ είναι ένα ζωτικής σημασίας όργανο, καθώς έχει ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών στο οποίο περιλαμβάνεται η αποτοξίνωση, η σύνθεση πρωτεϊνών και η παραγωγή βιοχημικών ουσιών απαραίτητων για την πέψη των τροφών (Sha Li et al., 2015). Το ήπαρ επίσης, είναι ένα από τα κύρια όργανα που προσβάλλεται από τις ROS. Τα παρεγχυματικά κύτταρα, τα κύτταρα Kupffer, τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ενδεχομένως περισσότερο εκτεθειμένα ή ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες. Μια ποικιλία κυτοκινών, όπως ο TNF-α, μπορεί να παραχθεί από τα Kupffer κύτταρα, ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες, κάτι το οποίο μπορεί να οδηγήσει ενδεχόμενος σε εμφάνιση φλεγμονής ή/και απόπτωσης (Sha Li et al., 2015). Ένα εξελιγμένο αντιοξειδωτικό σύστημα έχει αναπτυχθεί στο ήπαρ, για τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Οι συγκεντρώσεις των ενζύμων της μεταφοράς της γλουταθειόνης και της συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης στο ήπαρ είναι ιδιαίτερα αυξημένες, ενώ τα επίπεδά τους επηρεάζονται τόσο από μεταγραφικές όσο και από μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις σε επίπεδο έκφρασης (Sha Li et al., 2015).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η δραστηριότητα του ενζύμου της SOD δεν σημείωσε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στο ήπαρ, σε αντίθεση με την δραστηριότητα της GST, η οποία βρέθηκε να αυξάνεται στατιστικά σημαντικά, στην πολυφαινολική ομάδα (στέμφυλα), τόσο στις 42 ημέρες όσο και στις 70 ημέρες κατά 21% και 30.7%, αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα control. Όσον αφορά τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της συνθετάσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης στο ήπαρ, μια στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε για την πολυφαινολική ομάδα (στέμφυλα) 42 ημερών, κατά 36%, συγκρίνοντάς την με την ομάδα ελέγχου (control), χωρίς να παρατηρηθεί κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή στις 70 ημέρες. Η επαγόμενη, από την εμπλουτισμένη ζωτροφή με πολυφαινόλες, αύξηση της δραστηριότητας της GST, μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων της GSH, καθώς η καταλυτική δράση αυτού του ενζύμου εκδηλώνεται με σύζευξη της σουλφυδρυλομάδας της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) με ηλεκτρονιόφιλες ομάδες (Mannervik & Danielson, 1988). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης, στην οποία αυτή τη φορά εξετάστηκαν δείκτες του οξειδωτικού στρες, τα επίπεδα της GSH βρέθηκαν να μειώνονται κατά 14,29% στον ηπατικό ιστό προβάτων 42 ημερών, συγκρίνοντας την πολυφαινολική με την control ομάδα. Μάλιστα στις 70 ημέρες η μείωση των επιπέδων της GSH ήταν στατιστικά σημαντική, κατά 70.59% στην πολυφαινολική ομάδα, επιβεβαιώνοντας

την παραπάνω παρατήρηση (I. Kafantaris et al., 2016). Μια άλλη πιθανή εξήγηση που μπορεί να αποδοθεί για τα χαμηλά επίπεδα της GSH είναι η προοξειδωτική δράση που εμφανίζουν οι πολυφαινολικές ενώσεις. Τα φλαβονοειδή μπορούν να αυτό-οξειδωθούν και τα προϊόντα της αυτό-οξειδωσης να μειώσουν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (Jan Ø Moskaug et al., 2005). Ωστόσο, η σύνθεση της γλουταθειόνης, ελέγχεται από επανατροφοδοτική αναστολή (feedback) των ενζύμων που την συνθέτουν (Cristina Espinosa-Diez et al., 2015), που σημαίνει πως η GSH έχει την ικανότητα να αναστέλλει ή να επάγει αντιστρεπτά τη συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης. Η στατιστικά σημαντική αύξηση λοιπόν των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης της GCS στον ηπατικό ιστό 42 ημερών, μπορεί να αποδοθεί στην επαγωγή της de novo σύνθεσης της γλουταθειόνης, για να αντισταθμίσει τη μείωση των επιπέδων της από τη δραστηριότητα της GST. Ένας πιθανός μηχανισμός που μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων είναι μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού του Nrf2. Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση, όταν αποδεσμεύεται από την πρωτεΐνη Keap1, με την οποία είναι δεσμευμένος στο κυτταρόπλασμα, μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου προσδένεται στα AREs πολλών κυτταροπροστατευτικών γονιδίων και επάγει την έκφρασή τους (SOD-1, HO-1, CAT, GCS, GST) (Cristina Espinosa-Diez et al, 2015). Ένας μεγάλος αριθμός μελετών σε κυτταροκαλλιέργειες ή σε ζωικά μοντέλα, αποδεικνύουν ότι απομονωμένες πολυφαινολικές ενώσεις (κερκετίνη, γενιστεΐνη, κουρκουμίνη) ή φυτικά εκχυλίσματα σταφυλιών πλούσια σε πολυφαινόλες, επάγουν κατά κάποιο τρόπο την ενεργοποίηση του Nrf2 (D. K. Gessner et al., 2016). Μπορεί γενικά οι υψηλές συγκεντρώσεις των πολυφαινολών να είναι τοξικές, ωστόσο υποτοξικά επίπεδα αυτών όταν καταναλώνονται από τα ζώα, μέσω της τροφής, μπορούν να προκαλέσουν ήπιες κυτταρικές αποκρίσεις στο στρες, όπως την ενεργοποίηση του Nrf2, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα και ένζυμα βιομετατροπής (D. K. Gessner et al., 2016). Έτσι, διατηρείται η κυτταρική ομοιόσταση, κατά τη διάρκεια συνθηκών στρες και προσδίδεται αντοχή σε πιο σοβαρές περιπτώσεις εμφάνισης οξειδωτικού στρες (D. K. Gessner et al., 2016).

Ο σπλήνας είναι ένα λεμφοειδές όργανο των ζώων και αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του λεμφικού ιστού. Αποτελεί αιμοποιητικό όργανο κατά την εμβρυϊκή ζωή, ενώ λειτουργεί ως ηθμός (φίλτρο) και καθαρίζει το αίμα από γηρασμένα ή παθολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια, από αντιγόνα και μικροοργανισμούς, παίζει σημαντικό ρόλο στη μη ειδική και ειδική ανοσία του οργανισμού, συμμετέχει στο μεταβολισμό του σιδήρου και λειτουργεί ως αποθήκη λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων (Mebius R.E. and Kraal G., 2005). Ενώ η ανοσολογική λειτουργία του σπλήνα είναι αναμφίβολα κρίσιμης σημασίας, ο ρόλος του στη μεσολάβηση της οξειδωτικής βλάβης, ως απάντηση στους στρεσογόνους παράγοντες, έχει υποτιμημένη

σημασία (Mebius R.E. and Kraal G., 2005). Στην παρούσα διπλωματική εργασία, αξίζει να σημειωθεί πως παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), στην πολυφαινολική ομάδα 42 ημερών, μετά τη σύγκρισή της με την ομάδα ελέγχου (control), χωρίς όμως να παρατηρηθεί κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή στις 70 ημέρες. Επίσης όσον αφορά τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της GCS, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή, όπως το ίδιο παρατηρήθηκε και για την ενζυμική δραστηριότητα της SOD. Αξίζει να αναφερθεί πως τα επίπεδα της GSH, σύμφωνα με τη μελέτη που προηγήθηκε, παρουσίασαν αύξηση από την control ομάδα στην πολυφαινολική στις 42 ημέρες κατά 27.02%, χωρίς βέβαια να είναι στατιστικά σημαντική, ενώ στις 70 ημέρες η στατιστικά σημαντική αύξηση που σημειώθηκε από την ομάδα ελέγχου στην πολυφαινολική ομάδα ήταν της τάξης του 101.47% (I. Kafantaris et al., 2016). Αυτά τα αποτελέσματα αποδίδονται, όπως επεξηγήθηκε και παραπάνω, στην εξαρτώμενη δράση της GST από την GSH, επηρεάζοντας ανάλογα κάθε φορά και τη έκφραση της GCS. Ωστόσο όμως έρχονται σε αντίθεση με τις μετρήσεις στον ιστό του ήπατος, κάτι που σχετίζεται με το γεγονός πως το σπλήνα γενικότερα παρουσιάζει μικρότερη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες και επίσης ως διαφορετικός ιστός από το ήπαρ, χαρακτηρίζεται από διαφορετικά επίπεδα και συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών ενζύμων. 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 K. et al., 2014). Επιπλέον, Chen et al. (2013) έχουν επίσης δείξει ότι η συμπληρωματική μεθειονίνη, κύριος πρόδρομος της σύνθεσης GSH, αυξάνει τα επίπεδα γλουταθειόνης σε κοτόπουλα πάχυνσης, με χαμηλή συγκέντρωση GSH αλλά μειώνει τα επίπεδα γλουταθειόνης σε κοτόπουλα πάχυνσης, με υψηλή GSH. Έτσι, οι ενώσεις στεμφύλων μπορεί να μειώσουν την έκφραση ή να αναστείλουν την δραστηριότητα της GCS ή GSH συνθετάσης σε πρόβατα με υψηλή GSH και αντίθετα να αυξήσουν τα επίπεδα της GSH επάγοντας την έκφραση ή την ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων σε πρόβατα με χαμηλή GSH. Οι DeLeve και Karlowitz (1990) έχουν αναφέρει ότι τα υψηλά επίπεδα GSH μπορεί να αναστέλλουν τη σύνθεση της, μέσω της αναστολής της GCS. Στην παρούσα μελέτη υπάρχει μία τάση μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της GCS χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική. Προκειμένου λοιπόν να διαμορφωθεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με τα επίπεδα της GSH και τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της GCS, τόσο στον ηπατικό ιστό όσο και στο σπλήνα, κρίνεται σκόπιμη και η μελέτη της έκφρασης του ενζύμου συνθετάσης της γλουταθειόνης.

Συνοψίζοντας, τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν στην άποψη, πως η βιολειτουργική ζωοτροφή, παρουσιάζει θετικά αποτελέσματα τόσο στο ήπαρ όσο και στο σπλήνα, καθώς συμβάλλει στην αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της GST και την πρωτεϊνική έκφραση της συνθετάση της GCS. Μπορεί η GST να είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει κυρίως στην αποτοξίνωση του οργανισμού από τις ξενοβιοτικές ουσίες, ωστόσο η ενζυμική της δράση και η συμμετοχή της σε ένα μεγάλο κύκλο οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων που συμμετέχουν αντιοξειδωτικά, υποδεικνύει πως μια ενδεχόμενη μεταβολή της δραστηριότητάς της, θα είχε ως αποτέλεσμα να επηρεαστεί η δραστηριότητα και τα επίπεδα άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Η επίδραση της εμπλουτισμένης ζωοτροφής με στέμφυλα, ήταν περισσότερο εμφανής στον ηπατικό ιστό και όχι τόσο στο σπλήνα, καθώς πρόκειται για ένα όργανο που παρουσιάζει μικρότερη ευαισθησία έναντι των ROS και συνεπώς η δράση των αντιοξειδωτικών συστημάτων, παρουσιάζει ένα διαφορετικό πρότυπο δράσης σε σχέση με τα άλλα όργανα.

Η εξαιρετικά επωφέλης δράση της βιολειτουργικής ζωοτροφής, αποδίδεται στις ευεργετικές ιδιότητες των στεμφύλων λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, η οποία βασίζεται κυρίως στην σημαντικά υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, ουριδίνη, γενιστεΐνη, γενιστίνη, τυροσόλη, γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, συριγγικό οξύ, μηλικό οξύ, π-μεθόξικουμαρικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, τρυγικό οξύ) (Apostolou et al., 2013). Η αξιοποίηση λοιπόν των υποπροϊόντων οινοποίησης, για παραγωγή βιολειτουργικής ζωοτροφής, αποτελεί μια χαμηλού κόστους παρέμβαση για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων των κτηνοτροφικών ζώων στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες, ενώ παράλληλα μειώνεται ο κίνδυνος περιβαλλοντικής ρύπανσης που προκαλείται από την εναπόθεση τους στο έδαφος. Η παρούσα μελέτη επίσης, είναι ιδιαίτερης σημασίας εξαιτίας των πληροφοριών που παίρνουμε σχετικά με την οξειδοαναγωγική κατάσταση διαφορετικών ιστών και πως αυτή επηρεάζεται μέσω της διατροφής, καθώς η διεθνής βιβλιογραφία είναι πολύ περιορισμένη και όχι διεξοδική, επί αυτού του θέματος.

Βιβλιογραφία

Αλεξάνδρα Ε. Παπαδάκη, Συγκριτική Ανατομική και Μορφολογική Μελέτη των Οργάνων της Ρίζας και του Βλαστού Ποικιλιών και Υποκειμένων Αμπέλου, 2010.

Μαρία Ι. Αναστασιάδη, Μελέτη Προϊόντων Ελληνικής Αμπελουργίας και Οινοποίησης- Μελέτη Βιοδραστικών Συστατικών και Αξιολόγηση της Αντιοξειδωτικής Δράσης, 2007.

António Teixeira, José Eiras-Dias, Simone D. Castellarin, Hernâni Gerós, Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments, International Journal of Molecular Sciences, 2013.

New World Encyclopedia, Grape, August 2008.

Patrice This, Thierry Lacombe, Mark R. Thomas, Historical origins and genetic diversity of wine grapes, Cell Press, September 2006.

Luan Zyka, Συμβολή στην ταυτοποίηση και μελέτη κλώνων διάφορων ποικιλιών αμπέλου (Vitis Vinifera), 1998.

Walker AR, Lee E., Bogs J., McDavid DA, Thomas MR, Robinson SP, White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes, Plant Journal, 2007.

Καραμολέγκου Μαργαρίτα, Αμπελογραφική Μελέτη Ποικιλιών Αμπέλου (Vitis Vinifera L.), Αθήνα 2006.

Guillon T.M., Étude générale de la vigne : historique les vignobles et les crus anatomie et physiologie, sol et climat, 1905.

Ribereau- Gayon, Traité d'oenologie. Microbiologie du vin. Vinifications, 1998.

Pratt C., Reproductive anatomy in cultivated grapes, American Journal of Enology and Viticulture, 1971.

Δημοπούλου Ειρήνη, Μελέτη Ταννινών των Γίγαρων της ποικιλίας Cabernet Sauvignon, Εφαρμογή και Ανάπτυξη μεθόδων Ανάλυσης, Αθήνα 2008.

James Kennedy, Understanding Grape Berry Development, Department of Food Science & Technology, 2002.

Xiao-Yan Zhang, Xiu-Ling Wang, Xiao-Fang Wang, Da-Peng Zhang, A Shift of Phloem Unloading from Symplasmic to Apoplasmic Pathway Is Involved in Developmental Onset of Ripening in Grape Berry, Plant physiology, 142(1):220-32, October 2006.

William McGlynn, Oklahoma State University, Basic Grape Berry Structure, Extension, 2012.

Rita Maria Francisco, Ana Regalado, Agnès Ageorges, Bo J. Burla, Barbara Bassin, Cornelia Eisenach, Olfa Zarrouk, Sandrine Vialet, Thérèse Marlin, Maria Manuela Chaves, Enrico Martinoia, Réka Nagy, ABCC1, an ATP Binding Cassette Protein from Grape Berry, Transports Anthocyanidin 3-O-Glucosides, The Plant Cell, 2013.

Camila Gomez, Geneviève Conejero, Laurent Torregrosa, Véronique Cheynier, Nancy Terrier, Agnès Ageorges, In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST, The Plant Journal, 2011.

Enrico Braidot, Marco Zancani, Elisa Petrusa, Carlo Peresson, Alberto Bertolini, Sonia Patui, Francesco Macri, Angelo Vianello, Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.), *Plant Signaling and Behavior*, 2008.

E. Braidot, E. Petrusa, A. Bertolini, C. Peresson, P. Ermacora, N. Loi, M. Terdoslavich, S. Passamonti, F. Macri, A. Vianello, Evidence for a putative flavonoid translocator similar to mammalian bilitranslocase in grape berries (*Vitis vinifera* L.) during ripening, *Planta*, 2008.

Elisa Petrusa, Enrico Braidot, Marco Zancani, Carlo Peresson, Alberto Bertolini, Sonia Patui, Angelo Vianello, Plant Flavonoids- Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses, *International Journal of Molecular Sciences*, 2013.

Erich Grotewold, *The Science of Flavonoids*, Springer, 2006.

Kuhn N., Guan L., Dai ZW, Wu BH, Lauvergeat V., Gomès E., Li SH, Godoy F., Arce-Johnson P., Delrot S., Berry ripening: recently heard through the grapevine, *Journal of Experimental Botany*, 2014.

Natacha Fontes, Hernani Gerós, Serge Delrot, Grape Berry Vacuole: A Complex and Heterogeneous Membrane System Specialized in the Accumulation of Solutes, *American Journal of Enology and Viticulture*, 2011.

Anthony Ananga, Vasil Georgiev, Joel Ochieng, Bobby Phills, Violeta Tsolova, Production of Anthocyanins in Grape Cell Cultures: A Potential Source of Raw Material for Pharmaceutical, Food, and Cosmetic Industries, *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive*, 2013.

James Kennedy, *Understanding Grape Berry Development*, 2002.

Ελένη Α. Συμεού, Μελέτη των φαινολικών συστατικών σταφυλιών και οίνου, Χίου και Νεμέας και την επίδρασης των ενζύμων και άλλων παραμέτρων σ' αυτά, Αθήνα 2010.

Jorge Domínguez, Hugo Martínez-Cordeiro, Marta Álvarez-Casas, Marta Lores, Vermicomposting grape marc yields high quality organic biofertiliser and bioactive polyphenols, *Waste Management & Research*, 2014.

Ana Teixeira, Nieves Baenas, Raul Dominguez-Perles, Ana Barros, Eduardo Rosa, Diego A. Moreno, Cristina Garcia-Viguera, Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review, *International Journal of Molecular Sciences*, 2014.

I. Φεγγέρος, Μελέτη της Διαιτητικής Αξίας των Στεμφύλων της Οινοποιίας για τα Μηρυκαστικά, 1985.

M. Pinelo, A. Arnous, A.S. Meyer, Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release, *Trends Food Sci. Tech.*, 2006.

L.F. Ribeiro, R.H. Ribani, T.M.G. Francisco, A.A. Soares, R. Pontarolo, C.W.I. Haminiuk, Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses, *Journal of Chromatography B*, 2015.

M.A. Bustamante, R. Moral, C. Paredes, A. Pérez-Espinosa, J. Moreno-Caselles, M.D. Pérez-Murcia, Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry, *Waste Management*, 2008.

Anja Fiesel, Melanie Ehrmann, Denise K. Geßner, Erika Most, Klaus Eder, Effects of polyphenol-rich plant products from grape or hop as feed supplements on iron, zinc and copper status in piglets, Archives of Animal Nutrition, 2015.

Ioannis S. Arvanitoyannis, Demetrios Ladas, Athanasios Mavromati, Potential uses and applications of treated wine waste: a review, Food Science and Technology, 2005.

Massimo D'Archivio, Carmelina Filesi, Rosaria Vari, Beatrice Scazzocchio, Roberta Masella, Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies, International Journal of Molecular Sciences, 2010.

D. K. Gessner, R. Ringseis, K. Eder, Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals, Animal Physiology and Animal Nutrition, 2016.

En-Qin Xia, Gui-Fang Deng, Ya-Jun Guo, Hua-Bin Li, Biological Activities of Polyphenols from Grapes, International Journal of Molecular Sciences, 2010.

Laura Marín, Elisa M. Miguélez, Claudio J. Villar, Felipe Lombó, Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties, BioMed Research International, 2015.

Jenkins, R.R, Free radical chemistry: relationship to exercise. Sports Med., 1998.

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

Gerogianni, E. & Goyrgoulisanis, K.I. (2006), Oxidative stress and lung diseases. Archives of Hellenic Medicine, 23(5), 444-454.

Cheeseman, K.H., Slater, T.F. (1993), An introduction to free radical biochemistry. Br. Med. Bull. 49, 481-93.

J. Raymond, D. Segrè, The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life, Science, 2006.

N. Παπαγαλάνης, Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα. Δραστικές ρίζες οξυγόνου, Ελληνική Νεφρολογία 2014; 26 (3): 151 – 194.

Giles G.I., Jacob C., Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress, Biol Chem., 2002 Mar-Apr;383(3-4):375-88.

E. Συντιχάκη, Ποσοτικοποίηση και βιοχημική σημασία των πρωτεϊνικών θειολών στους οργανισμούς, 2010.

Marian Valko, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T.D. Cronin, Milan Mazur, Joshua Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, Pages 44–84.

E. Κερασιώτη, Επίδραση της χορήγησης σκευάσματος υδατανθράκων- πρωτεϊνών σε δείκτες οξειδωτικού στρες, φλεγμονής και υποξίας μετά από άσκηση σε ανθρώπους, 2014.

Halliwell and Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine, 1999.

Close, G.L., Kayani, A.C., Ashton, T., McArdle, A. & Jackson, M.J. (2007). Release of superoxide from skeletal muscle of adult and old mice: an experimental test of the reductive hotspot hypothesis. *Aging Cell*, vol. 6, 189-195.

Powers, S.K. & Lennon, S.L. (2000). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(4), 1025-33.

Halliwell, B. & Gutteridge J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine* (Fourth Edition). Oxford University Press, Oxford.

Muller, F.L., Liu, Y., Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 279, 49064–49073.

Yeong-Renn Chen and Jay L. Zweier, Cardiac Mitochondria and Reactive Oxygen Species Generation, *Circulation Research*, January 31, 2014, Volume 114, Issue 3.

Michael Schrader, H. Dariush Fahimi, Peroxisomes and oxidative stress, *Biochimica et Biophysica Acta* 1763 (2006) 1755–1766.

Taylor DE, Ghio AJ, Piantadosi CA., Reactive Oxygen species produced by liver, mitochondria of rats in sepsis, 1995 *Arch Biochem Biophys*.

Μ. Καλαφάτη, Επίδραση της συμπληρωματικής χορήγησης σπιρουλίνας στην ανάπτυξη του οξειδωτικού στρες και στην λειτουργία του αντιοξειδωτικού μηχανισμού μετά από παρατεταμένη αερόβια άσκηση, 2014.

Kevin Kavanagh, Emer P. Reeves, Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens, *FEMS Microbiology Reviews*, 2004.

Carolyn S. Sevier, Chris A. Kaiser, Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Volume 1783, Issue 4, April 2008, Pages 549–556.

Hafiz Maher Ali Zeeshan, Geum Hwa Lee, Hyung-Ryong Kim, Han-Jung Chae, Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS, *Int. J. Mol. Sci.* 2016 Mar; 17(3): 327.

Δ. Γαλάρης, Ελεύθερες Ρίζες και Οξειδωτικό Στρες, *Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών*, 2015.

Reid, M.B. (2001), Plasticity in skeletal, cardiac and smooth muscle. Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J. Appl. Physiol.* 90, 724-731.

Finaud, J., Lac, G., Filaire, E. (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 36 (4), 327-358.

Sies, H. (1991). Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *Amer. J. Med.* 91, 31-38.

Brewer, T.F., Garcia, F.J., Onak, C.S., Carroll, K.S. and Chang, C.J. 2015. Chemical approaches to discovery and study of sources and targets of hydrogen peroxide redox signaling through NADPH oxidase proteins. *Annu Rev Biochem* 84 765-790.

Stadtman, E.R. 2006. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res* 40(12) 1250-1258.

Jung T., Bader N., Grune T., Minireview-Oxidized proteins: Intracellular distribution and recognition by the proteasome, (2007), *Archives of Biochemistry and Biophysics* 462: 231–237.

Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). Free radicals in biology and chemistry. New York: Oxford Science Publications.

Suzuki, K., Ohno, H., Oh-ishi, S., Kizaki, T., Ookawara, T., Fukii, J., Radak, A., Taniguchi, N. (2000). Superoxide dismutases in exercise and disease. In: Handbook of Oxidants and Antioxidants and Exercise, edited by Sen CK, Packer L, Hanninen O. Amsterdam: Elsevier, 2000, pp. 243–295.

Antunes, F., Han, D., Cadenas, E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1260-1267.

Cristina Espinosa-Diez, Verónica Miguel, Daniela Mennerich, Thomas Kietzmann, Patricia Sánchez-Pérez, Susana Cadenas, Santiago Lamas, Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress, *Redox Biology*, Volume 6, December 2015, Pages 183–197.

Chae, H.Z., Oubrahim, H., Park, J.W., Rhee, S.G. and Chock, P.B. 2012. Protein glutathionylation in the regulation of peroxiredoxins: a family of thiol-specific peroxidases that function as antioxidants, molecular chaperones, and signal modulators. *Antioxid Redox Signal* 16(6) 506-523.

Rhee, S.G., Chae, H.Z. and Kim, K. 2005. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 38(12) 1543-1552.

Chae, H.Z., Chung, S.J. and Rhee, S.G. 1994. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 269(44) 27670-27678.

Ahsan, M.K., Lekli, I., Ray, D., Yodoi, J. and Das, D.K. 2009. Redox regulation of cell survival by the thioredoxin superfamily: an implication of redox gene therapy in the heart. *Antioxid Redox Signal* 11(11) 2741-2758.

Abate, C., Patel, L., Rauscher, F.J., 3rd and Curran, T. 1990. Redox regulation of fos and jun DNA binding activity in vitro. *Science* 249(4973) 1157-1161.

Matthews, J.R., Wakasugi, N., Virelizier, J.L., Yodoi, J. and Hay, R.T. 1992. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res* 20(15) 3821-3830.

Ryan J. Mailloux, Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species, *Redox Biology*, Volume 4, April 2015, Pages 381–398.

Giles, I. G., Tasker, M. K. and Jacob, C. (2001). Hypothesis: The role of reactive sulfur species in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 1279-1283.

Mannervik B., Danielson U. H. (1988) Glutathione transferases - Structure and catalytic activity. *CRC Critic. Revs. Biochem.* 23, 283-337.

Sipes I. G., Gandolfi A. J. (1991) Biotransformation of toxicants. In Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons (4th ed.) (Amdur M. O., Doull J., Klaassen C. D., eds), chp. 4, pp. 88-126. Pergamon Press, New York.

Fahey R. C., Sundquist A. R. (1991) Evolution of glutathione metabolism. *Adv. Enzymol. Related Areas Molec. Biol.* 64, 1-47.

Mannervik B. (1985) Isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol. Mol. Biol.* 57, 357-417.

Buetler T. M., Gallacher E. P., Wang C , Stahl D. L., Hayes J. D., Eaton D. L. (1995) Induction of phase I and phase II drug-metabolizing enzyme mRNA, protein, and activity by BKA, ethoxyquin, and oltipraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 135, 45-57.

Clark A. G. (1989) The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B, 419-446.

Keen J. H., Jakoby W. B. (1978) Glutathione transferases: catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. *J. Biol. Chem.* 253, 5654-5657.

Rosanna Rinaldi, Erik Eliasson, Stellan Swedmark and Ralf Morgenstern, *Reactive Intermediates and The Dynamics of Glutathione Transferases, Drug Metabolism and Disposition* October 2002, 30 (10) 1053-1058.

Daniel W. Nebert, Vasilis Vasiliou, *Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family, Human Genomics* 2004, 1:460.

P. David Josephy, *Genetic Variations in Human Glutathione Transferase Enzymes: Significance for Pharmacology and Toxicology, Hum Genomics Proteomics*, 2010; 2010: 876940.

Richard Armstrong, Vanderbilt University School of Medicine, *GLUTATHIONE TRANSFERASE (GST) SUPERFAMILY*, Project period: 2010 – 2014.

Thomas D. Boyer, *The Glutathione S-Transferases: An Update, Hepatology*, Vol. 9, No. 8, pp. 486-496, 1989.

Goldfarb AH, Garten RS, Cho C, Chee PD, Chambers LA. (2011). Effects of a fruit/berry/vegetable supplement on muscle function and oxidative stress. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 43(3), 501-8.

Bigard, A.X. (2001). Lesions musculaires induites par l' exercice et surentrainment. *Sci. Sports.* 16, 204-215.

Palmer, F.M., Nieman, D.C., Henson, D.A., McAnulty, L., Swick, N.S., Utter, A.C., Vinci, D.M., Morrow, J.D. (2003). Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary Ig A changes following an ultramarathon. *Eur. J. Appl. Physiol.* 89, 100-107.

Lester Packer, Stefan U. Weber, and Gerald Rimbach, *Molecular Aspects of α -Tocotrienol Antioxidant Action and Cell Signalling*, The American Society for Nutritional Sciences, 2001.

Misha F. Vrolijk, Antoon Opperhuizen, Eugène H.J.M. Jansen, Roger W. Godschalk, Frederik J. Van Schooten, Aalt Bast, Guido R.M.M. Haenen, *The shifting perception on antioxidants: The case of vitamin E and β -carotene*, *Redox Biology*, 2015.

Crane, F.L. (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *J. Am. Coll. Nutr.* 20, 591-598.

Stocker, R. (2004). Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid. Redox Signal.* 6, 841–849.

Baranano, D.E., Rao, M., Ferris, C.D., Snyder, S.H. (2002). Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 16093–16098.

Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., Ames, B.N. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 235, 1043–1046.

Svensson, M.B., Ekblom, B., Cotgreave, I.A., Norman, B., Sjoberg, B., Ekblom, O., Sjodin, B., Sjodin, A. (2002). Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta Physiol. Scand.* 176, 43-56.

Sevanian, A., Davies, K.J., Hochstein, P. (1991). Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 54, 1129S-1134S.

Wayner, D.D., Burton, G.W., Ingold, K.U., Barclay, L.R., Locke, S.J. (1987). The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim. Biophys. Acta.* 924, 408-419.

Hellsten, Y., Sjodin, B., Richter, E.A., Bangsbo, J. (1998). Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *Am. J. Physiol.* 274, E600-606.

Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 916-921.

Meister, A., Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711-760.

Shelly C. Lu, Regulation of glutathione synthesis, *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 30, Issues 1–2, February–April 2009, Pages 42–59.

Narciso Couto, JenniferWood, Jill Barber, The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network, *FreeRadicalBiologyandMedicine* 95(2016)27–42.

Monica Leopoldini, Nino Russo, Marirosa Toscano, The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants, *Food Chemistry*, 2011.

Ifan Rahman et al, Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols, *Biochemical Pharmacology*, 2006.

D. Procházková, I. Boušová, N. Wilhelmová, Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia*, Volume 82, Issue 4, June 2011, Pages 513–523.

Cesar G. Fraga et al, Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols, *Molecular Aspects of Medicine*, 2010.

Christopher C. Franklin, Donald S. Backos, Isaac Mohar, Collin C. White, Henry J. Forman, Terrance J. Kavanagh, Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase, *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 30, Issues 1–2, February–April 2009, Pages 86–98.

A. Σφήκας, Διδακτορική διατριβή με θέμα: «Μελέτη του ρόλου του NF-kB στην απόπτωση κυττάρων που εκτίθενται σε παράγοντες επαγωγής οξειδωτικού στρες και σε κυτταροκίνες», Ιωάννινα 2009.

Forman H.J., Ursini F. and Maiorino M., An overview of mechanisms of redox signaling, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 73 2-9. 2014.

Shih, A. Y., Li, P., & Murphy, T. H. (2005). A small-molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo. *The Journal of neuroscience*, 25(44), 10321-10335.

Agnes Görlach, Elitsa Y. Dimova, Andreas Petry, Antonio Martínez-Ruiz, Pablo Hernansanz-Agustín, Anabela P. Rolo, Carlos M. Palmeira, Thomas Kietzmann, Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved?, *Redox Biology*, Volume 6, December 2015, Pages 372–385.

Tonks NK. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signalling. *Cell*, 2005, 121(5): 667–670.

S. Magesh, Y. Chen, and L. Hu, Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Med Res Rev*, 2012. **32**(4): p. 687-726.

J.W. Kaspar, S.K. Niture, and A.K. Jaiswal, Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 2009. **47**(9): p. 1304-9.

D.A Bloom and A.K. Jaiswal, Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem*, 2003. **278**(45): p. 44675-82.

W. Li and A.N. Kong, Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog*, 2009. **48**(2): p. 91-104.

A. Lau et al., Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res*, 2008. **58**(5-6): p. 262-70.

A.K. Jaiswal, *Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression*. *Free Radic Biol Med*, 2004. **36**(10): p. 1199-207.

Jeong-Sang Lee, Young-Joon Surh, Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention, *Cancer Letters* 224 (2005) 171–184.

Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, Trizoglou I, Wallace Hayes A, Tsatsakis A.M, Kouretas D (2013). Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of Vitis vinifera stem extracts *Food and Chemical Toxicology*. 61: 60–68

Sha Li, Hor-Yue Tan, Ning Wang, Zhang-Jin Zhang, Lixing Lao, Chi-Woon Wong, and Yibin Feng, The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases, *Int J Mol Sci*. 2015 Nov; 16(11): 26087–26124.

Kafantaris I, Kotsampasi B, Christodoulou V, Kokka E, Kouka P, Terzopoulou Z, Gerasopoulos K, Stagos D, Mitsagga C, Giavasis I, Makri S, Petrotos K, Kouretas D, Grape pomace improves antioxidant capacity and faecal microflora of lambs., *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*.2016 Oct 18.

Mebius R.E., Kraal G., Structure and function of the spleen, *Nat Rev Immunol*. 2005 Aug;5(8):606-16.

Jan Ø Moskaug, Harald Carlsen, Mari CW Myhrstad, and Rune Blomhoff, *Am J Clin Nutr* January 2005 vol. 81 no. 1 277S-283S.