



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας»

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΚΙΤΣΙΚΟΥΔΗ ΔΕΣΠΟΙΝΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ
(ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ-ΕΝΤΕΡΟ-ΝΕΦΡΟ) ΑΠΟ ΝΕΑΡΑ ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ ΜΕΤΑ
ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ
ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ**

**ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN TISSUES
(LUNG -INTESTINE-KINDEY) FROM YOUNG CHICKENS FEED WITH
POLYPHENOLIC ADDITIVES FROM VINIFICATION WASTES**

ΚΙΤΣΙΚΟΥΔΗ ΔΕΣΠΟΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2015

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ
(ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ-ΕΝΤΕΡΟ-ΝΕΦΡΟ) ΑΠΟ ΝΕΑΡΑ ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ ΜΕΤΑ
ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ
ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

ΑΦΙΕΡΩΜΕΝΟ

Στην οικογένεια μου για τη στήριξη και τη ενθάρρυνση που απλόχερα μου χορηγήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον Λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο, για την συνεχή και ουσιαστική παρουσία και υποστήριξη του, τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στην συγγραφή αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ ακόμη όλη την ομάδα του εργαστηρίου, για τη συνεργασία και το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα την Υποψήφια Διδάκτορα, Σωτηρία Μακρή που εκτελεί το μεταδιδακτορικό της πρόγραμμα και τα δείγματα προήλθαν από το δικό της πρόγραμμα, που συνέβαλαν στα μέγιστα τόσο στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας όσο και στην ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής, ήταν η εκτροφή τριάντα (30) κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής με ζωοτροφή εμπλουτισμένη με πολυφαινολικά πρόσθετα από στέμφυλα και στη συνέχεια έλεγχος της αντιοξειδωτικής τους δράσης στον πνευμονικό, εντερικό και νεφρικό ιστό σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές. Τα τριάντα (30) κοτόπουλα που εκτράφηκαν χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες. Σε αυτές τις δύο ομάδες χορηγήθηκε διαφορετικό σιτηρέσιο. Η πρώτη ομάδα αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου (ομάδα control) η οποία λάμβανε κοινό σιτηρέσιο, ενώ η δεύτερη (πολυφαινολική) αποτελούνταν από τα νεαρά κοτόπουλα στο σιτηρέσιο των οποίων, περιέχονταν ενσίρωμα στέμφυλων πλούσια σε πολυφαινόλες. Τα κοτόπουλα της δεύτερης ομάδας εκτράφηκαν με το πειραματικό σιτηρέσιο για τριάντα πέντε (35) ημέρες, διότι τις πρώτες 15 ημέρες, μετά τη γέννησή τους, τρέφονταν μόνο με το κοινό σιτηρέσιο. Πραγματοποιήθηκαν 2 ιστοληψίες. Η πρώτη ιστοληψία πραγματοποιήθηκε στις τριάντα (30) ημέρες μετά την γέννηση των κοτόπουλων και η δεύτερη στις πενήντα (50) ημέρες, με σκοπό τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής τους άμυνας σε πρόωρη ηλικία.

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που ελέγχθηκαν ήταν: για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών, ελέγχθηκαν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) ,η δραστηριότητα της καταλάσης (CAT) και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – Total antioxidant capacity), επίσης ελέγχθηκαν οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric acid reactive substances), για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων και τέλος τα πρωτεϊνικά καρβονύλια για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσίας των πρωτεϊνών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα εξετάστηκε τελικά αν ο πνευμονικός, εντερικός και νεφρικός ιστός, παρουσιάζει βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κοτόπουλων τα οποία τρέφονταν με το σιτηρέσιο το οποίο περιείχε τα στέμφυλα. Τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα που καταγράφηκαν ήταν: οι τιμές της γλουταθειόνης του πνευμονικού ιστού της πολυφαινολικής ομάδας των 50 ημερών παρουσίασαν αύξηση σε ποσοστό 38,1% σε σχέση με την ομάδα control και του νεφρικού ιστού της πολυφαινολικής ομάδας των 30 ημερών παρουσίασαν αύξηση σε ποσοστό 16,1% σε σχέση με την ομάδα control. Η τιμή της καταλάσης του εντερικού ιστού της πολυφαινολικής ομάδας των 50 ημερών παρουσίασε μείωση κατά 25,1% σε σχέση με την ομάδα control. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του νεφρικού ιστού της πολυφαινολικής ομάδας των 50 ημερών παρουσίασε αύξηση σε ποσοστό 11,3% σε σχέση με την ομάδα control. Οι τιμές των TBARS του εντερικού ιστού της πολυφαινολικής ομάδας των 30 ημερών παρουσίασαν μείωση σε ποσοστό 50,8% σε σχέση με την ομάδα control. Τέλος οι τιμές των πρωτεϊνικών καρβονυλίων του νεφρικού ιστού της πολυφαινολικής ομάδας των 30 ημερών παρουσίασαν μείωση σε ποσοστό 17,9 % σε σχέση με την ομάδα control, ενώ του νεφρικού ιστού

της πολυφαινολικής ομάδας των 50 ημερών παρουσίασαν μείωση σε ποσοστό 12,6% σε σχέση με την ομάδα control. Κατά συνέπεια, η παρουσία πολυφαινολών από απόβλητα οινοποίησης στη διατροφή των κοτόπουλων βοηθά στην αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής τους ικανότητας.

ABSTRACT

The aim of the present study was to raise thirty young chickens with feed supplemented with polyphenolic additives from grapes, in order to examine the effects on the redox status in tissues (lung-intestinal and kidney), using oxidative stress markers at two different time-points.

Thus thirty young chickens were divided into two (2) groups. In these two groups, different diets were given. The first group was the control group with the basic diet, while the other group was received special feed with polyphenolic additives from grapes. The young chicken of the second group were fed with experimental diet for thirty five (35) days (for the first fifteen days, the chickens were fed with the basic diet). Tissues were collected from the experimental animals at 2 different time-points. The first time-point was thirty (30) days, while the second time-point was at fifty (50) days after birth.

The following oxidative stress biomarkers were assessed in tissues: reduced glutathione (GSH), catalase activity (CAT), total antioxidant capacity (TAC), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyls. The results showed statistically significant increase by 38.1% in glutathione levels in the lung tissue of polyphenolic group at 50 days compared to the control group and in kidney tissue by 16.1% at 30 days in the polyphenolic group compared to the control group. The values of CAT in the intestinal tissue were decreased at 50 days by 25.1% compared to control group. The TAC values was increased significantly by 11.3% in kidney tissue of polyphenolic group at 50 days compared to control. The TBARS values was decreased significantly by 50.8% in the intestinal tissue of polyphenolic group at 30 days compared to the group control. Finally the CARB values was decreased by 17.9% in the kidney tissue of polyphenolic group at 30 days compared to the control group, and by 12.6% 50 days. In conclusion, the supplementation of the feed with polyphenols from vinification wastes improved the redox status of the chickens.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	
ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	2
ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΑΦΙΕΡΩΣΗ -ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	9
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ	10
1.2 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ	13
1.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	16
1.3.1 Οξειδωτικό στρες και διαταραχές της υγείας	20
1.3.2 Οξειδωτικό στρες και διαταραχή της υγείας των ζώων	21
1.4 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	23
1.4.1 Χημική δομή και ομάδες	24
1.4.2 Φυσιολογικές δράσεις	26
1.4.3 Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία	26
1.5 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ.	27
1.5.1. Φαινολικά Συστατικά Σταφύλης και Στέμφυλων.	31
1.5.2. Εναλλακτικές χρήσεις Στέμφυλων	33
1.5.3 Στέμφυλα και περιβάλλον	35
ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ	36
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
Τεχνική Περιγραφή-Μεθοδολογία	37
2.1 ΓΕΝΙΚΑ	39
2.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟΥ.	40
2.2.1 Παρασκευή ενσιρώματος στέμφυλων	41
2.3 ΛΗΨΗ ΙΣΤΩΝ –ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ	43
2.3.1 Επεξεργασία Ιστών.	44
2.3.2 Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες.	44
2.3.2.1 Γενικά.	44
2.4. ΠΡΩΤΟΛΟΛΛΑ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ.	45
2.4.1 Μέτρηση Γλουταθειόνης.	45
2.4.2 Δραστηριότητα της Καταλάσης.	47
2.4.3 Ολική Αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC).	50
2.4.4 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).	53
2.4.5 Πρωτεϊνικά καρβονύλια	55
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	58
3.1 Μέτρηση Γλουταθειόνης στους ιστούς.	58
3.2 Δραστηριότητα Καταλάσης.	59
3.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα.	60
3.4 TBARS	61
3.5 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια	62
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.	63
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Γενικοί τύποι οξειδωτικής τροποποίησης πρωτεϊνών.	17
Πίνακας 2: Βιοχημικές συνέπειες οξειδωτικής τροποποίησης πρωτεϊνών.	18
Πίνακας 3: Σύσταση στεμφύλων εκφρασμένη σε ποσοστό %	32
Πίνακας 4: Σύσταση σιτηρεσίου κοτόπουλων πάχυνσης.	40
Πίνακας 5: Διαλυμάτων αντίδρασης	47
Πίνακας 6: Διαλυμάτων αντίδρασης	49
Πίνακας 7: Διαλυμάτων αντίδρασης	52

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Δραστικές μορφές οξυγόνου	12
Εικόνα 2. Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ΔΜΟ	15
Εικόνα 3. Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών	15
Εικόνα 4. Οξειδωτικό στρες	18
Εικόνα 5. Οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια τόσο ενδοκυτταρικά όσο και διακυτταρικά.	20
Εικόνα 6. Χημικές δομές πολυφαινόλων	25
Εικόνα 7. Δομικά χαρακτηριστικά ώριμης ράγας.	30
Εικόνα 8. Εναπόθεση των υποπροϊόντων της οξείδωσης (στέμφυλα) στο περιβάλλον	33
Εικόνα 9. Εκτροφή - παρακολούθηση ανάπτυξης κοτόπουλων	39
Εικόνες 10. Συσκευασία και αποθήκευση σιτηρεσίου	42
Εικόνα 11. Αποθήκευση ιστών	43
Εικόνες 12. Ομογενοποίηση Ιστών με Υγρό Άζωτο.	44
Εικόνα 13. Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης.	45
Εικόνα 14. Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης.	46
Εικόνα 15. Μονοπάτι αναγωγής του H_2O_2 σε H_2O	48

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1. GSH στους ιστούς των κοτόπουλων.	58
Γράφημα 2. Καταλάση στους ιστούς των κοτόπουλων.	59
Γράφημα 3. TAC στους ιστούς των κοτόπουλων.	60
Γράφημα 4. TBARS στους ιστούς των κοτόπουλων.	61
Γράφημα 5. Καρβονύλια στους ιστούς των κοτόπουλων.	62

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

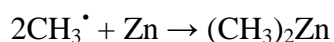
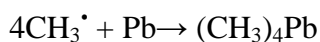
1.1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Ο όρος ελεύθερη ρίζα στην περίοδο του 19ου αιώνα είχε την έννοια τμήματος ενός μορίου που είχε ανεξάρτητη ύπαρξη. Με την εξέλιξη όμως της θεωρίας του δεσμού και την αναγνώριση της τετρασθένειας του άνθρακα, ο όρος ελεύθερη ρίζα μεταβλήθηκε. Αναγνωρίστηκε ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια, τα οποία θα μπορούσαν να έχουν ανεξάρτητη ύπαρξη κάτω από ορισμένες συνθήκες. Από πειράματα όμως, όπου γίνονταν η υπόθεση της δημιουργίας της ρίζας του μεθυλίου (CH_3^\bullet), το τελικό προϊόν που λαμβάνονταν ήταν το αιθάνιο ($\text{CH}_3\text{-CH}_3$). Πιστεύονταν λοιπόν ότι οι "ελεύθερες ρίζες", τουλάχιστον για οργανικές ενώσεις, δεν υπάρχουν σε σταθερή μορφή.

Η αντίληψη για τις ελεύθερες ρίζες άλλαξε το 1900 από τον Gomborg. Στην προσπάθειά του να παρασκευάσει το εξαφαινυλοαιθάνιο από διαλύματα χλωριούχου τριφαινυλομεθυλίου με άργυρο ή ψευδάργυρο, παρέλαβε κίτρινα διαλύματα μιας ουσίας που αποχρωματίζονταν πολύ γρήγορα από τον αέρα ή με ιώδιο. Η παρατήρηση αυτή κατά τη γνώμη του ήταν το αποτέλεσμα της σύνθεσης της τριφαινυλομεθυλο-ρίζας, όπως δείχνει η αντίδραση:



Μία άλλη σημαντική παρατήρηση έγινε το 1929 από τον Paneth που τεκμηρίωσε την ύπαρξη ελευθέρων ριζών σε αέρια φάση. Διαβίβαση αζώτου 2 σε δοκιμαστικό σωληνίσκο που περιείχε τετραμεθυλομόλυβδο, δημιούργησε ατμό που περνούσε στη συνέχεια από φούρνο 450 °C. Αρχικά υπήρχε εναπόθεση ενός στρώματος μολύβδου (σχηματισμός μεταλλικού καθρέπτη) από τη διάσπαση του τετρααιθυλομολύβδου, ενώ στη συνέχεια το αέριο προϊόν περνούσε από δεύτερη μεταλλική εναπόθεση (ψευδαργύρου ή αντιμονίου) θερμαινόμενη σε 1000 °C. Οι αντιδράσεις που ελάμβαναν χώρα είναι: $(\text{CH}_3)_4\text{Pb} \xrightarrow{450^\circ\text{C}} 4\text{CH}_3^\bullet + \text{Pb}$



Τα επόμενα χρόνια έγιναν πειράματα με άλλες αντιδράσεις και τα αποτελέσματα τεκμηρίωναν την ύπαρξη ελεύθερων οργανικών ριζών. Η ανακάλυψη τους διαλεύκανε μηχανισμούς οργανικών αντιδράσεων, όπως την προσθήκη anti-Markovnikov του υδροβρωμίου σε ολεφίνες και την ομολυτική αρωματική υποκατάσταση. Το 1937, ο Flory (Βραβείο Νόμπελ Χημείας, 1974), που θεωρείται ο "πατέρας" της χημείας των πολυμερών, πρότεινε το μηχανισμό ελευθέρων ριζών στον

πολυμερισμό προσθήκης.

Αρκετές συνθετικές μέθοδοι παραγωγής συνθετικών ελαστικών από στυρόλιο και βουταδιένιο καθώς και πολυαιθυλενίου χρησιμοποιούν τον ριζικό πολυμερισμό.

Ελεύθερη ρίζα με τη νεώτερη έννοια, είναι ένα άτομο ή ομάδα ατόμων (ανόργανα ή οργανικά μόρια) που φέρει ένα ασύζευκτο (unpaired) ηλεκτρόνιο. Υπάρχουν και οι διρίζες όπου τα δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια βρίσκονται σε κάποια απόσταση μεταξύ τους αλλά στο ίδιο μόριο

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

Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία λέγεται ελεύθερη ρίζα και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Gilbert, 2000, Halliwell & Gutteridge, 1990). Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης. (Halliwell & Gutteridge, 1990). Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και έχουν διπλό ρόλο αφού ανάλογα με το ρυθμό παραγωγής τους μπορεί να είναι είτε ευεργετικές είτε επιβλαβείς.

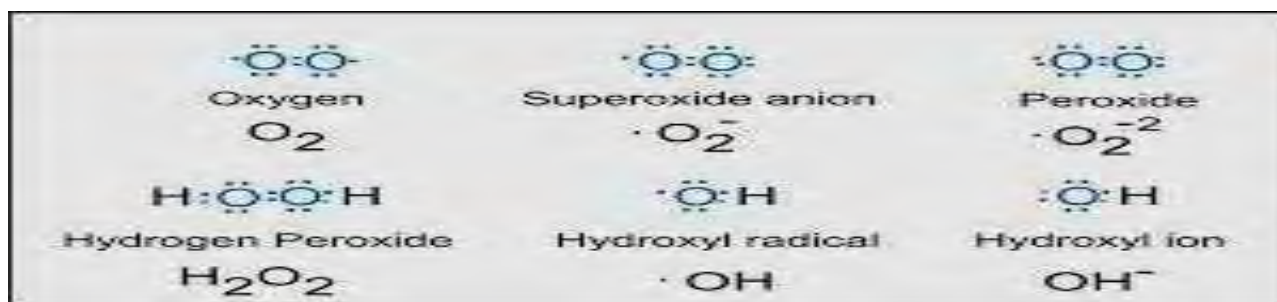
Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta et al., 2004; Pani and Galeotti, 2010; AICR, 2007), το θείο (Battin et al., 2009; Pani and Galeotti, 2010) ή τον άνθρακα. Το ίδιο το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του O_2 , που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (*triplet state*) και συμβολίζεται με $3O_2$, δεν είναι ιδιαίτερα δραστική. Όμως, είναι δυνατή η ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, με αποτέλεσμα τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (*singlet state*) και συμβολίζεται με $*O_2$. Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα

ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Halliwell 2001). Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ) (Cheeseman et al, 1993; Gutteridge, 1995). Τα κυριότερα ΔΕΟ (Aqil et al., 2012; Vainio et al., 1999; Weisburger, 2001; AICR, 2007) είναι:

1. η ρίζα σουπεροξειδίου (O_2^{\bullet}),
2. η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}),
3. η ρίζα υπεροξειδίου (ROO^{\bullet}),
4. το O_2 απλής κατάστασης,
5. το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)
6. και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$).

Στα δραστικά αυτά μοριακά είδη συμπεριλαμβάνεται επίσης και η δραστική μορφή αζώτου, το μονοξειδίο του αζώτου (NO), το οποίο είναι ελεύθερη ρίζα (με τελεία συμβολίζεται η ελεύθερη ρίζα, ενώ με (-) συμβολίζεται το αρνητικό φορτίο της ρίζας και με R, ένα άτομο ή μία ομάδα ατόμων, κυρίως αλυσίδα ατόμων άνθρακα).



Εικόνα 1. Δραστικές μορφές οξυγόνου

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

Όπως συνάγεται από τις αντιδράσεις τους, οι ελεύθερες ρίζες και κυρίως οι πολύ δραστικές όπως η

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

1.2 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με τους παρακάτω τρόπους:

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

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

1. Προσθετικά, όταν η ελεύθερη ρίζα συνδέεται με ένα μόριο ή άτομο (π.χ. προσθήκη της ρίζας OH^\bullet στη βάση γουανίνη του DNA): $X^\bullet + Y \rightarrow [X-Y]^\bullet$
2. Αναγωγικά, όταν η ελεύθερη ρίζα δρα ως αναγωγικός παράγοντας, παραχωρώντας το ασύζευκτό της ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο ή άτομο: $X^\bullet + Y \rightarrow X^+ + Y^{\bullet-}$
3. Οξειδωτικά, όταν η ελεύθερη ρίζα δρα ως οξειδωτικός παράγοντας, δεχόμενη ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο ή άτομο : $X^\bullet + Y \rightarrow X^- + Y^{\bullet+}$
4. Αφαιρετικά, 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: $CH + OH^\bullet \rightarrow C^\bullet + H_2O$

Οι ελεύθερες ρίζες στον ανθρώπινο οργανισμό μπορούν να σχηματιστούν τόσο ενδογενώς όσο και εξωγενώς. Ενδογενώς, σχηματίζονται μέσω των φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών, από όλα τα αερόβια κύτταρα μέσω της δράσης πολλών ενζύμων και πολλές φορές ως αποτέλεσμα παθολογικών καταστάσεων που περιλαμβάνουν το τραύμα, τις μολύνσεις και άλλα. Οι βασικότερες

πηγές ελευθέρων ριζών είναι οι εξής:

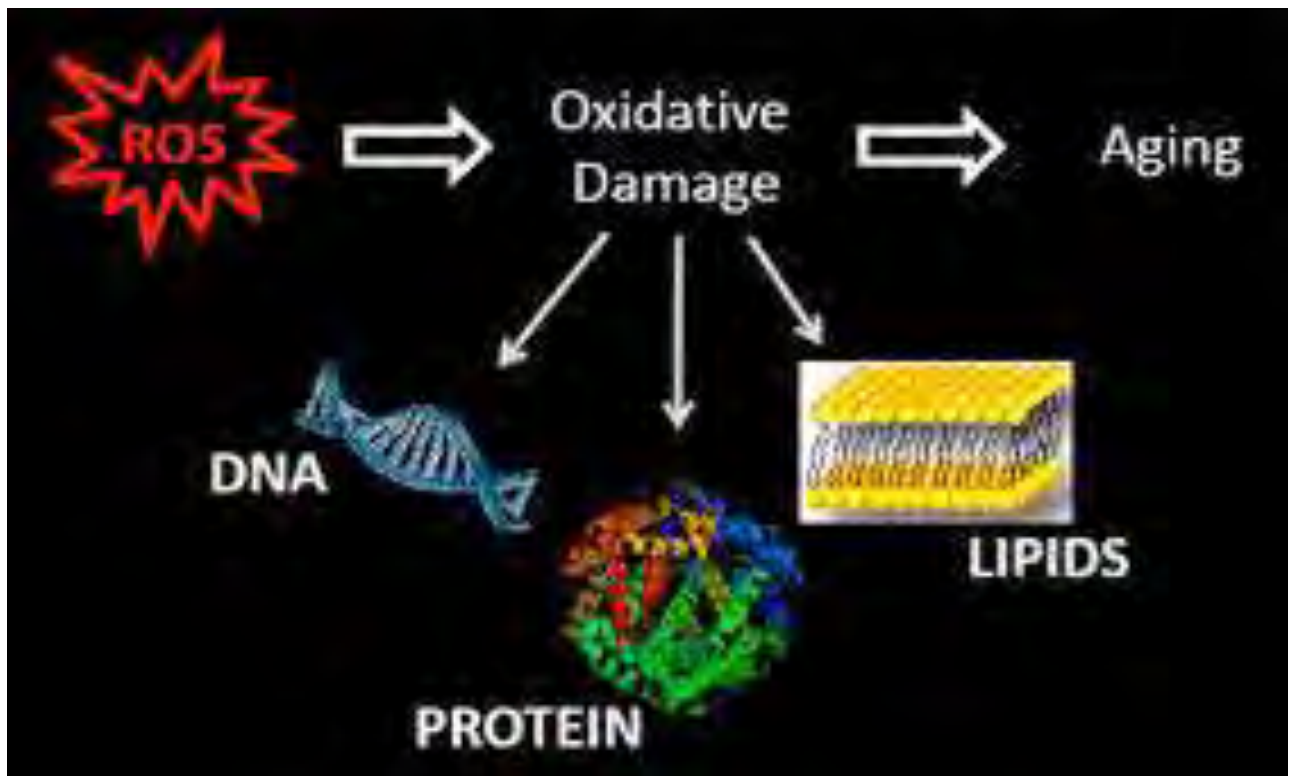
Ενζυμικά συστήματα όπως είναι το κυτόχρωμα P450, η οξειδάση του NAD(P)H, η λιποοξυγονάση, η κυκλοοξυγονάση και η οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν τις κυριότερες ενζυμικές πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.

Ιόντα μετάλλων τα οποία αποτελούν σημαντικούς ενζυμικούς συμπαράγοντες. Στην ελεύθερη μορφή τους, τα ιόντα αυτά μπορούν, μέσα σε βιολογικά συστήματα, να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA προκαλώντας έτσι βλάβες.

Μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς. Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα (Pani and Galeotti, 2010, Vainio et al., 1999).

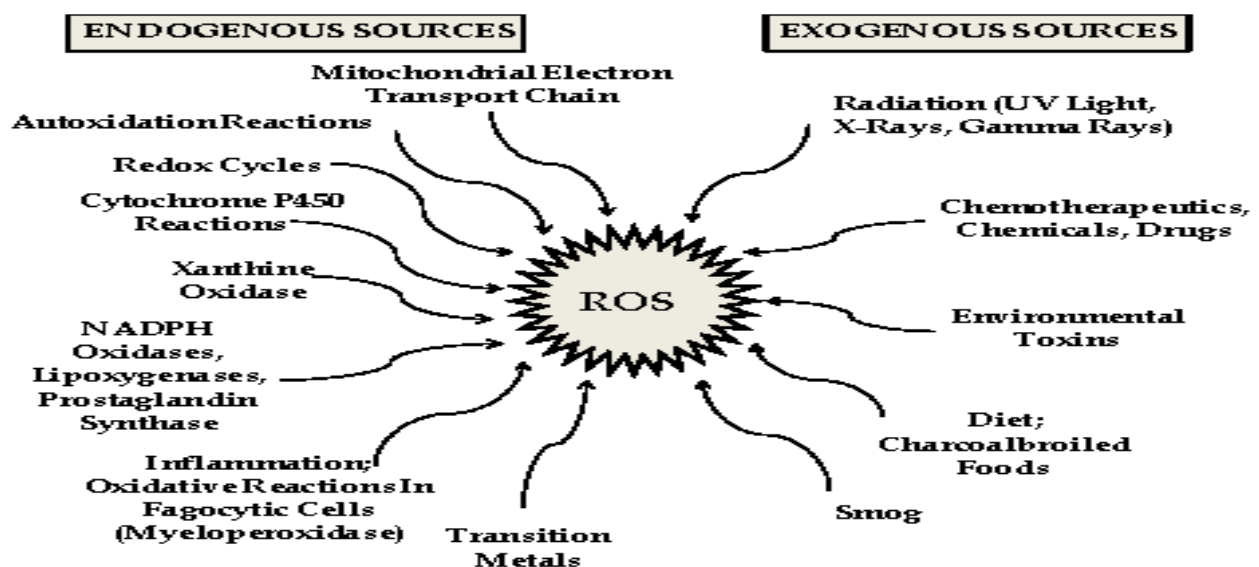
Φαγοκύτταρα. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου που συνοδεύεται από παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ελευθέρων ριζών.

Μιτοχονδριακό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων της αναπνευστικής αλυσίδας έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η κυριότερη πηγή ΔΜΟ (δραστικές μορφές οξυγόνου) στον άνθρωπο είναι η διαρροή ενεργοποιημένου οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια, το οποίο φυσιολογικά εμφανίζεται ως ενδιάμεσο κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και η τελική του τύχη είναι ο σχηματισμός μορίων νερού (Valko, M., et al., 2007).



Εικόνα 2. Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ΔΜΟ.

Επίσης, υπάρχουν αρκετοί εξωγενείς παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στη δημιουργία ελευθέρων ριζών, όπως τα συστατικά του καπνίσματος, η περιβαλλοντική ρύπανση, ο μεταβολισμός συγκεκριμένων διαλυτών, φαρμάκων, παρασιτοκτόνων καθώς και η έκθεση στην ραδιενέργεια-ακτινοβολία.



Εικόνα 3. Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών

1.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Ο όρος οξειδωτικό στρες ορίστηκε για πρώτη φορά το 1985 ως «η διαταραχή της ισορροπίας των προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων» (Sies, H., et al., 1985).

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

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ), όπως η ρίζα υπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο πυρηνικό, μιτοχονδριακό DNA, καθώς και στο DNA των χλωροπλαστών. Οι βλάβες μπορεί να είναι εγκοπές στη μία έλικα του DNA (DNA nicks) ή σπασίματα και στις δύο αλυσίδες του (DNA fragments), καθώς επίσης και πληθώρα χημικών τροποποιήσεων στις βάσεις πουρίνης [για παράδειγμα η 8-υδροξύ-γουανίνη (8-OH-guanine)] και πυριμιδίνης [για παράδειγμα η 5-υδροξύ-6-υδροθυμίνη (5-hydroxy-6-hydrothymine)]. Εναλλακτικά, η προσβολή των πρωτεϊνών του DNA από ελεύθερες ρίζες μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό ομοιοπολικών ενώσεων DNA-πρωτεϊνών (DNA-protein cross-links), όπως για παράδειγμα μεταξύ θυμίνης και τυροσίνης, ενώ η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) μπορεί να προκαλέσει ομοιοπολική δέσμευση και διμερισμό μεταξύ γειτονικών πυριμιδινών (pyrimidine dimers). Άμεσο επακόλουθο της βλάβης του DNA είναι η μεταλλαξιογένεση που με τη σειρά της οδηγεί σε δυσλειτουργία του κυττάρου και καρκινογένεση.

Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στο DNA, ο σχηματισμός υπεροξειδίων είτε στον πεπτιδικό κορμό είτε στις πλευρικές αλυσίδες ορισμένων αμινοξέων αποτελεί έναν μόνο από τους πολλούς τύπους οξειδωτικών βλαβών που έχουν παρατηρηθεί στις πρωτεΐνες. Παρ' όλα αυτά, ο όρος υπεροξειδωση πρωτεϊνών έχει προσλάβει μια ευρύτερη έννοια και δηλώνει όλα τα είδη ομοιοπολικών

τροποποιήσεων που προκαλούνται στις πρωτεΐνες από τα διάφορα είδη ΔΜΟ (OH•, ONOO⁻, HClO, ¹O₂) ή άλλα παραπροϊόντα του οξειδωτικού στρες (π.χ. από προϊόντα της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, όπως οι αλδεϋδες MDA και HNE). Οι χημικές μεταβολές που επέρχονται στις πρωτεΐνες ως συνέπεια του οξειδωτικού στρες ποικίλουν ανάλογα με το προσβαλλόμενο σε κάθε περίπτωση αμινοξύ αλλά και το είδος του δραστικού μορίου που επιφέρει τη βλάβη (Stadtman, 2006).

Χαρακτηριστικά, πρωτεΐνες που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν πιο εύκολα με ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα τη μεταβολή της δομής τους και της λειτουργίας τους (Liras et al, 1977).

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

Πίνακας 1: Γενικοί τύποι οξειδωτικής τροποποίησης πρωτεϊνών.

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

Πίνακας 2: Βιοχημικές συνέπειες οξειδωτικής τροποποίησης πρωτεϊνών.

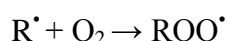
Οι περισσότερες οξειδωτικές επιδράσεις οδηγούν στη δυσλειτουργία πολλών πρωτεϊνών, η οποία μπορεί να οφείλεται σε αυτή την άμεση μεταβολή/αλλαγή αμινοξέων που βρίσκονται σε μια λειτουργική περιοχή για την πρωτεΐνη ή σε μερική αποδιάταξή της (Εικόνα 4). Αν οι πρωτεΐνες δεν αποδομηθούν εγκαίρως σε αυτό το στάδιο, τείνουν να δημιουργούν συσσωματώματα τα οποία μακροπρόθεσμα σχηματίζουν ομοιοπολικές ενώσεις (cross links) μεταξύ τους και με τη συσσώρευσή τους, μπορούν να οδηγήσουν ακόμα και στον κυτταρικό θάνατο (Jung et al., 2007).



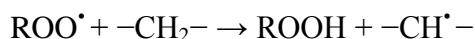
Εικόνα 4. Οξειδωτικό στρες

Όσον αφορά τα λιπίδια, έχει βρεθεί πως ένας από τους κύριους στόχους των ελευθέρων ριζών και λοιπών Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ΔΜΟ) που σχηματίζονται στο κύτταρο είναι η φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταροπλασματικής και των ενδοκυττάρων μεμβρανών. Ως γνωστόν, το υδρόφοβο τμήμα των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων αποτελείται από λιπαρά οξέα με

μακριές (14-24 άτομα C), αλειφατικές υδρογονανθρακικές αλυσίδες, ένα μεγάλο ποσοστό των οποίων έχει έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς σε cis διάταξη (μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αντιστοίχως). Όσο αυξάνεται ο αριθμός των διπλών δεσμών της αλειφατικής αλυσίδας τόσο μειώνεται το σημείο τήξης του αντίστοιχου λιπαρού οξέος. Έτσι, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) συνεισφέρουν σημαντικά στη ρευστότητα των μεμβρανών, η οποία είναι άρρηκτα συνυφασμένη με όλες σχεδόν τις βιολογικές τους λειτουργίες. Την ίδια στιγμή όμως, τα PUFAs είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στην οξειδωτική προσβολή από διάφορα είδη ΔΜΟ, με την οποία ξεκινά μια αλληλουχία αντιδράσεων ελευθέρων ριζών με καταστροφικά αποτελέσματα για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των μεμβρανών γνωστή ως υπεροξείδωση λιπιδίων. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων αποτελεί, αν όχι την πιο σημαντική, τουλάχιστον την πιο μελετημένη εκδήλωση του οξειδωτικού στρες και των αλληλεπιδράσεων ελευθέρων ριζών στα κύτταρα. Περιλαμβάνει το στάδιο έναρξης (initiation) και το στάδιο διάδοσης (propagation stage). Η συνήθης τύχη της ρίζας άνθρακα που σχηματίζεται (R^{\bullet}) είναι να συνδυαστεί με ένα μόριο O_2 με επακόλουθη παραγωγή υπεροξυλικής ρίζας, με βάση την αντίδραση:

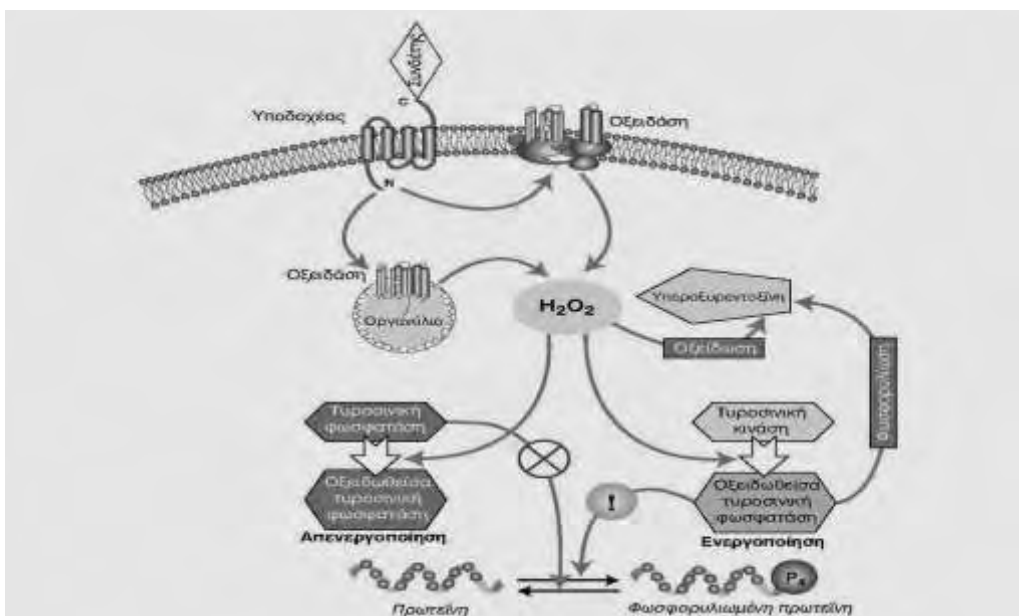


Η ελεύθερη υπεροξυλική ρίζα είναι πολύ δραστική και μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από κάποιο γειτονικό μόριο PUFA, μετατρέπόμενη στο αντίστοιχο υδροϋπεροξειδίο ($ROOH$) :



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

Η έκθεση των λιπιδικών υπεροξειδίων σε ιόντα Fe ή Cu του μεμβρανικού περιβάλλοντος μπορεί να προκαλέσει την αποικοδόμησή τους σε μια πληθώρα προϊόντων, τα οποία θεωρούνται ως τελικά προϊόντα της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται εποξειδία, κορεσμένες αλδεϋδες (π.χ. εξανάλη), ακόρεστες αλδεϋδες αλκενάλες, (π.χ. 4-υδροξυνονενάλη ή HNE), κετόνες (βουτανόνες, πεντανόνες κ.α.), υδρογονάνθρακες (πεντάνιο, αιθάνιο, αιθυλένιο), μαλονική διαλδεϋδη (MDA) και ισοπροστάνες. Πολλά από αυτά τα προϊόντα ή μεταβολικά παράγωγά τους είναι εξαιρετικά τοξικά και ευθύνονται για μεγάλο μέρος των βιοφυσικών και βιοχημικών διαταραχών που έπονται της υπεροξείδωσης των λιπιδίων



Εικόνα 5. Οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, τόσο ενδοκυτταρικά όσο και διακυτταρικά (Sen et al., 1996; Rimbach et al., 1999; Reid, 2001; Sen, 2001; Linnane et al., 2002). Για παράδειγμα, έχουν τη δυνατότητα τροποποίησης της δραστηριότητας πρωτεϊνών προκαλώντας το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Οι πρωτεΐνες στόχοι των ROS ανήκουν σε πολλές κατηγορίες όπως φωσφατάσες, MAP κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες ή μεθυλάσες ιστονών.

1.3.1 Οξειδωτικό στρες και διαταραχές της υγείας

Το οξειδωτικό στρες συμμετέχει σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η αθηροσκλήρυνση, νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως Parkinson και Alzheimer, ο καρκίνος και η διαδικασία της γήρανσης (Vera, D., et al., 2013).

Πιο συγκεκριμένα η περίσσεια ελευθέρων ριζών μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση των κυτταρικών μεμβρανών (διακοπή της διακυτταρικής επικοινωνίας), των νουκλεϊκών οξέων (αυξημένος κίνδυνος καρκινογένεσης), των μιτοχονδρίων (αποσύζευξη ενεργειακής παραγωγής) και των πρωτεϊνών. Οι ασθένειες οι οποίες συνδέονται με βλάβες λόγω ελευθέρων ριζών είναι καρδιακές παθήσεις, νευρολογικές παθήσεις, αναπνευστικά προβλήματα, δερματικές παθήσεις, περιβαλλοντική ευαισθησία, φλεγμονώδης ασθένεια του εντέρου, χρόνια σύνδρομο κόπωσης καθώς και AIDS ή παρεμφερείς ασθένειες (Poljsak, B., et al., 2011).

1.3.2 Οξειδωτικό στρες και διαταραχή της υγείας των ζώων

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι στα κτηνοτροφικά ζώα το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε μία σειρά από παθολογικές καταστάσεις (σήψη, μαστίτιδα, εντερίτιδα, πνευμονία, παθήσεις των αρθρώσεων, φλεγμονή της αναπνευστικής οδού) στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και καταστάσεις που σχετίζονται άμεσα με τη ζωική παραγωγή και την ευζωία (Lykkesfeldt and Svendsen 2007). Για παράδειγμα, κοινές ασθένειες όπως, πνευμονία (Lauritzen et al., 2003), εντερίτιδα (Miller et al., 1993), πυρετός (Kataria 2012b), σήψη στους χοίρους (Basu and Eriksson 2001) και υποτροπιάζουσα απόφραξη και φλεγμονή της αναπνευστικής οδού στα άλογα (Deaton et al., 2004a, 2005), προκαλούνται από διαταραχές της αντιοξειδωτικής ομοιόστασης των ζώων. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι μαστίτιδα (Weiss et al., 2004), πανώλη (*Peste des petits ruminants*) (PPR) (Kataria A. K 2012a), πνευμονία (Wessely-Szponder et al., 2004) και μολύνσεις από παράσιτα (Celi 2010) προκαλούνται στα μηρυκαστικά λόγω οξειδωτικού στρες, ενώ πολλές έρευνες έδειξαν ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να προστατεύσει τα ζώα από τέτοιες ασθένειες ή να μειώσει τα κλινικά συμπτώματά τους (Hogan et al., 1992; Deaton et al., 2004b).

Έτσι, θεωρείται ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική και χαμηλού κόστους παρέμβαση για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων των κτηνοτροφικών ζώων στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες (Lykkesfeldt and Svendsen 2007). Επίσης, πρόσφατες μελέτες (Jain and Flora 2012; Chan et al., 2013) έδειξαν ότι τα πολύ νεαρά ζώα λόγω παραγόντων στρες (στρες απογαλακτισμού) έχουν μειωμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σε σύγκριση με τα ενήλικα άτομα και έτσι στα νεαρά άτομα είναι ακόμα πιο απαραίτητη η χορήγηση αντιοξειδωτικών για προστασία από ασθένειες.

Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, χρησιμοποιήθηκαν πλήρως εμπλουτισμένο σε πολυφαινόλες εκχύλισμα από Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (YAE) σε ζωοτροφές για κοτόπουλα και προέκυψαν σημαντικά αποτελέσματα για την αντιοξειδωτική τους δράση. Τα αποτελέσματα προήλθαν από μετρήσεις των ακόλουθων δεικτών οξειδωτικού στρες: ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), δραστικότητα της καταλάσης (CAT), ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC - Total antioxidant capacity), ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric acid reactive substances) και πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC).

Συγκεκριμένα, όσον αφορά στα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής τόσο στο αίμα όσο και στους ιστούς (Μυϊκός, Ηπατικός, Καρδιακός) διαπιστώθηκε, ότι η ομάδα που λαμβάνανε το πλήρως εμπλουτισμένο σε πολυφαινόλες εκχύλισμα από YAE, παρουσίασε αυξημένες τιμές της TAC

(αίμα:15%, ιστούς: 14,8-19,2%), στατιστικά σημαντικές μειωμένες συγκεντρώσεις στην οξειδωση των λιπιδίων (αίμα: 54%, ιστούς: 50,7% στον μυϊκό), των πρωτεϊνών (αίμα: 43%, ιστούς: 58,6% στον ηπατικό), αλλά και αυξημένη δραστηριότητα της καταλάσης (αίμα: 58%, ιστούς: 23% ηπατικό) σε σχέση με τα κοτόπουλα της ομάδας ελέγχου που λάμβαναν κοινό σιτηρέσιο. Αντίθετα, οι τιμές της GSH στο αίμα ήταν αυξημένες στην ομάδα που λάμβανε ζωοτροφή με ΥΑΕ περίπου στο τετραπλάσιο από την ομάδα ελέγχου (από 1,1 σε 4 $\mu\text{mol/gr}$ αιμοσφαιρίνης), ενώ στους ιστούς η GSH, ως ενδογενές αντιοξειδωτικό, εμφάνισε τις μεγαλύτερες τιμές της στην ομάδα ελέγχου κάτι το οποίο ερμηνεύεται ως απόκριση του οργανισμού στα εξωγενή αντιοξειδωτικά που χορηγούνται με το σιτηρέσιο των αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Αρα αποδείχθηκε ότι η χορήγηση πολυφαινολικού σιτηρεσίου εμπλουτισμένου με εκχύλισμα ΥΑΕ αυξάνει την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού στα κοτόπουλα. Επίσης κατά την διάρκεια των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της ημερήσιας αύξησης βάρους και αποδείχθηκε ότι τα ΥΑΕ βελτιώνουν την πρόσληψη τροφής και κατά συνέπεια την μετατροπή της τροφής σε σωματικό βάρος. Με δεδομένο λοιπόν τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική η συμβολή των αντιοξειδωτικών ουσιών στην ευζωία των ζωικών οργανισμών σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής τους και είναι ιδιαίτερης σημασίας η δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών και η εισαγωγή τους στην καθημερινή διατροφή, ειδικότερα στα πρώτα στάδια μετά την γέννησή τους όπου η φυσική άμυνα του οργανισμού δεν επαρκεί για να διατηρήσει την ισορροπία μεταξύ του οξειδωτικού στρες και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

Έτσι, στην παρούσα μελέτη θα ελεγχθεί αν πολυφαινολικό εκχύλισμα στεμφύλων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών με σκοπό την προστασία των ζώων από το οξειδωτικό στρες αλλά και τη γενικότερη βελτίωση της ευζωίας τους και την αύξηση της παραγωγικότητάς τους, αυξάνοντας την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού στα κοτόπουλα όπως έγινε με την χορήγηση πολυφαινολικού σιτηρεσίου εμπλουτισμένου με εκχύλισμα ΥΑΕ.

Επιπλέον, τα στέμφυλα που θα χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή αυτών των ζωοτροφών παράγονται ως υποπροϊόντα κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας της οينوποίησης τα οποία είναι ιδιαίτερα ρυπογόνα λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε οργανικές ενώσεις και η ανεξέλεγκτη απόρριψή τους προκαλεί περιβαλλοντολογικά προβλήματα.

Αντιοξειδωτικές ουσίες όπως οι φυτικές πολυφαινόλες που εμπεριέχονται στα στέμφυλα και στα Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), αποτελούν αποδεδειγμένα σημαντικά βιοδραστικά συστατικά με αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς εμποδίζουν την συσσώρευση των ελεύθερων ριζών, που μπορούν να οδηγήσουν σε οξειδωτική βλάβη των βιολογικών μακρομορίων, ενώ συμβάλλουν

σημαντικά στην αντιοξειδωτική άμυνα των ζωικών οργανισμών αυξάνοντας τα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενδογενών μορίων και ενζύμων όπως της γλουταθειόνης (GSH) και της καταλάσης (CAT), ενισχύοντας έτσι το ανοσοποιητικό τους σύστημα.

Συγκεκριμένα, εξαιτίας των ευεργετικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων των στεμφύλων όλο και μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς αυτά, κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης που παρουσιάζουν, η οποία βασίζεται στη σημαντικά υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες. Έρευνες για την ανάκτηση πολυφαινόλων από τα υποπροϊόντα της οينوποιίας έχουν κυρίως επικεντρωθεί στα στέμφυλα των κόκκινων σταφυλιών, τα οποία χαρακτηρίζονται από σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις (Ju and Howard, 2005; Kammerer et al., 2005; Spingo et al., 2007). Τα στέμφυλα τα οποία αποτελούνται από τα στερεά μέρη του σταφυλιού, δηλαδή τους βόστρυχους, τους φλοιούς, και τα κουκούτσια (γίγαρτα), είναι η φυτική βιομάζα που προκύπτει κατά τη διαδικασία οينوποίησης, μετά από την πίεση των σταφυλιών για την παραλαβή του μούστου και είναι το κύριο από άποψη όγκου και απομένουσας αξίας υποπροϊόν της οينوποιίας.

Επιπλέον, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών σε κυτταροκαλλιέργειες έδειξαν ότι εκχύλισμα στεμφύλων, πλούσιο σε πολυφαινόλες, ενισχύει τους ενδοκυττάριους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, όπως αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH), επιδρώντας στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων, ενώ προσφέρει προστασία υπό την παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (Tert-butylhydroperoxide) (Goutzourelas et al., 2014).

1.4 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Οι πολυφαινόλες είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται κυρίως από φυσικές αλλά επίσης και συνθετικές ή ημισυνθετικές, οργανικές χημικές ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων πολλαπλάσιων δομικών μονάδων της φαινόλης (Quideau, S., et al., 2011).

Βρίσκονται στα φυτά και στα τρόφιμα, τα προστατεύουν από εξωτερικούς παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία και οι μικροβιακές εισβολές, ενισχύοντας τη φυσική τους άμυνα. Στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες μπορούν να συμβάλλουν στην πικρή γεύση, στυφότητα, στο χρώμα, στη γεύση, στην οσμή και στην οξειδωτική σταθερότητα. Η κύρια πηγή για τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά είναι η διατροφή, μιας και οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε ποικιλίες τροφίμων που περιέχουν φυτοθεραπευτικά συστατικά. Τα περισσότερα όσπρια, φρούτα (όπως μήλα, μούρα, πεπόνι,

κεράσια, βακκίνια, σταφύλια, αχλάδια, δαμάσκηνα, βατόμουρα, και φράουλες), και λαχανικά (όπως μπρόκολο, λάχανο, σέλινο, κρεμμύδι και μαϊντανός) είναι πλούσια σε πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά. Το κόκκινο κρασί, η σοκολάτα, το πράσινο τσάι, το ελαιόλαδο, η γύρη της μέλισσας είναι εναλλακτικές πηγές. Χιλιάδες είναι τα αντιοξειδωτικά και καθένα από αυτά έχει διαφορετικές ιδιότητες. Διαχωρίζονται σύμφωνα με τη χημική τους δομή σε μεγάλες ομάδες.

Ένα άλλο σπουδαίο όμως σημείο που πρέπει να επισημανθεί, είναι πως οι πολυφαινόλες αποτελούν αρκετές φορές την κύρια ρυπαντική παράμετρο διαφόρων αποβλήτων από βιομηχανίες τροφίμων (π.χ. οινοποιεία, ελαιουργεία κλπ.) η οποία ευθύνεται για σημαντικότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Άρα, εάν προκύψουν μέθοδοι απομόνωσης των πολυφαινολών από τέτοιου είδους απόβλητα, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για παράδειγμα στην ενσίρωση για οικότροφα ζώα και στην υδρολίπανση. Ενώ από την άλλη πλευρά, οι απομονωμένες πολυφαινόλες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία προϊόντων με αυξημένη προστιθέμενη αξία όπως ζωοτροφών με αντιοξειδωτική δράση.

1.4.1 Χημική δομή και ομάδες

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

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

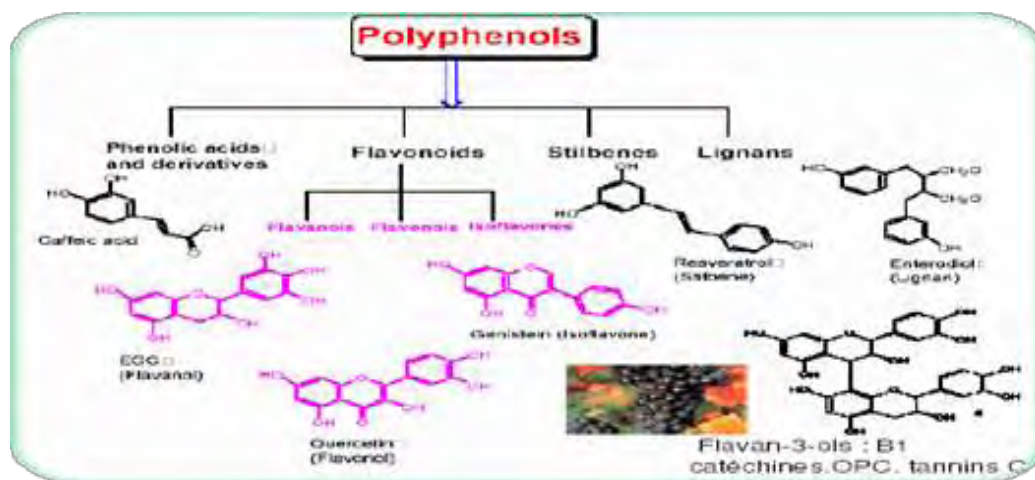
Φαινολικά οξέα. Παρέχουν αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Μία διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά ολικής άλεσης μας παρέχει επαρκείς ποσότητες από φαινολικά οξέα. Παραδείγματα τροφών που περιέχουν φαινολικά

οξέα είναι τα μήλα, τα κεράσια, τα ακτινίδια, οι φράουλες, τα κρεμμύδια, το τσάι και άλλα.

Ανθοκυανίνες. Είναι αντιοξειδωτικές ουσίες που μας παρέχουν προστασία από τις φλεγμονές, τον καρκίνο και τις καρδιαγγειακές νόσους. Στην ουσία πρόκειται για τις χρωστικές που δίνουν το λαμπρό κόκκινο, μπλε και μωβ χρώμα στα ρόδια, στα σταφύλια, στα κόκκινα κρεμμύδια, στα μπλε μούρα και άλλα.

Στιλβένια. Με την πιο διάσημη από αυτά την ρεσβερατρόλη, είναι ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά του Alzheimer, των καρδιαγγειακών νόσων και ιδιαίτερα της αθηρομάτωσης, του καρκίνου και του σακχαρώδους διαβήτη. Βρίσκονται στα μούρα, στη φλούδα των σταφυλιών ιδιαίτερα των κόκκινων, στο κρασί και σε άλλες φυτικές τροφές.

Λιγνάνες. Οι λιγνάνες είναι χημικές ενώσεις που βρίσκονται στα φυτά, ιδιαίτερα στο λιναρόσπορο. Το λινάρι είναι ένα φυτό με εντυπωσιακά μωβ λουλούδια που είναι ενδημικά στη Μεσόγειο και την Ινδία. Οι λιγνάνες έχουν χρησιμοποιηθεί στα φυτικά φάρμακα για πολλούς αιώνες (Naghma, K., et al., 2007).



Εικόνα 6. Χημικές δομές πολυφαινολών

Το μέγεθος όλων αυτών των πολυφαινολών ποικίλει από μικρά μόρια (όπως η φαινόλη), έως πολυμερή (όπως οι ταννίνες) μεγάλου μοριακού βάρους.

1.4.2 Φυσιολογικές δράσεις

Οι πολυφαινόλες παίζουν σημαντικό ρόλο και στα φυτά καθώς μπορεί να έχουν αρκετές επιπτώσεις στους φυτικούς ιστούς όπως είναι η καταστολή αυξητικών ορμονών, η προστασία από την UV ακτινοβολία, η προσθήκη χρώματος, η πρόληψη μικροβιακών μολύνσεων και η συμμετοχή σε διαδικασίες ανάπτυξης (Huber., B., et al., 2003), είναι υπεύθυνες επίσης για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών (Manach C. et al. 2004), συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών προσελκύοντας τα έντομα επικονιαστές και στη διασπορά των σπερμάτων μετά την κατανάλωση των καρπών από τα ζώα. Επιπλέον, λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων, ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα που είναι τοξικά για τα φυτά και ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων ενώ εμπλέκονται στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του καθορισμού του φύλου και της φωτοσύνθεσης (Manach et.al., 2004; Di Carlo et.al., 1999; Harborne 1986) Επιπλέον, σε ορισμένα είδη φυτών οι πολυφαινόλες μπορούν να παρέχουν προφύλαξη έναντι της σήψης (John Hart., H., et al., 1974).

Επίσης, οι πολυφαινόλες είναι ως ένα βαθμό υπεύθυνες για τις οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες των φυτικών τροφίμων. Προσδίδουν στα τρόφιμα και στα ποτά την χαρακτηριστική πικρή γεύση και τη στυφότητα. Εμπλέκονται και σε οξειδωτικές μεταβολές οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων.

Εκτός από τις ιδιότητες που προσδίδουν στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες είναι ιδιαίτερα ωφέλιμες για τον ανθρώπινο οργανισμό, αφού παρέχουν προστασία έναντι των καρδιοπαθειών και ορισμένων μορφών καρκίνου (Hertog., M., et al., 1995).

1.4.3 Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία

Στην περίπτωση των καρδιαγγειακών διαταραχών, το οξειδωτικό στρες και οι ΔΜΟ εμπλέκονται σε ενδοθηλιακές βλάβες, σε δημιουργία αρτηριοσκλήρυνσης και σε παρατεταμένη ζημιά η οποία μπορεί να οδηγήσει σε έμφραγμα του μυοκαρδίου, καθώς και σε ισχαιμική επανέγχυση.

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει τη σημασία των φυσικών διατροφικών πολυφαινολών στη βελτίωση της καρδιαγγειακής υγείας και έχει τονιστεί ο σημαντικός ρόλος που παίζουν αυτές οι ουσίες στον περιορισμό των επιπτώσεων της κυτταρικής γήρανσης. Πολυφαινόλες όπως η ρεσβερατρόλη, η επιγαλλοκατεχίνη (EGCG) και η κουρκουμίνη έχουν αναγνωριστεί ότι έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην καρδιαγγειακή υγεία, ενώ ορισμένες έχουν επίσηςδειχθεί ότι είναι

προστατευτικές ενάντια στη γήρανση (Sandhya, K., et al., 2013).

Η προστατευτική δράση των πολυφαινολών αποδίδεται στην αντιοξειδωτική τους δράση ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών ή ως αναστολείς των αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων. Οι φαινολικές τους ομάδες δρουν σαν ισχυροί δέκτες ηλεκτρονίων, σχηματίζοντας σταθερές φαινοξυλικές ρίζες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες που έρχονται σε επαφή μαζί τους να δίνουν το ηλεκτρόνιο τους και να αδρανοποιούνται. Η φαινολική ρίζα που παράγεται είναι σταθερή και έχει την ικανότητα να μετατοπίζει το ηλεκτρόνιο έτσι ώστε να μην είναι δραστικό. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις, γεγονός το οποίο προσαυξάνει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών. Η ρίζα αυτή μπορεί επιπλέον να αδρανοποιήσει και την αρχική ρίζα η οποία οδήγησε στην παραγωγή της οδηγώντας στη δημιουργία ενός μη δραστικού μορίου (Ferguson et al., 2001).

1.5 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ.

Η **ράγα** προέρχεται από την ανάπτυξη των ιστών του νουκέλλου της ωοθήκης. Είναι ένας σαρκώδης καρπός που φέρει μη- αποσχιζόμενο, σε όλο του το βάθος, σαρκώδες **περικόρπιο** και περιλαμβάνει δύο συγκαρπικά **καρπόφυλλα**. Το κάθε καρπόφυλλο αποτελείται από δύο ανάτροπους σπερματικές βλάστες, διατεταγμένες σε αξονική θέση, οι οποίες κατά την ωρίμανση μετατρέπονται σε γίγαρτα (Δημοπούλου, 2008).

Υπάρχει ένα μεγάλο σύνολο βιβλιογραφικών αναφορών για την ονοματολογία των ιστών της ράγας (Pratt, 1971, Viala και Pechoutre 1910, Guillon 1905, Ribereau- Gayon et al. 1998), σύμφωνα όμως με τον Fournioux (1982) ο καρπός αποτελείται από τρία κύρια τμήματα:

- α) το περικόρπιο ή φλοιό, που δομείται από την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και το υπόδερμα
- β) το μεσοκάρπιο ή αλλιώς σάρκα
- γ) το ενδοκάρπιο, δηλαδή το εσωτερικό στρώμα της σάρκας.

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

α) Περικάρπιο ή φλοιός

Αποτελεί το 5-10% του συνολικού βάρους της ράγας. Είναι ένα δερματώδες σύστημα που περιλαμβάνει την εφυμενίδα, την εξωτερική επιδερμίδα του περικάρπιου, το κολλεγχυματικό υπόδερμα (Considine 1979, Knox 1981) και άλλους ιστούς πλούσιους σε βιταμίνη C και ουσίες που συνεισφέρουν στο χρώμα, το άρωμα και τη γεύση (Mullins et al. , 1990). Η επιδερμίδα αποτελείται από μία ή δύο στιβάδες εφαπτόμενων επιμηκυμένων κυττάρων, που αποτελούν το στρώμα του φλοιού στο οποίο περιέχονται αρωματικές και πρόδρομες αρωματικές ενώσεις κάθε ποικιλίας.

Αντίστοιχα, το υπόδερμα αποτελείται από έξι έως δέκα στιβάδες κυττάρων, στα πρώτα επίπεδα των οποίων εντοπίζονται οι ανθοκυάνες στις οποίες οφείλεται το κόκκινο χρώμα των σταφυλιών. Τα κύτταρα του φλοιού είναι ενεργά μεταβολικά, καθώς διεξάγουν πολλές βιοχημικές και φυσιολογικές μεταβολές κατά την πορεία ανάπτυξης των ραγών. Ο αριθμός των στιβάδων του φλοιού και το μέγεθός τους αποτελεί χαρακτηριστικό κάθε ποικιλίας (Δημοπούλου, 2008).

Ο φλοιός αποτελείται κυρίως από νερό κατά 75-80%, αδιάλυτες πηκτίνες, κυτταρίνη, πρωτεΐνες και οξέα όπως είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό οξύ. Σε γενικές γραμμές αν και η πολυφαινολική σύσταση είναι διαφορετική σε κάθε ποικιλία, επηρεαζόμενη σε κάθε περίπτωση και από τις συνθήκες καλλιέργειας, ο φλοιός φαίνεται να περιέχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα τανινών στο σταφύλι. Οι τανίνες στα σταφύλια διακρίνονται από το μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού τους και από το μικρότερο ποσοστό εστέρων γαλλικού οξέος. Η κατεχίνη, η επικατεχίνη και η γαλλική επικατεχίνη είναι τα συστατικά της τανίνης. Η κερκετίνη, οι γλυκοζίτες, τα γλυκουρονίδια, το γαλλικό οξύ και η ρεσβερατρόλη ολοκληρώνουν τη φαινολική σύσταση του φλοιού (Arnous, Meyer, 2009).

β) το μεσοκάρπιο ή αλλιώς σάρκα

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

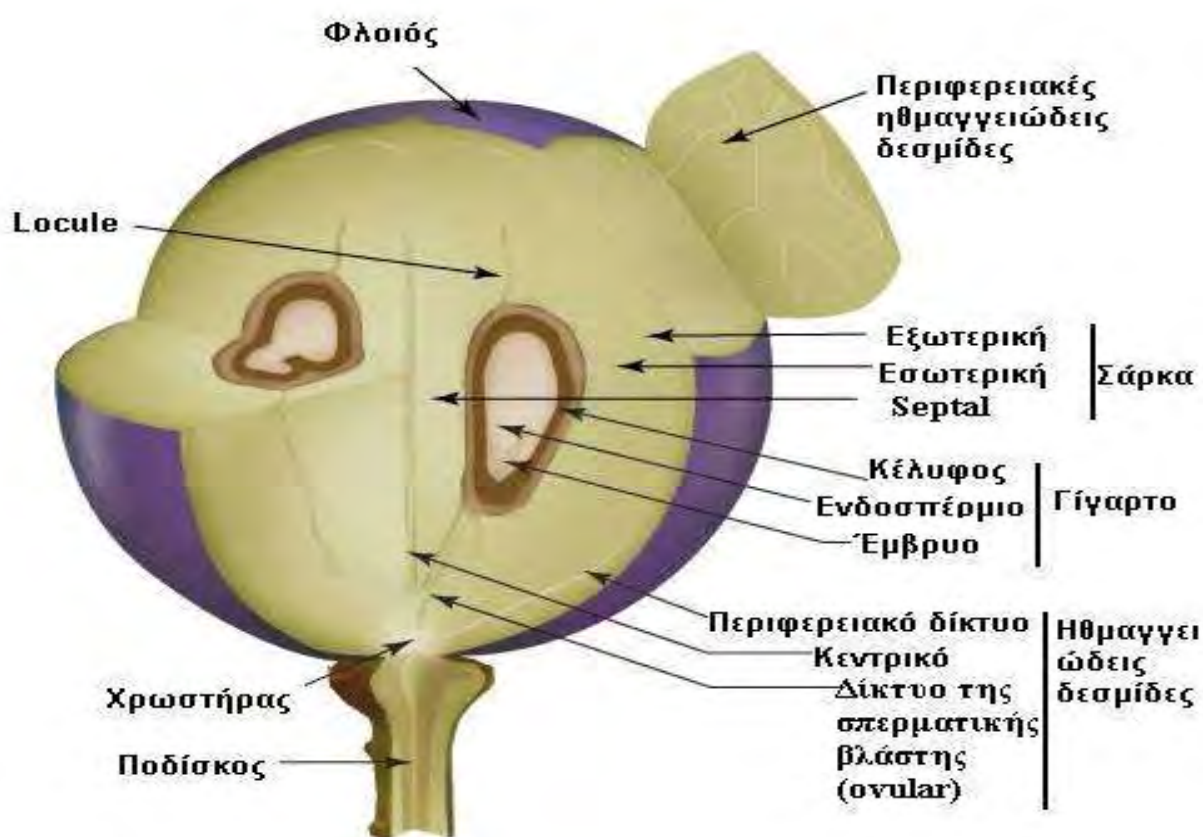
ανόργανων ιόντων και βρίσκεται προς την περιφέρεια της ράγας. Τα αζωτούχα συστατικά της σάρκας είναι το $\frac{1}{4}$ με $\frac{1}{5}$ των αζωτούχων συστατικών της ράγας. Βρίσκονται σε μορφή ανόργανη (NH_4) ή σε οργανική ως αμινοξέα, πολυπεπίδια και πρωτεΐνες. Οι μέσες τιμές των κυριότερων αμινοξέων είναι: αργινίνη 327 mg/l (χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο), προλίνη 266 mg/l, θρεονίνη 258 mg/l, γλουταμινικό οξύ 173 mg/l (Καλλή, 2008). Τα παρεγχυματικά κύτταρα που δομούν τη σάρκα, αποτελούνται από κυτταρικές κύστες που περιέχουν τον κυτταρικό χυμό (γλεύκος). Ο κυτταρικός χυμός αντιπροσωπεύει το 64-90% του βάρους των ραγών. Η σάρκα απαρτίζεται από κύτταρα του μεσοκαρπίου και από κύτταρα της εξωτερικής και εσωτερικής στιβάδας του ενδοκαρπίου. Αυτά σχηματίζουν είκοσι με τριάντα περίπου στιβάδες πενταγωνικών ή εξαγωνικών κυττάρων, στα πρώτα επίπεδα των οποίων, τα τοιχώματά τους είναι λεπτά και εύθραυστα, με αποτέλεσμα να δημιουργείται κάτω από το φλοιό μια πλήρη ζώνη υγρού (Δημοπούλου, 2008). Επιπλέον οι μεμβράνες των συνεχόμενων κυττάρων δεν είναι ενωμένες μεταξύ τους σε όλη την περιφέρεια, αλλά αφήνουν στις γωνίες μικρούς, επικοινωνούντες χώρους μέσα από τους οποίους γίνονται οι εναλλαγές αερίων με το εξωτερικό περιβάλλον.

γ) γίγαρτα

Προέρχονται από τη γονιμοποίηση της σπερματικής βλάστης. Η ωοθήκη, όπως ήδη αναφέρθηκε, αποτελείται από δύο καρπόφυλλα και το κάθε καρπόφυλλο από δύο σπερματικές βλάστες. Συνεπώς, ο αριθμός των γιγάρτων κυμαίνεται από μηδέν έως τέσσερα. Τα γίγαρτα αποτελούνται από ένα οξύ μέρος, το ράμφος και από το ωοειδές τμήμα που καλείται σώμα. Το σώμα διαιρείται από ένα αυλάκι σε δύο λοβούς. Το γίγαρτο εσωτερικά εμπεριέχει τη σάρκα ή τον ιστό, όπως ονομάζεται διαφορετικά, που εσωτερικά του οποίου βρίσκεται το έμβρυο που αναπτύσσεται από τον εμβρυόσακκο και προστατεύεται εσωτερικά από το κέλυφος. Το κέλυφος αποτελείται από τρία στρώματα: το εξωτερικό, το μεσαίο και το εσωτερικό. Το εξωτερικό στρώμα που αποτελεί το φλοιό, είναι μαλακό και περιέχει κόκκους αμύλου και ραφίδες οξαλοξικού ασβεστίου. Το μεσαίο στρώμα είναι σκληρό, αδιαπέραστο από το νερό, πλούσιο σε τανίνες και φέρει δύο με τρεις στιβάδες κυττάρων με πολύ παχιά τοιχώματα, ενώ τέλος το εσωτερικό στρώμα περιέχει μικρές ποσότητες αμύλου μαζί με δύο- τρεις στιβάδες κυττάρων με μαλακά τοιχώματα.

Τα γίγαρτα αποτελούν το 10% του βάρους των ραγών. Γενικά είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά όπως οι κατεχίνες και οι τανίνες. Οι τανίνες των σπόρων έχουν την ίδια συστατική μονάδα, όπως οι τανίνες του φλοιού αλλά εντοπίζονται σε μονομερή μορφή και όχι πολυμερισμένες. Η ποσότητά τους μειώνεται σημαντικά στο στάδιο της ωρίμανσης ενώ το επίπεδο των εστέρων γαλλικού οξέος παραμένει 30% πιο υψηλό από εκείνο του φλοιού και των μίσχων. Η ανάπτυξη αγιγάρτων 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 νιτρικών συστατικών αλλά με μεγαλύτερα επίπεδα οξύτητας (Δημοπούλου, 2008).



Εικόνα 7. Δομικά χαρακτηριστικά ώριμης ράγας (Kennedy, 2002).

1.5.1. Φαινολικά Συστατικά Σταφύλης και Στέμφυλων.

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

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

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

Η άμπελος (*Vitis vinifera*) είναι ένα από τα πιο καλλιεργούμενα φρούτα στο κόσμο, με ετήσια παραγωγή περίπου εξήντα εκατομμύρια τόνους (FAD STAT Database, 2002). Τα κύρια υποπροϊόντα που λαμβάνονται κατά την αποβοστρύχωση, σύνθλιψη και συμπίεση των σταφυλιών είναι τα στέμφυλα (A.Brenes et al, 2007). Τα στέμφυλα, λοιπόν αποτελούν τα στερεά υπολείμματα οινοποίησης, που απομένουν μετά την έκθλιψη και πίεση των σταφυλιών για την παραλαβή του γλεύκους κατά την οινοποίηση. Περιλαμβάνουν τον φλοιό, τα γίγαρτα και τους β;οστρυγχους των σταφυλιών, αντιπροσωπεύοντας το 12% του βάρους των λευκών και το 14% του βάρους των ερυθρών οινοποιηθέντων σταφυλιών.

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

Φλοιοί	50%
Γίγαρτα	20%
Αλκοόλη	5%
Υγρασία	25%
Σύνολο	100%

Πίνακας 3: Σύνθεση στέμφυλων εκφρασμένη σε ποσοστό%

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

1.5.2. Εναλλακτικές χρήσεις Στέμφυλων

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



Εικόνα 8.Εναπόθεση των υποπροϊόντων της οινοποίησης (στέμφυλα) στο περιβάλλον.

Από την ανάλυση των υπολειμμάτων της βιομηχανίας οίνου (Bustamande et al., 2008), διαπιστώθηκε σ' αυτά χαμηλό pH, με τις τιμές του να κυμαίνεται από 3,8 έως 6,8, ηλεκτρική αγωγιμότητα 1,62-6,15 dSm⁻¹, υψηλό οργανικό περιεχόμενο από 669-920 gkg⁻¹ που οφείλεται στην προσθήκη ουσιών και μικροοργανισμών όπως οι πρωτεΐνες και οι ζύμες κατά την οινοποίηση, μεγάλες συγκεντρώσεις μακροθρεπτικών και ιδίως καλίου (11,9-72,8 gkg⁻¹) κυρίως λόγω καθίζησης του όξινου τρυγικού καλίου κατά τη διαδικασία της οινοποίησης, όπως και πολυφαινολών (1,2-19,0 gkg⁻¹), ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων (Fe, Cu, Mn, Zn), όπως του Cu λόγω καθίζησης του θείου και του σιδήρου, αλλά και βαριών μετάλλων (κυρίως Pb) επίσης

εντοπίστηκαν. Όσον 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 (Zoecklein et al., 1999). Τα υψηλά επίπεδα υπολειμματικών φαινολικών ενώσεων, μπορεί να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον, κυρίως λόγω της αναστολής της βλάστησης και της ακινητοποίησης του αζώτου που προκαλείται από τη δράση τους. Οι πολυφαινόλες σχετίζονται με τον κύκλο του αζώτου. Συγκεκριμένα, έχουν την ικανότητα να προκαλούν καθίζηση πρωτεϊνών, καθώς δεσμεύονται μ' αυτές, μέσω υψηλής συγγένειας για τις ομάδες αμιδίου, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται σύμπλοκα που είναι αδύνατο να χρησιμοποιηθούν από τη βιοκοινότητα και από την άλλη λόγω της χημικής τους δραστηρότητας, αφού επιδρούν άμεσα στους μικροοργανισμούς του εδάφους που εμπλέκονται στην ανοργανοποίηση- ακινητοποίηση του αζώτου (Scalbert, 1991). Αυτό έχει σαν συνέπεια την αύξηση των επιπέδων του ανόργανου αζώτου, με επιβράδυνση της διαδικασίας ακινητοποίησης του, κάτι που φαίνεται να εξαρτάται τόσο από τον τύπο του εδάφους όσο και από τα υπολείμματα, παράγοντες που επιδρούν αντίστοιχα και στην ανοργανοποίηση του άνθρακα (Bustamante et al., 2006). Οι ιδιότητες αυτές είναι ασύμβατες με τις γεωργικές απαιτήσεις και ως εκ τούτου τα υποπροϊόντα αυτά θα πρέπει να υφίστανται κατάλληλη επεξεργασία πριν τη χρήση (Bustamante et al., 2008).

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

- ☐ Ως λίπασμα μετά από κομποστοποίηση τους, με βέλτιστες αναλογίες 1:1 υδρολυμένα στέμφυλα-οινολάσσης και 5g CaCO₃/100 g υδρολυμένων στέμφυλων ώστε τελικά το pH να αυξηθεί σε 7,1 έως 8,1 και η αρχική φυτοτοξικότητα να εξαλειφθεί.
- ☐ Για καύση με σκοπό την ανάκτηση του ενεργειακού τους περιεχομένου.
- ☐ Για διαχωρισμό και ανάκτηση της περιεχόμενης αιθυλικής αλκοόλης και του όξινου τρυγικού καλίου, ένα σταθερό οξύ, που έχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών αφού χρησιμοποιείται εναλλακτικά αντί του κιτρικού και φωσφορικού οξέος.
- ☐ Για την παραγωγή γιγαρτέλαιου, που θεωρείται υψηλής ποιότητας εδωδιμο προϊόν.
- ☐ Για την παραγωγή εκχυλίσματος ανθοκυανών αναγνωρισμένων χρωστικών για τα τρόφιμα

(φυσική χρωστική E163), ειδικά από στέμφυλα ερυθρών ποικιλιών.

- ☐ Για παραγωγή άλλων εκχυλισμάτων σταφύλης.
- ☐ Ως ζωοτροφή, όπως χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

1.5.3 Στέμφυλα και περιβάλλον

Τα στέμφυλα που θα χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή των ζωοτροφών παράγονται ως υποπροϊόντα κατά την διαδικασία της οينوποίησης, τα οποία είναι ρυπογόνα λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε οργανικές ενώσεις και η ανεξέλεγκτη απόρριψη τους προκαλεί τεράστια προβλήματα στο οικοσύστημα. Συγκεκριμένα το οργανικό τους φορτίο διαθέτει σημαντική αντιμικροβιακή και φυτοτοξική δραστηριότητα, η οποία περιορίζει σημαντικά τη δράση των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη διαδικασία της βιοαποικοδόμησης με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται η βιοαποικοδόμηση και η ανεξέλεγκτη εναπόθεση των υποπροϊόντων να έχει ως επακόλουθο την εμφάνιση φαινόμενων φυτοτοξικότητας, που:

- ☐ επηρεάζει την ανάπτυξη των φυτών,
- ☐ μολύνει τον υδροφόρο ορίζοντα, υποβαθμίζοντας την ποιότητα του πόσιμου

ύδατος,

- ☐ θανατώνει τους ευαίσθητους οργανισμούς των ποταμών και των θαλασσών.

Με δεδομένο λοιπόν τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι αρκετά σημαντική η επεξεργασία των υποπροϊόντων των οينوποιείων κάτι το οποίο θα οδηγήσει στην εξάλειψη προβλημάτων ρύπανσης του περιβάλλοντος, στην αξιοποίηση των προϊόντων που θα προκύψουν και την περαιτέρω χρησιμοποίησή τους, μέσω της δημιουργίας βιολειτουργικών ζωοτροφών υψηλής προστιθέμενης αξίας.

ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η παρούσα εργασία αφ' ενός στοχεύει στην αξιοποίηση των υποπροϊόντων των οиноποιείων (στεμφύλων) για τη δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών υψηλής προστιθέμενης αξίας που θα χορηγηθούν σε κοτόπουλα νεαρής ηλικίας με σκοπό την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής τους άμυνας και κατά συνέπεια την βελτιστοποίηση της ευζωίας τους και την αύξηση της ζωικής παραγωγής. Από την άλλη, η επεξεργασία των ρυπογόνων υποπροϊόντων των οиноποιείων θα οδηγήσει στη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος.

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να προσδιοριστεί η επίδραση εκχυλισμάτων στέμφυλων στην αντιοξειδωτική ικανότητα κοτόπουλων νεαρής ηλικίας μέσω προσδιορισμού δεικτών οξειδωτικού στρες (GSH, CAT, TBARS, TAC, BARBONYLS) σε ιστούς (πνεύμονας-έντερο-νεφρό).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την εκτροφή χρειάστηκαν 30 κοτόπουλα και συνολικά το πείραμα (χορήγηση σιτηρεσίου και μεγάλωμα κοτόπουλων) είχε διάρκεια 50 ημέρες περίπου. Για 15 ημέρες τα κοτόπουλα λάμβαναν κανονικό σιτηρέσιο και στην συνέχεια χωρίστηκαν σε 2 ομάδες Α και Β.

1. Καλαμπόκι Α ομάδας (control): (Νερό + Καλαμπόκι). (Σύνολο: 60% Στερεά.)
2. Καλαμπόκι Β ομάδας: Ενσίρωμα καλαμποκιού και στέμφυλων . (Σύνολο 60% Στερεά)

Ομάδα Α (ομάδα ελέγχου -control)

Από την γέννηση μέχρι το πέρας των 50 ημερών, η ομάδα Α (ομάδα ελέγχου) λάμβανε κανονικό σιτηρέσιο και έγιναν λήψεις ιστών (πνεύμονα-έντερο-νεφρό) σε ηλικία 30 και 50 ημερών.

Ομάδα Β

Με το πέρας των 15 ημερών, η ομάδα Β λάμβανε σιτηρέσιο με ενσίρωμα καλαμποκιού-στέμφυλων και έγιναν λήψεις ιστών (πνεύμονα-έντερο-νεφρό) σε ηλικία 30 και 50 ημερών.

Τεχνική Περιγραφή-Μεθοδολογία

Αρχικά, πριν την μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες πραγματοποιήθηκε λήψη ιστών σε προκαθορισμένα στάδια ανάπτυξης, και ομογενοποίηση των ιστών αυτών.

Μετά τη λήψη τους οι ιστοί μεταφέρθηκαν σε σωλήνες των 2 ml σε υγρό άζωτο και η ομογενοποίησή τους εκτελέστηκε με γουδί και γουδοχέρι, χρησιμοποιήθηκαν επίσης υπέρηχοι για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και στη συνέχεια διατηρήθηκαν στους -80 °C μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση. Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν με αναλογία 1/2 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH=7,4 που περιέχει 138mM NaCl, 2,7mM KCl και 1mM EDTA καθώς και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH).

Η αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια με τη μέτρηση του συνόλου των παρακάτω δεικτών στους ιστούς των ζώων:

1. Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH): Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλο-κυστέινο-γλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου και ανήκει

στην κατηγορία των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) της ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. (Pastore et al., 2003). Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα και παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι επίσης ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξеноβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών. Το πειραματικό πρωτόκολλο που θα χρησιμοποιηθεί βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειοδυο-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB). Η GSH αντιδρά με το DTNB οδηγώντας στην παραγωγή οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκού οξέος, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm και προσδιορίζεται φωτομετρικά (Kyrgaros et al., 2009).

2. Προσδιορισμός των ουσιών (TBARS-Thiobarbituric acid reactive substances) που προέρχονται από την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων (TBARS) από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΐδη. Η μαλονδιαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί φωτομετρικά στα 530 nm μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (Keles et al., 2001).

3. Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC). Ο σχηματισμός των καρβονυλίων μπορεί να προσδιοριστεί φωτομετρικά στα 375 nm μετά από αντίδρασή τους με το DNPH (2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4-δινιτροφαινυλδραζονίου) (Patsoukis et al., 2005).

4. Προσδιορισμός της δράσης της καταλάσης (CAT). Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Έχει τη δυνατότητα να καταλύει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και οξυγόνο, αφού το H_2O_2 είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλη, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο (Chelikani et al., 2004). Η μέθοδος προσδιορισμού της βασίζεται στη μέτρηση φωτομετρικά στα 240 nm του H_2O_2 .

Συγκεκριμένα, προστίθενται 16mM H_2O_2 στο εξεταζόμενο δείγμα και μετράται η μεταβολή στην απορρόφηση (ΔAbs) του H_2O_2 στη διάρκεια δύο λεπτών (Margonis et al., 2007).

5. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC). Η TAC στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH•) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm (Janaszewska et al., 2002).

2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Στο εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων - Βιοσυστημάτων και στο αγρόκτημα του ΤΕΙ / Θεσσαλίας πραγματοποιήθηκαν οι εξής εργασίες :

- Εκτροφή κοτόπουλων (Εφαρμογή σιτηρεσίου και συνθηκών ομαλής διαβίωσης – ανάπτυξης).
- Παρακολούθηση ανάπτυξης κοτόπουλων (Ημερήσια αύξηση ζωϊκού βάρους, ημερήσια κατανάλωση τροφής).
- Εκτέλεση λήψης ιστών (Στις 16/12/14 & στις 9/1/15).



Εικόνα 9. Εκτροφή - παρακολούθηση ανάπτυξης κοτόπουλων.

Στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας πραγματοποιήθηκαν οι εξής εργασίες :

- Επεξεργασία των ιστών (Ομογενοποίηση).
- Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.

2.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟΥ.

Στις 18.11.2014 παρελήφθησαν στο αγρόκτημα του ΤΕΙ Λάρισας τριάντα (30) κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής (Hubbard), ηλικίας δύο (2) ημερών, από το πτηνοτροφείο Αγραφιώτης με έδρα τον Τύρναβο Λάρισας. Μέχρι και τις 2.12.2014 τα κοτόπουλα λάμβαναν κοινό σιτηρέσιο. Από τις 3.12.2014, δημιουργήθηκαν δύο ομάδες οι οποίες λάμβαναν το παρακάτω σιτηρέσιο:

	Ποσοστά %
Καλαμπόκι Α/Β ομάδας (60% στερεά)	55,2
Σογιάλευρο 42/8	31,8
Λίπος Σκόνη (Λεκιθ.)	5,0
Ιχθυάλευρο 70/10	4,0
Ισορροπιστής Broiler 2,5%	2,5
Μαρμαρόσκονη	1,5
ΣΥΝΟΛΟ	100

Πίνακας 4: Σύσταση σιτηρεσίου κοτόπουλων πάχυνσης.

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

1.Καλαμπόκι Α ομάδας: (Νερό + Καλαμπόκι). Σύνολο 60% Στερεά και 40% υγρασία

2.Καλαμπόκι Β ομάδας: Καλαμπόκι (ενσίρωμα με στερεά απόβλητα οينوποίησης-στέμφυλα). Σύνολο 51% στερεά, 9% στέμφυλα και 40% υγρασία.

Σημείωση: Προστέθηκαν βακτήρια γαλακτικής ζύμωσης τα οποία χρησιμοποιούνται για την

εξελίξη της διαδικασίας της ενσίρωσης.

2.2.1 Παρασκευή ενσιρώματος στέμφυλων

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

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

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

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

Η μέτρηση του pH έγινε με 2 μεθόδους. Στην πρώτη μέθοδο γίνεται αραιώση 1/10 του

ενσιρώματος. Δηλαδή σε 1 γραμμάριο ενσιρώματος προστίθενται 9 ml απεσταγμένου νερού. Το μίγμα αναδεύεται έντονα σε vortex για τουλάχιστον 20 λεπτά. Τέλος μετρήθηκε το pH το οποίο ήταν 3,82. Με την δεύτερη μέθοδο γίνεται αραιώση 1/2 του ενσιρώματος. Δηλαδή σε 5 γραμμάρια ενσιρώματος προστίθενται 5 ml απεσταγμένου νερού. Έπειτα ακολουθεί έντονη ανάδευση σε vortex για τουλάχιστον 20 λεπτά και τέλος μετρήθηκε το pH. Το pH του ενσιρώματος με την δεύτερη μέθοδο ήταν 3,80. Όπως φαίνεται και οι δύο μέθοδοι έδωσαν παρόμοιες τιμές pH και συνεπώς η διαδικασία της γαλακτικής ζύμωσης στο ενσίρωμα είχε ολοκληρωθεί και ήταν πλέον έτοιμο για να προστεθεί στο σιτηρέσιο.



(α)



(β)

Εικόνα 10 (α). Συσκευασία και (β). αποθήκευση σιτηρεσίου.

2.3 ΛΗΨΗ ΙΣΤΩΝ –ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ

Στις 16/12/14 και σε ηλικία 30 ημερών, καθώς και στις 9/1/2015 και σε ηλικία 50 ημερών τα κοτόπουλα μεταφέρθηκαν από το αγρόκτημα του Τ.Ε.Ι. Θεσσαλίας, στο πτηνοτροφείο «Αγραφιώτης» με έδρα τον Τύρναβο Λάρισας. Κατόπιν, οδηγήθηκαν στο συγκρότημα σφαγής. Όλες οι διαδικασίες (αναισθητοποίησης, σφαγής, αφαίμαξης, απομάκρυνσης πούπουλων, εκσπλαχνισμός, διαχωρισμός εντοσθίων και πλύση), πραγματοποιήθηκαν από ειδικά μηχανήματα και καταρτισμένο προσωπικό που ελέγχε στο σύνολο την ορθή διεξαγωγή της διαδικασίας, σύμφωνα με την οδηγία 2007/43/EK.

Τα δείγματα των ιστών του πνεύμονα, του εντέρου και του νεφρού αφαιρέθηκαν χειρουργικά, τοποθετήθηκαν σε Eppendorf Tubes 1,5mL, ψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80 °C μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.



Εικόνα 11. Αποθήκευση ιστών.

Ο ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7,4 που περιείχε 138mM NaCl, 2,7mM KCL και 1mM EDTA καθώς και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH), όπως:

- Απροτινίνη (10mg/mL), η οποία αναστέλει την θρυψίνη και άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα.
- Λιουπεπτίνη (1mg/mL), η οποία αναστέλει πεπτιδάσες όπως την κυστεΐνη, την σερίνη και την θρεονίνη.
- PMSF (9mg/mL), κλπ.

Κατά την προετοιμασία για τη βιοχημική ανάλυση του ιστού τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με

γουδί και γουδοχέρι χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο.



Εικόνες 12. Ομογενοποίηση Ιστών με Υγρό Άζωτο.

2.3.1 Επεξεργασία Ιστών.

Ακολούθως, το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε.(15.000 g - 5 min - 4°C).

2.3.2 Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες.

2.3.2.1 Γενικά.

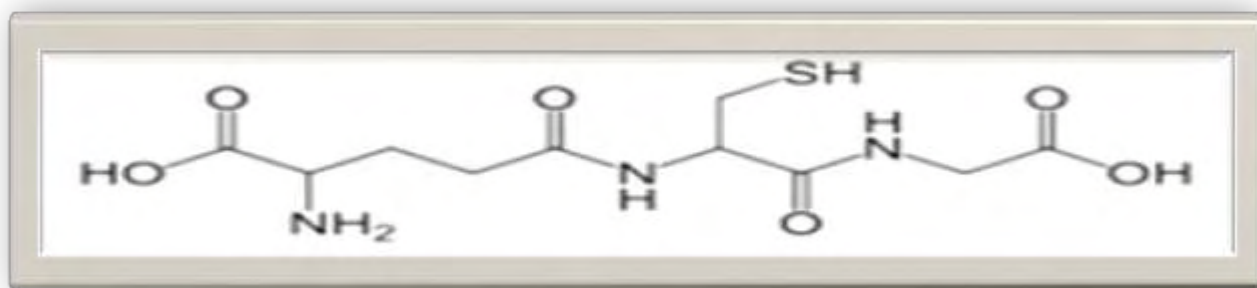
Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστηριότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στους ιστούς. Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού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

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

2.4. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ.

2.4.1 Μέτρηση Γλουταθειόνης.

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

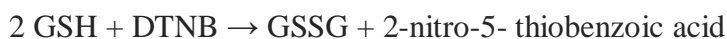


Εικόνα 13. Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης.

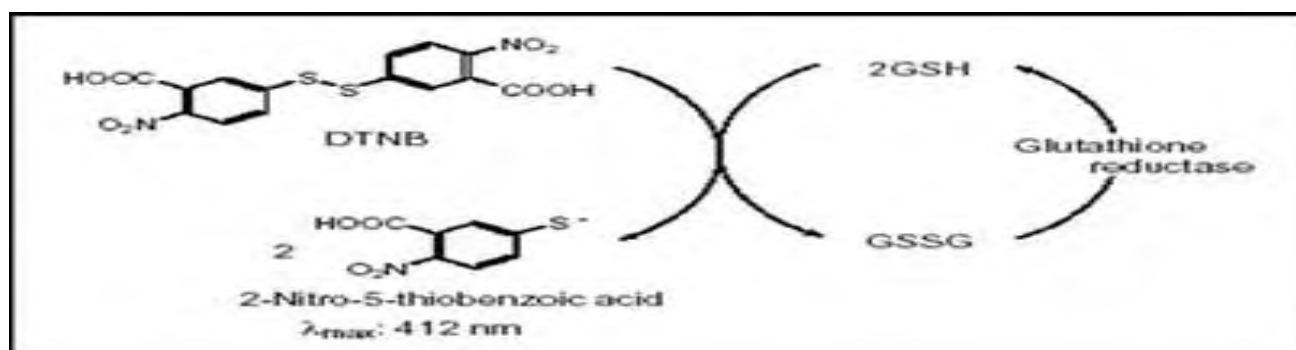
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών.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

Αρχή της μεθόδου.

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



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



Εικόνα 14. Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης.

Διαλύματα

□ **Phosphate buffer 67 mM** (pH 8). MB (KH₂PO₄): 136 MB (Na₂HPO₄): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH₂PO₄ (67 mM) και 500 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0,227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 5,94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1 N για pH = 8.

□ **DTNB (1mM)** σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό. (39,6 mg DTNB σε 100 ml του 1% διαλύματος του κιτρικού νατρίου, για να δώσει μία συγκέντρωση του 1 mM). DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396,35.

□ **Κιτρικό Νάτριο**. (C₆H₅Na₃O₇*2H₂O, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB: 294,10. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Αρχικά 100μL ιστού προστέθηκαν σε 100μL TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000g για 5 min στους 50C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο eppendorf. 20 μL ιστού, αραιωμένου 1/2 αναμίχθηκαν με 660 μL ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 8,0) και 330μL DTNB.

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια erpendorf:

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH 7,95	660 μ L	660 μ L
DTNB 1 mM	330 μ L	330 μ L
Απεσταγμένο νερό	20 μ L	-
Ομογενοποιημένος Ιστός	-	20 MI

Πίνακας 5: Διαλυμάτων αντίδρασης

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

Υπολογισμοί

Δραστικότητα GSH (μ mol/mg total prot.) = (Absδείγματος - Δabstυφλού/13.6) \times 2 \times 3 ή 4 (λόγω αραιώσεων) \times 50,5 / Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL). Όπου το 50,5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μ L) με τον όγκο του ιστού (20 μ L) (1010/20=50,5), πολλαπλασιάζουμε με 2 και την πρώτη αραιώση που έγινε από το TCA 5% (1:1), πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον παγκρεατικό, τον πνευμονικό και τον εντερικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Το 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

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

2.4.2 Δραστικότητα της Καταλάσης.

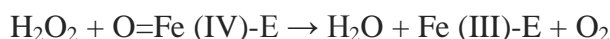
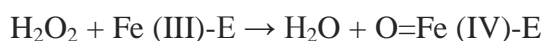
Αρχή της μεθόδου.

Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα

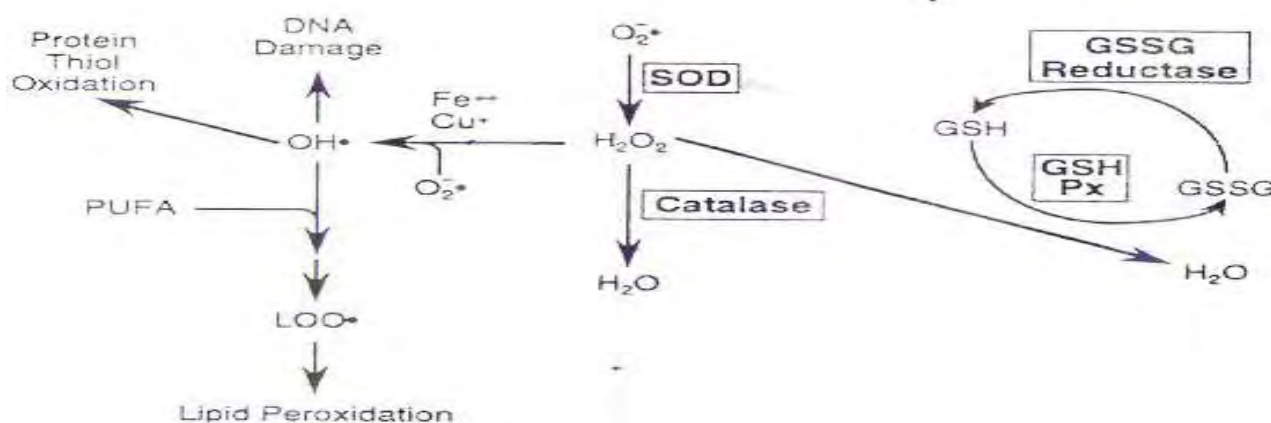
σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία.

Η ενζυμική καταλάση καταλύει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου, σε αβλαβή οξυγόνο και νερό. Chelikani P, (Chelikani P et. al., 2004). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Boon EM, et. al. (2007). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 .

Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



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



Εικόνα 15. Μονοπάτι αναγωγής του H_2O_2 σε H_2O

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



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

Διαλύματα

□ **Phosphate buffer 67mM** (pH 7,4) MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178. Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0,91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 4,77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού.

Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7,4.

30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

Το διάλυμα H_2O_2 είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7,4	2955 μL
Ομογενοποιημένος Ιστός	40 μL

Πίνακας 6: Διαλυμάτων αντίδρασης

Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση. Κατόπιν, μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV). Τέλος, προσθέτουμε 5 μL 30% H_2O_2 στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = $(\Delta\text{Abs}_{\text{sample per min}} / 40) \times (75 \times 1000 \times 3 \text{ ή } 4 \times 2) / \text{Conc. Protein (mg/mL)}$.

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

Ο υπολογισμός της δραστηριότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης. ΔAbs = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM. $U = \mu\text{mol/min}$. $\Delta \text{Abs blank}$ είναι πάντοτε μηδέν και έτσι δεν απαιτείται μέτρηση του τυφλού (One Unit decomposes one micromole of hydrogen peroxide per minute at 25 oC pH 7.0).

2.4.3 Ολική Αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC).

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

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

Αρχή της μεθόδου.

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

Διαλύματα

□ **Phosphate buffer 10 mM** (pH 7,4). MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178.

Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH_2PO_4 (10 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (10 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0,136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 0,712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7,4.

□ **DPPH 0,1 mM**. MB: 394,32 Διαλύουμε 0,02 g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200 μL του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19,8 mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα, συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο).

Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 mL είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως, στο οποίο φτιάχνουμε το DPPH για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

□ **Ασκορβικό οξύ 10 mM**. Είναι έτοιμο προς χρήση.

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

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

	Blank	Θετικός control	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7,4	500 μ L	495 μ L	460 μ L
DPPH 0,1 Mm	500 μ L	500 μ L	500 μ L
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	-	5 μ L	-
Ιστός (Αραίωση 1/5)	-	-	40 μ L

Πίνακας 7: Διαλυμάτων αντίδρασης

Ανακινούμε τα Eppendorfs μερικές φορές και τα επωάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης η αντιοξειδωτικές ουσίες του ιστού, εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη. Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25 oC (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρουμε 900 mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

Υπολογισμοί.

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως: i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ. % Abs μείωση = $(\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} \times 100$ ii) $\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL πλάσματος} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 25 \times 3 \text{ ή } 4 \times 5] / 1000$.

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

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

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 25 διότι η αραίωση του ιστού στην κυψελίδα είναι 25 πλάσια (1000 μL στην κυψελίδα / 40 μL ιστού του δείγματος στην κυψελίδα = 25).

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

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

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

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

Αρχή της μεθόδου.

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

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

Διαλύματα

□ **Tris-HCl 200 mM** (pH 7,4). MB (Tris): 121,14. MB (HCl): 36,46 (stock 37%) [10,1 N]. Για να παρασκευάσουμε ≈100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0,1 N). Για το Tris ζυγίζουμε 0,61 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0,42 mL του stock 37% HCl (10.1 N) σε 42 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25 mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42 mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100 mL. Ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7,4. Το Tris είναι συντομογραφία του τρισυδροξυμεθυλαμινομεθάνιου (trishydroxymethylaminomethane). Το Tris είναι κατάλληλο για τη δημιουργία ρυθμιστικών διαλυμάτων με pH από 6,5 μέχρι 9,7.

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

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

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

Πειραματικό Πρωτόκολλο.

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μ L ομογενοποιημένου ιστού (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό). Προσθέτουμε 500 μ L TCA 35% και 500 μ L Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1 mL Na_2SO_4 – TBA και επωάζουμε στους 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο. Κατόπιν, μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1 mL σε eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25°C για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μ L από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί.

Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg total protein) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0,156 x 31 x 2 ή 3 x 3, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μ L) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (100 μ L) (3100 / 100 = 31). Το 0,156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156 (mol/L) διαιρούμενου με 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε μ mol/L. Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον παγκρεατικό, τον πνευμονικό και τον εντερικό ιστό για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 3 επειδή το δείγμα αραιώνεται 3 φορές κατά τη μέτρηση.

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

2.4.5 Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Αρχή της μεθόδου

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

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

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

Διαλύματα

□ **Διάλυμα HCl 2,5 N.** HCl: MB 36,46; stock 37% (10,1 N)

Για να παρασκευάσουμε 100 mL διαλύματος 2,5 N HCl, προσθέτουμε αργά 24,6 mL του 37% HCl (ίσο με 10,1 N HCl) σε ≈ 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του 37 % είναι πολύ καυστικό.

Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φορώντας γάντια.

□ **DNPH 14 mM.** (MB: 198,1)

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0,2833 g DNPH σε 100 mL 2,5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Όταν το ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτούνται 0,5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάχνουμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.

□ **Ουρία 5 M** (pH 2,3). (MB: 60,06)

Για να φτιάξουμε 100 mL 5 M ουρίας (pH 2,3, το οποίο ρυθμίζεται με 2N HCl), διαλύουμε 30 g ουρίας in \approx 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό.

Πειραματικό πρωτόκολλο.

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

Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Κατόπιν, προσθέτουμε στο ίζημα (πελέτα) 0,5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2,5 N HCL) για τα δείγματα ή 0,5 mL 2,5 N HCL για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Μετά την πάροδο της μίας ώρας, φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

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

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

Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2,3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37°C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4°C. Τέλος, μεταφέρουμε

με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.* (Το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0,5 mL DNPH, τα οποία αντικαθίστανται 0,5 mL HCL 2,5 N).

Υπολογισμοί.

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg total prot.) = $\frac{\text{Αδείγματος-Ατυφλού}}{0.022 \times 1000/50 \times 2 \text{ ή } 3 \times 2 / \text{Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL)}}$

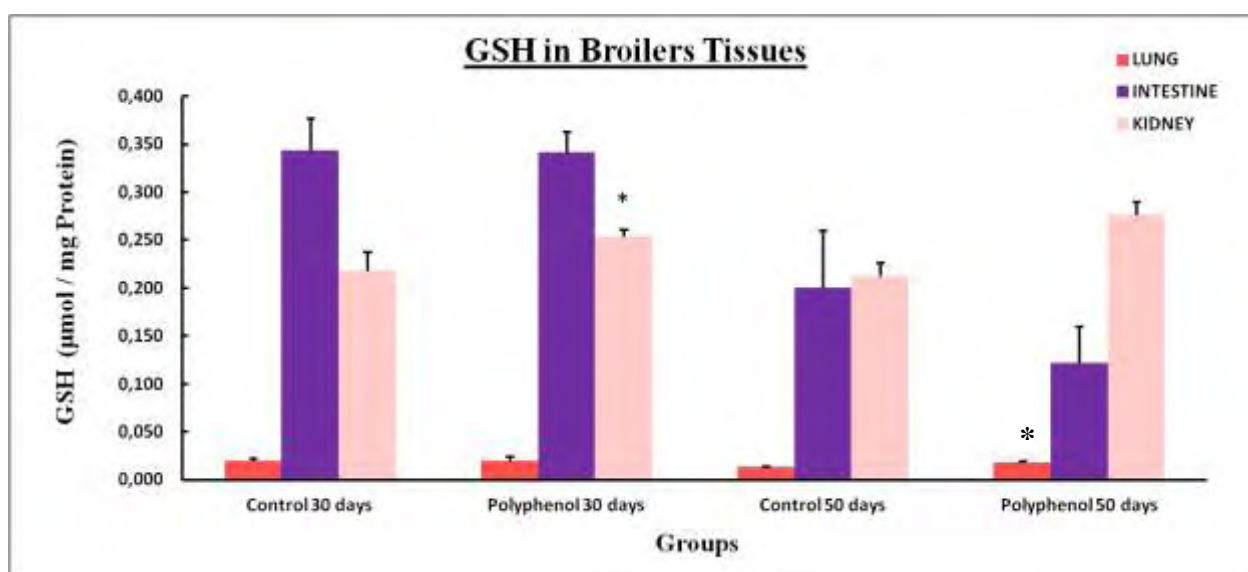
Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM x cm⁻¹. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μL στην κυψελίδα / 50 μL δείγματος). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και με 4 για καρδιακό – ηπατικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και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

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

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

3.1 Ανοιγμένη Γλουταθειόνη (GSH).

GSH ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ				GSH ΕΝΤΕΡΟ				GSH ΝΕΦΡΟ			
GROUP	M.O	S.D	SEM	GROUP	M.O	S.D	SEM	GROUP	M.O	S.D	SEM
Control 30 days	0,019	0,008	0,003	Control 30 days	0,344	0,081	0,033	Control 30 days	0,218	0,048	0,020
Polyphenol 30 days	0,020	0,011	0,004	Polyphenol 30 days	0,342	0,051	0,021	Polyphenol 30 days	0,253	0,019	0,008
Control 50 days	0,013	0,003	0,001	Control 50 days	0,201	0,158	0,060	Control 50 days	0,213	0,037	0,014
Polyphenol 50 days	0,018	0,005	0,002	Polyphenol 50 days	0,121	0,109	0,039	Polyphenol 50 days	0,276	0,038	0,014



(* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control).

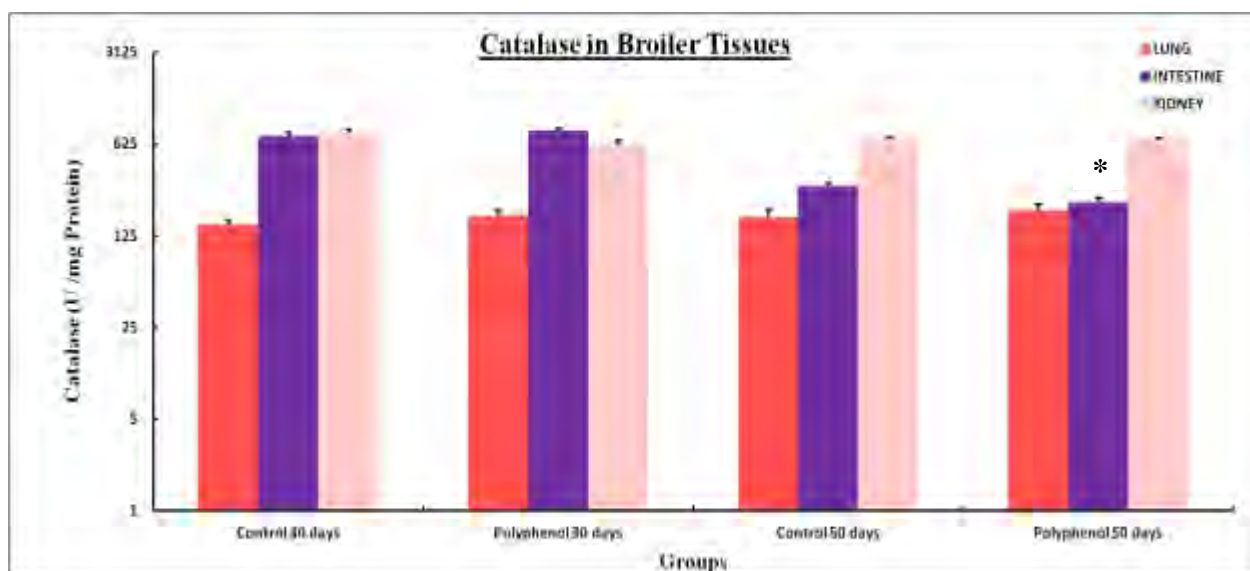
Γράφημα 1. GSH στους ιστούς των κοτόπουλων.

Η τιμή της GSH του πνευμονικού ιστού της πολυφαινολικής ομάδας των 50 ημερών αυξάνει τη συγκέντρωσή της κατά 38,1% σε σχέση με την ομάδα control και το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό.

Επίσης αυξάνεται η συγκέντρωση της GSH και στο νεφρικό ιστό της πολυφαινολικής ομάδας των 30 ημερών κατά 16,1% σε σχέση με την ομάδα control δίνοντας και εδώ στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

3.2 Δραστικότητα Καταλάσης.

CATALASE ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ				CATALASE ΕΝΤΕΡΟ				CATALASE ΝΕΦΡΟ			
GROUP	M.O	S.D	SEM	GROUP	M.O	S.D	SEM	GROUP	M.O	S.D	SEM
Control 30 days	152,208	27,302	11,146	Control 30 days	714,082	131,852	53,828	Control 30 days	760,690	130,278	53,186
Polyphenol 30 days	178,323	39,164	15,988	Polyphenol 30 days	793,682	79,882	32,612	Polyphenol 30 days	620,227	115,739	47,250
Control 50 days	173,223	68,996	26,078	Control 50 days	299,042	45,201	17,084	Control 50 days	679,158	66,740	25,225
Polyphenol 50 days	195,494	65,546	23,174	Polyphenol 50 days	223,842	57,373	20,285	Polyphenol 50 days	682,802	41,033	15,509



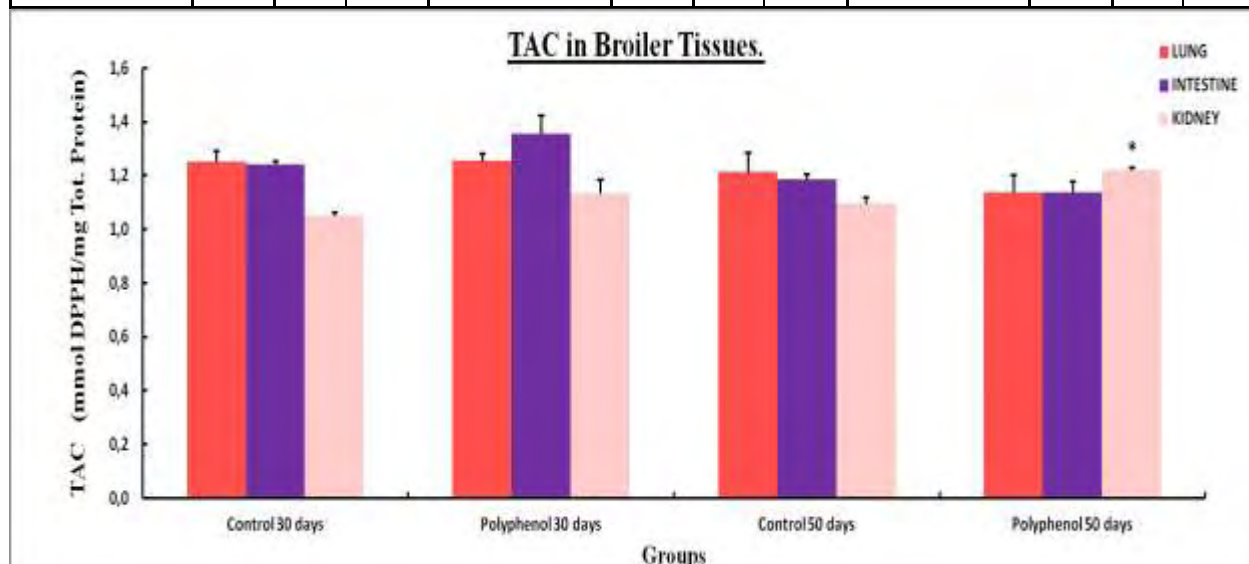
(*p < 0,05 σε σύγκριση με το Control).

Γράφημα 2. Καταλάση στους ιστούς των κοτόπουλων.

Η δραστικότητα της καταλάσης κατά τη σύγκριση των ομάδων του εντερικού ιστού μεταξύ τους, φαίνεται να μειώνεται προοδευτικά με την αύξηση της ηλικίας των κοτόπουλων και μάλιστα στον εντερικό ιστό της ομάδας control των 50 ημερών η μείωση αυτή είναι στατιστικά σημαντική.

3.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC).

TAC ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ				TAC ΕΝΤΕΡΟ				TAC ΝΕΦΡΟ			
GROUP	M.O	S.D	SEM	GROUP	M.O	S.D	SEM	GROUP	M.O	S.D	SEM
Control 30 days	1,250	0,102	0,042	Control 30 days	1,239	0,033	0,014	Control 30 days	1,051	0,029	0,012
Polyphenol 30 days	1,253	0,073	0,030	Polyphenol 30 days	1,356	0,170	0,069	Polyphenol 30 days	1,132	0,131	0,054
Control 50 days	1,212	0,190	0,072	Control 50 days	1,184	0,060	0,023	Control 50 days	1,096	0,060	0,023
Polyphenol 50 days	1,139	0,178	0,063	Polyphenol 50 days	1,136	0,115	0,044	Polyphenol 50 days	1,220	0,031	0,012



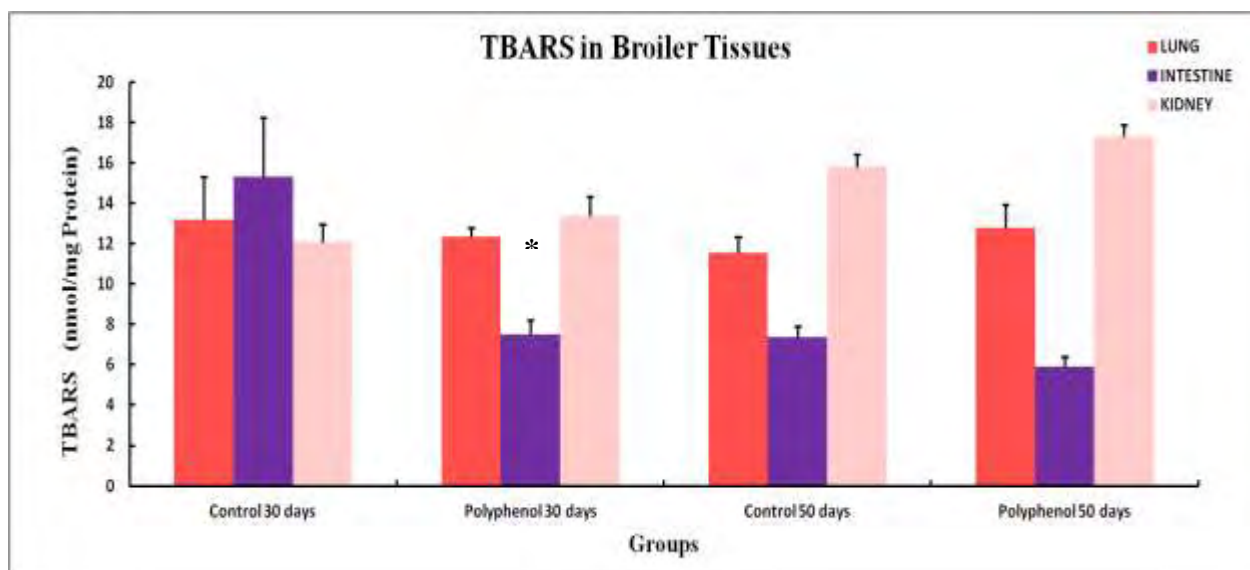
(*p < 0,05 σε σύγκριση με το Control).

Γράφημα 3. TAC στους ιστούς των κοτόπουλων.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του νεφρικού ιστού των ζώων που ταισθήκαν με πολυφαινόλες παρουσιάζει με βάση το γράφημα 3 μία αύξηση στις 50 ημέρες σε ποσοστό 11,3% σε σχέση με την ομάδα control με τις μεταβολές να είναι στατιστικά σημαντικές.

3.4. Υπεροξείδωση Λιπιδίων (TBARS)

TBARS ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ				TBARS ΕΝΤΕΡΟ				TBARS ΝΕΦΡΟ			
GROUP	M.O	S.D	SEM	GROUP	M.O	S.D	SEM	GROUP	M.O	S.D	SEM
Control 30 days	13,195	5,136	2,097	Control 30 days	15,296	7,238	2,955	Control 30 days	12,049	2,166	0,884
Polyphenol 30 days	12,331	1,077	0,440	Polyphenol 30 days	7,514	1,744	0,712	Polyphenol 30 days	13,348	2,457	1,003
Control 50 days	11,524	2,114	0,799	Control 50 days	7,379	1,366	0,516	Control 50 days	15,776	1,719	0,650
Polyphenol 50 days	12,765	3,245	1,147	Polyphenol 50 days	5,893	1,381	0,488	Polyphenol 50 days	17,298	1,518	0,574



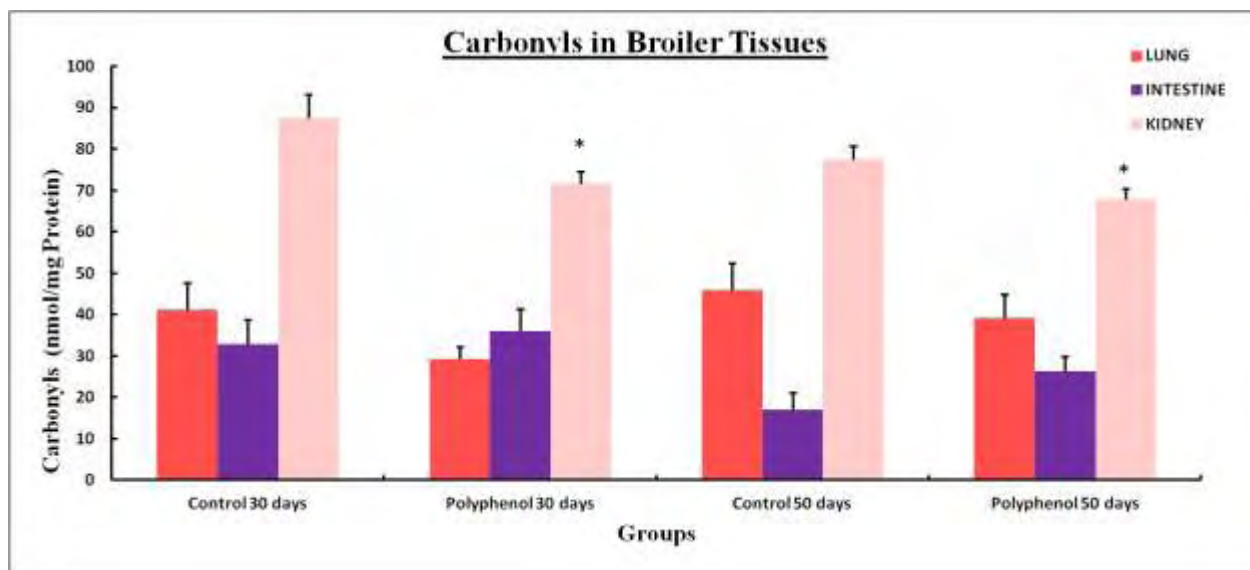
(*p < 0,05 σε σύγκριση με το Control).

Γράφημα 4. TBARS στους ιστούς των κοτόπουλων.

Τα επίπεδα των TBARS, στον εντερικό ιστό των 30 ημερών των ζώων που ταΐστηκαν με πολυφαινόλες μειώθηκαν σε σχέση με την ομάδα control κατά 50,8% δίνοντας αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό.

3.5 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια

CARBONYLS ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ				CARBONYLS ΕΝΤΕΡΟ				CARBONYLS ΝΕΦΡΟ			
GROUP	M.O	S.D	SEM	GROUP	M.O	S.D	SEM	GROUP	M.O	S.D	SEM
Control 30 days	41,202	16,031	6,545	Control 30 days	32,922	14,251	5,818	Control 30 days	87,384	14,169	5,784
Polyphenol 30 days	29,297	6,735	3,012	Polyphenol 30 days	36,042	13,092	5,345	Polyphenol 30 days	71,691	7,224	2,949
Control 50 days	45,802	16,211	6,618	Control 50 days	16,962	10,183	4,157	Control 50 days	77,601	7,683	3,137
Polyphenol 50 days	39,176	14,150	5,777	Polyphenol 50 days	26,253	8,973	3,663	Polyphenol 50 days	67,811	6,706	2,535



(*p < 0,05 σε σύγκριση με το Control).

Γράφημα 5. Καρβονύλια στους ιστούς των κοτόπουλων.

Τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, στον νεφρικό ιστό των ζώων που ταΐστηκαν με πολυφαινόλες σημειώνουν όπως φαίνεται και στο γράφημα 5 σταδιακή μείωση σε σχέση με τις ομάδες control. Αυτή η μείωση στις 30 ημέρες είναι κατά 17,9% και στις 50 ημέρες κατά 12,6% και οι τιμές είναι στατιστικά σημαντικές.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εκτραφούν δύο (2) ομάδες κοτόπουλων πάχυνσης. Η ομάδα Α - ομάδα control λάμβανε κανονικό σιτηρέσιο και η ομάδα Β για 15 ημέρες λάμβανε κανονικό σιτηρέσιο και στην συνέχεια ενσίρωμα καλαμποκιού-στέμφυλων με πολυφαινολικά πρόσθετα. Ελέγχθηκαν οι δείκτες του οξειδωτικού στρες, στους ιστούς (πνεύμονας -έντερο - νεφρό) και εξετάστηκε αν βελτιώθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των ζώων. Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που ελέγχθηκαν ήταν: Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστικότητα της καταλάσης (Catalase activity), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC–Total antioxidant capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS – Thiobarbituric acid reactive substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Το σπουδαιότερο σε αυτήν την εργασία είναι πως τα πολυφαινολικά πρόσθετα διαφοροποιούν τους δείκτες μεταξύ των ομάδων, δείχνοντας πως επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ζώων.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά στην συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), διαπιστώνεται πως η πολυφαινολική ομάδα παρουσιάζει αυξημένες τιμές, στατιστικά σημαντικές, σε σχέση με την ομάδα control. Πιο συγκεκριμένα ο πνευμονικός ιστός της πολυφαινολικής ομάδας των 50 ημερών σε σχέση με την ομάδα control αυξάνει τη συγκέντρωση κατά 38,1% και το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό. Επίσης και ο νεφρικός ιστός της πολυφαινολικής ομάδας των 30 ημερών σε σχέση με την ομάδα control αυξάνει τη συγκέντρωση κατά 16,1% και αυτό το αποτέλεσμα είναι επίσης στατιστικά σημαντικό. Η γλουταθειόνη είναι το κυριότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό που παράγεται από τα κύτταρα, συμμετέχοντας απευθείας στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και των ενεργών μορφών του οξυγόνου, ενώ συντηρεί και εξωγενή αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E στις ανηγμένες (ενεργές) μορφές τους (Scholz 1989, Hughes 1964). Επίσης, επιδρά σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις όπως η σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, η πρωτεϊνόςύνθεση, η σύνθεση προσταγλανδίνης, η μεταφορά αμινοξέων και η ενεργοποίηση ενζύμων. Ζωτική είναι επίσης η δράση της στον μεταβολισμό του σιδήρου. Στα ζώα η γλουταθειόνη δρα ως υπόστρωμα σε συζευκτικές και αναγωγικές αντιδράσεις, που καταλύονται από το ένζυμο S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) στο κυτταροπλασματικό υγρό, στα μικροσώματα και στα μιτοχόνδρια. Είναι επίσης ικανή να συμμετέχει σε μη ενζυματικές συζευκτικές αντιδράσεις με κάποιες ουσίες. Σε παρόμοιες εργασίες που έχουν διεξαχθεί στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, 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 στο θετικό αποτέλεσμα των πολυφαινολών (Gerasopoulos K.

et.al.,2014) .

Όσον αφορά στην καταλάση (CAT), οι πολυφαινολικές ομάδες παρουσιάζουν αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου, σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου χωρίς όμως να έχουμε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα για κάποιον από τους ιστούς που ελέγχθηκαν. Στατιστικά σημαντικό είναι το αποτέλεσμα της τιμής της CAT στον εντερικό ιστό στην ομάδα ελέγχου των 50 ημερών όπου τα επίπεδα της μειώθηκαν. Η κυριότερη πηγή ROS στον άνθρωπο είναι η διαρροή ενεργοποιημένου οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια, το οποίο φυσιολογικά εμφανίζεται ως ενδιάμεσο κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και η τελική του τύχη είναι ο σχηματισμός μορίων νερού. Επιπρόσθετα, οι αντιδράσεις ουβικινόνης της αναπνευστικής αλυσίδας μπορούν να προκαλέσουν διαρροή ηλεκτρονίων απευθείας στο οξυγόνο. Συνολικά, μέχρι και 2% του οξυγόνου που εισέρχεται στην αναπνευστική αλυσίδα σχηματίζει ανιόντα σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) τα οποία μέσω της δράσης της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου μετατρέπονται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Επίσης, υποστηρίζεται ότι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν φλαβινοπρωτεΐνες επίσης συνεισφέρουν ένα ποσοστό των συνολικών ROS. Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) μπορούν να παράγουν ποικίλα ένζυμα, μεταξύ των οποίων αρκετές οξειδάσες. Τα κυριότερα από αυτά είναι η οξειδάση της ξανθίνης, η οξειδάση του NADPH και το σύμπλεγμα του κυτοχρώματος P450. Η CAT είναι το ένζυμο το οποίο μετατρέπει το H_2O_2 σε H_2O και O_2 . Στην παρούσα εργασία ωστόσο, οι μεταβολές της CAT δεν βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικές σε κανέναν από τους υπό μελέτη ιστούς. Σε μια παρεμφερή μελέτη (Goutzourelas et.al., 2015), φάνηκε ότι η χορήγηση εκχυλισμάτων σπόρων σταφυλιού (GPE), δεν φάνηκε να ασκεί αντιοξειδωτική δράση μέσω της ρύθμισης των αντιοξειδωτικών ενζύμων CAT, SOD και HO-1 ένζυμα. Σε αυτή τη μελέτη, η επεξεργασία με GPE μείωσε τόσο την έκφραση όσο και τη δραστηριότητα του ενζύμου CAT σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ στα μυϊκά κύτταρα, δεν είχε κανένα αποτέλεσμα. Επίσης, φάνηκε ότι δεν επηρεάστηκε η έκφραση ή η δραστηριότητα της SOD στα κύτταρα EA.hy926 και C₂C₁₂. Το γεγονός ότι το εκχύλισμα δεν είχε καμία επίδραση (ή ακόμη και μείωση), στην έκφραση και τη δραστηριότητα της CAT και των SOD ενζύμων μπορεί να εξηγηθεί από την ικανότητα αυτών των πολυφαινολών να ενισχύουν άλλους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, όπως GSH, GCS και GST. Παρόμοια αποτελέσματα φάνηκαν και σε άλλες μελέτες, οι οποίες έχουν αναφέρει ότι τα εκχυλίσματα σταφυλιού δεν επηρέασαν την δραστηριότητα της CAT και των ενζύμων SOD (Yang T. et.al., 2014. και Fernández-Iglesias A. et. al. 2014).

Οι τιμές της TAC στους ιστούς, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και ερμηνεύονται ως ακολούθως: ο νεφρικός ιστός των 50 ημερών της πολυφαινολικής ομάδας σε σχέση με την ομάδα control αυξάνει τη συγκέντρωση κατά 11,3% και το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό.

Για τις υπόλοιπες μετρήσεις, οι τιμές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο επίπονος τρόπος επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο. Σε άλλες μελέτες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών όμως βρέθηκε ότι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), ήταν μεγαλύτερη για ζώα που τράφηκαν με πολυφαινόλες από απόβλητα ελαιοτριβείου (Gerasopoulos K. et.al. 2014).

Η υπεροξείδωση λιπιδίων αποτελεί ένα κύριο χαρακτηριστικό του οξειδωτικού στρες και μπορεί να μετρηθεί με διάφορες μεθόδους, οι οποίες περιλαμβάνουν την ποσοτικοποίηση είτε των πρωτογενών (υδροϋπεροξειδίων), είτε των δευτερογενών (TBARS, ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ και F2-ισοπροστανία) προϊόντων της υπεροξείδωσης. Στην παρούσα εργασία, οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) δείχνουν πως ο συγκεκριμένος δείκτης παρουσιάζει για τον εντερικό ιστό της πολυφαινολικής ομάδας των 30 ημερών σε σχέση με την ομάδα control μείωση της συγκέντρωσης κατά 50,8% και το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό. Επίσης ο εντερικός ιστός της πολυφαινολικής ομάδας των 50 ημερών σε σχέση με την ομάδα control μειώνει τα TBARS κατά 20,1%, πιθανώς λόγω των πολυφαινολών τα οποία δρουν αντιοξειδωτικά και μειώνουν τη λιπιδική υπεροξείδωση. Για τις υπόλοιπες μετρήσεις οι μεταβολές των TBARS δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Επιπλέον, σε παρόμοιες μελέτες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών τα TBARS, ήταν σημαντικά μειωμένα στις πολυφαινολικές ομάδες σε σχέση τις control (Gerasopoulos K. et.al. 2014). Συνεπώς, οι πολυφαινόλες συμβάλουν στην μείωση της οξείδωσης των λιπιδίων. Η μείωση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων εκτός από τις θετικές επιδράσεις για την υγεία του ζώου, θα μπορούσε επίσης να βελτιώσει την ποιότητα του κρέατος, καθώς η οξείδωση των λιπιδίων στο κρέας είναι μία από τις κύριες αιτίες για τον περιορισμό της ποιότητας του (Arshad et al., 2013). Ειδικότερα, η οξείδωση των λιπιδίων οδηγεί στην αλλοίωση της γεύσης και τη μείωση της διατροφικής αξίας του κρέατος και των προϊόντων του (Namand Ahn, 2003).

Τέλος, η μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μας υποδηλώνει το ποσοστό οξείδωσης που έχουν υποστεί οι πρωτεΐνες των ιστών, από τη δράση των ελευθέρων ριζών. Για τα επίπεδα των

πρωτεϊνικών καρβονυλίων παρατηρούμε ότι η ομάδα ελέγχου παρουσιάζει αυξημένες τιμές, σε σχέση με τις άλλες ομάδες. Ο νεφρικός ιστός της πολυφαινολικής ομάδας των 30 ημερών σε σχέση με την ομάδα Control μειώνει τη συγκέντρωση κατά 17,9% και το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό επίσης ο νεφρικός ιστός της πολυφαινολικής ομάδας των 50 ημερών σε σχέση με την ομάδα Control μειώνει τη συγκέντρωση κατά 12,6% και αυτό το αποτέλεσμα είναι επίσης στατιστικά σημαντικό. Αυτό σημαίνει πως οι πολυφαινόλες που υπάρχουν σ' αυτήν την ομάδα υποβοηθούν στην μείωση της οξειδωσης των πρωτεϊνών. Οι υπόλοιπες μετρήσεις δεν εμφάνισαν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή. Σε άλλες εργασίες, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είχαν αυξημένες τιμές στις ομάδες control σε σχέση με τις πολυφαινολικές, ενώ με το πέρας των ημερών παρουσιάστηκε συνεχής μείωση στις πολυφαινολικές ομάδες, υποδεικνύοντας ότι οι πολυφαινόλες αποτρέπουν την οξειδωση των πρωτεϊνών (Gerasopoulos K. et.al. 2014). Έχει προταθεί ότι η διάσπαση του H_2O_2 από σίδηρο ή χαλκό είναι μια σημαντική πηγή $OH\cdot$ που μπορούν να οξειδώσουν τα υπολείμματα αμινοξέων στις πρωτεΐνες και οδηγούν στο σχηματισμό πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Stadtman και Levine, 2003). Έτσι, πολυφαινόλες που βρίσκονται στα στέμφυλα μπορούν να αναστέλλουν αυτές τις αντιδράσεις. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η οξειδωση πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει τον πολυμερισμό πρωτεϊνών και συσσωμάτωση, επηρεάζοντας έτσι την πεπτικότητα τους, η οποία μειώνει τη θρεπτική αξία των τροφών. (Zhang et al., 2013).

Συνοπτικά, από την παρούσα εργασία εξάγουμε το συμπέρασμα ότι ο εμπλουτισμός των ζωοτροφών με πολυφαινόλες από στέμφυλα, έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) να μειώνονται οι δείκτες οξειδωσης των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, το οποίο εκτός από τις θετικές επιδράσεις για την υγεία του ζώου, θα μπορούσε επίσης να βελτιώσει την ποιότητα και την θρεπτική αξία του κρέατος.

Ένα άλλο σπουδαίο όμως σημείο που πρέπει να επισημανθεί, είναι πως οι πολυφαινόλες αποτελούν την κύρια ρυπαντική παράμετρο, η οποία ευθύνεται για τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Άρα, εάν προκύψουν μέθοδοι απομόνωσης των πολυφαινολών, τότε θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για παράδειγμα στην ενσίρωση για τα οικότροφα ζώα και στην υδρολίπανση. Ενώ από την άλλη πλευρά, οι απομονωμένες πολυφαινόλες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία προϊόντων με αυξημένη προστιθέμενη αξία όπως ζωοτροφών με αντιοξειδωτική δράση.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aebi H. In: Catalase in Vitro. Methods in Enzymology. Colowick SP, Kaplan NO, editors. Vol. 105. Florida: Acad. Press; 1984. pp. 114–121.

AICR (2007) Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective; World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, Washington, DC, USA.

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

Aqil F., Gupta A., Munagala R., Jeyabalan J., Kausar H., Sharma R. J., Singh I. P. and Gupta R. C. (2012) Antioxidant and Antiproliferative Activities of Anthocyanin/Ellagitannin-Enriched Extracts From *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry) Nutrition and Cancer

Arnous, A & Meyer, AS, Grape skins (*Vitis vinifera* L.) catalyze the in vitro enzymatic hydroxylation of p-coumaric acid to caffeic acid' Biotechnology Letters, 2009.

Arshad, M.S., Anjum, F.M., Khan, M.I., Shahid, M., Akhtar, S., Sohaib, M., 2013. Wheat germ oil enrichment in broiler feed with α -lipoic acid to enhance the antioxidant potential and lipid stability of meat. Lipids Health Dis. 4 (12), 164.

B. Poljsak. Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress, 2011.

Basu S, Eriksson M, (2001) Retinol palmitate counteracts oxidative injury during experimental septic shock. Annals of the Academy of Medicine Singapore 30: 265–269.

Battin E. E., Brumaghim J. L. (2009) Antioxidant Activity of Sulfur and Selenium: A Review of Reactive Oxygen Species Scavenging, Glutathione Peroxidase, and Metal-Binding Antioxidant Mechanisms Cell Biochem Biophys 55:1–23

Bhat KP¹, Pezzuto JM., Cancer chemopreventive activity of resveratrol, Ann N Y Acad Sci. 2000.

Bourchis, M., Dumon, M. C., Glories, Y. and Vercauteren, J. Polyphenols Communications p 43. 1996

Bravo L, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, Nutrition Rev, 1998.

Bustamante M.A., Moral R., Paredes C., Pérez-Espinosa A., Moreno-Caselles J., Pérez-Murcia M.D. (2008a). Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. Waste Manage., 28, 372-380

Bustamante M.A., Paredes C., Moral R., Moreno-Caselles J., Pérez-Espinosa A. and Pérez-Murcia M.D. (2005). Uses of winery and distillery effluents in agriculture: Characterisation of nutrient and hazardous components. Water Sci. Technol., 51, 145-151

Campbell DJ, Sargious P, Lewanczuk R, McBrien K, Tonelli M, Hemmlgarn B, Manns B. (2013). Use of chronic disease management programs for diabetes: in Alberta's primary care networks. Can Fam Physician, 59 (2):86-92

Celi P (2010). The role of oxidative stress in small ruminant's health and production, R. Bras. Zootec. v.39: 348-363.

Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. Cellular and Molecular Life Sciences 61(2): pp. 192-208.

Chen, Y.P., Chen, X., Zhang, H., Zhou, Y.M., 2013. Effects of dietary concentrations of methionine on growth performance and oxidative status of broiler chickens with different hatching weight. Br. Poult. Sci. 54 (4), 531–537.

Clementi, Emilio; Smith, Guy Charles; Howden, Martin; Dietrich, Salvador;Bugg, S; O'Connell, MJ; Goldsbrough, PB; Cobbett, CS (1999). «Phytochelatase synthase genes from Arabidopsis and the yeast Schizosaccharomyces pombe». The Plant cell 11 (6): 1153–64.

Considine, J.A. και Knox, R.B., 1979: Development and histochemistry of the cells, cells walls and cuticle of the dermal system of fruit of the grape, Vitis vinifera L. Protoplasma, 99:347)365.

Considine, J.A. και Knox, R.B., 1981: Tissue origins, cell lineages and patterns of cell division in the developing dermal systems of the fruit of Vitis vinifera L. Planta, 151:403)412.14.

D.P Miller, et al., “Fabrication of functionally graded NiAl/Al₂O₃ composites”, J.Mater. Sci., Vol.8, Aug. 1993, 2004-2013.

Deaton C.M, Marlin D.J, Smith N.C, Harris P.A, Roberts C.A, Schroter R.C, Kelly F.J (2004a). Pulmonary epithelial lining fluid and plasma ascorbic concentrations in horses affected by recurrent airway obstruction. *American Journal of Veterinary Research* 65, 80–87.

Deaton C.M, Marlin D.J, Smith N.C, Harris P.A, Schroter R.C, Kelly F.J (2004b). Antioxidant supplementation in horses affected by recurrent airway obstruction. *Journal of Nutrition* 134, S2065– S2067.

Deaton C.M, Marlin D.J, Smith N.C, Roberts C.A, Harris P.A, Schroter R.C, Kelly F.J (2005). Antioxidant and inflammatory responses of healthy horses and horses affected by recurrent airway obstruction to inhaled ozone. *Equine Veterinary Journal* 37, 243–249.

Devesa-Rey R, Vecino X, Varela-Alende JL, Barral MT, Cruz JM, Moldes AB. Waste Manag. 2011 Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling.

Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A. Capasso F, (1999), Flavonoids : Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, 4:337-353

Durackova Z, Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiol Res*, 2010.

FAD STAT Database, 2002.

Ferguson Lynnette R, (2001), Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, 475:89-111.

Fernández-Iglesias A, Quesada H, Díaz S, Pajuelo D, Bladé C, Arola L, Salvadó MJ and Mulero M: Combination of grape seed proanthocyanidin extract and docosahexaenoic acid-rich oil increases the hepatic detoxification by GST mediated GSH conjugation in a lipidic postprandial state. *Food Chem* 165: 14-20, 2014.

Fournioux J-C (1982) *Sciences de la vigne: Cours de travaux pratiques*. Université de Dijon.

Galvin, C. *These de Doctorat Oenologie – Ampelologie*, Université de Bordeaux II. 1993

Gerasopoulos K., D. Stagos, K. Petrotos, S. Iokkas, D. Kantas, P. Goulas, D. Kouretas, “Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets,” *Food and chemical toxicology*, vol. 86, pp. 319–327, 2015.

Gilbert, F. H. (1995). Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. *Methods Enzymol.* 251:8-28 .

Goutzourelas N, Stagos D, Demertzis N, Mavridou P, Karterolioti H, Georgadakis S, Kerasioti E, Aligiannis N, Skaltsounis L, Tsatsakis A.M, Hayes A.W, Kouretas D. (2014). Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Human and Experimental Toxicology.* 33(11):1099-112.

Guillon T.M., (1905): Étude générale de la vigne: historique, les vignobles et les crus, anatomie et physiologie, sol et Climat. Masson, Paris.

Halliwell B. (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344:721–724.

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

Harborne JB. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: *Plant flavonoids in biology and medicine.* Cody B, Middleton E, Harborne JB, eds. Alan Liss: New York, 1986.

Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, et al, Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study, 1995.

Hogan J.S, Weiss W.P, Todhunter D.A, Smith K.L, Schoenberger P.S (1992). Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. *Journal of Dairy Science* 75: 399–405. sel 18

Huber B, Eberl L, Feucht W, Polster J., *Naturforsch*, 2003.

Hughes, RE (1964). «Reduction of dehydroascorbic acid by animal tissues». *Nature* 203 (4949): 1068–9.

Jain A, Flora SJ ((2012) Dose related effects of nicotine on oxidative injury in young, adult and old rats. *J Environ Biol.* 33(2):233-8.

Janaszewska A. and Bartosz G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J. Clin Lab Invest.* 62:231-6

Janaszewska A. and Bartosz G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four

methods as applied to human blood plasma. *Scand J. Clin Lab Invest.* 62:231-6

Jeandet, P., Bessis, R., Maume, B. F., Meunier, P. Trollat, P. Effect of Enological practices on the Resveratrol Isomer Content of Wine . *J. Agricultural Food Chemistry* vol. 43 (2) pp. 316-319, 1995

John H Hart. Hillis W.E., Inhibition of wood-rotting fungi by stilbenes and other polyphenols in *eucalyptus sideroxylon*, 1974.

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.

Kammerer D, Claus A, Schieber A, Carle R (2005). A novel process of polyphenols from grape (*Vitisvinifera* L) pomace. *Journal of Food Science.* 70: 157-163.

Kataria A. K, Kataria N (2012a) Evaluation of oxidative stress in sheep affected with peste des petits ruminants. *J Stress Physiol Biochem* 8(4):72-77.

Kataria A. K, Kataria N (2012b) Evaluation of oxidative stress in pigs affected with classical swine fever. *Porc Res* 2(2):35-38.

Keles M.S., Taysi S., Sen N., Aksoy H., Akçay F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J NeurolSci.* 28:141-3

Kennedy, J.A., 2002: Understanding grape berry development.

Khanal, S.K. and Ju-Chang Howard HUANG (2005), Online Oxygen Control for Sulfide Oxidation in Anaerobic Treatment of High Sulfate Wastewater, *Water Environment*.

Kyparos A., Vrabas I.S., Nikolaidis M.G., Riganas C.S., Kouretas D. (2009). Increased oxidative stress blood markers in well-trained rowers following two thousand-meter rowing ergometer race. *J Strength Cond Res.* 23:1418-26

Langcake, C. *Physiol. Plant Pathol.* , 18, 213, 1981.

Lauritzen B, Lykkesfeldt J, Friis, C (2003). Evaluation of a single dose versus divided dose regimen of danofloxacin in treatment of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Research in Veterinary Science* 74, 271–277.

- Linnane, A.W. et al. Aging and global function of coenzyme, N.Y. Acad. Sci, 2002.
- Liras, P., J. Mc Cusker, S. Mascioli and J. E. Haber, 1978 Characterization of a mutation causing nonrandom chromosome loss during mitosis. *Genetics* 88:651–671.
- Lykkesfeldt J, Svendsen O (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 173(3):502-11.
- Lykkesfeldt J, Svendsen O (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 173(3):502-11.
- Manach Claudine, Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., (2004), Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Society for Clinical Nutrition*, 79:727-47.
- Margonis K., Fatouros I.G., Jamurtas A.Z., Nikolaidis M.G., Douroudos I., Chatzinikolaou A., Mitrakou A., Mastorakos G., Papassotiriou I., Taxildaris K, Kouretas D. (2007). Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free Radic Biol Med.* 43:901-10
- Mullins, M.G., Bouquet, A. και Williams, L.E., 1992: *Biology of Horticultural crops. Biology of the grapevine.* Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Nam K. C., D. U. Ahn, “Use of antioxidants to reduce lipid oxidation and off-odor volatiles of irradiated pork homogenates and patties,” *Meat science*, vol. 63, no. 1, pp. 1–8, 2003.
- Pani G., Galeotti T. and Chiarugi P. (2010) Metastasis: cancer cell’s escape from oxidative stress *Cancer Metastasis Rev* 29:351–378.
- Pastore A., Fedetici G., Bertini E., Piemonte F. (2003) Analysis of Glutathione: Implication in Redox and Detoxification. *Clin .Chim. Acta.* 333(1): 19-39.
- Patsoukis N., Papapostolou I., Zervoudakis G., Georgiou C.D., Matsokis N.A., Panagopoulos N.T. (2005). Thiol redox state and oxidative stress in midbrain and striatum of weaver mutant mice, a genetic model of nigrostriatal dopamine deficiency. *Neurosci Lett.* 376(1):24-8
- Patsoukis N., Papapostolou I., Zervoudakis G., Georgiou C.D., Matsokis N.A., Panagopoulos N.T. (2005). Thiol redox state and oxidative stress in midbrain and striatum of weaver mutant mice, a genetic model of nigrostriatal dopamine deficiency. *Neurosci Lett.* 376(1):24-8

Quideau, S. P.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C. L.; Pouységu, L., Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis, 2011.

Reddy A.R., Chaitanya K.V., Vivekanandan M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. J. Plant Physiol., 161: 1189-1202

Reid MB, Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction, Medicine and Science in Sports and Exercise, 2001.

RibéreaueGayon, P., Dubourdieu D., Doneche, B. and Lonvaud, Al., 1998: Handbook of Enology, Volume 1, the Microbiology of Wine and Vinifications.

Ribereaum Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B. and Lonvaud Al., (1998): Handbook of Enology, Volume 1, the Microbiology of Wine and Vinifications.

Rimbach, M. and F. Liebert. 1999. N-metabolism parameter of current broiler chicken genotypes in different age period. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 8:49.

Roland F. Beers, Jr. and Irwin W. Sizer J. Biol. Chem. 1952, 195:133-140. CATALASE OF HYDROGEN PEROXIDE BY FOR MEASURING THE BREAKDOWN A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD

Sandhya Khurana, Krishnan Venkataraman, Amanda Hollingsworth, Matthew Piche, and T. C. Tai, Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging, 2013.

Salway J.G, Ιατρική Βιοχημεία με μια Ματιά, Β' Έκδοση, Blackwell Publishing, 2006, Σελίδα 49

Scalbert, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry, 30: 3875-3883.

Scholz, R.W. Graham K.S. Gumprich E. Reddy C.C. (1989). «Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation». Ann NY Acad Sci Sen CK, Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction, Medicine and Science in Sports and Exercise, 2001.

Sengupta A., Ghosh S., Bhattacharjee S. (2004) Allium Vegetables in Cancer Prevention: An Overview Asian Pacific J Cancer Prev, 5: 237-245.

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

Sies, H. Oxidative Stress. London: Academic; 1985.

Singleton V., Rossi A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Viticult. 16: 144-158

Spigno, G., L. Tramelli, and D. M. D. Faveri (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. J. Food Eng., 81: 200-208 .

Stadtman Earl R. Protein oxidation and aging, (2006), Free Radical Research, 40(12): 1250–1258.

Stadtman E. R. , R. L. Levine, “Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins,” Amino acids, vol. 25, no. 3-4, pp. 207–218, 2003.

Tania Brenes-Arguedas, Phyllis D. Coley and Thomas A. Kursar, Divergence and diversity in the defensive ecology of Inga at two Neotropical sites, Journal of Ecology, 2007.

Vainio H. (1999) Chemoprevention of cancer: a controversial and instructive story British Medical Bulletin 55 (3): 593-599 .

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J of Biochem & Cell Biol, 2007.

Vera Dias. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's disease, 2013.

Vermerris W., Nicholson R. (2006) Phenolic Compound Biochemistry. USA: Springer. Nueva York, EEUU. pp. 3-16, 151-153.

VIALA, P. & PECHOUTRE, P., 1910. Morphologie du genre Vitis. In Viala, P. & Vermorel, V. Traite general de Viticulture ampelo.

Weisburger J. H. (2001) Chemopreventive Effects of Cocoa Polyphenols on Chronic Diseases Experimental Biology and Medicine.

Weiss W.P, Hogan J.S, Smith K.L (2004) Changes in vitamin C concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of Escherichia coli. Journal of Dairy Science 87: 32–37.

Wessely-Szponder J, Bobowiec R, Martelli F, Wojcik M, Kosior-Korzecka U (2004) Assessment of

neutrophil components as markers of lung injury in the course of bovine respiratory tract infections. Polish Journal of Veterinary Science 7: 157–161.

Yang T, Li X, Zhu W, Chen C, Sun Z, Tan Z and Kang J: Alteration of antioxidant enzymes and associated genes induced by grape seed extracts in the primary muscle cells of goats in vitro. PLoS One 9: e107670, 2014.

Yen G.C., Duh P.D. (1994). Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free Radical and Active Oxygen Species. J. Agric. Food Chem. 42:629-632.

Zhang W., S. Xiao, D. U. Ahn, “Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality,” Critical reviews in food science and nutrition, vol. 53, no. 11, pp. 1191–1201, 2013.

Zoecklein .,B.W.,Fugelsang.,K.C., Gump., B.H and Nury.,F.S.,(1999) Wine Analysis and Production .New York Kluwer Academic.

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

ΚΑΛΛΗ ΕΛΛΗ, ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΟΙΝΟΥ ΣΕ ΧΩΡΕΣ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΗΣ ΚΑΙ ΤΑ ΟΦΕΛΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ,2008.