



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες σε καρδιακούς και ηπατικούς ιστούς κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής μετά από χορήγηση πόσιμου νερού με πολυφαινολικό εκχύλισμα από απόβλητα ελαιοτριβείου

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



Τερψίδης Ηλίας Κωνσταντίνος
Λάρισα 2017

Τριμελής Επιτροπή

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

Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος Καθηγητής Τοξικολογίας και Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

Ευχαριστίες:

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Τοξικολογίας και Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Επίκουρο Καθηγητή Τοξικολογίας και Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για όλη την βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τον διδάκτορα Κωνσταντίνο Γερασόπουλο για την πολύτιμη καθοδήγηση και συνεισφορά.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	11
1.1.1. Δραστικές μορφές οξυγόνου.....	12
1.1.2. Δραστικές μορφές αζώτου (RNS).....	15
1.1.3. Δημιουργία ελευθέρων ριζών.....	15
1.2 Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα.....	18
1.3 Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες.....	21
1.4 Ευεργετικές Επιδράσεις Ελευθέρων Ριζών.....	23
1.5 Πολυφαινόλες.....	23
1.5.1 Γενικά - Κατηγορίες πολυφαινολών.....	23
1.5.2. Ιδιότητες πολυφαινολών.....	25
1.5.3. Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία.....	26
1.5.4. Επιδράσεις πολυφαινολών από συστατικά ελαιολάδου και Υ.Α.Ε.....	27
1.6 Σκοπός.....	28
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
2.1. Περιγραφή Σκόνης Πολυφαινολικού Εκχυλίσματος.....	28
2.2. Περιγραφή Σιτηρεσίου - Βάρη.....	30
2.3. Ιστοληψία, μεταφορά στο εργαστήριο και ομογενοποίηση.....	32
2.3.1. Ιστοληψία και μεταφορά.....	32
2.3.2. Ομογενοποίηση.....	32
2.4. Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.....	33
2.4.1. Μέτρηση Γλουταθειόνης (GSH).....	33
2.4.2. Μέτρηση ρυθμού διάσπασης H ₂ O ₂	37
2.4.3. Μέτρηση Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC).....	39
2.4.4. Μέτρηση TBARS.....	42
2.4.5. Μέτρηση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων.....	44
2.4.6. Μέθοδος Bradford.....	47
2.5. Στατιστική Ανάλυση.....	47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	48
3.1. GSH.....	48
3.2. Καταλάση.....	49
3.3. TAC.....	50
3.4. TBARS.....	51
3.5. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια.....	52
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.	Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα που δημιουργεί ελεύθερη ρίζα.	12
Εικόνα 2.	Δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας.	13
Εικόνα 3.	Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια.	16
Εικόνα 4.	Αναγωγή του μοριακού οξυγόνου εκτός μιτοχονδρίων.	17
Εικόνα 5.	Δημιουργία οξειδωτικού στρες.	18
Εικόνα 6.	Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας.	20
Εικόνα 7.	Δράση των ενδογενών, ενζυμικών αντιοξειδωτικών.	21
Εικόνα 8.	Διαταραχές που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες.	22
Εικόνα 9.	Κατηγορίες πολυφαινολών.	24
Εικόνα 10.	Ασθένειες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες.	27
Εικόνα 11.	Προϊόντα πολυφαινολικού εκχυλίσματος.	28
Εικόνα 12.	Χρωματογραφία (HPLC) του Πολυφαινολικού Προφίλ του Προϊόντος.	30
Εικόνα 13.	Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης.	34
Εικόνα 14.	Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης.	34
Εικόνα 15.	Φάσμα απορρόφησης του 2-Nitro-5-thiobenzoic οξέος. (DojindoMolecularTechnologies).	36
Εικόνα 16.	Μονοπάτι αναγωγής του H ₂ O ₂ σε H ₂ O.	37
Εικόνα 17.	Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), Που Οδηγεί Στην Παραγωγή Του Μορίου TBA-MDA.	42
Εικόνα 18.	Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δίνιτριφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου.	45

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.	Δραστικές Μορφές Οξυγόνου.	12
Πίνακας 2.	Δραστικές Μορφές Αζώτου.	15
Πίνακας 3.	Συγκεντρώσεις πολυφαινολικής σκόνης στις ομάδες των κοτόπουλων.	30
Πίνακας 4.	Σύσταση σιτηρεσίου.	31
Πίνακας 5.	Μετρήσεις βάρους κοτόπουλων.	31
Πίνακας 6.	Απόδοση σε κρέας μετά τη σφαγή.	32
Πίνακας 7.	Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της GSH.	35
Πίνακας 8.	Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση του ρυθμού διάσπασης H ₂ O ₂ .	38
Πίνακας 9.	Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC.	41
Πίνακας 10.	Αποτελέσματα μετρήσεων της GSH (μmol/mg protein)	48
Πίνακας 11.	Αύξηση %GSH Ηπατικού σε σχέση με Control.	48
Πίνακας 12.	Αύξηση % GSH Καρδιακού σε σχέση με Control.	48
Πίνακας 13.	Αποτελέσματα μετρήσεων του Ρυθμού Διάσπασης H ₂ O ₂ (U/mg protein).	49
Πίνακας 14.	Αύξηση % Ρυθμού Διάσπασης H ₂ O ₂ Ηπατικού σε σχέση με Control.	49
Πίνακας 15.	Αύξηση % Ρυθμού Διάσπασης H ₂ O ₂ Καρδιακού σε σχέση με Control.	49
Πίνακας 16.	Αύξηση % Ρυθμού Διάσπασης H ₂ O ₂ καρδιακού της ομάδας C σε σχέση με B ομάδα.	49
Πίνακας 17.	Αποτελέσματα μετρήσεων της TAC (mmol DPPH/mg protein).	50
Πίνακας 18.	Αύξηση % TAC Ηπατικού σε σχέση με Control.	50
Πίνακας 19.	Αύξηση % TAC Καρδιακού σε σχέση με Control.	50
Πίνακας 20.	Αύξηση % TAC Καρδιακού της ομάδας C σε σχέση με B ομάδα.	50
Πίνακας 21.	Αποτελέσματα μετρήσεων των TBARS (nmol /mgprotein).	51
Πίνακας 22.	Μείωση % TBARS Ηπατικού σε σχέση με Control.	51
Πίνακας 23.	Μείωση % TBARS Καρδιακού σε σχέση με Control.	51
Πίνακας 24.	Μείωση % TBARS Ηπατικού της ομάδας C, σε σχέση με B ομάδα	51
Πίνακας 25.	Αποτελέσματα μετρήσεων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. (nmol /mgprotein).	52
Πίνακας 26.	Μείωση % καρβονυλίων Ηπατικού σε σχέση με Control.	52

Πίνακας 27.	Μείωση % καρβονυλίων Καρδιακού σε σχέση με Control.	52
Πίνακας 28.	Μείωση % καρβονυλίων Ηπατικού της ομάδας C, σε σχέση με B ομάδα	52
Πίνακας 29.	Μείωση % καρβονυλίων Καρδιακού της ομάδας C, σε σχέση με B ομάδα	52

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1.	GSH στον Ηπατικό και Καρδιακό ιστό των Κοτόπουλων.	48
Γράφημα 2.	Ρυθμός Διάσπασης H ₂ O ₂ στον Ηπατικό και Καρδιακό ιστό των Κοτόπουλων.	49
Γράφημα 3.	TAC στον Ηπατικό και Καρδιακό ιστό των Κοτόπουλων.	50
Γράφημα 4.	TBARS στον Ηπατικό και Καρδιακό ιστό των Κοτόπουλων.	51
Γράφημα 5.	Καρβονύλια στον Ηπατικό και Καρδιακό ιστό των Κοτόπουλων.	52

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες σε ηπατικούς και καρδιακούς ιστούς κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, έτσι ώστε με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, να διερευνηθεί αν θα υπήρχε ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών τους. Στη διατροφή τους υπήρχε το προβλεπόμενο σιτηρέσιο, αλλά στο πόσιμο νερό τους προστέθηκε πολυφαινολικό εκχύλισμα σε μορφή σκόνης. Τα κοτόπουλα χωρίστηκαν σε τρεις (3) ομάδες των είκοσι πέντε (25) πτηνών. Η ομάδα Α ήταν η ομάδα ελέγχου. Στις άλλες δύο (2) ομάδες, όπως αναφέρθηκε, στο νερό τους το οποίο ανανεώνονταν καθημερινά, μετά την ηλικία των δεκαπέντε (15) ημερών, προστέθηκε πολυφαινολική σκόνη που παράγεται από το υγρό (υδατικό κλάσμα) που προκύπτει από την διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου από την ελιά. Μετά το πέρας εξήντα (60) ημερών, όταν δηλαδή τα κοτόπουλα έκαναν αγωγή πολυφαινολών για σαράντα πέντε μέρες (45), οδηγήθηκαν στο πτηνοσφαγείο. Μετά την θανάτωσή τους πραγματοποιήθηκε η λήψη τμήματος καρδιακού και ηπατικού ιστού από δώδεκα (12) κοτόπουλα από την κάθε ομάδα των είκοσι πέντε (25). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο όπου και τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη μέχρι να μελετηθούν περαιτέρω. Μετά την ομογενοποίηση του ιστού προσδιορίστηκε η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ο ρυθμός διάσπασης του H_2O_2 , τα TBARS, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας ήταν θετικά και ενθαρρυντικά. Τα πολυφαινολικά πρόσθετα επηρεάζουν τη συμπεριφορά των δεικτών οξειδωτικού στρες, μεταξύ των τριών ομάδων, δείχνοντας ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Ενδεικτικά, στην ομάδα των 50μg/ml τόσο στον ηπατικό όσο και στον

καρδιακό ιστό αυξήθηκε η γλουταθειόνη, που είναι το σημαντικότερο ενδογενές μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό, με ποσοστά 29,6% και 64,7% αντίστοιχα. Ωστόσο η γλουταθειόνη δεν είναι ο μόνος δείκτης που επηρεάστηκε, καθώς σε όλο το εύρος των αποτελεσμάτων μας παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Στατιστικά σημαντικές διαφορές εμφανίζουν **όλοι** οι δείκτες **και στους δύο** ιστούς, συγκρίνοντας τις πολυφαινολικές ομάδες με την control. Αλλά και σε ορισμένες περιπτώσεις στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα βλέπουμε και μεταξύ των δύο πολυφαινολικών ομάδων 20 και 50μg/ml. Κατά συνέπεια, η παρουσία πολυφαινολών στο πόσιμο νερό έχει ευεργετικές ιδιότητες, βελτιώνοντας την οξειδοαναγωγική κατάσταση στα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής.

ABSTRACT

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

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

The chickens were fed according to plan, but they were administrated with water, containing polyphenolic powder. The chickens were divided into three (3) groups of twenty five (25) subjects. Group A was the control group, which was administrated with drinking water without polyphenols, throughout the experiment. The other two (2) were administrated with polyphenolic water, each one of a different concentration. The water was freshened up, daily. After the age of sixty days (60), the chickens were slain. Heart and liver collection took place from twelve (12) subjects from each team. The samples were carried back to lab and were put into the refrigerator till they were studied more extensively. After the homogenization biochemical analysis was performed for assaying reduced glutathione (GSH), catalase activity, total antioxidant capacity (TAC), TBARS and protein carbonyls.

To sum up, the results of this study were positive and encouraging. Polyphenolic additives affect the oxidative stress biomarkers' behavior in between groups presenting interesting results. For example, in group C (50 µg/ml) in both liver and heart tissue reduced glutathione was elevated, 29,6% and 64,7% respectively. But GSH was not the only biochemical index to show some interesting results. On every other biochemical test we run, polyphenolic groups in both liver and heart shown statistical important results in comparison to the control group. In some cases, there were some statistical important differences between in the two polyphenolic groups, 20 and 50 µg/ml. This leads to the conclusion that the presence of polyphenolic compounds in drinkable water has some beneficial results.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες Ρίζες

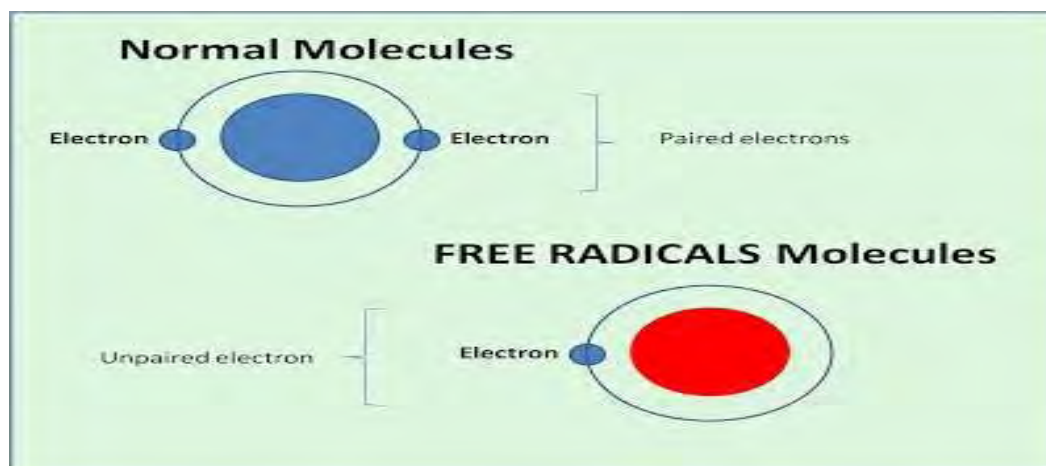
Ελεύθερη ρίζα είναι οποιοδήποτε άτομο, μόριο ή ιόν, που διαθέτει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα, είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Halliwell & Gutteridge 1990).

Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, τότε το μόριο γίνεται ασταθές, εμφανίζοντας μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση, κι έτσι είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων και μεταβολή του αριθμού οξείδωσης των ατόμων των στοιχείων που συμμετέχουν (οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις).

Ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός και ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεοσχηματισμένη χημική οντότητα. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικές, λόγω της παρουσίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων και τείνουν να "αποσπάσουν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell & Gutteridge 1990). Το υπόβαθρο για τη διεργασία αυτή αποτελεί η εγγενής τάση ενεργειακών συστημάτων να διατηρούνται στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας (ground state or atomic unexcited state).

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελεύθερων ριζών. Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες

είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta *et al.* 2004; Pani *et al.* 2010; AICR 2007), το θείο (Battin & Brumaghim 2009; Pani *et al.* 2010) ή τον άνθρακα.



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

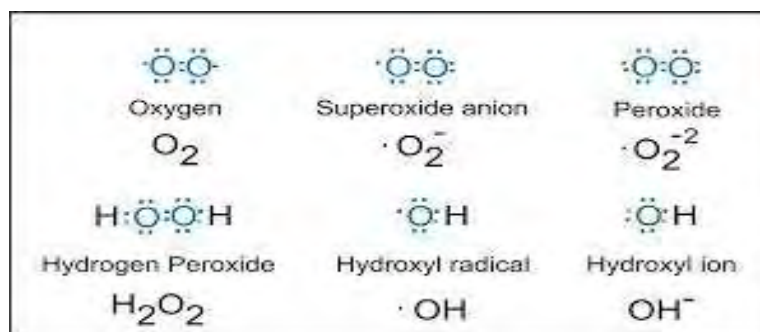
1.1.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι χημικά δραστικές ουσίες που περιέχουν οξυγόνο και σε αυτές ανήκουν και ουσίες που αποτελούν ελεύθερες ρίζες όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου.

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)	Υπεροξείδιο Υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot})	Υποχλωριώδες Οξύ ($HOCl$)
Ρίζα Υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot})	Υποβρωμιώδες Οξύ ($HOBr$)
Ρίζα Αλκοξειδίου (RO^{\cdot})	Όζον (O_3)
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot})	Μονήρες Οξυγόνο (1O_2)

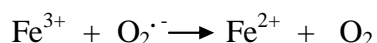
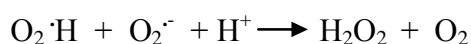
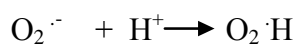
Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας και μπορούν να διακριθούν τα μονήρη ηλεκτρόνια που διαθέτει το ανιόν σουπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου.



Εικόνα 2. Δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας.

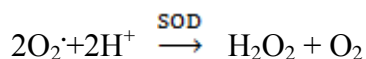
Ανιόν σουπεροξειδίου: Το ανιόν του σουπεροξειδίου σχηματίζεται από την οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ του μοριακού οξυγόνου και ενός ηλεκτρονίου. Είναι ιδιαίτερα τοξικό και χρησιμοποιείται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Στα φαγοκύτταρα παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τη οξειδάση NADPH και χρησιμοποιείται στους εξαρτώμενους από οξυγόνο μηχανισμούς εξολόθρευσης εισβαλόντων παθογόνων. Το ανιόν του σουπεροξειδίου παράγεται επίσης ως παραπροϊόν της αναπνοής που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, και κυρίως από το σύμπλεγμα I και II. Παράγεται επίσης και από άλλα ένζυμα, όπως η οξειδάση της ξανθίνης κατά τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ (Muller et al. 2007). Επειδή η ρίζα αυτή είναι τόσο τοξική, οι οργανισμοί που ζουν παρουσία οξυγόνου διαθέτουν ισομορφές του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) το οποίο μετατρέπει το ανιόν σουπεροξειδίου σε μοριακό οξυγόνο ή υπεροξειδίο υδρογόνου το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται από το ένζυμο καταλάση σε νερό και μοριακό οξυγόνο.

Ρίζα υδροξυλίου: Πρόκειται για μια πολύ δραστική ρίζα όπως έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες (Bielski and Cabelli, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999; Hayyan et al. 2016). Η ρίζα υδροξυλίου προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου (O_2^-) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas and Kouretas, 1999).



Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις τη ρίζας υδροξυλίου είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Υπεροξειδίο υδρογόνου: Το υπεροξειδίο του υδρογόνου σχηματίζεται από οξειδάσες, οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο, όπως οι οξειδάσες των αμινοξέων, η οξειδάση της γλυκόζης και η οξειδάση του γλυκολικού. Σχηματίζεται επίσης με αυτο-οξειδοαναγωγή της ρίζας υπεροξειδίου :



Το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά προκαλεί βλάβες στο κύτταρο σε μικρές συγκεντρώσεις (10μM). Αποτελεί πηγή από την οποία προέρχεται το OH·. Λόγω της οξειδωτικής του ικανότητας προκαλεί απελευθέρωση σιδήρου, απενεργοποίηση ενζύμων, οξείδωση DNA, λιπιδίων, -SH ομάδων και κετοξέων. Επίσης, σύμφωνα με έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί στον οργανισμό μοντέλο ψάρι ζέβρα που έδειξε ότι μετά από τραυματισμό του τα επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου αυξάνονται, έγινε η υπόθεση ότι λειτουργεί σαν σήμα για την προσέλκυση λευκών αιμοσφαιρίων στο σημείο του τραύματος και την εκκίνηση της διαδικασίας επούλωσης (Philipp Niethammer, Clemens Grabher, A. Thomas Look & Timothy J. Mitchison, 2009)

1.1.2 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και κάποιες από τις δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο όπως το μονοξειδίο του αζώτου $\text{NO}\cdot$ και το διοξειδίο του αζώτου $\text{NO}_2\cdot$ καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ HNO_2 και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου ONOO^-) (Fang et al. 2002).

Πίνακας 2: Δραστικές Μορφές Αζώτου.

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου ($\text{NO}\cdot$)	Νιτρώδες Οξύ (HNO_2)
Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου ($\text{NO}_2\cdot$)	Κατιόν Νιτροσυλίου (NO^+)
	Ανιόν Νιτροσυλίου (NO^-)

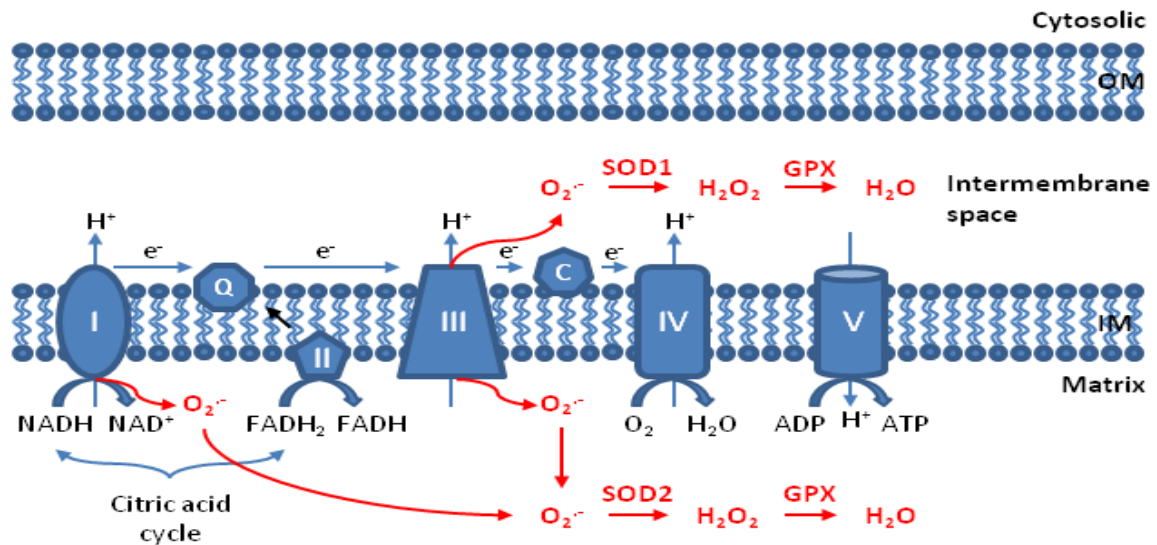
1.1.3 Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν στον οργανισμό μας τόσο ενδογενώς όσο και εξωγενώς.

Οι φυσιολογικές διαδικασίες για παραγωγή ελεύθερων ριζών ενδογενώς είναι οι ακόλουθες (Valko *et al.* 2006):

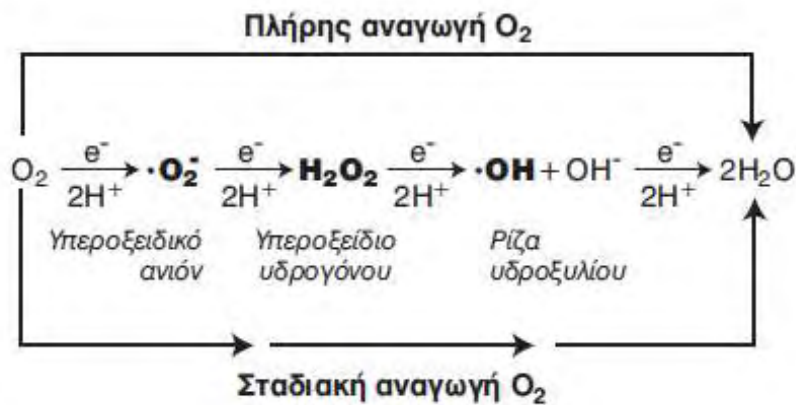
A) Η πιο σημαντική πηγή ελεύθερων ριζών είναι μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, σύμφωνα με την οποία τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH_2 μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό, ενώ ταυτόχρονα η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται στην ATP μέσω της συνθετάσης του ATP. Αυτό αφορά το 95-99% του οξυγόνου. Το υπόλοιπο οξυγόνο διαφεύγει από

τα συμπλέγματα πρωτεϊνών με τη μορφή μονήρους οξυγόνου και σουπεροξειδίου. Το φαινόμενο αυτό, δηλαδή της παραγωγής ελεύθερων ριζών από τα μιτοχόνδρια, εξαρτάται από τη μερική τάση του οξυγόνου και αυξάνεται σημαντικά σε περίπτωση βλάβης στα μιτοχόνδρια (μιτοχονδριακή μεταβολή της διαπερατότητας) με αποτέλεσμα τη μη χρησιμοποίηση της παραγόμενης ενέργειας για τη σύνθεση ATP και τη μεγάλη παραγωγή σουπεροξειδίου που προκαλεί απόπτωση του κυττάρου (Παπαγαλάνης 2014).



Εικόνα 3. Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια.

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



Εικόνα 4. Αναγωγή του μοριακού οξυγόνου εκτός μιτοχονδρίων.

Γ) Κάποια ιόντα μετάλλων (σίδηρος, χαλκός, χρώμιο, κοβάλτιο, αρσενικό, κάδμιο, νικέλιο), που αποτελούν σημαντικούς ενζυμικούς συμπαραγόντες, όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους μέσα σε βιολογικά συστήματα μπορούν να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA, προκαλώντας έτσι καταστροφές.

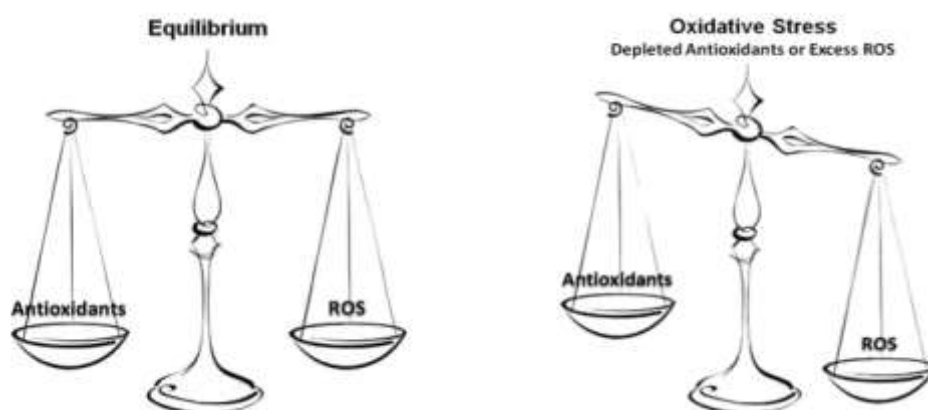
Δ) Τέλος, η παραγωγή ελεύθερων ριζών λαμβάνει χώρα και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς και βιολογικά υλικά (μεταμοσχευθέντα όργανα ή ιστοί). Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου που συνοδεύεται από παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ελευθέρων ριζών.

Μερικοί από τους εξωγενείς παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν δημιουργία ελευθέρων ριζών είναι: η έκθεση στην ιονίζουσα και υπεριώδη ακτινοβολία, η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ, η επίδραση των βαρέων μετάλλων (μόλυβδος, κάδμιο, νικέλιο, υδράργυρος, χαλκός), το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης όπως το όζον της τροπόσφαιρας (ισχυρό οξειδωτικό της φωτοχημικής ρύπανσης) το οποίο προκαλεί υπεροξείδωση λιπιδίων και επιδρά στις δράσεις των ενζύμων, καθώς και διάφοροι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και φάρμακα που δρουν με έμμεσο μηχανισμό (ενεργοποίηση κυτοχρώματος P450). Επίσης, ουσίες που περιέχονται στα τσιγάρα, όπως η πίσσα, η νικοτίνη και το μονοξείδιο του άνθρακα προκαλούν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών που επιδρούν στους πνεύμονες. Τέλος,

αξίζει να σημειωθεί ότι ο καπνός του τσιγάρου μπορεί να αποβεί ακόμα πιο βλαβερός, κάτι που αυξάνει τους κινδύνους και για τους παθητικούς καπνιστές.

1.2 Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Σε περίπτωση, όμως, που προκύψει μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ των δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρος του τελευταίου, τότε παρατηρείται το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες (Pisoschi & Pop 2015). Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μείωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών αζώτου και οξυγόνου. Στην πρώτη περίπτωση, παρατηρούνται διάφορες μεταλλάξεις και τοξικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, εξάντληση των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων λόγω πιθανής παθολογικής κατάστασης, καθώς και μείωση των αντιοξειδωτικών ουσιών που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Στη δεύτερη περίπτωση, έχουμε έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS και RNS ή ύπαρξη παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή τους.



Εικόνα 5. Δημιουργία οξειδωτικού στρες.

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

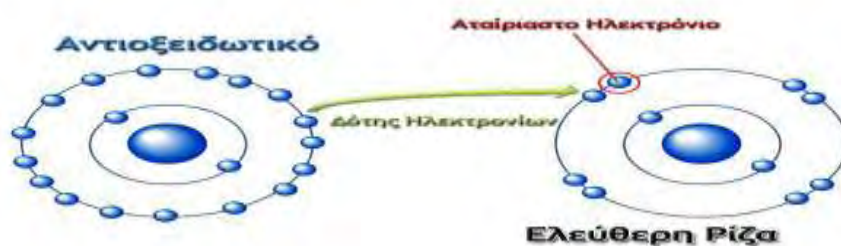
- α) Εμποδίζουν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών.
- β) Καθυστερούν ή σταματούν τις οξειδωτικές διαδικασίες αφότου αρχίσουν, δηλαδή τη διάδοση των ελεύθερων ριζών μέσω των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Αυτό γίνεται με τη σύρωση και την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών τελικά.
- γ) Απενεργοποιούν τα μέταλλα μέσω της σύνδεσής τους με αυτά και έτσι δεν τα αφήνουν να δράσουν (μεταλλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες).
- δ) Δρουν συνεργειακά. Δηλαδή, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού.

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

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

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

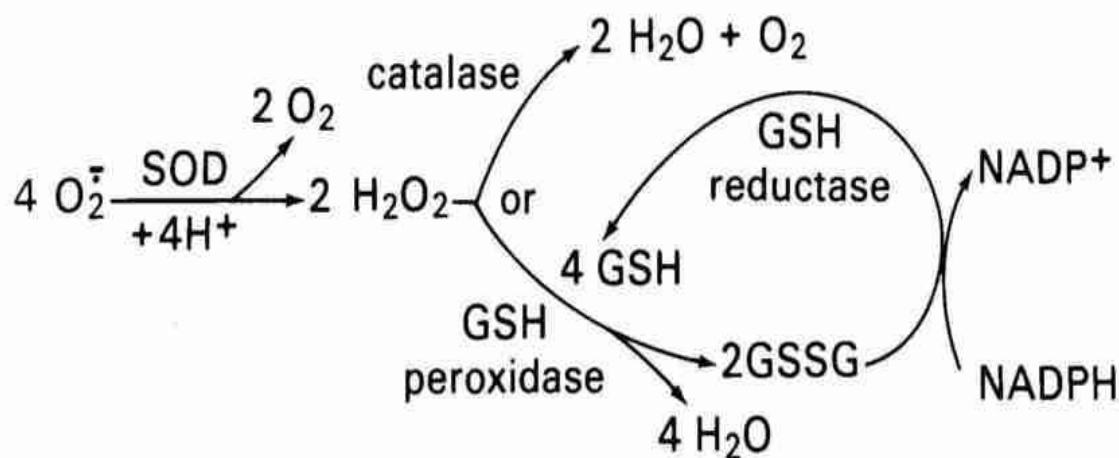
Γενικότερα, άλλες γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι η λακτοφερίνη, η σερουλοπλασμίνη, η απτοσφαιρίνη, η τρανσφερίνη, η αιμογλοβίνη, οι οξειδάσες κυτοχρωμάτων και το συνένζυμο Q10 (Gerogianni & Gourgoulialis 2006). Σημαντική, επίσης, θεωρείται και η δράση της μελατονίνης η οποία παράγεται κυρίως σε συνθήκες απόλυτου σκοταδιού. Η μελατονίνη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό που μπορεί εύκολα να διασχίσει τις κυτταρικές μεμβράνες και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και εξουδετερώνει άμεσα τις ελεύθερες ρίζες OH , O^{2-} και NO . Έτσι, απαιτείται αρκετός ύπνος, ώστε ο οργανισμός μας να παράξει τα απαραίτητα επίπεδα μελατονίνης και να επωφεληθεί από τον προστατευτικό ρόλο που αυτή ασκεί στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA (Poljsak 2011b).



Εικόνα 6. Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας.

Σχετικά με τα ένζυμα που αναφέρθηκαν προηγουμένως, έχουν άμεση επίδραση μεταξύ τους. Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) μετατρέπει το $\text{O}_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 και οξυγόνο. Η καταλάση (catalase) με τη σειρά της μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH peroxidase) μειώνει την λιπιδική υπεροξείδωση και ανάγει το H_2O_2 σε νερό και παράλληλα μετατρέπει δυο ανηγμένα μόρια γλουταθειόνης σε ένα μόριο οξειδωμένης. Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GSH reductase) καταλύει την αναγωγή της γλουταθειόνης, δηλαδή μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή της (GSH). Τέλος, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο μεταβολισμού φάσης II, το οποίο καταλύει τη σύζευξη της GSH με κάποιο ξеноβιοτικό υπόστρωμα με

σκοπό την αποτοξίνωσή του. Οι δράσεις τους φαίνονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα (Valko *et al.* 2006).



Εικόνα 7. Δράση των ενδογενών, ενζυμικών αντιοξειδωτικών.

Η βιταμίνη C (ή ασκορβικό οξύ) και η βιταμίνη E είναι δύο ισχυρά αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν συνεργειακή δράση (Khallouki *et al.* 2003). Η βιταμίνη E είναι λιποδιαλυτή, αποτελείται από τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες και βρίσκεται κυρίως στα φυτικά έλαια και τους ξηρούς καρπούς. Προστατεύει τα κύτταρα του πνεύμονα που είναι εκτεθειμένα στο οξυγόνο, αποτρέπει την οξείδωση της κακής χοληστερίνης LDL, ανάγει μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός και ως επί το πλείστον αποτρέπει την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και των πρωτεϊνών και εμποδίζει την δημιουργία οξειδωτικού στρες. Η βιταμίνη C με τη σειρά της, είναι υδατοδιαλυτή, βρίσκεται κυρίως στα φρούτα και λαχανικά και προστατεύει από την αθηροσκλήρωση, καθώς εμποδίζει την οξείδωση της LDL χοληστερίνης και αυξάνει την ευεργετική χοληστερίνη (HDL). Επίσης, δρα απευθείας με τις ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου και το οξυγόνο απλής κατάστασης, ενώ παράλληλα ανάγει την οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης E, όταν η τελευταία έχει παγιδέψει μια ελεύθερη ρίζα.

1.3 Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες

Σε περίπτωση που δημιουργηθεί οξειδωτικό στρες στον οργανισμό, τότε είναι πιθανόν να παρατηρηθούν και σημαντικές αλλοιώσεις-τροποποιήσεις κυρίως των νουκλεϊκών οξέων (πρόκληση μεταλλάξεων και διαφόρων γενετικών επιπτώσεων),

των κυτταρικών μεμβρανών (διακοπή της διακυτταρικής επικοινωνίας), των μιτοχονδρίων (αποσύζευξη ενεργειακής παραγωγής), των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να προκληθεί αποσύνθεση και θάνατος των κυττάρων και κατ' επέκταση ανάπτυξη πολλών σοβαρών ασθενειών (Pisoschi & Pop 2015).

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



cancercelltreatment.com

Εικόνα 8. Διαταραχές που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες.

1.4 Ευεργετικές Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών

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

1.5 Πολυφαινόλες

1.5.1. Γενικά - Κατηγορίες πολυφαινολών

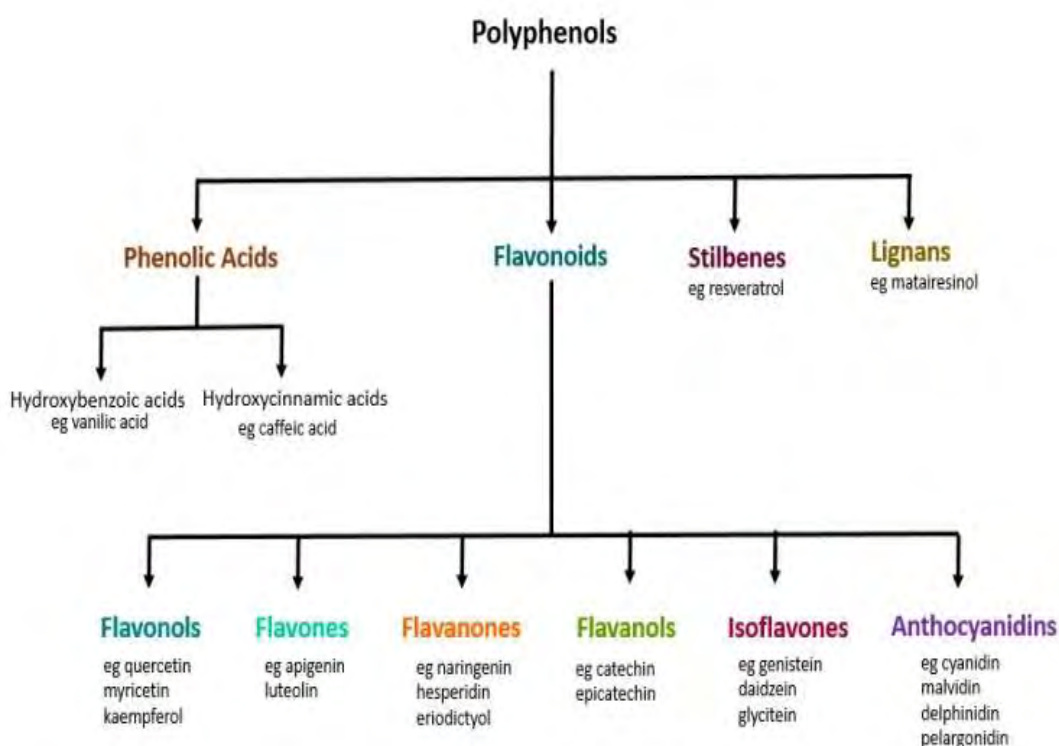
Οι πολυφαινόλες είναι οι κυριότερες βιοδραστικές, φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων, οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο για τις βιολογικές τους ιδιότητες. Παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες και συνιστούν μια από τις πολυπληθέστερες και περισσότερο διαδεδομένες ομάδες φυτικών μεταβολιτών, ενώ αποτελούν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

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Επίσης, οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις όπως οι ταννίνες. Συναντώνται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες είτε

ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμα και 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. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες:

α) Φλαβονόλες β) Φλαβανόλες γ) Φλαβόνες δ) Φλαβανόνες ε) Ισοφλαβόνες
στ) Ανθοκυανιδίνες



<https://drsarahbrewer.com/food/polyphenols-and-bioflavonoids-in-food>

Εικόνα 9. Κατηγορίες πολυφαινολών.

- **Μη Φλαβονοειδή**

Τα μη φλαβονοειδή μπορούμε να τα χωρίσουμε σε 3 υποκατηγορίες:

- *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.
- *Λιγνάνια*. Οι λιγνάνες είναι χημικές ενώσεις που βρίσκονται στα φυτά, και ιδιαίτερα στο λιναρόσπορο. Το λινάρι είναι ένα φυτό με εντυπωσιακά μωβ λουλούδια που είναι ενδημικά στη Μεσόγειο και την Ινδία. Οι λιγνάνες έχουν χρησιμοποιηθεί στα φυτικά φάρμακα για πολλούς αιώνες (Naghma, K., et al., 2007).
- *Στιλβένια*. Με την πιο διάσημη από αυτά την Ρεσβερατρόλη, είναι ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά του Alzheimer, των καρδιαγγειακών νόσων και ιδιαίτερα της αθηρωμάτωσης, του καρκίνου και του σακχαρώδους διαβήτη. Βρίσκονται στα μούρα, στη φλούδα των σταφυλιών ιδιαίτερα των κόκκινων, στο κρασί και σε άλλες φυτικές τροφές.

1.5.2. Ιδιότητες πολυφαινόλων

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

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

των παραδοσιακών χημειοπροστατευτικών παραγόντων (Bode A.M., Dong Z., 2006).

1.5.3. Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία

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

Πιθανολογείται πως παίζει σημαντικό ρόλο σε νευροεκφυλιστικές νόσους συμπεριλαμβανομένων αυτών του Alzheimer, του Parkinson και του Huntington. Το οξειδωτικό στρες πιστεύεται επίσης ότι σχετίζεται με καρδιαγγειακές παθήσεις, καθώς η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) στο αγγειακό ενδοθήλιο είναι προάγγελος της δημιουργίας αθηρωματικών πλακών. Είναι ακόμα γνωστός ο ρόλος του στον τραυματισμό κάποιου ιστού που εμφανίζεται μετά από επαναιμάτωση κατόπιν υποξίας.

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

IMPLICATED DISEASE STATES



Εικόνα 10. Ασθένειες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες.

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

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

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

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

1.6 Σκοπός

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

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Περιγραφή Σκόνης Πολυφαινολικού Εκχυλίσματος

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



Εικόνα 11. Προϊόντα πολυφαινολικού εκχυλίσματος.

Η κατοχυρωμένη με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας διαδικασία παραγωγής δεν χρησιμοποιεί καθόλου οργανικούς διαλύτες ή άλλα επικίνδυνα υλικά αλλά μόνον υπέρ καθαρό πόσιμο νερό και εφαρμόζει μία φιλική προς το περιβάλλον λειτουργία, έχοντας υιοθετήσει την οδηγία της ΕΕ που αφορά στην Αρχή της Ολικής Αξιοποίησης (Principle of Total Discharge).

Το προϊόν παράγεται σε υγρή μορφή η οποία είναι σταθερή και ασφαλής χωρίς

ανάγκη οποιασδήποτε προσθήκης συντηρητικού. Η μετατροπή του σε μορφή σκόνης, γίνεται με χρήση αντιεκρηκτικής τεχνολογίας συσκευής ξήρανσης με ψεκασμό (**SprayDryer**).

Περιγραφή προϊόντος

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

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Χρώμα: σκούρο μαύρο

Ιξώδες: Χαμηλό

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

Οσμή: Χαρακτηριστική του ελαιοκάρπου

Γεύση: Πικρή φυσικό χαρακτηριστικό της πολυφαινολικής του σύνθεσης

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

Χημική σύσταση

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

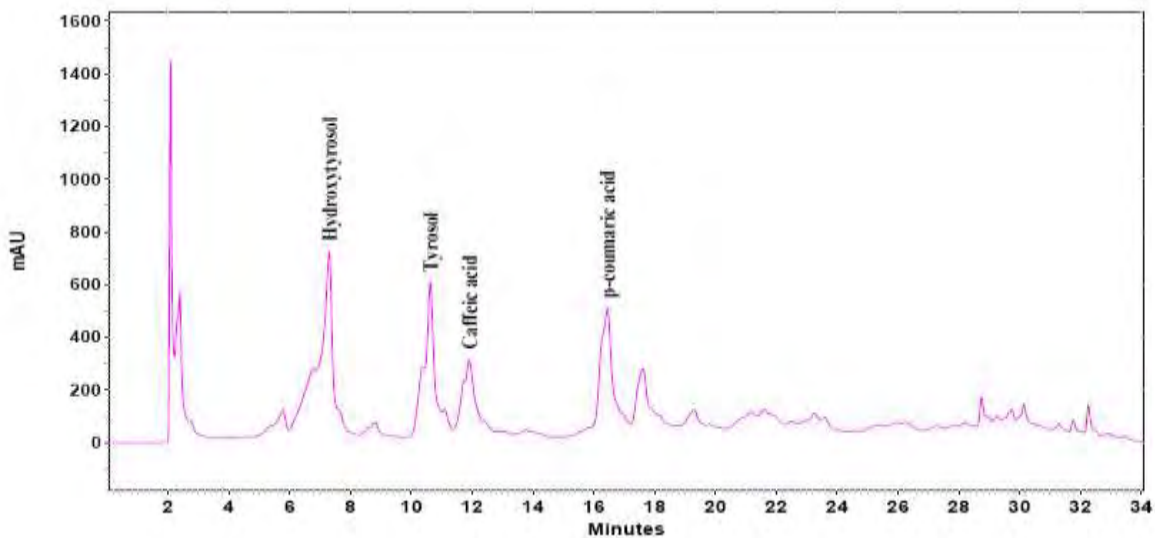
A) Υδροξυτυροσόλη

B) Τυροσόλη

Γ) Καφεϊκό οξύ

Δ) ρ-κουμαρικό οξύ

E) Ανθοκυάνες και κατεχίνες



Εικόνα 12. Χρωματογραφία (HPLC) του Πολυφαινολικού Προφίλ του Προϊόντος.

Στο πείραμά μας χρησιμοποιήθηκαν στο σύνολο 75 κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, υβρίδια F1 SASSO / HUBBARD από την εκτροφή του αγροκτήματος του TEI / Θεσσαλίας. Αυτά χωρίστηκαν σε 3 ομάδες των 25 ατόμων ως εξής:

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις πολυφαινολικής σκόνης στις ομάδες των κοτόπουλων.

Ομάδα	Συγκέντρωση πολυφαινολικής σκόνης	Ποσότητα πολυφαινολικής σκόνης / 10 L H ₂ O
1η	Control	-
2η	20 µg/ml	2gr
3η	50 µg/ml	5gr

2.2 Περιγραφή Σιτηρεσίου - Βάρη

Και οι 3 ομάδες, κάθε μία αποτελούμενη από 25 πτηνά, ελάμβαναν κοινό σιτηρέσιο καθώς και νερό που ανανεωνόταν καθημερινά. Το εμπλουτισμένο με πολυφαινολική σκόνη νερό δόθηκε μόνο στην δεύτερη και στην τρίτη ομάδα σε συγκεντρώσεις 20 και 50 mg/ml αντίστοιχα μετά από την δέκατη πέμπτη (15) ημέρα της ηλικίας τους μέχρι και την εξηκοστή (60) ημέρα. Άρα τα κοτόπουλα ελάμβαναν την σκόνη για συνολικά σαράντα πέντε (45) μέρες. Τα δε κοτόπουλα της ομάδας control έπιναν καθαρό νερό.

Πίνακας 4. Σύσταση σιτηρεσίου.

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

*Μορφή: αλευρώδης

Τα κοτόπουλα και των τριών (3) ομάδων ζυγίζονταν κάθε πέντε (5) μέρες, ώστε να μπορέσει να υπολογιστεί η καμπύλη αύξησης βάρους, καθώς και η απόδοση σε κρέας μετά τη σφαγή των κοτόπουλων. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ζυγίσεων. Κάθε τιμή είναι αθροιστικά το βάρος και των 25 κοτόπουλων που ανήκουν στην αντίστοιχη ομάδα.

Πίνακας 5. Μετρήσεις βάρους κοτόπουλων.

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

Με τον καθαρισμό του σφάγιου βάρους και ζύγισης του καθαρού κρέατος προκύπτει η απόδοση σε κρέας.

Πίνακας 6. Απόδοση σε κρέας μετά τη σφαγή.

Απόδοση σε κρέας %		
CONTROL	20µg/ml	50µg/ml
80,3	85,8	86,5

2.3 Ιστοληψία, μεταφορά στο εργαστήριο και ομογενοποίηση

2.3.1 Ιστοληψία και μεταφορά στο εργαστήριο

Με το πέρας των 60 ημερών, όπου τα κοτόπουλα ελάμβαναν πολυφαινολικό σιτηρέσιο για 45 μέρες, οδηγήθηκαν στο πτηνοσφαγείο. Μετά την θανάτωση τους, αποπτιλώθηκαν, ανοίχθηκαν και με κοινό χειρουργικό νυστέρι πραγματοποιήθηκε η λήψη του ηπατικού και καρδιακού ιστού. Συλλέχθηκαν τεμάχια 12 ηπατικών και 12 καρδιακών ιστών από 12 διαφορετικά πτηνά για κάθε μία από τις τρεις ομάδες. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικές κασετίνες και ύστερα σε υγρό άζωτο. Έτσι μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -80°C.

2.3.2 Ομογενοποίηση

Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν (1 μέρος ιστού σε 2 μέρη PBS), 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). Ακολούθως, το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε. (15.000 g - 5 min - 4°C). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε σε eppendorfστους -80°C.

2.4. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες Στους Ιστούς

Γενικά

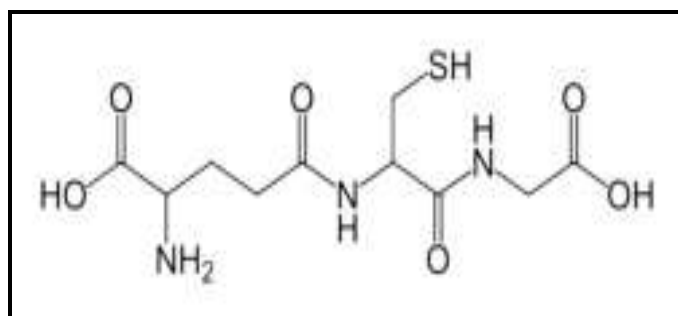
Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστικότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ομογενοποιημένου ιστού. Για την αξιολόγηση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

Μέθοδοι

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

2.4.1 Μέτρηση Γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστέινογλυκίνη) 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 et al. 2003).

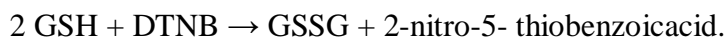


Εικόνα 13. Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης.

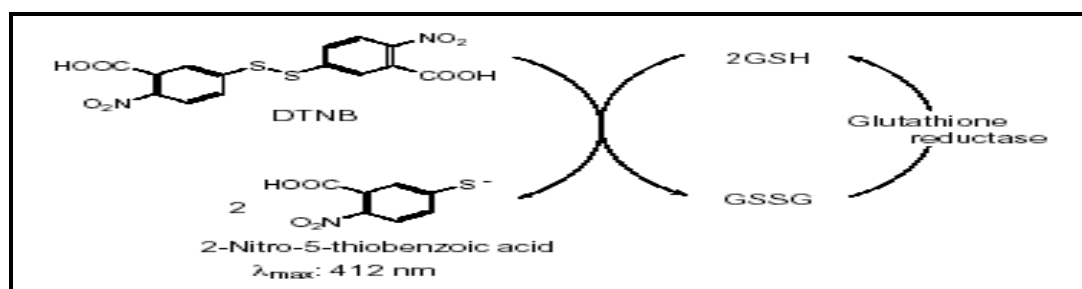
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. 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). Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm. (Reddy, et.al. 2004).



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



Εικόνα 14. Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης.

Αντιδραστήρια

Phosphatebuffer 67 mM (pH 8). MB (KH₂PO₄): 136 MB (Na₂HPO₄): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphatebuffer φτιάχνουμε 25 mLKH₂PO₄ (67 mM) και 500 mLNa₂HPO₄ (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 ή 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. ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, διένυδροτρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB: 294.10. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Πειραματικό πρωτόκολλο

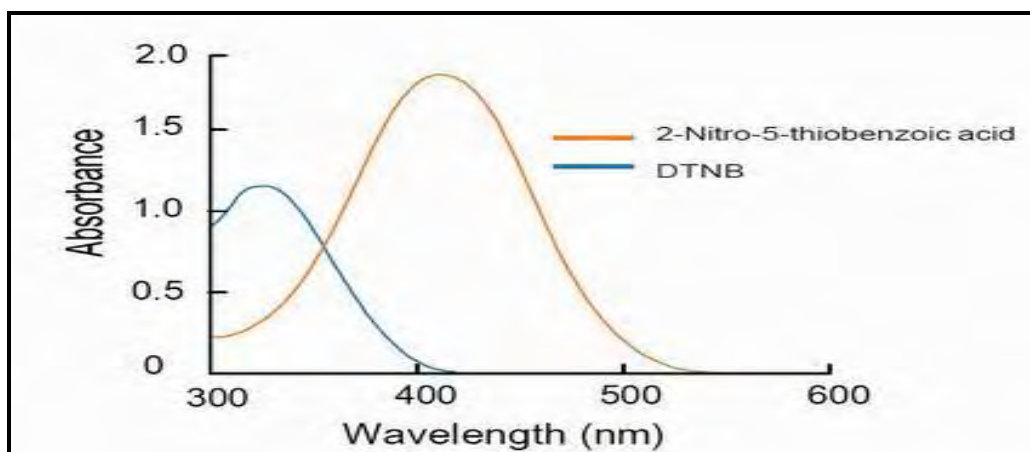
100μL ιστού προστέθηκαν σε 100μL TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 5 min στους 5°C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο erpendorf. 20 μL ιστού, αραιωμένου 1/2 αναμίχθηκαν με 660 μL ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 8.0) και 330μL DTNB.

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια erpendorf:

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

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

Αναδεύουμε τα erpendorfs και τα επιάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm. (Roland F. Beers, Jr. and Irwin W. Sizer. 1952).



Εικόνα 15. Φάσμα απορρόφησης του 2-Nitro-5-thiobenzoic οξέος. (Dojindo Molecular Technologies).

Υπολογισμοί

Δραστηκότητα GSH (μmol/mg total prot.) = (Abs δείγματος - Δabstυφλού/13.6) × 2 × 3 (λόγω αραιώσεων) × 50.5 / Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL).

Όπου το 50.5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010μL) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (20μL) (1010/20=50.5), πολλαπλασιάζουμε με 2 (αραίωση που έγινε από το TCA 5%) και πολλαπλασιάζουμε με 3, 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, όπου ο άξονας y = Abs στα 595 nm και ο x = Συγκέντρωση (μg/ml). Κατόπιν, με το Bradfordtest, λαμβάνονταν η τιμή της απορρόφησης και υπολογίζονταν αντίστοιχα η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.

2.4.2 Μέτρηση ρυθμού διάσπασης H₂O₂

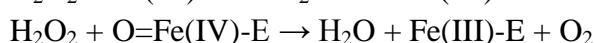
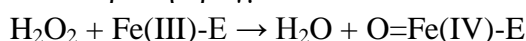
Αρχή της μεθόδου

Η αποσύνθεση του H₂O₂ σε H₂O και O₂ οφείλεται εκτός της καταλάσης (Halliwell et al., 2000) και σε ένζυμα όπως: η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και οι υπεροξειδιοξίνες.

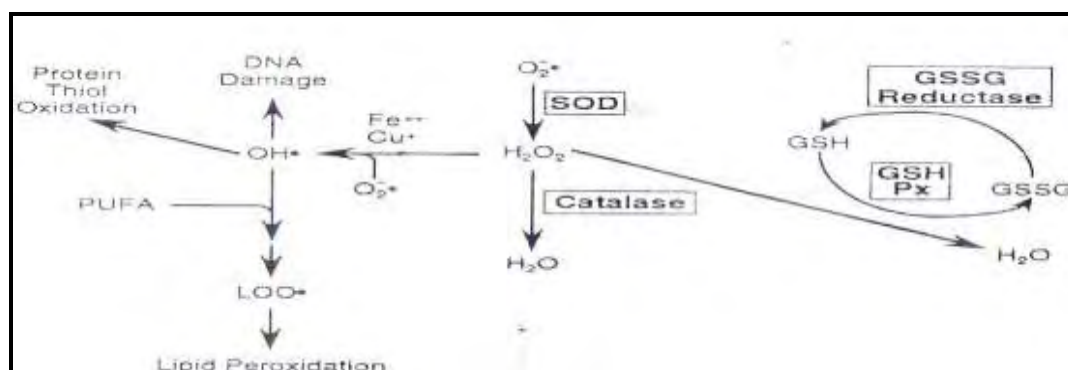
Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι

τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Για να διαχειριστεί αυτό το πρόβλημα, η ενζυμική καταλάση καταλύει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου, σε αβλαβή οξυγόνο και νερό. (ChelikaniP, et. al., 2004). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τεραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. (BoonEM, et. al. 2007). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:

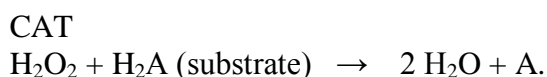


(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεδεμένη στο ένζυμο).



Εικόνα 16. 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 et al., 1984).

Αντιδραστήρια

Phosphatebuffer 67mM (pH 7.4) MB (KH₂PO₄): 136 και MB (Na₂HPO₄): 178.
Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphatebuffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL KH₂PO₄ (67 mM) και 400 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂).

Το διάλυμα H₂O₂ είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Πραγματοποιούμε πάλι αραιώση αναμειγνύοντας 1 μέρος ομογενοποιημένου ιστού με 2 μέρη PBS.

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

Πίνακας 8. Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση του ρυθμού διάσπασης H₂O₂.

	Δείγμα
Phosphatebuffer 67 mM, pH 7.4	2955 μL
Ομογενοποιημένος Ιστός (από τον εκ νέου αραιωμένο)	40 μL

Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση. Κατόπιν, μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV). Τέλος, προσθέτουμε 5 μL 30% H₂O₂ στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας πάραφιλιμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

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

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

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

U = μmol/min. $\Delta Abs_{\text{blank}}$ είναι πάντοτε μηδέν και έτσι δεν απαιτείται μέτρηση του τυφλού.

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, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

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

Αρχή της μεθόδου

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

Αντιδραστήρια

Phosphatebuffer 10 mM (pH 7.4). MB (KH₂PO₄): 136 και MB (Na₂HPO₄): 178. Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphatebuffer φτιάχνουμε 100 mL KH₂PO₄ (10 mM) και 400 mL Na₂HPO₄ (10 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0.136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na₂HPO₄ 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 μ L 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.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Πραγματοποιούμε πάλι αραιώση αναμιγνύοντας 1 μέρος ομογενοποιημένου ιστού με 4 μέρη PBS.

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

Πίνακας 9. Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC.

	Blank	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μL	460 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL
Ιστός Ομογενοποιημένος (από τον εκ νέου αραιωμένο)	-	40 μL

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

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

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

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

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

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

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

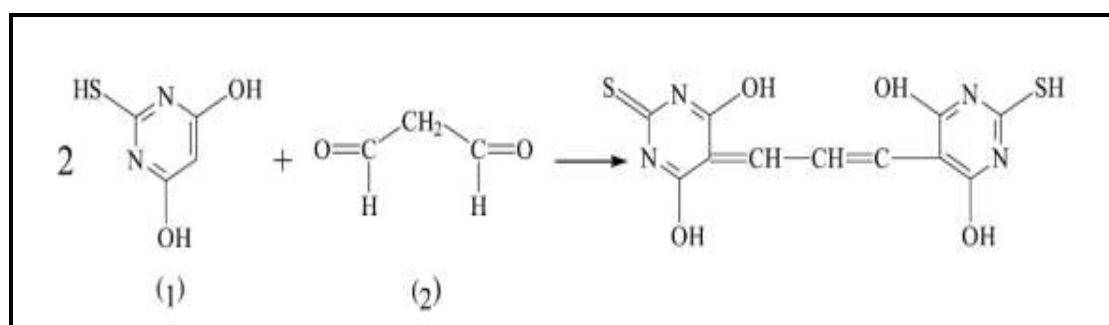
ε) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L σε mL.

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



Εικόνα 17. Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), Που Οδηγεί Στην Παραγωγή Του Μορίου TBA-MDA.

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

Αντιδραστήρια

Tris-HCl 200 mM (pH 7.4). MB (Tris): 121.14. MB (HCl): 36.46 (stock 37%) [10.1 N]. Για να παρασκευάσουμε \approx 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 Na_2SO_4 (2 M) – TBA (55 mM). MB (TBA): 144.1 και MB (Na_2SO_4): 142.04. Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος, ζυγίζουμε 2.84 g Na_2SO_4 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 φτιάχεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

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

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

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL ομογενοποιημένου ιστού (για τα δείγματα) ή αποσταγμένο νερό (για το τυφλό). Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1 mL 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 11.200 g

(10.000 rpm) στους 25 °C για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 x 31, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3.100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) (3.100 / 100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156.000 (mol/L) διαιρούμενου με 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L to μmol/L.

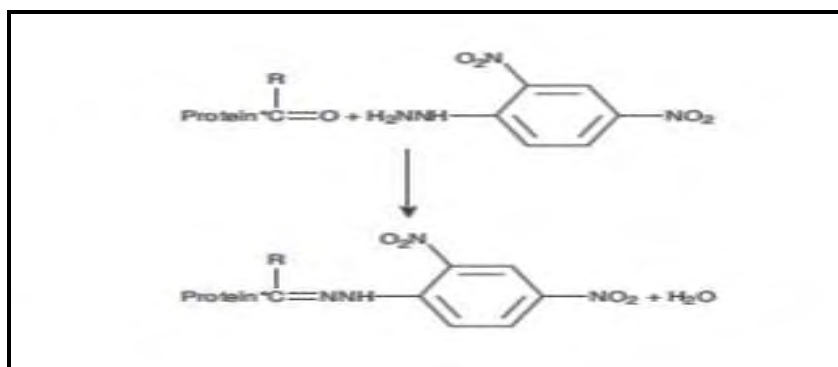
* Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

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 οξειδωσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεύδες 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 οξειδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

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



Εικόνα 18. Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δίνιτριφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου.

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 DNAπολυμεράσες, 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-δίνιτριφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου. Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο (Patsoukis et. al., 2004).

Αντιδραστήρια

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

Για να παρασκευάσουμε 100 mL διαλύματος 2.5 NHCl, προσθέτουμε αργά 24.6 mL του 37% HCl (ίσο με 10.1 NHCl) σε ≈ 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με αποσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5 NHCl 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 NHCl. 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 2NHCl), διαλύουμε 30 g ουρίας in ≈ 70 mL αποσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με αποσταγμένο νερό.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Πραγματοποιούμε εκ νέου αραίωση του ιστού 1:2 με 100 μl ιστού και 200 μl PBS, αναδεύουμε και φυλάσσουμε σε eppendorf.

Σε 50 μl ιστού προσθέτουμε 50 μl 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 ιστού. Το TCA (τριχλωροοξικό οξύ) χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμνιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.

Επιάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

Κατόπιν, προσθέτουμε στο ίζημα (πελέτα) 0.5 mL του 14 mM DNP (διαλυμένο σε 2.5 NHCL) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 NHCL για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επιάζουμε 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 αιθυλεστέρα (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 DNP 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 επιάζουμε στους 37 °C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους. Φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 3 λεπτά στους 4 °C. Τέλος, μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.

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

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg total prot.)= A δείγματος-Ατυφλού/ $0.022 \times 1000/50 \times 3 \times 2 \times 3$ /Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL). Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPΗ είναι $22 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$. Το $1000/50$ είναι ο συντελεστής αραιώσης ($1000 \mu\text{L}$ στην κυψελίδα / $50 \mu\text{L}$ δείγματος). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης με 2 επειδή το δείγμα αραιώνεται 2 φορές κατά τη μέτρηση, διότι προσθέτουμε TCA 20% αρχικά και μετά ξανά με 3 λόγω της αραιώσης στην αρχή της μεθόδου.

2.4.6 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

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

2.5 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση υπολογιζόταν αρχικά οι παράμετροι της περιγραφικής στατιστικής η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard error).

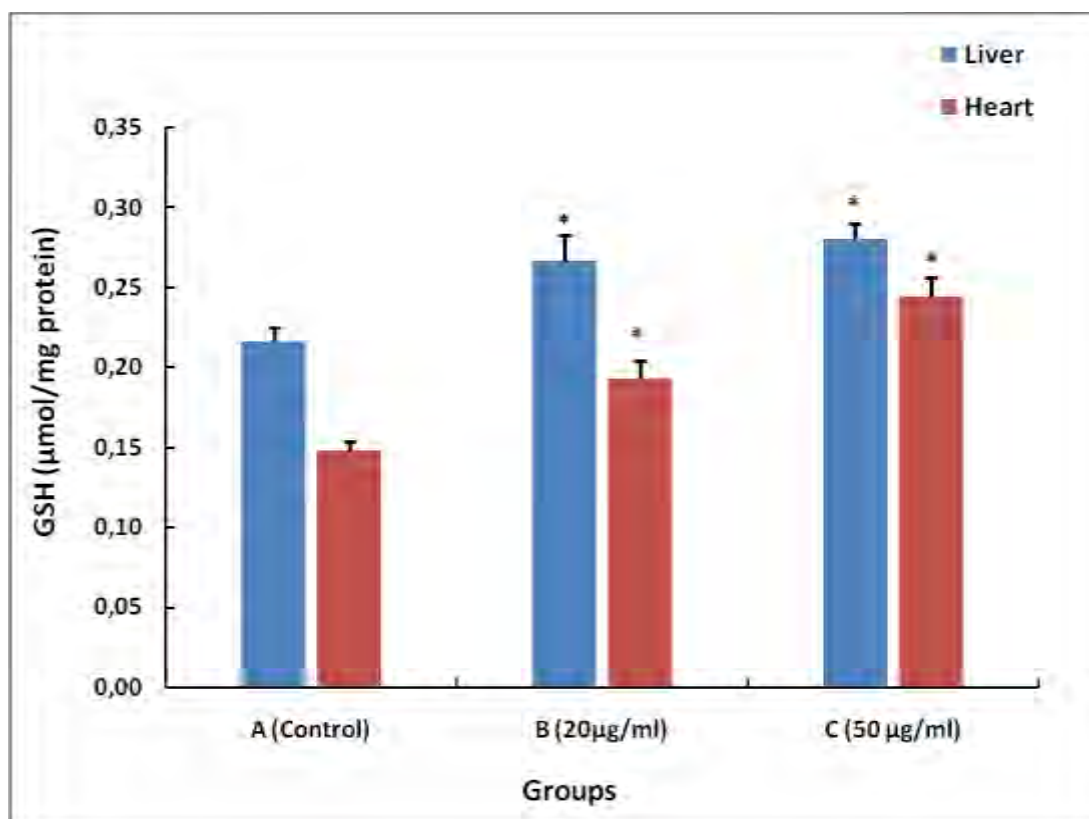
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω των τεστ των Tukey και Dunnett. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$.

Οι εξαρτημένες μεταβλητές ήταν:

- Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα TAC.
- Η μεταβολή της δραστηριότητας της CAT.
- Η μεταβολή της συγκέντρωσης της GSH.
- Η μεταβολή του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS.
- Η μεταβολή του δείκτη πρωτεϊνικής οξειδωσης CARBONYLS.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 GSH



Γράφημα 1. GSH στον Ηπατικό και Καρδιακό ιστό των Κοτόπουλων.

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

$p < 0,05$ μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων

Πίνακας 10. Αποτελέσματα μετρήσεων της GSH ($\mu\text{mol/mg protein}$)

GSH ΗΠΑΤΙΚΟΣ			GSH ΚΑΡΔΙΑΚΟΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
A (Control)	0,216	0,009	A	0,148	0,006
B (20 μg/ml)	0,267	0,016	B	0,193	0,011
C (50 μg/ml)	0,280	0,010	C	0,244	0,012

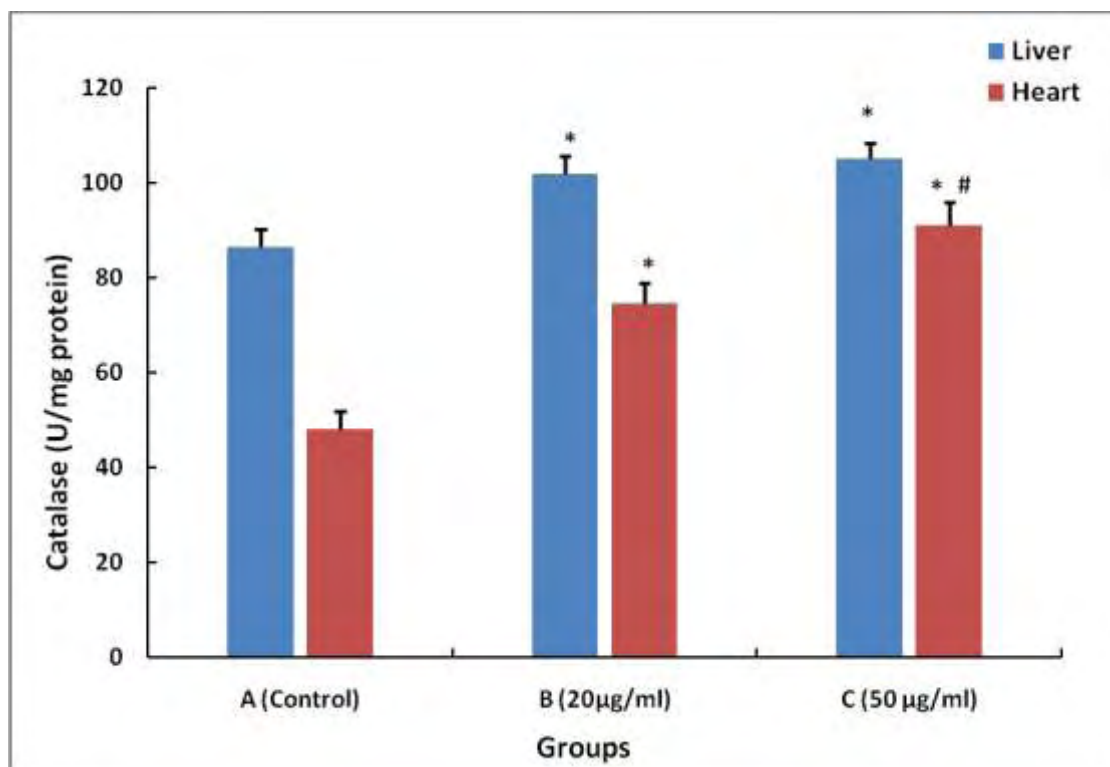
	Ηπατικός 45 d. treatment
B	23,6
C	29,6

Πίνακας 11. Αύξηση % σε σχέση με Control.

	Καρδιακός 45 d. treatment
B	30,4
C	64,7

Πίνακας 12. Αύξηση % σε σχέση με Control.

3.2 Ρυθμός Διάσπασης H₂O₂



Γράφημα 2. Ρυθμός Διάσπασης H₂O₂ στον Ηπατικό και Καρδιακό ιστό των Κοτόπουλων.

* p < 0,05 σε σύγκριση με το Control

p < 0,05 μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων

Πίνακας 13. Αποτελέσματα μετρήσεων του Ρυθμού Διάσπασης H₂O₂ (U/mg protein).

ΗΠΑΤΙΚΟΣ			ΚΑΡΔΙΑΚΟΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
A (Control)	86,4	3,87	A	48,1	3,92
B (20µg/ml)	101,9	3,73	B	74,7	4,35
C (50 µg/ml)	105,2	3,13	C	91,1	4,78

	Ηπατικός 45 d. treatment
B	17,93
C	21,76

Πίνακας 14. Αύξηση % σε σχέση με Control.

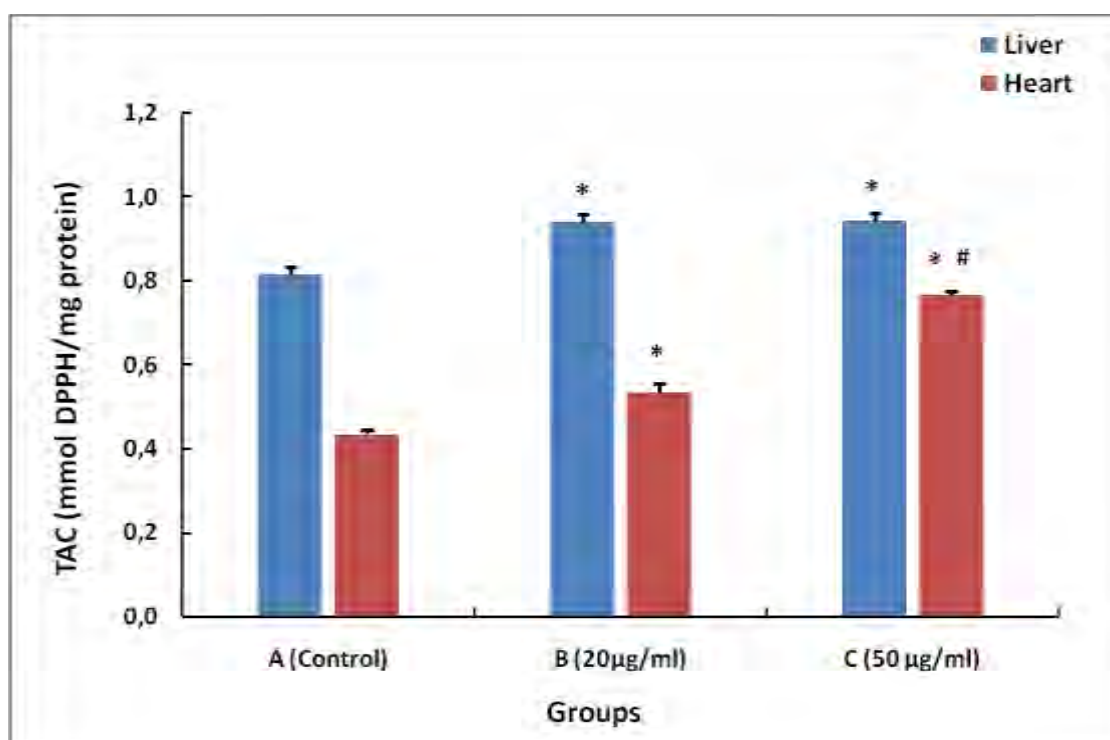
	Καρδιακός 45 d. treatment
B	55,30
C	89,40

Πίνακας 15. Αύξηση % σε σχέση με Control.

	Καρδιακός 45 d. treatment
C	21,95

Πίνακας 16. Αύξηση % της ομάδας C, σε σχέση με Βομάδα.

3.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC)



Γράφημα 3. TAC στον Ηπατικό και Καρδιακό ιστό των Κοτόπουλων.

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

$p < 0,05$ μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων

Πίνακας 17. Αποτελέσματα μετρήσεων της TAC (mmol DPPH/mg protein).

TAC ΗΠΑΤΙΚΟΣ			TAC ΚΑΡΔΙΑΚΟΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
A (Control)	0,816	0,016	A	0,435	0,011
B (20 µg/ml)	0,941	0,017	B	0,535	0,019
C (50 µg/ml)	0,945	0,018	C	0,766	0,010

	Ηπατικός 45 d. treatment
B	15,32
C	15,80

Πίνακας 18. Αύξηση %
σε σχέση με Control.

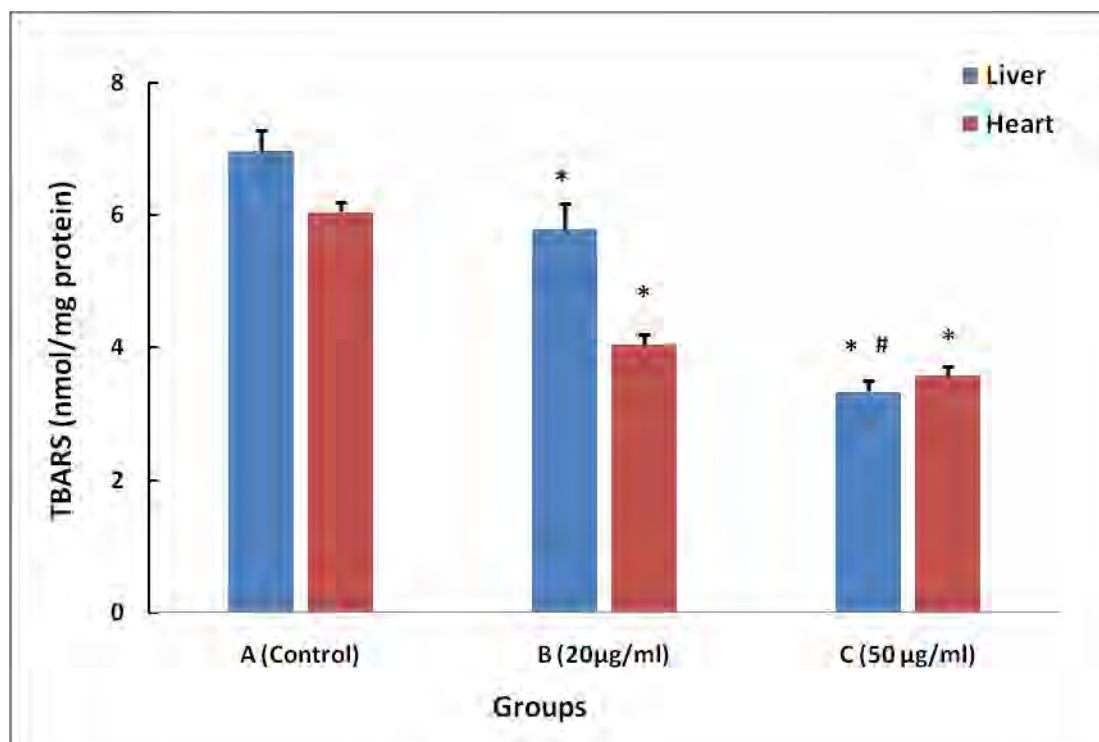
	Καρδιακός 45 d. treatment
B	22,98
C	76,09

Πίνακας 19. Αύξηση %
σε σχέση με Control.

	Καρδιακός 45 d. treatment
C	43,18

Πίνακας 20. Αύξηση % της ομάδας
C, σε σχέση με B ομάδα.

3.4 TBARS



Γράφημα 4. TBARS στον Ηπατικό και Καρδιακό ιστό των Κοτόπουλων.

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

$p < 0,05$ μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων

Πίνακας 21. Αποτελέσματα μετρήσεων των TBARS (nmol/mg protein).

TBARS ΗΠΑΤΙΚΟΣ			TBARS ΚΑΡΔΙΑΚΟΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
A (Control)	6,968	0,301	A	6,053	0,141
B (20 µg/ml)	5,786	0,395	B	4,047	0,148
C (50 µg/ml)	3,340	0,153	C	3,587	0,119

	Ηπατικός 45 d. treatment
B	16,96
C	52,07

Πίνακας 22. Μείωση %
σε σχέση με Control.

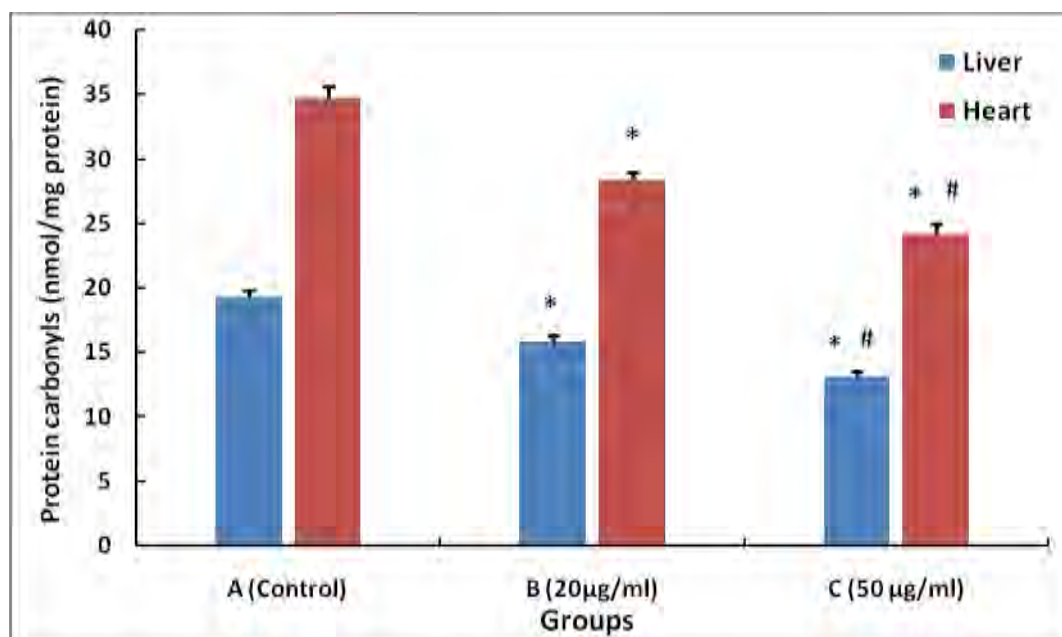
	Καρδιακός 45 d. treatment
B	33,14
C	40,74

Πίνακας 23. Μείωση %
σε σχέση με Control.

	Ηπατικός 45 d. treatment
C	42,27

Πίνακας 24. Μείωση % της
ομάδας C. σε σχέση με B ομάδα.

3.5 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια



Γράφημα 5. Καρβονύλια στον Ηπατικό και Καρδιακό ιστό των Κοτόπουλων.

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

$p < 0,05$ μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων

Πίνακας 25. Αποτελέσματα μετρήσεων των Carb. (nmol /mg protein).

TBARS ΗΠΑΤΙΚΟΣ			TBARS ΚΑΡΔΙΑΚΟΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
A (Control)	19,35	0,423	A	34,75	0,833
B (20µg/ml)	15,83	0,517	B	28,34	0,578
C (50 µg/ml)	13,13	0,436	C	24,20	0,774

Ηπατικός 45 d. treatment	
B	18,19
C	32,14

Πίνακας 26. Μείωση % σε σχέση με Control.

Καρδιακός 45 d. treatment	
B	18,45
C	30,36

Πίνακας 27. Μείωση % σε σχέση με Control.

Ηπατικός 45 d. treatment	
C	17,06

Πίνακας 28. Μείωση % της ομάδας C, σε σχέση με B ομάδα.

Καρδιακός 45 d. treatment	
C	14,61

Πίνακας 29. Μείωση % της ομάδας C, σε σχέση με B ομάδα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής ύστερα από προσθήκη στο νερό τους της πολυφαινολικής σκόνης, που παράγεται από νανοενθυλάκωση με χρήση μαλτοδεξτρίνης, από το υγρό (υδατικό κλάσμα) που προκύπτει από την διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου από την ελιά. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες: μία ομάδα control και δύο που λάμβαναν την σκόνη πολυφαινόλης σε συγκεντρώσεις 20 και 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ αντίστοιχα. Το ακολουθούμενο σιτηρέσιο ήταν το ίδιο για όλες τις ομάδες. Συνολικά πραγματοποιήθηκε ιστοληψία από τριάντα έξι (36) κοτόπουλα ήτοι δώδεκα (12) κοτόπουλα σε κάθε μία από τις τρεις (3) ομάδες.

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες οι οποίοι ελέγχθηκαν ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ο ρυθμός διάσπασης του H_2O_2 , η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – total antioxidant capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric acid reactive substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Έτσι, δόθηκε η ευκαιρία για εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική κατάσταση των ηπατικών και καρδιακών ιστών κοτόπουλων, μέσω της σύγκρισης των τιμών των προαναφερθέντων δεικτών είτε μεταξύ των πτηνών της ομάδας ελέγχου (κοτόπουλα που δεν λάμβαναν την πολυφαινολική σκόνη) και των πολυφαινολικών ομάδων (κοτόπουλα που λάμβαναν πολυφαινολική σκόνη) είτε μεταξύ των πτηνών των πολυφαινολικών ομάδων.

Οι δείκτες αυτοί μελετήθηκαν, διότι αποτελούν βασικούς μηχανισμούς ένδειξης του οξειδωτικού στρες στους έμβιους οργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, η γλουταθειόνη είναι το κυριότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό που παράγεται από τα κύτταρα, συμμετέχοντας απευθείας στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και των ενεργών μορφών του οξυγόνου, ενώ συντηρεί και προσλαμβάνόμενα μέσω της διατροφής αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E στις ανηγμένες (ενεργές) μορφές τους (Scholz et al., 1964) (Hughes et al., 1989), και ρυθμίζει τον κύκλο του μονοξειδίου του αζώτου που είναι κρίσιμος για τη ζωή (Clementi et al., 1999). Επίσης, επιδρά σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις όπως η σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, η πρωτεϊνοσύνθεση, η σύνθεση προσταγλανδίνης, η

μεταφορά αμινοξέων και η ενεργοποίηση ενζύμων. 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 ενζυμικές συζευκτικές αντιδράσεις με κάποιες ουσίες. Αξιολογώντας, λοιπόν, τα αποτελέσματα του ελέγχου της ανηγμένης γλουταθειόνης, παρατηρείται ότι και στον καρδιακό και στον ηπατικό ιστό, η προσθήκη πολυφαινολικής σκόνης στο νερό των πτηνών έχει αυξήσει στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της σε σχέση με την ομάδα control. Συγκεκριμένα σε σύγκριση με το control, στον ηπατικό ιστό τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν κατά 23,6% στην ομάδα των 20 μg/ml, ενώ στην ομάδα των 50 μg/ml αυξήθηκαν κατά 29,6%. Στον καρδιακό ιστό σε σύγκριση με το control, τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν κατά 30,4% στην ομάδα των 20 μg/ml, ενώ στην ομάδα των 50 μg/ml αυξήθηκαν κατά 64,7%. Αυτό υποδηλώνει ότι ίσως οι φαινολικές ενώσεις της σκόνης παραγόμενης απόκατάλοιπα ελαιοτριβείου επιδρούν στη αύξηση των κύριων ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της GSH. Αυτά τα ένζυμα είναι η λιγάση της γ- γλουταμινοκυστεΐνης (GCL) και η GSH συνθετάση (Aquilano et al. 2014). Η ρύθμιση της έκφρασης των ενζύμων αυτών διαμεσολαβείται μέσω του στοιχείου απόκρισης σε αντιοξειδωτικά (ARE), μια cis αλληλουχία ενισχυτή που ρυθμίζει την μεταγραφή διαφόρων αντιοξειδωτικών γονιδίων (Kumar et al. 2014). Σε παρόμοιες εργασίες που έχουν διεξαχθεί σε κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, η χορήγηση πολυφαινολών από απόβλητα ελαιοτριβείου μέσω της τροφής, είχε ως αποτέλεσμα, η GSH να παρουσιάσει αύξηση στους ιστούς των πτηνών (Gerasopoulos et. al. 2015). Εξαιτίας του διαφορετικού αριθμού ημερών χορήγησης των πολυφαινολών δεν μπορεί να γίνει ξεκάθαρη σύγκριση με την παρούσα εργασία για το ποιά είναι η καλύτερη μέθοδος χορήγησης τους (με την τροφή ή το νερό). Ωστόσο η παροχή αυτών μέσω της τροφής αυξάνει κατά πολύ την TAC και μειώνει τα TBARS σε σχέση με την χορήγηση δια του ύδατος όπου εκεί παρατηρείται μεγαλύτερη αύξηση της GSH αλλά και μείωση των καρβονυλίων.

Όσον αφορά τον ρυθμό αποσύνθεσης του H_2O_2 σε H_2O και O_2 οφείλεται εκτός της καταλάσης (Halliwell et al., 2000) και σε ένζυμα όπως: η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και οι υπεροξειδιοξίνες. Ο ρυθμός αποσύνθεσης του H_2O_2 ,

είναι σημαντικά υψηλότερος στο ήπαρ αφού πρόκειται για ζωτικό όργανο του συστήματος της πέψης, που διασπά τα τοξικά υπεροξειδία του υδρογόνου, παράγοντας νερό και οξυγόνο. Στον καρδιακό ιστό τα ένζυμα διάσπασης του υπεροξειδίου εξακολουθούν να διατηρούν υψηλή ενεργότητα. Από την αξιολόγηση των μετρήσεων για την διάσπαση του H_2O_2 προκύπτουν τα εξής. Παρατηρείται ότι στον καρδιακό και στον ηπατικό ιστό, η προσθήκη πολυφαινολικής σκόνης στο νερό έχει αυξήσει στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της σε σχέση με την ομάδα control, αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση υπάρχει και μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων στην καρδιά. Συγκεκριμένα σε σύγκριση με το control, στον ηπατικό ιστό τα επίπεδα της διάσπασης υπεροξειδίου αυξήθηκαν κατά 17,93 % στην ομάδα των 20 $\mu\text{g/ml}$, ενώ στην ομάδα των 50 $\mu\text{g/ml}$ αυξήθηκαν κατά 21,76 %. Στον καρδιακό ιστό σε σύγκριση με το control, τα επίπεδα της διάσπασης αυξήθηκαν κατά 55,30 % στην ομάδα των 20 $\mu\text{g/ml}$, ενώ στην ομάδα των 50 $\mu\text{g/ml}$ αυξήθηκαν κατά 89,40 %. Η αύξηση της διάσπασης μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων κυμάνθηκε στο 21,95 %. Άλλες μελέτες έχουν επίσης αναφέρει πως τα ΥΑΕ, αυξάνουν την διάσπαση του H_2O_2 και άρα και την δραστηριότητα της καταλάσης στο πλάσμα, το ήπαρ και στους νεφρούς αρουραίων (*Hamden et al., 2009*). Το υπεροξειδίο του υδρογόνου αποτελεί μία ROS και προκαλεί βλάβες στο κύτταρο σε μικρές συγκεντρώσεις (10 μM). Η αύξηση του ρυθμού αποικοδόμησης του σημαίνει και μείωση της διαστηριότητάς του άρα και των προκαλούμενων βλαβών στον κυτταρικό μηχανισμό. Ένα μόριο px καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο, οπότε έχουμε ταχύτατη καταστροφή του

Όσον αφορά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), αυτή αναφέρεται στα αναγωγικά στοιχεία και στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Όπως είναι γνωστό, κάθε συστατικό έχει διαφορετική αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα για την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – Total Antioxidant Capacity) στα κοτόπουλα δείχνουν πως, από την σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες, ο συγκεκριμένος δείκτης και στους δύο ιστούς εμφάνισε στατιστικά σημαντική μεταβολή. Συγκεκριμένα σε σύγκριση με το control, στον

ηπατικό ιστό τα επίπεδα της TAC αυξήθηκαν κατά 15,32 % στην ομάδα των 20μg/ml, ενώ στην ομάδα των 50 μg/ml αυξήθηκαν κατά 15,80 %. Στον καρδιακό ιστό σε σύγκριση με το control, τα επίπεδα TAC αυξήθηκαν κατά 22,98 % % στην ομάδα των 20 μg/ml, ενώ στην ομάδα των 50 μg/ml αυξήθηκαν κατά 76,06 %. Στατιστικά σημαντική ήταν και η αύξηση κατά 43,18% ανάμεσα στις πολυφαινολικές ομάδες του καρδιακού ιστού.

Η υπεροξειδωση 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-ισοπροστάνια) προϊόντων της υπεροξειδωσης. Συγκεκριμένα στο πείραμα μας από τη σύγκριση της ομάδας control με τις ομάδες των πτηνών που έλαβαν πολυφαινολική σκόνη στο νερό τους, προκύπτει στατιστικά σημαντική μείωση των TBARS και στους δύο ιστούς, αλλά και στατιστικά σημαντική μείωση τους στον ηπατικό ιστό μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων. Σε σύγκριση με τα control στον ηπατικό ιστό τα οξειδωμένα λιπίδια μειώθηκαν κατά 16,96 % στην ομάδα των 20 μg/ml και 52,07 στην ομάδα των 50 μg/ml. Στον καρδιακό ιστό οι αντίστοιχες μειώσεις ήταν 33,14 % και 40,74 %. Η μείωση των TBARS μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων στον ηπατικό ιστό, κυμάνθηκε στο 42,27%. Η μείωση των TBARS στους προαναφερθέντες ιστούς ίσως οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα της GSH η οποία παρείχε προστασία στους συγκεκριμένους ιστούς από την οξείδωση των λιπιδίων. Σε παρόμοια μελέτη, στην οποία έγινε χορήγηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (YAE) σε χοιρίδια, μειώθηκε η υπεροξειδωση των λιπιδίων σε όλους τους ιστούς και το αίμα (Gerasopoulos et al. 2015), γεγονός που επιβεβαιώνει τις ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινολών που βρίσκονται στα YAE. Η μείωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων εκτός από τις θετικές επιδράσεις για την υγεία του ζώου, θα μπορούσε επίσης να βελτιώσει την ποιότητα του κρέατος, 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 (Nama and Ahn, 2003). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι μερικές από τις σημαντικότερες πολυφαινόλες που βρέθηκαν στα απόβλητα των ελαιοτριβείων (π.χ.

υδροξυτυροσώλη, τυροσώλη και καφεϊκό οξύ) είναι αποτελεσματικές στο να αναστείλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων (*Cardinali et al., 2012; Rubio-Senent et al., 2015*).

Με τη μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων προέκυψε και στους δυο ιστούς, ότι από την σύγκριση των τριών ομάδων υπήρξε μείωση των καρβονυλίων στατιστική σημαντική τόσο ανάμεσα στις πολυφαινολικές ομάδες με την ομάδα control, όσο και στις πολυφαινολικές μεταξύ τους. Στον ηπατικό ιστό η μείωση της ομάδας των 20 µg/ml σε σχέση με την ομάδα control ήταν 18,19 %, ενώ αυτή των 50 ήταν 32,14 %. Στον καρδιακό αντίστοιχα οι τιμές ήταν 18,45 % και 30,36 %. Μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων, στον ηπατικό ιστό η μείωση των καρβονυλίων ήταν 17,06 %, ενώ στον καρδιακό ήταν 14,61 %. Δηλαδή και στους δύο ιστούς παρατηρούμε ότι η επίδραση της σκόνης είναι ευεργετική καθώς μειώνεται η οξείδωση των πρωτεϊνών. Σε παρόμοια μελέτη, στην οποία έγινε χορήγηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (YAE) σε χοιρίδια αλλά και σε κοτόπουλα, επίσης μειώθηκε η υπεροξειδωση των πρωτεϊνών στο ήπαρ και στην καρδιά (*Gerasopoulos et al. 2015*), γεγονός που επιβεβαιώνει τις ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινολών που βρίσκονται στα YAE. Η μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μας υποδηλώνει το ποσοστό οξείδωσης που έχουν υποστεί οι πρωτεΐνες των ιστών εξαιτίας της δράσης των ελεύθερων ριζών. Ουσιαστικά η οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών προκύπτει από την τροποποίηση ενός μεγάλου φάσματος αμινοξέων, όπως η προλίνη, η αργινίνη, η θρεονίνη και η λυσίνη. Είναι γνωστό ότι οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν μια μη αναστρέψιμη μορφή τροποποίησης πρωτεϊνών που έχει αποδειχθεί πως είναι πολύ σταθερές, σε αντίθεση με τα προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων που εξουδετερώνονται μέσα σε λίγα λεπτά. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα προϊόντα που σχηματίζονται με την οξείδωση των πρωτεϊνών (φορμαλδεΰδη, ακεταλδεΰδη, ακετόνη) απομακρύνονται γρήγορα και είναι δύσκολο να προσδιοριστούν. Γενικώς, μελέτες έχουν δείξει ότι η οξείδωση των πρωτεϊνών από τις ROS συντελεί στην απώλεια των απαραίτητων αμινοξέων (π.χ. τρυπτοφάνη) και επηρεάζει την ικανότητα συγκράτησης του νερού από τις πρωτεΐνες του κρέατος, το χρώμα και την υφή των επεξεργασμένων προϊόντων του κρέατος, γεγονός που οδηγεί στην μείωση της θρεπτικής τους αξίας (*Villaverde et al., 2014; Lund et al., 2011*).

Από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η εισαγωγή πολυφαινολικής σκόνης στο νερό κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής βοηθάει σημαντικά στη βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών που ελέγχθηκαν. Αυτή η ευεργετική επίδραση των εκχυλισμάτων από εκχύλισμα απόβλητων ελαιοτριβείου βασίζεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, ουριδίνη, γενιστεΐνη, γενιστίνη, τυροσόλη, γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ, συριγικό οξύ, π-μεθόξικουμαρικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, τρυγικό οξύ). Ως λογικό επακόλουθο, ενισχύεται η δράση όσον αφορά την αντιμετώπιση ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες στα παραγωγικά ζώα και γενικότερα στην βελτιστοποίηση της ευζωίας τους. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις των ζώων εκτροφής, θεωρείται ότι σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (*Lykkesfeldt and Svendsen, 2007*). Έτσι, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, δείχνουν για την πρώτη φορά ότι η προσθήκη πολυφαινολικής σκόνης στο πόσιμο νερό, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, με τη μείωση της οξειδωτικής βλάβης των βιολογικών μορίων (δηλ. οξείδωση πρωτεϊνών, υπεροξείδωση λιπιδίων) και την αύξηση αντιοξειδωτικών μηχανισμών (π.χ. δράσης της καταλάσης και GSH επίπεδα TAC).

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

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, pp.121–126.
- 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
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 7915–22.
- Apostolou, A. et al., 2013. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 61, pp.60–68
- Aquilano, K., Baldelli, S. & Ciriolo, M.R., 2014. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in pharmacology*, 5, p.196.
- Arshad, M.S. et al., 2013. Wheat germ oil enrichment in broiler feed with alpha-lipoic acid to enhance the antioxidant potential and lipid stability of meat. *Lipids in health and disease*, 12, p.164
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Laughton, M. J., Quinlan, G. J., & Gutteridge, J. M. (1989). The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *The Biochemical Journal*, 258(2), 617–20.
- Battin, E.E. & Brumaghim, J.L., 2009. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell biochemistry and biophysics*, 55(1), pp.1–23.
- Battin, T.J., Luyssaert, S., Kaplan, L.A., Aufdenkampe, A.K., Richter, A., Tranvik, L.J., 2009. The boundless carbon cycle. *Nature Geoscience*.
- Bidlack, W.R., Omay, S.T., Meskin, M.S., Topham, D.K.W., 2000. *Phytochemicals as bioactive agents*. CRC Press
- Boon, E.M., Downs, A., Marcey, D., 2007. Proposed Mechanism of Catalase in Catalase: H₂O₂: H₂O₂ Oxidoreductase Catalase Structural Tutorial Text
- Bouayed, J. & Bohn, T., 2010. Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses: *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(4), pp.228–237.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–33.
- Celi, P., 2010. The role of oxidative stress in small ruminants health and production. *R. Bras. Zootec. v.39*, pp.348-363

- Celi, P., 2011. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 33(2), pp.233–240
- Chelikani, P., Fita, I. & Loewen, P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 61(2), pp.192–208.
- COOKE, M. S. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195–1214.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10), 1195–214.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10), 1195–214.
- D'Archivio, M. et al., 2010. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, 11(4), pp.1321–1342.
- Di Carlo, G. et al., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65(4), pp.337–353.
- Durackova, Z., 2010. Some current insights into oxidative stress. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 59(4), pp.459–469.
- Fang, Y.-Z., Yang, S. & Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), pp.872–879. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900702009164>.
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Kokkas, S., et al., 2015. Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 82, pp.42–49
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Krouezas, A., Karaveli, C., Barda, C., Gkika, H., ... Kouretas, D. (n.d.). Assessment of Fatty Acid Allocation in Plasma and Tissues in Piglets, Using Feed Supplemented with Byproducts from Processed Olive Mill Wastewater In Vivo (*Athens, Greece*), 30(3), 291–301.
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Petrotos, K., et al., 2015. Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 86, pp.319–327.
- Gerogianni, I., Gourgoulialis, K.i., 2006. Oxidative stress and lung diseases. *Archives of Hellenic Medicine*. 23(5), pp.444–454.

- Gkoutosidis, P.E., Petrotos, K.B., Kokkora, M.I., Tziortziou, A.D., Christodouloulis, K., Goulas, P. 2011. Olive mill waste water (OMWW) treatment by diafiltration desalination and water treatment. *Volume 30, Issue 1-3, Pages 237-246.*
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, pp.1–85.
- Halliwell, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & aging*, 18(9), pp.685–716
- Hamden K1, Allouche N, Damak M, Elfeki A, 2009, Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chem Biol Interact.* 2009 Aug 14;180(3):421-32. doi: 10.1016/j.cbi.2009.04.002. Epub 2009 Apr 23.
- Han, X., Shen, T. & Lou, H., 2007. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. , 2, pp.950–988
- Harborne, J.B., 1986. Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Progress in clinical and biological research*, 213, pp.15–24.
- Hayyan, M., Hashim, M.A. & AlNashef, I.M., 2016. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical reviews*, 116(5), pp.3029–3085.
- HUGHES, R.E., 1964. REDUCTION OF DEHYDROASORBIC ACID BY ANIMAL TISSUES. *Nature*, 203, pp.1068–1069
- Jain, A. & Flora, S.J.S., 2012. Dose related effects of nicotine on oxidative injury in young, adult and old rats. *Journal of environmental biology / Academy of Environmental Biology, India*, 33(2), pp.233–238
- Janaszewska, A. & Bartosz, G., 2002. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 62(3), pp.231–236
- Khallouki, F. et al., 2003. Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 12(1), pp.67–75.
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*, 81(7), 519–33.
- Krinsky, N.I., 2002. Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of nutrition*, 132(3), p.540S–542S.
- Kris-Etherton, P.M. et al., 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American journal of medicine*, 113 Suppl 9B, p.71S–88S

- Kroon, P. A., Clifford, M. N., Crozier, A., Day, A. J., Donovan, J. L., Manach, C., & Williamson, G. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(1), 15–21
- Kumar, H. et al., 2014. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Natural product reports*, 31(1), pp.109–139.
- Kushi, L.H. et al., 2012. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(1), pp.30–67.
- Lund, M.N. et al., 2011. Protein oxidation in muscle foods: a review. *Molecular nutrition & food research*, 55(1), pp.83–95
- Lykkesfeldt, J. & Svendsen, O., 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 173(3), pp.502– 511.
- Manach, C. et al., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), pp.727–747.
- Mebirouk, M., Sbai, L., Lopez, M., Gonzalez, J. 2007. The absorption of polyphenols from olive oil mill wastewaters by sawdust and biodegradation by the fungus *phanerochaetae chrysosporium*. *Grasas y Aceites* 58(4), pp. 366-371.
- Mennen, L.I. et al., 2005. Risks and safety of polyphenol consumption. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), p.326S–329S
- Meskin, M.S., Bidlack, W.R., Davies, A.J., Omaye, S.T., 2002. *Phytochemicals in nutrition and health*. CRC Press.
- Miller, J.K., Brzezinska-Slebodzinska, E. & Madsen, F.C., 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of dairy science*, 76(9), pp.2812–2823
- Muller, F.L. et al., 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(4), pp.477–503.
- Mylonas, C. & Kouretas, D., 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In vivo (Athens, Greece)*, 13(3), pp.295–309.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 333(1), 19–39.
- Patsoukis, N. et al., 2004. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience letters*, 357(2), pp.83–86.
- Philipp Niethammer, Clemens Grabher, A. Thomas Look & Timothy J. Mitchison, 18 June 2009. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish, *Nature* 459, 996-999

- Pisoschi, A.M. & Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, pp.55–74
- Poljsak, B., 2011. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2011, p.194586.
- Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R., Prabhakar, M.C., 2004. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients.
- Rinnerthaler, M. et al., 2015. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, 5(2), pp.545–589.
- Rodrigo, R. et al., 2014. Polyphenols in disease: from diet to supplements. *Current pharmaceutical biotechnology*, 15(4), pp.304–317.
- Roland, F.B., Jr. and I.W. Sizer. 1952. A Spectrophotometric Method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by Catalase
- Scalbert, A. et al., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), pp.287–306.
- Scholz, R.W., Graham, K.S., Gumprich, E., Reddy, C.C., 1989. Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation. *Ann NY Acad Sci*. 570, pp.514–7.
- Sengupta, A., Ghosh, S. & Bhattacharjee, S., 2004. Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 5(3), pp.237–245
- Tristan P. Dew, Andrea J. Day, and, & Morgan*, M. R. A. (2005). Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components.
- Valko, M. et al., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), pp.1–40
- Valko, M. et al., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), pp.44–84.
- Villaverde, A., Morcuende, D. & Estevez, M., 2014. Effect of curing agents on the oxidative and nitrosative damage to meat proteins during processing of fermented sausages. *Journal of food science*, 79(7), pp.C1331–42.
- Παπαγαλάνης, Ν., 2014. Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I . *Δραστικές ρίζες οξυγόνου* , 26(3), pp.151–194.